

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Pharmacologie

Présentée et soutenue par :

Annie Elia TURKIEH

le : 24 avril 2012

Titre :

Contribution à l'étude du rôle physiologique de l'Apolipoprotéine O.

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

INSERM- I2MC

Directeur(s) de Thèse :

Dr. Philippe ROUET

Dr. Fatima SMIH-ROUET

Rapporteurs :

Dr. Catherine BRENNER-JAN

Dr. Florence PINET

Pr. Uwe SCHLATTNER

Membre(s) du jury :

Pr. Michel GALINIER

Dr. Catherine BRENNER-JAN

Dr. Florence PINET

Pr. Uwe SCHLATTNER

Dr. Philippe ROUET

Dr. Fatima SMIH-ROUET

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

Co-Directrice de thèse

A MES PARENTS
A MA SŒUR

Remerciements

Une thèse est une expérience scientifique et humaine. Cette section est pour moi l'occasion de remercier tous ceux qui m'ont soutenue dans mon travail.

Je tiens à remercier, en premier, le Pr. Michel Galinier et le Dr. Philippe Rouet pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire et pour avoir mis à ma disposition tout le matériel essentiel pour pouvoir travailler dans les meilleures conditions.

Je remercie particulièrement mes directeurs de thèse, le Dr. Philippe Rouet et le Dr. Fatima Smih pour m'avoir soutenue et guidée dans mon travail. Grand merci pour vos conseils précieux, votre encouragement ainsi que la confiance que vous m'avez accordé pour réaliser ce travail. Je ne vais jamais oublier ce que vous m'avez appris : « ne jamais baisser les bras, avoir confiance et croire pour obtenir ce que l'on veut ».

Je remercie également tous les autres membres de mon équipe :

- Le Dr. Franck Desmoulin pour ses conseils judicieux, ses discussions scientifiques ainsi que son soutien moral tout au long de la thèse.
- Céline Caubère pour toutes ces années vécues ensemble, pour sa sympathie, pour nos discussions scientifiques et personnelles ainsi que son aide pour réaliser certaines expériences.
- Tous les stagiaires et les techniciennes qui ont travaillé avec moi pour leur aide et leur humour : Pauline D., Naina A., Sara B., Alice M. Mathieu B. Marie B., Sadek S., Caroline F., Anais F., Adeline D., Matthieu B., Charlotte T., Clement D., Mannon B. et Pauline F.

Je remercie aussi tous les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail et plus particulièrement mes rapporteurs, Dr. Catherien Brenner-Jan, Dr. Florence Pinet et le Pr. Uwe Schlattner, pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture du manuscrit et à la rédaction du rapport.

Mes remerciements s'adressent aussi à toutes les plateformes du centre, la lipidomique, la génomique, l'imagerie, la microscopie électronique, la zootechnie et à

l'équipe « plasticité des tissus adipeux (U1031) » pour m'avoir mis à disposition le matériel nécessaire pour réaliser certaines expériences.

Je tiens à remercier mon adorable famille qui a toujours été présente pour me soutenir et m'encourager dans tout ce que j'ai fait. Grand merci à Elie et Madeleine pour leur amour, leur confiance en moi et pour tout ce qu'ils ont fait pour moi, mais aussi pour leurs belles valeurs qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Un merci spécial à mon adorable petite sœur Katia pour son amour, ses encouragements et son aide dans les moments les plus difficiles.

Je remercie aussi les autres membres de la famille et je pense fort à certaines personnes qui comptais beaucoup pour moi, Argent, Michel, Jacques et Elias mais qui malheureusement ne sont plus là. Je voudrais vous dire que j'ai réussi, comme je vous avais promis, à continuer mes études jusqu'au bout.

Finalement, Je voudrais remercier tous mes amis plus spécifiquement Carine, Ghinwa, Julie, Patty, Simona, Chadi, Georges, Rawad et Ziad, pour toutes les années qu'on a vécues ensemble, pour leur encouragement et leur soutien qui ont rendu ma vie beaucoup plus facile en France. Je remercie particulièrement Yoann pour son aide et sa présence à mes côtés dans les bons comme dans les mauvais moments.

Résumé

Pour maintenir sa fonction de pompe, le cœur doit produire une quantité suffisante d'ATP. Dans un cœur adulte, 70% de l'ATP est produit par l'oxydation des acides gras et 30% provient de la glycolyse. En situation de diabète, d'obésité ou d'hypertension, le cœur consomme presque exclusivement les acides gras. Ce changement du profil métabolique entraîne une accumulation de lipides dans le cœur et un dysfonctionnement mitochondrial conduisant à une lipotoxicité cardiaque et à l'installation d'une cardiomyopathie.

L'Apolipoprotéine O ou ApoO est une nouvelle apolipoprotéine découverte en 2006 par notre équipe dans le cœur des chiens soumis à un régime gras hypercaloriques pendant 9 semaines. L'expression de cette protéine augmente également dans le cœur du patient diabétique. Durant ma thèse, j'ai participé à la recherche de la fonction de l'ApoO en étudiant les conséquences de la surexpression de l'Apo O cardiaque sur le métabolisme et la lipotoxicité. Durant cette étude nous avons réalisé des expériences « *in vitro* » et « *in vivo* » en utilisant respectivement une lignée de cardiomyoblastes (H9c2) et 3 lignées de souris transgéniques surexprimant l'Apo O au niveau cardiaque. Nous avons voulu valider les résultats obtenus dans des biopsies de cœurs humains obtenus au décours d'une circulation extracorporelle mise en place lors de chirurgies cardiaques à l'hôpital Rangueil de Toulouse. Nous avons montré que l'Apo O est localisée dans la membrane interne mitochondriale et interagit avec un des constituant/régulateur du pore de transition mitochondrial (MPTP), l'adénine nucléotide translocase (ANT). Cette interaction se traduit par une ouverture du pore, un découplage partiel et une augmentation de la consommation globale d'oxygène. L'activation de la respiration va faire appel à plus de substrats dans de la mitochondrie ce qui va se traduire par une consommation plus importante d'acides gras. Pour subvenir aux besoins de ce puits métabolique la cellule va augmenter l'expression des transporteurs des acides gras de la membrane plasmique ainsi que l'entrée de ces derniers. Lorsque les capacités oxydatives de la mitochondrie sont dépassées, des lipides toxiques tels que les diglycérides sont générés et leur accumulation potentialise l'apoptose induite par l'ouverture du pore mitochondrial. Cette cascade d'événements est inhibée lorsque l'Apo O est démunie de sa séquence d'adressage à la mitochondrie suite à la délétion de sa région N-terminale (ApoO Δ 1-40) déviant ainsi sa localisation vers le cytoplasme. Les conséquences de la surexpression de l'ApoO sont également diminuées si les cardiomyoblastes sont traités avec de très faibles doses de cyclosporine, un inhibiteur du pore de transition mitochondriale (MPTP).

Ces résultats proposent l'Apo O comme un nouveau régulateur du MPTP et montrent un modèle de dysfonctionnement mitochondrial conduisant à la lipotoxicité et la cardiomyopathie. L'Apo O pourrait être donc une nouvelle cible pharmacologique pour lutter contre la cardiomyopathie diabétique.

Abstract

The mitochondrial permeability transition pore (MPTP), first considered to play a key role in "life or death" decisions of the cell has been proposed to be a target for cardioprotection during heart disease. This pore enables free passage into the mitochondria for molecules and metabolites smaller than 1.5 kDa⁶, including protons thus leading to mitochondrial uncoupling. The exact protein composition of the MPTP is still under debate but minimally includes cyclophilin D and adenine nucleotide translocase (ANT) which is proposed to be a regulatory component. Thus, MPTP regulators are of central importance to the control of mitochondrial (dys)function and the fate of cardiomyocytes. In this study, we demonstrate the importance of apolipoprotein O (ApoO) as a new signal regulator of the MPTP.

Through a functional genomics study aimed at identifying genes differentially regulated in the heart by obesity¹³, we discovered a new apolipoprotein (ApoO) as overexpressed in the heart of diabetic patients. In the present study, we sought to uncover how changes in the expression of this protein relate to modifications of cardiac function. We used cardiac myoblasts, in vivo transfected mouse liver, human heart samples and cardiac specific transgenic mouse lines constitutively expressing ApoO at physiological levels. These mice, exhibited depressed ventricular function, characteristic patterns of systolic dysfunction, and dilated cardiomyopathy. We show that ApoO localizes within mitochondria and that its expression associates with mitochondrial dysfunction in mouse and human heart. ApoO interacts with ANT and causes the MPTP to adopt an open state, inducing mild uncoupling. Consequently, mitochondrial respiration and fatty acid metabolism are enhanced. This cascade of events generates a mitochondrial metabolic sink whereby cells accumulate lipids and lipotoxic byproducts leading to apoptosis, loss of cardiac myoblasts and cardiomyopathy mimicking the metabolic phenotype of the diabetic heart. We propose a model for the original molecular mechanisms that may account for the ApoO induced mitochondrial dysfunction through the MPTP opening regulation. The molecular mechanisms that initiate, mediate and trigger mitochondrial dysfunction in response to lipid overload remain unclear. Our results distinguish the interplay between mitochondrial dysfunction and lipotoxicity and demonstrate, for the first time, the implication of the permeability transition pore in lipid metabolism in mouse and human heart. ApoO-model could be an original link between impaired mitochondrial heart function and lipid accumulation. ApoO may open up novel strategies to control lipid overload in pathophysiological situation like obesity, diabetes and cardiomyopathy.

Liste des abreviations

ABCA-1 : ATP Binding Cassette Transporter A-1
ACC : Acétyl CoA Carboxylase
ACC : Acétyl-CoA Carboxylase
ACS : Acyl-CoA Synthétase
ACSL: Long chain Acyl-CoA Synthétase
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine Diphosphate
AICAR: 5- Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucléotide
AIF : Apoptose Inducing Factor
AMP : Adénosine Monophosphate
AMPK : Adénosine Monophosphate Activated Protein Kinase
ANT: Adenine Nucléotide Translocase/ Transporteur des nucléotides adényliques
Apaf-1 : Apoptosis protease activating factor 1
Apo : Apolipoprotéine
ARN_t : Acide Ribonucléique de transfert
ATP : Adénosine Triphosphate
ATPase : Adénine Triphosphate synthase
Atra : Atractyloside
BA : Bongkrelic Acid/ Acide bongkrelique
BAX : Bcl₂ Associated X protein
Bcl₂: B Cell leukemia/lymphoma 2
Bcl-Xl: B cell Lymphoma extra large
Bid: BH3 Interacting Domain death agonist
Ca²⁺ : Ion Calcium
Caspase: Cysteine aspartate specific protease
CAT : Catalase
CAtra : carboxyatractyloside
CCCP: Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl hydrazone
CETP : Cholesterol Ester Transfer Protein/ Protéine de Transfert des esters de cholesterol
CK: Créatine Kinase
CO₂ : Dioxyde de carbone
CoA : Coenzyme A
CoQ : Quinone
CoQH : semi Quinone
CoQH₂ : Quinol
Cox : Cytochrome C Oxydase
CPT 1/2: Carnitine PalmitoTransférase 1 ou 2
CsA : Cyclosporine A
Cu A/B : cuivre A ou B
Cyp D : Cyclophilidine D
Cyt C : Cytochrome C
DCFDA: Dichlorodihydrofluorescein diacétate
DG : Diglycérides
DISC : death inducing signalling complexe
DMA: Diméthylamiloide

DOX: Doxorubicine
EMD: inhibiteur de l'échangeur Na⁺/H⁺
Endo G: Endonucléase G
ERR: Estrogen Related Receptor
FABPm: plasma membrane fatty Acid Binding Protein
FADD: fas associated protein with death domain
FADH2 : Flavine Adénine Dinucléotide Dihydrogène
FAME: Fatty Acid Methyl Ester
FAT/CD36 : Fatty Acid Translocase/ Cluster of Differentiation 36
FATP: Fatty Acid Transport Protein
FE: Fraction d'Ejection
Fe-S : Fer-Souffre
Fig : Figure
FMN : Flavine mononucléotide
FR: fraction de Raccourcissement
FSHD : Fasioscapula humeral muscular dystrophy
g : gramme
g/l : gramme par litre
GABP: GA Binding protein
GK: Goto kakizaki rat
Glut ou GLUT 1/4: Glucose Transporter 1 ou 4/ Transporteur de glucose 1 ou 4
GPx : Glutation Peroxydase
GR : Glutathion Réductase
GSH/GSSG : Glutathion réduit/ Oxydé
GSK 3 β : Glycogène sunthase 3 β
GST : Glutathione S Transférase
H₂O : eau
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HDL : High Density Lipoprotein
HK : Hexokinase
IAP : Inhibitor Apoptosis Protein
IC : Insuffisant Cardiaque
IDL : Intermediate Density Lipoprotein
IM/IMM: mitochondrial inner membrane
IMS: mitochondrial intermembrane space
inS2: insuline 2
Interval PR: temps en seconde entre le début de l'onde P et celui de l'onde R
kDa : kilodalton
KO : Knock-Out
LCAT : Lecithine Cholesterol Acyl Transférase
LDL : Low Density Lipoprotein
LDLR : Low Density Lipoprotein Receptor
LPL : Lipoprotéine Lipase
MCAD : Medium Chain Acyl CoA dehydrogenase
MCD : Malonyl CoA Décarboxylase
MDA : Malondialdéhyde
mg/kg: milligramme par kilogramme
mg/l : milligramme par litre

Na⁺/H⁺: Ion sodium/ proton
NAD⁺/NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydé/ réduit
ND : NADH Déshydrogénase
NHE: Na⁺/H⁺ Exchanger
NO : oxyde Nitrique
NRF: Nuclear Respiratory Factor
O : Oxygène
O₂ : Dioxygène
O₂⁻ : L'anion superoxyde
OH⁻ : Ion hydroxyle
OM/OMM: outer mitochondrial membrane
ONOO⁻ : Peroxynitrite
OSCP : Oligomycin Sensitivity Conferral Protein
OXPHOS : Oxydative Phosphorylation
P38 MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase 38
PDH : Pyruvate Déshydrogénase
PDK : Pyruvate Déshydrogénase Kinase
PE: Phenylephrine
PEK 1/2 : Phosphofructokinase 1 ou 2
PGC1: Peroxisome proliferator activated receptor γ co activator-1
pH : potentiel d'Hydrogène
Pi : Phosphate inorganique
PiC : Phosphate Inorganic Carrier/ Transporteur de Phosphate Inorganique
POLRMT : ARN polymérase mitochondriale
PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptor
Prx : Peroxyredoxines
PTP : Pore de Transition de Perméabilité
RIP 140 : Receptor Interacting Protein 140
ROO : radicaux peroxydes
ROS : Reactive Oxygen Species/ Espèces réactives d'oxygène
RPB: Récepteur Périphérique des Benzodiazépines
RR: Ruthenium Red
SDH : Succinate Déshydrogénase
SERCA 2a : Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2a
SLC25: Solute carrier family 25
SiRNA: Small interfering RNA
SOD : Superoxyde Dismutase
SR-BI : Scavenger Receptor Class B1/ Récepteur d'épuration de classe B1
STZ: Streptozotocine
TFAM: Mitochondrial Transcription factor A
TFBM: Mitochondrial Transcription factor B
TNF/ TNFR : Tumor necrosis Factor/ Tumor necrosis Factor
TOM/TIM : Translocase of the Outer Membrane/ Translocase of the Inner Membrane
TTFA : Thénoyltrofluoroacétate
UCP : Uncoupling Protein/ protéine découplante
UCP-DTA : UCP promoter driven Diphtheria Toxin A transgenic mice
VDAC: Voltage Dependent Anion Channel
VLDL : Very Low Density Lipoprotein

vMIA: Viral mitochondrial inhibitor of apoptosis

Vpr: Viral protein R

ZDF: Zucker Diabetic Fatty Rat

Δp : force protomotrice

ΔpH : différence de pH de part et d'autre de la membrane mitochondriale

$\Delta \Psi$: potentiel de la membrane mitochondriale

μM : micromètre

4 HNE : 4- Hydroxynonéal

Sommaire

Sommaire

Avant propos.....	1
Revue bibliographique.....	3
I. Transport des lipides dans le sang	4
1. Les classes de lipoprotéines	4
1.1. Les chylomicrons	4
1.2. Les lipoprotéines de basse densité	5
1.3. Les Lipoprotéines de Haute Densité.....	5
2. Rôles particuliers des apolipoprotéines	6
2.1. Apolipoprotéine A	6
2.2. Apolipoprotéine B	7
2.3. Apolipoprotéine C	8
2.4. Apolipoprotéine D	8
2.5. Apolipoprotéine E.....	9
2.6. Apolipoprotéine F.....	9
2.7. Apolipoprotéine H	9
2.8. Apolipoprotéine J	9
2.9. Apolipoprotéine L.....	10
2.10. Apolipoprotéine M	10
2.11. Apolipoprotéine N	10
2.12. Apolipoprotéine R	11
2.13. Apolipoprotéine O	11
II. Métabolisme énergétique cardiaque.....	12
1. Métabolisme du glucose	12
1.1. Généralité.....	12

1.2.	Régulation du métabolisme du glucose	13
2.	Métabolisme des acides gras	14
2.1.	Généralité	14
2.2.	Régulation du métabolisme des acides gras	15
2.2.1.	Effet d'AMPK	15
2.2.2.	Effet des PPAR :	16
III.	Lipotoxicité cardiaque en cas de diabète	17
1.	Cardiomyopathie diabétique.....	17
1.1.	Modèles de diabète de type 1.....	17
1.1.1.	Traitement à la streptozotocine (STZ).....	17
1.1.2.	Souris OVE26 :	18
1.1.3.	Souris Akita :	18
1.2.	Modèles de diabète de type 2.....	18
1.2.1.	Souris ob/ob	18
1.2.2.	Souris db/db	18
1.2.3.	Rat ZDF (Zucker diabetic fatty rat)	19
2.	Acides gras et dysfonctionnement cardiaque	20
2.1.	Souris surexprimant LPL dans le cœur	20
2.2.	Souris surexprimant FATP1 dans le cœur.....	20
2.3.	Souris surexprimant ACS-1 dans le cœur	20
2.4.	Souris surexprimant PPAR α dans le cœur	21
IV.	Mitochondrie.....	21
1.	Structure.....	21
1.1.	La membrane externe	22
1.2.	La membrane interne.....	22
1.3.	La matrice mitochondriale	22

2.	Fonctions	22
2.1.	Production d'ATP.....	23
2.1.1.	Mécanisme	23
2.1.2.	Composition du système de phosphorylation oxydative	24
2.1.2.1.	Le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase)	24
2.1.2.2.	Le complexe II (Succinate-ubiquinone oxydoréductase)	25
2.1.2.3.	Le complexe III (Ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase).....	26
2.1.2.4.	Le complexe IV (Cytochrome c oxydase).....	27
2.1.2.5.	Le complexe V (ATP synthase).....	27
2.1.2.6.	Les surpercomplexes	28
2.2.	L'apoptose	30
2.2.1.	Mécanisme	30
2.2.2.	Constitution du pore de transition mitochondriale (PTP).....	33
2.2.2.1.	VDAC (voltage dependent anion channel)	34
2.2.2.2.	ANT (adenine nucleotide translocator)	35
2.2.2.3.	CyP D (Cyclophilin D)	36
2.2.2.4.	PiC (phosphate inorganic carrier).....	36
2.2.2.5.	Le complexe I de la chaîne respiratoire.....	37
2.2.2.6.	Créatine Kinase (CK)	37
2.2.2.7.	L'hexokinase (HK)	38
2.2.2.8.	Le récepteur périphérique des benzodiazépines (RPB)	38
V.	Dysfonctionnement mitochondrial	40
1.	Le stress oxydatif	40
1.1.	ROS : Production et élimination	40
1.2.	Stress oxydatif	41
1.2.1.	Domage de l'ADN mitochondrial	42

1.2.2.	Peroxydation des lipides.....	42
1.2.3.	Oxydation des protéines	42
1.3.	ROS et maladies cardiaques	43
2.	Découplage.....	44
2.1.	Les protéines découplantes (UCP) : expression et rôles	44
2.2.	UCP3 et maladies cardiaques	45
3.	Biogenèse mitochondriale.....	46
3.1.	Rôle de NRF, ERR et TFAM dans la biogenèse mitochondriale	47
3.1.1.	TFAM	47
3.1.2.	NRF	47
3.1.3.	ERR.....	48
3.2.	Rôle de PGC1 α dans la régulation de la Biogenèse mitochondriale	50
3.3.	Rôle de PGC1 α dans le développement d'une cardiomyopathie	51
3.4.	Rôle de la biogenèse mitochondriale dans les maladies cardiaques	52
4.	Pore de transition du potentiel mitochondrial (mPTP) et maladies cardiaques.....	53
5.	Dysfonctionnement du transporteur des nucléotides adényliques (ANT).....	55
5.1.	Expression et structure de l'ANT	55
5.2.	Fonctions de l'ANT :.....	55
5.3.	ANT et le dysfonctionnement mitochondrial:.....	57
5.4.	ANT et maladies :.....	57
	Résultats expérimentaux.....	59
	Article : Apolipoprotein O induces lipid overload, apoptosis and cell death by opening the mitochondrial permeability transition pore in mouse and human heart.	60
	Discussion.....	110
1.	Apo O est une protéine mitochondriale :.....	111
2.	Apo O interagit avec ANT et favorise l'ouverture un pore non spécifique :	111

3. La surexpression d'Apo O entraine une augmentation de la respiration :	112
4. La surexpression d'Apo O favorise le métabolisme des acides gras :	114
5. La surexpression de l'Apo O entraine une cardiomyopathie :	115
6. L'Apo O et l'homeostasie calcique :	117
Conclusion et perspectives.....	118
Annexes.....	121
Article 1: Blood Signature of Pre-Heart Failure: A Microarrays Study	122
Article 2: Metabonomic analyses of plasma reveal lactate to cholesterol ratio as an independent prognostic factor of short-term mortality in acute heart failure.....	134
Article 3: Resistin impairs the metabolic action of insulin in muscle cells through an extensive shift in pyruvate homeostasis	159
Références bibliographiques	189

Avant propos

Les incidences de l'obésité et du diabète sont en constante croissance dans le monde. Ces maladies sont caractérisées par une accumulation de lipides dans le cœur et constituent un facteur de risque d'insuffisance cardiaque. De nombreuses études ont montré que l'accumulation de lipides dans le cœur, encore nommée lipotoxicité, est corrélée à une apoptose, une dysfonction mitochondriale et une cardiomyopathie (Borradaile & Schaffer, 2005) (Schrauwen et al, 2010).

La mitochondrie est un organe clef de la cellule. Elle est impliquée dans de nombreux processus tels que la production d'ATP, l'homéostasie de calcium et la mort cellulaire. Il a été démontré qu'un dysfonctionnement mitochondrial dû à une altération de l'expression ou de l'activité des protéines mitochondriales conduisait à une dysfonction cardiaque (Russell et al, 2005). Dans la situation de diabète et d'obésité, l'accumulation de lipides dans le cœur est associée à un dysfonctionnement mitochondrial tel que la production excessive des espèces réactives d'oxygène (ROS), l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP) conduisant à la libération des protéines proapoptotiques et un découplage respiratoire (Bugger & Abel, 2008; Duncan, 2011).

Notre équipe s'intéresse aux conséquences physiopathologiques de l'obésité au niveau cardiaque. Des études sur un modèle canin ont été réalisées au sein de notre équipe afin d'étudier l'effet d'un régime gras hypercalorique de neuf semaines sur le transcriptome cardiaque (Philip-Couderc et al, 2003). Ces travaux ont mis en évidence, par génomique fonctionnelle, une régulation différentielle de 38 gènes au niveau de l'auricule cardiaque droit dont 11 codant pour des protéines de fonctions inconnues. Un des ces gènes a suscité l'intérêt de l'équipe car l'analyse *in silico* de sa séquence a révélé qu'il code pour une nouvelle protéine possédant un domaine de la famille apolipoprotéine A1/A4/E et que nous avons nommé Apolipoprotéine O selon la nomenclature internationale (Lamant et al, 2006).

Une apolipoprotéine est une protéine permettant le transport des lipides dans le sang. En plus de leur rôle dans le métabolisme des lipoprotéines, certaines apolipoprotéines sont impliquées dans des processus intracellulaires pour jouer un rôle (favorisant ou protecteur) dans certaines maladies telles que l'Alzheimer, le cancer, l'obésité et le diabète (Hunter et al, 2005; Jong et al, 2001; Katzman, 1994; Nielsen et al, 2002).

L'Apo O est surexprimée dans le cœur des patients obèses, diabétiques et hypertendus (Lamant et al, 2006). Mes travaux de thèse ont consisté à étudier les conséquences de la surexpression de l'Apo O sur le métabolisme lipidique et la lipotoxicité au niveau cardiaque.

Ce mémoire de thèse est divisé en plusieurs parties :

- Une revue bibliographique qui débute par un petit résumé sur les apolipoprotéines en général, le métabolisme cardiaque ainsi que le phénomène de la lipotoxicité dans le cœur. Etant donné que la mitochondrie joue un rôle clef dans ces deux processus, j'ai consacré un paragraphe à la structure et fonctions de cet organite. Une dernière partie traitera l'effet du dysfonctionnement mitochondrial sur l'altération de la fonction cardiaque.

- Le reste du mémoire concerne les résultats et leur discussion. Une conclusion ainsi que les perspectives qui s'ouvrent suite à cette étude sont rédigées à la fin de ce mémoire.

Revue bibliographique

I. Transport des lipides dans le sang

Les graisses absorbées dans l'alimentation et les lipides synthétisés par le foie et les tissus adipeux doivent être véhiculés entre les différents tissus pour leurs utilisations ou leur stockage. Les lipides étant insolubles dans l'eau, leur transport dans un environnement aqueux comme le plasma sanguin nécessite leur association à des protéines amphipatiques « les apolipoprotéines ».

Ce complexe lipide-apolipoprotéine est nommé « lipoprotéine ». Il est constitué d'un noyau hydrophobe, comprenant les triglycérides et les esters de cholestérol, recouvert d'une surface constituée d'une couche de phospholipides, de cholestérol non estérifié et d'apolipoprotéines (Apo) (**Fig.1**).

1. Les classes de lipoprotéines

Les différentes classes de lipoprotéines se distinguent en fonction de leur taille, leur densité, leur compositions relatives en lipides et en protéines, leur fonction et leur lieux de synthèse.

1.1. Les chylomicrons

Les chylomicrons sont les plus grandes lipoprotéines. Leur noyau lipidique est constitué à plus de 80 % de triacylglycérol associé à du cholestérol exogène fournis par le régime alimentaire. La protéine structurale majoritaire est l'Apo B48. Les chylomicrons sont synthétisés et sécrétés par les intestins vers les autres tissus.

Après leur entrée dans le courant sanguin, les triacylglycérols des chylomicrons sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL). Les tissus captent alors les produits d'hydrolyse, acides gras et monoacylglycérols pour leur métabolisme. Les chylomicrons diminuent de taille au fur et à mesure que leurs triacylglycérols sont hydrolysés. Ils deviennent alors des remnants de chylomicrons enrichis en cholestérol qui sont ensuite captés par le foie. Les chylomicrons assurent donc le transport des triacylglycérols alimentaires au muscle et au tissu adipeux et du cholestérol alimentaire au foie (Redgrave, 2004).

1.2. Les lipoprotéines de basse densité

Les VLDL (*very low density lipoprotein*) sont synthétisées et secrétées par le foie. Elles sont constituées à 80% de triglycérides. La protéine constituante majoritaire est l'Apo B100. Les IDL (*intermediate density lipoprotein*) sont des restes de VLDL formés après l'hydrolyse par la LPL des triglycérides des VLDL. Le core lipidique est constitué de pratiquement autant de triglycéride que d'ester de cholestérol.

Les LDL (*low density lipoprotein*) sont constituées principalement d'une seule molécule d'Apo B qui occupe la moitié de la surface de la particule. Le core lipidique est riche en ester de cholestérol et contient la majorité du cholestérol circulant. Cette lipoprotéine résulte d'un traitement hépatique des remnants de VLDL.

Ces lipoprotéines de basse densité transportent les lipides du foie aux tissus pour assurer leur approvisionnement. Les cellules des tissus captent le cholestérol exogène par l'endocytose des particules de LDL grâce à la fixation de l'Apo B100 au récepteur LDLR (*low density lipoprotein receptor*). Les vésicules ainsi formées vont fusionner avec des lysosomes. Les LDL vont être dégradées en acides aminés, cholestérol et acides gras disponibles pour la cellule (Brown & Goldstein, 1992).

1.3. Les Lipoprotéines de Haute Densité

Les HDL (*high density lipoprotein*) sont principalement constituées d'esters de cholestérol et la protéine structurale est majoritairement l'Apo A1. Les HDL assurent le transport reverse du cholestérol, c'est-à-dire qu'elles retirent le cholestérol des tissus et l'amènent au foie. L'origine de ces particules demeure mal établie : elles peuvent être secrétées directement par les cellules ou issues du métabolisme intravasculaire des lipoprotéines.

Les HDL commencent leur processus de maturation sous forme discoïdale « pré- β -HDL » et contiennent de l'Apo A1 et des phospholipides. Les particules discoïdales sont converties en particules sphériques (HDL2 ou HDL3) via l'action de LCAT (lécithine cholestérol acyl transférase) qui estérifie le cholestérol à la surface de la HDL discoïdale. Des études ont montré que l'efflux du cholestérol cellulaire ne se fait pas par un mécanisme de transfert passif mais via l'interaction de l'Apo A1 avec ABCA-1 (*ATP-binding-cassette-transporter-A-1*) ou avec le SR-BI (*scavenger receptor class B1*) (Barter et al, 2003).

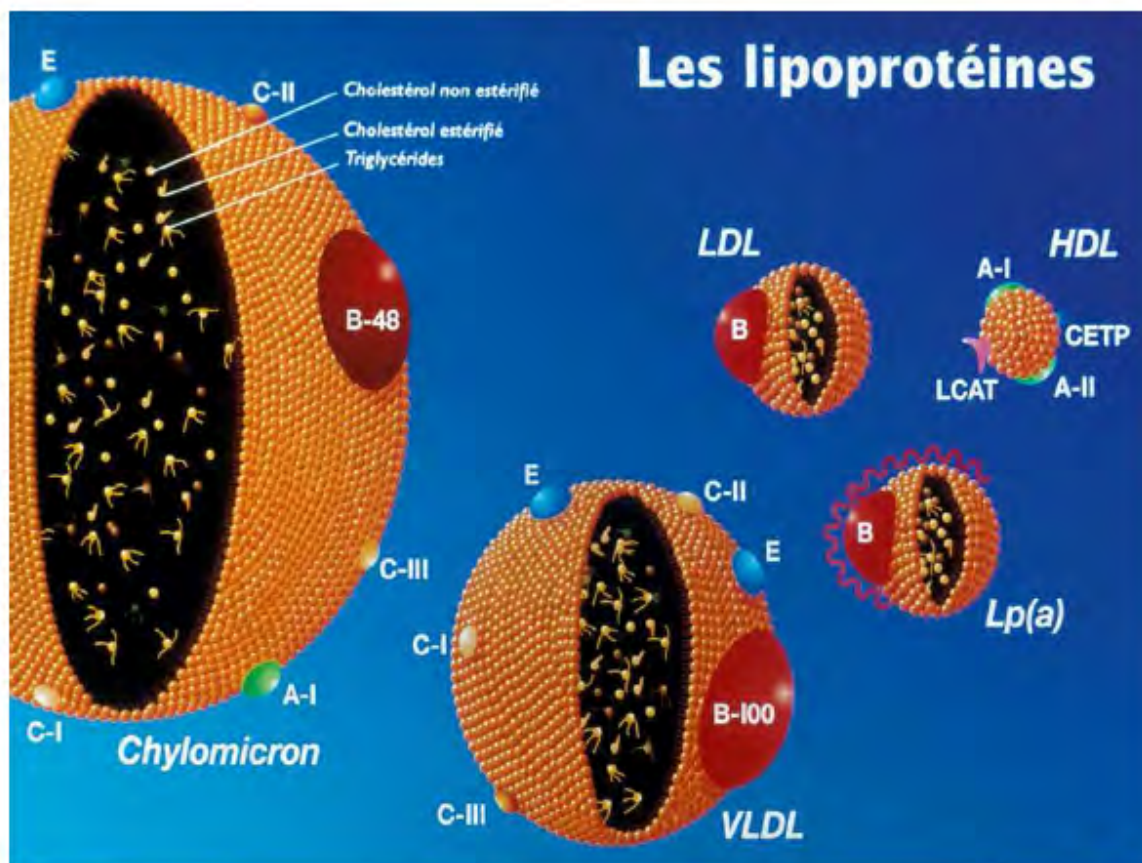


Figure 1 : Représentation des différentes lipoprotéines et de leurs constituants. Une lipoprotéine est constituée d'un noyau hydrophobe, comprenant les triglycérides et les esters de cholestérol, recouvert d'une surface constituée d'une couche de phospholipides, de cholestérol non estérifié et d'apolipoprotéines. Les différentes classes de lipoprotéines se distinguent en fonction de leur taille, leur densité, leur compositions relatives en lipides et en protéines, leur fonction et leur lieux de synthèse. A-I, A-II : Apolipoprotéine A I et II ; C-I, C-II, C-III : Apolipoprotéine C I, II et III ; B-48, B-100 : Apolipoprotéine B 48 et 100 ; E : Apolipoprotéine E ; CETP : Cholesterol Ester Transfert Protein, LCAT : Lécithine Cholestérol Acyl Transférase. (Emmerich & Bruneval, 2005)

2. Rôles particuliers des apolipoprotéines

Les apolipoprotéines (Apo) sont les constituants protéiques des lipoprotéines. Ces protéines permettent la formation et la stabilisation des particules lipoprotéiniques, elles jouent donc un rôle fondamental dans le transport sanguin des lipides mais elles ont aussi un grand nombre d'autres fonctions spécifiques.

2.1. Apolipoprotéine A

Il existe 4 formes d'Apolipoprotéines A : A1, A2, A4 et A5.

La protéine Apo A1 est produite principalement par le foie et l'intestin. C'est une protéine de 28.3 kDa et sa concentration plasmatique est de 1 à 1.5 g/l. Elle représente 70 % des protéines des HDL. Apo A1 active l'efflux cellulaire du cholestérol et a un effet anti-athérogénique et protecteur contre les maladies cardiaques (Fielding & Fielding, 1995).

L'Apo A2 est une protéine de 17.3 kDa, principalement synthétisée par le foie. Sa concentration plasmatique est de 0.5 à 0.7 g/l. elle représente 20 % des protéines totales des HDL, elle est aussi présente sur les chylomicrons. L'Apo A2 a un effet athérogénique en déplaçant l'Apo A1 des surfaces des HDL limitant ainsi le transport reverse du cholestérol et le remodelage des HDL (Lagocki & Scanu, 1980).

L'Apo A4 est une protéine de 46 kDa synthétisée dans le foie et l'intestin. Sa concentration plasmatique est de 1.3 à 1.6 g/l. Après la lipolyse des chylomicrons, l'Apo A4 se retrouve associée au HDL. L'Apo A4 est impliquée dans divers mécanismes comme la régulation de la prise alimentaire (Tso et al, 2001), la motilité gastro-intestinale, la protection contre l'oxydation des lipides et l'athérosclérose (Ostos et al, 2001).

L'Apo A5 est une protéine de 39 kDa produite par le foie ; elle est présente dans les chylomicrons, les VLDL et les HDL. Une surexpression de l'Apo A5 entraîne une diminution drastique des taux de triglycérides (van der Vliet et al, 2002) et de la production de VLDL (Schaap et al, 2004).

2.2. Apolipoprotéine B

Il existe 2 formes d'apolipoprotéine B : B48 et B100

L'Apo B48 est une protéine de 260 kDa et sécrétée par l'intestin. Elle représente la protéine majoritaire des chylomicrons et elle est obligatoire pour la sécrétion de ces lipoprotéines.

L'Apo B100 est une protéine de 550 kDa et d'une concentration plasmatique de 0.8 à 1.2 g/l. Elle est sécrétée par le foie et elle est nécessaire pour l'assemblage des VLDL (Nielsen et al, 2002; Schumaker et al, 1994). Cette protéine est aussi présente sur les IDL et LDL. La surexpression de l'Apo B100 dans le cœur des souris protège contre la cardiomyopathie diabétique (Nielsen et al, 2002).

2.3. Apolipoprotéine C

Il existe 4 formes d'Apo C : C1, C2, C3 et C4

L'Apo C1 est une protéine de 6.6 kDa et sécrétée par le foie et l'intestin. Sa concentration plasmatique est de 0.5 à 1 g/l et se trouve associée au HDL, VLDL et chylomicrons. La surexpression de l'Apo C1 chez des souris transgéniques est associée à la protection contre l'obésité et l'insulino-résistance (Jong et al, 2001).

L'Apo C2 est une protéine de 8.8 kDa et sécrétée par le foie et l'intestin. Sa concentration plasmatique est de 0.3 à 0.5 g/l et se trouve associée au HDL, VLDL et chylomicrons. Elle joue un rôle dans l'hydrolyse des lipoprotéines riche en triglycérides en activant la LPL (Storjohann et al, 2000). Une déficience en Apo C2 entraîne une hypertriglycéridémie.

L'Apo C3 est la plus abondante des Apo C dans le plasma humain avec une concentration de 1.2 g/l et représente 60 % de la masse protéique totale des HDL. L'Apo C3 est principalement synthétisée dans le foie, associée au VLDL, et en plus faible quantité par les intestins dans les chylomicrons. L'Apo C3 inhibe la lipolyse des lipoprotéines riches en triglycérides en inhibant la LPL, ce qui pourrait contribuer à une hypertriglycéridémie (Ito et al, 1990).

L'Apo C4 est une protéine de 11 kDa exprimée par le foie. Elle est présente dans les VLDL, ou elle représente 0.7 % des apolipoprotéines totales. L'Apo C4 pourrait avoir un effet inhibiteur de la lipolyse comme l'Apo C3 (Allan & Taylor, 1996).

2.4. Apolipoprotéine D

L'Apo D, ou Apo A3, est une protéine de 29 kDa associée au HDL, LDL et VLDL. Elle est produite par différents organes : foie, intestin, rate, pancréas, cerveau, testicules, surrénales, rein. Apo D peut intervenir dans la maintenance et la réparation des systèmes nerveux centraux et périphériques, elle est sous-exprimée lors de la formation des tumeurs cérébrales (Hunter et al, 2005).

2.5. Apolipoprotéine E

L'Apo E présente plusieurs isoformes, E1 à E7, et est synthétisée par différents types cellulaires comme le foie, les reins, le tissu adipeux, les macrophages et le cerveau. C'est une protéine de 34 kDa et sa concentration plasmatique est comprise entre 0.4 et 1.4 g/l. L'Apo E est un composant des chylomicrons, des VLDL, des IDL et des HDL. En plus de son rôle dans l'assemblage des lipoprotéines, l'Apo E est aussi un antioxydant (Miyata & Smith, 1996), un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire (Riddell et al, 1997), un facteur antiprolifératif (Ishigami et al, 1998), athéroprotecteur (Zhang et al, 1992), neuroprotecteur (Kitagawa et al, 2002), immunomodulateur (Zhou et al, 1998). L'Apo E est un activateur de la phosphorylation d'Akt / PKB des voies de signalisations cellulaires (Laffont et al, 2002). L'Apo E aurait aussi un rôle sur la longévité humaine (Schachter et al, 1994) et dans l'initiation de la maladie d'Alzheimer (Katzman, 1994).

2.6. Apolipoprotéine F

L'Apo F est une protéine de 29 kDa exprimée principalement dans le foie. Elle est présente dans les LDL, VLDL et HDL. L'Apo F régule le transport du cholestérol en inhibant la CETP (Wang et al, 1999b).

2.7. Apolipoprotéine H

L'Apo H est une protéine de 54.2 kDa, produite par le foie et le placenta, sa concentration plasmatique est de 0.2 g/l. L'Apo H est présente en surface des VLDL et des HDL mais la majorité circule librement. L'Apo H est impliquée dans le système de coagulation et présente à la fois des activités procoagulantes et anticoagulantes (McNeil et al, 1990). L'Apo H est aussi nécessaire à l'homéostasie placentaire et est impliquée dans l'activation des cellules endothéliales et les mécanismes apoptotiques (Miyakis et al, 2004).

2.8. Apolipoprotéine J

L'Apo J est une protéine de 80 kDa, exprimée par le foie, le cerveau, les ovaires et les testicules. Dans le plasma, elle est associée aux HDL. L'Apo J possède plusieurs fonctions, elle intervient dans la différenciation cellulaire, le remodelage tissulaire, l'apoptose, l'inflammation et le développement de la maladie d'Alzheimer (Han et al, 2001; McLaughlin et al, 2000; Nuutinen et al, 2009).

2.9. Apolipoprotéine L

L'Apo L est une protéine de 42 kDa et possède 6 isoformes. Elle est exprimée par le pancréas, le poumon, la prostate, la rate, le foie et le placenta. Sa concentration sérique normale est de 8.5 mg/l. Chez les patients hyperlipidémiques et diabétiques ou atteints de maladies cardiovasculaires, on observe une corrélation entre la concentration de cette apolipoprotéine et celle de triglycérides et du cholestérol (Albert et al, 2005; Duchateau et al, 2000). Elle est surexprimée aussi chez les patients schizophrènes et pourrait jouer aussi un rôle dans la maladie du sommeil (Vanhamme et al, 2003).

L'Apo L présente aussi des homologies de structures avec la famille de protéines apoptotiques Bcl2 (B cell lymphoma 2) (Vanhollebeke & Pays, 2006). L'Apo L6 intracellulaire est capable d'activer l'apoptose de la voie mitochondriale, activant aussi les caspases 8 et 9 (Liu et al, 2005).

2.10. Apolipoprotéine M

L'Apo M est une protéine de 21 kDa et 25 kDa quand elle est glycosylée. Elle est principalement exprimée par le foie et les reins mais aussi par la rate, le cœur, le cerveau et les testicules. Sa concentration plasmatique varie entre 0.02 et 0.15 g/l. Elle associée majoritairement au HDL et est aussi présente dans les LDL, VLDL et chylomicrons. Elle a un effet anti-athérogénique en favorisant la formation des pré- β -HDL (Christoffersen et al, 2006).

La concentration plasmatique d'Apo M est positivement corrélée à celle de la leptine chez les obèses (Xu et al, 2004), l'Apo M pourrait donc être impliquée dans le développement de l'obésité. Il a aussi été montré qu'un polymorphisme d'un seul nucléotide dans le promoteur pourrait favoriser le développement d'un diabète de type 2 (Niu et al, 2007).

2.11. Apolipoprotéine N

L'Apo N a été identifiée chez les bovins, les porcs et les souris. C'est une protéine de 12 kDa exprimée dans les ovaires, les testicules, les yeux, les muscles, l'utérus et le foie. L'Apo N est présente sur les HDL et les LDL. Elle pourrait jouer un rôle dans la stéroïdogénèse et l'immunorégulation (O'Bryan et al, 2004).

2.12. Apolipoprotéine R

L'Apo R a été détectée chez le porc mais pas chez l'Homme. Apo R est une protéine de 23 kDa présente sur les chylomicrons, les VLDL et les HDL. Sa concentration plasmatique est de 5.1 mg/l. L'Apo R est exprimée par le foie, la rate, les poumons, la moelle osseuse, les macrophages et le nœud lymphatique. Elle a peut-être un rôle dans la coagulation ou dans la synthèse de lipoprotéines porcines (Cooper & Attie, 1992).

2.13. Apolipoprotéine O

L'Apo O est exprimée dans de nombreux tissus humains, notamment dans les tissus producteurs d'apolipoprotéine tels que le foie, les intestins, les glandes surrénales, le tissu adipeux et le pancréas, mais aussi fortement par le cœur qui est une localisation plus rare pour les apolipoprotéines (Veniant et al, 1999). Son poids moléculaire est de 22 kDa avec son peptide signal. L'Apo O est glycosylée par des chaînes de chondroïtine sulfate lui conférant un poids moléculaire de 55 kDa. L'Apo O est une protéine minoritaire du sérum ; sa concentration dans le sérum humain n'a pas encore pu être déterminée. Les deux formes à 20 et 55 kDa sont présentes dans le sérum humain. La forme glycosylée est majoritaire. La forme non glycosylée semble moins stable. L'Apo O est présente principalement associée aux HDL mais aussi aux LDL et VLDL (Lamant et al, 2006).

Historiquement, l'Apo O a été découverte étant surexprimée au niveau cardiaque chez le chien obèse hypertendu (Philip-Couderc et al, 2003). L'Apo O est une des rares apolipoprotéine exprimée au niveau cardiaque chez l'Homme. Dans le cœur humain, l'Apo O est surexprimée chez les diabétiques (Lamant et al, 2006).

L'obésité, l'hypertension et le diabète ont un impact important sur le risque cardiovasculaire des patients et sont considérés comme des facteurs de risque de développement de l'insuffisance cardiaque. Il a été observé une accumulation de lipides dans les myocardiocytes d'insuffisants cardiaques et chez des patients obèses (Sharma et al, 2004; Unger & Orci, 2001). Cette accumulation excessive de lipides dans les cardiomyocytes peut entraîner une apoptose et un dysfonctionnement cellulaire, phénomène appelé lipotoxicité cardiaque. Ce mécanisme est considéré comme un contributeur à la dysfonction cardiaque et au développement de l'insuffisance cardiaque (Borradaile & Schaffer, 2005).

Notre équipe a évalué le rôle potentiel de l'Apo O dans la lipotoxicité cardiaque afin de trouver une cible pharmaceutique pour protéger le cœur contre le développement de l'insuffisance cardiaque.

II. Métabolisme énergétique cardiaque

Le cœur est un muscle qui nécessite une quantité importante d'énergie afin de maintenir sa fonction principale, la circulation du sang dans tout l'organisme. Cette énergie provient de l'ATP (adénosine triphosphate). Pour un cœur normal, la majorité de l'ATP (70%) est produite suite à la β -oxydation des acides gras dans la mitochondrie, le reste est plutôt fourni par la glycolyse et la production de lactate.

1. Métabolisme du glucose

1.1. Généralité

L'entrée du glucose dans les cardiomyocytes s'effectue grâce à la présence de protéines de transport à la surface membranaire, soit les protéines GLUT-4 et GLUT-1. On retrouvera le GLUT-4 de façon plus importante dans un cœur en bonne santé, alors que le GLUT-1, la forme fœtale, sera augmentée lors d'un dysfonctionnement cardiaque. Le transporteur GLUT-4 est une protéine intramembranaire qui se regroupe dans le cytosol dans des vésicules intracellulaires (Luiken et al, 2004). Lorsque la cellule est soumise à un stimulus, comme en présence d'insuline, les récepteurs seront alors transloqués à la membrane cellulaire afin de faire pénétrer les molécules de glucose. Une fois à l'intérieur de la cellule le glucose sera d'abord transformé en glucose-6-phosphate puis il subira la première étape de la glycolyse (**Fig.2**). Cette réaction est catalysée par la phosphofruktokinase-1 (PFK-1), une enzyme régulatrice très importante de la glycolyse (Rider et al, 2004). Suite à cette première étape irréversible, le glucose poursuivra sa route à travers le cycle de la glycolyse nécessitant la consommation de deux molécules d'ATP et en produisant quatre ATP en plus de deux molécules de NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduit) et de deux molécules de pyruvate. Ce dernier pourra alors soit être converti en lactate, être décarboxylé en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA) ou encore subir la carboxylation en oxaloacétate ou en malate. La décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA est l'étape la plus importante de l'oxydation du glucose. Elle est catalysée par la pyruvate déshydrogénase (PDH), un complexe multienzymatique important situé au niveau de la matrice mitochondriale. L'acétyl-CoA entre

dans le cycle de Krebs et le produit formé sera pris en charge par les chaînes respiratoires mitochondriales afin de générer l'ATP.

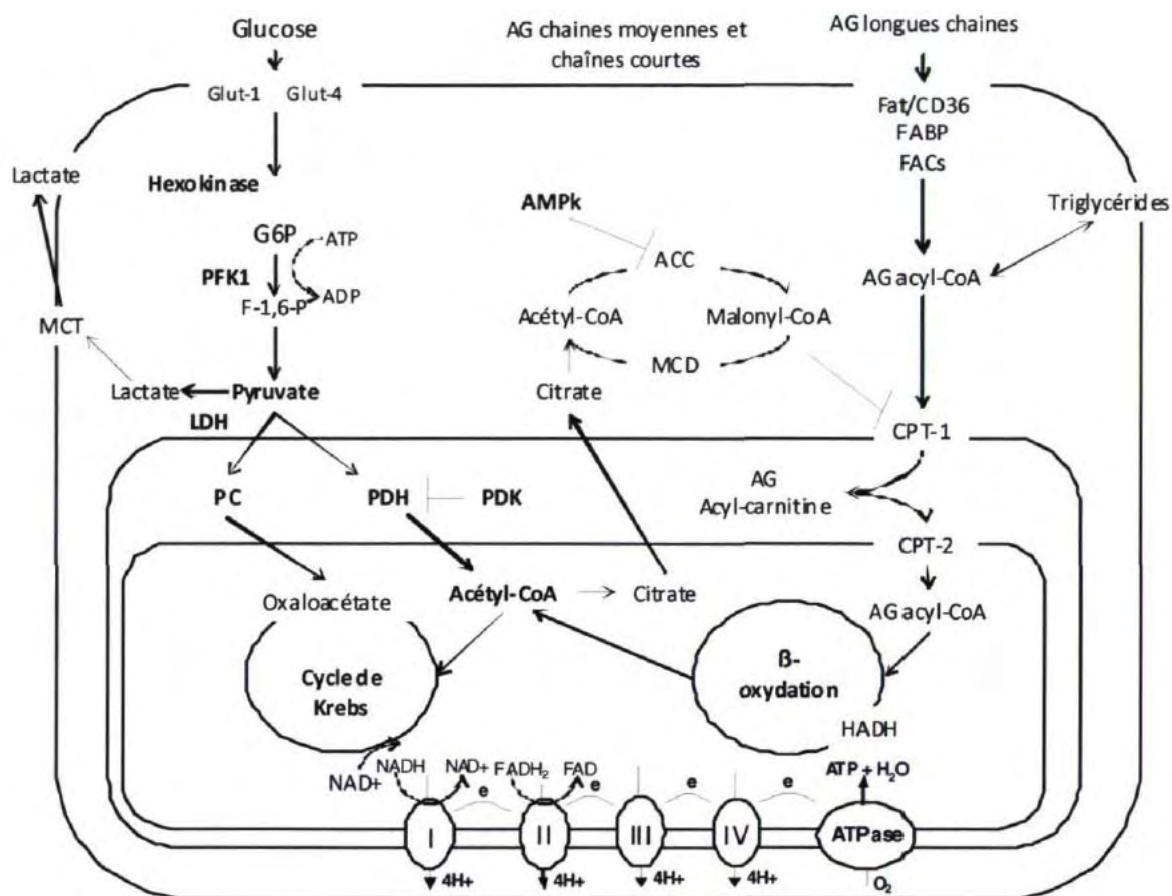


Figure 2 : Principales voies du métabolisme énergétique cardiaque : Dans un cœur sain, la majorité de l'ATP (70%) est produite suite à la β-oxydation des acides gras, le reste est apporté par la glycolyse et la production de lactate. (<http://www.theses.ulaval.ca/2010/27372/27372.pdf>).

1.2. Régulation du métabolisme du glucose

Ce métabolisme peut être régulé en agissant sur les transporteurs GLUT ou sur l'activité des deux enzymes PEK-1 et PDH.

Le transport du glucose à travers la membrane cellulaire grâce à des transporteurs peut être un facteur de régulation de la glycolyse. La translocation des récepteurs GLUT-4 à la membrane cellulaire se fait suite à une concentration élevée de glucose plasmatique, à une activation de l'AMPK (adenosine monophosphate activated protein kinase), ou encore suite à l'action d'hormone de régulation comme l'insuline (Li et al, 2004; Luiken et al, 2004).

Une augmentation de la concentration d'ATP ou de citrate intracellulaire inhibe l'activité de PEK-1 alors qu'elle est activée par une augmentation de taux d'AMP (adénosine monophosphate), d'ADP (adénosine diphosphate) ou de phosphate (Stanley et al, 2005).

L'insuline, le glucagon et l'AMPK activent la phosphorylation de PEK-2 (Stanley et al, 2005), enzyme responsable de la formation de 2,6 biphosphate. Une grosse quantité de ce dernier active PEK-1 et en conséquence la formation du pyruvate (Depre et al, 1993).

Une augmentation du ratio acétyl-CoA/ CoA ou NADH/NAD⁺ dans la mitochondrie entraîne l'activation du pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) (Holness & Sugden, 2003). Cette enzyme phosphoryle PDH et l'inhibe empêchant ainsi la décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA.

2. Métabolisme des acides gras

2.1. Généralité

Ayant une capacité limitée de synthèse et du stockage des acides gras, le cœur utilise les acides gras provenant de la circulation qui se trouvent sous 2 formes : associés à l'albumine ou dans les lipoprotéines riches en triglycérides, VLDL et chylomicrons. Les acides gras provenant de l'hydrolyse de ces lipoprotéines par la LPL constituent la source majeure des acides gras pour le cœur (Augustus et al, 2003).

Les cardiomyocytes vont internaliser les acides gras (**Fig.2**) ainsi générés soit par diffusion passive dans le cas des acides gras à courtes (4 à 8 carbones) ou moyennes chaînes (jusqu'à 14 carbones). Les acides gras à longue (entre 14 et 24 carbones) et très longue chaînes (plus de 24 carbones), vont plutôt utiliser des transporteurs protéiques comme les «fatty acid translocase» (FAT), dont la forme prédominante dans le coeur est FAT/CD36 (cluster of differentiation 36) ou les « fatty acid transport protein » (FATP) ou encore les «plasma membrane fatty acid binding protein » (FABPpm). Une fois dans la cellule, ces acides gras vont être estérifiés grâce à l'action de l'acyl CoA synthétase (ACS). 10 à 30% des acyl-CoA formés rentrent dans la synthèse de triglycérides alors que 70 à 90% sont oxydés pour générer l'ATP (Chabowski et al, 2008).

En effet, les acyl-CoA formés seront transférés sur des carnitines. C'est la carnitine palmitotransférase-1 (CPT-1), située entre la membrane interne et externe de la mitochondrie, qui permet de catalyser la formation de l'acylcarnitine avec formation d'ATP. Par la suite, c'est une translocase qui va permettre le transport de cette longue chaîne d'acides gras couplée

à un groupement acyl-CoA à travers la membrane interne de la mitochondrie. Finalement, une autre enzyme, la carnitine palmitotransférase-2 (CPT-2), reconstituera la longue chaîne d'acides gras afin que cette dernière puisse subir la β -oxydation et ainsi former une molécule de FADH₂ (flavine adenine dinucléotide dihydrogène) et une molécule de NADH, par cycle. Les acides gras sont oxydés par groupe de deux par cycle et le cycle recommence jusqu'à ce que l'acide gras soit converti en acétyl-CoA dans sa totalité. Le produit de cette réaction sera ensuite oxydé par le cycle de Krebs afin de former de l'ATP, alors que le FADH₂ et le NADH vont plutôt pénétrer la chaîne de transport des électrons et produire de l'ATP (Bartlett & Eaton, 2004; Kerner & Hoppel, 2000).

2.2. Régulation du métabolisme des acides gras

La régulation de ce métabolisme comporte le transport des acides gras à travers la membrane plasmique et mitochondriale ainsi que leur β -oxydation. Deux protéines semblent jouer un rôle important dans cette régulation : AMPK et PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor).

2.2.1. Effet d'AMPK

En plus de son rôle dans le métabolisme de glucose, l'AMPK est impliquée aussi dans la régulation du métabolisme des acides gras. Il a été montré que la phosphorylation de l'AMPK stimule la translocation de FAT/CD36 entraînant ainsi une augmentation d'entrée des acides gras dans la cellule cardiaque (Luiken et al, 2003). Une autre étude a montré que l'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK par l'AICAR (5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucléotide)

dans les cardiomyocytes et le cœur perfusé augmente l'expression de FAT/CD36 et de FABP et leur translocation à la membrane plasmique (Chabowski et al, 2006).

D'autre part, l'AMPK active l'entrée des acides gras dans la mitochondrie augmentant ainsi la β -oxydation (**Fig.2**). En effet, l'acétyl-CoA produit en excès dans la mitochondrie active l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) qui le transforme en malonyl-CoA, inhibiteur de CPT-1. Une fois activée, l'AMPK phosphoryle ACC et l'inhibe. Il en résulte une diminution du taux de malonyl-CoA formé et une activation de CPT-1. Les acides gras rentrent dans la mitochondrie et seront β -oxydés (Kudo et al, 1995).

2.2.2. Effet des PPAR :

La famille des PPAR est connue pour être des régulateurs importants de la transcription de gènes du métabolisme énergétique. Il en existe plusieurs formes, alpha (α), beta (β) et gamma (γ). PPAR α est fortement exprimé dans le cœur et régule positivement l'expression des gènes impliqués dans l'entrée des acides gras et leur estérification tels que LPL, FAT/CD36, FABP, ACS, ainsi que leur entrée dans la mitochondrie et leur β -oxydation tels que CPT-1, acyl-CoA dehydrogenase et l'acyl-CoA oxidase (Huss & Kelly, 2004). La surexpression de PPAR α entraîne une augmentation marquée de l'utilisation et de l'oxydation des acides gras et une diminution de l'utilisation de glucose (Finck et al, 2002). Ce phénomène confirme donc le rôle de PPAR α dans l'expression de gènes importants dans le transport et dans le cycle de l'oxydation des acides gras.

PPAR β est bien exprimé dans le cœur et régule l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation des acides gras (Cheng et al, 2004; Gilde et al, 2003). Chez les souris KO (knock-out) en PPAR β , on observe une sous-expression des gènes impliqués dans la β -oxydation et une diminution de l'oxydation des acides gras. Dans les cardiomyocytes PPAR α -/-, l'activation de PPAR β améliore l'expression des gènes de β -oxydation qui sont réduits à l'état basal suite à l'absence de PPAR α . Cependant, PPAR β est incapable de compenser le rôle de PPAR α en condition de stress métabolique (DeLuca et al, 2000; Leone et al, 1999).

PPAR γ est très faiblement exprimé dans le cœur ce qui suggère un rôle très limitant dans le métabolisme énergétique cardiaque (Gilde et al, 2003). D'autre part, PPAR γ semble avoir un effet indirect sur le métabolisme cardiaque en agissant sur d'autres tissus. Elle augmente le stockage des acides gras dans le tissu adipeux et une diminution de leur taux plasmatique, ce qui pourrait moduler l'activité de PPAR α et PPAR β dans les cardiomyocytes (Huss & Kelly, 2004).

Le métabolisme énergétique cardiaque est flexible. Suite à un régime riche en glucose le cœur augmente l'utilisation du glucose (Stephens & Pilch, 1995). De même, suite à un régime riche en acides gras ou en cas de certaines maladies métaboliques telles que le diabète et l'obésité, le cœur utilise presque 100% des acides gras (Grynberg, 2001; Lopaschuk et al, 2007; Wright et al, 2009). Des études ont montré qu'une utilisation excessive des acides gras par le cœur entraîne une apoptose des cardiomyocytes et un dysfonctionnement cardiaque ; phénomène appelé lipotoxicité cardiaque (Borradaile & Schaffer, 2005).

III. Lipotoxicité cardiaque en cas de diabète

1. Cardiomyopathie diabétique

Le diabète est connu comme un facteur de risque d'insuffisance cardiaque indépendant des autres facteurs tels que les maladies cardiaques congénitales, l'hypertension, l'alcoolisme et l'athérosclérose : il y a deux fois plus de risque chez l'homme et cinq fois plus de risques chez la femme diabétique de développer une insuffisance cardiaque par rapport aux non diabétiques (Kannel et al, 1974).

En cas de diabète, le métabolisme énergétique cardiaque compte uniquement sur le métabolisme des acides gras. On observe une augmentation d'entrée des acides gras et de leur β -oxydation. Ce changement métabolique a pour conséquence une accumulation de lipides intracellulaires, un dysfonctionnement mitochondrial, une apoptose aboutissant ainsi à une cardiomyopathie. Une cardiomyopathie diabétique est désignée par tout dysfonctionnement ventriculaire observé lors de la diastole et/ou de la systole en absence d'autres facteurs de risques ou des maladies coronaires. On détecte une prolongation de la relaxation du ventricule gauche et du délai de l'ouverture de la valve mitrale, une augmentation de la pression sur le ventricule gauche à la fin de la diastole ainsi qu'un remodelage cardiaque. Chez les patients diabétiques atteints d'une cardiomyopathie, il y a 3 fois plus de risque de mort après un infarctus du myocarde que des individus normaux (Borradaile & Schaffer, 2005; Boudina & Abel, 2007).

Pour mieux comprendre l'effet du changement métabolique sur le dysfonctionnement du myocarde, des modèles animaux mimant le diabète de type 1 et 2 ont été créés. Ils sont obtenus par traitement chimique ou par mutation d'un gène.

1.1. Modèles de diabète de type 1

1.1.1. Traitement à la streptozotocine (STZ)

C'est le modèle le plus courant du diabète de type 1. La STZ est une molécule ayant une structure similaire au glucose et captée par le récepteur GLUT-2 au niveau des cellules β - du pancréas (Schneidl et al, 1994). Cette molécule entraîne la mort des cellules β - du pancréas et par conséquent une diminution de la sécrétion de l'insuline (Bonnevie-Nielsen et al, 1981). La STZ est injectée par voie intrapéritonéale. Son administration peut être effectuée soit par une simple dose de 200 mg/kg soit par une dose plus faible de 50 mg/kg pendant 5

jours. Une hyperglycémie est détectée 7 à 14 jours après l'injection. Il faut noter que la STZ a certains effets propres indépendamment de l'hyperglycémie ; elle entraîne une diminution de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de glucose et du lipide dans le foie en absence d'hyperglycémie et peut altérer d'une façon directe la contraction cardiaque via un mécanisme de stress oxydatif impliquant P38 MAPK (mitogen activated protein kinase) (Kume et al, 2005; Wold & Ren, 2004).

1.1.2. Souris OVE26 :

Ces souris sont générées suite à une surexpression de la calmoduline, protéine fixatrice de calcium, dans les cellules β du pancréas. Cette surexpression aboutit à une déficience en insuline mais son mécanisme d'action ne reste pas bien connu. Dans ce modèle, le diabète se développe une semaine après la naissance, ce qui permet d'étudier l'effet du diabète chez des souris jeunes (Epstein et al, 1989).

1.1.3. Souris Akita :

Elles sont obtenues suite à une mutation par substitution d'une seule paire de base au niveau du gène d'insuline « ins2 » empêchant un repliement correct de la pro-insuline (Yoshioka et al, 1997). Par conséquent, des agrégats se forment induisant un stress sur le réticulum endoplasmique suivi d'une perte des cellules β du pancréas (Ron, 2002). Ces souris développent une hyperglycémie à l'âge de 5 à 6 semaines et peuvent vivre jusqu'à 40 à 50 semaines.

1.2. Modèles de diabète de type 2

1.2.1. Souris ob/ob

Ces souris sont obtenues par une mutation au niveau du gène codant la leptine, une hormone sécrétée par le tissu adipeux et impliquée dans l'entrée et la β -oxydation des acides gras dans les tissus non adipeux (Zhang et al, 1994). Ces souris deviennent obèses et hyperinsulinémiques à l'âge de 5 semaines et diabétiques à l'âge de 15 semaines (Buchanan et al, 2005). Elles peuvent vivre 14 mois. Ces souris possèdent le même phénotype que les patients obèses et diabétiques.

1.2.2. Souris db/db

Elles sont obtenues par une mutation au niveau du gène codant le récepteur de la leptine (Ob-R) (Chen et al, 1996). Ces souris présentent le même phénotype que les souris

ob/ob et développent un diabète très sévère de type 2 à l'âge de 8 semaines (Buchanan et al, 2005). Ce modèle mime l'état de la résistance à la leptine observé chez les patients obèses et diabétiques.

1.2.3. Rat ZDF (Zucker diabetic fatty rat)

Ces rats sont obtenus suite à une mutation au niveau du gène « fa » codant le récepteur de la leptine (Phillips et al, 1996). Ils développent une insulino-résistance au bout de 6 semaines qui aboutit à une hyperglycémie au bout de 10 à 12 semaines (Clark et al, 1983).

Chez tous ces modèles, le cœur augmente l'utilisation des acides gras et diminue celle du glucose. On observe une entrée massive des acides gras, une augmentation de la β -oxydation, une accumulation de lipides intracellulaires et une diminution de l'oxydation du glucose. On détecte aussi une cardiomyopathie caractérisée par un dysfonctionnement ventriculaire avec une diminution de la fraction d'éjection (FE) et de raccourcissement (FR). Chez les animaux traités à la STZ, ce défaut contractile commence par un dysfonctionnement diastolique suivi par une altération sévère de la fonction systolique. En cas de diabète de type 2, certaines études montrent une altération des deux fonctions, diastolique et systolique, alors que d'autres n'ont montré aucune modification de la fonction systolique. Cette différence dans les résultats pourrait être due soit à la sévérité du diabète soit à la méthode utilisée pour évaluer la fonction cardiaque (Bugger & Abel, 2009).

Durant le diabète, le changement du métabolisme cardiaque précède le développement de la cardiomyopathie. Après traitement à la STZ, une modification du métabolisme cardiaque est observée 4 jours après l'induction du diabète alors que la cardiomyopathie est apparue après 4 à 6 semaines (Ghosh et al, 2004a). D'une façon similaire, chez les souris ayant un diabète de type 2, souris ob/ob et db/db, la modification du métabolisme cardiaque est mis en évidence bien avant le dysfonctionnement cardiaque (Buchanan et al, 2005).

Plusieurs études ont été faites sur les souris db/db et les rats ZDF et ont montré le rôle de l'altération du métabolisme cardiaque sur le développement d'une cardiomyopathie. Des souris âgées de 6 à 9 mois ont été traitées pendant 3 à 6 semaines avec un agoniste de PPAR α ou PPAR δ (Aasum et al, 2002; Carley et al, 2004). Chez ces souris, le métabolisme cardiaque est normalisé mais la fonction cardiaque est restée altérée. Suite à ce résultat, deux hypothèses sont probables : il y a aucune relation entre le métabolisme énergétique et la fonction cardiaque ou le traitement n'est pas initié au bon moment. Cette dernière hypothèse semble

plus probable car des rats ZDF traités par l'agoniste de PPAR γ ont un profil métabolique normal et une fonction cardiaque améliorée (Golfman et al, 2005; Zhou et al, 2000). En outre, la surexpression de glut4 chez les souris db/db normalise le métabolisme énergétique et améliore la fonction cardiaque (Semeniuk et al, 2002).

2. Acides gras et dysfonctionnement cardiaque

Pour confirmer que chez les diabétiques, le dysfonctionnement cardiaque résulte de l'utilisation excessive des acides gras et leur accumulation et non pas à des perturbations hormonales ou à l'intervention d'autre organe, des modèles animaux ont été créés. Ils sont obtenus suite à une surexpression dans le cœur des gènes impliqués dans l'entrée des acides gras ou leur oxydation.

2.1. Souris surexprimant LPL dans le cœur

La surexpression de la LPL à la surface des cardiomyocytes des souris entraîne une accumulation intracellulaire des acides gras libres et du cholestérol estérifié. L'absence d'accumulation du triglycéride dans ce modèle et l'augmentation de gène impliqués dans le métabolisme des acides gras montrent une augmentation de la β -oxydation. L'accumulation des acides gras libres entraîne une hypertrophie, une apoptose des cardiomyocytes et une altération de la contraction (fraction de raccourcissement est 33% au lieu de 58%) (Yagyu et al, 2003).

2.2. Souris surexprimant FATP1 dans le cœur

La surexpression de FATP1 dans le cœur augmente l'entrée des acides gras et leur β -oxydation. Par conséquent, une accumulation des acides gras libres et non de triglycérides est observée et aboutit à une apoptose des cardiomyocytes et un dysfonctionnement diastolique (Chiu et al, 2005).

2.3. Souris surexprimant ACS-1 dans le cœur

Chez les souris transgéniques surexprimant ACS-1 dans le cœur, on observe une augmentation de l'entrée des acides gras et une accumulation intracellulaire de triglycérides et de céramides. Ceci entraîne une hypertrophie cardiaque, une diminution importante de la fonction systolique (fraction de raccourcissement est 28% au lieu de 65%) et une mort prématurée de ces souris (Chiu et al, 2001).

2.4. Souris surexprimant PPAR α dans le cœur

La surexpression de PPAR α dans le cœur entraîne une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'entrée des acides gras et leur β -oxydation. En présence d'un régime riche en lipide, le déséquilibre entre l'entrée des acides gras et leur oxydation entraîne une accumulation de triglycérides accompagnée d'un stress oxydatif. Ceci aboutit à une apoptose des cardiomyocytes, une hypertrophie ventriculaire et un dysfonctionnement systolique (fraction de raccourcissement est de 43.2% au lieu de 58.5% (Finck et al, 2002).

Tous ces modèles confirment l'implication de l'utilisation excessive des acides gras dans le développement d'une cardiomyopathie. Comment les acides gras entraînent ce dysfonctionnement cardiaque ? En situation de diabète, de nombreuses études ont montré que l'augmentation du métabolisme lipidique est associée à une dysfonction mitochondriale qui pourrait être à l'origine de la cardiomyopathie observée dans les différents modèles utilisés (Bugger & Abel, 2010; Duncan, 2011). Un des mécanismes proposé : l'entrée excessive des acides gras et de leur β -oxydation induit un stress oxydatif dans la mitochondrie, ce qui entraîne une altération de la structure et de la fonction de cet organe de différentes manières, soit en activant les protéines découplantes, soit en peroxydant la cardiolipine, le phospholipide essentiel de la membrane interne de la mitochondrie, soit en peroxydant l'ANT, un des régulateurs de l'ouverture du pore de transition mitochondriale. Il en résulte une diminution de la synthèse d'ATP, une augmentation de la perméabilité membranaire et une libération des protéines proapoptotiques dans le cytosol, ce qui aboutit à une mort cellulaire et à une dysfonction contractile. Etant donné que la mitochondrie est l'organe clef dans ce mécanisme, il est alors important d'étudier sa structure et ses fonctions afin de mieux comprendre son implication dans la lipotoxicité cardiaque.

IV. Mitochondrie

1. Structure

Les mitochondries sont des organites retrouvés dans la plupart des cellules eucaryotes à l'exception des érythrocytes. Elles mesurent entre 0.5 et 1 μm de diamètre et peuvent atteindre plus de 10 μm de long. Les mitochondries sont constituées d'une membrane externe et d'une membrane interne, délimitant deux compartiments, l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale.

1.1. La membrane externe

Elle constitue une barrière semi-perméable aux ions et aux petites molécules, ce qui fait que l'espace inter-membranaire a une composition proche de celle du cytoplasme. Cette perméabilité est assurée en grande partie par une protéine formant un canal transmembranaire: VDAC (voltage-dependent anion channel). Cette protéine permet le passage des molécules d'une taille inférieure à 5 kDa (anions, cations, acides gras, pyruvate et nucléotides). Les molécules supérieures à 5 kDa sont prises en charge par les complexes d'importation TOM/TIM (translocase of the outer membrane / translocase of the inner membrane) localisés au niveau d'une zone d'accolement entre les membranes externe et interne.

1.2. La membrane interne

Elle a une composition qui diffère des autres membranes biologiques : elle est formée environ de 80% de protéines et de 20% de phospholipides, de plus, elle est riche en un lipide particulier, la cardiolipine. Par conséquent, la membrane interne est beaucoup moins perméable que la membrane externe. Le passage des molécules nécessite donc la présence de transporteurs tels que le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) qui réalise l'échange ATP/ADP entre le cytosol et la matrice mitochondriale, le transporteur du phosphate inorganique (PiC), le transporteur du pyruvate, la navette glycérol 3-phosphate et la navette malate/aspartate. La membrane interne s'invagine et forme des crêtes mitochondriales qui permettent d'augmenter la surface membranaire. Elle contient la machinerie enzymatique des phosphorylations oxydatives (OXPHOS) qui assure la synthèse d'ATP mitochondriale.

1.3. La matrice mitochondriale

Elle contient l'ADN mitochondrial, les éléments nécessaires à sa réplication et à son expression. C'est l'endroit où s'effectuent de nombreuses voies métaboliques telles que le cycle de Krebs et la β -oxydation des acides gras.

2. Fonctions

Les mitochondries sont des organites impliqués dans un grand nombre de voies métaboliques et de processus physiologiques ; leur principale fonction consiste à la production d'ATP. Elles sont aussi impliquées dans un processus important de la mort cellulaire. Deux grands complexes sont impliqués dans ces 2 processus : le système des phosphorylations oxydatives et le pore de transition de la perméabilité mitochondriale.

2.1. Production d'ATP

2.1.1. Mécanisme

Les phosphorylations oxydatives produisent l'ATP à partir de l'oxygène et des nutriments (environ 70 kg par jour pour un homme au repos). Les produits obtenus par le catabolisme des glucides et acides, NADH et FADH₂, sont pris en charge par une chaîne d'oxydoréduction constituée de quatre complexes protéiques (complexe I : NADH-ubiquinone oxydoréductase ; complexe II : succinate-ubiquinone oxydoréductase ; complexe III : ubiquinone-cytochrome *c* oxydoréductase ; complexe IV : cytochrome *c* oxydase) et de deux transporteurs d'électrons mobiles, l'ubiquinone et le cytochrome *c* (Hatefi, 1985) (**Fig.3**). Le NADH cède ses électrons au complexe I et le FADH₂ au complexe II. Les électrons sont ensuite transportés par l'ubiquinone jusqu'au complexe III. Finalement les électrons sont pris en charge par le cytochrome *c* (Cyt *c*) puis libérés au niveau du complexe IV, où ils sont utilisés pour la réduction de l'oxygène en eau (H₂O) (**Fig.3**). Ce transfert d'électrons repose donc sur une série de réactions d'oxydoréductions au niveau de la chaîne respiratoire où les électrons vont transiter du composé ayant le plus faible potentiel redox vers des molécules à plus fort potentiel.

Le transfert des électrons s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire au niveau des complexes I, III et IV. Ce mouvement de protons crée un gradient de pH (la matrice devient plus basique) et engendre un potentiel de membrane ($\Delta\Psi$) d'environ -180 mV. La résultante de ces deux forces constitue un gradient électrochimique de protons, la force protonmotrice (Δp), qui permet le retour des protons dans la matrice à travers le complexe F₀-F₁ ATP synthase et la phosphorylation de l'ADP en ATP (Mitchell, 1961). Une fois synthétisé, l'ATP⁴⁻ matriciel va être échangé contre l'ADP³⁻ cytosolique par le transporteur des nucléotides adényliques « ANT », localisé dans la membrane interne mitochondriale et composé de deux monomères de 30 kDa chacun constitué de 6 hélices α transmembranaires.

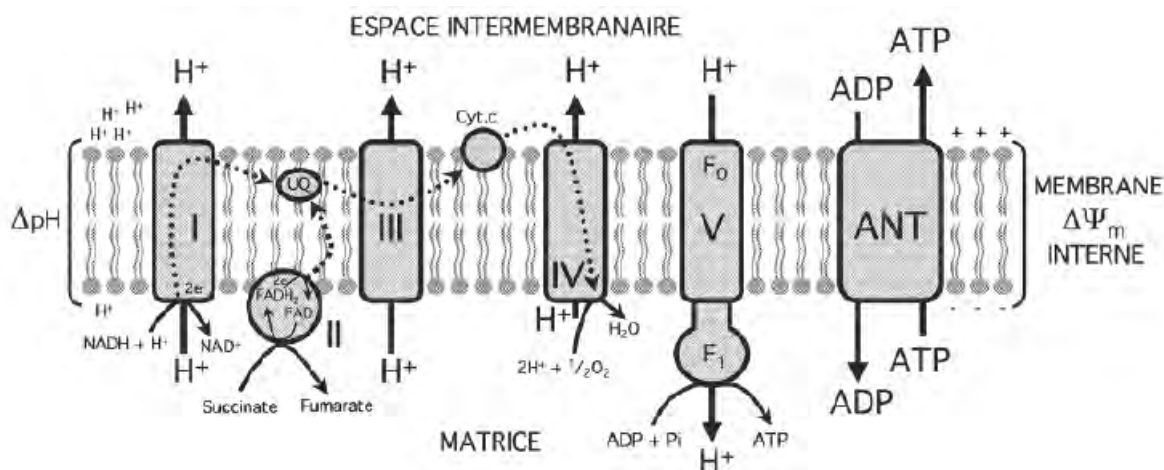


Figure 3: Constitution et Fonctionnement de la chaîne respiratoire (http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/60/95/14/PDF/TH2009_Li_-_Bo.pdf).

Le couplage entre l'oxydation des substrats et la synthèse d'ATP par la force protonmotrice est appelée « phosphorylation oxydative couplée ». On parle d'un découplage pour désigner tout processus qui diminue le rapport ATP/O₂ ; il est dû soit à une modification de la force protonmotrice (découplage extrinsèque) soit à une modification de l'efficacité de pompage des protons (découplage intrinsèque) [voir aussi paragraphe : dysfonction mitochondriale].

2.1.2. Composition du système de phosphorylation oxydative

Le système de phosphorylation oxydative (OXPHOS) est constitué de cinq enzymes localisées dans la membrane interne mitochondriale: les complexes I à IV qui composent la chaîne respiratoire et l'ATP synthase. Le système OXPHOS est composé de plus de quatre-vingts protéines différentes, 13 d'entre elles sont codées par l'ADN mitochondrial et les autres par le génome nucléaire.

2.1.2.1. Le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase)

C'est le plus gros des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire avec une masse moléculaire d'environ 980 kDa. Il est composé de 45 sous-unités dont 38 sont codées par le génome nucléaire et 7 par le génome mitochondrial (Carroll et al, 2006). L'assemblage de ces sous-unités constitue deux domaines majeurs (**Fig.4**). Le domaine hydrophile codé par le génome nucléaire contient le site de liaison du NADH, la flavine mononucléotide (FMN) et huit ou neuf centres fer/soufre (Fe-S) constituant le centre catalytique de l'enzyme (Sazanov, 2007). Le domaine hydrophobe est constitué des sept sous-unités NADH déshydrogénase (ND) codées par le génome mitochondrial et contient le site de réduction des quinones et la

machinerie de pompage des protons. Ce complexe catalyse le transfert des électrons du NADH vers l'ubiquinone par l'intermédiaire de la flavine mononucléotide et des centres fer/soufre. Pour chaque paire d'électrons transférés, quatre protons sont pompés de la matrice vers l'espace intermembranaire. Un déficit d'activité du complexe I est la cause la plus fréquente de maladie mitochondriale. L'inhibiteur du complexe I est la roténone (Degli Esposti, 1998).

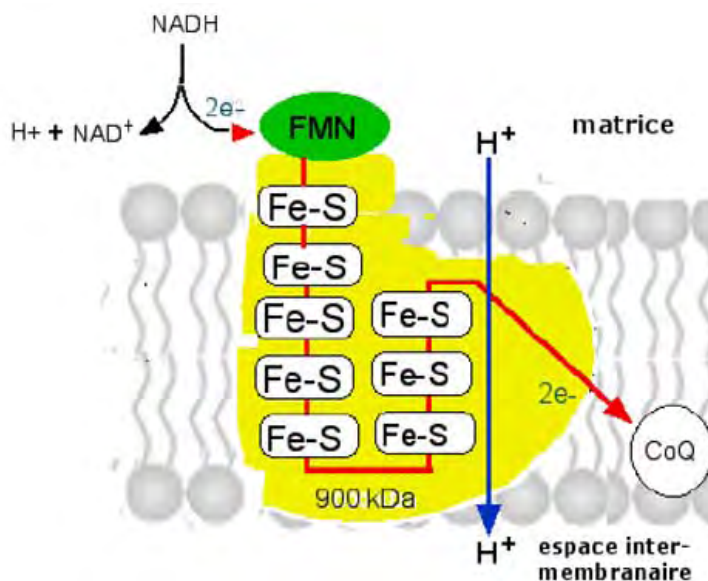


Figure 4: Complexe I de la chaîne respiratoire (<http://www2.ulg.ac.be/cord/mito%20et%20oxygene/mitoxph.html>).

2.1.2.2. Le complexe II (Succinate-ubiquinone oxydoréductase)

Ce complexe d'une masse moléculaire d'environ 200 kDa, est composé de 4 sous-unités codées par le génome nucléaire (**Fig.5**). Les sous-unités SDH (succinate déshydrogénase) A et B constituent le domaine hydrophile et sont localisées dans la matrice mitochondriale. Les sous-unités SDH C et D permettent l'ancrage du complexe à la membrane interne. Ce complexe catalyse l'oxydation du succinate en fumarate et présente certaines différences avec les autres complexes de la chaîne respiratoire. Il ne transfère pas de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire mais joue un rôle important dans la mitochondrie puisqu'il fait partie à la fois de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs (Briere et al, 2005). Le complexe II est inhibé par le malonate et le thénylthiofluoroacétone (TTFA). La malonate empêche l'utilisation du succinate et le TTFA inhibe le transfert d'électron des centres fer/soufre vers l'ubiquinone (Hatefi, 1985).

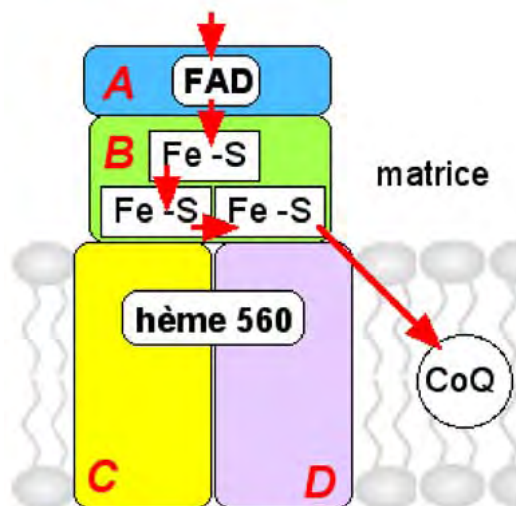


Figure 5: *Complexe II de la chaîne respiratoire* (<http://www2.ulg.ac.be/cord/mito%20et%20oxygene/mitoxph.html>).

2.1.2.3. Le complexe III (Ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase)

D'une masse moléculaire de 240 kDa, est constitué de 11 sous-unités dont trois contiennent les centres métalliques responsables du transfert des électrons (**Fig.6**). Les 2 cytochromes *b* (*bL* et *bH*) sont associés à la sous-unité 3, le cytochrome *c1* appartient à la sous-unité 4 et le centre fer/soufre est contenu dans la sous-unité 5. La fonction des autres sous-unités reste à élucider. Seule la sous-unité 3 est codée par le génome mitochondrial. Ce complexe catalyse le transfert de deux électrons de l'ubiquinol au cytochrome *c* et à la translocation de quatre protons vers l'espace intermembranaire (Mitchell, 1975). Il est inhibé par l'antimycine ou le myxothiazol.

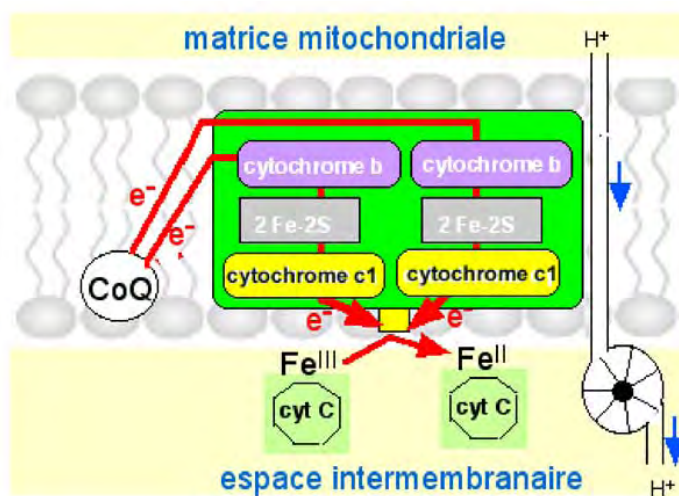


Figure 6: *Complexe III de la chaîne respiratoire* (<http://www2.ulg.ac.be/cord/mito%20et%20oxygene/mitoxph.html>).

2.1.2.4. Le complexe IV (Cytochrome c oxydase)

Ce complexe a une masse de 200 kDa et contient 13 sous-unités dont trois (COX I, COX II et COX III) sont codées par le génome mitochondrial. Le site actif binucléaire de cette enzyme (**Fig.7**) est composé d'un noyau hème de haut spin (hème a_3) associé à un ion cuivre (CuB). En plus de ce centre binucléaire, le cytochrome c oxydase possède un hème de bas spin (hème a) et un autre centre cuivre (CuA). Ce complexe catalyse le transfert des électrons du cytochrome c vers l'oxygène. Les électrons cédés par le cytochrome c entrent dans ce complexe protéique par le centre cuivre CuA puis sont transférés successivement à l'hème a puis au site actif binucléaire où s'effectue la liaison de l'oxygène et sa réduction en eau (Abramson et al, 2001). Durant cette étape, 4 protons sont consommés et 4 autres sont transloqués de la matrice vers l'espace intermembranaire (Wikstrom & Verkhovsky, 2007). Des défauts d'activité de cette enzyme ont été associés au développement de différentes myopathies (DiMauro et al, 1990; Rahman et al, 1999). L'activité de ce complexe est inhibée par le cyanure de potassium ou l'azide de sodium.

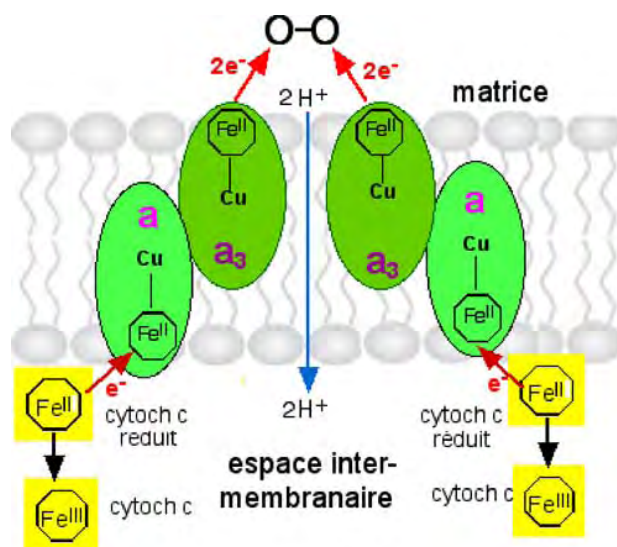


Figure 7: Complexe IV de la chaîne respiratoire (<http://www2.ulg.ac.be/cord/mito%20et%20oxygene/mitoxph.html>).

2.1.2.5. Le complexe V (ATP synthase)

Ce complexe qu'on nomme aussi F1- F0 ATPase, a une masse moléculaire d'environ 600 kDa et possède deux sous unités F0 et F1 (**Fig.8**). La partie F0 est ancrée dans la membrane interne mitochondriale et forme un canal qui permet le passage des protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice. Cette partie est composée de cinq sous-unités, les sous-unités a_6 , b, c, d et OSCP (oligomycin sensitivity conferral protein). Le domaine

catalytique F1 se trouve dans la matrice mitochondriale au contact de la membrane interne. Il utilise le gradient de protons pour la phosphorylation de l'ADP en ATP. Ce domaine est composé de cinq types de sous-unités (α 3, β 3, δ 1, γ 1, ϵ 1). Les 10 sous-unités c du domaine F0 sont connectées à la sous unité γ du domaine F1 et forment un rotor tandis que les sous unités α , β , a6, b, d et OSCP forment un stator. Le passage des protons à travers le stator permet la rotation des sous-unités c qui entraînent la sous-unité γ . C'est la rotation de cette dernière qui provoque un changement de conformation des sous unité α et β du domaine F1 conduisant à la production d'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique (Fillingame, 1999; Sambongi et al, 1999). Le domaine catalytique F1 est également capable d'hydrolyser l'ATP (Wang & Oster, 1998). L'activité de ce complexe est inhibée par l'oligomycine.

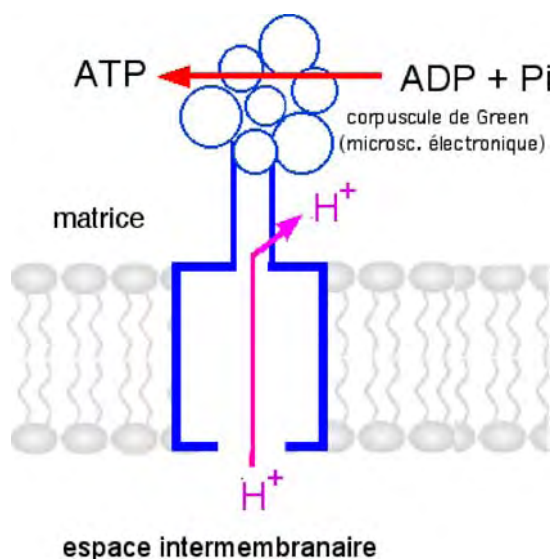


Figure 8: **Complexe V de la chaîne respiratoire** (<http://www2.ulg.ac.be/cord/mito%20et%20oxygene/mitoxph.html>).

2.1.2.6. Les supercomplexes

Les expériences de co-précipitations de complexes, de microscopie électronique et d'électrophorèse sur gel « blue native » ont montré l'existence, dans la membrane interne mitochondriale, de structures appelées « supercomplexes » et formées par le groupement de plusieurs complexes de la chaîne respiratoire. Quatre associations principales ont été retrouvées :

- supercomplexe I+III₂

Dans ce modèle, une association latérale est observée entre un dimère de complexes III et la partie membranaire du complexe I (Dudkina et al, 2005).

- supercomplexe III₂+IV₁₋₂

Ce supercomplexe a été observé la première fois chez la levure. Dans ce modèle, deux monomères du complexe IV sont associés à un dimère central du complexe III. Il peut également exister des assemblages entre le complexe III et un seul monomère du complexe IV (Cruciat et al, 2000).

- supercomplexe I+III₂+IV₁₋₄

C'est le plus gros des surcomplexes, appelé aussi « respirasome ». Dans ce modèle, le complexe III est latéralement associé avec le bras membranaire du complexe I. Le complexe IV stabilise l'ensemble en interagissant à la fois avec la partie membranaire du complexe I et en s'associant de manière latérale avec le complexe III (Schafer et al, 2006; Schagger, 2002).

- dimères d'ATP synthase

Les monomères d'ATP synthase interagissent ensemble au niveau des domaines Fo membranaires. Il a été suggéré que cette dimérisation de l'ATP synthase pouvait servir à stabiliser les crêtes mitochondriales puisque des mutations dans des sous-unités impliquées dans cette dimérisation entraînaient une désorganisation de la structure de la membrane interne mitochondriale (Arnold et al, 1998; Giraud et al, 2002; Paumard et al, 2002).

Il est intéressant de souligner que le complexe II ne fait partie d'aucun supercomplexe décrit à ce jour. Cependant, il a été montré par co-immunoprécipitation une association physique entre les sous-unités catalytiques SDH A et B du complexe II et la sous-unité α du domaine catalytique F₁ de l'ATP synthase. L'ANT et le PiC ont également été coprécipités (Ardehali et al, 2004).

La formation de ces supercomplexes semble jouer un rôle physiologique important : ces structures pourraient augmenter la vitesse de transfert des électrons, réguler le fonctionnement de la chaîne respiratoire et stabiliser la structure des crêtes de la membrane interne (Boekema & Braun, 2007).

2.2. L'apoptose

2.2.1. Mécanisme

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée caractérisé par une condensation de la chromatine, une fragmentation du noyau et une contraction de la cellule. Deux voies entraînent l'apoptose : une voie extrinsèque et une voie intrinsèque (**Fig.9**).

La voie extrinsèque est une voie par laquelle les caspases (cysteine aspartate specific protéases) initiatrices (2-8-9-10) activent directement les caspases effectrices (3-6-7) qui à leur tour, entraînent de nombreuses modifications au sein de la cellule dont la condensation et la dégradation de l'ADN, le remaniement du cytosquelette ou encore l'inhibition d'enzymes réparatrices (Chang & Yang, 2000).

La voie intrinsèque fait intervenir la mitochondrie dans la mort cellulaire en libérant certaines protéines présentes dans son espace intermembranaire. Comme je l'ai déjà mentionné, le cytochrome *c* est un composant essentiel de la chaîne respiratoire et permet le transfert des électrons du complexe III au complexe IV. Il est localisé dans l'espace intermembranaire mitochondrial et en partie attaché à la surface de la membrane interne, sa localisation dans le cytosol joue un rôle important dans l'apoptose. Une fois libéré de la mitochondrie, le cytochrome *c* s'associe avec Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor 1), qui en présence d'ATP, induit le recrutement de la pro-caspase 9 formant ainsi un complexe appelé « apoptosome ». La caspase 9 est alors activée au sein de ce complexe, puis libérée et provoque l'activation des caspases effectrices (Li et al, 1997). D'autres protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial sont aussi relarguées dans le cytosol et présentent une activité pro-apoptotique : l'AIF (apoptose inducing factor) et l'Endo G (endonucléase G) migrent jusqu'au noyau pour dégrader l'ADN, alors que Smac active les caspases en se fixant sur les protéines inhibitrices d'apoptose, les IAP (Ekert et al, 2001; Li et al, 2001; Susin et al, 1999).

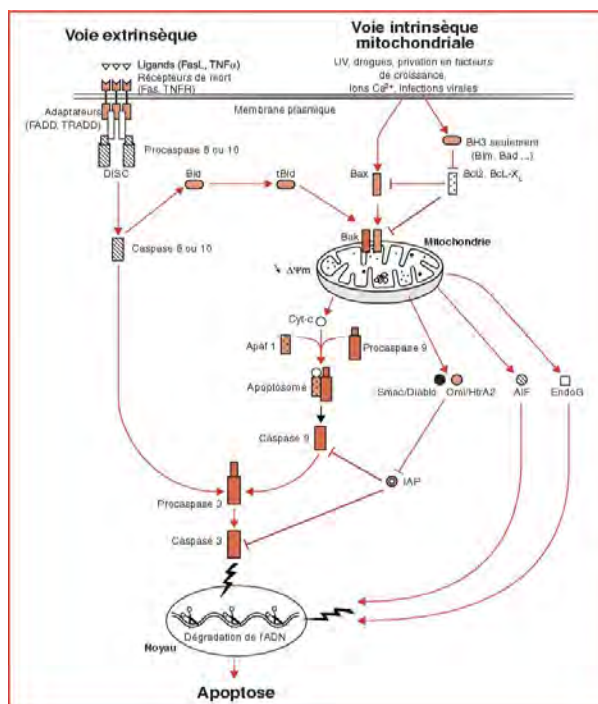


Figure 9 : voies extrinsèque et intrinsèque d'induction de l'apoptose (Blondel et al, 2006).

Le mode de libération de ces protéines et plus particulièrement du cytochrome *c* par la mitochondrie est un sujet de débat. Toutes ces molécules ne peuvent pas diffuser à travers la membrane mitochondriale, leur libération nécessite la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.

Un des mécanismes qui participe à ce relargage est l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP), un complexe protéique (voir paragraphe constitution du pore) situé au niveau des 2 membranes externes et internes de la mitochondrie. L'ouverture de ce pore est induite par plusieurs facteurs dont le stress oxydant et l'augmentation du taux de calcium et du phosphate inorganique matriciel (Halestrap, 2009).

Le PTP semble bien être impliqué dans l'apoptose. L'inhibition de l'ouverture de ce pore par la cyclosporine A (CsA) ou l'acide bongkrekiq (BA) protège les cellules contre l'apoptose alors que l'induction de son ouverture par l'atractyloside favorise la mort cellulaire (Zamzami et al, 1996). En outre, des mitochondries issues des souris déficientes en cyclophilin D (CyP D), un des constituants de pore, résistent à la mort cellulaire induite par le calcium et le stress oxydatif (Baines et al, 2005).

Ce pore participe à la mort cellulaire par libération du cytochrome *c* suivant 2 mécanismes (**Fig.10**):

- rupture de la membrane externe

L'ouverture du pore entraîne une augmentation du passage des molécules ayant un poids moléculaire < de 1500 Da à travers la membrane interne mitochondriale. La force osmotique ainsi générée entraîne l'entrée d'eau dans la matrice. Possédant une grande surface, la membrane interne s'étale et provoque une force mécanique sur la membrane externe aboutissant à sa rupture. Par conséquent, les protéines intermembranaires dont le cytochrome *c* sont libérées et induisent l'apoptose (Tsujimoto & Shimizu, 2007).

- Régulation de la formation d'un pore au niveau de la membrane externe

Des études ont montré que le relargage du cytochrome *c* induit par l'ouverture du pore peut avoir lieu sans gonflement mitochondrial (De Giorgi et al, 2002; Scorrano et al, 2002) ; un modèle a été proposé pour expliquer ce phénomène: le PTP régule la formation d'un pore au niveau de la membrane externe constituée de protéines pro-apoptotique de la famille Bcl-2 et qui permet la libération du cytochrome *c*.

Les protéines de la famille Bcl-2 sont rassemblées en 2 groupes : les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bid...) et les protéines anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-xL...). L'interaction entre ces protéines entraîne la mort ou la survie des cellules (Tsujimoto, 2003). En effet, suite à un stimulus apoptotique, Bax se déplace du cytosol vers la membrane externe mitochondriale, change de conformation et s'accroche à la membrane formant ainsi des complexes oligomériques (Hsu et al, 1997). Bid semble jouer un rôle dans l'accrochage de Bax et la stabilité des complexes formés (Desagher et al, 1999). Des études ont montré que l'ajout de la protéine recombinante Bax à des mitochondries isolées ou la surexpression de Bax dans les cellules entraînent la libération du cytochrome *c* (Finucane et al, 1999; Jurgensmeier et al, 1998). Le mode par lequel Bax induit ce relargage n'est pas bien connu. En effet il agit soit en formant un pore homo-oligomérique ou hétéro-oligomérique en s'associant à une autre protéine pro-apoptotique tel que Bak, soit en déstabilisant la bicouche lipidique (Tsujimoto, 2003).

Des études réalisées par plusieurs équipes permettent de supposer que la libération du cytochrome *c* par Bax pourrait être régulée par le pore. Des interactions entre Bax et les 2 constituants du pore, ANT et VDAC, ont été détectées (Marzo et al, 1998; Narita et al, 1998; Vieira et al, 2000). En plus, chez des levures déficientes en VDAC ou dans des cellules injectées par un anticorps anti-VDAC, Bax est incapable d'induire la libération du

cytochrome *c* (Shimizu et al, 2001; Shimizu et al, 1999). Il a été montré, *in situ*, que l'ouverture du pore n'entraîne pas une rupture de la membrane externe mais provoque une redistribution de Bax sous forme de pore sur cette membrane (De Giorgi et al, 2002). Cette ouverture du pore résulterait d'une transition de la perméabilité qui induit une dépolarisation membranaire. Celle-ci attire Bax sur la membrane externe et permet leur oligomérisation en canal qui laisse sortir le cytochrome *c* de la mitochondrie. Cependant cette théorie reste à vérifier car d'autres auteurs ont montré que Bax peut aussi entraîner l'apoptose d'une façon indépendante de la transition mitochondriale et que la libération du cytochrome *c* induite par Bax n'est pas inhibée par la CsA ou par le BA (Eskes et al, 1998).

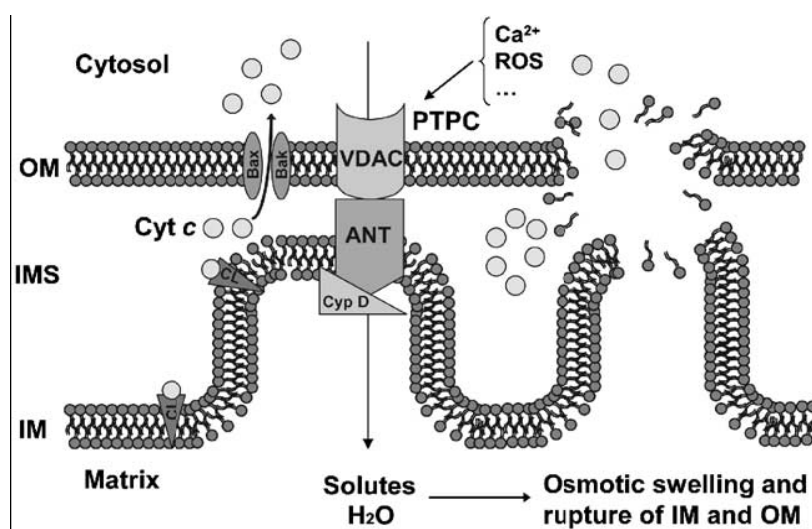


Figure 10 : Régulation de la libération du cytochrome C par le pore PTP. Deux mécanismes ont été proposés : la rupture de la membrane externe de la mitochondrie ou régulation de la formation d'un canal situé sur la membrane externe et constitué de plusieurs protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Garrido et al, 2006)

2.2.2. Constitution du pore de transition mitochondriale (PTP)

Le pore est un complexe protéique qui permet le passage de molécule ayant un poids moléculaire < 1500 Da. La constitution exacte de ce pore est un sujet de débat (Baines, 2009). Certains auteurs disent qu'il est constitué de VDAC situé à la membrane externe, ANT à la membrane interne et la CyP D du côté matriciel. D'autres suggèrent des modèles faisant intervenir d'autres molécules telles que la PiC et le complexe I de la chaîne respiratoire, les deux situés au niveau de la membrane interne. Le PTP regroupe aussi certaines protéines considérées comme « régulatrices » de son ouverture : l'hexokinase (HK), la créatine kinase (CK) et le récepteur périphérique des benzodiazépines (RPB).

2.2.2.1. VDAC (voltage dependent anion channel)

C'est la protéine la plus abondante de la mitochondrie, située au niveau de la membrane externe. Elle facilite le transport d'ATP/ADP à travers la membrane externe. Elle se trouve sous trois isoformes : VDAC 1-2-3 (Blachly-Dyson & Forte, 2001). Ce canal se trouve sous 2 états : « ouvert » ou « fermé ». Quand VDAC est « ouvert », il est perméable à toute molécule ayant un poids moléculaire inférieur à 5 kDa. A l'état « fermé », ce canal devient cation sélectif et permet le passage de molécule ayant un poids moléculaire inférieure à 1.5 kDa (Tan & Colombini, 2007). Le fait que VDAC soit un des constituants de pore reste controversé (Baines et al, 2007).

Une étude réalisée sur des mitochondries isolées du foie a montré que l'anticorps dirigé contre VDAC bloque l'activité de ce canal et empêche l'effet du calcium sur l'ouverture du pore et sur la libération du cytochrome *c* (Shimizu et al, 2001). Des études menées par l'équipe de Shoshan-Barmatz ont montré que la surexpression de VDAC1 induit la transition du potentiel mitochondrial et l'apoptose des cellules (Abu-Hamad et al, 2006; Zaid et al, 2005). Le groupe du Crompton a réussi à co-immunoprécipiter VDAC avec les autres constituants du pore ANT et CyP D en incubant le lysat mitochondrial avec du GST-CyP D (Crompton et al, 1998). Ces chercheurs ont réussi également à reconstituer un pore formé par VDAC-ANT-CyP D ayant les mêmes caractéristiques que PTP, c'est à dire induit par le calcium et inhibé par la CsA.

Cependant d'autres études ont montré que VDAC n'est pas un composant essentiel du PTP mais pourrait être un élément « régulateur » de l'ouverture de se pore. Des fibroblastes issus des souris KO en VDAC1 et 3 et transfectées par un siRNA (small interfering RNA) dirigé contre la forme VDAC2 sont toujours sensibles à la transition du potentiel mitochondrial et à l'apoptose induite par le calcium ou le stress oxydant (Baines et al, 2007). Sachant que l'anticorps anti-VDAC peut reconnaître d'autres protéines, il n'est pas sûr que l'inhibition de l'apoptose avec cet anticorps soit due au blocage de VDAC (Rostovtseva et al, 2005). En outre, le pore, quand il est ouvert, laisse passer des molécules dont le poids est inférieur à 1.5 kDa, ce qui correspond à l'état fermé de VDAC. Dans cette conformation, VDAC fait entrer le calcium dans la mitochondrie alors que le pore est induit par une forte quantité de calcium matriciel et permet son relargage (Tan & Colombini, 2007). Ceci permet de suggérer un rôle « régulateur » de VDAC sans être un « constituant » du pore: VDAC à

l'état fermé permettrait l'entrée de calcium dans la mitochondrie qui à son tour induit l'ouverture du pore.

2.2.2.2. ANT (adenine nucleotide translocator)

C'est la protéine la plus abondante de la membrane interne mitochondriale. Elle joue un rôle très important dans le transport ADP/ATP à travers cette membrane. Elle existe sous 4 isoformes chez l'Homme (ANT1-2-3 et 4) et 3 chez les rongeurs (ANT1-2 et 4) (Dolce et al, 2005; Levy et al, 2000; Rodic et al, 2005; Stepien et al, 1992). L'ANT1 est exprimé uniquement dans le cœur et le muscle squelettique. L'ANT2 est exprimé dans les cellules à haute capacité de prolifération chez l'Homme et d'une façon ubiquitaire chez le rongeur. L'ANT3 est exprimé dans tous les tissus alors que l'ANT4 est exprimé dans le foie, les testicules et les cellules embryonnaires non différenciées. L'ANT se trouve sous 2 conformations : « c » et « m ». Le blocage d'ANT, dans une seule conformation, inhibe le transport d'ADP/ATP. En plus de son rôle de transporteur d'adénine, l'ANT semble jouer un rôle dans l'apoptose via la formation du PTP (Belzacq et al, 2002; Vieira et al, 2000).

L'ANT a été considéré comme étant un constituant du PTP par le fait que l'inhibiteur d'ANT, l'acide Bongkreique, qui stabilise l'ANT dans sa conformation « m » inhibe l'ouverture du pore et que l'autre inhibiteur, l'atractyloside, qui le stabilise dans sa conformation « c » induit l'ouverture de pore (Haworth & Hunter, 2000). Une interaction entre ANT et la CyP D a été démontrée (Vyssokikh et al, 2001) et Crompton et Halestrap ont réussi à reconstituer dans les liposomes un complexe ANT-CyP D ayant les mêmes caractéristiques que le PTP (Crompton et al, 1998; Woodfield et al, 1998). En outre, la surexpression d'ANT1, et non d'ANT2, entraîne un dysfonctionnement mitochondrial aboutissant à la mort cellulaire (Bauer et al, 1999; Jang et al, 2008; Zamora et al, 2004). Etant donné que seul ANT1 peut interagir avec CyP D (Vyssokikh et al, 2001), l'effet observé lors de la surexpression de l'ANT1 est plus dû à son implication dans la formation du pore qu'à son rôle dans le transport d'ATP/ADP.

Cependant, comme pour VDAC, plusieurs études suggèrent que ANT n'est pas un constituant essentiel du PTP mais pourrait jouer un rôle important dans sa régulation. Si ANT est un constituant essentiel du PTP, comment peut-on expliquer le fait que le pore se forme et cause l'apoptose dans des cellules n'exprimant pas ANT1, la seule isoforme d'ANT capable d'interagir avec les constituants du pore ? Le rôle régulateur d'ANT a été montré grâce à une étude menée sur des souris KO en ANT1 et 2. Chez ces souris, les mitochondries répondent

normalement à différents stimuli apoptotiques et le traitement avec la CsA protège contre l'apoptose en inhibant l'ouverture du pore. Dans ce modèle, l'absence d'ANT n'a pas pu empêcher l'ouverture du PTP mais une diminution de la sensibilité de ce pore au calcium a été détectée, ce qui suggère un rôle régulateur d'ANT (Kokoszka et al, 2004).

2.2.2.3. CyP D (Cyclophilin D)

C'est une protéine de 20 kDa située dans la matrice mitochondriale. Elle interagit avec la membrane interne mitochondriale en se fixant sur ANT ou une éventuelle autre molécule située sur la membrane interne. Il a été montré que cette interaction favorise l'ouverture du pore. La cyclosporine A empêche l'interaction de la CyP D avec son partenaire et inhibe l'ouverture du pore protégeant ainsi contre l'apoptose. L'effet de la CsA est inhibé par de fortes concentrations de calcium (Andreeva et al, 1995). Pour montrer que l'effet de la CsA est dû à son action sur la CyP D et non sur la calcineurine phosphatase, d'autres inhibiteurs de CyP D, tels que sanglifehrin-A et Debio-025, ont été utilisés et ont confirmé le rôle de la CyP D dans l'ouverture du pore (Clarke et al, 2002; Gomez et al, 2007; Hausenloy et al, 2003). En outre, des mitochondries et des cellules déficientes en CyP D sont plus résistantes aux stimuli induisant l'ouverture du pore tels que le calcium et le stress oxydatif (Baines et al, 2005; Schinzel et al, 2005).

Il faut noter que la CyP D n'est pas nécessaire à l'ouverture du pore en présence de forte concentration de calcium matriciel ; la transition de la perméabilité mitochondriale est toujours observée chez les souris déficientes en CyP D après l'ajout d'une quantité suffisante de calcium (Basso et al, 2005). On peut conclure que la liaison de la CyP D au pore permet juste de potentialiser l'effet du calcium.

2.2.2.4. PiC (phosphate inorganic carrier)

C'est une protéine de 30 kDa située sur la membrane interne mitochondriale. Elle permet le transport vers la matrice du phosphate inorganique nécessaire à la synthèse d'ATP (Palmieri, 2004). Cette protéine semble de plus en plus impliquée dans la formation du PTP : Elle transporte le phosphate inorganique qui est connu comme étant un inducteur de l'ouverture du pore et interagit avec la CyP D (Leung et al, 2008). Cette interaction est favorisée par les inducteurs du PTP et bloquée par ses inhibiteurs. Un nouveau modèle a été suggéré : le pore est constitué de PiC et de la Cyp D et régulé par l'ANT. Plusieurs études semblent confirmer cette hypothèse. La surexpression de PiC induit un dysfonctionnement

mitochondrial et une apoptose des cellules (Alcala et al, 2008). L'expression de PiC est ubiquitaire ce qui pourrait expliquer la formation du pore même dans les cellules n'exprimant pas ANT1. PiC appartient à la famille des SLC25 (solute carrier family 25) et a une masse de 30 kDa, ce qui permet de la confondre avec l'ANT. En effet après plusieurs années de travaux dans ce domaine, cette équipe a confirmé que la protéine qui interagit avec CyP D est PiC et non pas ANT. Cette dernière semble jouer un rôle régulateur du fait qu'elle interagit avec PiC puisque l'altération de sa conformation peut influencer PiC (Leung et al, 2008).

PiC semble donc jouer un rôle dans la formation du pore. Des études supplémentaires doivent être réalisées afin de confirmer s'il s'agit d'un constituant du PTP ou d'un régulateur de ce pore.

2.2.2.5. Le complexe I de la chaîne respiratoire

Plusieurs arguments ont permis de considérer le complexe I comme un constituant du pore : il est sensible à différents facteurs connus comme étant régulateurs du PTP comme le calcium (Kotlyar et al, 1992) et capable de réguler la transition de perméabilité par le flux de ses électrons. L'équipe de Fontaine a montré que la probabilité d'ouvrir le pore est plus élevée lorsqu'on fournit des électrons au complexe I que lorsqu'on donne des substrats au complexe II ou IV (Fontaine et al, 1998). L'inhibition du complexe I par la roténone ou la metformine protège contre la transition de la perméabilité mitochondriale et la mort cellulaire (Chauvin et al, 2001; Guigas et al, 2004). En outre, des levures déficientes en ce complexe présentent une transition de perméabilité insensible au calcium ou à la cyclosporine A (Jung et al, 1997).

Cependant, cette implication du complexe I semble être tissu spécifique, l'effet de la roténone sur le PTP est bien visible dans le muscle squelettique et non dans le foie (Fontaine et al, 1998). D'autres part, plusieurs études contredisent cette hypothèse et montrent que le complexe I n'est pas un constituant du PTP et que son inhibition entraîne l'ouverture du pore et la mort cellulaire par production de ROS (reactive oxygen species) (Garcia et al, 2005; Scorrano et al, 1999; Seaton et al, 1998).

2.2.2.6. Créatine Kinase (CK)

C'est une enzyme située dans l'espace intermembranaire mitochondrial et dans le cytosol. Elle catalyse la conversion de la créatine en phosphocréatine. On la trouve dans le cœur, le muscle squelettique et le cerveau. CK pourrait intervenir dans la formation du pore puisqu'un complexe ANT, VDAC et CK a été observé au niveau des mitochondries du

cerveau du rat (Beutner et al, 1996). Il semble que la CK sous forme dimérique favorise l'ouverture du pore alors que sa forme octamérique l'inhibe (Dolder et al, 2001; O'Gorman et al, 1997). Certains auteurs proposent que la régulation de CK n'est pas directe : en transformant la créatine en phosphocréatine, l'ATP est transformé en ADP, ceci oblige l'ANT de prendre une conformation « m », inhibitrice du PTP, pour pouvoir transporter l'ADP dans la matrice (Dolder et al, 2003).

2.2.2.7. L'hexokinase (HK)

L'hexokinase est une protéine cytosolique impliquée dans le métabolisme du glucose. Il a été montré que HK interagit avec VDAC au niveau de sa région N-terminal et protège contre l'apoptose (Arzoine et al, 2009; Azoulay-Zohar et al, 2004). Cette protection est inhibé par la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) qui phosphoryle VDAC empêchant ainsi la fixation de la HK (Pastorino et al, 2005). Le mécanisme exact de la protection contre l'apoptose due à l'interaction de VDAC avec HK n'est pas très bien connu. Certains chercheurs disent que la présence d'HK inhibe la liaison entre VDAC et Bax et d'autre disent que cette protection est indépendante de Bax (Majewski et al, 2004; Pastorino et al, 2002).

2.2.2.8. Le récepteur périphérique des benzodiazépines (RPB)

C'est une protéine de 18 kDa située au niveau de la membrane externe mitochondriale. Il a été démontré que le RPB forme un complexe avec ANT et VDAC et que ses ligands sont capables de réguler le PTP (Kinnally et al, 1993; McEnery et al, 1992). Cependant, des études ont montré que l'effet des ligands du RPB sur le PTP dépend de la dose et du type cellulaire utilisés (Berson et al, 2001; Chelli et al, 2001) et que ces ligands peuvent agir d'une façon indépendante du RPB (Gonzalez-Polo et al, 2005; Hans et al, 2005). Des études supplémentaires sont alors nécessaires pour confirmer ou pas son implication dans la constitution et la régulation du PTP.

En résumé la constitution exacte du pore PTP n'est pas encore bien connue (**Fig.11**). Pendant des années, les auteurs ont considéré que le pore est constitué de VDAC, ANT et CyP D et régulé par CK, HK, RPB. De ce que l'on peut dire actuellement, le pore est constitué de protéines encore inconnus situées au niveau de la membrane interne et régulés par les différentes protéines citées ci-dessus. Certains chercheurs proposent le transporteur de phosphate PiC comme un constituant potentiel mais des études supplémentaires doivent être réalisées afin de confirmer cette hypothèse.

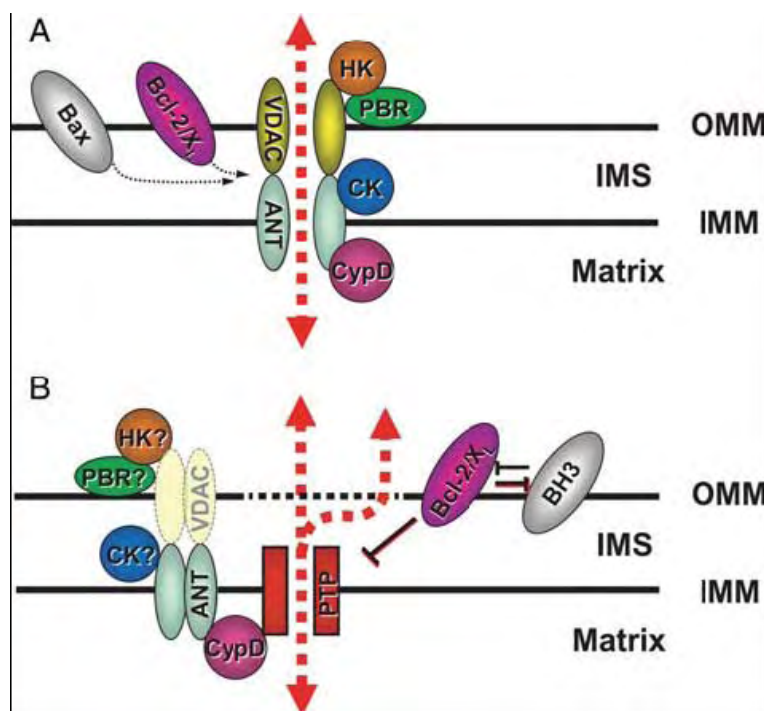


Figure 11 : Modèles proposés de la constitution du complexe PTP. (A) modèle classique : le pore PTP est constitué de VDAC, ANT et CypD et régulé par Hexokinase (HK), créatine kinase mitochondriale (CK), le récepteur benzodiazépine (PBR) ainsi que les membres de la famille Bcl-2. (B) : modèle actuel : les constituants essentiels du pore sont encore inconnus et tous les éléments cités dans (A) sont des régulateurs probables de ce pore (Zorov et al, 2009).

La chaîne respiratoire et le pore PTP qui semblent être 2 complexes différents sont en réalité très associés. D'une part, le fonctionnement de l'un est capable d'influencer celui de l'autre : Lors de la respiration, les fuites des électrons par le complexe I, II et III de la chaîne respiratoire entraînent la formation des ROS qui en grande quantité entraîne l'ouverture du pore et l'apoptose. En outre, l'ouverture du pore entraîne une chute du potentiel membranaire mitochondriale aboutissant à un découplage de la respiration caractérisé par une augmentation de la consommation d'oxygène et une diminution de la production d'ATP. D'autre part, les deux complexes sont affectés par certains facteurs dont le calcium qui est connu pour être un activateur de la respiration et un inducteur de l'ouverture du pore. Finalement, ces 2 complexes possèdent des composés en commun : le complexe I qui est un constituant de la chaîne respiratoire est, selon certains chercheurs, capable de réguler l'ouverture du pore et l'ANT, un constituant ou un régulateur du pore, qui est essentiel à la production d'ATP puisqu'il transporte l'ADP vers la matrice et l'ATP vers le cytosol. Par conséquent, un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire ou du pore PTP pourrait alors affecter la production de l'ATP et la vie cellulaire.

V. Dysfonctionnement mitochondrial

La mitochondrie représente l'organite clef de la synthèse d'ATP nécessaire pour le bon fonctionnement du cœur. Des études réalisées chez l'Homme ou sur des modèles animaux montrent qu'un défaut héréditaire ou acquis au niveau de la mitochondrie développe une cardiomyopathie (Russell et al, 2005; Wallace, 1999). En outre, dans certaines maladies telles que le diabète et l'insuffisance cardiaque, on remarque une diminution de la production d'ATP associée à une accumulation de lipides et à un dysfonctionnement cardiaque (An & Rodrigues, 2006; Murray et al, 2008). Les auteurs supposent que l'accumulation de lipides entraîne un dysfonctionnement mitochondrial aboutissant à une cardiomyopathie. Plusieurs facteurs pourraient être impliqués dans ce processus tels que le stress oxydatif, le découplage, l'ouverture du pore, et la biogenèse mitochondriale.

1. Le stress oxydatif

1.1. ROS : Production et élimination

Les espèces réactives d'oxygène (ROS) sont formées par gain d'électron à partir de l'oxygène. Il existe plusieurs formes de ROS : l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxynitrite ($ONOO^-$), l'oxyde nitrique (NO), les radicaux peroxydes (ROO) et hydroxyles (OH).

Dans l'organisme, il ya de nombreuses sources de la production de ROS dont l'importance varie selon les tissus. Dans le muscle squelettique et cardiaque, la mitochondrie est considérée comme étant la source principale de ROS par le fonctionnement de sa chaîne respiratoire. Pour certains auteurs, le complexe I représente la principale source de O_2^- par le groupe flavine mononucléotidique (Liu et al, 2002). D'autres considèrent le site ubiquinone du complexe III comme le site majeur de la production de ROS (Chen et al, 2003). Cette production s'effectue du côté matriciel de la membrane interne par le complexe I et du côté cytoplasmique de cette membrane par le complexe III (St-Pierre et al, 2002). Le complexe II peut jouer un rôle dans la production de ROS par flux inverse d'électrons de ce complexe au complexe I. L'utilisation du succinate comme substrat en absence de roténone entraîne une production massive de H_2O_2 , ceci est expliqué par le fait qu'en absence d'ADP, les électrons provenant du succinate peuvent remonter au complexe I et réduire le NAD^+ en NADH (Liu et al, 2002).

Les ROS possèdent de nombreuses fonctions physiologiques et leur maintien à une concentration physiologique est assuré par des systèmes anti-oxydants enzymatiques comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), les peroxyredoxines (Prx) et non enzymatiques comme les vitamines C et E (Mates et al, 1999). SOD catalyse la dismutation de O_2^- en H_2O_2 qui pourrait être pris en charge par les autres enzymes à activité peroxydase pour donner de l' H_2O et de l' O_2 (**Fig.12**). La CAT semble jouer un rôle important en présence de forte concentration de H_2O_2 alors que GPx fonctionne même en faible quantité. GPx prend aussi en charge les lipides peroxydés et nécessite, pour son action, la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron. La glutathion désulfite (GSSG) ainsi formé est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme donneur d'électron. Le rapport GSH/GSSG est un index de l'état d'oxydation dans la cellule. Malgré sa faible capacité catalytique par rapport aux autres peroxydases, Prx joue un rôle important dans l'élimination de H_2O_2 et des lipides peroxydés à cause de sa quantité énorme et sa large distribution dans la cellule.

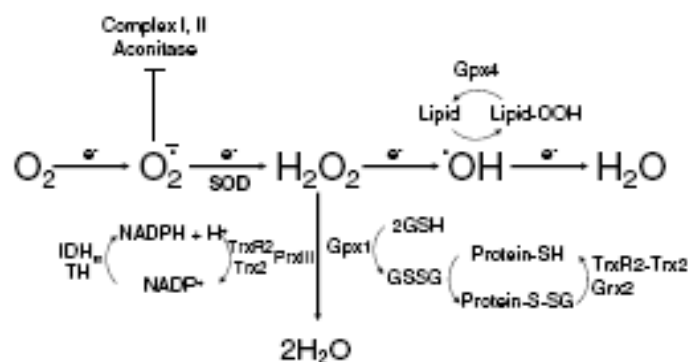


Figure 12 : formation et inactivation des espèces réactives d'oxygène dans la mitochondrie (Ott et al, 2007).

1.2. Stress oxydatif

Le stress oxydatif résulte du déséquilibre entre la production de ROS et leur élimination aboutissant à un dommage mitochondrial et cellulaire. Il est dû à un dysfonctionnement au niveau de système de production de ROS ou de leur élimination. La cible principale des ROS est la mitochondrie. L'excès de ROS aboutit à une diminution de la production d'ATP et à la mort cellulaire par différents mécanismes (Ott et al, 2007) :

1.2.1. Dommage de l'ADN mitochondrial

L'une des cibles de ROS est l'ADN mitochondrial. Celui-ci est plus sensible à l'effet de ROS que l'ADN nucléaire à cause de sa proximité de la chaîne respiratoire, la source de production de ROS, et de l'absence des histones qui jouent un rôle protecteur. Étant donné que l'ADN mitochondrial code pour certaines sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale (7 du complexe I, 1 du complexe III, 3 du complexe IV et 2 de l'ATP synthase), une altération au niveau de cet ADN pourrait donc modifier le fonctionnement de la chaîne respiratoire et par conséquent la production d'ATP.

1.2.2. Peroxydation des lipides

Les ROS peuvent oxyder les lipides et génèrent des peroxydes lipidiques qui sont eux-même très réactifs. Parmi les produits formés, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (4 HNE) peuvent attaquer l'ADN et/ou interagir avec des protéines perturbant ainsi leur fonctionnement (voir paragraphe oxydation des protéines).

D'autre part, les lipides peroxydés peuvent entraîner l'apoptose en facilitant la libération du cytochrome *c*. En effet, le cytochrome *c* se trouve associé à la cardiolipine : le constituant lipidique le plus abondant de la membrane interne mitochondriale. Sa libération dans le cytosol nécessite 2 mécanismes : sa dissociation de la cardiolipine et la perméabilité de la membrane externe. Les ROS entraînent la peroxydation de la cardiolipine et sa déplétion libérant ainsi le cytochrome *c* dans l'espace intermembranaire (Shidoji et al, 1999). En outre, il a été montré qu'en présence de Ca^{2+} , l'ajout de la cardiolipine peroxydée sur les mitochondries du cœur de rat induit l'ouverture de pore PTP et la libération du cytochrome *c* (Petrosillo et al, 2006). En effet, la cardiolipine peroxydée ouvre le pore via son action inhibitrice sur l'activité de l'ANT (Imai et al, 2003).

1.2.3. Oxydation des protéines

Les réactions d'oxydation entraînent une modification de la protéine soit en cassant les liaisons peptidiques soit en ajoutant un produit issu de la peroxydation lipidique comme 4-HNE. Ces modifications conduisent à une perte de la fonction et de la structure de la protéine affectée qui pourrait engendrer des dysfonctionnements mitochondriaux et cellulaires importants. Le 4-HNE oxyde le groupe SH de l'ANT inhibant ainsi son activité comme transporteur d'ADP/ATP et favorise sa capacité à former ou réguler le pore PTP (Chen et al, 1995). Il a été montré que 4-HNE active le découplage mitochondrial par action directe sur les

UCP (uncoupling protein) (Echtay et al, 2003). Les ROS peuvent aussi affecter l'homéostasie de calcium et la contraction cardiaque via l'oxydation et l'inhibition de SERCA2a (sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase) qui permet le retour du calcium vers le réticulum endoplasmique (Kowluru et al, 2000).

1.3. ROS et maladies cardiaques

Chez des modèles animaux de diabète de type 1 et 2, le stress oxydatif est bien observé dans le cœur et représente un facteur important du dysfonctionnement mitochondrial. Plusieurs études réalisées sur les cœurs des animaux diabétiques-STZ révèlent la présence d'un stress oxydatif caractérisé par une augmentation de la production de superoxydes et une diminution du GSH (Ghosh et al, 2005; Ghosh et al, 2004b). Chez d'autres modèles de diabète de type 1, les souris OVE26, une diminution de taux de GSH et une augmentation de taux du malondialdéhyde sont observées. Cependant, la surexpression de certaines enzymes antioxydantes, la CAT et SOD, améliore la fonction mitochondriale et la contraction cardiaque chez ces souris confirmant ainsi le rôle des ROS dans le dysfonctionnement mitochondrial et cellulaire (Shen et al, 2006; Ye et al, 2004).

Chez les souris diabétiques de type 2, une augmentation de la production de superoxyde et du taux de MDA et de 4-HNE a été observée dans le cœur des souris db/db (Boudina et al, 2007). La présence du stress oxydatif a été aussi montré dans les cardiomyocytes des souris ob/ob (Li et al, 2006)

Le stress oxydatif est aussi observé en cas d'insuffisance cardiaque. Une augmentation du taux de ROS et une diminution de l'expression et de l'activité de certaines enzymes impliquées dans l'élimination des ROS telles que la CAT et SOD ont été détectées chez les patients insuffisants cardiaques (IC) (Sam et al, 2005). Chez les patients ayant une cardiomyopathie hypertrophique, une corrélation positive entre le taux de lipides peroxydés et la dysfonction cardiaque a été observée (Nakamura et al, 2005). Celle-ci est caractérisée par une augmentation de diamètre du ventricule gauche à la fin de la diastole et de la systole et une diminution de la fraction d'éjection. Des modèles animaux confirment le rôle des ROS dans le développement de l'insuffisance cardiaque : Des souris KO en SOD développent une insuffisance cardiaque congestive accompagnée par une diminution de la respiration mitochondriale (Nojiri et al, 2006). Une autre étude a montré une dilatation du ventricule gauche et une diminution de sa contractilité chez des souris ayant subi un infarctus de myocarde (Ide et al, 2001). Ce dysfonctionnement ventriculaire est accompagné par une

augmentation de taux de superoxydes et de lipides peroxydés et diminution de l'activité des complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire. En effet, les ROS attaquent l'ADN mitochondrial et entraînent une sous-expression de certains gènes codant des sous unités de ces complexes aboutissant à une diminution de la production d'ATP et un dysfonctionnement cardiaque. Ces résultats sont confirmés par une autre étude qui montre que la surexpression de la glutathion peroxydase améliore la fonction du ventricule gauche chez les souris ayant subi un infarctus de myocarde (Shiomi et al, 2004).

2. Découplage

Le découplage désigne tout processus capable de diminuer le ratio ATP/O. Un découplage est dit extrinsèque quand il permet la fuite de protons à travers la membrane interne : une partie des protons retourne dans la matrice mitochondriale sans passer par l'ATP synthase et donc sans participer à la synthèse d'ATP. La consommation d'oxygène est alors augmentée afin de compenser cette perte de protons et maintenir la force proton-motrice.

2.1. Les protéines découplantes (UCP) : expression et rôles

Les UCP (1 à 5) appartiennent à la famille de transporteurs d'anions et sont situées sur la membrane interne mitochondriale. Elles diminuent le potentiel membranaire mitochondrial en permettant le passage des protons vers la matrice. Leur expression est tissu dépendante : UCP1 est exprimée d'une façon abondante dans le tissu adipeux brun, UCP2 est ubiquitaire, UCP3 plus spécifiquement dans le muscle squelettique, le tissu adipeux et le cœur, UCP4 et 5 dans le cerveau (Boudina & Abel, 2006). Dans cette partie, je vais détailler uniquement le rôle d'UCP3.

Le rôle d'UCP3 dans le découplage a été montré suite à la surexpression de cette protéine dans la levure, le muscle squelettique et autres types cellulaires. Ces résultats ont été mis en doute par d'autres études qui montrent que ce découplage observé est un artefact de la surexpression anormale d'UCP3 (Cadenas et al, 2002; Guerini et al, 2002). Cependant le rôle d'UCP3 dans le découplage a été confirmé par des études menées sur des souris KO. Cline a montré une augmentation du taux d'ATP et du rapport ATP/ADP chez les souris KO en UCP3 (Cline et al, 2001). Cette amélioration du couplage respiratoire a été aussi observée par Vidal (Vidal-Puig et al, 2000).

Le rôle d'UCP3 dans la régulation de la production des ROS a été montré suite à des délétions de ce gène chez la souris (Vidal-Puig et al, 2000). D'autre part, les superoxydes et

les lipides peroxydés semblent activer UCP3 (Echtay et al, 2003; Echtay et al, 2002). Une hypothèse a été émise: les ROS activent les UCP qui par retour vont limiter leur production.

UCP3 semble jouer un rôle dans le métabolisme lipidique. Elle est régulée par les acides gras via une voie PPAR α dépendante (Murray et al, 2005). Sa surexpression est associée à une augmentation de la β oxydation et non de la glycolyse. Quand l'entrée des acides gras dans la cellule dépasse la capacité oxydative de la mitochondrie, les acides gras en excès peuvent franchir la membrane mitochondriale par un mécanisme « flip-flop ». Une fois dans la matrice, ces acides gras perdent leur protons et deviennent des acides gras anioniques. Etant incapable de franchir la membrane interne ni d'être oxydés (à cause de l'absence de l'acyl CoA synthase matricielle), ces anions s'accumulent dans la matrice et rentrent dans la formation des ROS. Pour certains auteurs, UCP3 transporte ces anions à l'extérieur de la matrice augmentant ainsi la capacité oxydative mitochondriale et empêchant la formation des lipides peroxydés (Himms-Hagen & Harper, 2001; Schrauwen et al, 2001).

2.2. UCP3 et maladies cardiaques

Chez les patients insuffisants cardiaques, on remarque un déficit énergétique représenté par la diminution du ratio Phosphocréatine/ATP. Une corrélation positive entre le taux d'acides gras plasmatique et le taux d'UCP3 a été détectée dans le cœur des individus IC. Les auteurs supposent que l'augmentation d'acides gras entraîne une activation de l'UCP3 qui à son tour entraîne un découplage de la respiration et une diminution de la synthèse d'ATP (Murray et al, 2004). Ce résultat a été confirmé dans le cœur des rats ayant subi un infarctus de myocarde (Murray et al, 2008).

Le découplage est aussi observé en cas d'obésité et de diabète. Une corrélation positive entre l'expression d'UCP3 et le pourcentage de la graisse corporelle est détectée chez des patients obèses ou diabétiques de type 2. L'augmentation d'expression de cette protéine chez les diabétiques ne dépend pas de l'insulinorésistance (Bao et al, 1998). La perfusion de cœur des souris ob/ob par du palmitate augmente la consommation d'oxygène et diminue la synthèse d'ATP (Boudina et al, 2005). Une autre étude réalisée par la même équipe sur des souris db/db a montré que le découplage observé est dû à l'augmentation de l'activité d'UCP3 par les acides gras et non de son expression (Boudina et al, 2007). Cependant le rôle des UCP dans le cas de diabète de type 1 n'est pas bien élucidé. Le traitement des rats à la STZ augmente l'expression d'UCP3 dans le cœur ce qui permet de suggérer un rôle de cette protéine dans le dysfonctionnement mitochondrial observé chez ces

rats (Hidaka et al, 1999). D'autre part, Bugger a observé une diminution de la production d'ATP non associée à un découplage malgré l'augmentation de taux d'UCP3 dans le cœur des souris Akita (Bugger et al, 2008). Etant donné que le taux de ROS n'était pas affecté chez ces souris, les auteurs supposent l'activation des UCP3 par les ROS nécessaire à son effet découplant.

L'effet de l'augmentation de l'expression et de l'activité d'UCP3 est un sujet de débat (Hesselink & Schrauwen, 2005) : Certains auteurs supposent qu'UCP3 est un facteur important du dysfonctionnement mitochondrial puisqu'elle favorise la fuite de proton dans la matrice aboutissant à une diminution de la production d'ATP et de la fonction cardiaque. Cependant d'autres auteurs suggèrent un rôle protecteur d'UCP3 en diminuant la production des ROS et le transport des acides gras anionique à l'extérieur de la mitochondrie. Le rôle exact d'UCP3 dans ces maladies reste encore à élucider.

3. Biogenèse mitochondriale

Le protéome mitochondrial comprend environ 1100 à 1500 protéines. La plupart de ces protéines sont codées par des gènes nucléaires alors que le génome mitochondrial code pour 13 sous-unités des enzymes impliquées dans la phosphorylation oxydative. La biogenèse mitochondriale nécessite alors la coordination de la transcription des gènes dans le noyau et dans la mitochondrie. La transcription de ces gènes localisés dans deux compartiments différents dépend de facteurs de transcription codés par le noyau. Certains de ces facteurs, tels que NRF (nuclear respiratory factor) et ERR (estrogen-related receptors) régulent les gènes nucléaires codant la majorité des sous-unités de la chaîne respiratoire et ceux impliqués dans l'assemblage et le fonctionnement de cette chaîne. D'autres facteurs tels que TFAM (mitochondrial transcription factor A) et TFBM (mitochondrial transcription factor B) se dirigent vers la mitochondrie et régulent la transcription de son ADN. L'expression de ces facteurs est contrôlée par les co-activateurs de la famille PGC-1 (peroxysome proliferator-activated receptor γ coactivator-1). Dans cette partie, je souhaite détailler le rôle de certains facteurs de transcriptions (NRF, ERR et TFAM) dans la biogenèse mitochondriale ainsi que sa régulation avec PGC1 α et β .

3.1. Rôle de NRF, ERR et TFAM dans la biogenèse mitochondriale

3.1.1. TFAM

TFAM est une protéine codée par le génome nucléaire qui régule la transcription (Falkenberg et al, 2002) et la réplication de l'ADN mitochondrial (Ekstrand et al, 2004; Kanki et al, 2004). La déplétion complète du gène TFAM chez la souris est létale (Larsson et al, 1998); chez les souris hétérozygotes, Larsson a observé une diminution de la quantité de l'ADN mitochondrial et des protéines codées par cet ADN ainsi qu'une déficience de la chaîne respiratoire. Une corrélation entre la quantité de TFAM et le nombre de l'ADN mitochondrial est aussi observée chez les cellules humaines (Kanki et al, 2004). Des souris KO en TFAM dans le cœur entraîne une cardiomyopathie dilatée alors qu'une surexpression de TFAM chez les souris ayant subi un infarctus du myocarde améliore la fonction cardiaque et diminue le remodelage et l'apoptose observés chez ces souris (Ikeuchi et al, 2005; Wang et al, 1999a).

3.1.2. NRF

NRF-1 est une protéine codée par le génome nucléaire qui régule (**Fig.13**) l'expression des gènes nucléaires codant pour les sous unités de la chaîne respiratoire et les facteurs impliqués dans l'import et l'assemblage de ces sous unités (Scarpulla, 2002; Scarpulla, 2008). Elle contrôle aussi l'expression des régulateurs majeurs de la transcription mitochondriale tels que TFAM, TFB1M et TFB2M (Gleyzer et al, 2005). Plusieurs études montrent le rôle important de NRF-1 dans la biogenèse mitochondriale. Des souris NRF-1^{-/-} présentent une mortalité embryonnaire précoce accompagnée d'une sévère diminution de l'ADN mitochondrial (Huo & Scarpulla, 2001). Une augmentation de l'expression de NRF-1 ou de l'activité de son liaison à l'ADN est observée dans plusieurs situations caractérisées par une augmentation de la biogenèse mitochondriale telles que l'exercice (Murakami et al, 1998) ou en réponse à une augmentation du calcium (Ojuka et al, 2003) ou de l'AMPK (Bergeron et al, 2001).

De même que NRF-1, NRF-2 (ou GABP) semble jouer un rôle dans la biogenèse mitochondriale. Des sites de liaison de NRF-2 ont été identifiés dans les promoteurs de nombreux gènes codant pour des composants de la chaîne respiratoire et des protéines impliquées dans l'import mitochondrial ainsi que dans les promoteurs des gènes TFAM, TFB1M et TFB2M (Scarpulla, 2008). L'inactivation du gène NRF-2 entraîne une réduction

de dix gènes COX, de TFAM, TFB1M, TFB2M et d'un composant impliqué dans l'import mitochondrial TOM20 (Ongwijitwat et al, 2006).

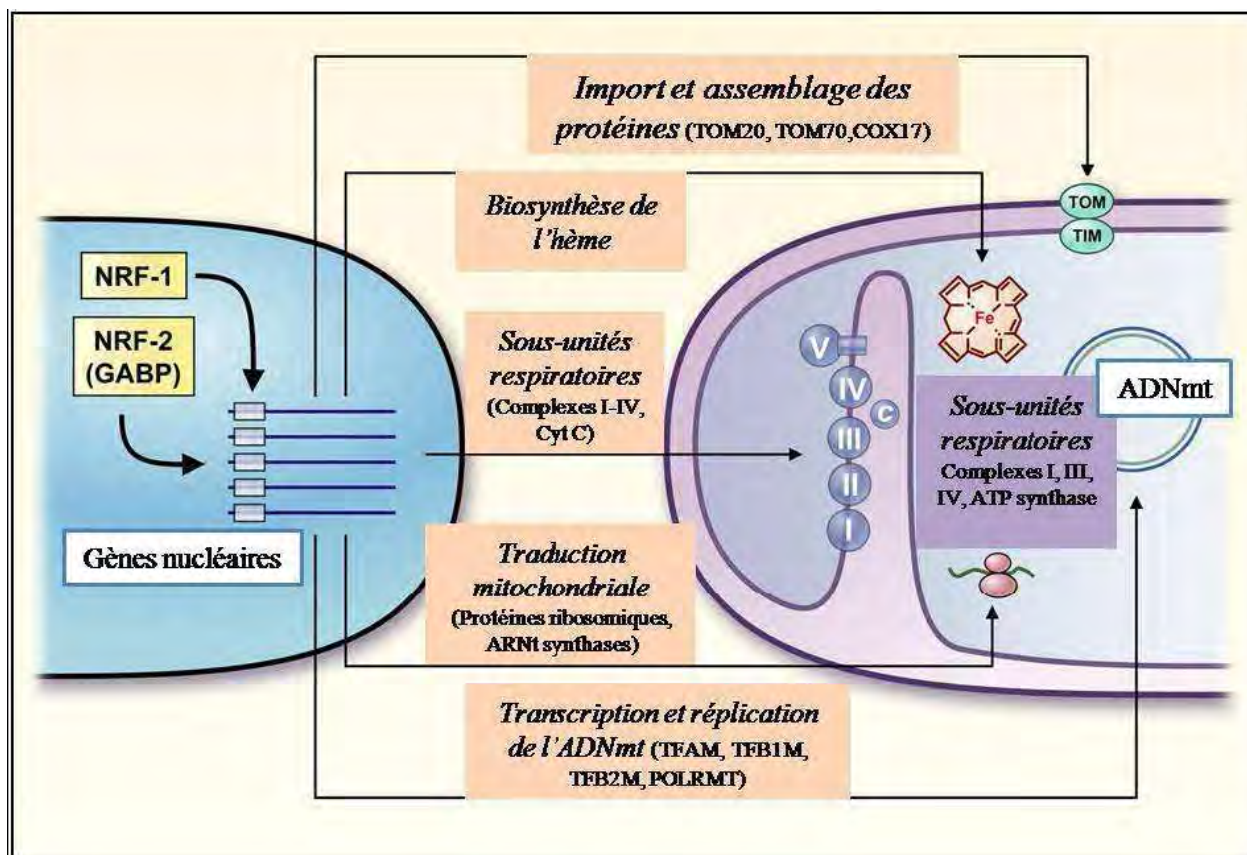


Figure 13 : Régulation des fonctions mitochondriales par NRF-1 et NRF-2 : les NRFs contribuent directement et indirectement à l'expression de nombreux gènes nécessaires pour la maintenance et le fonctionnement de l'appareil respiratoire mitochondriale. Elles sont également impliquées dans l'expression de facteurs clés de la machinerie d'import et d'assemblage des protéines (Scarpulla, 2008).

3.1.3. ERR

Les ERRs, α , β , et γ appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires et sont exprimées en grande quantité dans les tissus à haut métabolisme tels que le cœur, le muscle squelettique, le tissu adipeux brun (Bookout et al, 2006). Malgré le fait qu'ils présentent des similarités de séquence avec les récepteurs aux œstrogènes, ces récepteurs ne sont pas activés par cette hormone (Kallen et al, 2004). Leur activité transcriptionnelle est régulée par des interactions avec des cofacteurs : elle est inhibée suite à l'interaction des ERRs avec RIP140 (receptor interacting protein 140) et est activée suite à leur association avec les protéines de la famille de PGC1 (Villena & Kralli, 2008). Les ERRs (**Fig.14**) régulent l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans l'oxydation des acides gras, le

cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative, la production et l'export d'ATP, la transcription et la traduction de l'ADN mitochondrial (Giguere, 2008). Cette régulation peut s'effectuer d'une façon directe ou via l'activation de l'expression des autres facteurs de transcription tels que TFB2M, PPAR α et NRF2 (Giguere, 2008; Huss et al, 2004b; Mootha et al, 2004). Une diminution de l'expression des gènes cibles d'ERR impliqués dans l'oxydation des acides gras et de la phosphorylation oxydative (cox6a, cox8a, cpt2, Ndufs1, Slc25a29) a été détectée dans le cœur des souris déficientes en ERR γ (Alaynick et al, 2007). En outre, la transition de l'utilisation du glucose comme source d'énergie à un métabolisme lipidique est absente chez ces souris après la naissance. Par conséquent, une dysfonction cardiaque s'installe et contribue à une mort précoce post-natale. Une autre étude réalisée sur des souris KO en ERR α (Huss et al, 2007) montre une sous-expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme dans le cœur de ces souris à l'état basale ou lors d'une augmentation de la charge de travail. Une déficience énergétique n'est observée qu'en cas de surcharge de travail. Ces changements sont aussi observés dans d'autres tissus mais ces souris restent viables. Ceci peut être expliqué de deux manières : soit ERR α n'est pas essentiel pour l'expression basale de gènes impliqués dans le fonctionnement de la mitochondrie soit la perte de ERR α est compensée par une augmentation de l'activité d'autres ERRs ou d'autres facteurs ayant un rôle similaire.

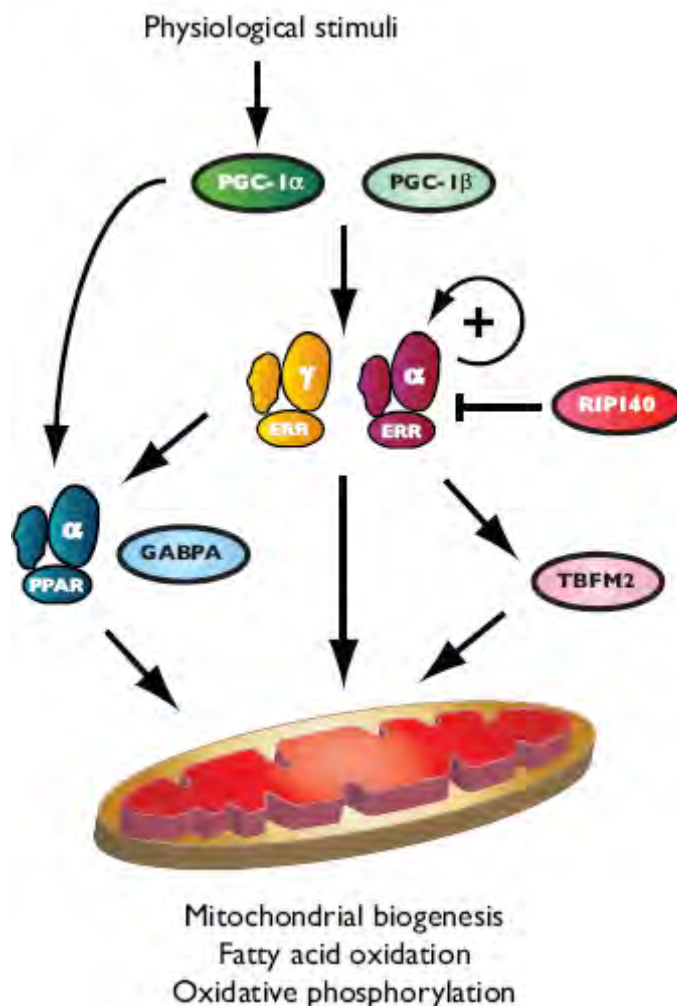


Figure 14 : Régulation des fonctions mitochondriales par les ERRs. L'activité transcriptionnelle des ERRs est activée par PGC1 et inhibée par RIP140 dont l'expression est contrôlée par les ERRs. Ces derniers induisent l'expression des autres facteurs de transcriptions tels que : PPAR α , GABPA (NRF-2) et TBFM2 et tous ensemble activent l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale, la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras (Giguere, 2008).

3.2. Rôle de PGC1 α dans la régulation de la Biogenèse mitochondriale

PGC1 α est exprimé dans les tissus à haute capacité oxydative tels que le cœur, le muscle squelettique et le tissu adipeux brun (Puigserver et al, 1998). L'expression de PGC1 α est induite après la naissance, durant l'exercice, le froid et le jeûne, situations caractérisées par une augmentation du métabolisme des acides gras (Baar et al, 2002; Goto et al, 2000; Lehman et al, 2000). PGC1 α joue aussi un rôle important dans la respiration mitochondriale. La surexpression de PGC1 α dans les cellules musculaires squelettiques et cardiaques augmente l'expression des gènes codant des protéines de la chaîne respiratoire telles que COXI, IV, cytochrome *c* et les sous unités de ATP synthase (Lehman et al, 2000; Wu et al, 1999). L'effet de PGC1 α sur la respiration est tissu spécifique : il entraîne un découplage associé à une

augmentation d'expression des UCP 2 et 3 dans le muscle squelettique, alors qu'il favorise la phosphorylation oxydative couplée dans les cardiomyocytes. PGC1 α régule (**Fig.15**) le métabolisme cardiaque et la biogenèse mitochondriale via l'augmentation d'expression ou d'activité de PPAR α , NRF1/2 et ERRs. L'équipe de Spiegelman a montré que PGC1 α augmente l'expression et interagit avec NRF1/2 pour réguler l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale (Wu et al, 1999). L'inhibition de l'expression ou de l'activité des ERR α par des siRNA ou des inhibiteurs empêche l'effet de PGC1 α sur la régulation des gènes codant pour des protéines de la phosphorylation oxydatives ainsi que le réplication de l'ADN mitochondrial (Mootha et al, 2004; Schreiber et al, 2004). Ce résultat est aussi observé chez les souris PPAR α -/- (Duncan et al, 2007).

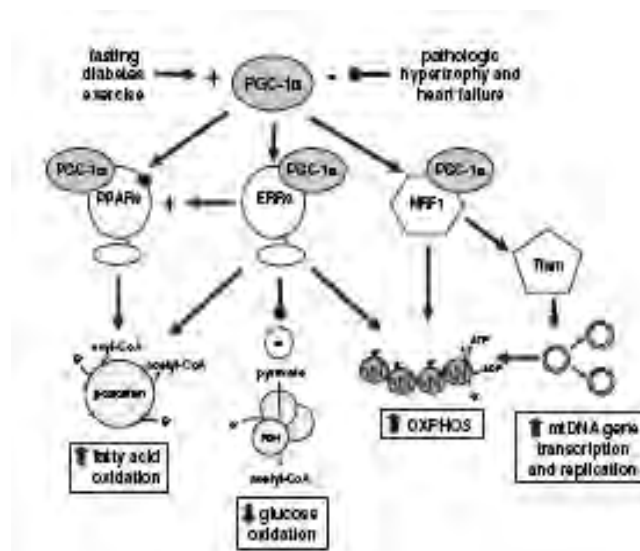


Figure 15 : Régulation des fonctions mitochondriales par PGC1 α . PGC1 α active PPAR pour induire l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras. Il active aussi les ERRs pour induire l'expression des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la β -oxydation et le système de phosphorylation oxydative et inhiber ceux qui sont impliqués dans l'oxydation de glucose. PGC1 α induit également la biogenèse mitochondriale en activant NRF1 qui à leur tour augmente la transcription des gènes codant des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative, d'origine nucléaire ou mitochondriale. Cette dernière est assurée suite à la surexpression du facteur de transcription mitochondrial Tfam (Finck & Kelly, 2007).

3.3. Rôle de PGC1 α dans le développement d'une cardiomyopathie

Des études *in vivo* montrent le rôle de PGC1 α dans la biogenèse mitochondriale et le développement d'une cardiomyopathie. La surexpression constitutive de PGC1 α dans le cœur de souris induit l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative, augmente le nombre d'ADN mitochondrial, entraîne une

cardiomyopathie dilatée et une mort de ces souris à l'âge de 6 mois (Lehman et al, 2000). Russell a montré que des souris surexprimant PGC1 α d'une manière inductible développent une cardiomyopathie âge dépendante (Russell et al, 2004). Il a observé une augmentation dramatique du nombre et de la taille des mitochondries ainsi que l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale sans altération de la fonction cardiaque chez les souris néonatales. Cependant, le cœur des souris adultes présente une prolifération mitochondriale modeste, des anomalies ultrastructurales des mitochondries et développe une cardiomyopathie. Le rôle de PGC1 dans le dysfonctionnement cardiaque a été étudié aussi sur des animaux KO en PGC1 α qui présentent des résultats controversés. L'équipe de Spiegelman a montré une diminution de l'expression des gènes codant pour des protéines impliqués dans la biogenèse mitochondriale, la phosphorylation oxydative et la β -oxydation, de taux d'ATP, de l'ADN mitochondrial associée à une cardiomyopathie dilatée âge dépendante chez les souris KO en PGC1 α (Arany et al, 2005). Cependant l'équipe de Kelly n'a réussi à observer ce dysfonctionnement qu'en réponse à l'exercice ou après stimulation β -adrénergiques et non à l'état basal (Leone et al, 2005).

3.4. Rôle de la biogenèse mitochondriale dans les maladies cardiaques

Vu l'importance de la biogenèse mitochondriale dans le maintien de la respiration et la fonction cardiaque, son altération pourrait être considérée comme un facteur clef dans le développement d'une cardiomyopathie en cas de diabète ou d'insuffisance cardiaque.

De nombreuses études montrent une diminution de la biogenèse mitochondriale dans le cœur des insuffisants cardiaques. Sihag a observé dans le ventricule des patients IC une sous-expression de PGC1 α , ERR α et de leur gènes cibles corrélée avec certains paramètres cliniques tels qu'une diminution de la fraction d'éjection (Sihag et al, 2009). Une autre étude réalisée sur des rats IC montre une faible expression de PGC1 α , NRF, TFAM, COXI et IV (Garnier et al, 2003). Cette altération transcriptionnelle n'est pas accompagnée par une diminution du nombre d'ADN mitochondriale. Ceci est expliqué par la quantité faible de TFAM qui normalement suffit pour la réplication de l'ADN et non pour son activité transcriptionnelle. En outre, une cardiomyopathie associée à une diminution de l'expression de PGC1 α et de certains gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras (ex : cpt2, mcad (medium chain acyl CoA dehydrogenase) et dans la respiration (exp : cox5b, atp5, ndufa5) a été observée chez la souris suite à une constriction transversale de l'aorte (Arany et al, 2006). Ces résultats ont été aussi détectés in vitro après traitement à l'épinephrine. L'introduction

ectopique de PGC1 α prévient cet effet suggérant ainsi PGC1 α comme une cible thérapeutique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Ce rôle important de PGC1 α dans le développement de l'insuffisance cardiaque est confirmé par une autre étude réalisée par Sano et ses collaborateurs (Sano et al, 2004).

Des études réalisées sur le cœur des souris diabétiques OVE26, UCP-DTA (UCP promoter driven diphtheria toxin A transgenic mice) et db/db ont montré une augmentation de taux de l'ADN mitochondrial, de la densité volumique mitochondriale et de l'expression des gènes impliqués dans le fonctionnement des mitochondries (Boudina et al, 2007; Duncan et al, 2007; Shen et al, 2004). Cependant, Une diminution de la transcription des gènes, d'origine mitochondriale et non nucléaire a été remarqué dans le cœur des rats diabétiques (Nishio et al, 2004). Ceci est dû à une diminution de la fixation de TFAM à l'ADN mitochondriale et non de son expression. En outre, Bugger a détecté, dans le cœur des souris Akita, une sous-expression de PGC1 α et de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative et dans le cycle de Krebs associée à une faible synthèse d'ATP (Bugger et al, 2009). Cette diminution de la biogenèse mitochondriale a été observée aussi dans le muscle squelettique des patients diabétiques (Mootha et al, 2003; Patti et al, 2003; Ritov et al, 2005).

4. Pore de transition du potentiel mitochondrial (mPTP) et maladies cardiaques

Comme je l'ai mentionné précédemment, le PTP est un complexe protéique situé au niveau de la membrane mitochondriale et permet le passage des molécules de poids moléculaire inférieur à 1.5 kDa. Son ouverture entraîne une chute du potentiel mitochondrial et une libération du cytochrome *c* dans le cytosol aboutissant à une diminution de la production d'ATP et à la mort des cardiomyocytes. Plusieurs études montrent une ouverture du PTP en cas d'une ischémie/reperfusion, d'une insuffisance cardiaque et de diabète suggérant ainsi un rôle important de ce pore dans les complications observées au cours de ces maladies (Javadov et al, 2009; Oliveira, 2005).

Chez les chiens insuffisants cardiaque, le traitement des cardiomyocytes par une dose faible de cyclosporine A améliore la fonction respiratoire et augmente la synthèse d'ATP (Sharov et al, 2007; Sharov et al, 2005). L'effet protecteur de la CsA est aussi observé en cas d'ischémie/reperfusion et chez les rats traités par la doxorubicine (DOX), une drogue anti-

cancéreuse qui entraîne une cardiomyopathie dilatée (Halestrap et al, 1997; Solem & Wallace, 1993).

L'inhibition de l'ouverture du pore peut se faire indirectement en agissant sur le principal facteur activateur : le calcium. En cas d'ischémie/reperfusion, l'échangeur Na^+/H^+ (NHE) est activé (Karmazyn et al, 1999). L'augmentation de taux du Na^+ dans le cytosol oblige l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, inversement à son rôle normal, à faire rentrer le calcium qui s'accumule dans le cytosol. Par conséquent, le calcium rentre dans la mitochondrie et active l'ouverture du pore. Le traitement avec un inhibiteur de NHE, le diméthylamiloride (DMA) protège contre l'ischémie/reperfusion en empêchant l'ouverture du pore (Prendes et al, 2008). Javadov a observé que l'inhibition de l'activité de NHE par EMD (2-méthyl-5-méthylsulfonyl-1-(1-pyrrolyl)-benzoylguanidine) ou celle du transporteur calcique mitochondrial par le ruthénium red (RR) empêche l'ouverture du pore et protège contre l'hypertrophie cardiaque induite par la phényléphrine (PE) (Javadov et al, 2006). Une autre étude réalisée par la même équipe a montré une amélioration de la fonction respiratoire, après traitement à l'EMD, pendant la période de remodelage post infarctus chez le rat (Javadov et al, 2005).

Chez les animaux traités à la STZ, on observe une diminution de la phosphorylation oxydative et de l'accumulation du calcium dans la mitochondrie (Oliveira et al, 2003; Tanaka et al, 1992). Selon Oliveira, ces changements détectés sont les conséquences d'une ouverture du pore PTP et non d'un défaut dans la machinerie de l'entrée du calcium dans la mitochondrie puisqu'en présence de la cyclosporine A, les mitochondries issus du cœur diabétique sont capables d'accumuler le calcium d'une façon similaire à ceux d'un cœur normal. D'autres paramètres tels que le taux élevé de ROS et la diminution du potentiel mitochondrial sont observés chez les animaux traités à la STZ et maintiennent l'hypothèse d'une ouverture du pore. Cependant, chez les rats Goto Kakizaki (GK), un modèle de diabète de type 2, les mitochondries des cardiomyocytes accumulent une forte quantité du calcium et sont moins sensibles à l'induction de la perméabilité mitochondriale par le système calcium/phosphate (Oliveira et al, 2001). Par contre, l'étude réalisée par Santos a montré une augmentation de la consommation d'oxygène et du stress oxydatif dans les mitochondries du cœur des rats GK (Santos et al, 2003). Les auteurs expliquent ces résultats contradictoires par le facteur « âge » en ce qui concerne les rats GK et le facteur « hyperglycémie » pour essayer d'expliquer les différences observées entre les animaux traités à la STZ et les rats GK.

5. Dysfonctionnement du transporteur des nucléotides adényliques (ANT)

5.1. Expression et structure de l'ANT

L'ANT est la protéine la plus abondante dans la mitochondrie. Dans le cœur, elle représente 10% des protéines situées dans la membrane interne mitochondriale. Son poids moléculaire est de 33 kDa. Elle contient (**Fig.16**) 3 séquences répétées de 100 acides aminés avec 6 domaines transmembranaires de 18 à 22 résidus associées par 5 boucles hydrophiles de 40 acides aminés dont 3 du côté matriciel et 2 de la face de l'espace intermembranaire [révisé par (Halestrap & Brenner, 2003)]. Chez l'Homme, il existe 4 isoformes d'ANT : 1-2-3-4 dont l'expression est tissu spécifique alors que chez les rongeurs on trouve que 3 isoformes ANT1, 2 et 4 : ANT1 est exprimée d'une façon abondante dans le cœur et le muscle squelettique, ANT2 est exprimée dans les cellules à prolifération rapide chez l'homme est dans tous les tissus chez le rongeur, ANT3 à une expression ubiquitaire et ANT4 se retrouve dans les cellules germinale et embryonnaires non différenciées chez l'Homme et la souris (Dolce et al, 2005; Levy et al, 2000; Rodic et al, 2005; Stepien et al, 1992).

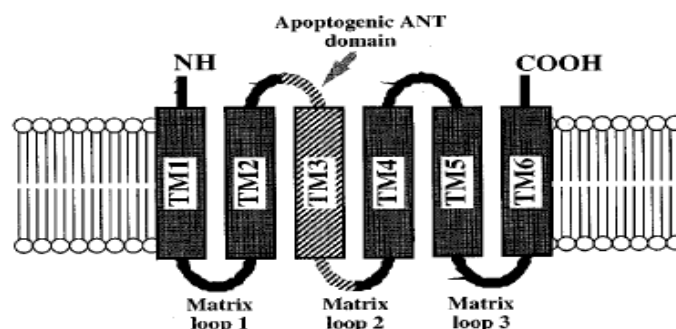


Figure 16 : Topologie de l'ANT au niveau de la membrane interne mitochondriale. Elle est constituée de 6 domaines transmembranaires associées par 5 boucles hydrophiles dont 3 du côté matriciel et 2 de la face de l'espace intermembranaire (Vieira et al, 2000).

5.2. Fonctions de l'ANT :

Le rôle physiologique d'ANT est le transport ADP/ATP à travers la membrane interne (Fiore et al, 1998): elle fait rentrer l'ADP³⁻ dans la matrice et fait sortir l'ATP⁴⁻ vers le cytosol. En plus de son rôle de transporteur, l'ANT régule la formation du pore de transition de la perméabilité membranaire (PTP) et participe au phénomène d'apoptose (Belzacq et al, 2002; Vieira et al, 2000). La fonction d'ANT, transport ATP/ADP ou régulateur de pore, varie selon son interaction avec d'autres protéines telles que Bax et Bcl2 ou des ligands comme BA et CAtra (carboxyatractyloside) (**Fig.17**). Il a été montré que Bax favorise la

fonction de formation de pore alors que Bcl2 stimule la fonction transport ADP/ATP (Brenner et al, 2000; Marzo et al, 1998). Malgré le fait que les 2 ligands inhibent le transport ADP/ATP, ils ne fonctionnent pas pareil vis à vis de la formation de pore : CAtra se fixe sur le coté cytosolique d'ANT et induit l'ouverture du pore qui se trouve inhibé par le BA qui se fixe sur son coté matriciel (Brandolin et al, 1985; Dianoux et al, 2000). En outre, des études montrent un découplage basal ou induit en présence d'acides gras par ANT (Brand et al, 2005; Roussel et al, 2000), ce qui suggère un rôle régulateur de l'ANT sur le potentiel membranaire et la production de ROS.

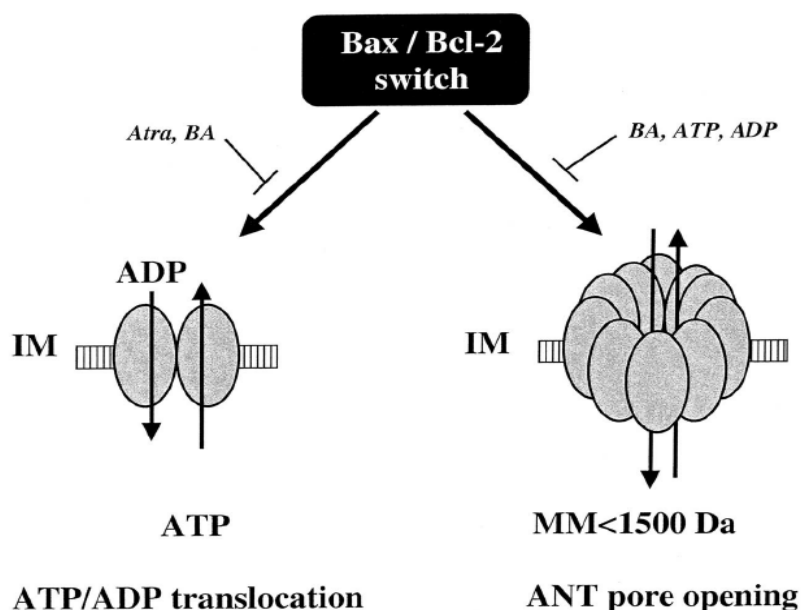


Figure 17: Régulation de la fonction de l'ANT par interaction avec d'autres protéines ou des ligands. Bax et ATRA inhibent le transport ADP/ATP et favorisent l'ouverture du pore. Bcl2 favorise le transport ADP/ATP et inhibe l'ouverture du pore en empêchant l'interaction de Bax avec ANT. BA inhibe le transport d'ADP/ATP ainsi que l'ouverture du pore. (adapté Belzacq et al, 2002)

Les isoformes d'ANT sont fonctionnellement différents. La surexpression d'ANT1 et 3 et non de 2 induit l'apoptose dans différents types cellulaires (Bauer et al, 1999; Zamora et al, 2004). Zamora et al a montré que l'effet cette surexpression est inhibé par la CsA et le BA, ce qui montre que ANT1 et 3 (pas ANT2) rentrent dans la formation du PTP. Contrairement aux autres isoformes, ANT2 est surexprimée dans les cellules cancéreuses et entraîne le transport reverse d'ADP/ATP : elle fait rentrer l'ATP dans la mitochondrie favorisant ainsi un métabolisme glycolytique (Giraud et al, 1998). Cependant, la surexpression de l'ANT1 cause l'apoptose des cellules cancéreuses MDA-MB-231 en diminuant le potentiel membranaire

mitochondrial et en induisant l'expression de Bax, la libération du cytochrome *c* et l'activation des caspase 3 et 9 (Jang et al, 2008).

5.3. ANT et le dysfonctionnement mitochondrial:

L'importance d'ANT dans le dysfonctionnement mitochondrial et cellulaire a été montrée chez des souris KO en ANT1. La déficience en ANT entraîne une prolifération mitochondriale associée à une hypertrophie cardiaque et une altération de la respiration couplée dans le muscle squelettique des souris ANT1^{-/-} (Graham et al, 1997). Une autre étude réalisée par cette équipe a montré une surexpression de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydatives (cytochrome *c* oxydase, NADH déshydrogénase) et dans le métabolisme énergétique (maltate déshydrogénase, glycogène phosphorylase) dans le muscle squelettiques des souris déficientes en ANT1 (Murdock et al, 1999). Suite à la délétion d'ANT1, Narula a détecté une cardiomyopathie dilatée concentrique caractérisée par une hypertrophie du myocarde, une dilatation ventriculaire ainsi qu'une diminution de la fonction cardiaque (Narula et al, 2011). Dans les cardiomyocytes de ces souris, une augmentation de taux de cytochrome *c* et de la caspase 3 a été observée. En conclusion, l'absence d'ANT1 entraîne une déficience énergétique et mécanique aboutissant à long terme à une insuffisance cardiaque. D'autre part, la surexpression d'ANT restaure l'échange ATP/ADP, améliore la phosphorylation oxydative et reverse les altérations histologiques associées à la myopathie chez les souris ANT1^{-/-} (Flierl et al, 2005).

5.4. ANT et maladies :

Ayant un rôle clé dans le métabolisme énergétique, des mutations au niveau du gène codant l'ANT ou une altération de la fonction de cette protéine causent un dysfonctionnement cardiaque et musculaire.

Des mutations au niveau du gène codant l'ANT ont été révélées chez les patients atteints d'une ophthalmoplegia, une maladie autosomale dominante caractérisée par une myopathie généralisée due à une diminution de la phosphorylation oxydative et à une délétion de l'ADN mitochondriale (Deschauer et al, 2005). Le syndrome de Senger, un désordre autosomale récessif, constitue un autre exemple de maladie génétique due à la restriction de la fonction d'ANT. Dans cette maladie la déplétion d'ANT1 est associée à des anomalies ultrastructurale et fonctionnelle de la mitochondrie aboutissant à un dysfonctionnement cardiaque et musculaire (Jordens et al, 2002). Cependant une surexpression d'ANT1 associée

à un stress oxydatif ont été observés chez les atteints d'une FSHD (Facioscapula humeral muscular dystrophy) (Laoudj-Chenivresse et al, 2005; Winokur et al, 2003).

En cas d'une cardiomyopathie dilatée, Schultheiss a détecté une diminution du transport ADP/ATP dans le cœur (Schultheiss, 1992). Une surexpression d'ANT1 et une sous-expression d'ANT2 ont été observées chez les patients ayant une cardiomyopathie dilatée mais pas dans le cas d'une cardiomyopathie ischémique ou valvulaire (Dorner & Schultheiss, 2000; Dorner et al, 1997; Sylven et al, 1993). Etant donné que le transport ADP/ATP par ANT2 est 2.5 fois plus actif que celui d'ANT1, la modification d'expression des différents isoformes d'ANT cause une déficience énergétique responsable de la cardiomyopathie dilatée (De Marcos Lousa et al, 2002; Dorner et al, 2006). La surexpression d'ANT1 et par conséquent l'activation du transport ATP/ADP semble protéger contre la cardiomyopathie induite par le diabète (Wang et al, 2009). Une autre étude réalisée par Walther montre une diminution de l'apoptose, la fibrose et une augmentation de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire suite à la surexpression d'ANT dans le cœur des rats hypertendus (Walther et al, 2007).

Une diminution de taux et de l'activité de l'ANT est aussi observée en cas d'ischémie (Borutaite et al, 1993; Duan & Karmazyn, 1989; Rauch et al, 1994), ce qui pourrait expliquer l'altération de la phosphorylation oxydative, la diminution du potentiel membranaire mitochondrial et l'augmentation du découplage caractéristiques de cette maladie (Zaugg & Schaub, 2003). L'augmentation de l'activité d'ANT augmente le transport ADP/ATP et protège contre l'ischémie (Imahashi et al, 2004; Maulik et al, 1999).

Dans certaines infections virales, le virus interagit avec ANT (Boya et al, 2003; Jacotot et al, 2001) ou déclenche la sécrétion de certaines cytokines qui modifient l'expression et le fonctionnement de cette protéine (Law et al, 2004), ce qui aboutit à l'apoptose des cellules infectées.

Résultats expérimentaux

Article : Apolipoprotein O induces lipid overload, apoptosis and cell death by opening the mitochondrial permeability transition pore in mouse and human heart.

Annie Turkieh¹, Céline Caubère¹, Michel Galinier^{1,3}, Romain Harmancey¹, Franck Desmoulin¹, Louis Casteilla², Matthieu Berry^{1,3}, François Koukoui¹, Philippe Rouet^{1,3} & Fatima Smih¹

¹U1048 Equipe n°7, Obésité et insuffisance cardiaque: approches moléculaires et cliniques.

²U1031, Equipe n°1, Plasticité des tissus adipeux.

³Hopital Rangueil, Cardiologie A. F-31432 Toulouse, France.

En révision dans Nature Cell Biology

Objectifs

L'Apolipoprotéine O est une nouvelle protéine découverte par notre équipe lors d'une étude sur le transcriptome cardiaque des chiens rendus obèses et hypertendus suite à un régime gras hypercalorique. Elle est surexprimée dans le coeur en situation de diabète et d'obésité, maladies caractérisées par une accumulation intracellulaire de lipides, une dysfonction mitochondriale et cellulaire aboutissant à une cardiomyopathie. Durant mon travail, je me suis intéressée à étudier les conséquences de la surexpression de l'Apo O dans le coeur afin de comprendre son implication dans les différentes maladies citées ci dessus.

Dans un premier temps nous avons cherché à déterminer le rôle de l'Apo O dans le métabolisme lipidique et la lipotoxicité cardiaque en étudiant l'effet de sa surexpression sur :

- l'entrée des lipides et/ou leur accumulation
- le dysfonctionnement mitochondrial
- la mort cellulaire
- le dysfonctionnement cardiaque

Ensuite, nous avons essayé de découvrir le mécanisme d'action de l'Apo O en déterminant sa localisation, ses partenaires ainsi que l'ordre chronologique des événements observés.

Pour réaliser ce travail, plusieurs modèles ont été créés et utilisés :

- Des cardiomyoblastes de rat « H9c2 » transfectés soit par un vecteur surexprimant l'Apo O pleine taille ou mutée par délétion de sa région N terminale, soit par un vecteur inhibant son expression (shRNA)
- 3 lignées de souris transgéniques surexprimant l'Apo O dans le coeur. Ce modèle a permis, de confirmer, *in vivo*, les résultats obtenus *in vitro* et à étudier l'effet de la surexpression de l'Apo O sur la fonction cardiaque.
- Des souris auxquelles nous avons injecté le vecteur d'expression pour Apo O dans la veine caudale pour permettre sa surexpression dans le foie. L'intérêt de ce modèle

repose sur la surexpression rapide de l'Apo O (24 h) et a pour objectifs de valider les résultats obtenus dans le cœur dans un autre organe, le foie.

- Pour étudier l'effet de l'ApoO chez l'Homme, nous avons utilisé des déchets d'auricules cardiaques humaines obtenues au décours d'une circulation extracorporelle mise en place lors de chirurgies cardiaques à l'hôpital Rangueil de Toulouse.

Apolipoprotein O induces lipid overload, apoptosis and cell death by opening the mitochondrial permeability transition pore in mouse and human heart.

Annie Turkieh¹, Céline Caubère¹, Michel Galinier^{1,3}, Romain Harmancey¹, Franck Desmoulin¹, Louis Casteilla², Matthieu Berry^{1,3}, François Koukoui¹, Philippe Rouet^{1,3} & Fatima Smih¹

INSERM, Université UPS, ¹U1048 Equipe n°7, Obésité et insuffisance cardiaque: approches moléculaires et cliniques. ²U1031, Equipe n°1, Plasticité des tissus adipeux. ³Hopital Rangueil, Cardiologie A. F-31432 Toulouse, France.

Abstract :

The mitochondrial permeability transition pore (MPTP), first considered to play a key role in “life or death” decisions of the cell^{1,2}, has been proposed to be a target for cardioprotection during heart disease^{3,4}. Thus, MPTP regulators are of central importance to the control of mitochondrial (dys)function and the fate of cardiomyocytes. Through a functional genomics study aimed at identifying genes differentially regulated in the heart by obesity⁵, we discovered the new apolipoprotein O (ApoO) as overexpressed in hearts from diabetic patients⁶. In this study, we demonstrate the importance of ApoO as a new signal regulator of the MPTP. We show that ApoO localizes within mitochondria and that its expression associates with mitochondrial dysfunction in mouse and human heart. ApoO interacts with adenine nucleotide translocase (ANT) and causes the MPTP to adopt an open state, which induces mild uncoupling. Consequently, mitochondrial respiration and fatty acid metabolism are enhanced. This cascade of events generates a mitochondrial metabolic sink whereby cells accumulate lipids and lipotoxic byproducts leading to apoptosis, loss of cardiac myoblasts and cardiomyopathy, mimicking the metabolic phenotype of the diabetic heart. We propose a model for the original molecular mechanisms accounting for ApoO induced mitochondrial dysfunction and lipotoxicity through regulation of the opening of MPTP. The involvement of ApoO in lipid metabolism may reveal novel strategies to control lipid overload in pathophysiological situations like obesity, diabetes and cardiomyopathy.

Apolipoproteins (Apos) were first characterized to bind lipoproteins that facilitate the plasma lipid transport process through the lymphatic and circulatory systems. However, different unexpected functions have also been identified for Apos. ApoE activates Akt/PKB phosphorylation⁷, ApoJ can be translocated to the nucleus where it binds to the DNA repair protein Ku80⁸. Finally, ApoL6, which has structural homologies with Bcl2 family members, regulates pathways such as autophagy⁹.

Through a functional genomics study aimed at identifying genes differentially regulated in the heart by obesity⁵, we discovered a new apolipoprotein (ApoO) that is overexpressed in hearts from diabetic patients⁶. In order to uncover how changes in the expression of this protein relate to modifications of cardiac function, we performed *in vitro* and *in vivo* manipulations utilizing cardiac myoblasts, three independent cardiac specific transgenic mouse lines expressing ApoO at physiological levels, *in vivo* transfected mouse liver and human heart samples. We first show that ApoO localizes to mitochondria and interacts with adenine nucleotide translocase (ANT) causing the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) to adopt an open state, inducing mild uncoupling. MPTP was first considered to play a key role in the “life or death” decision of the cell and was proposed as a target for cardioprotection during heart disease^{3,4,10}. This pore enables free passage of metabolites and molecules of molecular mass below 1.5 kDa into the mitochondria¹¹ including protons, which leads to uncoupling. The exact protein composition of MPTP is still under debate but minimally includes cyclophilin D and ANT, which is proposed to serve as a regulatory component.

Reduced cardiac efficiency is one of the hallmarks of obesity and Type 2 diabetes in both rodents and humans. The mechanism for increased myocardial V_{O_2} and decreased cardiac efficiency are incompletely understood. Increased mitochondrial uncoupling was suggested to be one of the underlying mechanism that affects cardiomyocyte energetics and contractility¹², contributing to the growing epidemic of diabetic cardiomyopathy¹³. Thus, MPTP regulators are of central importance to control mitochondrial (dys)function and the fate of cardiomyocytes.

The molecular mechanisms that initiate, mediate and trigger mitochondrial dysfunction in response to lipid overload remain unclear¹⁴⁻¹⁷. Our results distinguish the interplay between mitochondrial dysfunction and lipotoxicity and demonstrate, for the first time, the implication of the permeability transition pore in lipid metabolism in mouse and human hearts. Moreover, we demonstrate the importance of ApoO as a new signal regulator

of mitochondrial function and lipid metabolism. Our ApoO-model represents an original link between impaired mitochondrial heart function and lipid accumulation.

Mouse hearts, constitutively expressing human ApoO at physiological levels (less than 2 times endogenous), exhibited depressed ventricular function, characteristic patterns of systolic dysfunction, and dilated cardiomyopathy^{18,19}. Specifically, cardiac specific ApoO-Tg mice displayed a lengthening of the PR interval and a reduction in fractional shortening and ejection fractions (Supplementary Fig. S1). Transmission electron microscopy (TEM) analysis of longitudinal myocardial sections revealed degenerative changes, such as loss or discontinuity of cristae in mitochondria (Fig. 1a). Examination of publicly available human heart microarray data sets revealed that ApoO mRNA levels fluctuated between 1 to 5 arbitrary units. Pathway analysis using synthetic expression ratios between microarrays with the highest and lowest ApoO expression revealed significant enrichment in various metabolic pathways (Supplementary Fig. S2), the most significant being oxidative phosphorylation and mitochondrial dysfunction (Fig. 1b and Supplementary Fig. S3). We then designed expression vectors to generate cardiomyoblast transfectants overexpressing ApoO. *In vivo* fluorescent labeling (Fig. 1c), as well as studies with protein extracts (Supplementary Fig. S4a-c) and subcellular fractions (Supplementary Fig. S4d) from cardiac myoblasts overexpressing ApoO, revealed a mitochondrial localization for ApoO. *In silico* investigation of the ApoO sequence revealed a putative N-terminal mitochondrial “address label”. Deletion of 40 N-terminal residues (ApoO Δ 1-40) altered ApoO distribution from the mitochondria to the cytoplasm (Fig. 1c). Furthermore, hydrodynamics-based *in vivo* mouse liver transfection by rapid tail vein injection of pTT-hApoO expression vector led to a rise in ApoO mRNA levels (Supplementary Fig. S5), as evidenced by PCR amplification of the expression vector (Fig. 1d), and increased the level of ApoO protein in isolated mitochondria from hepatocytes (Fig. 1e). In recent studies, ApoO has been proposed to be mitochondrial due to evidence obtained with yeast²⁰ and *C. elegans* orthologs²¹ and through proteomics²² and confocal microscopy of human cell lines²³. Interestingly, mutation in the ApoO ortholog of *C. elegans* led to cristae disorganization²¹ similar to that observed upon modest ApoO overexpression in mouse heart.

ApoO increases mitochondrial respiration. In agreement with the human heart transcriptome bioinformatic analysis, we measured a significant increase in cytochrome C oxidase activity, a mandatory component of the respiratory chain, in both ApoO-Tg hearts and ApoO cells (Supplementary Fig. S6), which displayed a two-fold increase in basal oxygen

consumption that was dependent on mitochondrial localization of ApoO and ablated by ApoO shRNA treatment (Fig. 2a). Antimycin, an inhibitor of the quinone cycle, almost completely inhibited oxygen consumption, indicating that most of the respiration being measured is mitochondrial (Fig. 2b). Basal oxygen consumption was partly inhibited by oligomycin in ApoO cells and addition of the uncoupler carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) led to a 2-fold increase in oxygen consumption, suggesting that these cells have enhanced electron transport activity. Respiration coupling (RC) calculations confirmed that RC decreases in ApoO cells. Thus ApoO has two distinct effects on mitochondrial function: an increase in total respiration and mild uncoupling. These effects were also associated with increases in intracellular reactive oxygen species (ROS) and ATP levels (Supplementary Fig. S7). We observed equivalent results with isolated mitochondria from hydrodynamics-based *in vivo* transfected mouse liver, which displayed a significant increase in oxygen consumption (Fig. 2c).

ApoO interacts with adenine nucleotide translocase. Proper regulation of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP), a known therapeutic target^{3,4,10}, is essential for mitochondrial respiration and cardiac homeostasis. Given the mitochondrial localization of ApoO and the effects observed on mitochondrial structure and cardiac function with modest ApoO overexpression, we hypothesized that ApoO interacts with proteins implicated in MPTP function. MPTP structure has not yet been fully determined²⁴. The MPTP was originally proposed to include cyclophilin-D (CypD) in the matrix, the adenine nucleotide translocase (ANT) in the inner membrane and the voltage-dependent anion channel (VDAC) in the outer membrane. Recently, gene-targeted mice experiments have shown that VDAC was dispensable for MPTP²⁵. This pore enables free passage into the mitochondria for molecules and metabolites smaller than 1.5 kDa¹¹, including protons thus leading to mitochondrial uncoupling. Co-immunoprecipitation with ApoO antibodies (Supplementary Fig.S8a) and GST-pull down experiments demonstrated an interaction between ApoO and ANT (Fig. 2d) and excluded any interaction with VDAC (Supplementary Fig. S8b), in agreement with the computational prediction that ApoO localizes in the inner mitochondrial membrane²⁶. Moreover, the yeast ApoO ortholog Aim37 was observed within a six member MitOS protein complex linking the outer and inner membrane. Precisely, Aim37-GFP formed both a discrete punctuate and a filamentous structure around the inner membrane²⁷. Conversely, the *C. elegans* ApoO ortholog, Mitochondrial Outer Membrane Abnormal (MOMA-1) localizes to the outer membrane²¹. This difference could be organism dependant.

We have previously shown that ApoO colocalized with perilipins⁶ in cardiac myoblasts⁶. This is not in discrepancy with the present work since perilipins also localize to mitochondria²⁸. We propose the model shown in Fig. 2f to illustrate the ApoO-induced mild uncoupling via its interaction with ANT and consequent opening of the MPTP.

To test the functional relationship between ApoO and MPTP, we treated ApoO cells with two MPTP blockers: Bongkreic acid (BA) and cyclosporin A (CsA), which bind to ANT, and cyclophilin D, respectively. While CsA reversed the effect of ApoO overexpression on mitochondrial respiration, BA did not (Fig. 2e), suggesting that ApoO interacts with ANT on BA site or in its vicinity. The viral protein R of the HIV-1 virus has also been shown to elevate respiration through the ANT BA site^{29,30}. We demonstrate, for the first time, that an endogenous protein (ApoO) could mimic the effect of the viral protein on ANT. The interaction between ApoO and ANT could enhance MPTP opening to generate a nonspecific pore, permeable to all solutes < 1.5 kDa (Fig. 2f-1 and 2). ApoO-induced opening of MPTP would explain the observed mild mitochondrial uncoupling and enhanced oxygen consumption (Fig. 2f-3). Moreover, cardiac myocyte abnormalities observed in ApoO-Tg mice resemble those reported in skeletal muscle from ANT1 knockout mice. While the respiratory exchange ratio increased in ANT1-KO mice, control animals exhibited a directly proportional relationship between the rates of VO₂ and VCO₂¹⁹. Moreover, several studies have proposed uncoupling as a mechanism accounting for mitochondrial dysfunction in diabetes¹². Taken together, the results strongly suggest a role for ApoO in the regulation of mitochondrial function.

ApoO-induced MPTP opening increases fatty acid metabolism and lipotoxicity.

ApoO is highly expressed in mitochondria-enriched tissues that mainly use fatty acids as an energy source, such as heart and brown adipose tissue⁶. Therefore, we assumed that the ApoO-induced increase in electron transport chain flux, would increase the mitochondrial transport of long-chain fatty acids (LCFAs). In order to provide mitochondria with LCFAs, cells would ultimately increase fatty acid uptake at the plasma membrane.

We measured a rapid accumulation of green fluorescent BODIPY-palmitate in ApoO expressing cells (Fig. 3a) and found that total intracellular fatty acids increased 120% (Fig. 3b). We therefore analyzed whether ApoO could induce the expression of genes involved in fatty acid metabolism³¹. In ApoO cells, fatty acid transporter (CD36 and FATP4) expression and long-chain acyl-CoA synthetase (ACSL) activity were strongly increased, effects that

were significantly reversed by treatment with either ApoO shRNA or triacsin C, an ACSL inhibitor (Fig. 3c-e). ACSL and FATP4 catalyze LCFA esterification, allowing lipid channeling³². Animal models of cardiac lipotoxicity have been generated by increasing lipid uptake via overexpression of ACSL³³. To validate our hypothesis, we incubated ApoO cells for 5 days with a very low dose of CsA (20 nM) and showed a significant reduction in intracellular fatty acid levels and especially in the expression of FATP4 (Fig. 3f-g), suggesting that ApoO-induced MPTP opening affects not only mitochondrial respiration but also fatty acid metabolism. We assumed that LCFAs could rapidly enter the mitochondria through carnitine palmitoyltransferase I (CPT1) and the non-specific MPTP (permeable to solutes < 1.5kDa). Similarly, hearts from ApoO-Tg mice displayed a significant increase in fatty acid transporter expression and ACSL activity (Supplementary Fig. S9a-c). In human atrial appendage samples, ApoO expression positively correlated with the expression of CD36, FATP4 and ACSL-3 (Supplementary Fig. S9d-f). Microarrays data mining were in accordance with these results and showed that CD36 and FATP2 were also increased in hearts of patients with elevated ApoO expression (Supplementary Fig. S10). These changes should be associated with an increase in peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- α transcription factor, known to be involved in lipid uptake and β -oxidation³⁴. Indeed, ApoO expression led to increased PPAR α mRNA levels in human atrial appendage samples, hearts from ApoO-Tg mice, *in vivo* transfected mouse liver, and ApoO cells (Supplementary Fig. S11).

When excessive fatty acid uptake exceeds mitochondrial fatty acid oxidative capacity, toxic lipid storage increases, resulting in lipotoxicity³⁵. While lipid composition analysis of our model systems revealed that ApoO expression did not significantly modify levels of intracellular triglycerides, the levels of toxic species such as diglycerides were increased in ApoO-Tg hearts and transfected liver (Supplementary Fig. S12a-d). In human heart samples, endogenous ApoO mRNA levels correlated with diglyceride levels but not with triglyceride levels (Supplementary Fig. S12e-f). Moreover, palmitate treatment of ApoO cells induced a dramatic intracellular accumulation of diglycerides and did not significantly affect triglyceride levels (Fig. 3h-i). Incubation of ApoO cells with 20 nM CsA significantly reduced intracellular diglyceride levels (Fig. 3j), confirming that ApoO-mediated MPTP opening promotes lipotoxicity.

ApoO increases apoptosis. MPTP opening is a key step in the process of programmed cell death^{1,2,4}. We hypothesized that ApoO overexpression promotes apoptosis and found positive correlations between mRNA levels for ApoO and the proapoptotic factors Bax in human heart (Fig. 4a). Even with the modest overexpression of ApoO in hearts from ApoO-Tg mice, Bax expression and Caspase-3 activity (Fig. 4b-c) were enhanced. These results were confirmed *in vivo* with ApoO transfected liver (Fig. 4d-e) and *in vitro* with ApoO cells, where the increase in expression of Bax and activity of Caspase-3 were significantly reversed by ApoO shRNA treatment (Fig. 4f-g). Moreover, TEM revealed the formation of blebs in the plasma membrane of ApoO cells, indicative of the proapoptotic state (Supplementary Fig. S13). Functional genomics analysis of these cells revealed a massive increase in the expression of genes involved in the regulation of programmed cell death and metabolic pathways (Supplementary Fig. S14). A 5 day treatment with low doses of CsA cured ApoO cells that presented a reduction in basal Caspase-3 activity and Bax expression (Supplementary Fig. S15a-b). Indeed, these cells presented characteristic morphological amelioration including a reduction in cell body condensation and cytoplasmic vacuolization. Moreover, ApoO overexpression dramatically amplified the apoptotic effect of increasing doses of palmitate, which moderately increased Caspase-3 activity in control cells (Fig. 4h). Interestingly, palmitate-induced Caspase-3 activity was significantly reduced by treatment with CsA but not BA (Fig. 4i). ApoO may target ANT on its BA site and increase apoptosis and lipotoxicity by modulating MPTP opening. These results suggested a potential link between pathological ApoO overexpression and the induction of mitochondrial dysfunction, which should ultimately trigger mitochondrial biogenesis. Accordingly, expression of ApoO and PPAR- α co-activator 1 α (PGC-1 α), a master regulator of mitochondrial biogenesis³⁶, are tightly correlated in human right atrial appendage samples from patients undergoing heart surgery and in hearts from ApoO-Tg mice (Supplementary Fig. S16). We assume that increased mitochondrial synthesis balances the mitochondrial alteration and degradation in autophagosomal vacuoles and multilamellar bodies observed in ApoO-Tg hearts (Supplementary Fig. S17a and c) and ApoO cells (Fig. 5 a-d). We believe that the ApoO-induced apoptosis and mitochondrial alteration drive the cell in a vicious cycle that ends in cell death. This hypothesis could explain the myofibrillar and cardiomyocyte loss observed in ApoO-Tg hearts (Supplementary Fig. S17a-d). Based on the data presented here, we propose ApoO as a central molecule in the model depicted in figure 5e. The cascade of events illustrated in this figure, originates with ApoO-stimulated MPTP opening. At high expression levels, ApoO enhances the opening rate of the MPTP leading to mild uncoupling, increased

respiration, and production of reactive oxygen species (ROS). The activated electron transport chain requires more NADH/FADH₂ which generates a mitochondrial metabolic sink (Fig. 5e1 and 2), since NADH and FADH₂ production is mainly generated by β -oxidation of LCFAs in the adult heart. LCFAs enter rapidly into the mitochondria through CPT-1 presumably the open MPTP (Fig. 5e3). Increased expression of LCFAs transporters (FATPs) compensate for the increased mitochondrial consumption (Fig. 5e4). LCFAs uptake exceeds mitochondrial fatty acid oxidative capacity and leads to lipotoxicity, especially in presence of saturated LCFAs such as palmitate. Excess palmitate generates toxic lipid byproducts such as diglycerides (Fig. 5e5). This toxicity can be diminished by the addition of unsaturated lipids, like oleate³⁷⁻³⁹, which compels palmitate to produce non-toxic triglycerides. ApoO cells treated with both palmitate and oleate displayed a 12-fold decrease in their diglyceride/triglyceride ratio (supplementary Fig. S18a-b) and a 2-fold decrease in Caspase-3 activity (supplementary Fig. S18c). Thus, Apoptosis induced by MPTP opening is increased by lipid uptake. The enhanced oxidative stress and mitochondrial dysfunction increases the expression of genes involved in lipid uptake, β -oxidation, and mitochondrial biogenesis, such as PGC1 α and PPAR α (Fig. 5e6). Increased ROS levels further stimulate MPTP opening and proton gradient loss, which act together with Bax to release apoptosis inducing factor (AIF) and cytochrome C, leading to cell death (Fig. 5e7). We have shown that all subsequent steps, including lipotoxicity and apoptosis can be reversed by blocking the MPTP. Indeed, CsA not only reduced the respiration rate but also apoptosis, as indicated by the decrease in expression of proapoptotic genes such as Bax and Caspase-3 activity. MPTP blockers also reduced the expression level of fatty acid transporters and reduced lipid accumulation. Thus, the MPTP is involved in fatty acid metabolism.

Obesity and diabetes are forerunners to secondary organ failure through excessive ectopic lipid deposition. This lipotoxicity manifests as cardiomyopathy, myopathy, fatty liver, pancreatitis, hypothyroidism and diabetes³⁵. The nature of the signal that leads to sustained lipid uptake in cells remains unknown. Animal lipotoxicity models display evident mitochondrial dysfunction. In these models, fat accumulation has been proposed to precede the reduction in mitochondrial function. However, converse mechanisms have been proposed in which mitochondrial dysfunction plays a more causative role^{14,16,17}. In our models, lipotoxicity appears to be a consequence and not a cause of mitochondrial dysfunction. This preliminary study on the physiological role of ApoO in heart could give new insights into the primary pathological process of cardiac dysfunction in diabetes and obesity. This work also

establishes a link between the onset of impaired mitochondrial heart function and lipid accumulation via the new mitochondrial actor ApoO.

- 1 Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**, 99-163, (2007).
- 2 Gustafsson, A. B. & Gottlieb, R. A. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc Res* **77**, 334-343, (2008).
- 3 Piot, C. *et al.* Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* **359**, 473-481, (2008).
- 4 Di Lisa, F., Carpi, A., Giorgio, V. & Bernardi, P. The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 1316-1322, (2011).
- 5 Philip-Couderc, P. *et al.* Cardiac transcriptome analysis in obesity-related hypertension. *Hypertension* **41**, 414-421, (2003).
- 6 Lamant, M. *et al.* ApoO, a novel apolipoprotein, is an original glycoprotein up-regulated by diabetes in human heart. *J Biol Chem* **281**, 36289-36302, (2006).
- 7 Laffont, I. *et al.* Apolipoprotein E activates Akt pathway in neuro-2a in an isoform-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 83-87, (2002).
- 8 Yang, C. R. *et al.* Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5907-5912, (2000).
- 9 Zhaorigetu, S., Yang, Z., Toma, I., McCaffrey, T. A. & Hu, C. A. Apolipoprotein L6, induced in atherosclerotic lesions, promotes apoptosis and blocks Beclin 1-dependent autophagy in atherosclerotic cells. *J Biol Chem* **286**, 27389-27398, (2011).
- 10 Baines, C. P. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* **104**, 181-188, (2009).
- 11 Bernardi, P., Broekemeier, K. M. & Pfeiffer, D. R. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* **26**, 509-517, (1994).
- 12 Boudina, S. *et al.* Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes* **56**, 2457-2466, (2007).
- 13 Duncan, J. G. Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 1351-1359, (2011).
- 14 Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R. & Shulman, G. I. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* **350**, 664-671, (2004).

- 15 Graier, W. F., Malli, R. & Kostner, G. M. Mitochondrial protein phosphorylation: instigator or target of lipotoxicity? *Trends Endocrinol Metab* **20**, 186-193, (2009).
- 16 Patti, M. E. & Corvera, S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* **31**, 364-395, (2010).
- 17 Schrauwen, P., Schrauwen-Hinderling, V., Hoeks, J. & Hesselink, M. K. Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* **1801**, 266-271, (2010).
- 18 Cheng, S. *et al.* Long-term outcomes in individuals with prolonged PR interval or first-degree atrioventricular block. *JAMA* **301**, 2571-2577, (2009).
- 19 Narula, N. *et al.* Adenine nucleotide translocase 1 deficiency results in dilated cardiomyopathy with defects in myocardial mechanics, histopathological alterations, and activation of apoptosis. *JACC Cardiovasc Imaging* **4**, 1-10, (2011).
- 20 Huh, W. K. *et al.* Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686-691, (2003).
- 21 Head, B. P., Zulaika, M., Ryazantsev, S. & van der Blik, A. M. A novel mitochondrial outer membrane protein, MOMA-1, that affects cristae morphology in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **22**, 831-841, (2011).
- 22 Taylor, S. W. *et al.* Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol* **21**, 281-286, (2003).
- 23 Barbe, L. *et al.* Toward a confocal subcellular atlas of the human proteome. *Mol Cell Proteomics* **7**, 499-508, (2008).
- 24 Varanyuwatana, P. & Halestrap, A. P. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion*, (2011).
- 25 Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J. & Molkentin, J. D. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* **9**, 550-555, (2007).
- 26 Horton, P. *et al.* WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* **35**, W585-587, (2007).
- 27 Hoppins, S. *et al.* A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J Cell Biol* **195**, 323-340, (2011).
- 28 Bosma, M. *et al.* The lipid droplet coat protein perilipin 5 also localizes to muscle mitochondria. *Histochem Cell Biol*, (2011).
- 29 Jacotot, E. *et al.* The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med* **191**, 33-46, (2000).

- 30 Stewart, S. A., Poon, B., Song, J. Y. & Chen, I. S. Human immunodeficiency virus type 1 vpr induces apoptosis through caspase activation. *J Virol* **74**, 3105-3111, (2000).
- 31 Chabowski, A., Gorski, J., Glatz, J. F., JJ, P. L. & Bonen, A. Protein-mediated Fatty Acid Uptake in the Heart. *Curr Cardiol Rev* **4**, 12-21, (2008).
- 32 Jia, Z., Moulson, C. L., Pei, Z., Miner, J. H. & Watkins, P. A. Fatty acid transport protein 4 is the principal very long chain fatty acyl-CoA synthetase in skin fibroblasts. *J Biol Chem* **282**, 20573-20583, (2007).
- 33 Chiu, H. C. *et al.* A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest* **107**, 813-822, (2001).
- 34 Finck, B. N. *et al.* The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* **109**, 121-130, (2002).
- 35 Schaffer, J. E. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current opinion in lipidology* **14**, 281-287, (2003).
- 36 Handschin, C. & Spiegelman, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* **27**, 728-735, (2006).
- 37 Hardy, S. *et al.* Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. *J Biol Chem* **278**, 31861-31870, (2003).
- 38 Listenberger, L. L. *et al.* Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3077-3082, (2003).
- 39 Coll, T. *et al.* Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* **283**, 11107-11116, (2008).

FIGURE LEGENDS:

Figure 1 ApoO is mitochondrial and associated with heart dysfunction. **(a)** Transmission electron microscopy of myocardial sections (longitudinal) from WT and ApoO-Tg mice. Black arrows indicate cristae in select, markedly altered mitochondria (aM). nM designates normal mitochondria and nZB marks normal Z bands. **(b)**, Correlation between the expression level of human heart ApoO and mitochondrial genes selected by functional pathway. Gene expression data, obtained from the GEO database, consists of 107 independent Affymetrix microarrays. Expression levels (log10) are indicated as arbitrary units (A.U.). **(c)** Mitochondrial localization of ApoO as seen by confocal microscopy of H9c2 cardiac myoblasts transfected with SNAP-tagged hApoO (upper) and N-terminal deleted hApoO (Δ 1-

40, lower). Mitochondria were stained with green mitotracker (left), SNAP-ApoO was revealed with TMR-star (center), and the merge is shown on the right. **(d)**, 2 % ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis of PCR amplified products obtained from mouse liver after hydrodynamics-based *in vivo* liver transfection by rapid tail vein injection of control (n=12), hApoO expression vector (n=12), and saline (n=12). **e**, Western blot of protein extracts from isolated liver mitochondria probed with ApoO antibody shown above the loading/transfer control performed by ponceau S staining of the transferred membrane.

Figure 2 ApoO interacts with ANT and increases uncoupling and respiration. **(a)** Basal oxygen consumption in control cells, stable transfectants expressing ApoO, ApoO Δ 1-40 or ApoO treated with shRNA ApoO (n=5). **(b)** Oxygen consumption of control and ApoO cells treated with different drugs: 1.5 μ g/ml oligomycin (Oligo), 2 μ M carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP), and 1 μ M antimycin (Anti) (n=5). **(c)** Oxygen consumption of mitochondria isolated from the liver 24 h after hydrodynamics-based *in vivo* transfection of control (n=12) and ApoO (n=12) expression vectors with the following treatments: basal (B), 2.5 μ M rotenone (Rot), 5 mM succinate (Succ), and 300 μ M adenosine diphosphate (ADP). **(d)** Western blot analysis of ApoO-GST pull-downs. Upper panel: Ponceau S staining of the transferred membrane used to control loading and transfer. Lower panel: ANT detection using enhanced chemiluminescence of the same membrane probed with ANT antibody, labels are: molecular mass ladder (L), mitochondria protein extracts (Mit), GST-ApoO fusion protein incubated without (GST-ApoO) or with (GST-ApoO+Mit) heart mitochondria protein extracts, GST alone (GST), or with heart mitochondrial protein extracts (GST+Mit). **(e)** Oxygen flow in cardiac myoblasts expressing ApoO treated without (basal) or with 2 μ M CCCP and either 20 nM cyclosporine A (CsA) or 30 μ M Bonkretic acid (BA) (n=5). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. **(f)** Schematic illustration depicting ApoO –induced MPTP opening. (1) Low expression of ApoO and closed conformation of the MPTP. (2) High expression of ApoO, which interacts with ANT through the BA binding site, enhances the opening rate of the MPTP generating a non-specific, permeable pore (orange arrow). (3) The open pore leads to mild uncoupling, increased respiration, and reactive oxygen species (ROS) production. The outer (OMM) and inner (IMM) mitochondrial membranes are labeled. The molecular nature of the pore is unknown (?)

Figure 3 ApoO induces fatty acid metabolism. **(a)** Confocal microscopy images of control and ApoO cells taken after 2 minutes of incubation with BODIPY-palmitate, a fluorescent

analog of palmitate. **(b)** Intracellular levels of total fatty acids (indicated as FAME or polyunsaturated fatty acid methyl ester) in control and ApoO expressing cells (n = 6). **(c)**, **(d)** FATP4 and CD36 mRNA expression level in control, ApoO cells and ApoO cells where ApoO was subsequently knocked-down with shRNA (shApoO) (n = 5). **(e)** Palmitoyl-CoA synthesis rate in control and ApoO cells with and without 5 μ M triacsin C, an ACSL inhibitor (n = 5). **(f)**, **(g)** Total fatty acid and FATP4 mRNA levels in H9c2 cardiac myoblasts stably expressing ApoO with and without a 5 day treatment of 20 nM CsA (n = 5). **(h)**, **(i)** Intracellular levels of diglycerides (DG) and triglycerides (TG) in control and ApoO cells with or without overnight incubation of 100 μ M palmitate (n = 5). **(j)**, Diglyceride levels in H9c2 cardiac myoblasts stably expressing ApoO with or without a 12 hour incubation of 100 μ M palmitate and 20 nM Cyclosporine A (CsA) (n = 5). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Figure 4 ApoO induced apoptosis is reduced by MPTP inhibitors. **(a)** Positive correlation between ApoO and Bax mRNA levels in human atrial appendage samples (n = 48). **(b)**, **(c)** Bax mRNA levels and Caspase-3 activity in wild type (WT, n = 15) and cardiac specific transgenic mice (ApoO-Tg, n = 16). **(d)**, **(e)** Bax mRNA levels and Caspase-3 activity in liver 48 hours after hydrodynamics-based *in vivo* liver transfection by rapid tail vein injection of control and ApoO expression vectors (n = 12). **(f)**, **(g)** Bax mRNA levels and Caspase-3 activity in control cells, ApoO cells, and ApoO cells subsequently stably transfected with shRNA-ApoO expression vector (shApoO). **(h)** Caspase-3 activity in control and ApoO expressing cells incubated overnight with increasing concentrations of palmitate (n = 6). **(i)** Caspase-3 activity from H9c2 cardiac myoblasts stably expressing ApoO with or without 12 hour incubation of 100 μ M palmitate and either 20 nM cyclosporine A (CsA), or 30 μ M Bonkretic acid (BA) (n = 4). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Figure 5 Mitochondrial alteration and degradation in cardiac myoblasts overexpressing ApoO. **(a)**, **(b)** Transmission electron microscopy analysis of control and ApoO cells treated for 24 hours with 100 μ M palmitate. **(c)**, **(d)** Degradation of mitochondria in autophagosomal vacuoles and multilamellar bodies (myelin figure, mf) in ApoO cells. Normal mitochondrion (nM) and the nucleus (N) are labeled. **(e)** Schematic illustration depicting the role of ApoO. (1) ApoO –induced mild uncoupling activates the electron transport chain, which requires more NADH/FADH₂. (2) In adult heart, NADH and FADH₂ production is mainly generated by β -oxidation of long chain fatty acids (LCFAs) and their consumption generates a mitochondrial metabolic sink. (3) LCFAs enter rapidly into the mitochondria through CPT-1

and the open MPTP. (4) Increased expression of LCFA transporters (FATPs) compensate for the increased mitochondrial consumption. (5) LCFA uptake exceeds mitochondrial fatty acid oxidative capacity and leads to lipotoxicity. (6) The enhanced oxidative stress and mitochondrial dysfunction increases the expression of genes involved in lipid uptake, β -oxidation, and mitochondrial biogenesis (such as PGC1 α and PPAR α) (7) Increased ROS levels further stimulate MPTP opening and proton gradient loss, which act together with Bax to release apoptosis inducing factor (AIF) and cytochrome C, leading to cell death. The Outer (OMM) and inner (IMM) mitochondrial membrane are labeled.

Supplementary information:

Acknowledgements: We thank Dr. A. Galinier for aiding with COX activity measurement, M. Andre, P. Guillou, S. Eddiry and P. Decaunes for technical assistance, T. Picard for bioinformatics analyses, Dr P. Romanienko for reading the manuscript; Genotoul network for Electron microscopy, Cellular imaging, Lipidomics, Transcriptomics, Animal and Biocomputing facilities.

Author information: Microarray data were deposited in the GEO database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (#GSE34076). The authors have no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.S. (Fatima.smith-rouet@inserm.fr).

Author Contributions: A.T. qPCR analyses, lipid uptake, Caspase-3 assays, shRNA assays, mitochondrial isolation experiments, western blotting; C.C. aided with cloning and Confocal microscopy, M.G. performed human heart samples collection and echocardiography analysis; R.H. qPCR analyses, and Caspase-3 assays; F.D. assisted in preparation of heart tissue; M.B. performed electrocardiography analysis; F.K. aided with human heart samples collection; L.C. proposed the *in vivo* transfection and helped writing the paper; P.R. and F.S. made equal contributions to this work, designed the study, performed ACSL activity, cloning, GST pool down experiment, cell culture, respiration experiment, interpreted results, analyzed the data and wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Figure S1 ApoO alters heart function in mice. **(a)** ApoO mRNA levels in wild type (WT, n = 38) and cardiac-specific ApoO transgenic mice (ApoO-Tg, n = 32). **(b)** Electrocardiographic analysis of WT (n = 16) and ApoO-Tg (n = 12) mice. **(c)** PR interval bar chart measured from the beginning of the P wave to the beginning of the QRS complex. **(d)**, **(e)** Fractional shortening and ejection fractions assessed by transthoracic echocardiographic analysis of WT (n = 10) and ApoO-Tg (n = 9) mice. * p < 0.05, ***p < 0.001.

Figure S2 GEO database data mining. **(a)**, Distribution of ApoO mRNA levels extracted from 107 human heart Affymetrix microarrays, obtained from the GEO repository. **(b)** Ingenuity Pathway Analysis performed using an artificial log ratio of differential gene expression calculated using human heart microarray data from patients with the highest and the lowest ApoO expression level. Threshold designates p-value cutoff for pathways significantly enriched in differentially expressed genes (Ingenuity default).

Figure S3 ApoO is associated with a rise in the expression of oxidative phosphorylation genes in human heart. Comparison of gene expression levels for members of the oxidative phosphorylation pathway between human heart microarrays with the highest (High ApoO) and the lowest (Low ApoO) ApoO expression level, organized by mitochondrial complex CI to CV.

Figure S4 ApoO expression and localization in cardiac myoblasts. **(a)**, **(b)** ApoO mRNA and protein levels in control cardiac myoblasts and transfectants stably overexpressing ApoO. SH2, SH4 and SH5 indicate 3 independent ApoO clones subsequently stably transfected with shRNA-ApoO expression vectors. The lower panel in **(b)** shows equal lane loading and transfer with Ponceau S staining of the transferred membrane. **(c)** Western blot for ApoO with membrane protein extracts prepared from ApoO and control cells. **(d)** Anti-hApoO western blot with cellular subfractions from ApoO and control (C.) cells. Labels are: Mitochondria (Mit) Supernatant (Supern.). *p < 0.05, ***p < 0.001.

Figure S5 hApoO expression in *in vivo* transfected liver. Human ApoO mRNA levels in mouse liver after hydrodynamics-based *in vivo* liver transfection by rapid tail vein injection of control (n = 12) and ApoO (n = 12) expression vectors. **p < 0.01.

Figure S6 ApoO increases cytochrome C oxidase activity. **(a)** Cytochrome C oxidase (COX) activity in hearts from wild type (WT, n = 29) and ApoO (ApoO-Tg, n = 32) mice. **(b)** COX activity in H9c2 control versus ApoO expressing myoblasts. *p < 0.05, ***p < 0.001.

Figure S7 ApoO increases reactive oxygen species and ATP levels. **(a)** Reactive oxygen species, measured in the presence of increasing doses (1-6 μ M) of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), in control and ApoO expressing H9c2 cardiac myoblasts (n = 4). **(b)** ATP levels in control (Cont.) and ApoO (ApoO) expressing H9c2 cardiac myoblasts. ***p < 0.001 (n = 4).

Figure S8 ApoO interacts with ANT and does not interact with VDAC. **(a)** ANT western blot analysis after co-immunoprecipitation of protein extracts from isolated ApoO-Tg mouse heart mitochondria. Labels correspond to: mitochondria protein extracts (Mit), non immune serum (IgG), and serum from hApoO immunized rabbits (Anti-ApoO). **(b)** Western blot analysis of ApoO-GST pull-down. Upper panel: Ponceau S staining of the transferred membrane used to control loading and transfer. Lower panel: Enhanced chemiluminescence of the same membrane probed with VDAC antibody. Sample labels are: molecular mass ladder (L), mitochondria protein extracts (Mit), GST-ApoO fusion protein incubated without (GST-ApoO) or with (GST-ApoO+Mit) heart mitochondrial protein extracts, GST alone (GST), or with heart mitochondrial protein extracts (GST+Mit).

Figure S9 ApoO enhances the expression of fatty acid transporters in mouse and human heart. **(a)** CD36, **(b)** FATP4 mRNA levels and **(c)**, palmitoyl-CoA synthesis rate in hearts from wild type (WT, n = 11) and cardiac-specific ApoO transgenic (ApoO-Tg, n = 9) mice. **(d)**, **(e)**, **(f)**, Correlation between ApoO and CD36, FATP4 and ACSL3 mRNA levels in human atrial heart appendage samples (n = 32). *p < 0.05, **p < 0.01.

Figure S10 ApoO is associated with high expression of CD36 and FATP2 in human heart. **(a)**, **(b)** Comparison of CD36 and FATP2 expression levels from human heart microarray data sets (obtained from GEO) from patients with reduced (Low) and elevated (High) ApoO expression levels. *p < 0.05, ***p < 0.001.

Figure S11 ApoO increases PPAR α expression. **(a)**, **(b)** Correlation between ApoO and PPAR α mRNA levels in human atrial heart appendage samples (n = 34) and hearts from three cardiac-specific ApoO transgenic mouse lines (n = 70). **(c)** PPAR α mRNA levels in

mouse liver after hydrodynamic-based *in vivo* liver transfection by a rapid tail vein injection of control (n = 12) or ApoO (n = 12) expression vectors. **(d)** PPAR α mRNA levels in H9c2 cardiac myoblasts stably transfected with control (n = 4) and ApoO expression vectors (ApoO, n = 4). *p < 0.05, **p < 0.01.

Figure S 12 ApoO enhances intracellular levels of lipotoxic byproducts in mouse and human heart. **(a)**, **(b)** Diglyceride and triglyceride levels in wild type (WT, n = 12) and cardiac-specific ApoO transgenic mouse hearts (ApoO-Tg, n = 11). **(c)**, **(d)** Diglyceride and triglyceride levels in the liver after hydrodynamics-based *in vivo* transfection by a rapid tail vein injection of control (n = 12) and ApoO (n = 12) expression vectors. **(e)**, **(f)** Correlation between ApoO mRNA level and the intracellular concentration of diglycerides (n = 30) or triglycerides (n = 27) in human atrial heart appendage samples. *p < 0.05, **p < 0.01.

Figure S13 ApoO expression is associated with blebs on cardiomyoblasts. Transmission electron microscopy of ApoO expressing (left) and control (right) cardiomyoblasts. Black arrows indicate blebs.

Figure S14 Pangenomic microarray analysis of cardiac myoblasts overexpressing ApoO. **(a)** Hierarchical clustering of microarray data from pools of H9c2 cardiac myoblast clones stably transfected with ApoO (n = 6) or pTT, the control expression vector (n = 6). **(b)** Gene ontology analysis of the microarray data. Data are available from the GEO database (GSE34076).

Figure S15 ApoO-induced apoptosis is reduced by Cyclosporine A treatment. **(a)** Caspase-3 activity levels in H9c2 cardiac myoblasts stably overexpressing ApoO and treated for 5 days with increasing doses of cyclosporine A (CsA) (10, 20 and 200 nM). Chronic treatment with 20 nM or 200 nM CsA led to a similar reduction in Caspase-3 activity, suggesting that CsA used at 20 nM concentration was specific for MPTP (n = 5). **(b)** Bax expression in H9c2 cardiac myoblasts stably overexpressing ApoO treated with or without 20 nM CsA (n = 5). *p < 0.05, **p < 0.01.

Figure S16 ApoO associates with an increase in PGC1 α expression in human and mouse heart. **(a)**, **(b)** Correlation between ApoO and PGC1 α mRNA levels in human atrial heart appendage samples (n = 29) and three cardiac-specific ApoO transgenic mouse hearts (n = 70).

Figure S17 ApoO expression is associated with irreversible degeneration in the myocardium. Transmission electron microscopy study of ApoO-Tg myocardial sections. (a), (b) Longitudinal sections showing areas of moderate disorganization, myofibrillar disarray (green arrows) and widening of intercellular junctions (yellow arrows). Black arrows point to markedly dilated, irregular and altered mitochondria (aM). Red arrows point to abnormal Z bands (aZB). Also labeled are normal Z bands (nZB), normal mitochondrion (nM), and a blood vessel (BV). (c) Longitudinal section showing widened intercellular junctions, intercellular dissociation (yellow arrows) and myelin figures (blue arrow). (d) Severely affected area with ultrastructural evidence of marked loss of contractile elements producing a diffuse pattern in defective myocytes leading to myocyte death.

Figure S18 ApoO increases diglyceride levels in cardiac myoblasts. (a) Intracellular levels of diglycerides in H9c2 cardiac myoblasts stably transfected with control (n = 4) and ApoO expression vectors (n = 4) with or without 12 hours incubation with 100 μ M palmitate and 10 μ M oleate. (b) Intracellular diglyceride (DG) to triglyceride (TG) ratios in H9c2 cardiac myoblasts stably transfected with control (n = 4) and ApoO expression vectors (n = 4) with or without 12 hours incubation with 100 μ M palmitate and 10 μ M oleate. (c) Caspase-3 activity from H9c2 cardiac myoblasts stably transfected with control (n = 6) and ApoO expression vectors (n = 6) with or without 12 hours incubation with 100 μ M palmitate and either 1 or 10 μ M oleate. **p < 0.01, ***p < 0.001

METHODS

Human heart samples

After ethical committee approval, all patients in this study gave written consent for sample collection and molecular analysis prior to inclusion. Patients were carefully selected by physicians from the Department of Cardiology, Toulouse University Hospital, prior to coronary by-pass surgery.

Bioinformatics

Microarray expression data from human heart samples were downloaded from the GEO repository (GSE1145)⁴⁰. This series consisted of 107 myocardial samples collected from patients undergoing cardiac transplantation whose failure arises from different etiologies (e.g. idiopathic dilated cardiomyopathy, ischemic cardiomyopathy, valvular cardiomyopathy, and

hypertrophic cardiomyopathy) and from "normal" organ donors whose hearts cannot be used for transplants. Arrays were intensity normalized and hierarchical clustering (average group linkage, Pearson correlation, threshold $r = 0.8$) was applied to identify groups of co-expressed genes. ApoO expression levels were plotted for the 107 human hearts tested and used to define relevant molecular pathways using both Toppgene⁴¹ and Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity systems, Redwood City, CA, USA). ApoO subcellular localization was predicted using Mitopred⁴², mitoprot⁴³ and YLoc⁴⁴.

Animals

All animal Studies followed the INSERM Institute Animal Facility guidelines and were approved by the animal care committees of the INSERM I2MC UMR 1048. All animal procedures were performed according to the guidelines of the French Ministry of Agriculture. Animals were housed at the Toulouse I2MC animal facility in a room lit 12 h per day (6 AM–6 PM) at an ambient temperature of 22 +/- 1°C.

Construction of ApoO expression vectors

To overexpress human ApoO (pTT-ApoO), the ApoO coding sequence was amplified using primers hApoO5BamPTT (CGCGGATCCGCACCGAGTTTGCAGTA) and hApoO3BamPTT (CGCGGATCCTTAGTTCCAGGTGAATTCTTCA) and cloned into the BamHI site of pTT expression vector⁴⁵. pSNAP-ApoO was generated by PCR amplification of pTT-ApoO using primers SnapApoEcorV-F (AAGATATC ATG TTC AAG GTA ATT CAG AGG) and

SnapApoEcorV-R (TTGATATCCTTAGTTCCAGGTGAATTCTT) and cloned into the EcoRV site of pSNAP-tag® (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). pGEX2T-ApoO was constructed by PCR amplification of pTT-ApoO using hApoOpGEX1FBam (CGGGATCCATGTTCAAGGTAATTCAGAGGTC) and hApoOpGEX1RSma (TCCCGGGCTTAGTTCCAGGTGAATTCTTCAC) and cloned into the Bam HI/Sma I site of pGEX2T (Promega, Charbonnières-les-Bains). All primers used in this work were synthesized by Eurogentec France (Angers). All restriction enzymes used were from New England Biolabs (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines). All ApoO sequences within the expression vectors were verified by DNA double strand sequencing using ABI PRISM®BigDye™ Terminator version 3.1 Ready reaction cycle sequencing kit (Life

Technologies SAS, Villebon sur Yvette) and loaded on an ABI 3130XL DNA sequencing instrument (Life Technologies SAS, Villebon sur Yvette).

Cell culture and tranfection of H9C2 cardiac myoblasts

H9c2 were obtained from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, England). H9c2 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Life Technologies SAS, Villebon sur Yvette) adjusted to contain 1.5 g/liter sodium bicarbonate and supplemented with antibiotic-antimycotic solution (Life Technologies SAS, Villebon sur Yvette) and 10% fetal bovine serum (FBS, AbCys s.a., Paris). Cells were plated on 10-cm diameter tissue culture dish and grown in a 5% CO₂ incubator at 37°C with saturating humidity with medium changes every 2 days. H9c2 cardiomyoblasts were stably transfected by electroporation and pools of transfectants were selected as previously published⁴⁶.

Knock-down of ApoO overexpression

shRNA used to knock-down ApoO gene expression and controls were from MISSION shRNA set; Sh2 = TRCN 72707; Sh4 = TRCN 72704; Sh5= TRCN 72705 (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier) and used as recommended by generating pools of stable transfectants. Empty vector (no shRNA insert) control was also transfected and had no significant effect.

Membrane preparations

Membrane preparations were performed as described⁴⁷.

Functional genomics

Total RNA were purified using RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf) in a Qiacube (Qiagen, Courtaboeuf) automated protocol. Total RNA integrity was checked by Experion capillary electrophoresis (Bio-Rad, Marnes La Coquette). Samples with RNA Quality Indicator \geq 8.5/10 were selected for analyses. Total RNAs were precisely quantified using RiboGreen and a Victor™ X5 2030 multilabel reader (Perkin Elmer, Courtaboeuf). Total RNA was used for fluorescent labelling with ChipShot™ Direct Labeling kit (Promega, Charbonnières-les-Bains). Labeled RNA was hybridized to pangenomic rat glass microarrays (Operon set V3, full description available in GEO database Platform GPL2594:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL2594>). After standard hybridization, glass arrays were washed on a Ventana Discovery hybridization and wash system (Ventana Medical Systems SA, Illkirch) and scanned using a GenPix 4000 scanner (Molecular Devices France, St. Grégoire). Scanned images were processed by X-dot reader software (COSE, Paris) with operator's validation of the spots detection. Microarray data were analyzed using both Toppgene⁴¹ and Ingenuity pathway analysis software (Ingenuity systems, Redwood City, CA, USA).

Palmitate preparation and Caspase 3 activity monitoring

Palmitate preparation and Caspase-3 activity measurements were performed as previously described^{48,49}.

Echocardiographic analysis

Echocardiograms were performed by using the Vivid 7 PRO echocardiographic system (GE Medical System, Velizy), equipped with a i13 L 14-MHz linear-array transducer. Images were obtained from chest-shaven rats lightly anesthetized by 1–2% isoflurane (Baxter, Maurepas) lying on their back side with transducers placed on the left hemithorax. Two-dimensional parasternal long- and short-axis images of the left ventricle were obtained and two-dimensional targeted M-mode tracings were recorded at a sweep speed of 200 mm/s. All measurements were performed according to the recommendations of the American Society for Echocardiography. The leading-edge method was applied to three consecutive cardiac cycles (n) with the roundness of the left ventricular cavity (2D-image) as a criterion that the image was on axis. Great effort was taken to achieve a good image quality and to visualize the endocardial and epicardial borders of the heart by gently moving and angulating the transducer. Percent left ventricular (LV) fractional shortening (FS), a measure of LV systolic function, was calculated by the formula $FS = (EDD - ESD) / EDD \times 100$, where EDD and ESD are end-diastolic and end-systolic diameters, respectively.

Electrocardiogram

Surface electrocardiograms (ECGs) were recorded using an ADI system (ADInstruments LTD, Oxford, UK).

Generation of cardiac specific human ApoO transgenic mice

Studies on transgenic mice were carried out in agreement with French laws and INSERM guidelines on animal care. The α myosin heavy chain (α MHC)-ApoO transgene was constructed from a 5.5 kb BamHI–SalI fragment containing the murine α MHC promoter⁵⁰ and a SalI–Hind III cDNA fragment containing the human ApoO coding sequence⁶. The α MHC-ApoO transgene was linearized with NotI, purified by electroelution, concentrated on an elutip-d column (Schleicher and Schuell), and used for nuclear injection in fertilized eggs of B6D2/F1 hybrid females. The microinjected oocytes were then reimplanted in B6CBA/F1 hybrid pseudopregnant foster mothers. Three transgenic mice lines were generated and crossed with C57B616/J mice. Genomic DNA was extracted using DNAeasy blood and tissue kit in a QIAcube apparatus (Qiagen, Courtaboeuf). Offspring were followed by PCR using primers rtiMHCP1F (CCTAGCCCCACACCAGAAATGA) and rtiMHCP1R (CCCCACGGACCTCTGAATTA) and Dynazyme II enzyme (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines) as recommended. PCR was performed at least three times per mouse and PCR products were analyzed by acrylamide gel electrophoresis.

Hydrodynamics-based in vivo transfection of the mouse liver

DNA was administered as described with minor modifications by a single hydrodynamic injection of 50 μ g of plasmid in 2 ml isotonic NaCl in the tail vein of 20- to 24-g mice over 6-8 s⁵¹.

RNA extractions and quality controls

Total RNA isolated from tissues samples underwent quality check and concentration control as previously described⁵². Total RNA was isolated from cultured H9c2 cardiomyoblasts using RNeasy columns and QIAcube automated apparatus according to the manufacturer's protocol (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines).

Real-time PCR analysis of gene expression

Oligos were designed with PerlPrimer⁵³ software and synthesized by Eurogentec Company. Real-time PCR was performed as described⁵⁴ in a MyiQ™ realtime PCR apparatus (Bio-Rad)

using SurePrime kit reagents (MP Biomedicals, Illkirch). Real-time PCR was statistically analyzed with *SigmaStat 3* software.

Measurement of O₂ consumption

O₂ flows were measured using an OROBOROS Oxygraph-2k (Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, Austria) and standard Oroboros procedures. Calculation of the respiration control index (RC) was done by dividing oxygen consumption in the presence of CCCP by that measured with oligomycin^{55,56}. RC indicates the tightness of the coupling between respiration and phosphorylation.

Reactive oxygen (ROS) species assessment

5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (carboxy-DCFDA) was used as recommended by the manufacturer (Life Technologies SAS, Villebon sur Yvette) with a Victor™ X5 2030 multilabel reader (Perkin Elmer, Courtaboeuf)

Caspase-3 enzymatic activity monitoring

Caspase-3 assays were performed using the Caspase-3 Substrate IV Fluorogenic substrate (VWR, Strasbourg) and a Victor™ X5 2030 multilabel reader (Perkin Elmer, Courtaboeuf)⁴⁹

Acyl-CoA synthetase activity

Acyl-coA synthetase activity was performed as already published⁵⁷.

ATP level monitoring

ATP level was monitored using CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Charbonnières-les-Bains) and a Victor™ X5 2030 multilabel reader (Perkin Elmer, Courtaboeuf).

Cytochrome C oxydase activity

Cytochrome C oxydase activity was measured as recommended using Cytochrome c Oxidase Assay Kit Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier) and a Victor™ X5 2030 multilabel reader (Perkin Elmer, Courtaboeuf).

Co-Immunoprecipitation and GST pull-down

Co-immunoprecipitation (Co-IP) and GST pull-down were performed in RIPA buffer according to published protocol⁵⁸.

Confocal microscopy

Fluorescence detection of Bodipy-Palmitate (Life Technologies SAS, Villebon sur Yvette) was performed on Falcon culture slides (BD Biosciences, Le Pont de Claix)⁵⁹. Subconfluent cells were incubated 2 min with Bodipy-Palmitate 1 μ M, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in PBS containing 4% formaldehyde for 15 min at room temperature followed by 5 min at -20 °C. Cells were then washed 3 times in PBS and covered with fluorescent mounting medium and coverslips before being analyzed on a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss Meditec France SAS, Le Pecq).

Transmission electron microscopy

The tissues were fixed in 2 % glutaraldehyde in 0.1 M Sorensen phosphate buffer (pH 7.4) for 4 h at 4°C, washed overnight in 0.2 M phosphate buffer and then post-fixed for 1 h at room temperature with 1% osmium tetroxide in 250 mM saccharose and 0.05 M phosphate buffer. The samples were then dehydrated in a series of graded ethanol solutions, followed by propylene oxide, and embedded in an Epon-araldite resin (Embed 812-Araldite 502, Electron Microscopy Sciences). Finally, the tissues were sliced into 70-nm thick sections (Ultracut Reichert Jung) and mounted on 100-mesh collodion-coated copper grids prior to staining with 3 % uranyl acetate in 50 % ethanol and Reynold's lead citrate. The adhering cells were fixed and washed as above and stained overnight in 2 % uranyl acetate. Examinations were carried out on a transmission Hitachi HU12A electron microscope at an accelerating voltage of 75 kV.

Lipid profiling

Cells or tissues were homogenized in 2 ml of methanol/ 5 mM EGTA (2:1 v/v) with FAST-PREP (MP Biochemicals). 50 μ l was evaporated, the dry pellets were dissolved in 0.2 ml of NaOH (0.1M) overnight, and proteins were measured with the Bio-Rad assay.

Neutral lipid molecular species analysis

Lipids were extracted in chloroform/methanol/water (2.5 :2.5 :2.1, v/v/v)⁶⁰, in the presence of the internal standards : 3 µg stigmaterol, 2 µg 1,3-dimyristine, 3 µg cholesteryl heptadecanoate, and 5 µg glyceryl triheptadecanoate. Chloroform phases were evaporated to dryness. Neutral lipids were separated over SPE columns (Macherey Nagel glass Chromabond pure silice, 200 mg). After washing cartridges with 2 ml of chloroform, extract was applied on the cartridge in 20 µl of chloroform and neutral lipids were eluted with 2 ml of a chloroform:methanol solution (90:10, v/v). The organic phase was evaporated to dryness and dissolved in 20 µl of ethyl acetate. 1 µl of the lipid extract was analyzed by gas-liquid chromatography on a FOCUS Thermo Electron system using Zebron-1 Phenomenex fused silica capillary columns (5m X 0,32mm i.d, 0.50 µm film thickness)⁶¹. Oven temperature was programmed from 200°C to 350°C at a rate of 5°C per min using hydrogen (0.5 bar) as the carrier gas. The injector and the detector were at 315°C and 345°C, respectively.

Fatty Acid Methyl Ester (FAME) quantification

Homogenates were dried in the presence of 2 µg of the internal standard, glyceryl triheptadecanoate, and transmethylated in 1 ml 14% boron trifluoride methanol solution (SIGMA) and 1 ml hexane at 55°C for 1 h. After addition of 1 ml water to the extract, FAMEs were extracted with 3ml hexane, evaporated to dryness, and dissolved in 20 µl ethyl acetate. FAMEs (1 µl) were analyzed by gas-liquid chromatography⁶² on a Clarus 600 Perkin Elmer system using Famewax RESTEK fused silica capillary columns (30 m x 0.32 mm i.d, 0.25 µm film thickness). Oven temperature was programmed from 110 °C to 220 °C at a rate of 2 °C per min and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar). The injector and the detector were at 225 °C and 245 °C respectively.

Western blot

Cardiac or liver tissue was disrupted with mammalian MCL-1 cell lysis kit solution (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier) in the presence of a mix of protease inhibitors. Procedures were performed according to the manufacturer's protocol. Sixty micrograms of protein was loaded on a 10 % polyacrylamide-SDS gel that was blotted on a 0.45 µm nitrocellulose membrane BA85 (Schleicher and Schuell, Ecquevilly, France). Reversible Ponceau S staining

was used as a loading control alternative to actin in Western blots⁶³. MultiMark Multi-Colored standard (Life Technologies SAS, Villebon sur Yvette) was used to determine molecular mass of the proteins. Nitrocellulose membranes were blocked for 2 h in TBS (7 mM Tris, pH 7.5; 150 mM NaCl) with 0.1 % Tween 20 and 3 % nonfat dry milk. Hybridization of the anti-ApoO serum was performed in TBS-Tween 0.1 % during 2 h. After three washes in TBS-Tween 0.1 %, horseradish peroxidase conjugate (10^{-4} dilution) was incubated for 2 h with the membrane in TBS-Tween 0.1 % plus 3 % nonfat dry milk. Blots were washed three times in Tween-TBS and one time in TBS before hybridizations were revealed with SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate according to the manufacturer's protocol (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France).

Statistical analysis and identification of differentially expressed genes

All results are depicted as means \pm SE. Multiple comparisons were analyzed using ANOVA followed, when appropriate, by the Dunnett post hoc test using Statview 4.5 software (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Single comparisons were performed using unpaired Student's *t*-test with a *p* value \leq 0.05 considered as significant.

40 Barrett, T. *et al.* NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data. *Nucleic Acids Res* **37**, D885-890, (2009).

41 Chen, J., Bardes, E. E., Aronow, B. J. & Jegga, A. G. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res* **37**, W305-311, (2009).

42 Guda, C., Guda, P., Fahy, E. & Subramaniam, S. MITOPRED: a web server for the prediction of mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res* **32**, W372-374, (2004).

43 Claros, M. G. & Vincens, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**, 779-786, (1996).

44 Briesemeister, S., Rahnenfuhrer, J. & Kohlbacher, O. YLoc--an interpretable web server for predicting subcellular localization. *Nucleic Acids Res* **38**, W497-502, (2010).

45 Durocher, Y., Perret, S. & Kamen, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* **30**, E9, (2002).

46 Smih, F. *et al.* Transcriptional regulation of adipocyte hormone-sensitive lipase by glucose. *Diabetes* **51**, 293-300, (2002).

- 47 Harmancey, R., Wilson, C. R., Wright, N. R. & Taegtmeier, H. Western diet changes cardiac acyl-CoA composition in obese rats: a potential role for hepatic lipogenesis. *J Lipid Res* **51**, 1380-1393, (2010).
- 48 Hickson-Bick, D. L., Buja, L. M. & McMillin, J. B. Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 511-519, (2000).
- 49 Hirota, N., Otabe, S., Nakayama, H., Yuan, X. & Yamada, K. Sequential activation of caspases and synergistic beta-cell cytotoxicity by palmitate and anti-Fas antibodies. *Life Sci* **79**, 1312-1316, (2006).
- 50 Gulick, J., Subramaniam, A., Neumann, J. & Robbins, J. Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem* **266**, 9180-9185, (1991).
- 51 Zhang, G., Budker, V. & Wolff, J. A. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* **10**, 1735-1737, (1999).
- 52 Philip-Couderc, P. *et al.* Uncomplicated human obesity is associated with a specific cardiac transcriptome: involvement of the Wnt pathway. *Faseb J*, (2004).
- 53 Marshall, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* **20**, 2471-2472, (2004).
- 54 Ruiz, V. *et al.* Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L1026-1036, (2003).
- 55 Jacotot, E. *et al.* Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *J Exp Med* **193**, 509-519, (2001).
- 56 Wu, Z. *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-124, (1999).
- 57 Askari, B. *et al.* Rosiglitazone inhibits acyl-CoA synthetase activity and fatty acid partitioning to diacylglycerol and triacylglycerol via a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism in human arterial smooth muscle cells and macrophages. *Diabetes* **56**, 1143-1152, (2007).
- 58 Harlow, E. & Lane, D. Using antibodies. *Cold spring Harbor Laboratory Press*, (1999).
- 59 Fang, X. *et al.* Hyperglycemia- and hyperinsulinemia-induced alteration of adiponectin receptor expression and adiponectin effects in L6 myoblasts. *J Mol Endocrinol* **35**, 465-476, (2005).
- 60 Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917, (1959).

- 61 Barrans, A. *et al.* Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J Biol Chem* **269**, 11572-11577, (1994).
- 62 Lillington, J. M., Trafford, D. J. & Makin, H. L. A rapid and simple method for the esterification of fatty acids and steroid carboxylic acids prior to gas-liquid chromatography. *Clin Chim Acta* **111**, 91-98, (1981).
- 63 Romero-Calvo, I. *et al.* Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* **401**, 318-320, (2010).

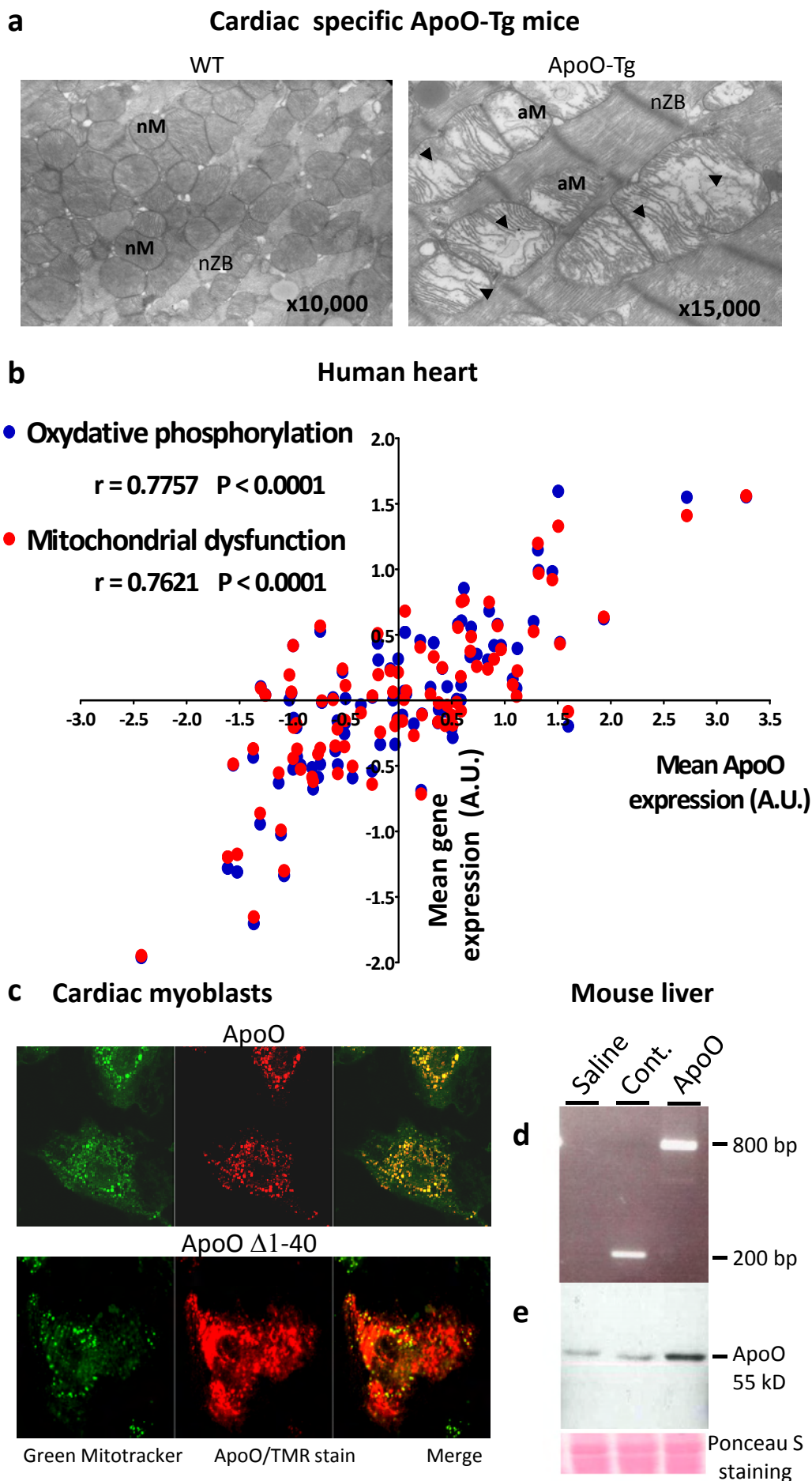


Fig. 2

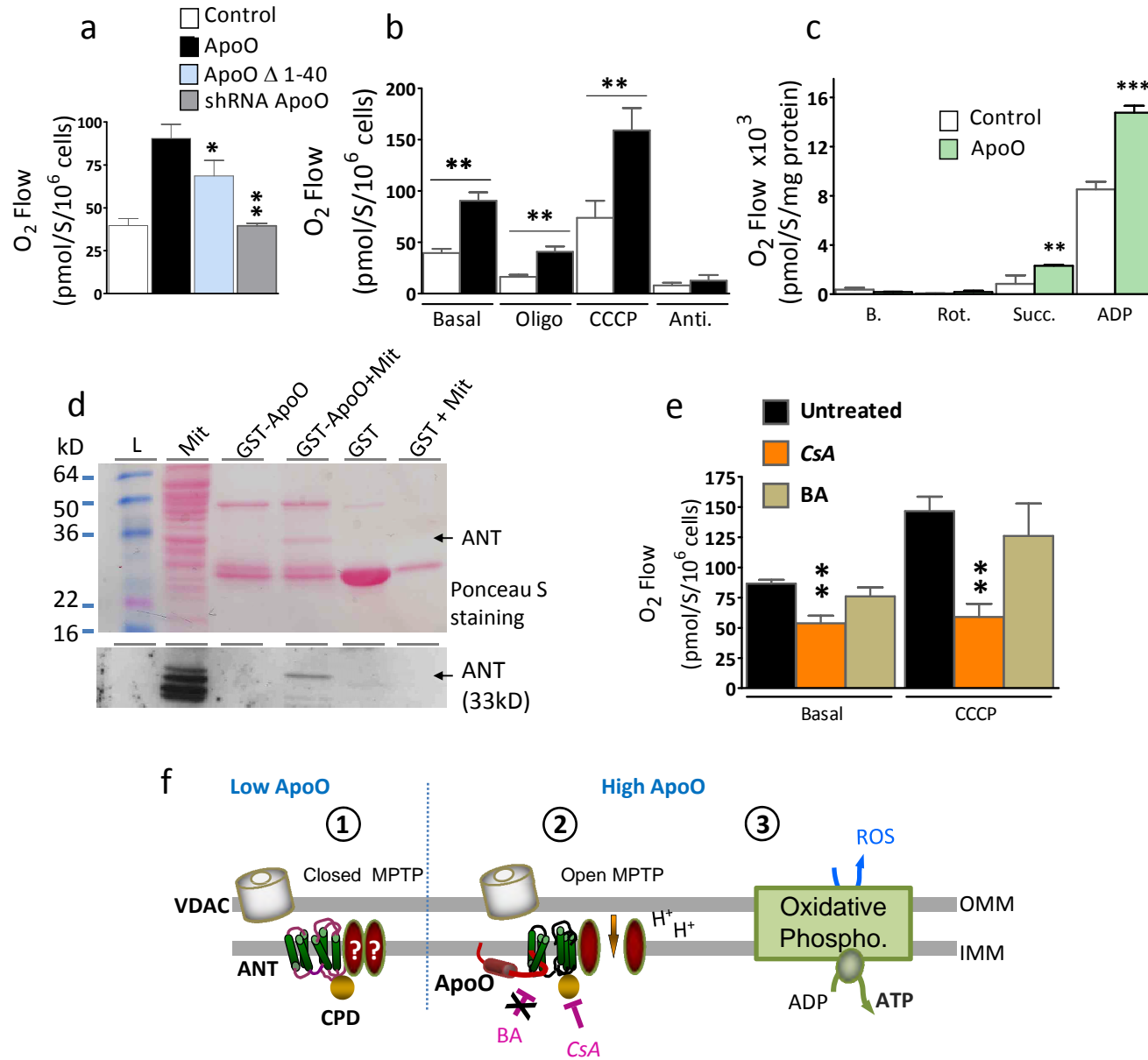


Fig. 3

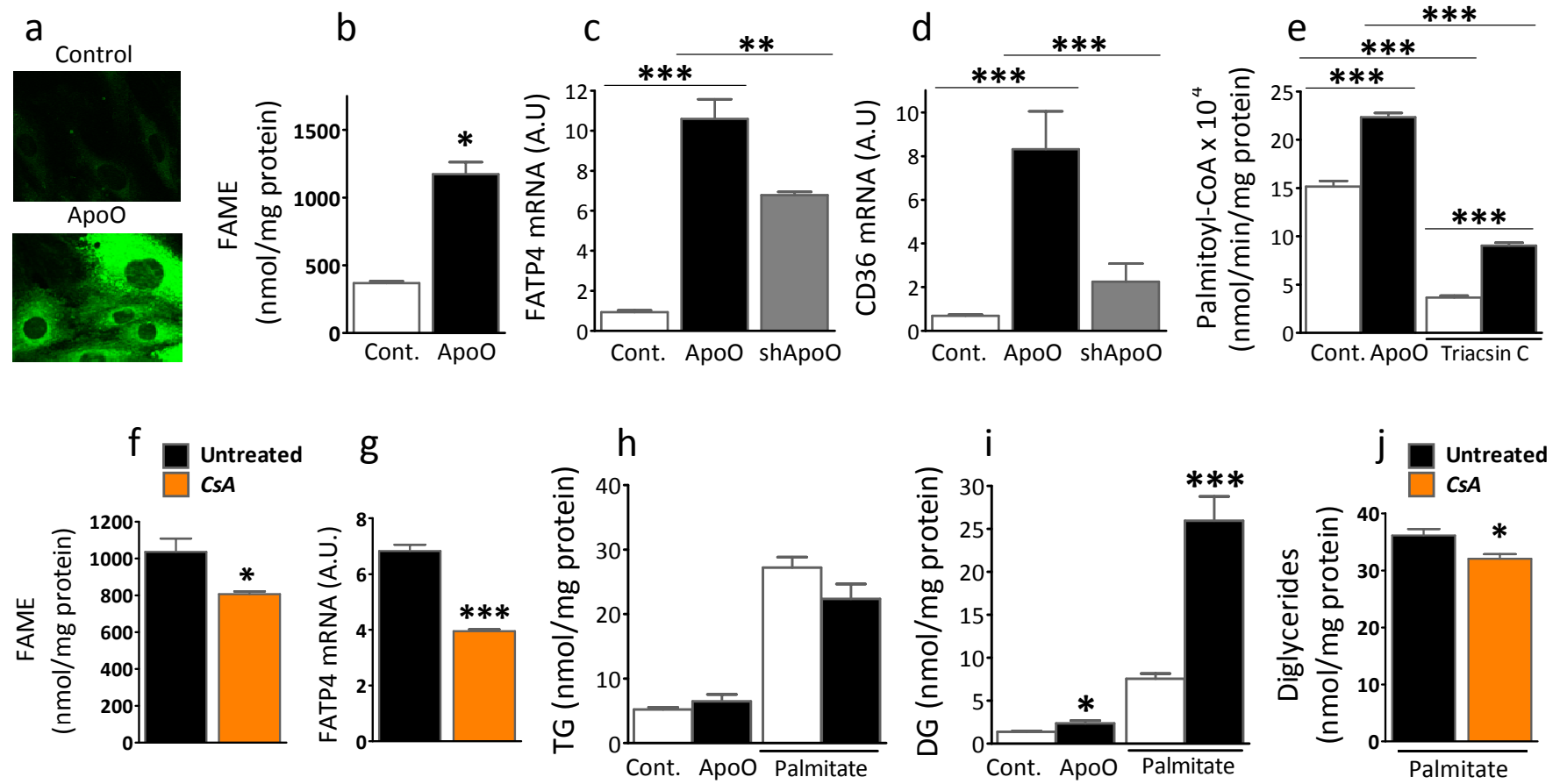


Fig. 4

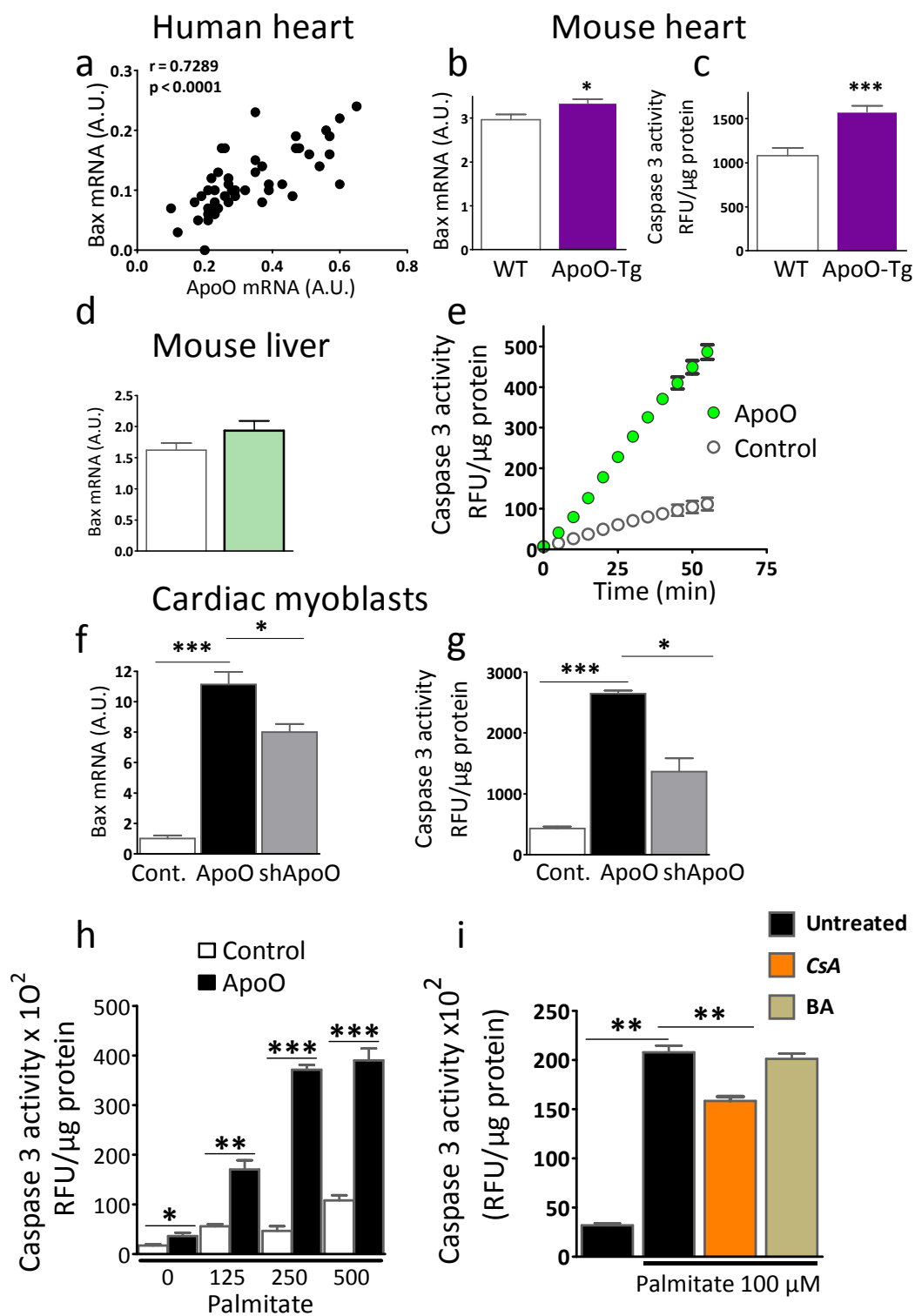
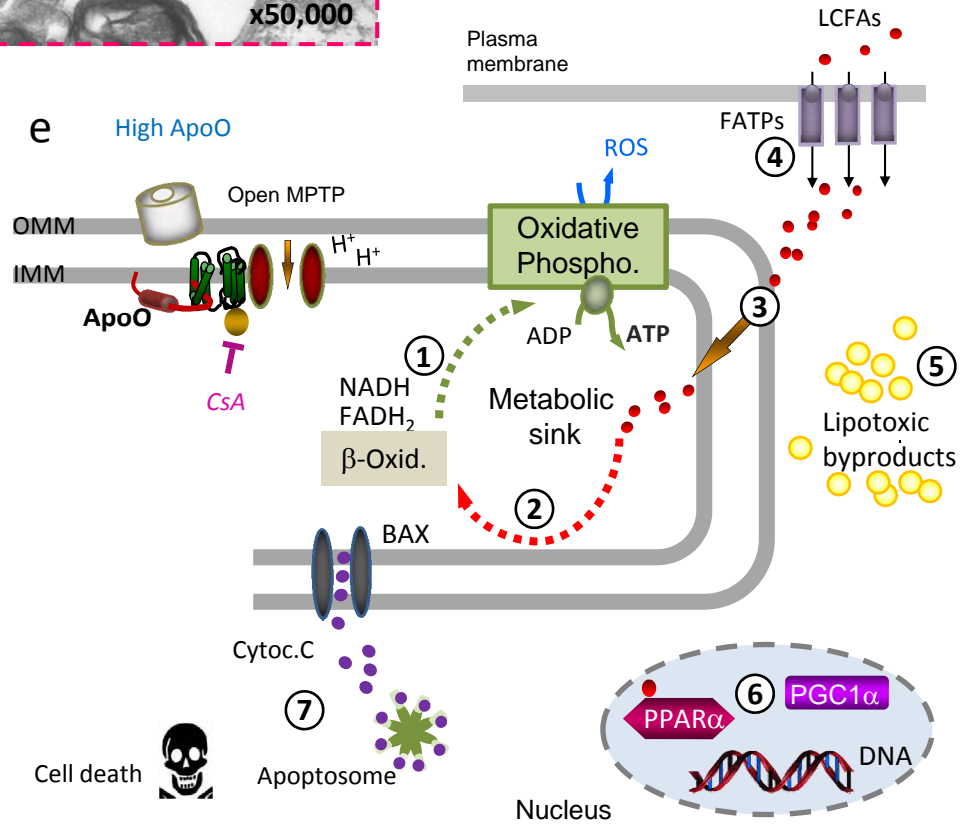
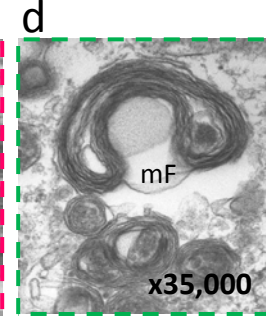
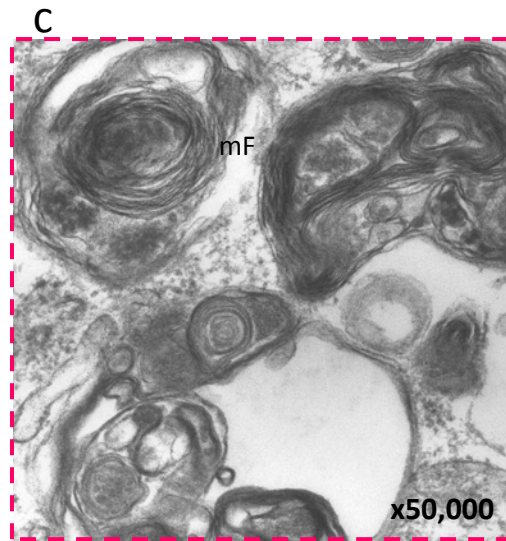
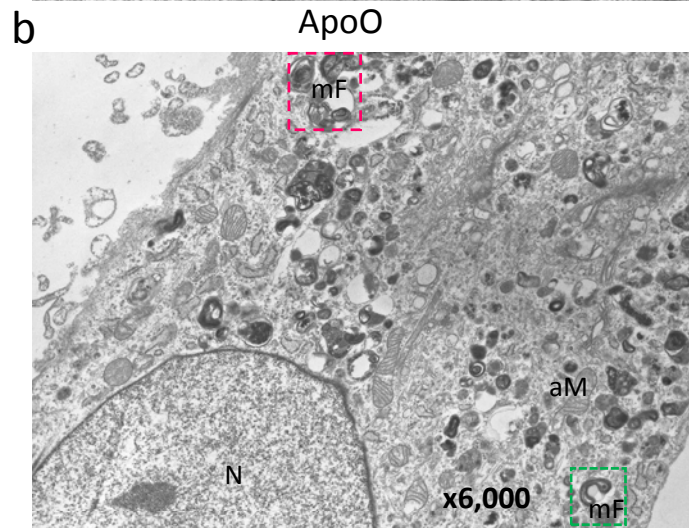
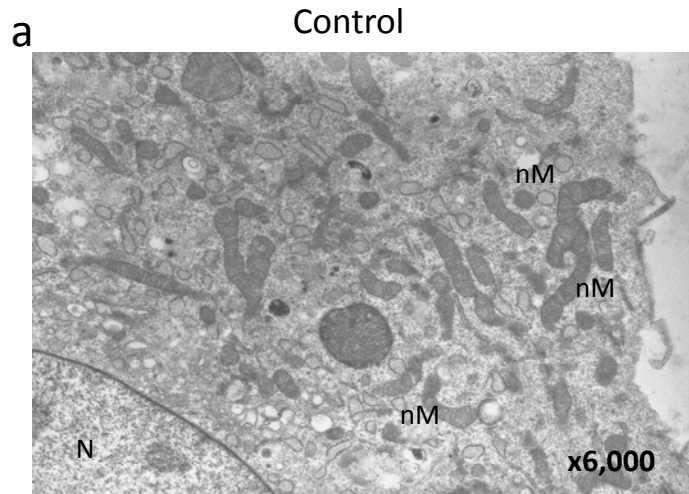


Fig. 5



Supplementary informations

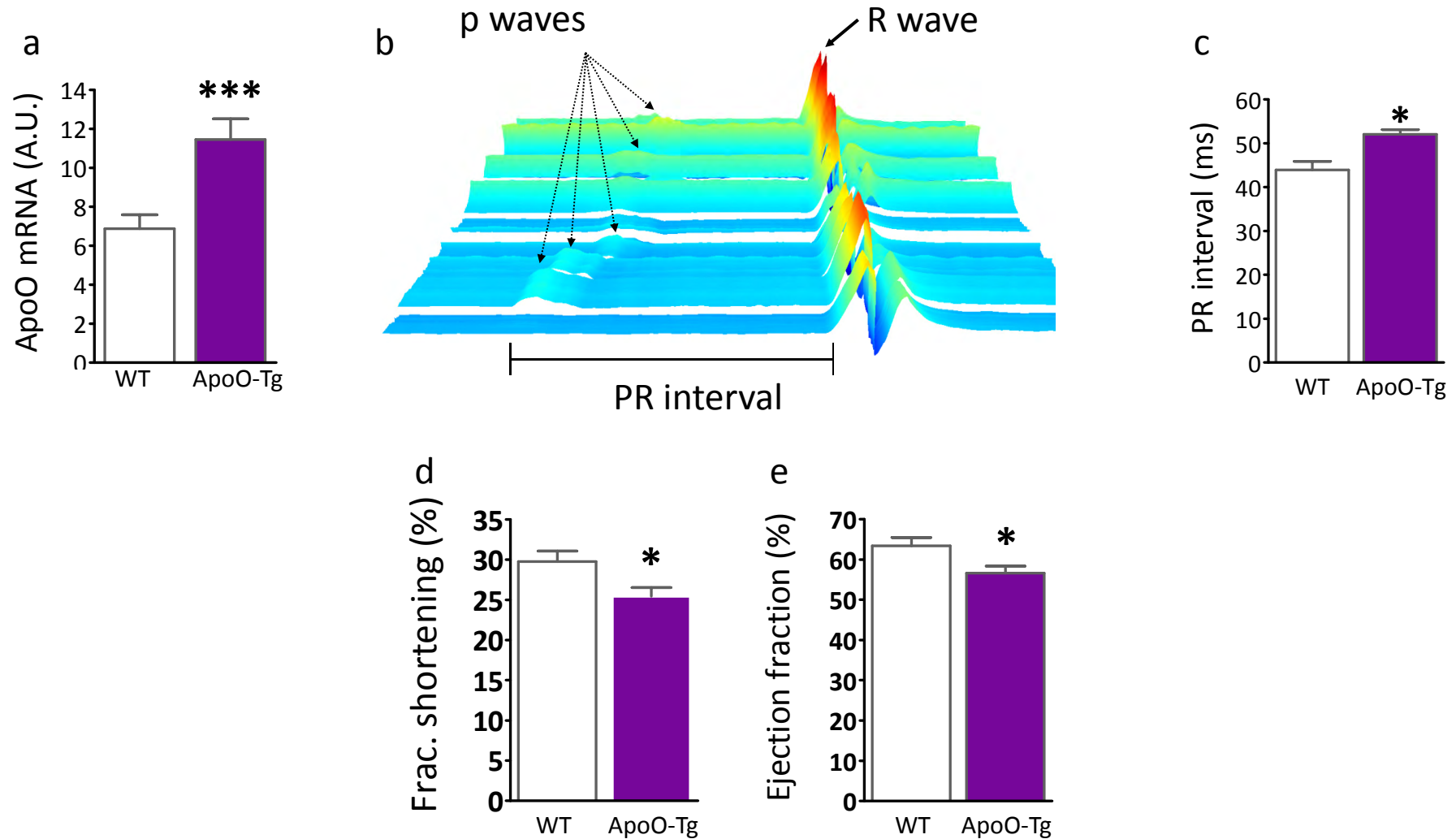


Figure S1 ApoO alters heart function in mice. **(a)** ApoO mRNA levels in wild type (WT, n = 38) and cardiac-specific ApoO transgenic mice (ApoO-Tg, n = 32). **(b)** Electrocardiographic analysis of WT (n = 16) and ApoO-Tg (n = 12) mice. **(c)** PR interval bar chart measured from the beginning of the P wave to the beginning of the QRS complex. **(d), (e)** Fractional shortening and ejection fractions assessed by transthoracic echocardiographic analysis of WT (n = 10) and ApoO-Tg (n = 9) mice. * p < 0.05, ***p < 0.001.

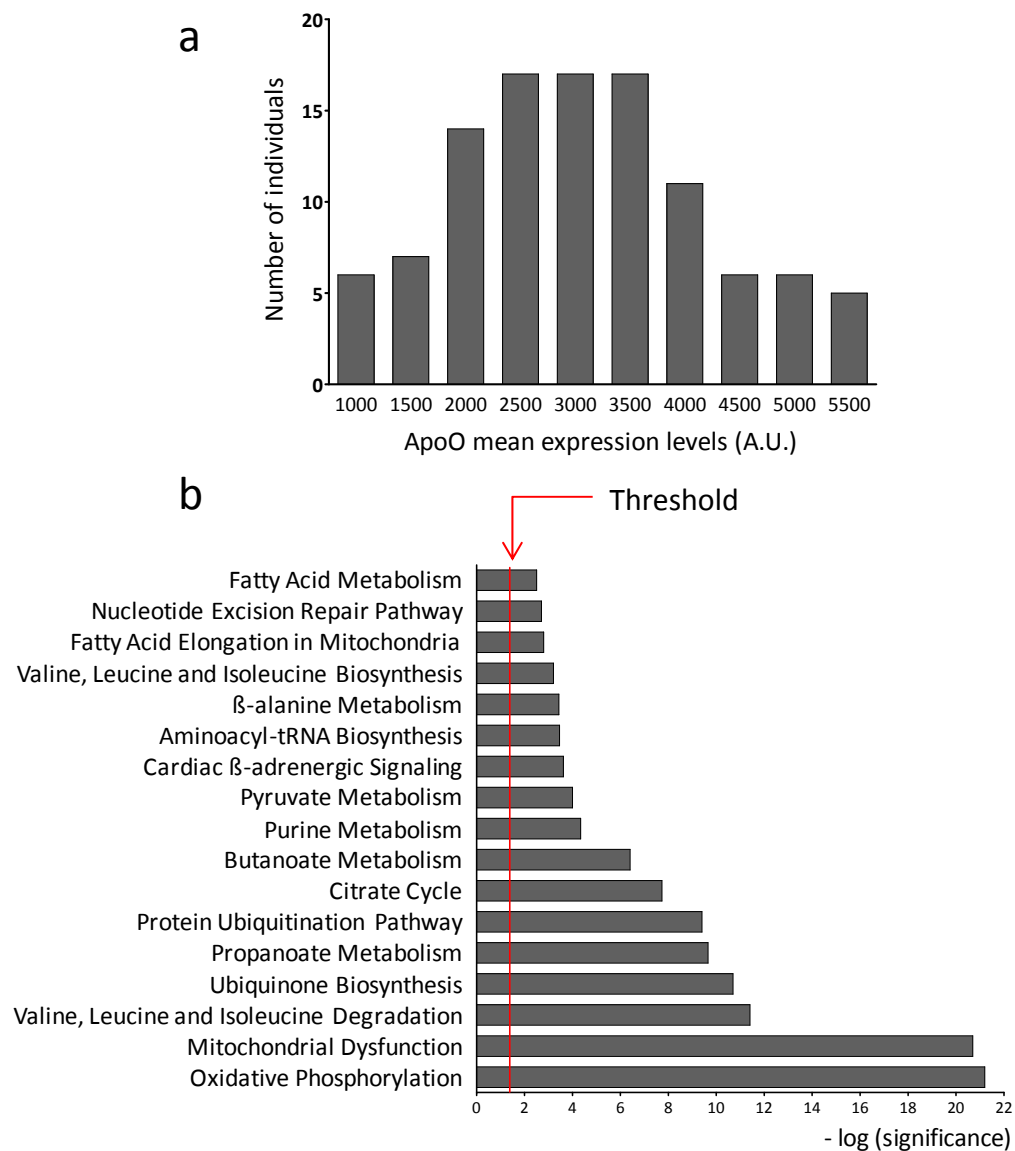


Figure S2 GEO database data mining. **(a)**, Distribution of ApoO mRNA levels extracted from 107 human heart Affymetrix microarrays, obtained from the GEO repository. **(b)** Ingenuity Pathway Analysis performed using an artificial log ratio of differential gene expression calculated using human heart microarray data from patients with the highest and the lowest ApoO expression level. Threshold designates p-value cutoff for pathways significantly enriched in differentially expressed genes (Ingenuity default).

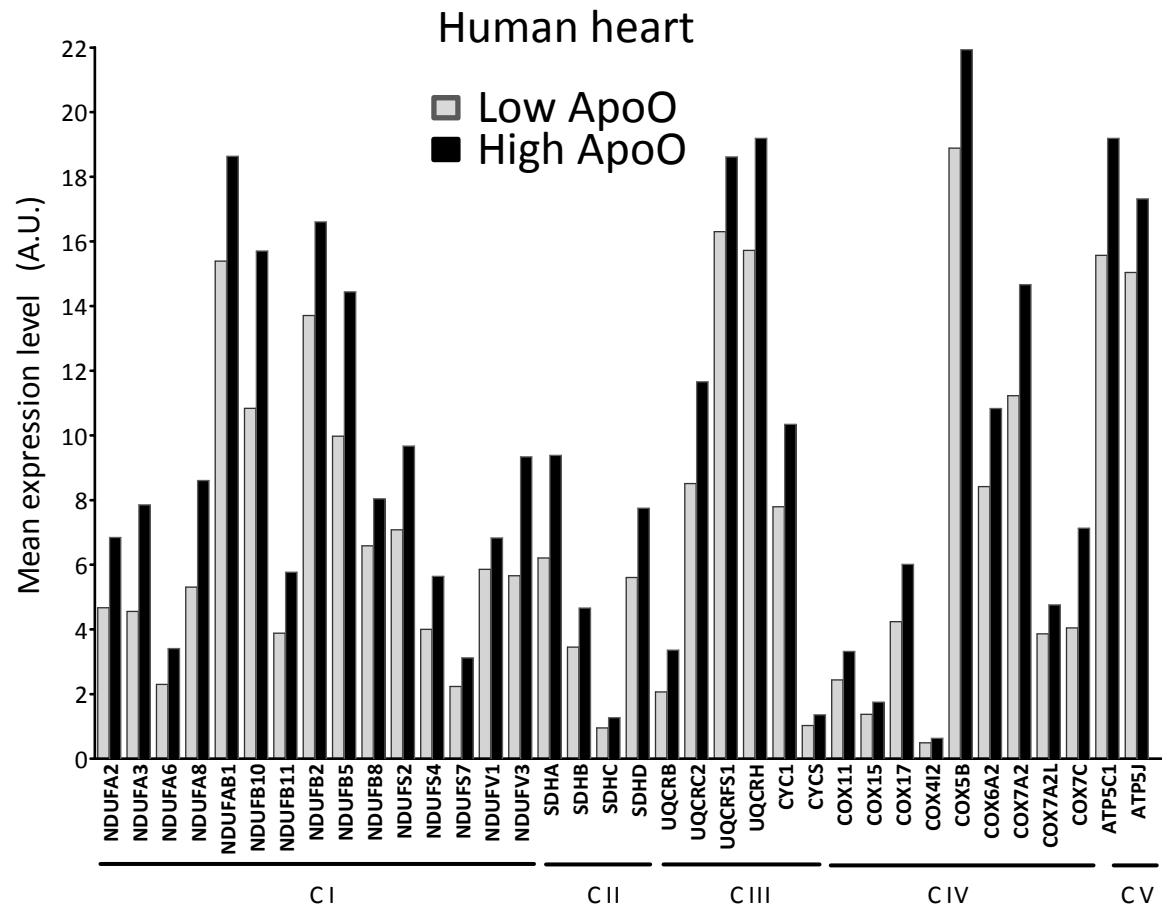


Figure S3 ApoO is associated with a rise in the expression of oxidative phosphorylation genes in human heart. Comparison of gene expression levels for members of the oxidative phosphorylation pathway between human heart microarrays with the highest (High ApoO) and the lowest (Low ApoO) ApoO expression level, organized by mitochondrial complex CI to CV.

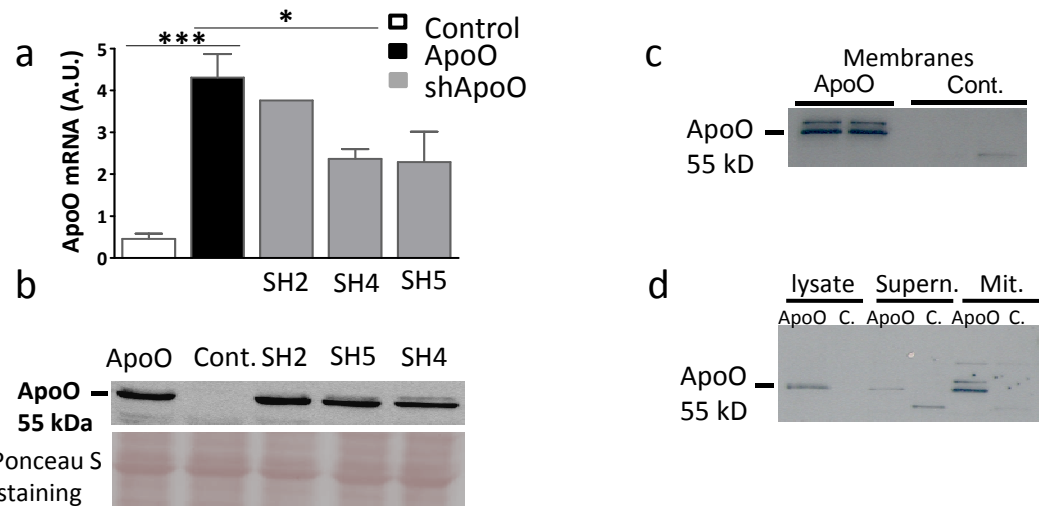


Figure S4 ApoO expression and localization in cardiac myoblasts. (a), (b) ApoO mRNA and protein levels in control cardiac myoblasts and transfectants stably overexpressing ApoO. SH2, SH4 and SH5 indicate 3 independent ApoO clones subsequently stably transfected with 3 different shRNA-ApoO expression vectors. The lower panel in (b) shows equal lane loading and transfer with Ponceau S staining of the transferred membrane. (c) Western blot for ApoO with membrane protein extracts prepared from ApoO and control cells. (d) Anti-hApoO western blot with cellular subfractions from ApoO and control (C.) cells. Labels are: Mitochondria (Mit) Supernatant (Supern.). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

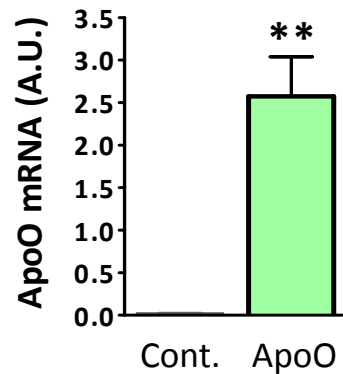


Figure S5 hApoO expression in *in vivo* transfected liver. Human ApoO mRNA levels in mouse liver after hydrodynamics-based *in vivo* liver transfection by rapid tail vein injection of control (n = 12) and ApoO (n = 12) expression vectors. ** $p < 0.01$.

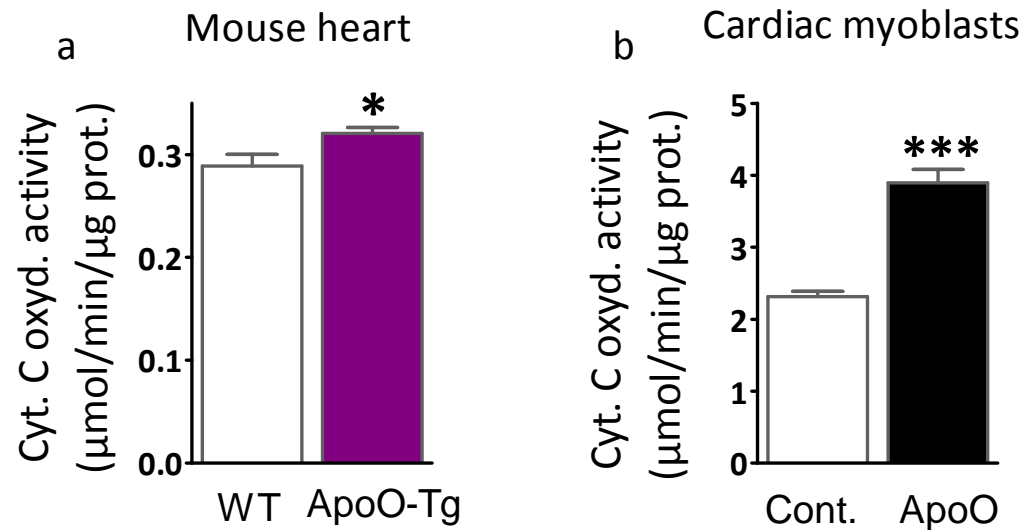


Figure S6 ApoO increases cytochrome C oxidase activity. **(a)** Cytochrome C oxidase (COX) activity in hearts from wild type (WT, n = 29) and ApoO (ApoO-Tg, n = 32) mice. **(b)** COX activity in H9c2 control versus ApoO expressing myoblasts. *p < 0.05, ***p < 0.001.

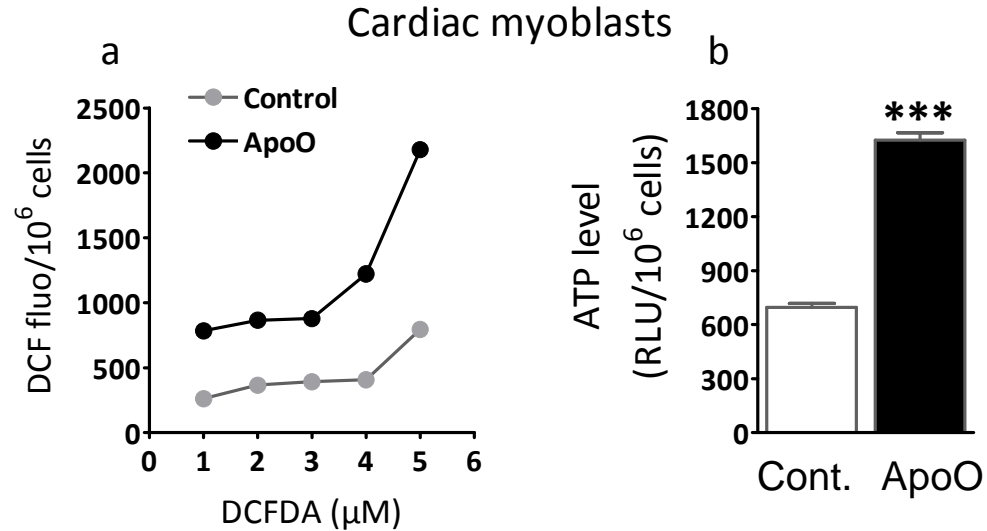


Figure S7 ApoO increases reactive oxygen species and ATP levels. **(a)** Reactive oxygen species, measured in the presence of increasing doses (1-6 μM) of 2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), in control and ApoO expressing H9c2 cardiac myoblasts (n = 4). **(b)** ATP levels in control (Cont.) and ApoO (ApoO) expressing H9c2 cardiac myoblasts. ***p < 0.001 (n = 4).

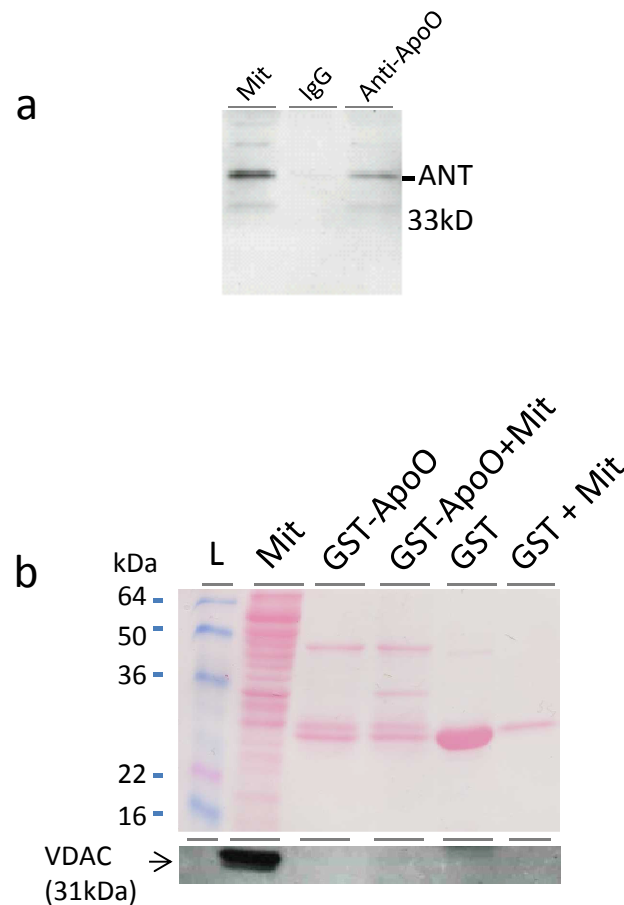


Figure S8 ApoO interacts with ANT and does not interact with VDAC. (a) ANT western blot analysis after co-immunoprecipitation of protein extracts from isolated ApoO-Tg mouse heart mitochondria. Labels correspond to: mitochondria protein extracts (Mit), non immune serum (IgG), and serum from hApoO immunized rabbits (Anti-ApoO). (b) Western blot analysis of ApoO-GST pull-down. Upper panel: Ponceau S staining of the transferred membrane used to control loading and transfer. Lower panel: Enhanced chemiluminescence of the same membrane probed with VDAC antibody. Sample labels are: molecular mass ladder (L), mitochondria protein extracts (Mit), GST-ApoO fusion protein incubated without (GST-ApoO) or with (GST-ApoO+Mit) heart mitochondrial protein extracts, GST alone (GST), or with heart mitochondrial protein extracts (GST+Mit).

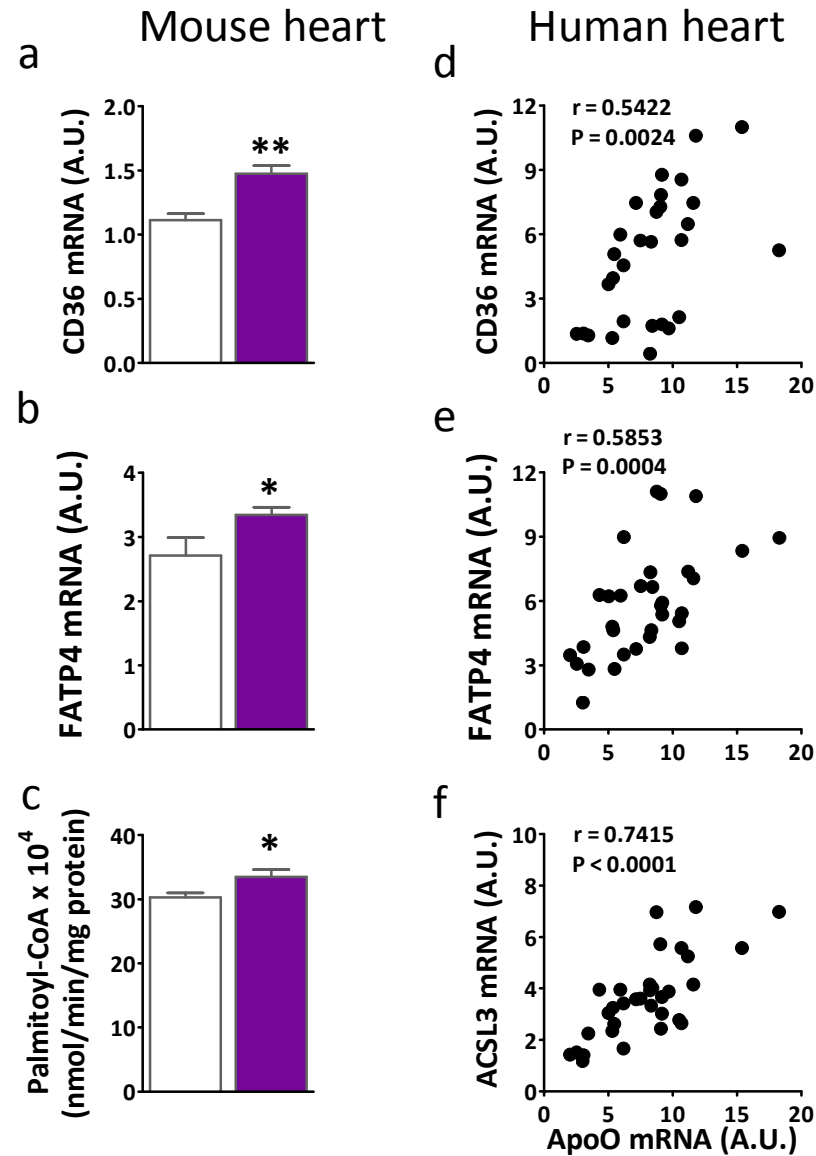


Figure S9 ApoO enhances the expression of fatty acid transporters in mouse and human heart. (a) CD36, (b) FATP4 mRNA levels and (c), palmitoyl-CoA synthesis rate in hearts from wild type (WT, n = 11) and cardiac-specific ApoO transgenic (ApoO-Tg, n = 9) mice. (d), (e), (f), Correlation between ApoO and CD36, FATP4 and ACSL3 mRNA levels in human atrial heart appendage samples (n = 32). *p < 0.05, **p < 0.01.

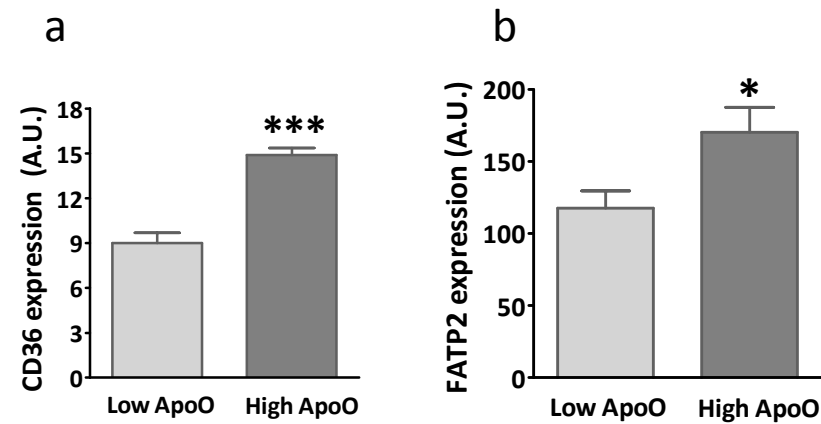


Figure S10 ApoO is associated with high expression of CD36 and FATP2 in human heart. (a), (b) Comparison of CD36 and FATP2 expression levels from human heart microarray data sets (obtained from GEO) from patients with reduced (Low) and elevated (High) ApoO expression levels. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

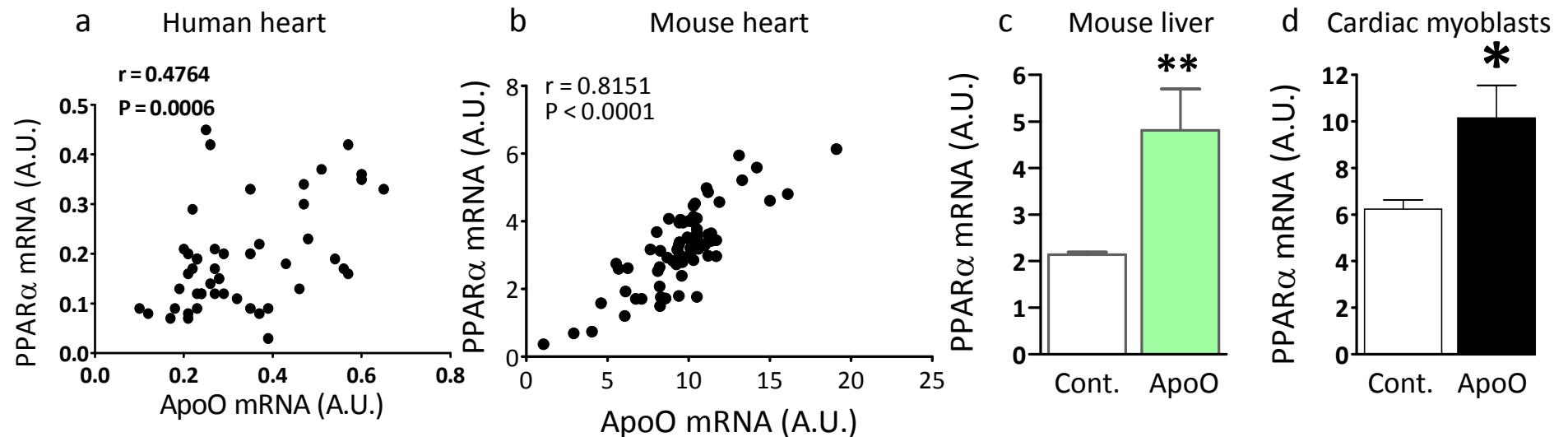


Figure S11 ApoO increases PPAR α expression. (a), (b) Correlation between ApoO and PPAR α mRNA levels in human atrial heart appendage samples (n = 34) and hearts from three cardiac-specific ApoO transgenic mouse lines (n = 70). (c) PPAR α mRNA levels in mouse liver after hydrodynamic-based *in vivo* liver transfection by a rapid tail vein injection of control (n = 12) or ApoO (n = 12) expression vectors. (d) PPAR α mRNA levels in H9c2 cardiac myoblasts stably transfected with control (n = 4) and ApoO expression vectors (ApoO, n = 4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

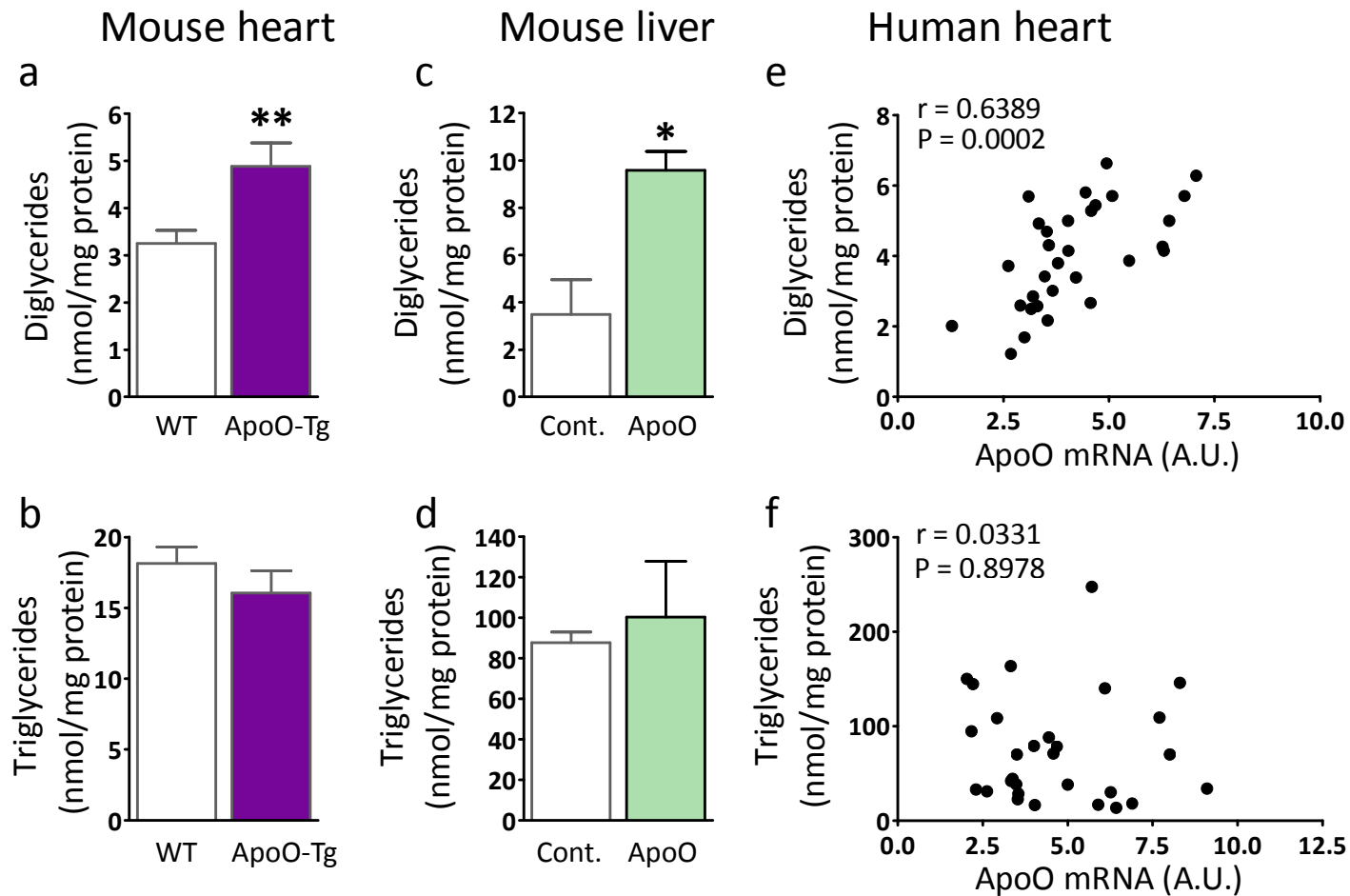


Figure S 12 ApoO enhances intracellular levels of lipotoxic byproducts in mouse and human heart. **(a), (b)** Diglyceride and triglyceride levels in wild type (WT, n = 12) and cardiac-specific ApoO transgenic mouse hearts (ApoO-Tg, n = 11). **(c), (d)** Diglyceride and triglyceride levels in the liver after hydrodynamics-based *in vivo* transfection by a rapid tail vein injection of control (n = 12) and ApoO (n = 12) expression vectors. **(e), (f)** Correlation between ApoO mRNA level and the intracellular concentration of diglycerides (n = 30) or triglycerides (n = 27) in human atrial heart appendage samples. *p < 0.05, **p < 0.01.

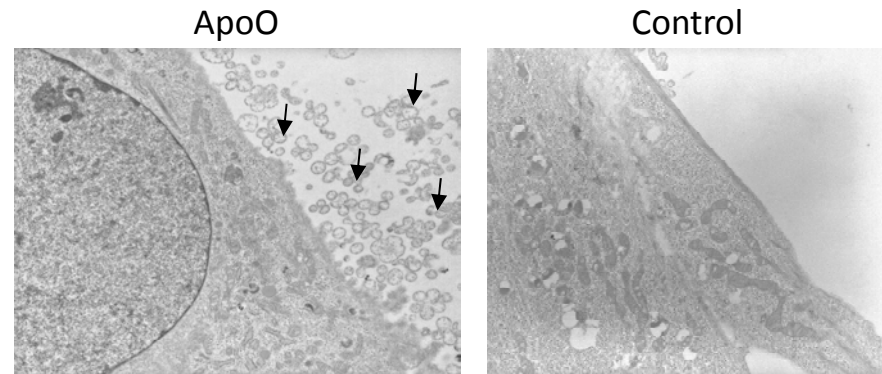


Figure S13 ApoO expression is associated with blebs on cardiomyoblasts. Transmission electron microscopy of ApoO expressing (left) and control (right) cardiomyoblasts. Black arrows indicate blebs.

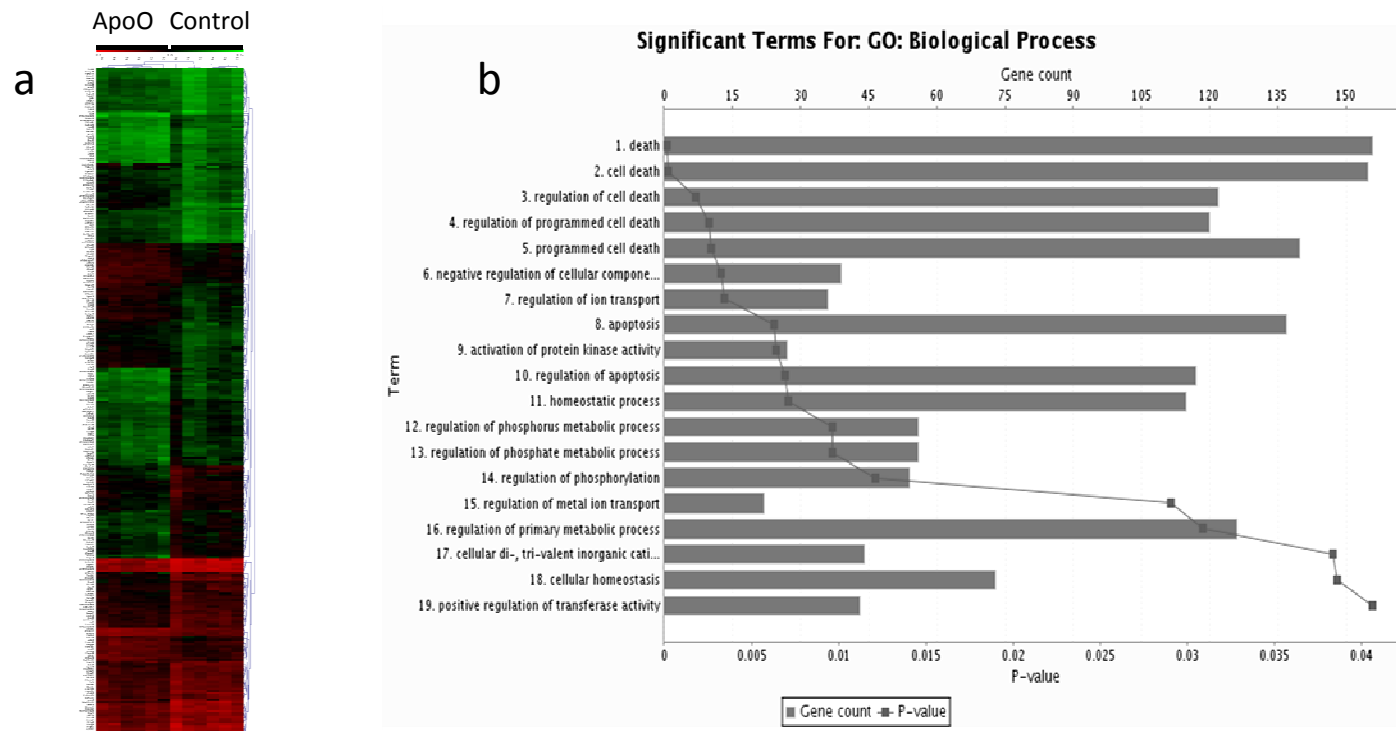


Figure S14 Pangenomic microarray analysis of cardiac myoblasts overexpressing ApoO. **(a)** Hierarchical clustering of microarray data from pools of H9c2 cardiac myoblast clones stably transfected with ApoO (n = 6) or pTT, the control expression vector (n = 6). **(b)** Gene ontology analysis of the microarray data. Data are available from the GEO database (GSE34076).

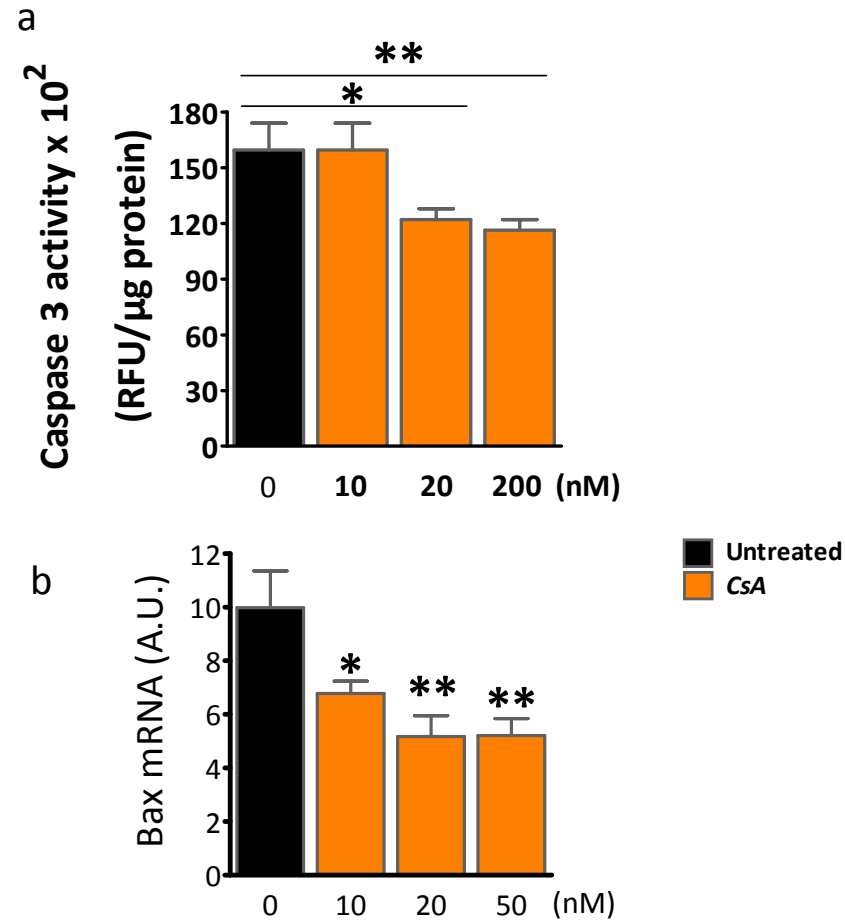
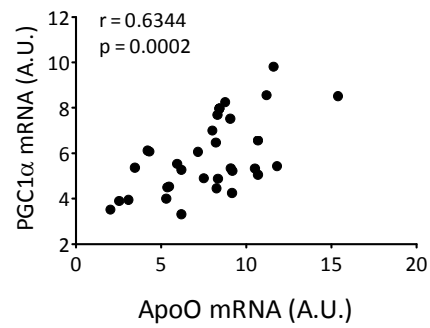


Figure S15 ApoO-induced apoptosis is reduced by Cyclosporine A treatment. **(a)** Caspase-3 activity levels in H9c2 cardiac myoblasts stably overexpressing ApoO and treated for 5 days with increasing doses of cyclosporine A (CsA) (10, 20 and 200 nM). Chronic treatment with 20 nM or 200 nM CsA led to a similar reduction in Caspase-3 activity, suggesting that CsA used at 20 nM concentration was specific for MPTP (n = 5). **(b)** Bax expression in H9c2 cardiac myoblasts stably overexpressing ApoO treated with or without 20 nM CsA (n = 5). *p < 0.05, **p < 0.01.

a Human heart



b Mouse heart

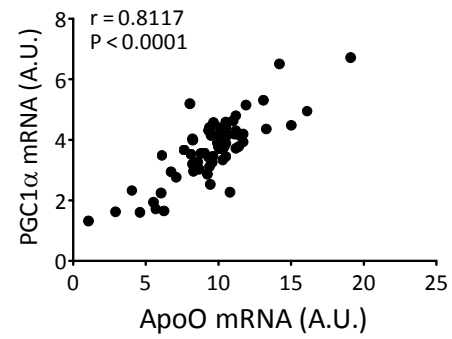


Figure S16 ApoO associates with an increase in PGC1 α expression in human and mouse heart. (a), (b) Correlation between ApoO and PGC1 α mRNA levels in human atrial heart appendage samples (n = 29) and three cardiac-specific ApoO transgenic mouse hearts (n = 70).

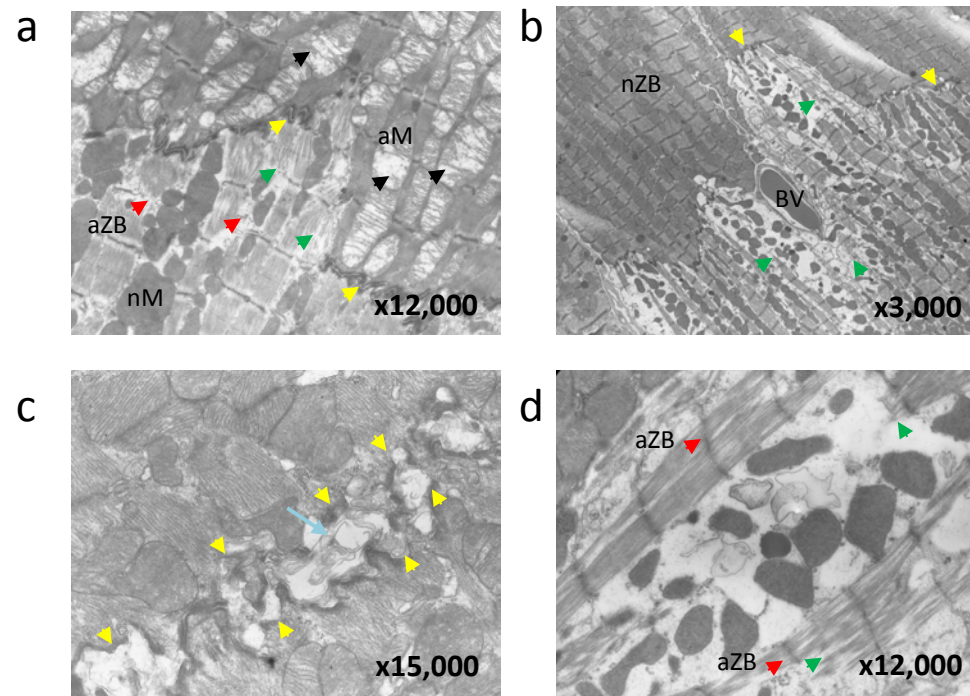


Figure S17 ApoO expression is associated with irreversible degeneration in the myocardium. Transmission electron microscopy study of ApoO-Tg myocardial sections. (a), (b) Longitudinal sections showing areas of moderate disorganization, myofibrillar disarray (green arrows) and widening of intercellular junctions (yellow arrows). Black arrows point to markedly dilated, irregular and altered mitochondria (aM). Red arrows point to abnormal Z bands (aZB). Also labeled are normal Z bands (nZB), normal mitochondrion (nM), and a blood vessel (BV). (c) Longitudinal section showing widened intercellular junctions, intercellular dissociation (yellow arrows) and myelin figures (blue arrow). (d) Severely affected area with ultrastructural evidence of marked loss of contractile elements producing a diffuse pattern in defective myocytes leading to myocyte death.

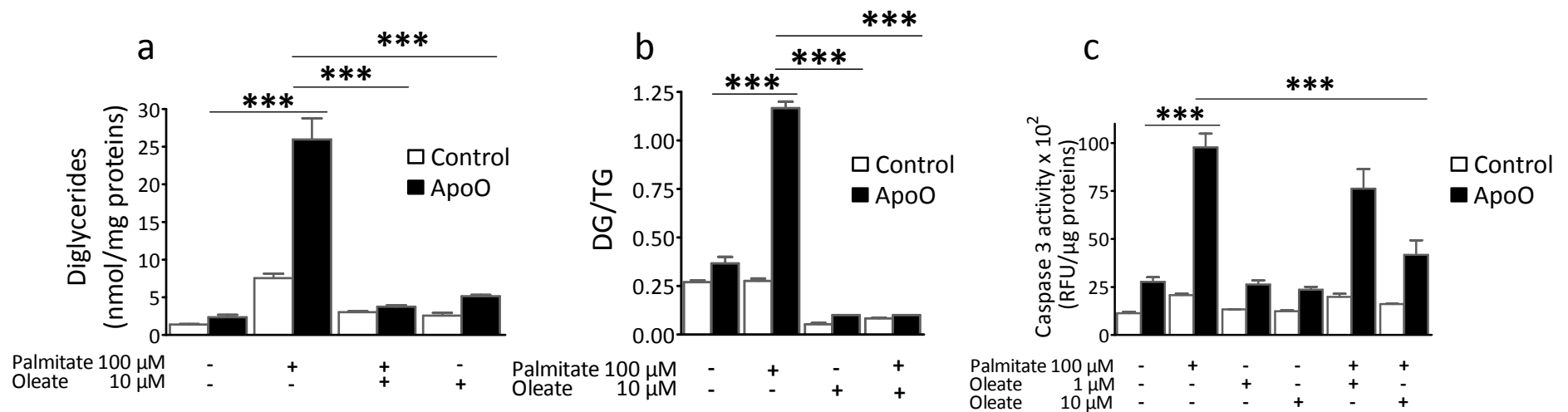


Figure S18 ApoO increases diglyceride levels in cardiac myoblasts. (a) Intracellular levels of diglycerides in H9c2 cardiac myoblasts stably transfected with control (n = 4) and ApoO expression vectors (n = 4) with or without 12 hours incubation with 100 μ M palmitate and 10 μ M oleate. (b) Intracellular diglyceride (DG) to triglyceride (TG) ratios in H9c2 cardiac myoblasts stably transfected with control (n = 4) and ApoO expression vectors (n = 4) with or without 12 hours incubation with 100 μ M palmitate and 10 μ M oleate. (c) Caspase-3 activity from H9c2 cardiac myoblasts stably transfected with control (n = 6) and ApoO expression vectors (n = 6) with or without 12 hours incubation with 100 μ M palmitate and either 1 or 10 μ M oleate. **p < 0.01, ***p < 0.001

Discussion

1. Apo O est une protéine mitochondriale :

Par microscopie confocale laser, nous avons montré que l'Apo O est située au niveau de la mitochondrie. Le fractionnement cellulaire des cardiomyocytes H9C2 et celui du cœur des souris transgéniques surexprimant l'Apo O nous a permis de détecter cette protéine au niveau des fractions correspondantes aux membranes totales et à la mitochondrie. Cette localisation mitochondriale est aussi observée dans le foie des souris transfectées par le vecteur pTT-Apo O.

L'analyse de la séquence de l'Apo O par le logiciel « Mitoprot » a révélé, au niveau de sa région N-terminale, une séquence d'adressage à la mitochondrie (Claros & Vincens, 1996). Ceci est confirmé par microscopie confocale montrant que l'Apo O mutée dans sa région N-terminale perd, en grande partie, sa localisation mitochondriale.

Ces résultats sont en accord avec des études réalisées par d'autres équipes qui ont montré que les orthologues de l'Apo O chez la levure et le ver « *C-elegans* » sont localisés au niveau de la mitochondrie (Huh et al, 2003; Sato & Mihara, 2010).

Des travaux antérieurs de notre équipe ont montré une colocalisation de l'Apo O et de la perilipine, un marqueur de gouttelettes lipidiques (Lamant et al, 2006). Ce résultat ne contredit pas la localisation mitochondriale de l'Apo O puisque récemment Bosma et ses collaborateurs ont révélé la perilipine 5 au niveau de la mitochondrie (Bosma et al, 2012).

2. Apo O interagit avec ANT et favorise l'ouverture un pore non spécifique :

ANT est une des protéines les plus abondantes de la mitochondrie, elle constitue 10% des protéines situées sur la membrane interne mitochondriale. Son rôle principal est le transport ADP/ATP à travers la membrane interne. Il a aussi été montré que l'ANT induit l'apoptose des cellules en entrant dans la formation du PTP (Vieira et al, 2000). Celui-ci est un pore multiprotéique non spécifique qui laisse passer des molécules de taille inférieure à 1.5 kDa. Sa constitution n'est pas encore bien définie (Baines, 2009), certains chercheurs considèrent que ce pore est constitué ou régulé par VDAC à la membrane externe, ANT à la membrane interne et Cyp D du côté matriciel. Le passage de l'ANT « transporteur ADP/ATP » à ANT « constituant de pore » est activé par son interaction avec d'autres protéines. Il a été montré que Bax interagit avec ANT et favorise la formation du pore alors

que Bcl2 active ANT à transporter ADP/ATP et vis-versa (Belzacq et al, 2003; Marzo et al, 1998). Certaines protéines virales, telles que la protéine du virus VIH « vpr » (viral protein R) et du cytomegalovirus « vMIA » (viral mitochondrial inhibitor of apoptosis) interagissent avec l'ANT induisant ou inhibant respectivement l'ouverture du pore (Goldmacher, 2002; Jacotot et al, 2001). Dans ce travail, nous montrons que l'Apo O interagit avec ANT en utilisant deux expériences différentes : la co-immunoprécipitation et le GST-Pull Down sur les extraits mitochondriaux de souris. Nous observons aussi que la surexpression d'Apo O entraîne une augmentation de l'activité de la caspase 3, une conséquence d'une stimulation de l'ouverture du pore. Cet effet est inhibé lorsque l'Apo O est mutée par délétion de sa région N-terminale « Apo O 40-198 » perdant alors sa localisation mitochondriale. En outre, le traitement avec des inhibiteurs du pore, le Ruthénium Red « RR » et la cyclosporine A « CsA », protège contre l'effet de la surexpression de l'Apo O. Ces résultats permettent de proposer Apo O comme un régulateur de la formation du pore en s'associant avec ANT. Etant donné que le BA n'a aucun effet, il est envisageable que l'interaction entre ces deux protéines s'effectue au niveau du site de fixation de ce ligand.

3. La surexpression d'Apo O entraîne une augmentation de la respiration :

Dans le cœur, la mitochondrie constitue le principal organe de synthèse d'ATP : Les électrons provenant de l'oxydation de NADH et FADH₂ sont transférés tout au long de la chaîne respiratoire et sont captés ensuite par l'oxygène qui sera réduit en H₂O. Ce transfert d'électrons est accompagné d'un transport de protons vers l'espace intermembranaire engendrant une différence de potentiel et de pH nécessaire à l'activité de l'ATP synthase et à la production d'ATP (Mitchell, 1966). L'association entre l'oxydation des substrats et la synthèse d'ATP est appelée « phosphorylation oxydative couplée ». On parle d'un découplage extrinsèque pour désigner toute entrée de protons dans la matrice indépendante du complexe V. Par conséquent, la consommation d'oxygène n'est pas couplée à la synthèse d'ATP d'où le nom de la « phosphorylation oxydative non couplée ».

Les mitochondries isolées de foie de souris transfectées *in vivo* par l'Apo O, présentent une augmentation de la phosphorylation découplée désignée par la consommation d'oxygène en présence du succinate (stade 4 de la respiration) et de la phosphorylation couplée mesurée suite à l'addition d'ADP (stade 3 de la respiration). Ces résultats sont aussi confirmés dans les cellules H9C2. La consommation totale d'oxygène augmente dans les cellules surexprimant l'Apo O. Le traitement par l'oligomycine permet de bloquer l'activité de l'ATP synthase et de

mesurer uniquement la respiration découplée. En présence de cet inhibiteur, la consommation d'oxygène reste plus élevée dans les cellules Apo O que chez les cellules contrôles suggérant ainsi la présence d'un découplage respiratoire (Wu et al, 1999). La respiration couplée (la respiration totale – la respiration en présence d'oligomycine) semble aussi augmentée en présence d'Apo O. L'augmentation de consommation d'oxygène est aussi observée après ajout du CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone), un découplant chimique qui permet le découplage total des mitochondries et permet de mesurer leur capacité de respiration maximale. Ce dernier résultat permet de supposer une augmentation du nombre et/ou de l'activité de la chaîne respiratoire (Wu et al, 1999). Cette hypothèse est en accord avec nos résultats montrant une augmentation de l'activité du cytochrome *c* oxydase, de l'expression des gènes codant pour PGC1 α , les sous-unités du complexes respiratoires et du système de la phosphorylation oxydative (voir les analyses de microarrays de cœur humains extraites des bases de données).

D'autre part, nous avons observé une diminution de la respiration dans les cellules H9c2 et dans les mitochondries isolées du foie de souris transfectées par le vecteur pTT-Apo O (40-198). Ce résultat est aussi obtenu après traitement des cellules par les inhibiteurs de l'ouverture du pore, la CsA et le BA. Nous pouvons conclure que l'ouverture du pore induite par la surexpression de l'Apo O est à l'origine de cette augmentation de la respiration. La présence de deux types de respiration (couplée et découplé) ne contredit pas l'hypothèse de l'ouverture du pore. Etant donné que l'ANT est la protéine majoritaire de la mitochondrie, la quantité d'Apo O exprimée reste probablement insuffisante pour interagir avec toutes ces protéines. Une partie d'ANT interagit alors avec Apo O et rentre dans la formation du pore et une autre reste fonctionnelle comme transporteur de nucléotides ADP/ATP. Ceci est en accord avec les travaux de Belzacq qui ont montré que Bax interagit avec ANT et favorise l'ouverture du pore et que cet effet dépend du ratio ANT/Bax (Belzacq et al, 2003). En outre, Feldmann a montré aussi que l'ouverture du pore est associée à une augmentation de la respiration découplée avec le maintien de la respiration couplée (Feldmann et al, 2000).

D'autre part, l'ANT qui entre dans la formation du pore perd sa capacité à transporter l'ADP/ATP (Belzacq et al, 2003), ce qui entraîne une diminution de la capacité générale du transport. Il a été montré que la diminution de l'activité de transport de l'ANT par délétion d'ANT1 entraîne une prolifération de mitochondrie ainsi qu'une surexpression de certains gènes codant pour des protéines appartenant à la chaîne respiratoire (Graham et al, 1997; Murdock et al, 1999). En outre, PGC1 α joue un rôle important dans la biogenèse et régule

certaines facteurs de transcription responsables de la réplication de l'ADN mitochondrial ainsi que la transcription des gènes codant les protéines impliquées dans le système de phosphorylation oxydative (Finck & Kelly, 2007). Won a montré que PGC1 α peut augmenter l'activité de transport de l'ANT (Won et al, 2010). Ces données associées à nos résultats permettent de suggérer l'hypothèse suivante : l'Apo O se fixe sur une partie de l'ANT qui forme un pore et perd son activité de transport ADP/ATP. Ce déficit de transport associé à la fuite du proton induite par l'ouverture du pore, déclenche un signal de stress qui active PGC1 α . Celui ci induit l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative et augmente l'activité de transport de l'ANT (non fixé à l'Apo O). Par conséquent, il en résulte une augmentation de la respiration couplée et non couplée, ce qui est en accord avec les résultats de l'équipe de Spiegelman (Wu et al, 1999).

4. La surexpression d'Apo O favorise le métabolisme des acides gras :

Un cœur adulte utilise principalement les acides gras pour produire de l'ATP. Ayant une capacité de stockage de lipides limitée, le cœur utilise les acides gras provenant de l'hydrolyse des VLDL ou ceux associés à l'albumine. Ces acides gras rentrent dans la cellule par diffusion ou grâce à des transporteurs situés à la membrane plasmique tels que FATP, CD36 et FABP. Ils sont pris en charge par les ACSL (long chain acyl coA synthétase) pour former les acyl-CoA qui vont se diriger vers la mitochondrie pour être β -oxydés. Il en résulte des acetyl-CoA qui vont être pris en charge par les enzymes de cycle de Krebs pour générer les NADH et FADH₂, substrats clés de la chaîne respiratoire. Une augmentation de la consommation d'oxygène nécessite alors une augmentation de taux de NADH et de FADH₂, de l'activité des enzymes de la β -oxydation ainsi que l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et dans la cellule.

Une surexpression des transporteurs (FATP4 et CD36) et une augmentation de l'activité des ACSL ont été détectée dans les cellules H9C2 surexprimant Apo O, dans le cœur des souris transgéniques ainsi que dans le foie de souris transfecté par le vecteur pTT-Apo O. Dans les auricules humaines, une corrélation entre l'expression de l'Apo O et celle des transporteurs et des ACSL a été aussi observée et confirmée avec les résultats de microarrays extraites des bases de données. Par microscopie confocale laser, nous avons montré une entrée rapide et massive du Palmitate-bodipy fluorescent dans les cellules surexprimant Apo O par rapport aux cellules contrôles. En outre, une augmentation de taux d'acides gras (FAME) a été détectée dans les cellules surexprimant Apo O. En plus de

l'augmentation de l'entrée des acides gras, la β -oxydation semble être activée suite à la surexpression d'Apo O. Bien que nous n'ayons pas mesuré directement la β -oxydation, nous avons déduit son augmentation en tenant compte de deux paramètres : d'une part, l'augmentation de la consommation d'oxygène montre que les substrats, NADH et FADH₂, sont en continuité fournis à la chaîne respiratoire et d'autre part, nous avons observé, *in vitro* et *in vivo*, une surexpression de PPAR α , connu comme étant un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique y compris les enzymes de cycles de Krebs et de la β -oxydation (Huss & Kelly, 2004).

L'ensemble de ces résultats montre que la surexpression de l'Apo O favorise le métabolisme des acides gras. Le traitement chronique des cellules H9C2 par la CsA pendant 5 jours diminue l'effet de l'Apo O sur l'expression des gènes codant pour les transporteurs ainsi que le taux des lipides intracellulaires. Nous pouvons conclure alors que la surexpression de l'Apo O induit l'entrée des acides gras dans la cellule en réponse à l'ouverture du pore.

Nous avons évoqué ci-dessus que l'ouverture du pore entraîne un déficit énergétique et induit l'expression et l'activité de PGC1 α . Il a été montré qu'en plus de son rôle dans la biogenèse mitochondriale, PGC1 α régule le métabolisme des acides gras soit en interagissant directement avec PPAR α (Vega et al, 2000) soit en régulant l'expression et l'activité d'ERR α (Schreiber, 2003) qui à son tour augmente l'activité et l'expression de PPAR α (Huss et al, 2004a). Ces données associées à nos résultats permettent de proposer cette hypothèse : suite à l'ouverture du pore, PGC1 α est surexprimée et induit l'expression et l'activité du PPAR α . Celui-ci régule positivement les gènes codant des protéines impliquées dans l'entrée des acides gras dans la cellule ainsi que leur β -oxydation (Huss & Kelly, 2004), ce qui fournit les substrats à la chaîne respiratoire et explique le maintien de l'augmentation de la consommation d'oxygène.

5. La surexpression de l'Apo O entraîne une cardiomyopathie :

En situation de cardiomyopathie dilatée, les auteurs ont observé une diminution de l'activité de transport d'ADP/ATP, malgré une surexpression de l'ANT, et supposent ce déficit énergétique comme une cause de la maladie (Dorner & Schultheiss, 2000; Schultheiss, 1992; Sylven et al, 1993). En outre, Narula a détecté, suite à la délétion d'ANT1, une cardiomyopathie dilatée concentrique caractérisée par une hypertrophie du myocarde, une dilatation ventriculaire ainsi qu'une diminution de la fonction cardiaque (Narula et al, 2011).

Ces résultats confirment qu'un dysfonctionnement de l'ANT pourrait être la cause d'une cardiomyopathie. Dans notre travail, nous avons proposé que suite à la surexpression de l'Apo O, une partie de l'ANT forme un pore et perd son activité de transport d'ADP/ATP ; en parallèle nous avons observé, dans le cœur de souris transgéniques surexprimant Apo O, une diminution de la fraction d'éjection, de la fraction de raccourcissement et de l'intervalle PR.

D'autre part, de nombreuses études ont montré que l'augmentation de l'entrée des acides gras ou de leur β -oxydation, par surexpression de FATP, ACSL ou PPAR α (Chiu et al, 2005; Chiu et al, 2001; Finck et al, 2002), entraîne une accumulation de lipides et un dysfonctionnement cardiaque. Dans notre modèle, la surexpression d'Apo O dans les cellules H9C2, le cœur de souris transgéniques, le foie de souris transfectées et les auricules humains, favorise le métabolisme des acides gras et leur accumulation en céramides et diglycérides (DG) connus comme étant des intermédiaires lipidiques toxiques (Hardy et al, 2003; Park et al, 2008). Nous avons également montré, dans ces différents modèles, une augmentation de l'expression des gènes pro-apoptotiques (Bax, Bad, casp9...) et de l'activité de la caspase 3. Cette apoptose semble liée en grande partie à l'accumulation de lipides puisque le traitement des cellules avec le palmitate favorise l'activité caspase 3 alors que le traitement des cellules avec Fumonisine B1, inhibiteur de la synthèse de céramide (Merrill et al, 1993), diminue l'effet toxique du palmitate (Dyntar et al, 2001). Cependant, le traitement chronique des cellules avec CsA diminue non seulement l'activité de la caspase 3 mais aussi l'expression de CD36, FATP4 et de Bax et le taux des lipides intracellulaires.

Ces résultats permettent de proposer le modèle suivant : la formation du pore PTP suite à l'interaction de l'Apo O à l'ANT, entraîne une fuite de protons dans la matrice et une augmentation de la perméabilité mitochondriale. Dans un mécanisme de protection, la cellule accroît l'entrée des acides gras et la biogenèse mitochondriale afin d'augmenter la respiration. Il en résulte une augmentation de taux d'ATP et de ROS. Ces derniers vont induire des dommages dans la mitochondrie en attaquant l'ADN mitochondrial ou en favorisant l'ouverture d'autres pores PTP : les autres ANT qui n'interagissent pas avec l'Apo O rentrent aussi dans la formation du pore et perdent leur activité de transport. Il en résulte une diminution du potentiel mitochondrial et une libération du cytochrome *c* dans le cytosol. Ces mitochondries deviennent de moins en moins fonctionnelles, les acides gras en excès s'accumulent sous forme de DG et céramides qui à leur tour vont attaquer d'autres mitochondries en favorisant la formation de ROS, ce qui entraîne l'apoptose des cellules et une cardiomyopathie.

6. L'Apo O et l'homeostasie calcique :

Je n'ai pas eu le temps d'étudier les conséquences de la surexpression de l'Apo O sur l'homéostasie du calcium durant mes travaux de thèse. Cependant, il est important de signaler que l'Apo O pourrait jouer un rôle dans ce mécanisme puisqu'elle régule l'ouverture du PTP.

En effet, en plus de son rôle dans la mort cellulaire, le PTP semble être impliqué dans la régulation de l'homéostasie calcique en permettant l'évacuation du calcium de la mitochondrie vers le cytosol. Ce mécanisme a été suggéré pour la première fois en 1992 par Altschuld qui a montré une augmentation de l'accumulation du calcium dans les mitochondries des cardiomyocytes de rat traités par la cyclosporine (Altschuld et al, 1992). Une autre étude réalisée sur les neurones de souris montre une ouverture du PTP suite à des traitements par des doses physiologiques de calcium permettant l'évacuation de cet ion sans aucun signe d'apoptose (Barsukova et al, 2011). Cette ouverture transitoire du pore non associée à une mort cellulaire ou « flickering » est aussi observée dans des cellules intactes ou des mitochondries isolées du foie (Huser & Blatter, 1999; Petronilli et al, 1999). En se basant sur ces résultats, on peut déduire que l'ouverture transitoire du PTP est un phénomène physiologique qui contribue à la régulation intracellulaire du calcium et que son ouverture permanente entraîne une diminution de la perméabilité mitochondriale et de la mort cellulaire, apoptose ou nécrose selon le niveau cellulaire d'ATP (Rasola & Bernardi, 2011).

Dans nos modèles, la surexpression de l'Apo O favorise l'ouverture du PTP ; Par conséquent, nous pouvons suggérer qu'une diminution de la capacité mitochondriale à retenir le calcium dans la matrice aboutit à une perturbation du cycle cellulaire du calcium. Cette hypothèse devrait être validée et étudiée plus en détail afin de répondre à certaines questions : est ce que la surexpression de l'Apo O augmente le flickering ou entraîne-t-elle une ouverture permanente du pore ? À partir de quelle concentration d'Apo O l'homéostasie calcique est affectée ? A quel moment ? Quelles sont ses conséquences ?

Conclusion et Perspectives

Les travaux présentés dans ce mémoire ont permis d'identifier des conséquences de la surexpression de l'Apo O dans le cœur. Ces études ont mis en évidence un nouveau modèle de cardiomyopathie dû à l'interaction de l'Apo O avec l'ANT.

Nous avons montré que la surexpression de l'Apo O dans le cœur favorise le métabolisme des acides gras en surexprimant des gènes codant des protéines impliquées dans l'entrée des acides gras et de son métabolisme tels que CD36, FATP, ACSL et PPAR α . En outre, nous avons observé une apoptose caractérisée par une accumulation de céramides et de diglycérides, une surexpression des gènes proapoptotiques ainsi qu'une augmentation de l'activité de la caspase 3 et du taux intracellulaire de ROS. Nous avons également détecté, chez la souris, une altération structurale du myocarde et une dysfonction cardiaque caractérisée par une altération de la fraction d'éjection, de la fraction de raccourcissement et de l'intervalle PR.

En parallèle, nous avons remarqué une augmentation de la biogenèse mitochondriale et de la respiration cellulaire caractérisée par une surexpression de PGC1 α , une augmentation de la consommation d'oxygène, du taux intracellulaire d'ATP ainsi que l'activité de cytochrome *c* oxydase. Ces résultats ont été confirmés par les données de microarrays sur les cœurs humains extraites des bases de données qui montrent une surexpression des gènes codant les sous-unités des différents complexes de la chaîne respiratoire chez les individus ayant une forte expression d'Apo O.

D'autre part, nous avons montré que l'effet de l'Apo O est d'origine mitochondriale via son association avec ANT. Nous supposons que l'Apo O interagit avec l'ANT et favorise l'ouverture du pore PTP puisque le traitement des cellules avec les inhibiteurs de ce pore, RR et CsA, inhibe l'effet de la surexpression de l'Apo O. Des études supplémentaires devraient être effectuées afin de valider cette hypothèse. En outre, Nous avons confirmé que l'ouverture du pore PTP n'est pas une conséquence de l'accumulation de lipides dans la cellule mais plutôt sa cause puisque le traitement des cellules par RR et CsA diminue non seulement l'apoptose mais également la consommation d'oxygène, l'entrée des acides gras et leur accumulation dans la cellule.

Ces résultats permettent de proposer le modèle suivant : en situation d'abondance, l'Apo O est importée dans la mitochondrie où elle interagit avec ANT au niveau de la membrane interne. Cette interaction entraîne l'ouverture du pore PTP, une entrée des ions H⁺

dans la matrice et une diminution du potentiel mitochondrial. Par conséquent, l'activité des différents complexes respiratoires augmente afin de compenser cette perte de proton et maintenir la différence du potentiel nécessaire pour la production d'ATP. La cellule induit alors l'expression de PGC1 α qui à son tour augmente l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale et la phosphorylation oxydative ainsi que l'entrée des acides gras et leur β -oxydation. L'augmentation de la respiration suite à l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et leur β -oxydation produit une grande quantité de ROS. Il en résulte une libération du cytochrome *c* et une altération mitochondriale. Il s'en suit un dysfonctionnement mitochondrial et les acides gras en excès entrent dans la formation d'espèces lipidiques toxiques telles que les céramides et les DG, ce qui aggrave la situation et entraîne à la fois une apoptose accrue des cellules et une dysfonction cardiaque.

Des études antérieures de notre équipe ont montré que l'Apo O est surexprimé chez les patients diabétiques et hypertendus ainsi que dans le cœur des chiens soumis à un régime gras hypercalorique pendant 9 semaines. Etant donné que le diabète et l'obésité aboutissent à une cardiomyopathie et représentent un facteur de risque d'insuffisance cardiaque, il sera intéressant de voir le niveau de l'implication de l'Apo O dans les cardiomyopathies induites par ces différentes pathologies. Il serait important, par exemple, de générer des souris ayant le gène Apo O inactivé au niveau cardiaque, provoquer un diabète par un traitement à la STZ et étudier l'effet de l'inactivation de ce gène sur la lipotoxicité cardiaque induite par le diabète. L'absence de l'Apo O dans le cœur pourrait jouer un rôle protecteur en prévenant l'entrée massive des acides gras, leur accumulation dans la cellule ainsi que l'apoptose des cardiomyocytes, ce qui améliorerait la fonction cardiaque chez les souris diabétiques. L'Apo O pourrait être une cible pharmacologique permettant de limiter ou d'empêcher l'effet du diabète ou d'autres maladies sur le dysfonctionnement cardiaque, d'où l'importance d'identifier les protéines ou les molécules qui régulent son expression ou son activité.

Annexes

Article 1: Blood Signature of Pre-Heart Failure: A Microarrays Study

Fatima Smih¹, Franck Desmoulin¹, Matthieu Berry^{1,2}, Annie Turkieh¹, Romain Harmancey¹, JasonIacovoni¹, Charlotte Trouillet^{1,2}, Clement Delmas^{1,2}, Atul Pathak^{1,2}, Olivier Lairez^{1,2}, François Koukoui¹, Pierre Massabuau^{1,2}, Jean Ferrieres², Michel Galinier^{1,2}, Philippe Rouet^{1,2}

¹ INSERM/Universite Paul Sabatier UMR 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Toulouse, France,

² Rangueil Hospital University, Cardiology Department, Toulouse, France

PLoS ONE 6(6): e20414-e20423, 2011

L'insuffisance cardiaque (IC) se définit comme étant l'incapacité du cœur à maintenir un débit sanguin adapté aux besoins métaboliques et fonctionnels de l'organisme. Selon l'« American College of Cardiology » et l'« American Heart Association », l'insuffisance cardiaque est classée en quatre stades (Hunt et al, 2001) :

Stade	Description
A	Patients à haut risque d'insuffisance cardiaque mais sans altération organique myo-péricardique ou valvulaire, et sans signes ni symptômes d'insuffisance cardiaque
B	Patients ayant une lésion structurelle du cœur associée à l'insuffisance cardiaque, mais qui n'ont jamais présenté de signes ou symptômes d'insuffisance cardiaque
C	Patients avec une lésion structurelle du cœur et qui présentent ou ont présenté une symptomatologie d'insuffisance cardiaque
D	Patients avec lésions structurelles du cœur à un stade avancé et qui malgré un traitement médicamenteux maximal, sont symptomatiques au repos et qui requièrent une intervention spécialisée

Stades de l'insuffisance cardiaque selon « ACC » et « AHA »

Le risque de développer une insuffisance cardiaque dans les pays occidentaux est estimé à 33%. 75% des patients insuffisants cardiaques meurent dans les 8 ans après le diagnostic (Lloyd-Jones et al, 2009). L'identification des patients aux stades asymptomatiques (A et B) permet de prévenir ou de prendre en charge de manière plus précoce l'insuffisance cardiaque.

Le stade B de l'insuffisance cardiaque est caractérisé par une dysfonction ventriculaire gauche asymptomatique (DVGA) aboutissant au développement d'une insuffisance cardiaque sévère (Hunt et al, 2001). Le dépistage de la DVGA est actuellement réalisé grâce à des examens d'imagerie, dominés par l'échocardiographie, rendant son diagnostic difficile à mettre en place en routine clinique.

Dans le but de faciliter le diagnostic de la DVGA, notre équipe s'est intéressée à déterminer des biomarqueurs sanguins caractéristiques de ce stade. Ainsi, une étude sur 294 individus a été réalisée à l'hôpital Rangueil de Toulouse. L'examen échocardiographique et le bilan clinique ont permis de classer les patients en 4 groupes : témoins, facteur de risque, DVGA et IC. Une étude du transcriptome des leucocytes des patients des différents groupes a été réalisée par microarrays afin de déterminer un profil d'expression caractéristique du groupe porteur d'une DVGA.

Blood Signature of Pre-Heart Failure: A Microarrays Study

Fatima Smih^{1*}, Franck Desmoulin¹, Matthieu Berry^{1,2}, Annie Turkieh¹, Romain Harmancey¹, Jason Iacovoni¹, Charlotte Trouillet^{1,2}, Clement Delmas^{1,2}, Atul Pathak^{1,2}, Olivier Lairez^{1,2}, François Koukoui¹, Pierre Massabuau^{1,2}, Jean Ferrieres², Michel Galinier^{1,2}, Philippe Rouet^{1,2}

1 INSERM/Universite Paul Sabatier UMR 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Toulouse, France, **2** Rangueil Hospital University, Cardiology Department, Toulouse, France

Abstract

Background: The preclinical stage of systolic heart failure (HF), known as asymptomatic left ventricular dysfunction (ALVD), is diagnosed only by echocardiography, frequent in the general population and leads to a high risk of developing severe HF. Large scale screening for ALVD is a difficult task and represents a major unmet clinical challenge that requires the determination of ALVD biomarkers.

Methodology/Principal Findings: 294 individuals were screened by echocardiography. We identified 9 ALVD cases out of 128 subjects with cardiovascular risk factors. White blood cell gene expression profiling was performed using pangenomic microarrays. Data were analyzed using principal component analysis (PCA) and Significant Analysis of Microarrays (SAM). To build an ALVD classifier model, we used the nearest centroid classification method (NCCM) with the ClANC software package. Classification performance was determined using the leave-one-out cross-validation method. Blood transcriptome analysis provided a specific molecular signature for ALVD which defined a model based on 7 genes capable of discriminating ALVD cases. Analysis of an ALVD patients validation group demonstrated that these genes are accurate diagnostic predictors for ALVD with 87% accuracy and 100% precision. Furthermore, Receiver Operating Characteristic curves of expression levels confirmed that 6 out of 7 genes discriminate for left ventricular dysfunction classification.

Conclusions/Significance: These targets could serve to enhance the ability to efficiently detect ALVD by general care practitioners to facilitate preemptive initiation of medical treatment preventing the development of HF.

Citation: Smih F, Desmoulin F, Berry M, Turkieh A, Harmancey R, et al. (2011) Blood Signature of Pre-Heart Failure: A Microarrays Study. PLoS ONE 6(6): e20414. doi:10.1371/journal.pone.0020414

Editor: Shahab A. Akhter, University of Chicago, United States of America

Received: November 25, 2010; **Accepted:** May 2, 2011; **Published:** June 24, 2011

Copyright: © 2011 Smih 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 the National Research Agency and Fondation de France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fatima.smith-rouet@inserm.fr

Introduction

The risk for developing heart failure (HF) in Western countries is estimated to be 33%, with a 8 year post-diagnosis mortality rate of 75% [1] and the annual cost of treatment in the US was estimated at \$37.2 billion in 2009 [1]. Epidemiologic studies have demonstrated that cardiovascular risk factors such as hypertension, diabetes and obesity are precursors of HF [1]. These factors induce modification of the myocardium structure and lead to functional alterations of the heart [2] including a reduction in the left ventricular ejection fraction (LVEF). Identification of patients at the “pre-heart failure” stage can prevent the development of HF through the initiation of adapted medical and non-medical strategies. This silent preclinical state (pre-heart failure) is referred as asymptomatic left ventricular dysfunction (ALVD) and can only be diagnosed by transthoracic echocardiography. ALVD, common in the general population, leads to a high risk of developing overt HF. Indeed, compared to individuals with normal LVEF, ALVD subjects have a 12-fold increase in the annual rate of hospitalization for first-event HF [3] and a 4-fold increase in the

risk of death over a 6-year period [2]. Effective large-scale screening for ALVD, at present a difficult task representing a major unmet clinical challenge, requires a determination of ALVD biomarkers.

Despite the fact that screening for ALVD has been advocated for over a decade [3,4], there are no ALVD biomarkers. Indeed, ALVD diagnosis requires a sophisticated echocardiographic analysis, which is both time-consuming and costly, and is not applicable to the large population of individuals at risk. The lack of biomarker(s) is of importance because ALVD is highly prevalent due to the general increase in cardiovascular risk factors [5]. ALVD has become established as a predictive early indicator of severe HF [6]. Follow-up studies have shown that ALVD subjects display an average annual chronic heart failure rate of 4.9 to 20%, with a mortality rate of 5.1 to 10.5% [7,8]. Such observations were recently confirmed in a 5-year survival rate analysis that showed a death rate of 31% for subjects suffering from ALVD and of 47% for patients with systolic HF [9]. Finally, the SOLVD study demonstrated that the treatment of ALVD results in a significantly delayed occurrence of HF [10]. Therefore, it is of clinical

relevance to identify ALVD individuals in the general population before they develop overt HF.

The objective of the present study was to evaluate the impact of ALVD on the human transcriptome and to identify a specific molecular signature based on differential gene expression. Ideally, the molecular signature should be independent of cardiovascular risk factors (such as hypertension, diabetes, obesity, dyslipidemia...) and should be useful to sort ALVD individuals among subjects with cardiovascular risk factors. Moreover, the transcriptome analysis allowed us to perform a global analysis without prior knowledge or hypothesis of the gene whose expression could be affected by the disease.

We analyzed white blood cell transcriptomes since gene expression patterns in peripheral blood has been validated in humans [11] as a basis for the detection and diagnosis of diseases such as chronic [12,13] and acute heart failure [14]. Indeed, the blood is a dynamic and interactive tissue that communicates with all cells of the body and can therefore display perturbations indicative of disease. Previous work have shown that blood cells share 84% of their transcriptome with the heart [15] and that some gene regulations in blood are similar to other organs such as the heart [13,14]. Thus, peripheral blood is likely to become a useful resource in the diagnosis of systemic diseases, selection of treatment methods and disease outcome prediction [15]. In this work we show that white blood cells retain information of ALVD and provide a set of genes that could be used to pre-screen patients for ALVD before time-consuming echocardiographic confirmation of the disease.

Results

Patient Inclusions

All the 294 subjects underwent transthoracic echocardiography for left ventricular ejection fraction (LVEF) assessment (**Fig. 1**). Healthy volunteers (HI) without cardiovascular risk or echocardiographic abnormalities were recruited from the general population. Individuals with cardiovascular risk factors and normal left ventricular ejection fraction (RF) and individuals with cardiovascular risk factors and asymptomatic abnormal left ventricular ejection fraction (ALVD) were from the atherosclerosis prevention center. Patients with stable systolic chronic heart failure (CHF) were recruited from the cardiology department at Rangueil Hospital, Toulouse. We used a threshold value of $LVEF < 45\%$ to sort individuals into 4 groups: HI, RF with $LVEF \geq 45\%$, ALVD, and CHF with $LVEF < 45\%$. We identified 9 ALVD cases out of the 128 subjects tested with cardiovascular risk factors. The set of cardiovascular risk factors used to match the study groups were determined based on the characteristics of the ALVD subjects ($n = 9$): mean age 58 years old, 78% male, 44% hypertensive, 33% diabetes, 44% obesity, 56% dyslipidemia and 22% heredity. We defined two comparative groups: 1- (RF) individuals with cardiovascular risk factors and normal left ventricular ejection fraction ($62 < LVEF < 81\%$); 2- (ALVD) individuals with cardiovascular risk factors and systolic ALVD ($32 < LVEF \leq 44\%$). Two additional groups were used as controls: 3- (HI, negative control) Healthy volunteers without cardiovascular risk or echocardiographic abnormalities and 4- (CHF, positive control) patients with chronic stable systolic heart failure ($18 < LVEF < 44\%$). Moreover, all individuals were extensively phenotyped to check for clinical and biochemical parameters. Medications and biochemical data were not significantly different between comparative groups (RF and ALVD) (**Table 1**).

BNP Measurements

Healthy individuals had plasma BNP levels within the range 11 ± 9 pg/ml. Plasma BNP levels were not statistically different

between ALVD (27 ± 23 pg/ml) and RF (15 ± 10 pg/ml) patients, but were significantly increased in CHF (164 ± 151 pg/ml) (**Table 1**).

ALVD predictive model based on white blood cell transcriptome

We used the RNG-MRC 25k human pangenomic glass microarrays from the National Genopole Network to analyze blood gene expression of 25,341 genes. An unsupervised PCA analysis of the expression data was able to cluster patients into their respective groups: HI, RF, ALVD and CHF (**Fig. 2**) and revealed that blood gene expression profiles provide a molecular signature characteristic of ALVD. In order to build an ALVD predictive model, we used the nearest centroid classification method (NCCM) from the ClaNC software package [16]. NCCM provided a set of genes whose expression profile led to a 100% successful classification of ALVD patients out of the 4 groups of individuals. We further tested the strength of our model of gene expression-based group prediction by leave-one-out cross-validation method [17]. The classifier model accuracy and precision computed from the confusion matrix (**Table 2**) were 83% and 78%, respectively. The Fisher's exact test P -value ($n = 18$, $P = 0.015$) pointed out the robustness of the model.

Additional ALVD patient group validation

In addition to our original patient cohort, we obtained blood samples from 8 additional ALVD and 8 RF individuals not matched for cardiovascular risk factors. These additional subjects fulfilled the ALVD parameter definition as they were in NYHA I class with an $EF < 45\%$, lacked HF symptoms, had low plasma BNP levels (25 ± 11 pg/ml) which was not significantly different from the initial ALVD group ($P = 0.87$) (**Table 3**). White blood cell gene expression analysis further validated using the ClaNC ALVD predictive model which gives 75% of true positive rate and 100% of true negative rate. Thus, the accuracy and precision of the prediction were 87% and 100%, respectively (Fisher's exact test P -value = 0.007; $n = 16$).

Discriminant genes

ClaNC defined a set of discriminant genes for the ALVD group including ALK, SLC43A2, NGFB, FBXW7, TMEM79, UBN1 and FECH (**Table 4**). SAM software analysis revealed that these genes were significantly differentially expressed between RF and ALVD with a false discovery rate ranging between 1.4 and 3.2 which is below 5%, a value generally used in transcriptome studies and is indicative of good reliability of the differential expression of these genes. Moreover, differential expression of these 7 genes in white blood cells from RF and ALVD groups was confirmed by realtime qPCR (**Figure S1**). Using human heart samples (right appendage) from patients undergoing coronary by-pass during heart surgery, we observed a similar regulation (induction or repression) that was statistically significant for 3 genes (UBN1, NGF, FECH) when comparing gene expression levels in the no HF vs the CHF group. ALK expression displayed a tendency to be increased in heart from heart failure patients but the difference was not statistically significant ($p = 0.15$) (**Figure S2**).

Moreover, Ingenuity's Pathway Analysis revealed that three genes encoded membrane proteins: the kinase ALK, TMEM79 and SLC43A2. FECH is a mitochondrial protein and FBXW7 encodes a cytoplasmic component of E3 ubiquitin protein ligase, which regulates the proteolytic machinery. UBN1 is a transcription factor involved in the formation of senescence-associated heterochromatin foci. NGFB (Nerve Growth Factor Beta) is a

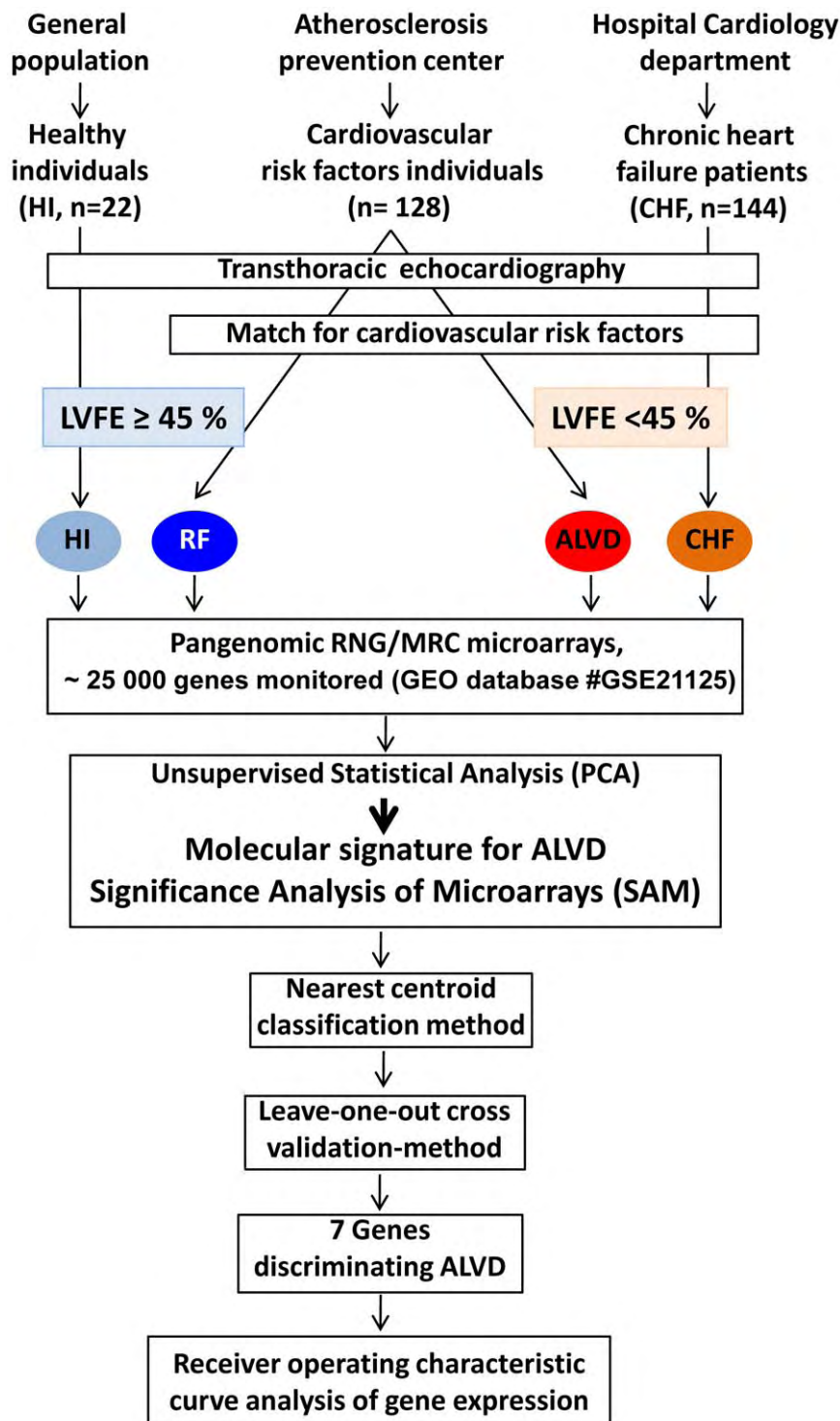


Figure 1. Flow chart of recruitment protocol involving 294 subjects and overall study design. Healthy volunteers (HI) were recruited from the general population, individuals with cardiovascular risk factors (RF) were from the atherosclerosis prevention center and patients with chronic heart failure (CHF) were recruited from the cardiology department at Rangueil Hospital, Toulouse. All subjects underwent transthoracic echocardiography for left ventricular ejection fraction (LVEF) assessment. We used a threshold value of $LVEF < 45\%$ to sort individuals into 4 groups: HI (light blue), RF with $LVEF \geq 45\%$ (dark blue), ALVD (red), and CHF (orange) with $LVEF < 45\%$. We identified 9 ALVD cases out of the 128 subjects tested with cardiovascular risk factors. We used the set of cardiovascular risk factors (age, gender, arterial hypertension, diabetes, obesity, dyslipidemia and heredity) based on the characteristics of the ALVD subjects to match the study groups ($n=9$). White blood cell gene expression profiling was performed using pangenomic microarrays for all 4 groups. Data were statically analyzed using unsupervised primary component analysis (PCA) and by Significance Analysis of Microarrays (SAM) software which defined the false discovery rate. Then to build an ALVD classifier model, we used the nearest centroid classification method (NCCM) with the ClaNC software package. Classification performance was determined using the leave-one-out cross-validation method. Expression levels of 7 genes capable of discriminating ALVD were compared between the 4 groups and each gene's capability to discriminate patients with $LVEF < 45\%$ was evaluated using Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis.
doi:10.1371/journal.pone.0020414.g001

Table 1. Cardiovascular risk factors, clinical and biochemical parameters of study groups.

Groups	HI	RF	ALVD	CHF
Age (years)	55 (72-45)	55 (69-38)	58 (84-31)	55 (83-23)
Male %	78	78	78	67
Hypertensive %	0	44	44	44
Diabetes %	0	33	33	33
Obesity %	0	44	44	56
Dyslipidemia %	0	56	56	44
Heredity %	0	33	22	11
BMI	24±3	28±3	29±4	30±5
Systolic blood pressure (mm Hg)	128±16	138±12	123±17	124±19
Diastolic blood pressure (mm Hg)	81±9	80±14	75±12	76±9
Heart rate	64 (45-86)	64 (57-72)	70 (54-87)	78 (60-102)
Medications				
Statines %	0	22	55	44
β Blockers %	0	11	44	78 ⁼
ARBs or ACEIs %	0	48	55	88 ⁼
Labs (means ± s.d.)				
BNP (pg/ml)	11±9	15±10	27±23	164±151 [§]
Na ⁺ (mM)	140±1	140±1	139±2	138±4
creatinine (μM)	80±6	83±9	96±23	126±73
Hb (g/dl)	14.7±1.1	14.3±1.1	14.1±1.8	13.4±1.8
Leukocytes (cells/μl)	5735±1225	6159±1433	6765±1533	8571±2734
Lymphocytes (cells/μl)	1865±412	1988±428	1918±499	1898±677
Neutrophils (cells/μl)	3498±898	3630±1073	4107±1153	6049±2619
Echocardiography				
LVEF %	73 (65-81)	71 (62-81)*	39 (32-44)	33 (18-44)
LVEDD (mm)	48 (53-44)	49 (53-42)*	61 (66-48)	61 (64-56)
Shortening fraction %	39 (44-30)	37 (45-28)*	23 (27-18)	20 (35-8)

Proportion of individuals with the indicated risk factor for each of the 4 groups of the study are indicated as percentages or averaged value:- HI, Healthy volunteers without cardiovascular risk or echocardiographic abnormalities; RF, individuals with cardiovascular risk factors and normal left ventricular ejection fraction (LVEF); ALVD, asymptomatic left ventricular dysfunction individuals with cardiovascular risk factors and abnormal left ventricular ejection fraction; CHF, Patients with chronic stable systolic heart failure. All individuals were extensively phenotyped to check for clinical and biochemical parameters. Family history of coronary artery disease is defined as a family history of coronary event before 55 years in men and/or 65 years in women occurring in first degree relatives.

*indicates $P < 0.05$ for statistical comparison between RF and ALVD groups.

[§]indicates $P < 0.05$ for statistical comparison between ALVD and CHF groups. BNP, B-type natriuretic peptide. ARBs: angiotensin receptor blockers. ACEIs: angiotensin converting enzyme inhibitors.

[†]indicates $P < 0.05$ for statistical comparison between groups. LVEDD: left ventricular end-diastolic diameter. LVESD: left ventricular end-systolic diameter. Shortening fraction % = $(LVEDD - LVESD) / LVEDD \times 100$.

doi:10.1371/journal.pone.0020414.t001

pleiotropic neurotrophin discovered over 50 years ago and involved in the development, maintenance of function and regeneration of nerve cells in the heart [18].

We next looked for the pertinence of each of these genes with respect to ALVD subject classification. Box-and-whisker plots, which depict variations in gene expression levels, showed that expression of NGFB, TMEM79 and FBXW7 was significantly down-regulated in ALVD group (**Fig. 3Aa, b, c**), whereas FECH, ALK, UBN1 and SLC43A2 expression were significantly increased in ALVD cases (**Fig. 3Ad, e, f, g**).

A series of ROC curves were created for each of the proposed discriminant genes as related to the incidence of left ventricular dysfunction (LVEF < 45%) (**Fig. 3B**). Six genes out of seven (NGFB, TMEM79, FECH, FBXW7, ALK, UBN1) statistically differed from the null hypothesis ($p < 0.005$ or $p < 0.0001$, **Table 5**) and provided a good discrimination (no overlap in the two

distributions). The area under the curve (AUC), ranged from 0.78 to 0.92 for predicting left ventricular dysfunction. Only the SLC43A2 gene harbored a weak AUC (0.59) and was a poor predictor ($p = 0.35$; **Table 5**).

Discussion

Epidemiological echocardiographic studies, have revealed that ALVD has a prevalence of 0.9 to 12.9%, depending on the definition of the threshold value for LVEF (<30% up to <54%) and the population studied [2,19,20,21,22]. We used a threshold value of LVEF < 45% to screen for truly asymptomatic subjects in a population possessing cardiovascular risk factors and found an ALVD prevalence of 7% (9 ALVD out of 128 subjects tested with cardiovascular risk factors), in line with values reported in previous works (6.7%) [2].

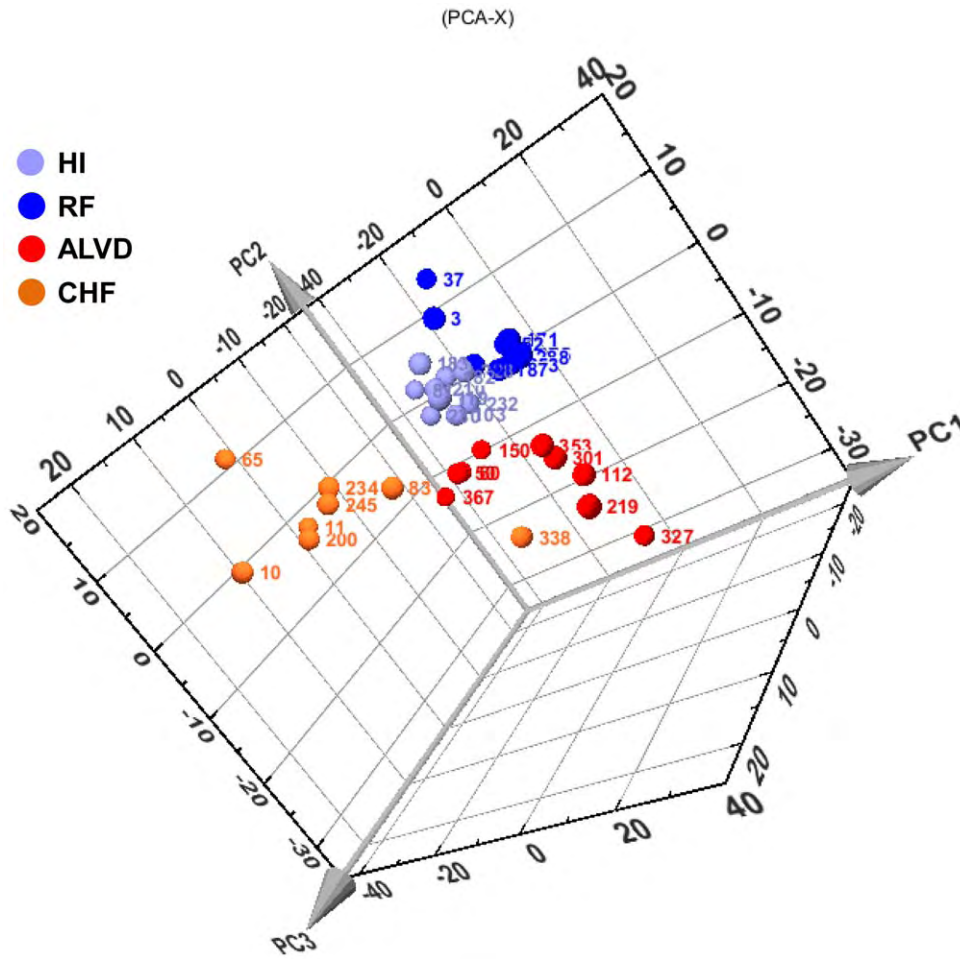


Figure 2. Unsupervised primary component statistical analysis (PCA) of blood transcriptome data reveals a molecular signature for ALVD. Three dimensional plot of the three first components(PC1, PC2, PC3) of the blood gene expression data from healthy subjects (HI, light blue), cardiovascular risk factor individuals (RF, dark blue), individuals with asymptomatic left ventricular dysfunction groups (ALVD, red) and chronic heart failure patients (CHF, orange). These three components can classify subjects according to their group and distribute the subjects in grouped locations in the defined space. Numbers in colors indicate subjects' identities. The relative expression level used is defined by the ratio obtained with the tested sample to the signal obtained using the common reference, an equimolar mix of all the RNA used to generate a reference signal. doi:10.1371/journal.pone.0020414.g002

Natriuretic peptides, B-type natriuretic (BNP) and N-terminal-proBNP (NT-ProBNP), released from the heart in response to pressure and volume overload, have become the main biomarkers for assessing HF (reviewed in [23]). BNP was shown to be of limited use in the detection of ALVD in diabetic patients [24]. While the negative predictive value of NT-ProBNP was 96 to 100% [25,26], its positive

predictive value ranged from 6 to 33%, which limited its use in ALVD detection [25,26]. In our study, ALVD individuals (test and validation groups together) had plasma BNP levels within the physiological range [23] : $(26 \pm 18 \text{ pg/ml}; n = 17)$. As generally observed in CHF patients, the symptomatic and positive controls of this study, BNP levels were significantly increased $(164 \pm 151 \text{ pg/ml})$. These values, in accordance with Daniels and Maisel [23], confirm that the ALVD subjects selected in this study are truly asymptomatic individuals. Since BNP levels could not be used satisfactorily for ALVD detection within our subjects, we attempted to find new biomarkers using holistic approaches. Considering DNA microarrays are powerful tools allowing for large scale screenings, we used the RING-MRC 25k human pangenomic glass microarrays from the National Genopole Network to analyze blood gene expression of 25,341 genes. An unsupervised Principal Component Analysis (PCA) of the global gene expression data clustered individuals into their respective groups (HI, RF, ALVD and CHF) and revealed a molecular signature characteristic of ALVD. Since it is difficult to define gene sets belonging to each clusters in most implementation of PCA [27] and in order to build an ALVD classifier model, we used the nearest centroid classification method (NCCM) which provides

Table 2. Leave-one-out's confusion matrix.

	ALVD Individuals	RF Individuals
Classified as LVEF<45	(true positive) 78%	(false positive) 11%
Classified as LVEF≥45%	(false negative) 22%	(true negative) 89%

Classification performance of the nearest centroid classifier was determined using leave-one-out cross-validation method. Calculation of the classifier model accuracy and precision by standard formulae provided 83% and 78%, respectively. Fisher's exact test *P*-value ($n = 18$) $P = 0.015$. doi:10.1371/journal.pone.0020414.t002

Table 3. Cardiovascular risk factors, clinical and biochemical parameters of the ALVD validation group (n = 8) and RF individuals (n = 8).

Groups	ALVD Individuals	RF
LVEF %	39 (20-45)	74 (65-81)*
Age (years)	63 (75-40)	67 (83-55)
Male %	87	100
Hypertensive %	62	37
Diabetes %	12	25
Obesity %	0	12
Dyslipidemia %	50	37
Heredity %	-	0
BMI	25 ± 3	28 ± 5
Systolic blood pressure (mm Hg)	144 ± 19	145 ± 12
Diastolic blood pressure (mm Hg)	82 ± 10	86 ± 8
Labs (mean ± s.d.)		
BNP (pg/ml)	25 ± 11	14 ± 9
Na⁺ (mM)	140 ± 2	140 ± 1
creatinine (μM)	110 ± 38	92 ± 12
Hb (g/dl)	14.0 ± 0.9	14.4 ± 0.4
Leukocytes (cells/μl)	6043 ± 1041	6682 ± 1360
Lymphocytes (cells/μl)	1433 ± 332	1959 ± 700
Neutrophils (cells/μl)	3975 ± 744	3049 ± 668

*indicates $P < 0.05$ for statistical comparison between RF and ALVD validation groups.

doi:10.1371/journal.pone.0020414.t003

an accurate predictor [16]. NCCM defined a set of 7 genes whose expression profile led to the classification of ALVD subjects out of the four groups of individuals. We further tested the strength of our model of gene expression-based group prediction by leave-one-out cross validation, a technique recognized for its small bias [17], which utilizes a single observation from the original sample as the validation data and the remaining observations as the training data. The confusion matrix from the leave one-out cross-validation results, led us to conclude that the defined pool of genes efficiently classifies ALVD subjects. Moreover, the test of additional patients included in an ALVD patient validation group showed that the accuracy (87%) and the precision (100%) of the gene expression based predictive model were close to the ones determined by leave-one-out cross-validation (88 and 78% for accuracy and precision, respectively).

Table 4. ClANC defined set of 7 discriminant genes for ALVD.

Gene symbol	Ensembl accession number	Full gene name	Protein location
ALK	ENSG00000171094	Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase	plasma membrane
SLC43A2	ENSG00000167703	Solute carrier family 43, member 2	plasma membrane
NGFB	ENSG00000134259	Nerve growth factor (beta polypeptide)	Extracellular space
FBXW7	ENSG00000109670	F-box and WD repeat domain containing 7	Nucleus; cytoplasm
TMEM79	ENSG00000163472	Transmembrane protein 79	plasma membrane
UBN1	ENSG00000118900	Ubinuclein 1	Nucleus
FECH	ENSG00000066926	Ferrochelatase	Mitochondrion

Gene symbol, Ensembl accession number, full gene name and protein location, as provided by Ingenuity's Pathway Assist software, are indicated.

doi:10.1371/journal.pone.0020414.t004

Interestingly, the decrease in NGFB gene expression that we observed in white blood cells was previously reported in both human and experimental heart failure [28]. Our data suggest that NGFB down-regulation could occur earlier in blood, in pre-heart failure state. Moreover, SAM analysis revealed significant overexpression EGR1 and CCR2 genes in CHF group (data not shown) in agreement with previous report [13].

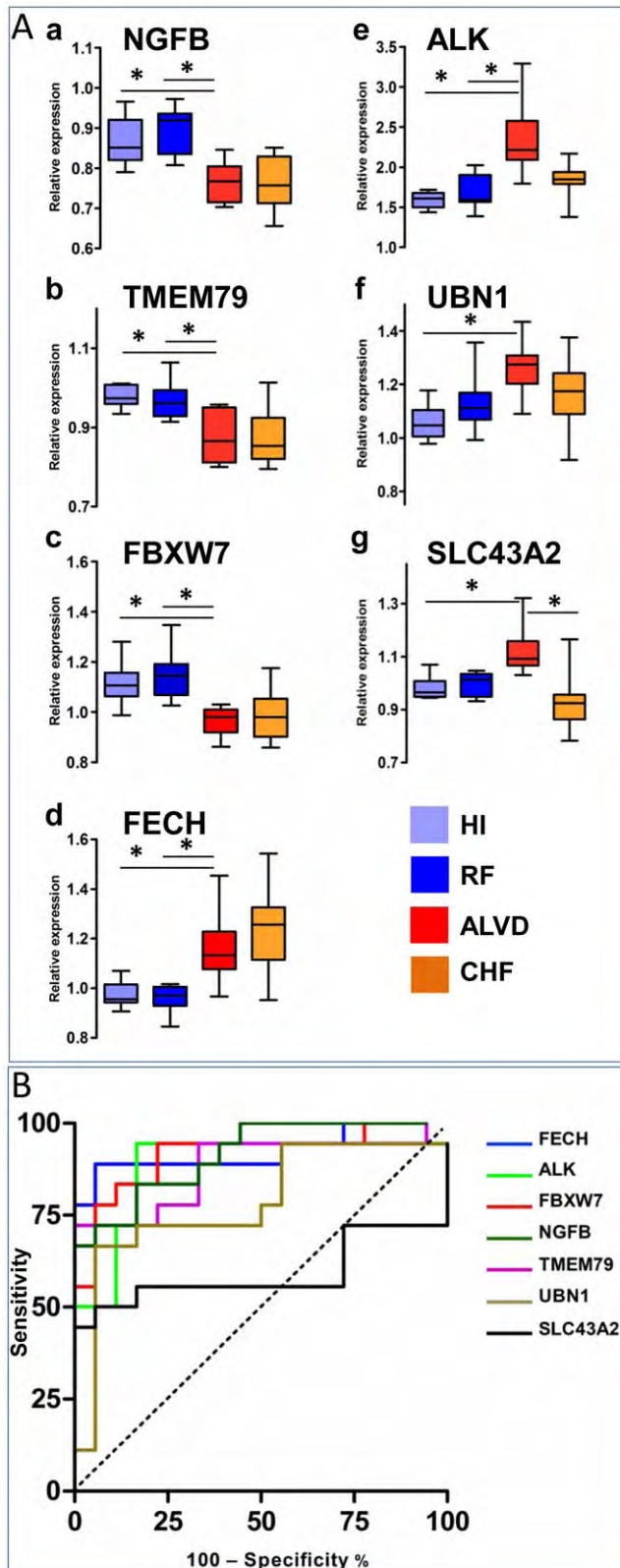
UBN1, NGF and FECH genes displayed similar statistically significant regulation (up or down regulated) in hearts samples from heart failure patients (Figure S2) but expression of the three remaining genes (TMEM79, FBXW7 and SLC43A2) could not be quantified, probably because of their low expression in heart. This is in accordance with other studies showing that white blood cells express a large number of heart genes but not all [15] and that some genes expressions regulations in heart are also observed in white blood cells which might serve as surrogate markers for heart failure [14].

The data presented in this paper has the potential to provide tools for ALVD screening. We have chosen to match cardiovascular risk factors within comparative groups (RF and ALVD), which limited the number of blood samples used in the analysis, but also resulted in the determination of an ALVD blood transcriptome signature as well as the elucidation of putative marker genes. One advantage of this prospective monocenter study is that the microarrays and clinical data quality were homogeneous. Gene expression analysis has recently undergone a tremendous evolution and could before long be carried out in a routine clinical setting (outpatient department, general practice) which would represent a cost effective method to identify ALVD subjects and prevent HF development. We anticipate that large screen of population at risk for ALVD examined by primary-care physician could be screened at low cost by blood microfluidic qPCR and if positive for ALVD would be addressed to echocardiography for ALVD confirmation. This strategy would identify subject in the early phase of this silent disease and prevent them from being symptomatic by early medication and appropriate lifestyle-related advices.

Materials and Methods

Study design and population

The present study was conducted with 294 individuals (Healthy volunteers (HI, n = 22), arteriosclerosis prevention (individuals with cardiovascular risk factors, n = 128) and cardiology departments (patients with chronic stable heart failure (CHF, n = 144) at the French Medical University Hospital of Toulouse (Fig. 1 and Table 1). All patients underwent echocardiography and left ventricular ejection fractions (LVEF) were determined by contour



used to generate a reference signal. The box plot presents the median, lower and upper quantiles (25th, 75th percentiles) lower and upper whiskers represent the 10th and 90th percentiles. * $P < 0.05$ where indicated, estimated by one-way ANNOVA. B. Receiver-operating characteristic (ROC) analysis of ALVD discriminant genes using HI with RF (LVEF $\geq 45\%$ as disease free) and ALVD with CHF (LVEF $< 45\%$ as left ventricular dysfunction) groups. Area under curve (AUC), confidence interval and P values to find an AUC value of 0.5 (null hypothesis) for each gene are depicted in **Table 5**. ROC curves for each of the 7 genes are displayed on a single figure. With the exception of SLC43A2, ALVD discriminant genes are also CHF biomarkers *i.e.* left ventricular dysfunction biomarkers.
doi:10.1371/journal.pone.0020414.g003

analysis using the two-dimensional Simpson’s method [29]. According to the European guidelines [30], left ventricular systolic dysfunction was defined by a LVEF $< 45\%$. We defined two comparative groups: 1- (RF) individuals with cardiovascular risk factors and normal left ventricular ejection fraction; 2- (ALVD, $n = 9$) individuals with cardiovascular risk factors and systolic ALVD.

Right ventricular function was evaluated during the echocardiography examination with the tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) index and/or the S-wave velocity, patients presenting a TAPSE index < 16 mm and/or a S-wave < 10 cm/s were excluded from the study. Two additional groups were used as controls: 3- (HI, $n = 22$) Healthy volunteers without cardiovascular risk or echocardiographic abnormalities and 4- (CHF, $n = 144$) Patients with chronic stable systolic heart failure. CHF etiology was 33% ischemia, 11% arterial hypertension, 11% valvular disease, 44% dilated idiopathic cardiomyopathy. Atrial fibrillation was found in 33% of CHF patients. Exclusion criteria were presence of infarct or recent angor (< 6 months), infiltrative cardiomyopathy, cerebral vascular event, kidney failure, liver failure, blood disease, ongoing cancer or cured since 5 years or less, toxicomania and alcohol abuse, psychiatric disorders and participation to a clinical trial within the last 30 days. Using SAS software, we defined groups of 9 subjects perfectly matched to the ALVD group for HF risk factors such as age, gender, arterial hypertension, diabetes, obesity, dyslipidemia and heredity. BNP was assessed using the Centaur Bayer kit (Bayer HealthCare, France) and a Centaur (Siemens, France) hospital automat as recommended by the manufacturers. This research protocol was approved by the institutional review boards and ethics committee. All participants gave written informed consent (ClinicalTrials.gov number: NCT01024049).

Table 5. ROC curve statistical data.

Gene	AUC	95% CI	P value
NGFB	0.91	0.82–1.00	< 0.0001
TMEM79	0.88	0.76–1.00	< 0.0001
FBXW7	0.91	0.81–1.01	< 0.0001
FECH	0.92	0.82–1.02	< 0.0001
ALK	0.88	0.76–1.00	< 0.0001
UBN1	0.78	0.62–0.94	$= 0.0036$
SLC43A2	0.59	0.38–0.80	$= 0.3589$

Area under curve (AUC), 95% confidence interval (CI) and P values are indicated.
doi:10.1371/journal.pone.0020414.t005

Human heart samples

After ethical committee approval, all patients included in the sub-study gave their informed consent for sample collection and molecular analysis prior to their inclusion. Patients were carefully selected by the physicians from Department of Cardiology, Toulouse University hospital prior to cardiac surgery for coronary by-pass due to coronary disease. Samples from right auricle appendages were collected from the department of cardiovascular surgery of Toulouse University Hospital at the beginning of cardiac surgery and were of extra corporeal circulation. Samples were immediately washed in cold buffer, snap frozen in liquid nitrogen and maintained at -80°C until analysis. Total RNA was isolated from the myocardium by using TRIzol reagent (Invitrogen, France) as described by the manufacturer. RNA integrity was checked by capillary electrophoresis using an Experion (Biorad) apparatus.

Microarrays Analysis

We collected blood samples in 8 ml BD CPT vacutainer tubes that were processed immediately after collection according to the manufacturer's protocol. Total RNA was purified from collected white blood cells using the RNeasy kit (Qiagen) in a Qiacube (Qiagen) automated protocol. Total RNA integrity was checked by capillary electrophoresis (Experion, Bio-Rad). Samples with RNA Quality Indicator $\geq 8.5/10$ were selected for analysis. Total RNAs were precisely quantified using RiboGreen and a VictorTM X5 2030 multilabel reader (Perkin Elmer). Total RNA (300 ng) were used for fluorescent labeling (QuickAmp Labeling, Agilent). Fluorescent RNAs were further purified on RNeasy columns. We used a pooled reference sample as a common reference for all hybridizations [31]. Labeled RNA were hybridized to human pangenomic glass microarrays from the consortium Reseau National des G enopole France and Medical Research Council, England; consisting of $\sim 25,000$ 51-mer oligonucleotide probes. After standard hybridization, glass arrays were washed on a Ventana robotized apparatus and scanned using a GenePix 4000 scanner (Axon). Scanned images were processed by X-dot reader software with operator validation. Microarray data were deposited in the GEO database (#GSE21125) and followed MIAME requirements.

Real time quantitative PCR analysis

Genomic DNA was removed from RNA samples by DNasefree kit according to the manufacturer protocol (Ambion). Reverse transcription was carried-out using 150 ng total RNA and Superscript III according to the manufacturer protocol (Invitrogen). Realtime quantitative PCR was performed in a MyiQ real time PCR detection system using Sybergreen and as previously described [32]. Oligos were synthesized by Eurogentec company and designed with PerlPrimer [33] and were as follow: hNGF forward, 5'-GAGGTGCATAGCGTAATGTC-3' and reverse 5'-TGCTGAAGTTTAGTCCAGTG-3'; hTMEM79 forward, 5'-CATCAAATGGGACTGTGGTG-3' and reverse 5'-TTAAAGGTGGGAAGTTACAGG-3'; hALK forward, 5'-AAGCTGTACTGTCCCACCTAAC-3' and reverse 5'-CATATTGGCAGTCAGCGAAGAG-3'; hFECH forward, 5'-AGTAGACTTTGAGTGACCGTCC-3' and reverse 5'-AAAGAAATTGAAGCAGGCCCTTG-3'; hUBN1 forward, 5'-AAATCAAGGTGAAGGAATCGTC-3' and reverse 5'-TCCTGTTTGGTGATCTGAG-3'; hFBXW7 forward, 5'-GGATTGATGAACCATTG-

CAC-3' and reverse 5'-ATGTTCTCAGACATTTGCCT-3'; hSLC43A2 forward, 5'-TTTGGTGGGATGTGTATGAC-3' and reverse 5'-CATAGAAGAGCTTGATTCCTG-3'; hGUS forward, 5'-CTCATTTGGAATTTTGCCGAT-3' and reverse 5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTT-3'. hGUS was used as a normalization gene since its expression did not significantly fluctuate between groups in this study.

Statistical Analysis

Data normalization was performed in $\langle\langle R \rangle\rangle$ (<http://www.r-project.org/index.html>) and the bioconductor package limma. Two-color GenePix files were normalized within arrays using the "loess" method and between arrays with "Rquantile" normalization. Five groups of 9 samples were established and used to calculate p-values with respect to the analysis of variance (aov) within each group. Log-ratios were extracted for probes in which the aov p-value was less than or equal to 0.001, resulting in 1055 probes before unsupervised statistical analysis by principal component analysis (PCA) with SIMCA P⁺ software (Umetrics). Class prediction was done with the nearest centroid method using ClaNC software, which is known to make the classifier more accurate by reducing the effect of noisy genes [16]. Significance Analysis of Microarrays (SAM) computed by SAM 3.0 software which can compute the false discovery rate (FDR) for the differentially expressed genes was used as "power analysis" [34]. ROC curve analysis was performed using MedCalc software (www.medcalc.be). Continuous variables are presented as mean \pm SD and categorical as numbers and percentages. Continuous variables were compared with the use of Student's *t*-test or Mann-Whitney rank sum test when normality or equal variance test failed. Categorical variables were compared with the use of the Pearson chi-square (sigma stat) otherwise specified in the text.

Supporting Information

Figure S1 Realtime qPCR analysis of white blood cell genes expression. RF: cardiovascular risk factors patients; ALVD: asymptomatic left ventricular dysfunction individuals. Arbitrary units are indicated (A.U.) after normalisation to the reference gene. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in Student's *t* test. (TIF)

Figure S2 Realtime qPCR analysis of genes expression in human heart. Cont: Control patients without heart failure; CHF: Chronic heart failure patients. Arbitrary units are indicated (A.U.) after normalisation to the reference gene. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in Student's *t* test. (TIF)

Acknowledgments

We thank the Toulouse genopole platform for microarrays processing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FK MG PR. Performed the experiments: FS MB AT RH CT CD AP OL PM JF. Analyzed the data: FD JI. Contributed reagents/materials/analysis tools: JF. Wrote the paper: FS FD AP MG PR.

References

- Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, et al. (2009) Heart disease and stroke statistics—2009 update: a report from the

American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119: e21–181.

2. Gottdiener JS, McClelland RL, Marshall R, Shemanski L, Furberg CD, et al. (2002) Outcome of congestive heart failure in elderly persons: influence of left ventricular systolic function. The Cardiovascular Health Study. *Ann Intern Med* 137: 631–639.
3. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, et al. (2009) 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 119: e391–479.
4. McMurray JV, McDonagh TA, Davie AP, Cleland JG, Francis CM, et al. (1998) Should we screen for asymptomatic left ventricular dysfunction to prevent heart failure? *Eur Heart J* 19: 842–846.
5. Wang TJ, Levy D, Benjamin EJ, Vasan RS (2003) The epidemiology of “asymptomatic” left ventricular systolic dysfunction: implications for screening. *Ann Intern Med* 138: 907–916.
6. Verdecchia P, Angeli F, Gattobigio R, Sardone M, Porcellati C (2005) Asymptomatic left ventricular systolic dysfunction in essential hypertension: prevalence, determinants, and prognostic value. *Hypertension* 45: 412–418.
7. Sharpe N, Murphy J, Smith H, Hannan S (1990) Preventive treatment of asymptomatic left ventricular dysfunction following myocardial infarction. *Eur Heart J* 11 Suppl B: 147–156.
8. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Jr., et al. (1992) Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 327: 669–677.
9. Hobbs FD, Roalfe AK, Davis RC, Davies MK, Hare R (2007) Prognosis of all-cause heart failure and borderline left ventricular systolic dysfunction: 5 year mortality follow-up of the Echocardiographic Heart of England Screening Study (ECHOES). *Eur Heart J* 28: 1128–1134.
10. (1992) Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med* 327: 685–691.
11. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, et al. (2003) Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1896–1901.
12. Yndestad A, Damas JK, Geir Eiken H, Holm T, Haug T, et al. (2002) Increased gene expression of tumor necrosis factor superfamily ligands in peripheral blood mononuclear cells during chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 54: 175–182.
13. Cappuzzello C, Napolitano M, Arcelli D, Melillo G, Melchionna R, et al. (2009) Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiol Genomics* 38: 233–240.
14. Seiler PU, Stypmann J, Breithardt G, Schulze-Bahr E (2004) Real-time RT-PCR for gene expression profiling in blood of heart failure patients—a pilot study: gene expression in blood of heart failure patients. *Basic Res Cardiol* 99: 230–238.
15. Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA (2006) The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med* 147: 126–132.
16. Dabney AR (2006) ClANC: point-and-click software for classifying microarrays to nearest centroids. *Bioinformatics* 22: 122–123.
17. Varma S, Simon R (2006) Bias in error estimation when using cross-validation for model selection. *BMC Bioinformatics* 7: 91.
18. Caporali A, Emanuelli C (2009) Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiol Rev* 89: 279–308.
19. McDonagh TA, Morrison CE, Lawrence A, Ford I, Tunstall-Pedoe H, et al. (1997) Symptomatic and asymptomatic left-ventricular systolic dysfunction in an urban population. *Lancet* 350: 829–833.
20. Mosterd A, Hoes AW, de Bruyne MC, Deckers JW, Linker DT, et al. (1999) Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 20: 447–455.
21. Davies M, Hobbs F, Davis R, Kenkre J, Roalfe AK, et al. (2001) Prevalence of left-ventricular systolic dysfunction and heart failure in the Echocardiographic Heart of England Screening study: a population based study. *Lancet* 358: 439–444.
22. Wang TJ, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, LeRoy EC, et al. (2003) Natural history of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction in the community. *Circulation* 108: 977–982.
23. Daniels LB, Maisel AS (2007) Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 50: 2357–2368.
24. Fang ZY, Schull-Meade R, Leano R, Mottram PM, Prins JB, et al. (2005) Screening for heart disease in diabetic subjects. *Am Heart J* 149: 349–354.
25. Betti I, Castelli G, Barchielli A, Beligni C, Boscherini V, et al. (2009) The role of N-terminal PRO-brain natriuretic peptide and echocardiography for screening asymptomatic left ventricular dysfunction in a population at high risk for heart failure. The PROBE-HF study. *J Card Fail* 15: 377–384.
26. Luers C, Wachter R, Kleta S, Uhlir M, Koschack J, et al. Natriuretic peptides in the detection of preclinical diastolic or systolic dysfunction. *Clin Res Cardiol* 99: 217–226.
27. Quackenbush J (2001) Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* 2: 418–427.
28. Kaye DM, Vaddadi G, Gruskin SL, Du XJ, Esler MD (2000) Reduced myocardial nerve growth factor expression in human and experimental heart failure. *Circ Res* 86: E80–84.
29. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, et al. (1989) Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* 2: 358–367.
30. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, et al. (2008) ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail* 10: 933–989.
31. Konig R, Baldessari D, Pollet N, Niehrs C, Eils R (2004) Reliability of gene expression ratios for cDNA microarrays in multiconditional experiments with a reference design. *Nucleic Acids Res* 32: e29.
32. Philip-Couderc P, Pathak A, Smith F, Dambrin C, Harmancey R, et al. (2004) Uncomplicated human obesity is associated with a specific cardiac transcriptome: involvement of the Wnt pathway. *Faseb J* 18: 1539–1540.
33. Marshall OJ (2004) PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20: 2471–2472.
34. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5116–5121.

Article 2: Metabonomic analyses of plasma reveal lactate to cholesterol ratio as an independent prognostic factor of short-term mortality in acute heart failure

Franck Desmoulin · Michel Galinier · Charlotte Trouillet · Matthieu Berry · Clément Delmas
Annie Turkieh · Pierre Massabuau · Heinrich Taegtmeier · Fatima Smih · Philippe Rouet

INSERM I2MC, UMR 1048, Université UPS, Equipe «Obésité et insuffisance cardiaque: approches moléculaires et cliniques », F-31432 Toulouse, France.

CHU de Rangueil, Service de Cardiologie A, F-31432 Toulouse, France

Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, University of Texas Medical School at Houston, Houston, Texas 77030, USA.

Soumis à Journal of cardiac failure

L'insuffisance cardiaque aigue (ICA) est l'une des causes fréquentes d'hospitalisation des individus ayant un âge supérieur à 65 ans. Bien que le traitement de l'ICA soit en progression, 13% des patients meurent entre le moment d'entrée à l'hôpital et deux semaines après l'hospitalisation (Cleland et al, 2003).

Les « Brain natriuretic peptides » (BNPs) (Daniels & Maisel, 2007) sont synthétisés, sous forme de précurseurs « ProBNP », essentiellement dans la paroi ventriculaire et sont sécrétés sans stockage. Cette synthèse est très faible et devient importante en situations pathologiques. Une fois sécrété, le ProBNP est clivé en 2 formes : une active, le « BNP » et une inactive, le « NT-ProBNP ». Les taux plasmatiques de ces 2 peptides sont élevés en cas d'insuffisance cardiaque et sont considérés comme un biomarqueur diagnostique et pronostique, actuellement le plus utilisé, de cette maladie. Au cours d'une hospitalisation pour décompensation (Logeart et al, 2004), la cinétique de décroissance du BNP ou le taux de BNP obtenu avant la sortie du patient, constituent un marqueur pronostique du devenir à court terme des patients après leur sortie (risque relatif augmenté par 5 et 15 pour des taux de BNP situés dans une fourchette de 350 à 700 pg/mL et supérieurs à 700 pg/mL respectivement). Ainsi, le dosage répété du BNP pendant l'hospitalisation ou avant la sortie du patient pourrait ainsi inciter le clinicien à renforcer le traitement ou le suivi immédiat chez les patients à haut risque, et à l'inverse, à autoriser une sortie plus rapide chez les autres. Cependant ce dosage présente certaines limitations: certaines études ont montré une variabilité très élevée malgré une certaine amélioration acquise avec la quantification de NT-ProBNP (van Kimmenade et al, 2006). Par conséquent, il est important de trouver un autre biomarqueur spécifique plus précis et plus stable.

Ainsi, une étude en collaboration avec le service de la cardiologie à hôpital Rangueil à Toulouse a été mise en place. Les plasmas de 126 patients ICA admis en unité de soins intensifs cardiaques ont été récoltés et la survie de ces patients 30 jours après hospitalisation a été évaluée. Une analyse métabonomique, par ^1H RMN, a été effectuée sur ces plasmas afin de trouver certains métabolites dont le taux plasmatique corrèle avec le risque de mortalité dans les 30 jours post-hospitalisation. Cette étude était basée sur des résultats montrant que le métabonome sanguin est modifié par le niveau de la sévérité de l'IC.

Metabonomic analyses of plasma reveal lactate to cholesterol ratio as an independent prognostic factor of short-term mortality in acute heart failure.

Short title :

Lactate/cholesterol ratio in acute heart failure

Franck Desmoulin, PhD,^{1,2} Michel Galinier, MD, PhD,^{1,2,3} Charlotte Trouillet, MD,^{1,3} Matthieu Berry, MD,^{1,2,3} Clément Delmas, MD,^{1,2,3} Annie Turkieh, PhD,^{1,2} Pierre Massabuau, MD,^{1,2,3} Heinrich Taegtmeier, MD, PhD,⁴ Fatima Smih, PhD,^{1,2} and Philippe Rouet, PhD^{1,2,3}

1 INSERM I2MC, UMR 1048, Equipe «Obésité et insuffisance cardiaque: approches moléculaires et cliniques », F-31432 Toulouse, France

2 Université Toulouse UPS, F-31432 Toulouse, France

3 CHU de Rangueil, Service de Cardiologie A, F-31432 Toulouse, France

4 Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, University of Texas Medical School at Houston, Houston, Texas 77030, USA.

Corresponding author :

Dr Philippe Rouet

Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires - I2MC INSERM UMR U1048

Equipe 7 "Obésité et insuffisance cardiaque: approches moléculaires et cliniques"

1 avenue Jean Poulhès BP 84225 31432 Toulouse Cedex 4. France.

Tel: +33 (0)5 61 32 34 83 Fax: +33 (0)5 61 32 20 84

E-mail: Philippe.rouet@inserm.fr

Sources of funding:

This work was supported by a Fédération Française de Cardiologie/Société Française de Cardiologie grant.

This work was not supported by any commercial funding.

Abstract

Background: Despite advances in treatment, mortality of acute heart failure (AHF) patients remains high within the first days of hospitalization. Prognosis biomarkers could be helpful to choose optimized treatments.

Methods and results: We conducted a prospective study on 126 AHF patients admitted in the cardiac intensive care unit and assessed survival at 30 days after hospital admittance. Venous plasma samples were used for without a priori ¹H-NMR-based metabonomic analysis to determine metabolites which have a high prognostic interest. Deceased patients presented high level of lactate concentration and low level of total cholesterol concentration at their admission. Lactate to cholesterol ratio provided the best accuracy with AUC: 0.82 (P < 0.0001). Cardiogenic shock state and lactate/cholesterol ratio \geq 0.4 (cutoff value with 82 % sensitivity and 64 % specificity) were significant independent predictors of 30-day mortality with hazards ratio of 6.99 and 3.20, respectively. In patients who had presented a cardiogenic shock, the HR of 30-days mortality risk for plasma lactate to cholesterol ratio \geq 0.4 was 3.26 compared to the one from lactate to cholesterol ratio < 0.4 (P = 0.018).

Conclusions: These data suggest that lactate to cholesterol ratio could be used for short-term prognosis of AHF mortality.

Key Words: Acute heart failure prognosis, lactate, cholesterol, Metabonomics

INTRODUCTION

Acute heart failure (AHF) is the most frequent cause of hospital admission among patients above 65 years old and a common presentation of seriously ill patients admitted to an intensive care unit. Despite advances in treatment, morbidity and mortality of AHF remain high ¹ as it is the case with the rate of rehospitalizations ². A survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe has shown a 13.5 % mortality between admission and 12 weeks follow-up ³. There is urgent special need for a simple test to identify patients with the higher mortality risk in order to optimize medical care.

Evaluation of heart failure patients includes a focused history, physical examination, an electrocardiogram and an echocardiogram. Altogether, these complementary approaches are aimed at better management strategies. Measurements of the biomarker brain natriuretic peptides (BNPs) are the most commonly used HF biomarkers associated with altered hemodynamics ⁴. BNPs are of both diagnostic and prognostic importance. Recently, BNPs levels at admission were shown to be significantly higher in patients that suffered a cardiac death within 3 months days of hospital discharge ⁵. However, blood BNPs level monitoring has limitations. Several reports have underlined their high variability despite some improvement gained with the quantification of amino-terminal pro-BNP ^{5,6}. Recently, positive serum cardiac troponin I was associated with high in-hospital mortality ⁷, reflecting heart muscle damage. However, the quest for prognostic biomarkers is an ongoing challenge because so far no blood molecule identified meets all the requirements of a perfect biomarker: adequate level of specificity and sensibility.

For the last decade the “omics” technology has gained in popularity for holistic screens of gene expression, proteins and metabolites ⁸⁻¹². The level of severity of the heart disease affects the blood metabolome ^{13, 14}. We hypothesized that the plasma metabolome could predict the short-term mortality. Thus, we conducted a study of the association of short-term outcomes with altered plasma metabolites levels on admission in hospitalized patients with acute heart failure. A ¹H NMR based metabolomic approach has been chosen mainly because of the ¹H NMR capability to detect hydrophilic and lipophilic metabolites without hyphenated separation techniques. Metabolic profiling was performed at hospital admittance and led us to identify metabolites associated with the 30 days mortality outcome of patient admitted for AHF. Moreover, we sought to evaluate the 30 days predictive power of these metabolites.

METHODS

Ethics statement

This research protocol was approved by the institutional review boards and ethics committee. Written informed consent was obtained from all participants and/or their legally authorized representatives.

Study design

We conducted a prospective study on 126 consecutive patients with AHF admitted to the cardiac intensive care unit (ICU) at Rangueil Hospital, Toulouse, France, between January 2008 and April 2009. Inclusion criteria was diagnosis of AHF based on echocardiography examination data according to the guidelines. Exclusion criteria were: stroke or angina within last 6 months; estimated creatinine clearance > 30 mL/min or a creatinemia < 150 μ mol/l; acute or chronic hepatic failure (alanine aminotransferase, aspartate amino transférase or glutamate oxaloacetic transaminase > 5 times the upper regular limits); history for alcohol abuse or drug addiction; hematological pathology (myelodegenerative syndrome, severe anemia (Hb < 8g / 100ml), severe neutropenia (neutrophil count < 1000 cells / μ l), thrombocypenia (platelet count < 7500 plts/ μ l); cancer or a diagnosis of cancer within 5 years; history of recent or current drug or alcohol abuse; or participation in any clinical trial within 30 days prior to admission. Baseline demographics; admission vital signs; clinical history; assessment of cardiovascular risk factors and admission medication were collected on ICU admission and recorded in a dedicated database. Biochemical data including a BNP concentration was determined at baseline upon ICU admission. Chest radiography and echocardiography and electrocardiography examinations were carried out within the 6 hours following the admission. Venous blood sample was withdrawn in the morning hours after an overnight fast and within 24 hours following the ICU admission.

Outcome and Follow-up

The outcome was 30-days cardiovascular mortality. Survival status was assessed through hospital records at 30 days for patients who were still hospitalized at this time point. Survival status of outpatient was obtained by telephone contact of the primary physicians or patients directly. Survival information was effectively collected for all patients during this follow-up.

Metabonomic analysis.

Samples for metabonomic analysis. Venous blood samples dedicated to ^1H -NMR-based metabonomic study were collected in a Becton Dickinson Vacutainer CPT tube with sodium heparin and the plasma was dispatched into 3 x 1 ml vials and stored at -80°C . One of these plasma aliquots were used for diluted plasma ^1H NMR analysis (250 μl were diluted into 755 μl final mixture of 500 μl 0,9% saline in D_2O and 5 μl 100 mM sodium 3-(trimethylsilyl) propionate-2,2,3,3-d4 (TSP)) immediately before the NMR spectra acquisition. The second plasma aliquots were submitted to an extraction process to isolate the hydrophilic and lipophilic plasma metabolites into two separated fractions which were analyzed serially on the day after. Simultaneous extraction of lipophilic and polar metabolites was performed with ice-cold methanol, chloroform and water (2:2:1.3, v/v/v) ¹⁵. The aqueous fraction of the extract was reconstituted in 600 μl of D_2O phosphate buffered solution with 10 μl of a 10 mM 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonate sodium salt (TMPS) before NMR analysis. The organic fraction of the extract was reconstituted in 1 ml CDCl_3 with 10 μl TCB (100 mM) and maintained under nitrogen atmosphere at -80°C until NMR analysis.

Acquisition of ^1H NMR spectra. ^1H NMR spectra were recorded at 300K on a Bruker Avance DRX 600 spectrometer operating at 600.13 MHz and equipped with a 5 mm triple axis inverse (TXI) gradient cryoprobe. Four spectra were acquired for each plasma's patient : 1- spectrum of diluted plasma sample was acquired with presaturation of the water signal and using one-pulse sequence, namely the Zg-spectrum; 2- spectrum of diluted plasma was acquired with presaturation of the water and CPMG spin-echo sequence, namely the cpmg-spectrum; 3-spectrum of aqueous fraction of the plasma extract, namely the Aq-spectrum and 4- spectrum of the organic fraction of the plasma extract, namely the Org-spectrum. Zg-spectrum and CPMG spin-echo sequence (cpmg spectrum) with an echo loop time ($2n\pi$) of 320 ms. A total of 64 transients were sampled with a spectral width of 12 ppm, 32 K data point on time domain (2.3 s acquisition time) and 2.5 s additional relaxation delay. Spectra of aqueous and organic fractions were serially acquired using an automatic sample changer (B-ACS 60). Spectra of aqueous fractions (Aq. spectrum) were obtained with similar parameters to the one-pulse spectrum of the diluted plasma whereas spectra of the organic fraction (Org. spectrum) were acquired with an additional delay of 4 s and without solvent suppression. ^1H NMR spectra were processed using the TOPSPIN (version 2.1, Bruker BioSpin SA, France) and AMIX (Bruker Analytik, Rheinstetten, Germany) software packages. Typical processing parameters were 65 K zero-filling and an exponential apodizing function (0.3 Hz) applied

prior to Fourier transform. Phase and base-line corrections of spectra were performed by operator and referenced with AMIX software to methyl resonance of TMPS, lactate or TCB for diluted plasma, aqueous fraction and organic fraction respectively. ¹H NMR spectra were processed using the TOPSPIN (version 2.1, Bruker BioSpin SA, France) and AMIX (Bruker Analytik, Rheinstetten, Germany) software packages.

Data Reduction and Pattern Recognition. This metabonomic analysis was based on assessment of four characteristic ¹H NMR spectra acquired on three distinctive samples. Each of the four NMR spectra obtained per patient were bucketed to obtain spectral data sets using AMIX (Bruker Analytik, Rheinstetten, Germany) software package. These generated variables were identified with the central chemical shift value of the bins as suffix and Zg, cpmg, Aq or Org as prefixes. This raw data matrix was exported into the SIMCA-P+ (version 12.0, Umetrics, Umeå, Sweden) software to be separately orthogonalized with an OSC filtering function ¹⁶ prior fusionned in a normalized matrix of 672 rows (X-block) and 126 lines. To maximize separation between the groups, partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) was performed by using survival or 30-day mortality as Y (Y-block). The statistical results obtained by PLS-DA methods are able to detect which variables in the X-block are relevant to determine the dependent variables (Y-block) by means of the variable Influence on projection parameter (IP) values. The IP values reflect, in fact, the importance of terms in the model both with respect to Y, i.e. its correlation with all the responses, and with respect to X.

Automated lactate, cholesterol and BNP assays.

Plasma concentrations of lactate and total cholesterol were determined from a third plasma aliquot coming from the blood withdrawn dedicated to metabonomic investigations. Lactate and total cholesterol concentration were determined on a routine laboratory method using a COBAS MIRA+ autoanalyzer according to the manufacturer's instructions (HORIBA ABX diagnostic, Montpellier, France). Cholesterol was measured by the CHOD-PAP method with kit A11A01634 and lactate was measured by the enzymatic colorimetric Trinder method with kit A11A01721 (HORIBA ABX diagnostic, Montpellier, France). Plasma BNP was immediately analyzed from EDTA-anticoagulated blood samples using the Centaur Bayer kit (Bayer HealthCare, France) and a Centaur (Siemens, France) hospital automat as recommended by the manufacturers.

Statistical Analysis

Continuous variables are presented as means (\pm SD) and categorical variables as percentages. Each of the variables used to describe characteristics of the population study was examined for its univariate association with 30-day mortality. For categorical variables, a Pearson Chi-square test was used to determine the statistical significance of the association between the variable and 30-day mortality. For continuous variables, a student's *t*-test or Mann-Whitney rank sum test when normality test failed was used to determine the statistical significance of the association between the variable and 30-day mortality with a 2-tailed *P* value determination. (Medcalc, version 11.6.0.0, Medcalc software bva, Belgium). Variables (except those related to admission medication) that were significantly associated with 30-day mortality with significance level of $P < 0.05$ were selected for univariate and multivariate Cox regression. Continuous variables were dichotomized at the cutoff levels. Maximum value of the youden index (sensitivity + specificity -1) on receiver operating characteristics analysis was used in determining of the cutoff level. Separate Cox regression using the enter method were applied to evaluate the hazard ratio of covariates adjusted for age and sex. Multivariate Cox proportional hazards analysis were performed as stepwise regression (enter variable if $P < 0.1$, remove variable if $P > 0.2$) with variables that were associated with 30-day mortality with $P < 0.05$, Lact/Chol ratio, HDL, acute decompensation of CHF (ADCHF), cardiogenic shock (CS). Survival curves were constructed using the Kaplan-Meier method and compared with the log-rank test.

Results

Demographic data and clinical characteristics

One hundred and twenty-six patients with AHF were eligible for this study (Table 1). The patients were 69 ± 15 years old, (61% male) and the LVEF was $\leq 45\%$ in 75%. Patients had significant comorbid conditions, including hypertension (58%) coronary heart disease (52%) and diabetes mellitus (38%). Most patients were on diuretics (91%) and antiplatelet agents (71%). Twenty-eight patients (22%) died within 30 days following their admission. Clinical presentation for cardiogenic shock and admission diagnosis for acute decompensation of chronic heart failure (CHF) parameters were significantly higher in patients with 30-day mortality than in those with good outcomes, 79 vs 21% ($P < 0.001$) and 78 vs 53% ($P = 0.031$) respectively. Clinical presentation for pulmonary oedema or hypertensive AHF, medication with beta-blockers and mean blood pressure parameters were significantly higher in patients with good outcome on day 30 following admission than in those with 30-day

mortality outcome, 72 vs 7 ($P < 0.001$), 39 vs 10 ($P = 0.008$) and, 89 ± 26 vs 69 ± 13 ($P = 0.004$), respectively. Concentration of LDL and HDL in plasma from patients with good outcomes were significantly higher, 1.08 ± 0.43 vs 0.84 ± 0.36 ($P = 0.046$) and 0.47 ± 0.15 vs 0.35 ± 0.09 ($P = 0.005$), respectively. BNP concentration at presentation were not significantly different in patients with good and 30-day mortality outcomes, 1154 ± 1090 pg/ml (n=98) and 1237 ± 1281 pg/ml (n=28) ($P = 0.738$), respectively. The mean length of stay in ICU was 11 ± 9 and 15 ± 8 days, before discharge and death, respectively.

NMR metabonomic profiling of patients' plasmas.

Data extracted from ^1H NMR spectra of the patient plasma were analyzed using partial least-square discriminant analysis, the score map (Figure 1A) shows separation of plasma samples based upon outcomes. Discriminant variables from each group are the ones with most extreme values on the loading plot (color spots; Figure 1B). Variables generating the highest influence on projection parameters with their corresponding metabolite are listed in Table 2. Signals from cholesterol were positively correlated with survival, whereas signals from lactate were positively correlated with 30-day mortality. Indeed, a significantly higher intensity of a characteristic signal of lactate (Figure 2A) relative to the total spectral intensity was observed in the aqueous fraction of plasma from the 30-day mortality group. Conversely, a significantly lower relative intensity of a characteristic signal of cholesterol (Figure 2A) relative to the total spectral intensity was measured in the lipid fraction of plasma from the 30-day mortality group.

Automated monitoring of venous plasma lactate and cholesterol.

Plasma concentrations of lactate and total cholesterol were further determined with enzymatic method on an aliquot of plasma sample. Lactate concentration was significantly higher in patients of 30-day mortality group than in good outcome patients group with 1.78 ± 1.32 (n=28) vs 1.14 ± 0.40 mM (n=98), ($p < 0.001$), respectively. Conversely, total cholesterol concentration was significantly lower in 30-day mortality patients group than in good outcome patients group with 2.37 ± 0.67 (n=28) vs 3.23 ± 1.01 mM (n=98), ($p < 0.001$), respectively.

Thirty-day mortality prognostic values of lactate, cholesterol and lactate to cholesterol ratio.

Accuracies of lactate and total cholesterol concentrations to predict 30-day mortality were evaluated using ROC curve analysis (Figure 3 and Table 3). The accuracy was better for cholesterol (AUC: 0.76, $P < 0.0001$) than for lactate (AUC: 0.73, $P = 0.0003$). Regarding the inverse relationship of lactate and cholesterol concentrations according to the outcomes status of patients we investigated the strength of the lactate to cholesterol ratio as prognostic index for 30-day mortality. The lactate to cholesterol ratio improved the accuracy, predicting 30-day mortality with AUC: 0.82 ($P < 0.0001$). The cutoff value corresponding to maximum of the Youden index was at 0.40 with 82 % sensitivity and 64 % specificity.

Survival analysis for 2 subgroups generated with a lactate to cholesterol ratio cutoff value of 0.40 is presented under a Kaplan-Meier plot in Figure 4. The two survival curves differed significantly ($p < 0.0001$) which confirmed the prognostic power for 30-day mortality of this index. The hazard ratio adjusted for age and sex of 30-day mortality in patients with lactate to cholesterol ratio ≥ 0.4 was 5.74 (95% CI, 2.13-15.48) compared with that in patient with lactate to cholesterol ratio < 0.4 (Table 4).

Univariate and multivariate predictors of 30-day mortality.

Patients with AHF were divided into 2 groups based for each variable associated with 30-day mortality. For continuous variable, the cutoff level was calculated by receiver operating characteristics analysis to detect 30-day mortality, and 30-day mortality prediction was evaluated by Cox proportional hazards ratio analysis (Table 4). The cutoff level was determined as 74 mmHg for MAP, giving a sensitivity of 71.4% and a specificity of 71.1%; 0.99 g/l for LDL, giving a sensitivity of 80% and a specificity of 52.1; 0.36 g/l for HDL, giving a sensitivity of 60% and a specificity of 77.5. By univariate Cox proportional hazards regression analysis, clinical presentation with cardiogenic shock (CS), high value of Lactate to Cholesterol ratio; low level of HDL and acute decompensation of CHF (ADCHF) were significant predictor of 30-day mortality (Table 4). By stepwise multivariate Cox analysis only cardiogenic shock state and Lactate/Cholesterol ratio > 0.4 were significant independent predictor of 30-day mortality with hazards ratio of 6.99 and 3.20, respectively.

Mortality prediction stratified by the combination of cardiogenic shock clinical presentation and lactate to cholesterol ratio.

Patients were stratified into 4 groups based on cardiogenic shock status and cutoff level of lactate to cholesterol ratio (Figure 5). Compared with patients who had not presented a cardiogenic shock and a plasma lactate to cholesterol ratio < 0.4 , patients who had presented a cardiogenic shock and a plasma lactate to cholesterol ratio ≥ 0.4 , had a 41 fold

higher 30-days mortality risk ($p < 0.0001$) with a median survival of 24 days. Furthermore, in patients who had presented a cardiogenic shock, the HR of 30-days mortality risk in patients with plasma lactate to cholesterol ratio ≥ 0.4 was 3.26 compared with that in patients with plasma lactate to cholesterol ratio < 0.4 ($P = 0.018$).

Discussion

We report that in patients with AHF, a high level of venous plasma lactate concentration, a low level of total cholesterol concentration, and a high lactate to cholesterol ratio are predictors of 30-day mortality. In other words, the lactate to cholesterol ratio measured at the admission is an independent short term prognostic for 30-days mortality.

This study was first conducted without any *a priori* analysis to find out potent correlations between ^1H NMR spectra and 30-day outcomes. We chose to use ^1H NMR spectroscopy based metabolic profiling because of its efficiency to identify plasma metabolites as potent biomarkers of miscellaneous pathologies^{14, 16}. Statistical analysis of ^1H NMR spectral data revealed that signals, corresponding to venous lactate and total cholesterol were strongly associated with patients' death and survival within 30 days following admission, respectively. This was further confirmed by a second analysis of the plasma admission withdrawn using routine laboratory techniques for quantification of lactate and cholesterol. The observed rise in venous blood lactate concentration in cardiac death patients is in accordance with the use of arterial lactate as a biomarker of severe myocardial infarction. It also assesses severity of shock situations^{17, 18}. In chronic heart failure serum lactate was not predictive of the severity of heart failure in a population of cardiac transplant candidates¹⁹ whereas defect in organ perfusion is increased in severe AHF and leads to tissue hypoxia, therefore inducing anaerobic pathways with lactate production that could be combined with a decrease in lactate clearance.

Plasma cholesterol level is the result of a balance between absorption by digestive system and cellular synthesis that occurs mostly in the liver. Lower total cholesterol levels have been associated with increased in-hospital mortality of patients with various diseases, including miscellaneous heart diseases, and was proposed as one of the first signs of forthcoming deterioration of a preexisting disease²⁰. Indeed, hypocholesterolemia is a signal of disease state in a number of pathologies²¹. These include hepatic failure, hyperthyroidism, malnutrition, poor digestive absorption, inflammatory syndromes, trauma and infectious diseases²². More recently, hypocholesterolemia was associated with high perioperative mortality in patients supported by a left ventricular assistant system²³ and with increased mortality in advanced or acute heart failure patients²⁴. In agreement with this total

cholesterol, HDL, and LDL cholesterol concentrations were significantly lower in 30-days mortality outcomes patients.

We aimed to find an index that would be easy to determine based on the venous cholesterol and lactate concentration. Analysis of receiver operating curves demonstrates that lactate to cholesterol concentration ratio with an AUC of 0.82 has a higher discriminatory power for 30-day mortality than lactate or cholesterol concentrations alone. In this study, patients with a lactate to cholesterol ratio superior to the best cutoff value (0.40) had a 6 times higher risk for 30-days mortality. The majority of patients with a 30-days mortality outcome were with a cardiogenic shock at admission and had the higher risk of death. High lactate to cholesterol ratio in these patients was associated with a large increase of the 30-days mortality risk.

Although it has been well established that BNP measurement at admission is helpful for the diagnosis and the long term prognostic of patients, its capability to give a short-term prognostic of all cause of mortality is less accurate in case of AHF or depend upon sepsis²⁵ chronic kidney disease²⁶. Several reports have focused on the prognostic role of serial measurements of BNP serum levels or percentage of BNP reduction to improve its short or long-term prognostic value of BNP²⁷⁻²⁹. AUC of ROC curve for BNP level at admission plotted to test for short-term prognosis give a poor predictive value 0.64 compared to NT-proBNP (0.78) for 90-days mortality⁴. In agreement with these reports, BNP plasma level measured at admission was not a predictor for 30-days mortality. Clinical presentation with CS, diagnosis of acute decompensation of CHF and lactate to cholesterol ratio remain variables significantly associated to 30-days mortality in the multivariate Cox regression analysis.

Evolution of lactate and cholesterol plasma levels during hospitalization was not investigated in this study but our data suggested that it could be used as a cost-effective putative efficiency index for the medical care of the patients. However, this severity index needs further testing in a large scale, multi-center study to confirm an optimum threshold value. Clinical use of such an index would be of major interest at hospital admission of acute heart failure patients. Further studies are needed to explore the potential of this index for inpatient treatment efficacy, follow-up care and clinical decision making.

Study limitations

The number of patients in the study population was relatively small. This is a monocentric study from a general hospital located in the southwest of France. It is known that there is a relatively low incidence of coronary heart disease in this population ("The French paradox") and that CHD mortality rates are significantly lower than in other developed Western countries^{30, 31}. Because of this, it is possible that the results presented may have to be

further validated in other population especially for the cutoff value of the lactate to cholesterol ratio. Despite these limitations, though, the present study does provide the first prospective evidence for the clinical utility of the lactate to cholesterol ratio in patients hospitalized with congestive heart failure. A larger study is warranted to confirm the prediction of 30-day mortality based on plasma lactate to cholesterol ratio in patients with AHF.

Figure Legends:

Figure 1: A: PLS-DA t1/t2 score plot derived from ^1H NMR spectral data correlating to 86% of the Y-variance. The plot shows how well individual separate as it is a survivor (blue spot) or a deceased (red spot) individual (number is for the identification of individual). **B:** PLS-DA weight plot (w^*c_1/w^*c_2). This plot of the X- and Y-weights (w^* and c) shows how the ^1H NMR spectral data correlate with class belonging i.e. the survival or 30-day mortality classes. Variables corresponding to the 6 first higher variable influence parameter have a colored box red when there are positively correlated with 30-day mortality class and blue when there are positively correlated with survival class. The triangles were labeled by spectral data identification. List of these discriminating variables is in **Table 2**.

Figure 2: A: Contribution of a ^1H NMR characteristic signal of lactate at 1.36 ppm to the spectrum of aqueous fraction of the plasma extract (Aq spectrum). **B:** Contribution of a ^1H NMR characteristic signal of cholesterol at 0.68 ppm to the spectrum of lipid fraction of the plasma extract (Org spectrum). Values are expressed as arbitrary unit (AU). Line at the middle for median, boxes extend from 25th to 75th percentile, error bars for max and min values. Boxes: white, plasma from patients with good outcome; grey plasma from patients with 30-day mortality outcome. * is for student's t test $p < 0.05$

Figure 3: Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis of lactate, cholesterol and lactate to cholesterol ratio in relation with 30-day mortality.

Figure 4: Kaplan–Meier curve estimation of the survival rate of the patients according to the cholesterol to lactate ratio at the cutoff value. A total of 126 AHF patients were included in this analysis based on **Cobas Mira+ automated enzymatic detection** of venous plasma lactate and cholesterol. Bold and dashed lines are for lactate/cholesterol ratio < 0.40 and ≥ 0.40 , respectively. Number at risk indicates upon time the number of survival patients within each group based on lactate to cholesterol ratio (< 0.40 and ≥ 0.40).

Figure 5: A: Kaplan Meier survival curves for patients with AHF stratified into 4 groups based on the combination of clinical presentation (with or without cardiogenic shock (CS)) and the cutoff level of lactate to cholesterol ratio (Lact/Chol ratio). **B:** Usefulness of 30-day mortality prediction using Lact/Chol ratio and clinical presentation. Hazard ratio for comparison with referent (i.e. without CS and a Lact/Chol ratio < 0.4 ; for « Lact/Chol ratio ≥ 0.4 — without CS ,» 9 ($p=0.015$); for « Lact/Chol ratio < 0.4 — with CS ,» 15 ($p=0.0014$); for « Lact/Chol ratio ≥ 0.4 — with CS ,» 41 ($p<0.0001$).

Disclosures: None

Acknowledgements: We thank Anexplo facilities of the Genotoul network for assistance in Cobas monitoring of lactate and cholesterol levels.

References

1. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J.* 2008 Oct;29(19):2388-442.
2. Krumholz HM, Chen YT, Wang Y, Vaccarino V, Radford MJ, Horwitz RI. Predictors of readmission among elderly survivors of admission with heart failure. *Am Heart J.* 2000 Jan;139(1 Pt 1):72-7.
3. Cleland JG, Swedberg K, Follath F, Komajda M, Cohen-Solal A, Aguilar JC, et al. The EuroHeart Failure survey programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis. *Eur Heart J.* 2003 Mar;24(5):442-63.
4. Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Dec 18;50(25):2357-68.
5. Waldo SW, Beede J, Isakson S, Villard-Saussine S, Fareh J, Clopton P, et al. Pro-B-type natriuretic peptide levels in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2008 May 13;51(19):1874-82.
6. van Kimmenade RR, Pinto YM, Bayes-Genis A, Lainchbury JG, Richards AM, Januzzi JL, Jr. Usefulness of intermediate amino-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations for diagnosis and prognosis of acute heart failure. *Am J Cardiol.* 2006 Aug 1;98(3):386-90.
7. Peacock WF, De Marco T, Fonarow GC, Diercks D, Wynne J, Apple FS, et al. Cardiac troponin and outcome in acute heart failure. *N Engl J Med.* 2008 May 15;358(20):2117-26.
8. Philip-Couderc P, Smih F, Pelat M, Vidal C, Verwaerde P, Pathak A, et al. Cardiac transcriptome analysis in obesity-related hypertension. *Hypertension.* 2003 Mar;41(3):414-21.
9. Philip-Couderc P, Pathak A, Smih F, Dambrin C, Harmancey R, Buys S, et al. Uncomplicated human obesity is associated with a specific cardiac transcriptome: involvement of the Wnt pathway. *Faseb J.* 2004 Oct;18(13):1539-40.
10. Philip-Couderc P, Smih F, Hall JE, Pathak A, Roncalli J, Harmancey R, et al. Kinetic analysis of cardiac transcriptome regulation during chronic high-fat diet in dogs. *Physiol Genomics.* 2004 Sep 16;19(1):32-40.
11. Roncalli J, Smih F, Desmoulin F, Dumonteil N, Harmancey R, Hennig S, et al. NMR and cDNA array analysis prior to heart failure reveals an increase of unsaturated lipids, a glutamine/glutamate ratio decrease and a specific transcriptome adaptation in obese rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Mar;42(3):526-39.
12. Trocme C, Marotte H, Baillet A, Pallot-Prades B, Garin J, Grange L, et al. Apolipoprotein A-I and platelet factor 4 are biomarkers for infliximab response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009 Aug;68(8):1328-33.
13. Lewis GD, Asnani A, Gerszten RE. Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway discovery. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Jul 8;52(2):117-23.
14. Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics. *Nat Med.* 2002 Dec;8(12):1439-44.

15. Tyagi RK, Azrad A, Degani H, Salomon Y. Simultaneous extraction of cellular lipids and water-soluble metabolites: evaluation by NMR spectroscopy. *Magn Reson Med*. 1996 Feb;35(2):194-200.
16. Makinen VP, Soininen P, Forsblom C, Parkkonen M, Ingman P, Kaski K, et al. Diagnosing diabetic nephropathy by ¹H NMR metabonomics of serum. *Magma*. 2006 Dec;19(6):281-96.
17. Henning RJ, Weil MH, Weiner F. Blood lactate as prognostic indicator of survival in patients with acute myocardial infarction. *Circ Shock*. 1982;9(3):307-15.
18. Krishna U, Joshi SP, Modh M. An evaluation of serial blood lactate measurement as an early predictor of shock and its outcome in patients of trauma or sepsis. *Indian J Crit Care Med*. 2009 Apr-Jun;13(2):66-73.
19. Canver CC. Serum lactates are not predictive of heart failure severity in status I cardiac transplant candidates. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2001 Dec;42(6):705-7.
20. Oster P, Muchowski H, Heuck CC, Schlierf G. The prognostic significance of hypocholesterolemia in hospitalized patients. *Klin Wochenschr*. 1981 Aug 3;59(15):857-60.
21. Franzblau A, Criqui MH. Characteristics of persons with marked hypocholesterolemia. A population-based study. *J Chronic Dis*. 1984;37(5):387-95.
22. Sassolas A, Cartier R. [Hypocholesterolemias: causes and diagnosis]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1999 Sep-Oct;57(5):555-60.
23. Richartz BM, Radovancevic B, Frazier OH, Vaughn WK, Taegtmeyer H. Low serum cholesterol levels predict high perioperative mortality in patients supported by a left-ventricular assist system. *Cardiology*. 1998 Mar;89(3):184-8.
24. Horwich TB, Hernandez AF, Dai D, Yancy CW, Fonarow GC. Cholesterol levels and in-hospital mortality in patients with acute decompensated heart failure. *Am Heart J*. 2008 Dec;156(6):1170-6.
25. Fellahi JL, Hanouz JL, Le Manach Y, Gue X, Monier E, Guillou L, et al. Simultaneous measurement of cardiac troponin I, B-type natriuretic peptide, and C-reactive protein for the prediction of long-term cardiac outcome after cardiac surgery. *Anesthesiology*. 2009 Aug;111(2):250-7.
26. Park S, Cho GY, Kim SG, Hwang YI, Kang HR, Jang SH, et al. Brain natriuretic peptide levels have diagnostic and prognostic capability for cardio-renal syndrome type 4 in intensive care unit patients. *Crit Care*. 2009;13(3):R70.
27. Faggiano P, Valle R, Aspromonte N, D'Aloia A, Di Tano G, Barro S, et al. How often we need to measure brain natriuretic peptide (BNP) blood levels in patients admitted to the hospital for acute severe heart failure? Role of serial measurements to improve short-term prognostic stratification. *Int J Cardiol*. Apr 1;140(1):88-94.
28. Di Somma S, Magrini L, Pittoni V, Marino R, Mastrantuono A, Ferri E, et al. In-hospital percentage BNP reduction is highly predictive for adverse events in patients admitted for acute heart failure: the Italian RED Study. *Crit Care*. 2010;14(3):R116.
29. Noveanu M, Breidhardt T, Potocki M, Reichlin T, Twerenbold R, Uthoff H, et al. Direct comparison of serial B-type natriuretic peptide and NT-proBNP levels for prediction of short- and long-term outcome in acute decompensated heart failure. *Crit Care*. 2011 Jan 5;15(1):R1.
30. Ferrieres J. The French paradox: lessons for other countries. *Heart*. 2004 Jan;90(1):107-11.
31. Mirzaei M, Truswell AS, Taylor R, Leeder SR. Coronary heart disease epidemics: not all the same. *Heart*. 2009 May;95(9):740-6.

Figure 2

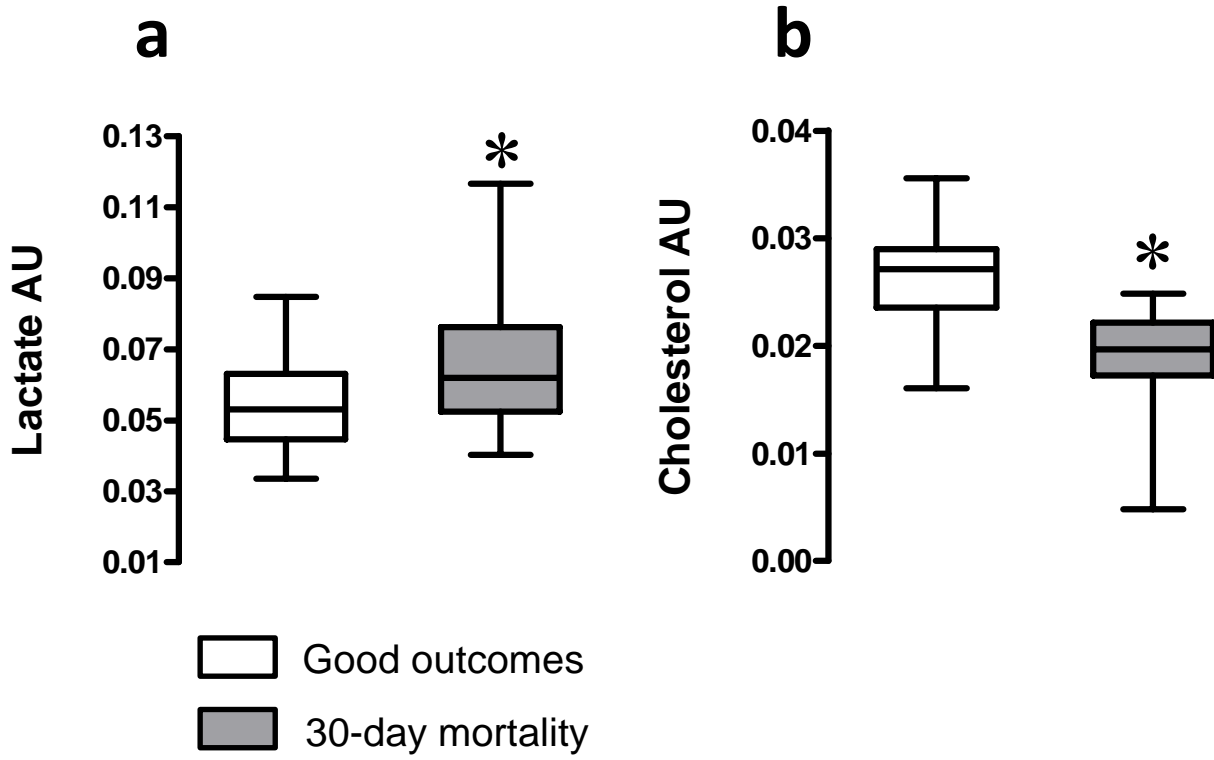


Figure 3

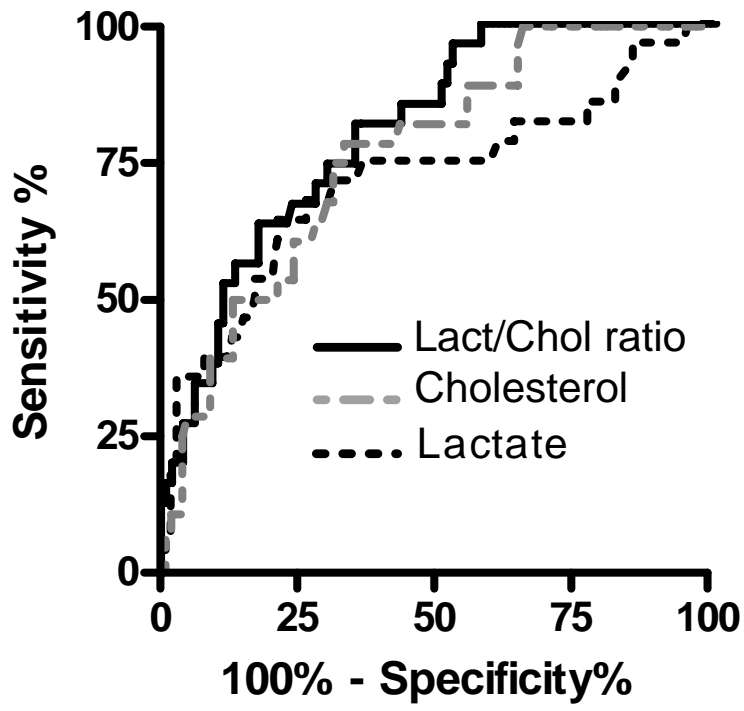
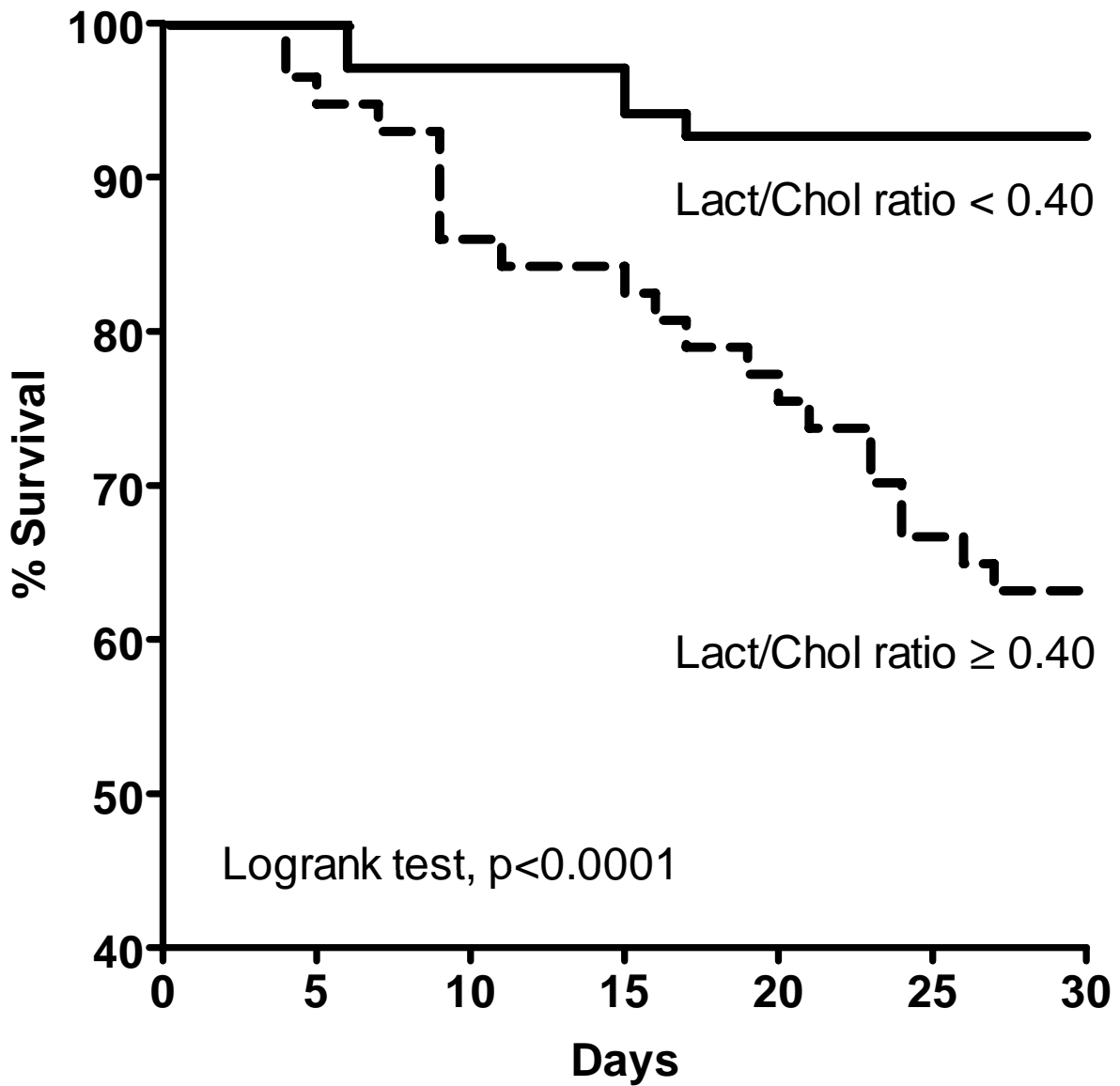


Figure 4



Number at risk

Lact/Chol ratio < 0.40

68 68 66 64 63 63 63

Lact/Chol ratio ≥ 0.40

58 55 49 47 43 38 36

Figure 5

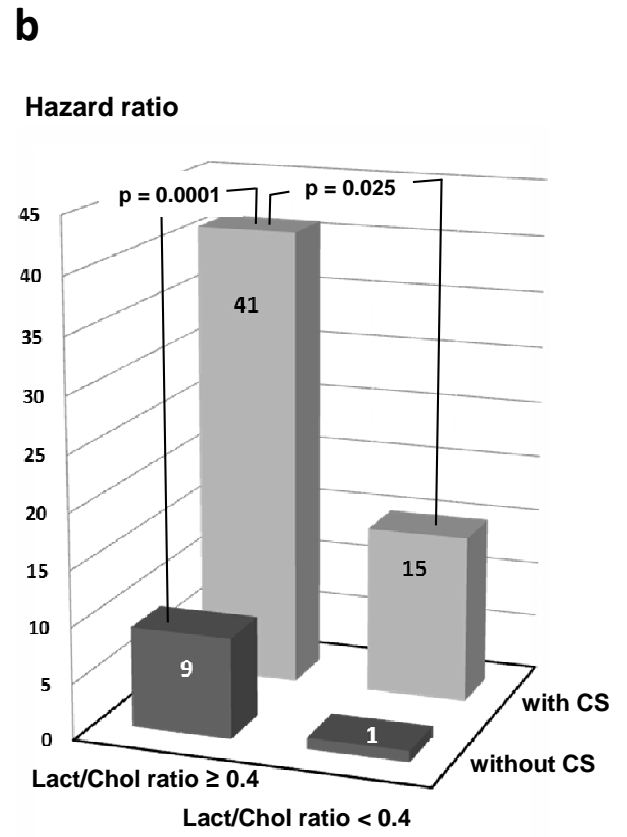
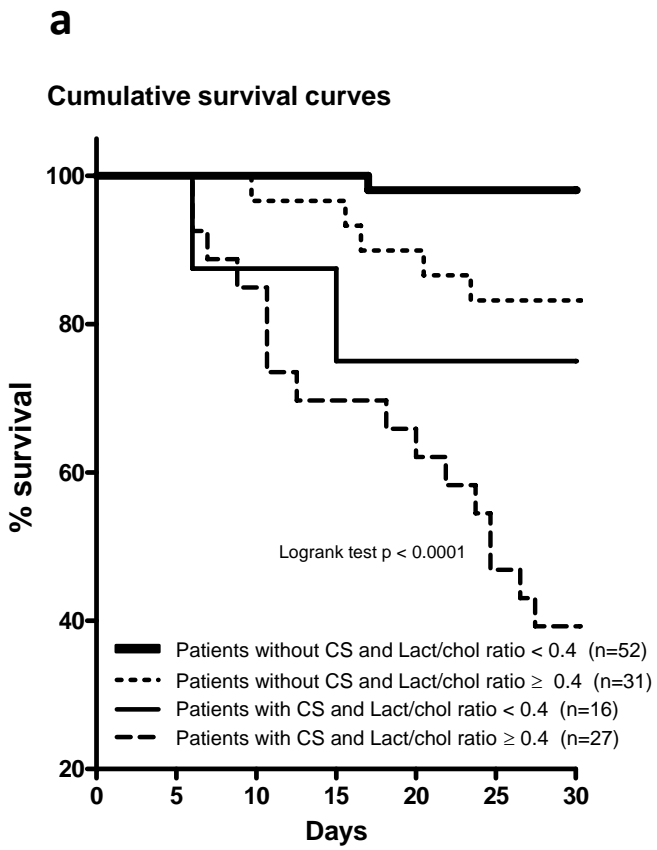


Table 1. Characteristics of the patients with AHF

Characteristics	All patients (n=126)	Good outcomes (n=98)	30-day mortality (n=28)	<i>P</i>
Age (y)	69 ± 15	69 ± 15	69 ± 13	0.881
Sex, Female (%)	39	43	25	0.133
BMI	26 ± 5	27 ± 5	25 ± 7	0.396
Cardiovascular risk factors				
Hypertensive (%)	58	61	46	0.230
Diabete (%)	38	39	33	0.721
Dyslipidemia (%)	50	51	50	0.903
Obesity (%)	16	17	15	0.970
Heridity CD (%)	8	8	9	0.822
Previous cardiac disease				
Coronary artery disease (%)	52	52	50	0.978
Valvular heart disease (%)	30	29	32	0.943
Idiopathic dilated cardiomyopathy (%)	13	12	14	0.967
Admission diagnosis				
New onset of AHF (%)	41	47	22	0.031
Acute decompensation of CHF (%)	59	53	78	0.031
Acute coronary syndrome (%)	52	52	50	0.978
HF with reduced ejection fraction (%)	71	71	71	0.813
Clinical presentation				
Pulmonary oedema or Hypertensive AHF (%)	58	72	7	<0.001
Cardiogenic shock (%)	34	21	79	<0.001
Acute right-sided heart failure, %	8	7	13	0.532
Admission medication				
ACE inhibitor, %	32	36	18	0.112
Angiotensin receptor blocker (%)	2	2	0	0.911
Beta-blocker (%)	33	39	10	0.008
Diuretic (%)	91	93	80	0.09
Aldosterone antagonist (%)	25	24	31	0.615
Antiplatelet agent (%)	71	69	81	0.315
Vitamin K antagonist (%)	31	32	24	0.543
Statine	30	33	16	0.1313
Laboratory data				
BNP (pg/ml)	1172 ± 1131	1154 ± 1090	1237 ± 1281	0.738
Na ⁺ (mM)	136 ± 4	136 ± 4	136 ± 6	0.412
Creatinine (µM)	140 ± 79	145 ± 81	162 ± 89	0.229
C reactive protein (mg/l)	53 ± 69	50 ± 69	64 ± 72	0.340
Hb (g/dl)	13 ± 2	13 ± 2	13 ± 2	0.634
Glucose (mM)	7 ± 2	7 ± 2	7 ± 3	0.408
Bilirubin (µM)	20 ± 15	18 ± 14	23 ± 16	0.121
Prothrombin ratio (%)	66 ± 26	67 ± 25	59 ± 25	0.119
LDL (g/l)	1.04 ± 0.43	1.08 ± 0.43	0.84 ± 0.36	0.046
HDL (g/l)	0.45 ± 0.15	0.47 ± 0.15	0.35 ± 0.09	0.005
TG (g/l)	1.05 ± 0.43	1.05 ± 0.43	1.05 ± 0.37	0.963
Admission vitals				
Mean blood pressure (mmHg)	84 ± 25	89 ± 26.	69 ± 13	0.004
Heart rate (Bpm)	91 ± 28	89 ± 31	97 ± 16	0.343
Echocardiography				
LVEF (%)	35 ± 16	35 ± 14	35 ± 21	0.831
LVEF > 45% (%)	25	25	26	0.889
LV telediastolic diameter (mm)	61 ± 11	61 ± 11	62 ± 12	0.930
Pulmonary artery pressure (mmHg)	51 ± 16	52 ± 24	47 ± 21	0.453
Electrocardiography				
Sinus rhythm (%)	72	73	64	0.495
Radiography				
Cardiothoracic index (CI > 0.5) (%)	58 ± 6	58 ± 6	58 ± 6	0.584

Heridity CD, occurrence of cardiovascular disease in first degree relatives; AHF, acute cardiac failure; CHF, cardiac heart failure; HF, heart failure; ACE, angiotensin-converting enzyme; LDL, Low Density Lipoproteins; HDL, High Density Lipoproteins; TG, triglycerides; BMI, body mass index; LVEF, left ventricular ejection fraction; LV, left ventricular. BNP, B-type Natriuretic Peptide concentration.

Table 2. Metabolites contributing to NMR spectral variables with higher influence on projection parameters values

Discriminating variables	Influence parameter	Contributing metabolites	Correlation Sign	
			30-Day mortality	Survival
Org_1.04 ppm	2.36	cholesterol	negative	positive
Org_0.68 ppm	2.22	cholesterol	negative	positive
Org_0.92 ppm	2.10	cholesterol	negative	positive
zg_1.34 ppm	1.98	lactate	positive	negative
cpmg_1.34 ppm	1.81	lactate	positive	negative
Aq_1.36 ppm	1.80	lactate	positive	negative

Zg and cpmg indicate that the variables were extracted from Zg-spectra and cpmg-spectra, respectively. Org and Aq indicate that the variables were extracted from Org-spectra and Aq-spectra obtained on lipophylic and hydrophilic fractions of plasma extracts, respectively. Correlation sign: negative corresponds to lower signal intensity of the variable in the group; positive corresponds to higher signal intensity of the variable in the group.

Table 3. Receiver operating characteristic analysis results

Variables	AUC	95% CI	<i>P</i>
Lactate	0.73 (98/28)	0.60-0.85	0.0003
Total Cholesterol	0.76 (98/28)	0.67-0.85	<0.0001
Lactate/Cholesterol ratio	0.82 (98/28)	0.73-0.89	<0.0001

AUC, area under ROC curve. CI, confident interval

Table 4. Univariate and multivariate Cox Regression Analysis of variables associated with 30-day mortality

Variables	Univariate Analysis ^a			Multivariate analysis ^b		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Age (y)	1.00	0.98-1.03	0.85			
Sexe, male = 1	1.99	0.84-4.74	0.12			
Clinical presentation, CS =1	8.84	3.53-22.12	<0.0001	6.99	2.79-17.50	<0.0001
MAP, < 74mmHg =1	2.47	0.85-7.14	0.098			
Admission diagnosis, ADCHF = 1	2.54	1.01-6.36	0.048	2.26	0.91-5.61	0.08
LDL ,< 0.99 g/l =1	3.81	0.97-8.30	0.052			
HDL, < 0.36 g/l = 1	3.55	1.26-10.03	0.017			
Lact/Chol ratio, ≥ 0.40 = 1	5.74	2.13-15.48	0.0006	3.20	1.20-8.63	0.009

Figures in bold are statistically significant. CS, cardiogenic shock; MAP, Mean blood pressure; ADCHF, acute decompensation of CHF. ^aHRs of 30-day mortality outcomes adjusted for age and sex. ^b stepwise regression, significance level of the model P <0.0001. HR, hazard ratio. CI, confident interval

Article 3: Resistin impairs the metabolic action of insulin in muscle cells through an extensive shift in pyruvate homeostasis

Shirley Guzmán^{*,†,¶}, Silvia Marin^{*,†,¶}, Vitaly A. Selivanov^{*,†}, Josep J. Centelles^{*,†}, Anibal Miranda^{*,†}, Romain Harmancey^{‡,§}, Fatima Smih^{‡,§}, Annie Turkieh^{‡,§}, Yves Durocher[¥], Antonio Zorzano^{*,||}, Philippe Rouet^{‡,§} and Marta Cascante^{*,†,§}

* Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Av Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

† Institute of Biomedicine of Universitat de Barcelona (IBUB) and CSIC-Associated Unit, Spain

‡ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR 1048, Toulouse, France

§ Université Toulouse III Paul-Sabatier, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Equipe n°7, Toulouse, France

¥,Animal Cell Technology Group, Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada, Montreal, QC, Canada

|| Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona) and CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Spain.

En revision à Biochem J.

La résistine est une adipokine appartenant à la famille des protéines riches en cystéines. Elle est produite et sécrétée par les adipocytes chez le rongeur et par les cellules immunitaires présentes au sein du tissu adipeux chez l'Homme (Schwartz & Lazar, 2011). Cette protéine a été découverte suite à l'analyse du transcriptome de cellules murines en cultures (3T3-L1) traitées avec les Thiazolidinediones. Le but de cette étude était d'identifier les gènes dont l'expression diminue en réponse à ce traitement afin d'expliquer leurs propriétés antidiabétiques (Banerjee & Lazar, 2003).

Chez le rat, une hyperresistinémie entraîne une intolérance au glucose, une hyperinsulinémie et une hypertriglycéridémie aboutissant à une insulinoresistance du muscle squelettique, du foie et du tissu adipeux (Satoh et al, 2004). Certaines études ont montré que la résistine affecte le métabolisme dans les cellules musculaires L6 du rat en diminuant le transport du glucose et son oxydation en réponse à l'insuline, la phosphorylation de récepteur de l'insuline IRS-1 et la diminution de l'entrée et l'oxydation des acides gras à longues chaînes (Fan et al, 2007; Palanivel et al, 2006). Toutes ces observations confirment un rôle de la résistine dans l'insulinorésistance via l'altération du métabolisme cellulaire.

Le travail présenté dans cet article a pour objectif de déterminer l'effet de la résistine sur le métabolisme du glucose dans les cellules musculaire L6 et le mécanisme par lequel cette protéine altère la réponse métabolique de ces cellules à l'insuline.

RESISTIN IMPAIRS THE METABOLIC ACTION OF INSULIN IN MUSCLE CELLS THROUGH AN EXTENSIVE SHIFT IN PYRUVATE HOMEOSTASIS

Shirley Guzmán^{*,†,¶}, Silvia Marin^{*,†,¶}, Vitaly A. Selivanov^{*,†}, Josep J. Centelles^{*,†}, Anibal Miranda^{*,†}, Romain Harmancey^{‡,§}, Fatima Smih^{‡,§}, Annie Turkieh^{‡,§}, Yves Durocher[¥], Antonio Zorzano^{*,||}, Philippe Rouet^{‡,§} and Marta Cascante^{*,†,§}

* Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Av Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

† Institute of Biomedicine of Universitat de Barcelona (IBUB) and CSIC-Associated Unit, Spain

‡ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR 1048, Toulouse, France

§ Université Toulouse III Paul-Sabatier, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Equipe n°7, Toulouse, France

¥, Animal Cell Technology Group, Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada, Montreal, QC, Canada

|| Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona) and CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Spain

¶ Both authors contributed equally to this work and are listed in alphabetical order

§ To whom correspondence should be addressed: Marta Cascante; Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Av Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. Telephone n°: +34-934021593; fax n°: +34-934021559; e-mail address: martacascante@ub.edu

SHORT TITLE

Resistin shifts pyruvate homeostasis-involved fluxes in muscle cells

ABBREVIATIONS

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Foetal bovine serum
G6P	glucose-6-phosphate
GLUD	glutamate dehydrogenase
GP	glycogen phosphorylase
GS	glycogen synthase
OAA	oxaloacetate
PC	pyruvate carboxylase
PDC	pyruvate dehydrogenase complex
PEP	phosphoenolpyruvate
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase
PPP	pentose phosphate pathway
TCA	tricarboxylic acid

SYNOPSIS

It has been suggested that the adipokine resistin links obesity and insulin resistance, although how resistin acts on muscle metabolism is controversial. Here we aimed to quantitatively analyze the effects of resistin on the glucose metabolic flux profile and on insulin response in L6E9 myotubes, using a tracer-based metabolomics approach and the software Isodyn. We found that resistin significantly increased glucose uptake and glycolysis, and that it dramatically altered pyruvate homeostasis, inducing a four-fold increase in pyruvate cycling and a four-fold decrease in the ratio between the fluxes through pyruvate dehydrogenase complex and pyruvate carboxylase. These effects on pyruvate homeostasis were opposite to those caused by insulin. Moreover, in the presence of resistin, insulin only slightly increased glucose uptake and glycolysis, and did not alter the flux profile around pyruvate induced by resistin. Further, resistin prevented the increase in gene expression in pyruvate dehydrogenase-E1 and the sharp decrease in gene expression in phosphoenolpyruvate carboxykinase-1 induced by insulin. We conclude that the impairment by resistin of the metabolic response to insulin was not at the level of a change in a single enzyme activity, but rather due to a reorganization of metabolic flux distribution through the alteration of pyruvate homeostasis.

KEYWORDS

Resistin, insulin, insulin resistance, glucose metabolism, fluxomics, pyruvate homeostasis

INTRODUCTION

Obesity is increasing in epidemic proportions and is associated with an escalation of type 2 diabetes throughout the world [1,2]. In recent years, the active participation of immune cells in obesity and type 2 diabetes has become evident [3,4]. This chronic activation of the innate immune system may subsequently lead to insulin resistance, impaired glucose tolerance and, eventually, diabetes [5,6].

Adipose tissue produces a vast array of adipocyte-derived factors known as adipocytokines, which have numerous functions including regulation of metabolism, inflammation and body mass. One of the adipokines, resistin, belongs to a family of cysteine-rich proteins that are involved in inflammation and altered insulin sensitivity in rodents [7,8]. Resistin is produced from adipose tissue in rodents, while in humans it is secreted by the mononuclear lymphocytes and stromal cells within adipose tissue [9, 10]. Studies in humanized resistin mice indicate that although the site of resistin production differs between species, human resistin exacerbates white adipose tissue inflammation and contributes to insulin resistance [11].

Skeletal muscle is considered to be the main tissue involved in the maintenance of glucose homeostasis, as its contribution to glucose uptake is around 75% of the total contribution of the peripheral tissues [12], and it is the main tissue responsible for insulin-dependent glucose use. Insulin resistance, defined as the genetic or learned inability of target tissues to respond normally to the action of the circulating hormone, has been described in skeletal muscle but also in liver and adipose tissue [13]. Some studies have shown that resistin affects both glucose transport and insulin-stimulated oxidation of glucose in L6 skeletal muscle cells [14-17]. It also decreases both uptake and oxidation of long-chain fatty acids [18], glycogen synthase kinase-3- β phosphorylation [15], and insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 (IRS-1) tyrosine phosphorylation [16] in the same cell line. Further, high resistin levels in rats led to insulin resistance involving impaired insulin signalling in skeletal muscle, liver and adipose tissue, resulting in glucose intolerance, hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia [19]. These observations relate resistin in muscle-cell metabolism to insulin resistance.

Changes in the metabolome, i.e. the whole set of metabolites, have been described as the ultimate response of an organism to various events, such as genetic alterations, disease or environmental influences [20]. But this metabolome is dynamic and the metabolites are continuously transformed in the metabolic processes of the cell. The comprehensive characterization of the metabolic networks and their functional state requires quantitative knowledge of intracellular metabolic fluxes. These intracellular fluxes can be quantified by analyzing the incorporation of labelled substrates in metabolic products using appropriate software packages [21].

The aim of this study was to examine the effect of resistin on the central carbon metabolic network of rat skeletal muscle cells and how resistin alters the metabolic response of muscle cells to insulin. For that we used [1,2- $^{13}\text{C}_2$]-glucose as a tracer, analyzed isotopomer distributions by GC coupled with MS, and performed quantitative flux analysis using Isodyn software [21-24]. The alterations that resistin induces in the metabolic flux profile of rat skeletal muscle cells have been identified, which have been complemented with the analysis of the expression of some genes.

The study presented here offers a wider vision than previously published of the metabolic reorganization that resistin induces in rat skeletal muscle cells and in the metabolic response of these cells to insulin. Our observations bring new data for a more precise understanding of the effect of resistin on metabolic network adaptations of skeletal muscle cells and help to explain the role of resistin in insulin resistance described in myocytes. Besides, our work reveals the importance of tackling the study of complex biological systems from a systems biology point of view in order to fully understand multifactorial diseases and identify new therapeutic targets.

EXPERIMENTAL

Cells and reagents

Myoblastic cell line L6E9 was kindly provided by Dr. Nadal-Ginard (Harvard University, Boston, USA). Rat resistin was produced in HEK293 cell line, purity and biological activity was tested as described [25]. Resistin was tested for endotoxin using ToxinSensor chromogenic LAL endotoxin assay kit (bioNova científica, Madrid, Spain) which indicated low levels of endotoxins (0.0015 EU/mL) at final concentration used, which is below current FDA limits that require eluates from medical devices to be less than 0.5 EU/mL). [1,2-¹³C₂]-D-glucose and [U-¹³C-²H₇]-D-glucose were purchased from Isotec, and 2-deoxy-D-[2,6-³H]-glucose (2-DG) from Amersham-Biosciences.

Cell culture and incubation conditions

Myoblastic cell line L6E9 was grown as described [26]. For the biochemical and isotopologue assays, L6E9 myoblasts were seeded at a density of 10⁴ cells/cm² with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) without glucose or glutamine (Biological Industries) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 10 mM glucose, 4 mM asparagine and 5% penicillin/streptomycin. Cell differentiation was induced by lowering FBS to final concentration of 2% when myoblasts were pre-confluent [26].

Cells at day four of differentiation were washed four times in PBS and pre-treated or not with 100 nM resistin dissolved in DMEM without FBS and supplemented with 10 mM glucose, 4 mM asparagine, 2% HEPES and 1% penicillin/streptomycin. After 8 hours, the medium was replaced by another with the same composition, but now with 10 mM glucose 50%-enriched in [1,2-¹³C₂]-glucose, in the presence or absence of 100 nM insulin. At the end of a 6-hour incubation, the media were collected and dishes were washed twice with PBS before freezing in liquid nitrogen. Incubation media and dishes were stored at -80°C until biochemical and isotopologue analysis.

Glucose transport assay

To carry out the glucose transport assay, 10⁵ L6E9 cells/dish were cultured on 6-well plates. At day four of differentiation cells were pre-treated or not with 100 nM resistin for 8 hours, as described above. Next, the uptake of 100 μCi 2-DG by myotubes incubated with or without 100 nM insulin for 30 min was measured as described [26].

Glucose, lactate and glucose-6-phosphate biochemical determinations

Concentrations of glucose and lactate in incubation media at the beginning and at the end of 6-hour incubations were measured as previously described, by spectrophotometric methods coupled to Cobas Mira Plus chemical analyzer. Intracellular glucose-6-phosphate (G6P) content was determined enzymatically as described [27].

Isotopologue analysis of lactate, medium and glycogen glucose, and RNA ribose, and glycogen content determination by GC/MS

Mass spectral data were obtained on a QP2010 Shimadzu mass selective detector connected to a GC-2010 gas chromatograph using helium as gas carrier and isobutane 0.0016 Pa as reagent gas in chemical ionization analysis. The settings were: GC inlet, 250 °C for glucose, ribose and deoxyribose, and 200 °C for lactate; transfer line, 250 °C;

MS source, 200 °C. A Varian VF-5 capillary column (30-m length, 250- μ m diameter, 0.25- μ m film thickness) was used to analyze all the compounds.

Glucose from the frozen media was purified using a tandem set of Dowex-1X8/Dowex-50WX8 (Sigma-Aldrich Co) ion exchange columns. The glucose from media was converted to its glucose aldonitrile pentaacetate derivative as described previously [27], and ion cluster around m/z 328 (carbons 1-6 of glucose, chemical ionization) was monitored.

Lactate from the media was extracted with ethyl acetate after acidification with hydrochloric acid (HCl) and was derivatized to its propylamide heptafluorobutyric form. The cluster around m/z 328 (carbons 1-3 of lactate, chemical ionization) was monitored [27].

RNA ribose was isolated by acid hydrolysis of cellular RNA after Trizol purification of cell extracts. Ribose isolated from RNA was derivatized to its aldonitrile acetate form using hydroxyl-amine in pyridine and acetic anhydride. We monitored the ion cluster around the m/z 256 (carbons 1-5 of ribose, chemical ionization) to find the molar enrichment and positional distribution of ^{13}C labels in ribose as described [28].

Glycogen in frozen cell monolayers from the different analysis conditions was extracted and quantified as described previously [28]. Extraction was done by direct digestion of sonicated extracts with amyloglucosidase. The isotopologue analysis of glycogen glucose was performed as described above for medium glucose. Measurement of the glycogen content was carried out using the isotopomer $[\text{U-}^{13}\text{C-}^2\text{H}_7]$ -glucose as recovery standard and internal standard quantification procedures. The ion cluster for the $[\text{U-}^{13}\text{C-}^2\text{H}_7]$ -glucose of the glucose aldonitrile pentaacetate derivative was monitored from m/z 339 to m/z 341.

Spectral data were corrected using regression analysis to extract natural ^{13}C enrichment from results [29]. Measurement of ^{13}C label distribution determined the different relative distribution percentages of the mass isotopologues, m_0 (without any ^{13}C labels), m_1 (with one ^{13}C), m_2 (with two ^{13}C) etc., which were reported as molar fractions.

Analysis and modelling of the data using Isodyn

Transfer of ^{13}C from $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -glucose medium into intracellular metabolites was simulated by the Isodyn, a software program, written in C++ and designed for stable isotope tracer data analysis [21-23]. Latest modifications of this software are described in detail in [24].

At first it solves the system of ordinary differential equations (ODE) describing the evolution of concentrations of metabolites shown in Figure 2⁽¹⁾ from some initial state to a steady state, which is defined by the topology of reaction network and parameters of reactions. The metabolism of incubated cells is assumed to be in steady state, although it was not necessary to assume steady state for isotopomers (isotopic steady state). Isotopic isomers of the same metabolites are assumed to be well mixed throughout the cell.

After computing steady state metabolite concentrations and fluxes, Isodyn switches to the second step of analysis, i.e. simulation of time course of all isotopic isomers of considered metabolites. At this step each variable (metabolite concentration computed

1 In fact the ODE system describes pentose phosphate pathway in much more details than Figure 1 shows. It accounts for all the reactions of non-oxidative branch catalyzed by transketolase and transaldolase, although pentose 5-phosphates are represented as one pool. The oxidative branch is lumped to one reaction leading from glucose 6-phosphate to pentose phosphates

at first step) splits in a number of variables in accordance with the corresponding number of isotopomers. At initial moment all metabolites, except added labeled substrate, are assumed non-labeled, and the latter is set in accordance with known isotopomer composition of used labeled substrate. Functions, especially designed for each type of reactions (e.g. carboxylation, decarboxylation, transketolase-type, etc) simulate the transformation of carbon skeleton (specific transitions of labeled carbons), and production and consumption rate for each isotopomer of the considered system. These transformations redistribute ^{13}C isotopes in all metabolites. The individual rates are computed for each isotopomer, thus resulting in the large system of ODEs describing the evolution of all isotopomers. This system is solved using a method of numerical integration that can be chosen arbitrarily (Runge-Kutta, BDF, Dassel). Starting from the initial values corresponding to experimental conditions of incubation, Isodyn simulates real time course of label propagation, thus experimental and computed data for corresponding time points can be compared. In this way, reaching isotopic steady state is not required for such analysis.

The computed concentrations for groups of isotopomers with the same total number of labels were summed and compared with the measured distribution of isotopologues. The fitting of the measured isotopologues was performed using Simulated annealing algorithm. It minimized the sum of squares of differences between experimental (f_i^e) and simulated (f_i^s) fractions of isotopologues normalized by the standard deviations (σ_i^e) of experimental data ($\chi^2 = \sum_i ((f_i^e - f_i^s) / \sigma_i^e)^2$) in global space of parameters.

The best fit of measured label distribution reveals the set of metabolic fluxes consistent with experimental data (the flux of glucose phosphorylation was fixed according to the experimentally determined glucose consumption).

RNA extraction and real-time PCR gene expression analysis

Total RNA was isolated from L6E9 cells using RNeasy mini kit and a QIAcube automat (Qiagen) as recommended. RNA integrity was checked by capillary electrophoresis (Experion, Bio-Rad). Concentration was checked with Ribogreen (Molecular probes) and a Victor-X5 multilabel reader (PerkinElmer). Labelled cDNA was synthesized from 600 ng of total RNA using SuperScript-II, reverse transcriptase and random hexamers as recommended (Invitrogen).

Oligonucleotide sequences for the reverse transcriptase reaction, synthesized by the Eurogentec Company (Angers, France), were as follows: pyruvate carboxylase (PC), *Pc*, rPC-F: TTCCGTGTCCGAGGTGTAAG and rPC-R: CGCTAGGAACTGCTGGTTGTT; pyruvate kinase muscle isozyme, *Pkm2*, rPKm-784F: GAGCAGGACGTGGACATGGT and rPKm-864R: CTCTCCCAGGACCTTCCTAACC; pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1, *Pdha1*, rNm_001004072.2F: TTTGTCTTCTGTGCTGGGAGACTG and rNm_001004072.2R: GTAGATGGGTGGCTTCAAGTTTGC; pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 2, *Pdk2*, rNm_030872.1F: CATGGCTAAGCTCCTGTGTGAC and rNm_030872.1R: GGACGTAGACCATGTGAATGGG; pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4, *Pdk4*, rNm_053551.1F: TGCTCATGAACCAGCACATCCTC and rNm_053551.1R: TCCAATGTGGCTTGGGTTTCC; cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase, *Idh1*, rNm_031510.1F: AGACGTCCACCAATCCCATTGC and rNm_031510.1R: TCAAGCTTTGCTCTGTGGGCTAAC; NADP-dependent malic enzyme, *Me1*, rNm_012600.2F: TGCAAGACCATGGTTCCCAGAC and rNm_012600.2R: AAGCTAAGCCCAGGGACATTAGGG; and cytosolic phosphoenolpyruvate

carboxykinase (PEPCK) 1, *Pck1*, rPEPCK1-2228F: TGGTTCCACTTCGAGGTCACT and rPEPCK1-2310R: CAAGTATGTTTTCTGTGCACTTTAGCT.

Real-time PCR was performed with a Sybreen master mix reagent and using Sureprime core kit (MP biomedical) in an iCycler (Bio-Rad) apparatus. The standard curve method was used for relative quantification of the PCR products and gene expressions were normalized to 18S RNA quantification which has been found to be a reliable internal control gene in our hands and by others [30-32].

Western Blotting

Western Blotting from the different analysis conditions was performed with minor modifications as described previously [33]. Ninety micrograms of protein was loaded on a 10% polyacrylamide-SDS gel that was blotted on a 0.45- μ m nitrocellulose membrane BA85 (Schleicher and Schuell). MultiMark Multi-Colored standard (Invitrogen) was used to determine size of the proteins. Nitrocellulose membranes were blocked for 2 h in TBS (20 mM Tris, pH 7.5; 150 mM NaCl) with 0.1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk. Hybridization of the 1/500 dilution of rabbit monoclonal antibody against PDK2 were used (EPR1948Y, Cliniscience, Nanterre, France) was performed overnight in TBS-Tween 0.1% and 5% nonfat dry milk. After three washes in TBS-Tween 0.1%, horseradish peroxidase conjugate (10^{-4} dilution) was incubated for 1 h with the membrane in TBS-Tween 0.1%, 3% nonfat dry milk. Blots were washed three times in Tween-TBS and one time in TBS; then hybridizations were revealed with SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate according to the manufacturer's protocol (Pierce).

Statistical analysis

Experiments of glucose transport were carried out using three cultures each time for each treatment regimen and then repeated three times. The metabolic characterization assays were performed in triplicate and then repeated twice. The RNAs for PCR assays were isolated from three independent extracts. Statistical analyses of glucose transport and biochemical and metabolite isotopologue distributions were calculated by the two-way ANOVA between groups. Real-time PCR data were statistically analyzed by the one-way ANOVA between groups. 95% or 99% confidence intervals ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) were taken as indicating significant differences in each parameter analyzed. Differences from the mean were considered significant for $p < 0.05$.

In the case of the metabolic fluxes estimated using Isodyn, the 20 sets of fluxes obtained were interdependent and most of them were not normally distributed. Results are expressed as the median and the minimum and maximum of the 20 fluxes obtained. Two fluxes were considered different when their ranges of values did not overlap. Two fluxes were not considered different, since their ranges of values overlapped partially or totally.

RESULTS

Rat recombinant resistin was controlled by SDS-PAGE and was estimated to be pure at over 99 % (Figure 1). Moreover, its endotoxin level was below current FDA limits and its biological activity was validated previously [25].

For the analysis of the effect of resistin on glucose metabolism and on the metabolic response of muscle cells to insulin, L6E9 myotubes were pretreated for 8 hours with or without 100 nM resistin. After preincubation, the myotubes were incubated for a further 6 hours with 10 mM glucose that was 50% enriched in [1,2-¹³C₂]-glucose, in the absence or presence of 100 nM insulin and in the continued presence or absence of resistin.

After 6 hours incubation, glucose consumption, lactate production, and glycogen and G6P intracellular contents were determined (Table 1), as well as the isotopologue distributions in glucose and lactate from incubation medium, and glycogen glucose and ribose isolated from RNA in cell pellets (Table 2). The analysis of the obtained data by Isodyn determined the metabolic flux profile distribution of L6E9 myotubes under the various incubation conditions tested (Table 3). As a visual summary, Figure 2 shows diagrams of the qualitative changes in metabolites and fluxes.

Effect of resistin on the metabolic flux profile of L6E9 myotubes

Isodyn quantified the metabolic flux distribution in L6E9 myotubes incubated in the presence of glucose 10 mM and in the absence of either insulin or resistin (Table 3, first column). Under this incubation condition, these cells had a flux of glucose phosphorylation of 207.9 $\mu\text{M}/\text{min}$. This flux was maintained through the next steps of upper glycolysis (of which flux 1 is representative) until the split of fructose-1,6-bisphosphate into two triose-phosphates by aldolase. From this reaction, the glycolytic flux (from here on, called *lower glycolysis*) (of which flux 3 is representative) increased 2-fold. Additionally, the flux across the oxidative branch of the pentose phosphate pathway (PPP) (flux 2) was around 60 times lower than the upper glycolytic flux. For glycogen metabolism, both glycogen synthase (GS) (flux 4) and glycogen phosphorylase (GP) (flux 5) were active, and glycogen recycling was estimated as 2-3% of the flux of glucose phosphorylation. However, the most significant contribution of using Isodyn to interpret the experimental data was the quantification of the fluxes around the last steps of lower glycolysis and the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Thus, Isodyn revealed that 49% of the phosphoenolpyruvate (PEP) and pyruvate entered the TCA cycle through the reactions catalyzed by pyruvate dehydrogenase complex (PDC) (flux 6) or pyruvate carboxylase (PC) (flux 7): the ratio between these two fluxes was about 1:1. Moreover, 32% of PEP-pyruvate was transformed to lactate, which was transported across the plasma membrane and then accumulated in the culture medium (flux 8). The remaining 19% of PEP-pyruvate was used for protein synthesis or excreted from the cell (flux 9). Furthermore, pyruvate cycling flux (flux 10), which supports the feedback of molecules from the TCA cycle to the PEP-pyruvate pool, was 103.6 $\mu\text{M}/\text{min}$, and the TCA cycle flux (fluxes 12 and 14) was 96 $\mu\text{M}/\text{min}$. These last fluxes were four times lower than the lower glycolytic flux. Finally, hardly any acetyl-CoA output (flux 11) was detected, and the oxaloacetate (OAA) output (flux 15) was low.

On the other hand, L6E9 myotubes treated with 100 nM resistin showed a 30% higher flux of glucose phosphorylation (269.8 $\mu\text{M}/\text{min}$). Fitting of the experimental data from

this incubation condition using Isodyn (Table 3, second column) indicated that resistin increased upper and lower glycolytic fluxes (fluxes 1 and 3, respectively) by 30%. However, resistin decreased the oxidative PPP flux (flux 2). Resistin did not affect the glycogen content of L6E9 myotubes and the glycogen recycling was not affected as indicated by the fact that no changes were observed in the ^{13}C incorporation into glycogen. (Table 2). However, lower values for fluxes 4 and 5 were obtained in the calculations, which correspond to GS and GP fluxes.

Moreover, resistin induced a 20% increase of lactate synthesis flux (flux 8). However, the most significant change was the strong increase in PC and pyruvate cycling fluxes, both 4-fold higher than in cells without resistin. In contrast, PDC flux was not significantly affected and consequently the ratio between PDC and PC fluxes was 1:3.5. Despite the large change in this ratio, resistin did not affect the TCA cycle fluxes (fluxes 12 and 14) or acetyl-coA output (flux 11). However, the flux through glutamate dehydrogenase (GLUD) (flux 13), which was negligible in the absence of resistin, increased to 50.3 $\mu\text{M}/\text{min}$ in the presence of resistin. Finally, resistin sharply reduced the flux of PEP-pyruvate for protein synthesis or excretion from the cell (flux 9), although it increased the flux from OAA for this purpose (flux 15).

Effect of resistin on the metabolic response of insulin in L6E9 myotubes

Having shown that resistin altered the metabolic profile of L6E9 myotubes, we examined its effect on the metabolic response of myotubes to insulin.

We first tested whether resistin affected the stimulation of insulin-induced glucose transport. Thus, the induction of 2-DG transport was assayed after 30 minutes' incubation with 100 nM insulin in L6E9 myotubes treated or not treated with 100 nM resistin. Our results showed that insulin induced a 79.27 ± 0.04 % increase in 2-DG transport in L6E9 myotubes. However, it only induced an increase of 48.00 ± 0.05 % glucose transport in cells that had been pre-treated with 100 nM resistin for 8 hours.

Next, we analyzed the changes in the metabolic flux profile induced by insulin in L6E9 myotubes that were treated or not with 100 nM resistin. On the one hand, in absence of resistin, insulin stimulated a 56% increase in both glucose consumption and lactate production in L6E9 myotubes. There were no changes in glycogen content, but a 150% increase in intracellular G6P content (Table 1). Fitting of experimental data using Isodyn (Table 3, third column) revealed that flux of lactate production was 77% higher than in cells not treated with insulin. Insulin also increased the flux of glucose phosphorylation (fixed as 345.0 $\mu\text{M}/\text{min}$) and the glycolytic fluxes (fluxes 1 and 3) by about 62%, and induced a 9-fold increase in oxidative PPP flux (flux 2). Moreover, fluxes of GS (flux 4) and GP (flux 5) increased in the insulin-treated cells. Unlike the effect provoked by the adipokine resistin, insulin did not affect PC flux (flux 7), but it induced a 2.5-fold increase of the PDC flux (flux 6) and a 2-fold decrease of the pyruvate cycling flux (flux 10). Changes in PDC and PC fluxes induced an imbalance in the ratio between these two fluxes, from 1:1 in the absence of hormones to 3:1 when insulin was added. Furthermore, the TCA cycle fluxes (fluxes 12 and 14) and GLUD flux (flux 13) increased 136% and 10-fold, respectively, indicating that insulin activated the TCA cycle in L6E9 myotubes. Resistin also led to a 3-fold increase in the flux of acetyl-CoA output (flux 11), which may have been used for *de novo* fatty acid synthesis. Moreover, insulin did not affect the PEP-pyruvate or OAA output fluxes (fluxes 9 and 15, respectively).

On the other hand, in presence of resistin, insulin only increased the flux of glucose phosphorylation from 269.8 to 300.8 $\mu\text{M}/\text{min}$. Insulin increased the glycolytic fluxes (fluxes 1 and 3) by only 9-10% in L6E9 myotubes treated with resistin (Table 3, fourth column). However, lactate production and lactate dehydrogenase flux (flux 8) increased by 41% and 51%, respectively with regard to the condition of resistin-treated cells. Furthermore, insulin induced a similar increase in the oxidative PPP flux (flux 2) in both treated and non-treated resistin cells. For glycogen synthesis and degradation, insulin increased both GS (flux 4) and GP (flux 5) fluxes: the values were similar to those calculated in insulin-stimulated non-treated resistin cells.

Interestingly, insulin did not increase PDC (flux 6), citrate synthase (flux 12) or the acetyl-CoA output (flux 11) fluxes when cells were treated with resistin. Moreover, insulin decreased 2-fold the flux from citrate to malate/OAA (flux 14) and 50-fold the oxaloacetate output flux (flux 15) in resistin-treated cells. Most importantly, resistin prevented insulin from increasing the ratio between the PDC and PC fluxes and decreasing the pyruvate cycling flux.

Thus, the final metabolic state of insulin-stimulated L6E9 myotubes did not coincide in cells treated or not with resistin. Some fluxes were equal in resistin-treated and non-treated cells, such as the oxidative PPP flux, the GS and GP fluxes, and the lactate dehydrogenase and PEP-pyruvate output fluxes. But most of the quantified fluxes were lower in resistin-treated cells. Only PC, pyruvate cycling and GLUD fluxes were higher in resistin-treated than in non-treated cells after stimulation with insulin.

Effect of resistin on the gene expression of enzymes involved in the PDC, PC and pyruvate cycling fluxes in L6E9 myotubes

The sets of fluxes shown in Table 3 indicate that resistin plays a crucial role in the regulation of the entrance and exit of pyruvate into mitochondria, altering the ratio between the PDC and PC fluxes and increasing the pyruvate cycling flux. Interestingly, these effects cannot be counteracted by insulin. To investigate further whether the observed effect on these fluxes was prompted by a change in the gene expression of any of the enzymes involved in their activities, we analyzed the gene expression levels of several enzymes involved in the pyruvate homeostasis at the end of the four incubation conditions tested.

FIGURE 3

Our results show that neither insulin, nor resistin, nor the combination of the two hormones had a statistically significant effect on Pc or Pkm2 mRNA levels (Figures 3A and 3B). However, insulin, but not resistin, increased Pdha1 and decreased Pdk2 mRNA levels (Figures 3C and 3D). Curiously, the presence of resistin did not affect to the decrease in Pdk2 mRNA levels, but prevented the increase in Pdha1 mRNA levels. With regard to Pdk4, its mRNA expression was decreased by both hormones (Figure 3E). These results indicate that resistin prevents the insulin-induced increase in the expression of the enzyme pyruvate dehydrogenase E1, but not the activation of the protein caused by the reduction of the pyruvate dehydrogenase kinase -2 and -4-induced phosphorylation.

Moreover, the gene expression levels of the main enzymes responsible of pyruvate cycling were analyzed. Thus, the mRNA levels of Idh1) and Me1, both causes of pyruvate cycling increasing the production of NADPH, were not affected by any of the hormones tested in these conditions (Figures 3F and 3G). However, insulin significantly decreased Pck1 mRNA levels in the absence of resistin, by 50%, but not in presence of resistin (Figure 3H). According to these results, resistin may prevent the insulin-induced

inhibition of Pck1 gene expression, which indicates that the flux through PEPCCK may be active in the presence of resistin, irrespective of the presence or absence of insulin. Western blot analysis revealed that PDK2 level diminished in presence of insulin, although the levels were maintained in presence of resistin (Figure 4). Nevertheless, antibodies tested in these analyses did not detect significant amount of PDH, PDK4 or any significant variation of PEPCCK level (data not shown) in L6E9 myotubes.

FIGURE 4

DISCUSSION

Following the discovery of several adipocyte-secreted molecules, including lipid metabolites and adipokines, adipocytes are recognized as forming endocrine tissue [6]. By means of these molecules, adipocytes communicate with other tissues and organs and regulate lipid and glucose metabolism, energy balance, insulin action and cell proliferation. Resistin was identified as an adipokine, and it was suggested that it might link obesity and insulin resistance [7,8]. However, the role of resistin in the pathophysiology of insulin resistance in humans and animals, and how it acts in muscle, liver and fat are controversial issues [9,11]. Here, we further investigated the effect of resistin on basal and insulin-stimulated glucose metabolism in L6E9 rat myotubes. We used tracer-based metabolomics and in-house Isodyn software to analyze quantitatively the metabolic flux distribution profile in this cell line under the different incubation conditions tested. The response to insulin and other hormone stimuli is similar to that observed in skeletal muscle *in vivo* [26]. L6E9 cells are thus considered suitable models for the analysis of the effect of resistin on glucose metabolism and on the metabolic response of muscle cells to insulin.

The analysis with Isodyn data provided an overview of the central carbon metabolism of L6E9 skeletal muscle cells. The analysis was performed assuming metabolic steady state (although not assuming isotopic steady state), and also rapid mixing of isotopic isomers of the same metabolite throughout intracellular compartments. The incubation at high excess of glucose ensures the possibility of required glucose uptake during whole incubation time. Since the other conditions of incubation did not change, the assumption of metabolic steady state seems reasonable. Rapid mixing of isotopic isomers of the same metabolites throughout the cell is usually accepted in analysis of stable isotope tracer data [34]. The fitting of experimental data in the framework of these assumptions pointed out to the set of metabolic fluxes underlying the measured isotopic isomer distributions.

According to our results, L6E9 myotubes were highly glycolytic, with active glycogen synthesis and degradation, as well as active TCA cycle operation and *de novo* fatty acid synthesis (from acetyl-CoA). However, oxidative PPP was poorly active in these cells. Furthermore, the use of the same tools revealed that insulin activated glucose uptake and phosphorylation, glycolysis, glycogen synthesis, the oxidative branch of the PPP, the TCA cycle and *de novo* fatty acid synthesis, whereas it decreased pyruvate cycling through the inhibition of Pck1 gene expression. Furthermore, insulin altered the ratio between the PDC and PC fluxes, increasing the PDC flux through the increase of Pdh1 and the decrease of Pdk2 and Pdk4 mRNA levels. The effects of insulin on the L6E9 myotube metabolic flux distribution reported in this paper correlate with the known activation of PDC and the inhibition of PEPCCK gene expressions and the increase in glycogen synthesis and glucose uptake previously published using other approaches [35-37].

With regard to the effects of resistin our results revealed that, in the absence of insulin, this adipokine activated glucose phosphorylation and the glycolytic pathway. Also, resistin did not affect the muscle glycogen content. However, despite the glycogen label enrichment (reflected in m2 values) was not statistically different, resistin tends to decrease the glycogen m2 value. The analysis with Isodyn of this slight decrease was sensitive enough to estimate lower values for GS and GP fluxes when cells were treated

with resistin. This tendency would be in agreement with lower glycogen synthesis, based on the lower ^{14}C incorporation into glycogen measured in incubations with ^{14}C -labeled glucose, described by other authors in resistin-treated L6 cells [15]. Furthermore, our approach showed that the flux through GLUD was higher in resistin-treated cells, while citrate synthase, citrate to malate/OAA and acetyl-CoA output fluxes were not affected. But the most significant effect is the huge imbalance in the ratio between the PDC and PC fluxes, increasing the entrance of pyruvate through PC into mitochondria, although Pc, Pdha1 and Pdk2 mRNA levels and protein (data not shown) were not affected by this hormone. PC activity is finely regulated by mechanisms such as allosteric activation by acetyl carnitine, which was not tested here. Furthermore, resistin induced a strong activation of the pyruvate cycling flux. Three different pyruvate cycling mechanisms have been described in other cellular types: involving PEPCK, involving the cytosolic isocitrate dehydrogenase and involving the NADP-dependent malic enzyme. These two last pathways have been described as key for beta cells and tumour cells, respectively, and are involved in NADPH production. Resistin did not affect Idh1 or Me1 mRNA levels, but it slightly increased Pck1 mRNA level which was also confirmed by a modestly increased signal in western blot analysis (data not shown). This increase correlates with the recently described higher PEPCK gene expression levels found in derived hepatic cell lines treated with this hormone [38,39].

We also showed that resistin affects the normal metabolic response of L6E9 myotubes to insulin. Thus, the increase in the glucose uptake and the glycolytic flux induced by insulin were lower in resistin-treated myotubes. These results are in line with those published by other authors for L6 muscle cells [14-16,40] and trophoblast cells [41]. However, resistin treatment did not affect the insulin-stimulated increase of glycogen content and recycling.

Moreover, in resistin-treated cells, insulin did not increase PDC and the pyruvate cycling flux. Pyruvate cycling flux was accompanied by a not significant 24% reduction of Pck1 mRNA levels. Interestingly, in absence of resistin treatment, insulin-induced decrease in Pck1 gene expression was much higher (50%).

Fluxes through the TCA cycle and acetyl-CoA output fluxes were not increased, but maintained or reduced, by insulin in resistin-treated cells. This lack of metabolic activation in response to insulin may be explained by: i) the slight increase observed in glucose uptake and ii) the high TCA cycle anaplerosis through PC and PEPCK-mediated pyruvate cycling, which impaired the increase in the levels of glycolytic intermediates available to be metabolized through other metabolic pathways. Our results provide mechanistic explanations for the observations of Palanivel and co-workers [15], who reported that the insulin-stimulated oxidation of glucose *via* the TCA cycle was reduced by resistin.

The increase of pyruvate cycling and GLUD fluxes together with the OAA output would be producing a decreased in the levels of metabolic intermediates available to be metabolized in TCA cycle and this reduction would compromise the oxidative respiration of the cell. Future research is necessary in order to deepen in the study of this part of our observations. However, our research will provide new avenues for future investigations.

Our overall results show that resistin significantly alters L6E9 myotube glucose metabolism and its response to insulin. Of the whole set of metabolic changes induced by resistin in L6E9 myotubes, the imbalance in the PDC and PC fluxes and the high pyruvate cycling flux detected, which are not affected by insulin, should be emphasized. Thus we suggest that, in the presence of resistin, the metabolic response of muscle cell is directed to maintain the TCA cycle anaplerosis through PEPCK-mediated pyruvate cycling even in the presence of insulin, which would lead to an important metabolic imbalance in the central carbon metabolic pathways of L6E9 myotubes.

In conclusion, our results support the idea that metabolic disorders, such as diabetes, are caused by complex multi-molecular interactions that cannot readily be explained by an alteration in a single gene, gene product or enzymatic cascade. The strength of results obtained on the effects of insulin on L6E9 metabolism, found here by combining tracer-based metabolomics data and flux analysis using Isodyn, showed that this approach is a suitable tool to study the effects of hormones on myocyte glucose metabolic network. The new insights on metabolic reprogramming induced by resistin in absence/presence of insulin, reported here using this combined approach, revealed that the disruption of pyruvate homeostasis, through the dramatic increase of PC and pyruvate cycling fluxes, is a key player in the mechanism through which resistin induces a lack of metabolic response of myocytes to insulin.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Robin Rycroft of the Language Service of the Universitat de Barcelona for valuable assistance in the preparation of the manuscript.

FUNDING

This study was supported by the project SAF2011-25726 and by RD06/0020/0046 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto de Salud Carlos III, both funded by the Ministerio de Ciencia e Innovación-Spanish government and European Regional Development Funds (ERDF) “Una manera de hacer Europa”. It has also received financial support from the European Union-funded project ETHERPATHS (FP7-KBBE-222639) (<http://www.etherpaths.org/>) and from the Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR)-Generalitat de Catalunya (2009SGR01308, 2006ITT-10007 and 2009CTP-00026). MC acknowledges the support received through the prize “ICREA Academia” for excellence in research, funded by ICREA foundation-Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

- 1 Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. and King, H. (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. **27**, 1047-1053
- 2 Lavie, C.J., Milani, R. V. and Ventura, H. O. (2009) Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 1925-1932
- 3 Gauthier, M.S. and Ruderman, N. B. (2010) Adipose tissue inflammation and insulin resistance: all obese humans are not created equal. *Biochem. J.* **430**, e1-e4.
- 4 Lolmède, K., Duffaut, C., Zakaroff-Girard, A. and Bouloumie, A. (2011) Immune cells in adipose tissue: Key players in metabolic disorders. *Diabetes Metab.* doi: 10.1016/j.diabet.2011.03.00
- 5 Donath, M.F. and Shoelson, S. E. (2011) Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 98-107
- 6 Samaras, K., Botelho, N. K., Chisholm, D. J., Lord, R. V. (2010) Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Obesity*. **18**, 884-889
- 7 Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S. and Lazar, M. A. (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307-312
- 8 Holcomb, I. N., Kabakoff, R. C., Chan, B., Baker, T. W., Gurney, A., Henzel, W., Nelson, C., Lowman, H. B., Wright, B. D., Skelton, N. J., Frantz, G. D., Tumas, D. B., Peale, F. V., Jr., Shelton, D. L. and Hebert, C. C. (2000) FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *Embo J.* **19**, 4046-4055
- 9 Schwartz, D. R. and Lazar, M. A. (2011) Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends Endocrinol. Metab.* **22**, 259-265
- 10 Lazar, M. A. (2007). Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Horm. Metab. Res.* **39**, 710-716
- 11 Qatanani, M., Szwegold, N. R., Greaves, D. R., Ahima, R. S. and Lazar, M. A. (2009) Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 531-539
- 12 DeFronzo, R. A. (1997) Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth. J. Med.* **50**, 191-197
- 13 DeFronzo, R. A. (1988) Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*. **37**, 667-687
- 14 Moon, B., Kwan, J. J., Duddy, N., Sweeney, G., and Begum, N. (2003) Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**, E106-E115
- 15 Palanivel, R., Maida, A., Liu, Y. and Sweeney, G. (2006) Regulation of insulin signalling, glucose uptake and metabolism in rat skeletal muscle cells upon prolonged exposure to resistin. *Diabetologia* **49**, 183-190

- 16 Fan, H. Q., Gu, N., Liu, F., Fei, L., Pan, X. Q., Guo, M., Chen, R. H., and Guo, X. R. (2007) Prolonged exposure to resistin inhibits glucose uptake in rat skeletal muscles. *Acta. Pharmacol. Sin.* **28**, 410-416
- 17 Jorgensen, S. B. Honeyman, J., Oakhill, J. S., Fazakerley, D., Stockli, J., Kemp, B. E., and Steinberg, G. R. (2009) Oligomeric resistin impairs insulin and AICAR-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle by inhibiting GLUT4 translocation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**, E57-E66
- 18 Palanivel, R. and Sweeney, G. (2005) Regulation of fatty acid uptake and metabolism in L6 skeletal muscle cells by resistin. *FEBS Lett.* **579**, 5049-5054
- 19 Satoh, H., Nguyen, M. T., Miles, P. D., Imamura, T., Usui, I., and Olefsky, J. M. (2004) Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J. Clin. Invest.* **114**, 224-231
- 20 Dettmer, K. and Hammock, B. D. (2004) Metabolomics--a new exciting field within the "omics" sciences. *Environ. Health. Perspect.* **112**, A396-A397
- 21 Selivanov, V. A., Marin, S., Lee, P. W. and Cascante, M. (2006) Software for dynamic analysis of tracer-based metabolomic data: estimation of metabolic fluxes and their statistical analysis. *Bioinformatics* **22**, 2806-2812
- 22 Selivanov, V. A., Meshalkina, L. E., Solovjeva, O. N., Kuchel, P. W., Ramos-Montoya, A., Kochetov, G. A., Lee, P. W. and Cascante, M. (2005) Rapid simulation and analysis of isotopomer distributions using constraints based on enzyme mechanisms: an example from HT29 cancer cells. *Bioinformatics* **21**, 3558-3564
- 23 Selivanov, V. A., Puigjaner, J., Sillero, A., Centelles, J. J., Ramos-Montoya, A., Lee, P. W. and Cascante, M. (2004) An optimized algorithm for flux estimation from isotopomer distribution in glucose metabolites. *Bioinformatics* **20**, 3387-3397
- 24 Selivanov, V. A., Vizán, P., Mollinedo, F., Fan T. W., Lee, P. W and Cascante, M. (2010) Edelfosine-induced metabolic changes in cancer cells that precede the overproduction of reactive oxygen species and apoptosis. *BMC Syst. Biol.* **4**, 135
- 25 Cifani, C., Durocher, Y., Pathak, A., Penicaud, L., Smih, F., Massi, M., Rouet, P. and Polidori, C. (2009) Possible common central pathway for resistin and insulin in regulating food intake. *Acta Physiol. (Oxf.)* **196**, 395-400
- 26 Suarez, E., Bach, D., Cadefau, J., Palacin, M., Zorzano, A. and Guma, A. (2001) A novel role of neuregulin in skeletal muscle. Neuregulin stimulates glucose uptake, glucose transporter translocation, and transporter expression in muscle cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 18257-18264
- 27 Marin, S., Lee, W. N., Bassilian, S., Lim, S., Boros, L. G., Centelles, J. J., Fernández-Novell, J. M., Guinovart, J. J. and Cascante, M. (2004) Dynamic profiling of the glucose metabolic network in fasted rat hepatocytes using [1,2-¹³C₂]glucose. *Biochem. J.* **381**, 287-294
- 28 Vizán, P., Sánchez-Tena, S., Alcarraz-Vizán, G., Soler, M., Messeguer, R., Pujol, M. D., Lee, W. N. and Cascante, M. (2009) Characterization of the metabolic changes underlying growth factor angiogenic activation: identification of new potential therapeutic targets. *Carcinogenesis* **30**, 946-952
- 29 Lee, W. N., Byerley, L. O., Bergner, E. A. and Edmond, J. (1991) Mass isotopomer analysis: theoretical and practical considerations. *Biol. Mass Spectrom.* **20**, 451-458

- 30 Harmancey, R., Senard, J. M., Rouet, P., Pathak, A. and Smih, F. (2007) Adrenomedullin inhibits adipogenesis under transcriptional control of insulin. *Diabetes* **56**, 553-563
- 31 Schmittgen, T.D. and Zakrajsek, B. A. (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods* **46**, 69-81
- 32 Aerts, J.L., Gonzales, M. I. and Topalian, S. L. (2004) Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques* **36**, 84-86, 88, 90-91
- 33 Couderc, P. P., Smih, F., Hall, J.E., Pathak A., Roncalli, J., Harmancey, R., Massabuau, P., Galinier, M., Verwaerde, P., Senard, J., M. and Rouet, P. (2004) Kinetic analysis of cardiac transcriptome regulation during chronic high-fat diet in dogs. *Physiol. Genomics*. **19**, 32-40.
- 34 van Winden, W., Verheijen, P. and Heijnen, S. (2001) Possible pitfalls of flux calculations based on (13)C- labeling. *Metab. Eng.* **3**, 151-162.
- 35 Quinn, P.G. and Yeagley, D. (2005). Insulin regulation of PEPCK gene expression: a model for rapid and reversible modulation. *Curr. Drug. Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* **5**, 423-437
- 36 Lee, F. N., Zhang, L., Zheng, D., Choi, W. S. and Youn, J. H. (2004) Insulin suppresses PDK-4 expression in skeletal muscle independently of plasma FFA. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **287**, E69-E74
- 37 Stephens, F. B., Norton, L., Jewell, K., Chokkalingam, K., Parr, T. and Tsintzas, K. (2010) Basal and insulin-stimulated pyruvate dehydrogenase complex activation, glycogen synthesis and metabolic gene expression in human skeletal muscle the day after a single bout of exercise. *Exp. Physiol.* **95**, 808-818
- 38 Luo, Z., Zhang, Y., Li, F., He, J., Ding, H., Yan, L. and Cheng, H. (2009) Resistin induces insulin resistance by both AMPK-dependent and AMPK-independent mechanisms in HepG2 cells. *Endocrine* **36**, 60-69
- 39 Li, F. P., He, J., Li, Z. Z., Luo, Z. F., Yan, L. and Li, Y. (2009) Effects of resistin expression on glucose metabolism and hepatic insulin resistance. *Endocrine* **35**, 243-251
- 40 Niederwanger, A., Kranebitter, M., Ciardi, C., Tatarczyk, T., Patsch, J. R. and Pedrini, M. T. (2007) Resistin impairs basal and insulin-induced glycogen synthesis by different mechanisms. *Mol. Cell. Endocrinol.* **263**, 112-119
- 41 Di Simone, N. F., Di Nicuolo, F., Marzioni, D., Castellucci, M., Sanguinetti, M., D'Ippolito, S. and Caruso, A. (2008) Resistin modulates glucose uptake and glucose transporter-1 (GLUT-1) expression in trophoblast cells. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 388-397.

TABLES

TABLE 1: Biochemical parameters in L6E9 myotubes after different incubations with resistin and/or insulin.

L6E9 myotubes were treated (Res+) or not treated (Res-) with 100 nM resistin for 8 hours and were then incubated for 6 hours in the absence (Ins-) or in the presence (Ins+) of 100 nM insulin. Glucose consumption, lactate production, glycogen and glucose-6-phosphate intracellular contents were determined, as described in Experimental. Results are expressed as mean value \pm standard deviation (n=3). (*) indicates $p < 0.05$ and (**) $p < 0.01$ compared with the condition of neither resistin nor insulin. (#) indicates $p < 0.05$ and (##) $p < 0.01$ compared with the L6E9 myotubes only treated with resistin.

TABLE 2: Isotopologue distribution of lactate, glucose isolated from glycogen and ribose from RNA of L6E9 myotubes after different incubations with resistin and/or insulin.

L6E9 myotubes were treated (Res+) or not treated (Res-) with 100 nM resistin for 8 hours and were then incubated for 6 hours with 10 mM glucose, 50%-enriched in [1,2-¹³C₂]-glucose in the absence (Ins-) or in the presence (Ins+) of 100 nM insulin. Isotopologue distributions at the end of incubations were determined, as described in Experimental. Results are expressed as mean value \pm standard deviation (n=3). (*) indicates $p < 0.05$ and (**) $p < 0.01$ compared with condition of neither resistin nor insulin. (#) indicates $p < 0.05$ and (##) $p < 0.01$ compared with the L6E9 myotubes only treated with resistin.

TABLE 3: Metabolic fluxes adjusted by Isodyn for the different incubation conditions.

Principal fluxes of central carbon metabolism calculated in L6E9 myotubes treated (Res+) or not treated (Res-) with 100 nM resistin for 8 hours and then incubated for 6 hours with 10 mM glucose, 50%-enriched in [1,2-¹³C₂]-glucose in the absence (Ins-) or in the presence (Ins+) of 100 nM insulin. Glucose phosphorylation flux was fixed according to the glucose consumption measured (Table 1). The remaining fluxes are expressed with the median values and the minimum and maximum values from the 20 best flux sets. χ^2 values for the averages were: Ins- Res-: 2.77; Ins- Res+: 7.56; Ins+ Res-: 10.9; Ins+ Res+: 4.23. (*) indicates that the flux is different to the condition of neither insulin nor resistin, and (#) indicates that the flux differs from the condition in which the cells were only treated with resistin. Abbreviations used in this Table are: PPP, pentose phosphate pathway; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PEP, phosphoenolpyruvate; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; OAA, oxaloacetate.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Analysis of rat resistin purification on SDS-PAGE.

A 4-12 % gradient NuPAGE Bis-Tris gel (Invitrogen) was used with MES buffer (Invitrogen). Lane 1 : Cell lysate ; Lane 2 : Talon column flow through ; Lane 3: column wash 1 ; Lane 4 : column wash 2 ; Lane 5 : Column elution. Eluat concentration was estimated at 0.88 mg/ml (Biorad Dc Protein assay) vs a BSA standard curve.

FIGURE 2: Metabolic fluxes in L6E9 myotubes not treated and treated with resistin and/or insulin.

L6E9 myotubes were treated (Res+) or not treated (Res-) with 100 nM resistin for 8 hours and then incubated for 6 hours with 10 mM glucose, 50%-enriched in [1,2-¹³C₂]-D-glucose in the absence or in the presence of 100 nM insulin. Fluxes were estimated using the software Isodyn. Arrow sizes indicate net fluxes in L6E9 myotubes not treated (Res-) or treated (Res+) with resistin that were incubated in the absence of insulin. Colors indicated flux fold changes in response to insulin. Fluxes plotted are the median values from the 20 best flux sets (Table 3). Gray-coloured fluxes have not been measured. Abbreviations used in this Figure are: FBP, fructose-1,6-bisphosphate; Hexose-P, glucose-6-phosphate and its isomers; Mal, malate; OAA, oxaloacetate; Pentose-P, ribose-5-phosphate and its isomers; PEP, phosphoenolpyruvate; PYR, pyruvate; Triose-P, glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate.

FIGURE 3: Gene expression levels of enzymes related with pyruvate homeostasis.

L6E9 myotubes were treated (Res+) or not treated (Res-) with 100 nM resistin for 8 hours and then incubated for 6 hours with 10 mM glucose in the absence (Ins-) or in the presence (Ins+) of 100 nM insulin. Real time PCR monitoring of mRNA levels of pyruvate carboxylase (*Pc*) (A), pyruvate kinase muscle isozyme (*Pkm2*) (B), pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1 (*Pdha1*) (C), pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 2 (*Pdk2*) (D), pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4 (*Pdk4*) (E), cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase (*Idh1*) (F), NADP-dependent malic enzyme (*Me1*) (G) and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (*Pck1*) (H) are shown. Results from three experiments are expressed as mean value ± S.E.M. (*) indicates p<0.05 and (**) p<0.01 compared with condition of neither resistin nor insulin. (#) indicates p<0.05 and (###) p<0.01 compared with the L6E9 myotubes only treated with resistin.

FIGURE 4: Western blot analysis of pyruvate dehydrogenase kinase 2 (PDK2) level.

L6E9 myotubes were treated or not treated with 100 nM resistin for 8 hours and then incubated for 6 hours with 10 mM glucose in the absence or in the presence of 100 nM insulin. For C (control), no treatment was done. IR indicates the addition of insulin (100 nM) and resistin (100 nM), R is resistin only and I is insulin only as supplements in the cell culture medium. Pyruvate dehydrogenase kinase 2 (PDK2) is indicated by a triangle and displayed a molecular mass of 46 kDa as expected.

TABLE 1

	Incubation condition			
	Ins-		Ins+	
	Res-	Res+	Res-	Res+
Glucose consumption (mM)	0.50 ± 0.04	0.61 ± 0.06 *	0.78 ± 0.03 **	0.70 ± 0.09
Lactate production (mM)	0.48 ± 0.01	0.56 ± 0.02 **	0.75 ± 0.06 **	0.79 ± 0.02 #
Glycogen (µg/mg prot)	9.88 ± 1.99	9.97 ± 0.98	11.34 ± 0.59	11.62 ± 1.21
Glucose-6-phosphate (mM/mg prot)	0.92 ± 0.14	1.44 ± 0.28	2.30 ± 0.29 **	2.10 ± 0.19 #

TABLE 2

Isotopologue distributions (%)				
Incubation condition				
	Ins-		Ins+	
	Res-	Res+	Res-	Res+
<i>Lactate</i>				
m0	88.56 ± 0.98	88.74 ± 0.25	87.68 ± 0.22	87.63 ± 0.17
m1	0.70 ± 0.34	0.48 ± 0.11	0.63 ± 0.06	0.52 ± 0.14
m2	10.53 ± 0.30	10.85 ± 0.15	11.69 ± 0.05 *	11.78 ± 0.11
m3	0.21 ± 0.63	0.07 ± 0.18	0.00 ± 0.11	0.07 ± 0.13
<i>Glycogen</i>				
m0	67.28 ± 0.65	69.20 ± 1.41	65.14 ± 1.08	64.48 ± 0.45
m1	0.29 ± 0.03	0.36 ± 0.14	0.96 ± 0.10	0.84 ± 0.10
m2	31.78 ± 0.74	29.91 ± 1.02	33.20 ± 1.18	33.78 ± 0.76
m3	0.53 ± 0.19	0.43 ± 0.28	0.43 ± 0.07	0.60 ± 0.20
m4	0.00 ± 0.02	0.00 ± 0.06	0.17 ± 0.05	0.15 ± 0.02
<i>Ribose</i>				
m0	96.13 ± 0.55	94.28 ± 0.76	94.47 ± 0.48	92.83 ± 1.18
m1	1.34 ± 0.23	1.45 ± 0.11	2.56 ± 0.14	2.97 ± 0.15
m2	0.68 ± 0.19	1.14 ± 0.16 *	1.18 ± 0.09 *	1.40 ± 0.23
m3	1.17 ± 0.63	1.56 ± 0.58	0.87 ± 0.17	1.14 ± 0.32
m4	0.50 ± 0.44	1.17 ± 0.22 *	0.61 ± 0.14	1.17 ± 0.41

TABLE 3

		Metabolic fluxes ($\mu\text{M}/\text{min}$)								
		Incubation condition								
Flux n°	Flux reaction	Ins -				Ins +				
		Res -		Res +		Res -		Res +		
		Median	[min - max]	Median	[min - max]	Median	[min - max]	Median	[min - max]	
0	Glucose phosphorylation	207.9		269.8		345.0		300.8		
<i>Glycolytic and PPP fluxes:</i>										
1	Phosphofructokinase	206.6	[206.5–206.8]	269.2*	[269.1–269.4]	334.1*	[331.9–337.3]	292.6 [#]	[291.6–293.4]	
2	Oxidative branch of PPP	3.3	[3.1–3.4]	1.6*	[1.3–1.9]	29.8*	[22.1–37.3]	21.0 [#]	[18.6–23.7]	
3	GAPDH	414.3	[414.0–414.7]	539.0*	[538.8–539.3]	678.1*	[676.2–681.1]	592.0 [#]	[591.0–593.0]	
<i>Glycogen-related fluxes:</i>										
4	Glycogen synthase	5.0	[4.8–5.1]	4.3*	[4.1–4.5]	6.4*	[6.1–6.7]	6.8 [#]	[6.7–7.1]	
5	Glycogen phosphorylase	4.8	[4.7–4.8]	4.2*	[4.0–4.5]	5.5*	[5.4–5.8]	5.5 [#]	[5.3–5.7]	
<i>Pyruvate homeostasis-related fluxes:</i>										
6	Pyruvate dehydrogenase complex	112.2	[59.4–144.2]	155.0	[139.5–185.5]	274.1*	[209.5–349.0]	141.9	[131.6–163.2]	
7	Pyruvate carboxylase	140.0	[100.9–193.9]	569.0*	[498.0–645.1]	88.7	[36.3–107.5]	407.4	[314.1–499.1]	
8	Lactate dehydrogenase	166.6	[165.5–167.8]	200.4*	[192.3–209.0]	295.2*	[267.3–316.8]	302.0 [#]	[295.8–304.5]	
9	PEP and pyruvate output	98.7	[69.2–165.4]	4.5*	[2.4–5.6]	61.1	[12.5–140.6]	60.3 [#]	[32.2–74.8]	
10	Pyruvate cycling	103.6	[77.7–153.1]	406.8*	[267.0–483.2]	46.5*	[20.9–60.4]	313.9	[235.8–402.7]	
<i>Tricarboxylic acid cycle fluxes:</i>										
11	Acetyl-CoA output	14.0	[3.5–19.3]	15.1	[13.0–26.5]	44.2*	[34.1–97.6]	13.2	[9.5–23.4]	
12	Citrate synthase	96.2	[55.9–125.2]	139.3	[123.6–159.0]	227.9*	[164.7–280.6]	130.2	[119.2–145.0]	
13	Glutamate dehydrogenase	0.2	[0.0–0.4]	50.3*	[22.8–64.8]	2.0*	[1.3–5.6]	86.9 [#]	[75.7–96.8]	
14	Citrate → malate/OAA	95.8	[55.9–125.1]	96.3	[68.0–109.7]	226.4*	[160.1–278.0]	44.1 [#]	[30.9–54.4]	
15	OAA output	34.3	[22.5–42.3]	118.0*	[90.3–163.6]	38.3	[12.8–50.9]	2.4 [#]	[1.6–3.2]	

FIGURE 1

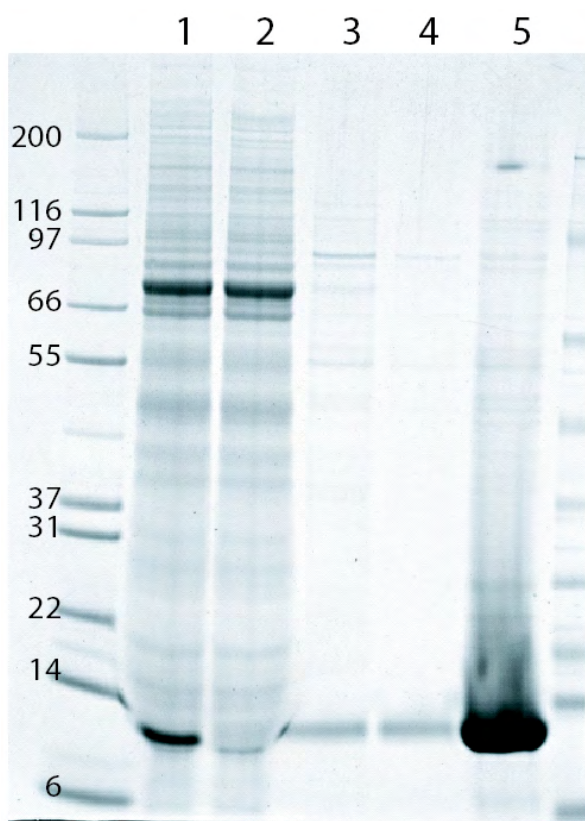


FIGURE 2

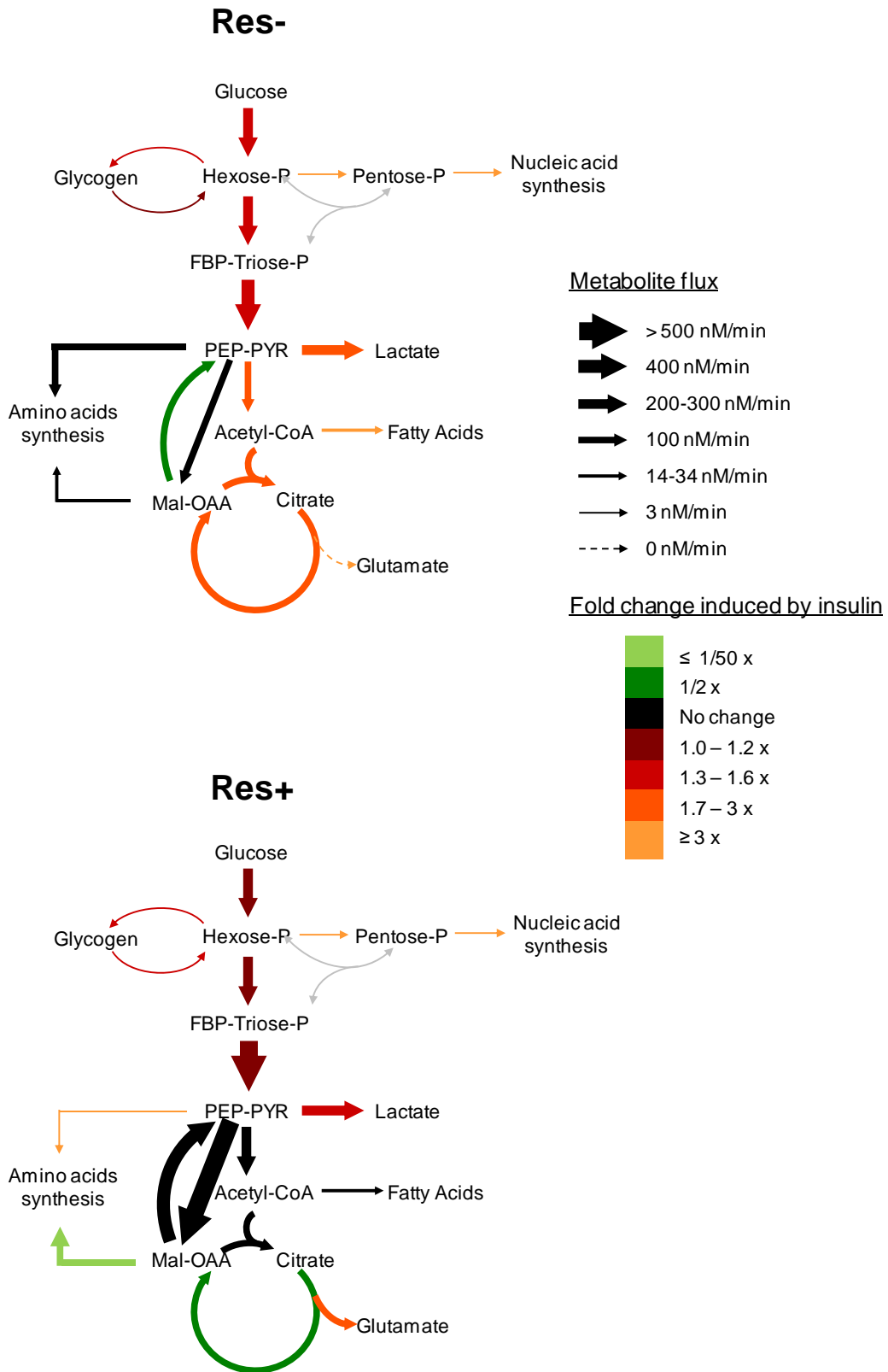


FIGURE 3

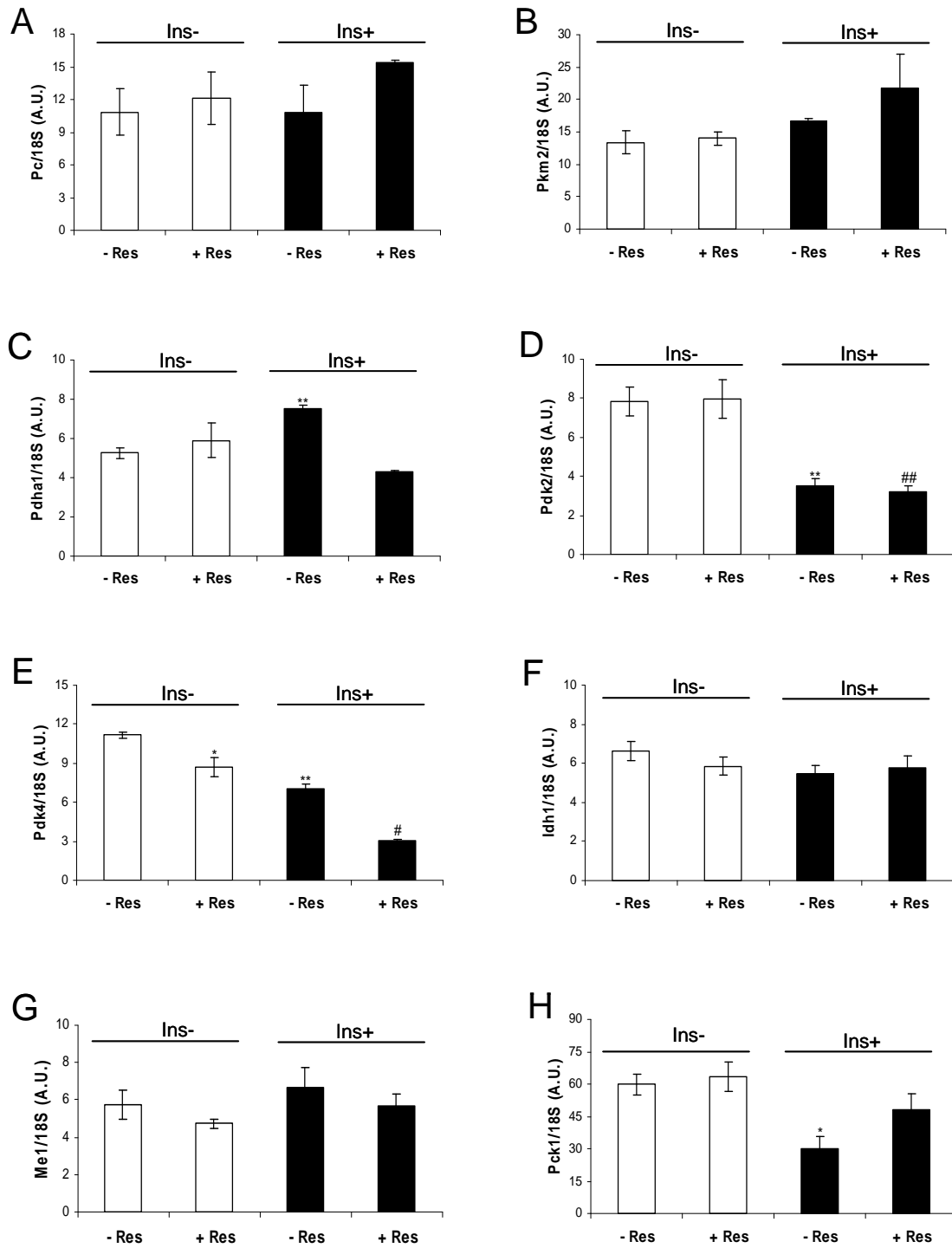


FIGURE 4



Références bibliographiques

Aasum E, Belke DD, Severson DL, Riemersma RA, Cooper M, Andreassen M, Larsen TS (2002) Cardiac function and metabolism in Type 2 diabetic mice after treatment with BM 17.0744, a novel PPAR-alpha activator. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**: H949-957

Abramson J, Svensson-Ek M, Byrne B, Iwata S (2001) Structure of cytochrome c oxidase: a comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1544**: 1-9

Abu-Hamad S, Sivan S, Shoshan-Barmatz V (2006) The expression level of the voltage-dependent anion channel controls life and death of the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5787-5792

Alaynick WA, Kondo RP, Xie W, He W, Dufour CR, Downes M, Jonker JW, Giles W, Naviaux RK, Giguere V, Evans RM (2007) ERRgamma directs and maintains the transition to oxidative metabolism in the postnatal heart. *Cell Metab* **6**: 13-24

Albert TS, Duchateau PN, Deeb SS, Pullinger CR, Cho MH, Heilbron DC, Malloy MJ, Kane JP, Brown BG (2005) Apolipoprotein L-I is positively associated with hyperglycemia and plasma triglycerides in CAD patients with low HDL. *J Lipid Res* **46**: 469-474

Alcala S, Klee M, Fernandez J, Fleischer A, Pimentel-Muinos FX (2008) A high-throughput screening for mammalian cell death effectors identifies the mitochondrial phosphate carrier as a regulator of cytochrome c release. *Oncogene* **27**: 44-54

Allan CM, Taylor JM (1996) Expression of a novel human apolipoprotein (apoC-IV) causes hypertriglyceridemia in transgenic mice. *J Lipid Res* **37**: 1510-1518

Altschuld RA, Hohl CM, Castillo LC, Garleb AA, Starling RC, Brierley GP (1992) Cyclosporin inhibits mitochondrial calcium efflux in isolated adult rat ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* **262**: H1699-1704

An D, Rodrigues B (2006) Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**: H1489-1506

Andreeva L, Tanveer A, Crompton M (1995) Evidence for the involvement of a membrane-associated cyclosporin-A-binding protein in the Ca(2+)-activated inner membrane pore of heart mitochondria. *Eur J Biochem* **230**: 1125-1132

Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, Ahmad F, Matsui T, Chin S, Wu PH, Rybkin II, Shelton JM, Manieri M, Cinti S, Schoen FJ, Bassel-Duby R, Rosenzweig A, Ingwall JS, Spiegelman BM (2005) Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* **1**: 259-271

Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, Spiegelman BM (2006) Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10086-10091

Ardehali H, Chen Z, Ko Y, Mejia-Alvarez R, Marban E (2004) Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11880-11885

- Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schagger H (1998) Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J* **17**: 7170-7178
- Arzoine L, Zilberberg N, Ben-Romano R, Shoshan-Barmatz V (2009) Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with hexokinase to prevent its anti-apoptotic activity. *J Biol Chem* **284**: 3946-3955
- Augustus AS, Kako Y, Yagyu H, Goldberg IJ (2003) Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**: E331-339
- Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V (2004) In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J* **377**: 347-355
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO (2002) Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J* **16**: 1879-1886
- Baines CP (2009) The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol* **46**: 850-857
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**: 658-662
- Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD (2007) Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* **9**: 550-555
- Banerjee RR, Lazar MA (2003) Resistin: molecular history and prognosis. *J Mol Med (Berl)* **81**: 218-226
- Bao S, Kennedy A, Wojciechowski B, Wallace P, Ganaway E, Garvey WT (1998) Expression of mRNAs encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle: effects of obesity and diabetes. *Diabetes* **47**: 1935-1940
- Barsukova A, Komarov A, Hajnoczky G, Bernardi P, Bourdette D, Forte M (2011) Activation of the mitochondrial permeability transition pore modulates Ca²⁺ responses to physiological stimuli in adult neurons. *Eur J Neurosci* **33**: 831-842
- Barter P, Kastelein J, Nunn A, Hobbs R (2003) High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis* **168**: 195-211
- Bartlett K, Eaton S (2004) Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem* **271**: 462-469
- Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* **280**: 18558-18561

- Bauer MK, Schubert A, Rocks O, Grimm S (1999) Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol* **147**: 1493-1502
- Belzacq AS, Vieira HL, Kroemer G, Brenner C (2002) The adenine nucleotide translocator in apoptosis. *Biochimie* **84**: 167-176
- Belzacq AS, Vieira HL, Verrier F, Vandecasteele G, Cohen I, Prevost MC, Larquet E, Pariselli F, Petit PX, Kahn A, Rizzuto R, Brenner C, Kroemer G (2003) Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity. *Cancer Res* **63**: 541-546
- Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, Young LH, Semenkovich CF, Shulman GI (2001) Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**: E1340-1346
- Berson A, Descatoire V, Sutton A, Fau D, Maulny B, Vadrot N, Feldmann G, Berthon B, Tordjmann T, Pessayre D (2001) Toxicity of alpidem, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, but not zolpidem, in rat hepatocytes: role of mitochondrial permeability transition and metabolic activation. *J Pharmacol Exp Ther* **299**: 793-800
- Beutner G, Ruck A, Riede B, Welte W, Brdiczka D (1996) Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett* **396**: 189-195
- Blachly-Dyson E, Forte M (2001) VDAC channels. *IUBMB Life* **52**: 113-118
- Boekema EJ, Braun HP (2007) Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* **282**: 1-4
- Bonnevie-Nielsen V, Steffes MW, Lernmark A (1981) A major loss in islet mass and B-cell function precedes hyperglycemia in mice given multiple low doses of streptozotocin. *Diabetes* **30**: 424-429
- Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ (2006) Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* **126**: 789-799
- Borradaile NM, Schaffer JE (2005) Lipotoxicity in the heart. *Curr Hypertens Rep* **7**: 412-417
- Borutaite V, Mildaziene V, Katiliute Z, Kholodenko B, Toleikis A (1993) The function of ATP/ADP translocator in the regulation of mitochondrial respiration during development of heart ischemic injury. *Biochim Biophys Acta* **1142**: 175-180
- Bosma M, Minnaard R, Sparks LM, Schaart G, Losen M, de Baets MH, Duimel H, Kersten S, Bickel PE, Schrauwen P, Hesselink MK (2012) The lipid droplet coat protein perilipin 5 also localizes to muscle mitochondria. *Histochem Cell Biol* **137**: 205-216
- Boudina S, Abel ED (2006) Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes. *Physiology (Bethesda)* **21**: 250-258

- Boudina S, Abel ED (2007) Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* **115**: 3213-3223
- Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME, Abel ED (2005) Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* **112**: 2686-2695
- Boudina S, Sena S, Theobald H, Sheng X, Wright JJ, Hu XX, Aziz S, Johnson JI, Bugger H, Zaha VG, Abel ED (2007) Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes* **56**: 2457-2466
- Boya P, Roumier T, Andreau K, Gonzalez-Polo RA, Zamzami N, Castedo M, Kroemer G (2003) Mitochondrion-targeted apoptosis regulators of viral origin. *Biochem Biophys Res Commun* **304**: 575-581
- Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, Cornwall EJ (2005) The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J* **392**: 353-362
- Brandolin G, Dupont Y, Vignais PV (1985) Substrate-induced modifications of the intrinsic fluorescence of the isolated adenine nucleotide carrier protein: demonstration of distinct conformational states. *Biochemistry* **24**: 1991-1997
- Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andrews D, Duclohier H, Reed JC, Kroemer G (2000) Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* **19**: 329-336
- Briere JJ, Favier J, El Ghouzzi V, Djouadi F, Benit P, Gimenez AP, Rustin P (2005) Succinate dehydrogenase deficiency in human. *Cell Mol Life Sci* **62**: 2317-2324
- Brown MS, Goldstein JL (1992) Koch's postulates for cholesterol. *Cell* **71**: 187-188
- Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, Cooksey RC, Litwin SE, Abel ED (2005) Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology* **146**: 5341-5349
- Bugger H, Abel ED (2008) Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)* **114**: 195-210
- Bugger H, Abel ED (2009) Rodent models of diabetic cardiomyopathy. *Dis Model Mech* **2**: 454-466
- Bugger H, Abel ED (2010) Mitochondria in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* **88**: 229-240
- Bugger H, Boudina S, Hu XX, Tuinei J, Zaha VG, Theobald HA, Yun UJ, McQueen AP, Wayment B, Litwin SE, Abel ED (2008) Type 1 diabetic akita mouse hearts are insulin sensitive but manifest structurally abnormal mitochondria that remain coupled despite increased uncoupling protein 3. *Diabetes* **57**: 2924-2932

Bugger H, Chen D, Riehle C, Soto J, Theobald HA, Hu XX, Ganesan B, Weimer BC, Abel ED (2009) Tissue-specific remodeling of the mitochondrial proteome in type 1 diabetic akita mice. *Diabetes* **58**: 1986-1997

Cadenas S, Echtay KS, Harper JA, Jekabsons MB, Buckingham JA, Grau E, Abuin A, Chapman H, Clapham JC, Brand MD (2002) The basal proton conductance of skeletal muscle mitochondria from transgenic mice overexpressing or lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem* **277**: 2773-2778

Carley AN, Semeniuk LM, Shimoni Y, Aasum E, Larsen TS, Berger JP, Severson DL (2004) Treatment of type 2 diabetic db/db mice with a novel PPAR γ agonist improves cardiac metabolism but not contractile function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**: E449-455

Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE (2006) Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J Biol Chem* **281**: 32724-32727

Chabowski A, Gorski J, Glatz JF, JJ PL, Bonen A (2008) Protein-mediated Fatty Acid Uptake in the Heart. *Curr Cardiol Rev* **4**: 12-21

Chabowski A, Momken I, Coort SL, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A (2006) Prolonged AMPK activation increases the expression of fatty acid transporters in cardiac myocytes and perfused hearts. *Mol Cell Biochem* **288**: 201-212

Chang HY, Yang X (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 821-846

Chauvin C, De Oliveira F, Ronot X, Mousseau M, Leverve X, Fontaine E (2001) Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem* **276**: 41394-41398

Chelli B, Falleni A, Salvetti F, Gremigni V, Lucacchini A, Martini C (2001) Peripheral-type benzodiazepine receptor ligands: mitochondrial permeability transition induction in rat cardiac tissue. *Biochem Pharmacol* **61**: 695-705

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* **84**: 491-495

Chen JJ, Bertrand H, Yu BP (1995) Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med* **19**: 583-590

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* **278**: 36027-36031

Cheng L, Ding G, Qin Q, Xiao Y, Woods D, Chen YE, Yang Q (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor delta activates fatty acid oxidation in cultured neonatal and adult cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **313**: 277-286

Chiu HC, Kovacs A, Blanton RM, Han X, Courtois M, Weinheimer CJ, Yamada KA, Brunet S, Xu H, Nerbonne JM, Welch MJ, Fettig NM, Sharp TL, Sambandam N, Olson KM, Ory DS, Schaffer JE (2005) Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res* **96**: 225-233

Chiu HC, Kovacs A, Ford DA, Hsu FF, Garcia R, Herrero P, Saffitz JE, Schaffer JE (2001) A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest* **107**: 813-822

Christoffersen C, Nielsen LB, Axler O, Andersson A, Johnsen AH, Dahlback B (2006) Isolation and characterization of human apolipoprotein M-containing lipoproteins. *J Lipid Res* **47**: 1833-1843

Clark JB, Palmer CJ, Shaw WN (1983) The diabetic Zucker fatty rat. *Proc Soc Exp Biol Med* **173**: 68-75

Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP (2002) Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* **277**: 34793-34799

Claros MG, Vincens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**: 779-786

Cleland JG, Swedberg K, Follath F, Komajda M, Cohen-Solal A, Aguilar JC, Dietz R, Gavazzi A, Hobbs R, Korewicki J, Madeira HC, Moiseyev VS, Preda I, van Gilst WH, Widimsky J, Freemantle N, Eastaugh J, Mason J (2003) The EuroHeart Failure survey programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis. *Eur Heart J* **24**: 442-463

Cline GW, Vidal-Puig AJ, Dufour S, Cadman KS, Lowell BB, Shulman GI (2001) In vivo effects of uncoupling protein-3 gene disruption on mitochondrial energy metabolism. *J Biol Chem* **276**: 20240-20244

Cooper ST, Attie AD (1992) Pig apolipoprotein R: a new member of the short consensus repeat family of proteins. *Biochemistry* **31**: 12328-12336

Crompton M, Virji S, Ward JM (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* **258**: 729-735

Cruciat CM, Brunner S, Baumann F, Neupert W, Stuart RA (2000) The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **275**: 18093-18098

Daniels LB, Maisel AS (2007) Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* **50**: 2357-2368

De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, Remington SJ, Youle RJ, Ichas F (2002) The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J* **16**: 607-609

De Marcos Lousa C, Trezeguet V, Dianoux AC, Brandolin G, Lauquin GJ (2002) The human mitochondrial ADP/ATP carriers: kinetic properties and biogenesis of wild-type and mutant proteins in the yeast *S. cerevisiae*. *Biochemistry* **41**: 14412-14420

Degli Esposti M (1998) Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim Biophys Acta* **1364**: 222-235

DeLuca JG, Doebber TW, Kelly LJ, Kemp RK, Molon-Noblot S, Sahoo SP, Ventre J, Wu MS, Peters JM, Gonzalez FJ, Moller DE (2000) Evidence for peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha-independent peroxisome proliferation: effects of PPARgamma/delta-specific agonists in PPARalpha-null mice. *Mol Pharmacol* **58**: 470-476

Depre C, Veitch K, Hue L (1993) Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis. Stimulation of glycogen synthesis by lactate in the isolated working rat heart. *Acta Cardiol* **48**: 147-164

Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* **144**: 891-901

Deschauer M, Hudson G, Muller T, Taylor RW, Chinnery PF, Zierz S (2005) A novel ANT1 gene mutation with probable germline mosaicism in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* **15**: 311-315

Dianoux AC, Noel F, Fiore C, Trezeguet V, Kieffer S, Jaquinod M, Lauquin GJ, Brandolin G (2000) Two distinct regions of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier are photolabeled by a new ADP analogue: 2-azido-3'-O-naphthoyl-[beta-32P]ADP. Identification of the binding segments by mass spectrometry. *Biochemistry* **39**: 11477-11487

DiMauro S, Lombes A, Nakase H, Mita S, Fabrizi GM, Tritschler HJ, Bonilla E, Miranda AF, DeVivo DC, Schon EA (1990) Cytochrome c oxidase deficiency. *Pediatr Res* **28**: 536-541

Dolce V, Scarcia P, Iacopetta D, Palmieri F (2005) A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett* **579**: 633-637

Dolder M, Walzel B, Speer O, Schlattner U, Wallimann T (2003) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* **278**: 17760-17766

Dolder M, Wendt S, Wallimann T (2001) Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. *Biol Signals Recept* **10**: 93-111

Dorner A, Giessen S, Gaub R, Grosse Siestrup H, Schwimmbeck PL, Hetzer R, Poller W, Schultheiss HP (2006) An isoform shift in the cardiac adenine nucleotide translocase expression alters the kinetic properties of the carrier in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* **8**: 81-89

Dorner A, Schultheiss HP (2000) The myocardial expression of the adenine nucleotide translocator isoforms is specifically altered in dilated cardiomyopathy. *Herz* **25**: 176-180

Dorner A, Schulze K, Rauch U, Schultheiss HP (1997) Adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy: pathophysiological alterations in expression and function. *Mol Cell Biochem* **174**: 261-269

Duan J, Karmazyn M (1989) Relationship between oxidative phosphorylation and adenine nucleotide translocase activity of two populations of cardiac mitochondria and mechanical recovery of ischemic hearts following reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* **67**: 704-709

Duchateau PN, Movsesyan I, Yamashita S, Sakai N, Hirano K, Schoenhaus SA, O'Connor-Kearns PM, Spencer SJ, Jaffe RB, Redberg RF, Ishida BY, Matsuzawa Y, Kane JP, Malloy MJ (2000) Plasma apolipoprotein L concentrations correlate with plasma triglycerides and cholesterol levels in normolipidemic, hyperlipidemic, and diabetic subjects. *J Lipid Res* **41**: 1231-1236

Dudkina NV, Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP (2005) Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3225-3229

Duncan JG (2011) Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* **1813**: 1351-1359

Duncan JG, Fong JL, Medeiros DM, Finck BN, Kelly DP (2007) Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor- α /PGC-1 α gene regulatory pathway. *Circulation* **115**: 909-917

Dyntar D, Eppenberger-Eberhardt M, Maedler K, Pruschy M, Eppenberger HM, Spinass GA, Donath MY (2001) Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. *Diabetes* **50**: 2105-2113

Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ, Brand MD (2003) A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J* **22**: 4103-4110

Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**: 96-99

Ekert PG, Silke J, Hawkins CJ, Verhagen AM, Vaux DL (2001) DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J Cell Biol* **152**: 483-490

Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hulthenby K, Rustin P, Gustafsson CM, Larsson NG (2004) Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet* **13**: 935-944

Epstein PN, Overbeek PA, Means AR (1989) Calmodulin-induced early-onset diabetes in transgenic mice. *Cell* **58**: 1067-1073

- Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, Martinou JC (1998) Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol* **143**: 217-224
- Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM (2002) Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet* **31**: 289-294
- Fan HQ, Gu N, Liu F, Fei L, Pan XQ, Guo M, Chen RH, Guo XR (2007) Prolonged exposure to resistin inhibits glucose uptake in rat skeletal muscles. *Acta Pharmacol Sin* **28**: 410-416
- Feldmann G, Haouzi D, Moreau A, Durand-Schneider AM, Bringuier A, Berson A, Mansouri A, Fau D, Pessayre D (2000) Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology* **31**: 674-683
- Fielding CJ, Fielding PE (1995) Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* **36**: 211-228
- Fillingame RH (1999) Molecular rotary motors. *Science* **286**: 1687-1688
- Finck BN, Kelly DP (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation* **115**: 2540-2548
- Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD, Kelly DP (2002) The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* **109**: 121-130
- Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR (1999) Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem* **274**: 2225-2233
- Fiore C, Trezeguet V, Le Saux A, Roux P, Schwimmer C, Dianoux AC, Noel F, Lauquin GJ, Brandolin G, Vignais PV (1998) The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie* **80**: 137-150
- Flierl A, Chen Y, Coskun PE, Samulski RJ, Wallace DC (2005) Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene Ther* **12**: 570-578
- Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P (1998) Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem* **273**: 12662-12668
- Garcia N, Correa F, Chavez E (2005) On the role of the respiratory complex I on membrane permeability transition. *J Bioenerg Biomembr* **37**: 17-23

Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R (2003) Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* **551**: 491-501

Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* **13**: 1423-1433

Ghosh S, An D, Pulinilkunnil T, Qi D, Lau HC, Abrahani A, Innis SM, Rodrigues B (2004a) Role of dietary fatty acids and acute hyperglycemia in modulating cardiac cell death. *Nutrition* **20**: 916-923

Ghosh S, Pulinilkunnil T, Yuen G, Kewalramani G, An D, Qi D, Abrahani A, Rodrigues B (2005) Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**: H768-776

Ghosh S, Ting S, Lau H, Pulinilkunnil T, An D, Qi D, Abrahani MA, Rodrigues B (2004b) Increased efflux of glutathione conjugate in acutely diabetic cardiomyocytes. *Can J Physiol Pharmacol* **82**: 879-887

Giguere V (2008) Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors. *Endocr Rev* **29**: 677-696

Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, Staels B, 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**: 518-524

Giraud MF, Paumard P, Soubannier V, Vaillier J, Arselin G, Salin B, Schaeffer J, Brethes D, di Rago JP, Velours J (2002) Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae? *Biochim Biophys Acta* **1555**: 174-180

Giraud S, Bonod-Bidaud C, Wesolowski-Louvel M, Stepien G (1998) Expression of human ANT2 gene in highly proliferative cells: GRBOX, a new transcriptional element, is involved in the regulation of glycolytic ATP import into mitochondria. *J Mol Biol* **281**: 409-418

Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC (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**: 1354-1366

Goldmacher VS (2002) vMIA, a viral inhibitor of apoptosis targeting mitochondria. *Biochimie* **84**: 177-185

Golfman LS, Wilson CR, Sharma S, Burgmaier M, Young ME, Guthrie PH, Van Arsdall M, Adroque JV, Brown KK, Taegtmeyer H (2005) Activation of PPARgamma enhances myocardial glucose oxidation and improves contractile function in isolated working hearts of ZDF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**: E328-336

Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G, Ovize M (2007) Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery

and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**: H1654-1661

Gonzalez-Polo RA, Carvalho G, Braun T, Decaudin D, Fabre C, Larochette N, Perfettini JL, Djavaheri-Mergny M, Youlyouz-Marfak I, Codogno P, Raphael M, Feuillard J, Kroemer G (2005) PK11195 potently sensitizes to apoptosis induction independently from the peripheral benzodiazepin receptor. *Oncogene* **24**: 7503-7513

Goto M, Terada S, Kato M, Katoh M, Yokozeki T, Tabata I, Shimokawa T (2000) cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun* **274**: 350-354

Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce IA, MacGregor GR, Wallace DC (1997) A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* **16**: 226-234

Grynberg A (2001) [Modifications in myocardial energy metabolism in diabetic patients]]. *Diabetes Metab* **27**: S12-19

Guerini D, Prati E, Desai U, Nick HP, Flammer R, Gruninger S, Cumin F, Kaleko M, Connelly S, Chiesi M (2002) Uncoupling of protein-3 induces an uncontrolled uncoupling of mitochondria after expression in muscle derived L6 cells. *Eur J Biochem* **269**: 1373-1381

Guigas B, Detaille D, Chauvin C, Batandier C, De Oliveira F, Fontaine E, Leverve X (2004) Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J* **382**: 877-884

Halestrap AP (2009) What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* **46**: 821-831

Halestrap AP, Brenner C (2003) The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* **10**: 1507-1525

Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, Kerr PM (1997) Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* **174**: 167-172

Han BH, DeMattos RB, Dugan LL, Kim-Han JS, Brendza RP, Fryer JD, Kierson M, Cirrito J, Quick K, Harmony JA, Aronow BJ, Holtzman DM (2001) Clusterin contributes to caspase-3-independent brain injury following neonatal hypoxia-ischemia. *Nat Med* **7**: 338-343

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

Hardy S, El-Assaad W, Przybytkowski E, Joly E, Prentki M, Langelier Y (2003) Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. *J Biol Chem* **278**: 31861-31870

Hatefi Y (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* **54**: 1015-1069

Hausenloy DJ, Duchen MR, Yellon DM (2003) Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **60**: 617-625

Haworth RA, Hunter DR (2000) Control of the mitochondrial permeability transition pore by high-affinity ADP binding at the ADP/ATP translocase in permeabilized mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **32**: 91-96

Hesselink MK, Schrauwen P (2005) Uncoupling proteins in the failing human heart: friend or foe? *Lancet* **365**: 385-386

Hidaka S, Kakuma T, Yoshimatsu H, Sakino H, Fukuchi S, Sakata T (1999) Streptozotocin treatment upregulates uncoupling protein 3 expression in the rat heart. *Diabetes* **48**: 430-435

Himms-Hagen J, Harper ME (2001) Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med (Maywood)* **226**: 78-84

Holness MJ, Sugden MC (2003) Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans* **31**: 1143-1151

Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3668-3672

Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**: 686-691

Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Goldstein S, Gregoratos G, Jessup ML, Noble RJ, Packer M, Silver MA, Stevenson LW, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Jacobs AK, Hiratzka LF, Russell RO, Smith SC, Jr. (2001) ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation; Endorsed by the Heart Failure Society of America. *Circulation* **104**: 2996-3007

Hunter S, Weiss S, Ou CY, Jaye D, Young A, Wilcox J, Arbiser JL, Monson D, Goldblum J, Nolen JD, Varma V (2005) Apolipoprotein D is down-regulated during malignant transformation of neurofibromas. *Hum Pathol* **36**: 987-993

Huo L, Scarpulla RC (2001) Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol Cell Biol* **21**: 644-654

Huser J, Blatter LA (1999) Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore. *Biochem J* **343 Pt 2**: 311-317

Huss JM, Imahashi K, Dufour CR, Weinheimer CJ, Courtois M, Kovacs A, Giguere V, Murphy E, Kelly DP (2007) The nuclear receptor ERRalpha is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload. *Cell Metab* **6**: 25-37

Huss JM, Kelly DP (2004) Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res* **95**: 568-578

Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguere V, Kelly DP (2004a) Estrogen-Related Receptor Directs Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Signaling in the Transcriptional Control of Energy Metabolism in Cardiac and Skeletal Muscle. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 9079-9091

Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguere V, Kelly DP (2004b) Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* **24**: 9079-9091

Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A (2001) Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* **88**: 529-535

Ikeuchi M, Matsusaka H, Kang D, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Fujiwara T, Hamasaki N, Takeshita A, Sunagawa K, Tsutsui H (2005) Overexpression of mitochondrial transcription factor a ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction. *Circulation* **112**: 683-690

Imahashi K, Schneider MD, Steenbergen C, Murphy E (2004) Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* **95**: 734-741

Imai H, Koumura T, Nakajima R, Nomura K, Nakagawa Y (2003) Protection from inactivation of the adenine nucleotide translocator during hypoglycaemia-induced apoptosis by mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochem J* **371**: 799-809

Ishigami M, Swertfeger DK, Granholm NA, Hui DY (1998) Apolipoprotein E inhibits platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G1 phase. *J Biol Chem* **273**: 20156-20161

Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, Walsh A, Breslow JL (1990) Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science* **249**: 790-793

Jacotot E, Ferri KF, El Hamel C, Brenner C, Druillennec S, Hoebeke J, Rustin P, Metivier D, Lenoir C, Geuskens M, Vieira HL, Loeffler M, Belzacq AS, Briand JP, Zamzami N, Edelman L, Xie ZH, Reed JC, Roques BP, Kroemer G (2001) Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *J Exp Med* **193**: 509-519

Jang JY, Choi Y, Jeon YK, Aung KC, Kim CW (2008) Over-expression of adenine nucleotide translocase 1 (ANT1) induces apoptosis and tumor regression in vivo. *BMC Cancer* **8**: 160

Javadov S, Baetz D, Rajapurohitam V, Zeidan A, Kirshenbaum LA, Karmazyn M (2006) Antihypertrophic effect of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 inhibition is mediated by reduced mitogen-activated protein kinase activation secondary to improved mitochondrial integrity and decreased generation of mitochondrial-derived reactive oxygen species. *J Pharmacol Exp Ther* **317**: 1036-1043

Javadov S, Huang C, Kirshenbaum L, Karmazyn M (2005) NHE-1 inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat. *J Mol Cell Cardiol* **38**: 135-143

Javadov S, Karmazyn M, Escobales N (2009) Mitochondrial permeability transition pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases. *J Pharmacol Exp Ther* **330**: 670-678

Jong MC, Voshol PJ, Muurling M, Dahlmans VE, Romijn JA, Pijl H, Havekes LM (2001) Protection from obesity and insulin resistance in mice overexpressing human apolipoprotein C1. *Diabetes* **50**: 2779-2785

Jordens EZ, Palmieri L, Huizing M, van den Heuvel LP, Sengers RC, Dorner A, Ruitenbeek W, Trijbels FJ, Valsson J, Sigfusson G, Palmieri F, Smeitink JA (2002) Adenine nucleotide translocator 1 deficiency associated with Sengers syndrome. *Ann Neurol* **52**: 95-99

Jung DW, Bradshaw PC, Pfeiffer DR (1997) Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **272**: 21104-21112

Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4997-5002

Kallen J, Schlaeppli JM, Bitsch F, Filipuzzi I, Schilb A, Riou V, Graham A, Strauss A, Geiser M, Fournier B (2004) Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha): crystal structure of ERRalpha ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha. *J Biol Chem* **279**: 49330-49337

Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, Hamasaki N, Kang D (2004) Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol* **24**: 9823-9834

Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP (1974) Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol* **34**: 29-34

Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K (1999) The myocardial Na⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾ exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res* **85**: 777-786

Katzman R (1994) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* **4**: 703-707

- Kerner J, Hoppel C (2000) Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1486**: 1-17
- Kinnally KW, Zorov DB, Antonenko YN, Snyder SH, McEnery MW, Tedeschi H (1993) Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1374-1378
- Kitagawa K, Matsumoto M, Hori M, Yanagihara T (2002) Neuroprotective effect of apolipoprotein E against ischemia. *Ann N Y Acad Sci* **977**: 468-475
- Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC (2004) The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* **427**: 461-465
- Kotlyar AB, Sled VD, Vinogradov AD (1992) Effect of Ca²⁺ ions on the slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase. *Biochim Biophys Acta* **1098**: 144-150
- Kowluru RA, Engerman RL, Kern TS (2000) Diabetes-induced metabolic abnormalities in myocardium: effect of antioxidant therapy. *Free Radic Res* **32**: 67-74
- Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuk GD (1995) High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* **270**: 17513-17520
- Kume E, Aruga C, Ishizuka Y, Takahashi K, Miwa S, Itoh M, Fujimura H, Toriumi W, Kitamura K, Doi K (2005) Gene expression profiling in streptozotocin treated mouse liver using DNA microarray. *Exp Toxicol Pathol* **56**: 235-244
- Laffont I, Takahashi M, Shibukawa Y, Honke K, Shuvaev VV, Siest G, Visvikis S, Taniguchi N (2002) Apolipoprotein E activates Akt pathway in neuro-2a in an isoform-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun* **292**: 83-87
- Lagocki PA, Scanu AM (1980) In vitro modulation of the apolipoprotein composition of high density lipoprotein. Displacement of apolipoprotein A-I from high density lipoprotein by apolipoprotein A-II. *J Biol Chem* **255**: 3701-3706
- Lamant M, Smih F, Harmancey R, Philip-Couderc P, Pathak A, Roncalli J, Galinier M, Collet X, Massabuau P, Senard JM, Rouet P (2006) ApoO, a novel apolipoprotein, is an original glycoprotein up-regulated by diabetes in human heart. *J Biol Chem* **281**: 36289-36302
- Laoudj-Chenivesse D, Carnac G, Bisbal C, Hugon G, Bouillot S, Desnuelle C, Vassetzky Y, Fernandez A (2005) Increased levels of adenine nucleotide translocator 1 protein and response to oxidative stress are early events in facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle. *J Mol Med (Berl)* **83**: 216-224
- Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA (1998) Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* **18**: 231-236

Law AK, Gupta D, Levy S, Wallace DC, McKeon RJ, Buck CR (2004) TGF-beta1 induction of the adenine nucleotide translocator 1 in astrocytes occurs through Smads and Sp1 transcription factors. *BMC Neurosci* **5**: 1

Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* **106**: 847-856

Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, Chen Z, Holloszy JO, Medeiros DM, Schmidt RE, Saffitz JE, Abel ED, Semenkovich CF, Kelly DP (2005) PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* **3**: e101

Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP (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**: 7473-7478

Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP (2008) The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem* **283**: 26312-26323

Levy SE, Chen YS, Graham BH, Wallace DC (2000) Expression and sequence analysis of the mouse adenine nucleotide translocase 1 and 2 genes. *Gene* **254**: 57-66

Li J, Hu X, Selvakumar P, Russell RR, 3rd, Cushman SW, Holman GD, Young LH (2004) Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**: E834-841

Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**: 95-99

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489

Li SY, Yang X, Ceylan-Isik AF, Du M, Sreejayan N, Ren J (2006) Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and myosin heavy chain isozyeme switch. *Diabetologia* **49**: 1434-1446

Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* **80**: 780-787

Liu Z, Lu H, Jiang Z, Pastuszyn A, Hu CA (2005) Apolipoprotein I6, a novel proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein, induces mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells. *Mol Cancer Res* **3**: 21-31

Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y (2009) Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **119**: e21-181

Logeart D, Thabut G, Jourdain P, Chavelas C, Beyne P, Beauvais F, Bouvier E, Solal AC (2004) Predischarge B-type natriuretic peptide assay for identifying patients at high risk of re-admission after decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* **43**: 635-641

Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC (2007) Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res* **101**: 335-347

Luiken JJ, Coort SL, Koonen DP, van der Horst DJ, Bonen A, Zorzano A, Glatz JF (2004) Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters. *Pflugers Arch* **448**: 1-15

Luiken JJ, Coort SL, Willems J, Coumans WA, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JF (2003) Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* **52**: 1627-1634

Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, Coy PE, Skeen JE, Gottlob K, Chandel NS, Thompson CB, Robey RB, Hay N (2004) Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell* **16**: 819-830

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G (1998) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**: 2027-2031

Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* **32**: 595-603

Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE, 3rd, Deaton D, Das DK (1999) Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation* **100**: II369-375

McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3170-3174

McLaughlin L, Zhu G, Mistry M, Ley-Ebert C, Stuart WD, Florio CJ, Groen PA, Witt SA, Kimball TR, Witte DP, Harmony JA, Aronow BJ (2000) Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis. *J Clin Invest* **106**: 1105-1113

McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA (1990) Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4120-4124

Merrill AH, Jr., van Echten G, Wang E, Sandhoff K (1993) Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *J Biol Chem* **268**: 27299-27306

Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148

Mitchell P (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc* **41**: 445-502

Mitchell P (1975) Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* **56**: 1-6

Miyakis S, Giannakopoulos B, Krilis SA (2004) Beta 2 glycoprotein I--function in health and disease. *Thromb Res* **114**: 335-346

Miyata M, Smith JD (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet* **14**: 55-61

Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, Yang W, Altshuler D, Puigserver P, Patterson N, Willy PJ, Schulman IG, Heyman RA, Lander ES, Spiegelman BM (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**: 6570-6575

Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* **34**: 267-273

Murakami T, Shimomura Y, Yoshimura A, Sokabe M, Fujitsuka N (1998) Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochim Biophys Acta* **1381**: 113-122

Murdock DG, Boone BE, Esposito LA, Wallace DC (1999) Up-regulation of nuclear and mitochondrial genes in the skeletal muscle of mice lacking the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *J Biol Chem* **274**: 14429-14433

Murray AJ, Anderson RE, Watson GC, Radda GK, Clarke K (2004) Uncoupling proteins in human heart. *Lancet* **364**: 1786-1788

Murray AJ, Cole MA, Lygate CA, Carr CA, Stuckey DJ, Little SE, Neubauer S, Clarke K (2008) Increased mitochondrial uncoupling proteins, respiratory uncoupling and decreased efficiency in the chronically infarcted rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **44**: 694-700

Murray AJ, Panagia M, Hauton D, Gibbons GF, Clarke K (2005) Plasma free fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the control of myocardial uncoupling protein levels. *Diabetes* **54**: 3496-3502

- Nakamura K, Kusano KF, Matsubara H, Nakamura Y, Miura A, Nishii N, Banba K, Nagase S, Miyaji K, Morita H, Saito H, Emori T, Ohe T (2005) Relationship between oxidative stress and systolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Card Fail* **11**: 117-123
- Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14681-14686
- Narula N, Zaragoza MV, Sengupta PP, Li P, Haider N, Verjans J, Waymire K, Vannan M, Wallace DC (2011) Adenine nucleotide translocase 1 deficiency results in dilated cardiomyopathy with defects in myocardial mechanics, histopathological alterations, and activation of apoptosis. *JACC Cardiovasc Imaging* **4**: 1-10
- Nielsen LB, Bartels ED, Bollano E (2002) Overexpression of apolipoprotein B in the heart impedes cardiac triglyceride accumulation and development of cardiac dysfunction in diabetic mice. *J Biol Chem* **277**: 27014-27020
- Nishio Y, Kanazawa A, Nagai Y, Inagaki H, Kashiwagi A (2004) Regulation and role of the mitochondrial transcription factor in the diabetic rat heart. *Ann N Y Acad Sci* **1011**: 78-85
- Niu N, Zhu X, Liu Y, Du T, Wang X, Chen D, Sun B, Gu HF (2007) Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of apolipoprotein M gene (apoM) confer the susceptibility to development of type 2 diabetes in Han Chinese. *Diabetes Metab Res Rev* **23**: 21-25
- Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S, Ohta Y, Sami M, Tachibana T, Ishikawa H, Kurosawa H, Kahn RC, Otsu K, Shirasawa T (2006) Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem* **281**: 33789-33801
- Nuutinen T, Suuronen T, Kauppinen A, Salminen A (2009) Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* **61**: 89-104
- O'Bryan MK, Foulds LM, Cannon JF, Winnall WR, Muir JA, Sebire K, Smith AI, Keah HH, Hearn MT, de Kretser DM, Hedger MP (2004) Identification of a novel apolipoprotein, ApoN, in ovarian follicular fluid. *Endocrinology* **145**: 5231-5242
- O'Gorman E, Beutner G, Dolder M, Koretsky AP, Brdiczka D, Wallimann T (1997) The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* **414**: 253-257
- Ojuka EO, Jones TE, Han DH, Chen M, Holloszy JO (2003) Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J* **17**: 675-681
- Oliveira PJ (2005) Cardiac mitochondrial alterations observed in hyperglycaemic rats--what can we learn from cell biology? *Curr Diabetes Rev* **1**: 11-21

Oliveira PJ, Rolo AP, Seica R, Palmeira CM, Santos MS, Moreno AJ (2001) Decreased susceptibility of heart mitochondria from diabetic GK rats to mitochondrial permeability transition induced by calcium phosphate. *Biosci Rep* **21**: 45-53

Oliveira PJ, Seica R, Coxito PM, Rolo AP, Palmeira CM, Santos MS, Moreno AJ (2003) Enhanced permeability transition explains the reduced calcium uptake in cardiac mitochondria from streptozotocin-induced diabetic rats. *FEBS Lett* **554**: 511-514

Ongwijitwat S, Liang HL, Graboyes EM, Wong-Riley MT (2006) Nuclear respiratory factor 2 senses changing cellular energy demands and its silencing down-regulates cytochrome oxidase and other target gene mRNAs. *Gene* **374**: 39-49

Ostos MA, Conconi M, Vergnes L, Baroukh N, Ribalta J, Girona J, Caillaud JM, Ochoa A, Zakin MM (2001) Antioxidative and antiatherosclerotic effects of human apolipoprotein A-IV in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**: 1023-1028

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**: 913-922

Palanivel R, Maida A, Liu Y, Sweeney G (2006) Regulation of insulin signalling, glucose uptake and metabolism in rat skeletal muscle cells upon prolonged exposure to resistin. *Diabetologia* **49**: 183-190

Palmieri F (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* **447**: 689-709

Park TS, Hu Y, Noh HL, Drosatos K, Okajima K, Buchanan J, Tuinei J, Homma S, Jiang XC, Abel ED, Goldberg IJ (2008) Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *J Lipid Res* **49**: 2101-2112

Pastorino JG, Hoek JB, Shulga N (2005) Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res* **65**: 10545-10554

Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB (2002) Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **277**: 7610-7618

Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ (2003) Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8466-8471

Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP, Velours J (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* **21**: 221-230

Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F (1999) Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be

monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J* **76**: 725-734

Petrosillo G, Casanova G, Matera M, Ruggiero FM, Paradies G (2006) Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: induction of permeability transition and cytochrome c release. *FEBS Lett* **580**: 6311-6316

Philip-Couderc P, Smih F, Pelat M, Vidal C, Verwaerde P, Pathak A, Buys S, Galinier M, Senard JM, Rouet P (2003) Cardiac transcriptome analysis in obesity-related hypertension. *Hypertension* **41**: 414-421

Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, Hess JF (1996) Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* **13**: 18-19

Prendes MG, Torresin E, Gonzalez M, Fernandez MA, Perazzo JC, Savino EA, Varela A (2008) Protection of ischaemic-reperfused rat heart by dimethylamiloride is associated with inhibition of mitochondrial permeability transition. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**: 201-206

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**: 829-839

Rahman S, Taanman JW, Cooper JM, Nelson I, Hargreaves I, Meunier B, Hanna MG, Garcia JJ, Capaldi RA, Lake BD, Leonard JV, Schapira AH (1999) A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes defective assembly and myopathy. *Am J Hum Genet* **65**: 1030-1039

Rasola A, Bernardi P (2011) Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* **50**: 222-233

Rauch U, Schulze K, Witzendichler B, Schultheiss HP (1994) Alteration of the cytosolic-mitochondrial distribution of high-energy phosphates during global myocardial ischemia may contribute to early contractile failure. *Circ Res* **75**: 760-769

Redgrave TG (2004) Chylomicron metabolism. *Biochem Soc Trans* **32**: 79-82

Riddell DR, Graham A, Owen JS (1997) Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine:nitric oxide pathway. Implications for vascular disease. *J Biol Chem* **272**: 89-95

Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, Michels PA, Rousseau GG, Hue L (2004) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J* **381**: 561-579

Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE (2005) Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **54**: 8-14

Rodic N, Oka M, Hamazaki T, Murawski MR, Jorgensen M, Maatouk DM, Resnick JL, Li E, Terada N (2005) DNA methylation is required for silencing of ant4, an adenine nucleotide translocase selectively expressed in mouse embryonic stem cells and germ cells. *Stem Cells* **23**: 1314-1323

Ron D (2002) Proteotoxicity in the endoplasmic reticulum: lessons from the Akita diabetic mouse. *J Clin Invest* **109**: 443-445

Rostovtseva TK, Tan W, Colombini M (2005) On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction. *J Bioenerg Biomembr* **37**: 129-142

Roussel D, Chainier F, Rouanet J, Barre H (2000) Increase in the adenine nucleotide translocase content of duckling subsarcolemmal mitochondria during cold acclimation. *FEBS Lett* **477**: 141-144

Russell LK, Finck BN, Kelly DP (2005) Mouse models of mitochondrial dysfunction and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **38**: 81-91

Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ, Kovacs A, Courtois M, Saffitz JE, Medeiros DM, Valencik ML, McDonald JA, Kelly DP (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**: 525-533

Sam F, Kerstetter DL, Pimental DR, Mulukutla S, Tabaee A, Bristow MR, Colucci WS, Sawyer DB (2005) Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. *J Card Fail* **11**: 473-480

Sambongi Y, Iko Y, Tanabe M, Omote H, Iwamoto-Kihara A, Ueda I, Yanagida T, Wada Y, Futai M (1999) Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F0F1): direct observation. *Science* **286**: 1722-1724

Sano M, Wang SC, Shirai M, Scaglia F, Xie M, Sakai S, Tanaka T, Kulkarni PA, Barger PM, Youker KA, Taffet GE, Hamamori Y, Michael LH, Craigen WJ, Schneider MD (2004) Activation of cardiac Cdk9 represses PGC-1 and confers a predisposition to heart failure. *EMBO J* **23**: 3559-3569

Santos DL, Palmeira CM, Seica R, Dias J, Mesquita J, Moreno AJ, Santos MS (2003) Diabetes and mitochondrial oxidative stress: a study using heart mitochondria from the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Mol Cell Biochem* **246**: 163-170

Sato T, Mihara K (2010) Mammalian Oxal protein is useful for assessment of submitochondrial protein localization and mitochondrial membrane integrity. *Anal Biochem* **397**: 250-252

Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM (2004) Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest* **114**: 224-231

Sazanov LA (2007) Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* **46**: 2275-2288

Scarpulla RC (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* **286**: 81-89

Scarpulla RC (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* **88**: 611-638

Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vrans C, van der Vliet HN, Chamuleau RA, Havekes LM, Groen AK, van Dijk KW (2004) ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem* **279**: 27941-27947

Schachter F, Faure-Delanef L, Guenot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, Cohen D (1994) Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat Genet* **6**: 29-32

Schafer E, Seelert H, Reifschneider NH, Krause F, Dencher NA, Vonck J (2006) Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* **281**: 15370-15375

Schagger H (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1555**: 154-159

Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, Hetz C, Danial NN, Moskowitz MA, Korsmeyer SJ (2005) Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12005-12010

Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB (1994) STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* **43**: 1326-1333

Schrauwen P, Saris WH, Hesselink MK (2001) An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. *FASEB J* **15**: 2497-2502

Schrauwen P, Schrauwen-Hinderling V, Hoeks J, Hesselink MK (2010) Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* **1801**: 266-271

Schreiber SN (2003) The Transcriptional Coactivator PGC-1 Regulates the Expression and Activity of the Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor alpha (ERRalpha). *Journal of Biological Chemistry* **278**: 9013-9018

Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvinec M, Oakeley EJ, 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**: 6472-6477

Schultheiss HP (1992) Dysfunction of the ADP/ATP carrier as a causative factor for the disturbance of the myocardial energy metabolism in dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* **87 Suppl 1**: 311-320

Schumaker VN, Phillips ML, Chatterton JE (1994) Apolipoprotein B and low-density lipoprotein structure: implications for biosynthesis of triglyceride-rich lipoproteins. *Adv Protein Chem* **45**: 205-248

Schwartz DR, Lazar MA (2011) Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends Endocrinol Metab* **22**: 259-265

Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ (2002) A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* **2**: 55-67

Scorrano L, Petronilli V, Colonna R, Di Lisa F, Bernardi P (1999) Chloromethyltetramethylrosamine (Mitotracker Orange) induces the mitochondrial permeability transition and inhibits respiratory complex I. Implications for the mechanism of cytochrome c release. *J Biol Chem* **274**: 24657-24663

Seaton TA, Cooper JM, Schapira AH (1998) Cyclosporin inhibition of apoptosis induced by mitochondrial complex I toxins. *Brain Res* **809**: 12-17

Semeniuk LM, Kryski AJ, Severson DL (2002) Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**: H976-982

Sharma S, Adroge JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, Noon GP, Frazier OH, Taegtmeier H (2004) Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* **18**: 1692-1700

Sharov VG, Todor A, Khanal S, Imai M, Sabbah HN (2007) Cyclosporine A attenuates mitochondrial permeability transition and improves mitochondrial respiratory function in cardiomyocytes isolated from dogs with heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **42**: 150-158

Sharov VG, Todor AV, Imai M, Sabbah HN (2005) Inhibition of mitochondrial permeability transition pores by cyclosporine A improves cytochrome C oxidase function and increases rate of ATP synthesis in failing cardiomyocytes. *Heart Fail Rev* **10**: 305-310

Shen X, Zheng S, Metreveli NS, Epstein PN (2006) Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* **55**: 798-805

Shen X, Zheng S, Thongboonkerd V, Xu M, Pierce WM, Jr., Klein JB, Epstein PN (2004) Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**: E896-905

Shidoji Y, Hayashi K, Komura S, Ohishi N, Yagi K (1999) Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* **264**: 343-347

Shimizu S, Matsuoka Y, Shinohara Y, Yoneda Y, Tsujimoto Y (2001) Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J Cell Biol* **152**: 237-250

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**: 483-487

- Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, Murakami K, Hayashidani S, Ikeuchi M, Wen J, Kubota T, Utsumi H, Takeshita A (2004) Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation* **109**: 544-549
- Sihag S, Cresci S, Li AY, Sucharov CC, Lehman JJ (2009) PGC-1alpha and ERRalpha target gene downregulation is a signature of the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* **46**: 201-212
- Solem LE, Wallace KB (1993) Selective activation of the sodium-independent, cyclosporin A-sensitive calcium pore of cardiac mitochondria by doxorubicin. *Toxicol Appl Pharmacol* **121**: 50-57
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* **277**: 44784-44790
- Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD (2005) Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* **85**: 1093-1129
- Stephens JM, Pilch PF (1995) The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT4, the major insulin-responsive glucose transporter. *Endocr Rev* **16**: 529-546
- Stepien G, Torroni A, Chung AB, Hodge JA, Wallace DC (1992) Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* **267**: 14592-14597
- Storjohann R, Rozek A, Sparrow JT, Cushley RJ (2000) Structure of a biologically active fragment of human serum apolipoprotein C-II in the presence of sodium dodecyl sulfate and dodecylphosphocholine. *Biochim Biophys Acta* **1486**: 253-264
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**: 441-446
- Syven C, Lin L, Jansson E, Sotonyi P, Fu LX, Waagstein F, Hjalmarsson A, Marcus C, Bronnegard M (1993) Ventricular adenine nucleotide translocator mRNA is upregulated in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* **27**: 1295-1299
- Tan W, Colombini M (2007) VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 2510-2515
- Tanaka Y, Konno N, Kako KJ (1992) Mitochondrial dysfunction observed in situ in cardiomyocytes of rats in experimental diabetes. *Cardiovasc Res* **26**: 409-414
- Tso P, Liu M, Kalogeris TJ, Thomson AB (2001) The role of apolipoprotein A-IV in the regulation of food intake. *Annu Rev Nutr* **21**: 231-254

Tsujimoto Y (2003) Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* **195**: 158-167

Tsujimoto Y, Shimizu S (2007) Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* **12**: 835-840

Unger RH, Orci L (2001) Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J* **15**: 312-321

van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, Ottenhoff R, Looije N, Wesseling JG, Groen AK, Chamuleau RA (2002) Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **295**: 1156-1159

van Kimmenade RR, Pinto YM, Bayes-Genis A, Lainchbury JG, Richards AM, Januzzi JL, Jr. (2006) Usefulness of intermediate amino-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations for diagnosis and prognosis of acute heart failure. *Am J Cardiol* **98**: 386-390

Vanhamme L, Paturiaux-Hanocq F, Poelvoorde P, Nolan DP, Lins L, Van Den Abbeele J, Pays A, Tebabi P, Van Xong H, Jacquet A, Moguilevsky N, Dieu M, Kane JP, De Baetselier P, Brasseur R, Pays E (2003) Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* **422**: 83-87

Vanhollebeke B, Pays E (2006) The function of apolipoproteins L. *Cell Mol Life Sci* **63**: 1937-1944

Vega RB, Huss JM, Kelly DP (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**: 1868-1876

Veniant MM, Nielsen LB, Boren J, Young SG (1999) Lipoproteins containing apolipoprotein B-100 are secreted by the heart. *Trends Cardiovasc Med* **9**: 103-107

Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB (2000) Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* **275**: 16258-16266

Vieira HL, Haouzi D, El Hamel C, Jacotot E, Belzacq AS, Brenner C, Kroemer G (2000) Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ* **7**: 1146-1154

Villena JA, Kralli A (2008) ERRalpha: a metabolic function for the oldest orphan. *Trends Endocrinol Metab* **19**: 269-276

Vyssokikh MY, Katz A, Rueck A, Wuensch C, Dorner A, Zorov DB, Brdiczka D (2001) Adenine nucleotide translocator isoforms 1 and 2 are differently distributed in the mitochondrial inner membrane and have distinct affinities to cyclophilin D. *Biochem J* **358**: 349-358

Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**: 1482-1488

Walther T, Tschöpe C, Sterner-Kock A, Westermann D, Heringer-Walther S, Riad A, Nikolic A, Wang Y, Ebermann L, Siems WE, Bader M, Shakibaei M, Schultheiss HP, Dorner A (2007) Accelerated mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate transport improves hypertension-induced heart disease. *Circulation* **115**: 333-344

Wang H, Oster G (1998) Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature* **396**: 279-282

Wang J, Wilhelmsson H, Graff C, Li H, Oldfors A, Rustin P, Bruning JC, Kahn CR, Clayton DA, Barsh GS, Thoren P, Larsson NG (1999a) Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *Nat Genet* **21**: 133-137

Wang X, Driscoll DM, Morton RE (1999b) Molecular cloning and expression of lipid transfer inhibitor protein reveals its identity with apolipoprotein F. *J Biol Chem* **274**: 1814-1820

Wang Y, Ebermann L, Sterner-Kock A, Wika S, Schultheiss HP, Dorner A, Walther T (2009) Myocardial overexpression of adenine nucleotide translocase 1 ameliorates diabetic cardiomyopathy in mice. *Exp Physiol* **94**: 220-227

Wikstrom M, Verkhovsky MI (2007) Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases. *Biochim Biophys Acta* **1767**: 1200-1214

Winokur ST, Barrett K, Martin JH, Forrester JR, Simon M, Tawil R, Chung SA, Masny PS, Figlewicz DA (2003) Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) myoblasts demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Neuromuscul Disord* **13**: 322-333

Wold LE, Ren J (2004) Streptozotocin directly impairs cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes via a p38 map kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **318**: 1066-1071

Won JC, Park JY, Kim YM, Koh EH, Seol S, Jeon BH, Han J, Kim JR, Park TS, Choi CS, Lee WJ, Kim MS, Lee IK, Youn JH, Lee KU (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha overexpression prevents endothelial apoptosis by increasing ATP/ADP translocase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**: 290-297

Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, Halestrap AP (1998) Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J* **336 (Pt 2)**: 287-290

Wright JJ, Kim J, Buchanan J, Boudina S, Sena S, Bakirtzi K, Ilkun O, Theobald HA, Cooksey RC, Kandror KV, Abel ED (2009) Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat feeding. *Cardiovasc Res* **82**: 351-360

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**: 115-124

- Xu N, Nilsson-Ehle P, Ahren B (2004) Correlation of apolipoprotein M with leptin and cholesterol in normal and obese subjects. *J Nutr Biochem* **15**: 579-582
- Yagyu H, Chen G, Yokoyama M, Hirata K, Augustus A, Kako Y, Seo T, Hu Y, Lutz EP, Merkel M, Bensadoun A, Homma S, Goldberg IJ (2003) Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy. *J Clin Invest* **111**: 419-426
- Ye G, Metreveli NS, Donthi RV, Xia S, Xu M, Carlson EC, Epstein PN (2004) Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes* **53**: 1336-1343
- Yoshioka M, Kayo T, Ikeda T, Koizumi A (1997) A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* **46**: 887-894
- Zaid H, Abu-Hamad S, Israelson A, Nathan I, Shoshan-Barmatz V (2005) The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **12**: 751-760
- Zamora M, Granell M, Mampel T, Vinas O (2004) Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells. *FEBS Lett* **563**: 155-160
- Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* **183**: 1533-1544
- Zaugg M, Schaub MC (2003) Signaling and cellular mechanisms in cardiac protection by ischemic and pharmacological preconditioning. *J Muscle Res Cell Motil* **24**: 219-249
- Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* **258**: 468-471
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425-432
- Zhou X, Paulsson G, Stemme S, Hansson GK (1998) Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J Clin Invest* **101**: 1717-1725
- Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH (2000) Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1784-1789
- Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ (2009) Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* **83**: 213-225