



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Pharmacologie

Présentée et soutenue par *Céline GUILBEAU-FRUGIER*
Le 23 avril 2012

Implication de la MAO-A dans l'insuffisance cardiaque et dans la
sénescence intrinsèque du myocarde

JURY

Dr. Renée VENTURA-CLAPIER Directeur de recherche à l'INSERM, Chatenay-Malabry	Rapporteur
Pr. Luc ROCHETTE Professeur des Universités, Dijon	Rapporteur
Pr. Marie-Dominique PIERCECCHI-MARTI Professeur des Universités / Praticien hospitalier, Marseille	Examinatrice
Dr. Jeanne MIALET-PEREZ Chargée de recherche à l'INSERM, Toulouse	Examinatrice
Pr. Marie-Bernadette DELISLE Professeur des Universités / Praticien hospitalier, Toulouse	Directrice de thèse
Pr. Angelo PARINI Professeur des Universités / Praticien hospitalier, Toulouse	Directeur de thèse

Ecole doctorale : Biologie – Santé - Biotechniques
Unité de recherche : I2MC - INSERM/UPS UMR1048 – Equipe 6
Directeurs de Thèse : Pr. Marie-Bernadette DELISLE - Pr. Angelo PARINI

Cette thèse est dédiée à Arthémise GUILBEAU morte dans la fleur de l'âge le 7 mai 2011 dans sa centième année.



REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont :

À Madame le Docteur Renée VENTURA-CLAPIER et à Monsieur le Professeur Luc ROCHETTE d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et de me faire l'honneur de siéger à mon jury.

À Madame le Professeur Marie-Dominique PIERCECCHI-MARTI, avec qui mes points communs vont au-delà du cardiomyocyte, je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de siéger à mon jury.

À Madame le Docteur Jeanne MIALET-PEREZ pour son enseignement, son aide, son encadrement, sa patience et sa gentillesse tout au long de ce travail et pour ceux à venir.

À Monsieur le Professeur Angelo PARINI de m'avoir accueillie au sein de son équipe, de m'avoir confié cette étude et de m'avoir encadrée pendant ces 5 années.

À Madame le Professeur Marie-Bernadette DELISLE, pour avoir codirigé ce travail, mais aussi pour sa confiance, ses encouragements, son aide et ses conseils qui enrichissent mon quotidien depuis presque 9 ans.

Je remercie toutes les personnes, il serait trop long de les nommer toutes, qui peuplent mon quotidien, qui m'apportent leur amitié, leur soutien, leurs encouragements et leur aide quand j'en ai besoin. Je remercie les équipes du service d'Anatomie Pathologique et du CMEAB avec qui je partage les bons et les mauvais moments. Je remercie tous les gens de l'INSERM (I2MC) et les partenaires de l'INSERM qui m'ont accueillie parmi eux et qui m'ont fait découvrir ce merveilleux métier qu'est celui de la recherche scientifique avec toute la passion qui les anime. Je suis heureuse que cette aventure s'achève et qu'une nouvelle commence à leurs côtés. Qu'elle soit aussi enrichissante que la première...

À ma famille, enfin...

RÉSUMÉ

L'insuffisance cardiaque (IC) correspond à l'incapacité du cœur à répondre à la demande métabolique ; elle est souvent l'étape finale de nombreuses pathologies cardiovasculaires (PCV). La meilleure prise en charge médicale des PCV entraîne une meilleure survie des patients, mais en parallèle une augmentation de l'IC. Le pronostic de l'IC est relativement sévère et est plus sombre chez le sujet âgé. Une des raisons est la sénescence intrinsèque du myocarde qui constitue un facteur de vulnérabilité.

La MAO-A est une enzyme mitochondriale qui réalise la déamination oxydative des amines biogènes ; elle est une source de stress oxydant par la libération d' H_2O_2 . Dans le cœur, cette enzyme augmente dans de nombreuses conditions pathologiques aiguës et chroniques, mais aussi au cours de la sénescence physiologique.

Dans une première partie de notre travail, nous avons étudié les conséquences fonctionnelles d'une augmentation de la MAO-A dans le cœur. Pour cela nous avons caractérisé un modèle murin surexprimant la MAO-A dans le cardiomyocyte adulte. Nous avons montré que ces souris présentaient un fort stress oxydant et évoluaient spontanément vers l'IC. De plus, nous avons mis en évidence un lien entre la MAO-A, le stress oxydant, l'activation par phosphorylation de p53 et la mort des cardiomyocytes par nécrose.

Dans une seconde partie, nous nous sommes attachée à déterminer si la MAO-A participait à la sénescence intrinsèque du myocarde. Pour cela, nous avons fait appel à plusieurs modèles animaux : la souris transgénique surexprimant la MAO-A dans le cardiomyocyte, la souris KO-MAO-A que nous avons comparée à la souris sauvage et au rat, modèle de surexpression physiologique de la MAO-A au cours du temps. Nous avons mis en évidence un lien entre la MAO-A et le remodelage au cours de la sénescence. Nous avons observé l'augmentation des protéines p21 et p53, marqueurs précoces de la sénescence qui semble essentiellement liée au stress oxydant. Nous avons également mis en évidence de façon intéressante une fission mitochondriale au cours de la sénescence qui peut être prévenue par l'inhibition de la MAO-A. Nous ignorons si cette fission est un mécanisme délétère ou protecteur pour le cardiomyocyte. Cette observation ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de la dynamique mitochondriale.

Nos travaux confirment le rôle de la MAO-A dans le remodelage du myocarde dans l'IC, mais aussi dans la sénescence, avec un lien possible avec la sénescence intrinsèque du cœur notamment via la production d' H_2O_2 . La première partie de nos travaux montre un

effet délétère de cette enzyme sur la survie du cardiomyocyte. La seconde partie laisse entrevoir un rôle inconnu jusqu'alors de la MAO-A dans la dynamique mitochondriale.

ABSTRACT

Heart failure (HF) is the inability of the heart to meet the body's metabolic demand. HF is often the end stage of many cardiovascular diseases (CVD). Optimal medical treatment of CVD improves patient survival, but leads to an increased incidence of HF. The prognosis of HF is relatively severe and is worse in the elderly. One reason is the intrinsic myocardial senescence constitutes a vulnerability factor.

MAO-A is a mitochondrial enzyme that catalyzes the oxidative deamination of biogenic amines and is a source of oxidative stress by the release of H₂O₂. In the heart, this enzyme increases in many acute and chronic pathological conditions but also during physiological senescence.

In the first part of our work, we investigated the functional consequences of increased MAO-A in the heart. We generated transgenic mice overexpressing MAO-A in the adult cardiomyocyte. Mice exhibited strong oxidative stress and spontaneous progressive HF. In addition, we have demonstrated a relationship between MAO-A, oxidative stress, activation of p53 by phosphorylation and necrotic death of cardiomyocytes.

In the second part, we focused on the relationship between MAO-A and intrinsic myocardial aging. We studied different animal models: transgenic mice overexpressing MAO-A in the adult cardiomyocyte, MAO-A knock-out mice compared with wild type mice and rat, physiologic model of MAO-A over-expression during aging. We have demonstrated an association between MAO-A and the myocardial remodeling during aging. We observed enhancement of p21 and p53, early marker of oxidative stress-induced senescence which seems more correlated to oxidative stress than MAO-A. Interestingly, mitochondrial fission during senescence can be prevented by inhibition of MAO-A. We don't know if that fission is a protective or deleterious mechanism for the cardiomyocyte. This data opens new perspectives in the field of mitochondrial dynamics.

Our data confirms the role of MAO-A in myocardial remodeling in HF, but also in senescence, with a possible link with the intrinsic aging of the heart, via H₂O₂ production. In the first part of our work, we demonstrate a deleterious effect of this enzyme on cardiomyocyte survival. The second part of our work suggests a previously unknown role of MAO-A in mitochondrial dynamics, independent of oxidative stress.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	5
ABSTRACT	8
TABLE DES MATIERES	10
LISTE DES ABREVIATIONS	14
LISTE DES FIGURES	17
LISTE DES TABLEAUX	19
INTRODUCTION GENERALE	21
I L'INSUFFISANCE CARDIAQUE	23
I.A ASPECTS CLINIQUES ET BIOLOGIQUES	24
I.A.1 LES SIGNES FONCTIONNELS DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE	24
I.A.2 CLASSIFICATION	24
I.A.3 LES MARQUEURS BIOLOGIQUES	25
I.A.4 COMORBIDITÉS ET SÉNESCENCE	25
I.A.5 PRONOSTIC	27
I.A.6 REMODELAGE DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE	28
I.A.7 MÉCANISMES RESPONSABLES DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE	40
I.A.8 CONCLUSION	40
II LE STRESS OXYDANT	41
II.A.1 DÉFINITION	41
II.A.2 SOURCES	42
II.A.3 ANTIOXYDANTS	45
II.A.4 EFFETS SUR LA CELLULE	47
II.A.5 LES MARQUEURS DU STRESS OXYDANT	50
II.A.6 RÔLE DES ROS DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE ET LA SENESCENCE	52
II.A.7 CONCLUSION	58

III	MAO	59
<hr/>		
III.A	GÉNÉRALITÉS	59
III.B	LA MAO-B	62
III.C	LA MAO-A	62
III.D	MAO-A ET PATHOLOGIES CARDIAQUES	63
III.D.1	MAO-A ET L'ISCHÉMIE REPERFUSION CARDIAQUE	63
III.D.2	MAO-A AU COURS DE L'HYPERTROPHIE ET L'INSUFFISANCE CARDIAQUE	63
III.D.3	MAO-A ET SÉNESCENCE	64
III.E	CONCLUSION	65
IV	PROBLÉMATIQUE	66
<hr/>		
V	PREMIÈRE ÉTUDE	68
<hr/>		
V.A	AVANT PROPOS	69
V.B	CONCLUSION	120
VI	SECONDE ÉTUDE	122
<hr/>		
VI.A	AVANT PROPOS	122
VI.B	INTRODUCTION	122
VI.C	MATERIELS ET METHODES	125
VI.C.1	ANIMAUX	125
VI.C.2	CARDIOMYOCYTES ISOLES	125
VI.C.3	MICROSCOPIE	125
VI.C.4	IMMUNOHISTOCHIMIE AVEC L'ANTICORPS ANTI- 8-OXO-DG	126
VI.C.5	MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE	126
VI.C.6	HISTOMORPHOMETRIE	127
VI.C.7	WESTERN BLOT	127
VI.C.8	RT-PCR EN TEMPS REEL	128
VI.C.9	ISOLEMENT DES CARDIOMYOCYTES DE RATS ADULTES	128
VI.C.10	ETUDE IN VITRO	130
VI.C.11	ANALYSE STATISTIQUE	130
VI.D	RÉSULTATS	131
VI.D.1	LA MAO-A ET LA SENESCENCE	131
VI.D.2	LIEN MAO-A ET DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE	135

VI.D.3	LE REMODELAGE MYOCARDIQUE CHEZ LE RAT AU COURS DE LA SENESCENCE	137
VI.D.4	LA SENESCENCE ET LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE CHEZ LE RAT	139
VI.D.5	STRESS OXYDANT ET DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE : ETUDE IN VITRO, RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES	142
VI.E	DISCUSSION	143
VI.E.1	SENESCENCE ET MAO-A	143
VI.E.2	SENESCENCE ET FISSION	147
VI.F	CONCLUSION	150
VII	CONCLUSION GENERALE	151
ANNEXES		154
VIII	ANNEXE 1	155
IX	ANNEXE 2	157
X	ANNEXE 3	159
XI	ANNEXE 4	160
XII	ANNEXE V	219
REFERENCES		225

LISTE DES ABREVIATIONS

•OH	Radical hydroxyle
5-HT	Sérotonine ou 5-hydroxytryptamine
8-oxo-dG	8-hydroxy-2'-déoxyguanosine
ADNmt	ADN mitochondrial
ALDH	Aldéhydes déshydrogénases
ALR	Aldéhyde réductase
Bax	Bcl2-Associated X Protein
BER	Base Excision Repair
BMI	Body mass index
BNP	Brain Natriuretic Peptide
DA	Dopamine
Drp-1	Dynamain-related protein-1
ERK	Extracellular-signal-regulated kinases
ERRs	estrogen receptor related receptor
FAD	Flavin adenine dinucleotide
Fis 1	Fission protein 1
GPDH	Glycerol-3-phosphate déshydrogénase
GPX	Glutathion peroxydase
GSH	Gluthation
GSSG	Glutathion disulphide
H ₂ O ₂	Péroxyde d'hydrogène
HIF1 α	Hypoxia-inducible factors
Hmox	Heme-oxygenase
HPLC	High-performance liquid chromatography
HTA	Hypertension artérielle
IC	Insuffisance cardiaque
IDM	Infarctus du myocarde
IL6	Interleukine 6
IVD	Insuffisance ventriculaire droite
IVG	Insuffisance ventriculaire gauche
MAO	Monoamine oxydase
MAPkinase	Mitogen Activated Protein Kinase
MEC	Matrice extracellulaire
Mfn	Mitofusin
Mn-SOD	Manganèse superoxyde dismutase
NAC	N-acetyl-cystein

NE	Norépinéphrine
NER	Nucléotide Excision Repair
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NHEJ	Non Homologous End-Joining
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Nitric Oxide Synthase
NOX	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxydase
NRFs	nuclear respiratory factor
NTG	Non transgénique
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OONO-	Peroxynitrite
OPA1	Optic atrophy-1
PAS	Periodic Acid Schiff
PCV	Pathologies cardiovasculaires
PEA	Bêta-phenylethylamine
PPARs	peroxisome proliferator-activated receptors
RIRR	ROS induced ROS release
RO•	Radical alkoxyde
RO ₂ •	Le radical peroxyde
ROS	Radicaux libres oxygénés
SEM	Écart à la moyenne
SOD	Superoxyde dismutase
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TG	Transgénique
TNF α	Tumor necrosis factor α
TRF2	TTAGGG repeat binding factor 2
TR β1	Thyroid hormone receptor beta 1
VG	Ventricule gauche
α-MHC	α-myosin heavy chain
β-MHC	β-myosin heavy chain

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : SURVIE CUMULEE DES PATIENTS EN IC.	22
FIGURE 2 : MODIFICATION GEOMETRIQUE DU CŒUR ABOUTISSANT A L'INSUFFISANCE CARDIAQUE.	29
FIGURE 3 : ASPECT DU MYOCARDE ET DU CARDIOMYOCYTE EN CONDITION NORMALE ET DANS L'IC.	31
FIGURE 4 : ASPECT ULTRASTRUCTURAL DE L'APPAREIL CONTRACTILE NORMAL.	32
FIGURE 5 : ASPECT ULTRASTRUCTURAL DU DISQUE INTERCALAIRE NORMAL.	33
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FUSION ET DE LA FISSION MITOCHONDRIALE MONTRANT LA LOCALISATION DES PRINCIPAUX REGULATEURS DE LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE.	34
FIGURE 7 : CASCADE DE REGULATION DE PGC1 α .	38
FIGURE 8 : SOURCES DE ROS MITOCHONDRIAUX.	43
FIGURE 9 : HOMEOSTASIE REDOX.	47
FIGURE 10 : STRUCTURE CHIMIQUE DE QUELQUES BIOMARQUEURS DE STRESS OXYDANT.	51
FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU LIEN EXISTANT ENTRE ROS, LESION DE L'ADNMT ET DYSFONCTION DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE.	55
FIGURE 12 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU LIEN ENTRE ROS ET SENESCENCE.	57
FIGURE 13 : DEAMINATION OXYDATIVE DES AMINES BIOGENES PAR LA MAO.	59
FIGURE 14 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU LIEN ENTRE MAO ET IC.	64
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INFLUENCE DE LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE AU COURS DU VIEILLISSEMENT.	124
FIGURE 16 : MAO-A ET SENESCENCE.	133
FIGURE 17 : ASPECT ULTRASTRUCTURAL DES MITOCHONDRIES DANS LES DIFFERENTS MODELES MURINS	134
FIGURE 18 : MAO-A ET MARQUEURS DE LA SENESCENCE.	135
FIGURE 19 : MAO-A ET FISSION.	136
FIGURE 20 : REMODELAGE DU MYOCARDE AU COURS DE LA SENESCENCE CHEZ LE RAT ET EVOLUTION DES MARQUEURS DE SENESCENCE.	138
FIGURE 21 : SENESCENCE ET DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE CHEZ LE RAT.	141
FIGURE 22 : ASPECT ULTRASTRUCTURAL D'UN CARDIOMYOCYTE ISOLE DE RAT ADULTE.	142
FIGURE 23 : CASCADE CELLULAIRE ABOUTISSANT A LA SENESCENCE.	144
FIGURE 24 : COLORATION CYTO-CHIMIQUE PAR LA B-GALACTOSIDASE A PH 6.	156
FIGURE 25 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU NOMBRE ABSOLU DE CELLULES COLOREES PAR LA B- GALACTOSIDASE A PH 6 CHEZ LA SOURIS NTG ET TG.	156
FIGURE 26 : ASPECT ULTRASTRUCTURAL DES MITOCHONDRIES CHEZ LE RAT JEUNE ET LE RAT AGE.	159

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION NYHA, COMPORTANT LES 4 STADES CLINIQUES.	24
TABLEAU 2 : EXEMPLES DE REACTIONS CHIMIQUES ENTRAINANT LA FORMATION DES RADICAUX LIBRES.	41
TABLEAU 3: LOCALISATION DE LA MAO-A ET DE LA MAO-B CHEZ L'HOMME DANS LES TISSUS PERIPHERIQUES.	61
TABLEAU 4 : ANTICORPS UTILISES EN WESTERN BLOT AVEC LEUR REFERENCE ET LEUR CONCENTRATION.	128
TABLEAU 5 : COMPOSITION DE LA SOLUTION DE BASE POUR L'ISOLEMENT DES CARDIOMYOCYTES ADULTES	129
TABLEAU 6 : ÉLÉMENTS AJOUTES A LA COMPOSITION DE BASE POUR REALISER LES DIFFERENTES SOLUTIONS POUR L'ISOLEMENT DES CARDIOMYOCYTES ADULTES.	130
TABLEAU 7 : COMPOSITION DE LA SOLUTION X-GAL PREPAREE EN EXTEMPORANEE.	155
TABLEAU 8 : DONNEES ECHOGRAPHIQUES DES DIFFERENTES SOURIS ANALYSEES.	157
TABLEAU 9 : POIDS DES SOURIS WT ET DE LEUR CŒUR.	157
TABLEAU 10 : POIDS DES RATS ET DE LEUR CŒUR.	158

INTRODUCTION GENERALE

Les pathologies cardiovasculaires (PCV) sont très fréquentes (HTA, athérosclérose, insuffisance coronarienne, accident cardiovasculaire, pathologie congénitale...). Aux USA, une personne sur 3 souffre d'une ou de plusieurs PCV. Malgré une meilleure gestion des facteurs de risque, l'insuffisance cardiaque (IC) reste la première cause de décès (36,3% des décès). Aux USA toutes les 37 secondes une personne meurt d'une PCV. Ces décès surviennent avant 75 ans pour un tiers d'entre eux. Si les principales PCV étaient éliminées, l'espérance de vie s'allongerait de 7 ans (ce gain ne serait que de 3 ans si on éliminait les cancers) [1].

L'amélioration de la prise en charge des PCV fait de l'IC l'issue convergente de nombreuses PCV. L'IC est une condition pathologique, et non une pathologie en soi, qui ne laisse pas présager de son étiologie. Elle est lentement progressive et passe par une période asymptomatique. Entre 25 et 74 ans, 1,5 % de la population générale présenterait une IC asymptomatique [2]. Elle est fréquente notamment après 65 ans. Sa prévalence, d'après l'étude de Framingham, basée sur des facteurs cliniques et donc sur des patients symptomatiques, est multipliée par un facteur 8 entre 60 et 90 ans (8/1000 entre 50-59 ans et 66/1000 entre 80-89 ans) [3]. L'étude plus récente de Bleumink GS *et al.* basée, elle aussi, sur des patients symptomatiques avance le chiffre de 17,4% chez le sujet de plus de 85 ans [4]. Sa prévalence devrait être multipliée par quatre en 2030, par rapport aux chiffres de 2000, notamment en raison du vieillissement de la population [5, 6]. L'IC est, aux USA, la première cause d'hospitalisation et le taux de réhospitalisation à un an est de 50 % [5, 7, 8]. Elle est coûteuse et représente 5,4 % des dépenses de santé aux USA et 1% en France [5, 9]. La meilleure prise en charge thérapeutique des sujets en IC a permis une nette amélioration de leur survie. Néanmoins, le pronostic est très sombre avec une médiane de survie de 2,1 ans sans différence notable homme/femme (Figure 1) [4].

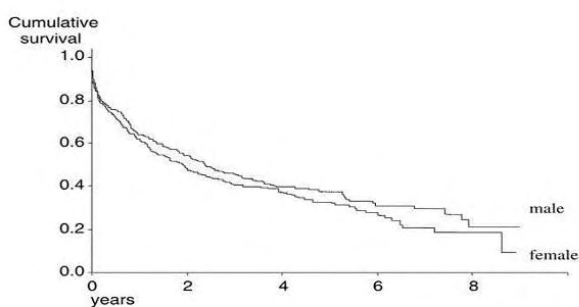


Figure 1 : Survie cumulée des patients en IC

Courbe de survie de Kaplan-Mayer tirée de Bleumink GS et al. 2004 [4]

I L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

L'IC correspond à l'incapacité du cœur à répondre à la demande métabolique [10]. Elle est la résultante d'un déséquilibre entre la demande de l'organisme et les capacités de la pompe cardiaque. La multiplicité des facteurs de risque d'IC illustre bien que ce déséquilibre peut être d'origine multiple : diminution de la délivrance d'oxygène (hypoxie chronique, athérosclérose, insuffisance coronarienne), augmentation de la charge de travail (HTA), altération structurale ou insuffisance de production d'ATP. Le stress chronique du myocarde, engendré par ces différentes situations pathologiques, entraîne une réponse adaptative. Elle comprend l'hypertrophie myocardique du VG, le remodelage fonctionnel et l'adaptation métabolique. Mais quand le stress dépasse les capacités adaptatives ou quand il est prolongé, il entraîne une hypertrophie « maladaptative », une dilatation progressive du VG, des anomalies de contraction et la défaillance cardiaque.

Lorsque la défaillance atteint le ventricule gauche, on parle d'insuffisance ventriculaire gauche (IVG) ; lorsqu'elle atteint le ventricule droit, on parle d'insuffisance ventriculaire droite (IVD) ; lorsque la défaillance atteint le cœur droit et gauche, on parle d'insuffisance cardiaque globale. L'insuffisance cardiaque gauche est de loin la plus fréquente et nous n'aborderons que ce versant dans ce chapitre.

On peut également scinder l'IC en deux : l'IC diastolique et l'IC systolique. L'IC diastolique se définit comme « la condition résultant d'une augmentation des résistances au remplissage d'un ou des deux ventricules entraînant des symptômes de congestion en relation avec des modifications importantes du rapport pression/volume en diastole. » [11]. Cette altération de la fonction diastolique résulte d'anomalies de la relaxation, de la compliance et du remplissage. La contractibilité et les performances du ventricule restent normales [12]. La fonction systolique du ventricule gauche est le plus souvent conservée ou subnormale (55 à 80% des cas) [13-15].

L'IC systolique correspond à une diminution des capacités contractiles du myocarde et aboutit à une diminution de la fraction d'éjection [10]. L'IC diastolique peut se compliquer d'IC systolique tandis que l'inverse est rarement vrai. Environ 50 à 60% des IC s'accompagnent d'une dilatation de la chambre ventriculaire gauche et d'une altération de la fraction d'éjection [16, 17].

I.A ASPECTS CLINIQUES ET BIOLOGIQUES

L'IC s'accompagne de signes fonctionnels qui sont corrélés à la gravité de la dysfonction cardiaque. Les marqueurs biologiques sont, pour leur part, le reflet du remodelage et de l'adaptation myocardique. Ils peuvent être utilisés comme marqueurs diagnostiques ou dans le suivi clinique, certains étant des marqueurs pronostiques.

I.A.1 LES SIGNES FONCTIONNELS DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

L'IC entraîne une dyspnée, à l'effort dans un premier temps puis une orthopnée et enfin une dyspnée nocturne paroxystique dans la forme évoluée. La toux peut accompagner cette dyspnée. Des palpitations et des douleurs thoraciques peuvent être présentes. Il existe aussi des signes périphériques en rapport avec le bas débit cardiaque : asthénie, ralentissement psychomoteur, syndrome confusionnel, douleurs abdominales, nausées, vomissements, oligurie, œdèmes périphériques.

I.A.2 CLASSIFICATION

Les classifications de l'IC servent essentiellement à suivre les patients et à évaluer l'évolution clinique. La classification la plus utilisée est celle de la NYHA (New York Heart Association) (Tableau 1).

Classification NYHA		
Stade I	<ul style="list-style-type: none">• Cardiopathie compensée• Pas de signe clinique D'IC• Signes de cardiopathie décelables à l'examen (souffle, cardiomégalie...)• Effort normal possible• Travail normal possible	Stade asymptomatique
Stade II	<ul style="list-style-type: none">• Signes d'IC en cas d'exercice soutenu• Effort mal supporté (essoufflement)• Toux lors d'effort violent	Stades symptomatiques : IC congestive
Stade III	<ul style="list-style-type: none">• Signes d'IC en cas d'exercice modéré• Intolérance à l'effort• Toux et essoufflement au moindre effort ou la nuit• Fatigue, dyspnée	
Stade IV	<ul style="list-style-type: none">• Signes d'IC au repos• Aucun effort possible• Toux et dyspnée au repos• Signes d'IC globale (ascite grave, œdème pulmonaire marqué)• Pouls faible (bas débit)	

Tableau 1 : classification NYHA, comportant les 4 stades cliniques

I.A.3 LES MARQUEURS BIOLOGIQUES

Au cours de l'IC, il existe de multiples facteurs (inflammatoires, biochimiques, neurohormonaux), qui agissent sur le cardiomyocyte et/ou sur l'interstitium. Les biomarqueurs correspondent aux enzymes, hormones, marqueurs de stress, marqueurs de la lésion du cardiomyocyte qui sont modifiés ou activés. Ils reflètent la souffrance du cardiomyocyte et/ou la défaillance cardiaque. Leur détection urinaire ou sanguine vient compléter les données clinico-biologiques et peut appartenir au suivi du patient.

C'est le cas du BNP (Brain Natriuretic Peptide), protéine synthétisée par le cardiomyocyte au cours du stress hémodynamique [18]. Son augmentation est un reflet de la sévérité de l'IC et son taux est corrélé au stade clinique (classification NYHA) [19-22].

On observe au cours de l'IC des phénomènes inflammatoires et leur détection peut être utilisée comme marqueur pronostique. L'IL6 est un marqueur pronostique de morbidité et de mortalité chez le sujet en IC, indépendamment de la fraction d'éjection ventriculaire gauche [23]. Le TNF α augmente également ainsi que ses récepteurs solubles 1 et 2. Ils sont corrélés à la fraction d'éjection et au degré d'IC, mais pas à la mortalité [24].

I.A.4 COMORBIDITÉS ET SÉNESCENCE

La complexité de l'IC est liée aux comorbidités qui lui sont associées. Chez les sujets hospitalisés pour IC, on dénombre de 2 à 6 comorbidités et jusqu'à plus de 7 chez certains sujets [25, 26]. Certaines de ces comorbidités sont également des facteurs de risque. Parmi eux, les plus fréquents sont les pathologies coronariennes, l'hypertension artérielle, le diabète, l'obésité. L'IC est une pathologie du sujet âgé, mais la place de la sénescence en tant que facteur de risque reste un sujet discuté dans la littérature.

I.A.4.a LES COMORBIDITÉS

I.A.4.a.i Les pathologies coronariennes

La meilleure prise en charge de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde (IDM) permet une survie prolongée, mais s'accompagne en parallèle d'une augmentation de l'incidence de l'IC. Il reste le facteur de risque majeur de l'insuffisance cardiaque systolique et le risque d'IC augmente avec la taille de l'infarctus, mais aussi avec la baisse de la contractilité myocardique [27, 28]. L'évolution vers l'IC proviendrait d'un remodelage

maladaptatif qui prendrait place dès la phase aiguë de l'ischémie myocardique. Ce remodelage aurait des répercussions électriques, mécaniques et structurales à l'origine du dysfonctionnement myocardique.

1.A.4.a.ii L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) semble être le facteur de risque principal de l'insuffisance cardiaque diastolique, elle toucherait environ 60 % des sujets [29, 30]. Dans l'étude de Framingham, l'HTA précède l'insuffisance cardiaque diastolique dans 91% des cas. Elle entraîne une augmentation de la masse du VG ainsi qu'une hypertrophie qui peut être concentrique ou excentrique [31]. Cette hypertrophie est la réponse au stress mécanique, mais est également influencée par les neurohormones, les facteurs de croissance et les cytokines [32, 33].

1.A.4.a.iii Le diabète

L'IC chez le sujet avec un diabète décompensé est fréquente, elle serait 2 à 5 fois plus fréquente que chez le sujet non diabétique [34, 35]. Les raisons sont multiples et liées aux comorbidités qui accompagnent le diabète comme l'athérosclérose coronarienne et l'HTA [36, 37]. De plus, le diabète a en lui-même une toxicité directe sur le myocarde à l'origine de la cardiomyopathie diabétique [38]. Les mécanismes de cette cardiomyopathie sont complexes, car ils associent des anomalies métaboliques, la production de ROS (ROS), une micro et une macroangiopathie...

1.A.4.a.iv L'obésité

L'obésité est en continuelle augmentation dans les pays industrialisés avec notamment un nombre croissant de sujets dont le BMI est supérieur à 40 [39, 40]. Elle est retrouvée chez 37 % des sujets en insuffisance cardiaque diastolique [41]. Son incidence est corrélée au BMI et à la durée de l'obésité : elle passe de 12 à 20 % après 20 ans d'obésité (incidence inférieure à 5% chez les sujets du même âge dont le BMI est normal) [42].

L'obésité a, en dehors des pathologies qui lui sont associées comme la dyslipidémie, l'HTA et le diabète, un effet direct sur le cœur. Elle entraîne une augmentation de la masse cardiaque, une hypertrophie concentrique du myocarde qui s'associe à une augmentation de la taille des cavités [41, 43-48].

I.A.4.a.v Le syndrome métabolique

Il ne s'agit pas d'une pathologie mais d'une association de facteurs de risque : HTA, hypertriglycéridémie, HDL-cholestérol bas, obésité androïde et élévation de la glycémie. Il prédispose à la survenue d'un diabète de type 2 et au développement des PCV[49]. Il toucherait un individu sur quatre aux Etats-Unis [50]. Il multiplie par deux le risque d'IC sévère post-infarctus du myocarde et est un facteur indépendant d'IC. Parmi les composants de ce syndrome métabolique, l'hyperglycémie est un facteur prédictif indépendant de la survenue de l'IC [51].

I.A.4.b LA SENESENCE

Il est difficile de déterminer les effets du vieillissement sur le système cardiovasculaire, car avec l'âge apparaissent des pathologies (diabète, athérosclérose, HTA...) qui ont des retentissements cardiaques et vasculaires. À l'heure actuelle, on ne sait toujours pas si le vieillissement du cœur est une adaptation ou une pathologie progressive [52, 53]. Il existe indéniablement une sénescence intrinsèque du myocarde en dehors de toute pathologie [54]. Elle se caractérise par des anomalies fonctionnelles (altération de la fréquence cardiaque en réponse au stress, de la relaxation myocardique, diminution de la compliance), structurales (hypertrophie ventriculaire gauche, perte de cardiomyocytes, fibrose interstitielle) et cellulaires (augmentation de la production de stress oxydant, diminution des défenses antioxydantes et des mécanismes de réparation, accumulation de dommages oxydatifs, anomalies métaboliques...) [54-56]. L'ensemble de ces modifications n'est pas spécifique à la sénescence et existe, pour la plupart, dans l'IC. Néanmoins leur préexistence pourrait expliquer l'issue plus rapide et défavorable de l'IC chez le sujet âgé.

I.A.5 PRONOSTIC

L'IC est une pathologie grave, mais son pronostic dépend de sa nature diastolique ou systolique. L'insuffisance cardiaque systolique est de loin la plus péjorative.

La mortalité à 1 an varie de 14,9% à 19 % pour les insuffisances cardiaques systoliques contre 8 à 9,4% pour les insuffisances cardiaques diastoliques [57, 58]. La mortalité à 1 an augmente dramatiquement après une première hospitalisation 28 à 36% [59-62]. Approximativement, 50% des décès sont soudains, soit 6 à 9 fois plus que dans la population générale [63]. Ce risque de mort subite serait bien mieux corrélé à la masse ventriculaire qu'à la fonction cardiaque [64, 65].

Le pronostic est nettement plus sévère chez le sujet âgé en raison des comorbidités qui s'associent à l'âge, mais aussi en raison de la plus grande vulnérabilité du sujet âgé au stress et de la sénescence intrinsèque du myocarde. L'âge est en lui-même un facteur de risque de mortalité indépendant (âge supérieur à 70 ans) [66]. L'IC aggrave la dépendance chez le sujet âgé et la fragilité qui en résulte multiplie par 4 le risque de décès [67, 68]. La mortalité à 1 an chez les sujets institutionnalisés de plus de 80 ans est dramatique, atteignant 63% avec une survie moyenne de 4 mois seulement [69].

I.A.6 REMODELAGE DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

Le développement de l'IC est un processus lent et chronique qui s'accompagne d'un stress myocardique qui initie des modifications structurelles appelées remodelage, dont le but est de normaliser le stress pariétal [70]. Le remodelage cardiaque se manifeste par des modifications de la taille, de la forme et de la fonction du cœur. Le stress ventriculaire est considéré comme compensé si le processus de remodelage permet une fonction ventriculaire normale. C'est-à-dire si le ratio masse/volume ventriculaire est suffisant pour faire redescendre à son niveau basal le stress au sein de la paroi myocardique. Lorsque le stress se prolonge et que les mécanismes compensatoires sont dépassés, le remodelage initial devient maladaptatif entraînant une dysfonction ventriculaire aboutissant à l'IC : c'est la phase décompensée [71]. À l'échelle tissulaire, le remodelage s'accompagne d'une hypertrophie des cardiomyocytes, des modifications de l'expression et de la distribution des composants intracellulaires et des protéines de la MEC, une perte des cardiomyocytes et une dysfonction métabolique [72].

I.A.6.a Modifications géométriques

Au cours de l'IC on observe toujours une augmentation de la masse cardiaque qui s'accompagne d'un épaissement de la paroi myocardique ou d'une dilatation de la chambre ventriculaire. L'épaissement pariétal apparaît le plus souvent en réponse à une augmentation barométrique (HTA, sténose aortique...) tandis que la dilatation des cavités survient volontiers au cours des surcharges volumétriques [73]. À l'échographie ces deux modes de réponses sont recherchés par le rapport épaisseur de la paroi du VG sur diamètre diastolique. Lorsque l'épaisseur du myocarde est augmentée, l'hypertrophie est dite concentrique, dans le cas contraire, elle est dite excentrique. Il est important de noter que l'évolution naturelle de l'IC aboutit à l'hypertrophie excentrique et à la chute de la fraction

d'éjection. À ce stade, l'épaississement de la paroi ventriculaire est réduit par rapport au volume de la cavité et la géométrie myocardique devient sphérique ce qui entraîne l'augmentation des contraintes pariétales.

Les techniques modernes ont bien montré que la dysfonction ventriculaire chez les patients avec une hypertrophie concentrique commençait bien avant la baisse de la fraction d'éjection [74-76]. Mais les paramètres impliqués dans la transition de l'hypertrophie concentrique vers l'IC dilatée sont encore mal connus. Il semble que le remodelage joue un rôle clef dans la réponse maladaptative en altérant les capacités contractiles des cardiomyocytes et en modifiant la composition de la matrice extracellulaire (MEC).

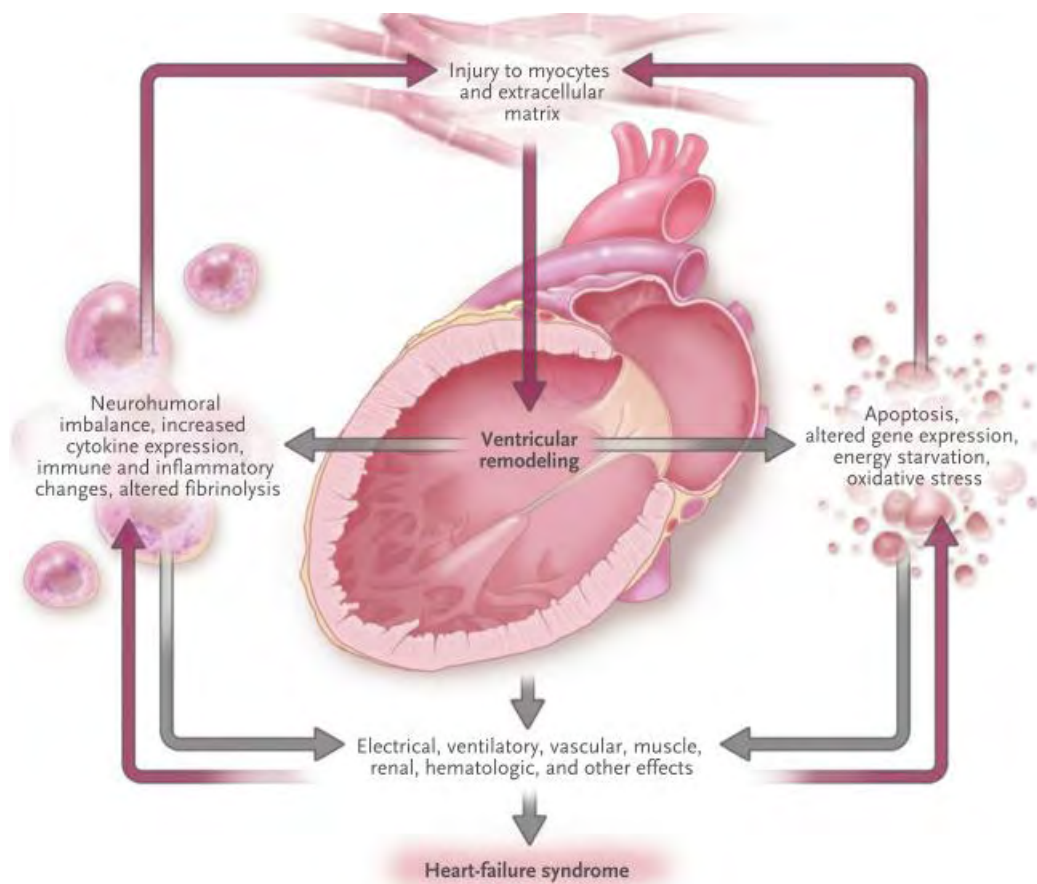


Figure 2 : Modification géométrique du cœur aboutissant à l'insuffisance cardiaque

Les altérations du cardiomyocyte et de la matrice extracellulaire entraînent des modifications de la taille, de la forme et de la fonction du ventricule gauche et plus généralement du cœur dans son intégralité, processus appelé remodelage. Ces modifications, à leur tour, entraînent une instabilité électrique, l'activation de systèmes biologiques, qui peuvent être délétères sur le cœur comme sur les autres organes ou tissus. L'ensemble associé à des événements intercurrents (infarctus du myocarde, décompensation aiguë...) aboutit progressivement à l'IC. Tiré de Mc Murray et al. 2010 [77]

1.A.6.b Modifications tissulaires et cellulaires

Au cours de l'IC, tous les constituants du myocarde sont affectés à l'origine d'une modification architecturale globale et d'une fibrose interstitielle. Néanmoins, c'est le

cardiomyocyte qui semble présenter les altérations les plus marquées à l'origine d'une détérioration fonctionnelle et métabolique pouvant aboutir à la mort cellulaire.

I.A.6.b.i Les modifications architecturales

Le cardiomyocyte est une cellule en forme de brique qui renferme un ou deux noyaux centraux. Contrairement au muscle strié périphérique, les cardiomyocytes ne sont pas arrangés en faisceaux, mais forment un réseau complexe de cellules interconnectées par leurs extrémités. Dans l'IC, les cardiomyocytes ont un aspect ondulant ou étiré à l'origine d'une désorganisation de l'architecture globale du myocarde. Leur noyau est irrégulier parfois de forme rectangulaire (Figure 3).

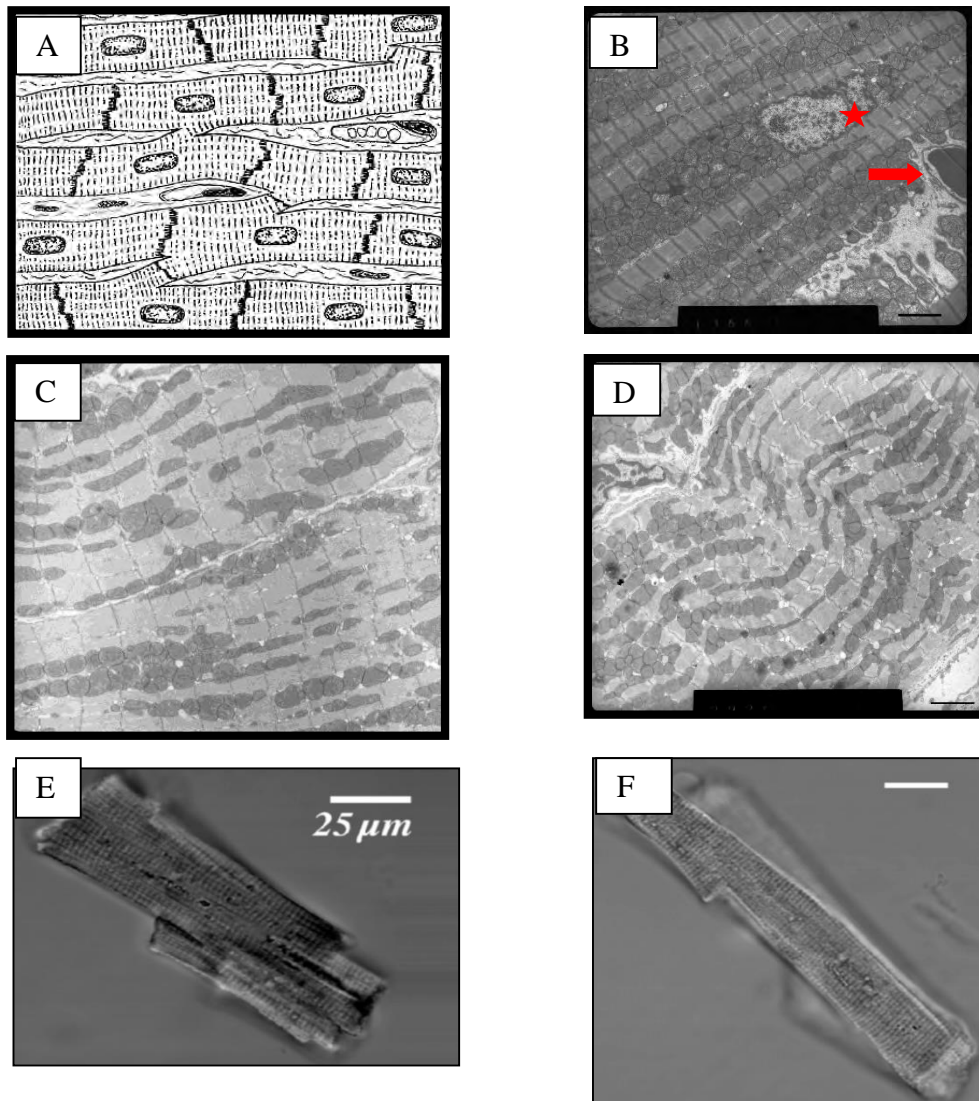


Figure 3 : Aspect du myocarde et du cardiomyocyte en condition normale et dans l'IC

A : représentation schématique du myocarde. B : aspect ultrastructural du myocarde normal (Gx4000) cœur de souris. \star = noyau du cardiomyocyte, \rightarrow = mitochondrie. C : myocarde normal (GX4000), cœur de souris, rectitude de l'appareil contractile et alignement des stries Z. D : insuffisance cardiaque (GX4000), cœur de souris, avec ondulation de l'appareil contractile et désalignement des stries Z. E : cardiomyocyte isolé à partir de sujet humain sain. F : cardiomyocyte isolé à partir d'un sujet en insuffisance cardiaque. Photographies tirées de Harvey et al. 2011 [78].

1.A.6.b.ii Modifications de l'appareil contractile et du cytosquelette

Dans le cardiomyocyte, l'appareil contractile occupe la plus grande partie du cytoplasme et est responsable de son aspect strié. Il est constitué de filaments fins d'actine et de filaments épais de myosine (isoforme α -MHC chez le rongeur adulte), disposés parallèlement. Ces filaments sont des complexes protéiques dont l'arrangement est responsable de l'aspect ultrastructural en stries et en bandes. L'espace délimité par les stries Z correspond à l'unité contractile ou sarcomère (Figure 4).

Dans l'IC, la striation du cytoplasme est anarchique et correspond d'un point de vue ultrastructural à un désalignement des stries Z et à la perte de la rectitude du sarcomère

(Figure 3). La composition du sarcomère est modifiée. Chez le rongeur, il existe une réexpression de l'isoforme fœtale de la chaîne lourde de la myosine : la β -MHC (β -myosin heavy chain). Cette dernière ne présente pas les mêmes propriétés que l'isoforme α -MHC, son activité ATPase est plus basse et sa vitesse de raccourcissement plus lente [79]. Chez l'humain, la myosine du myocarde ventriculaire est déjà, à l'état physiologique, constituée à 90-99% de l'isoforme β , il est donc difficile d'observer des modifications à ce niveau. Par contre, l'atrium peut présenter ce changement au cours de certaines pathologies cardiaques, comme la fibrillation auriculaire [80].

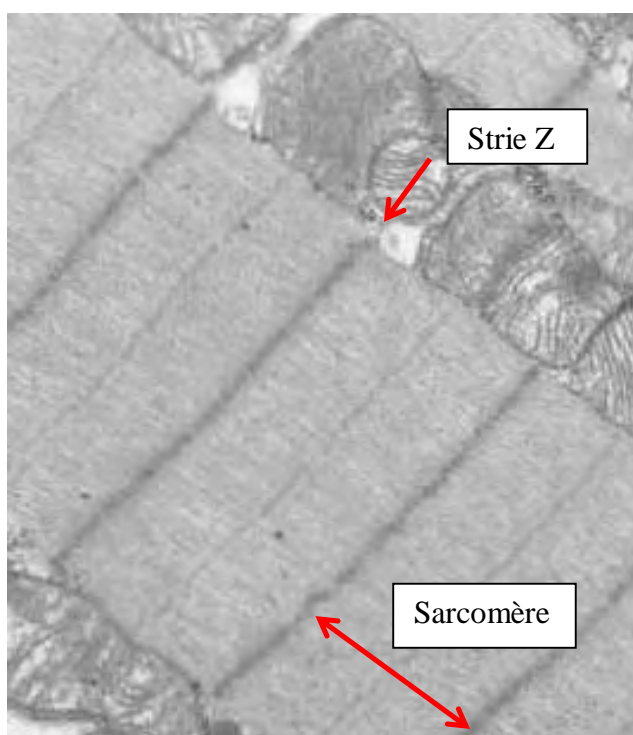


Figure 4 : Aspect ultrastructural de l'appareil contractile normal.

La stabilité et la résistance mécanique du cardiomyocyte sont assurées par un cytosquelette qui va permettre l'encrage des myofibrilles et des structures intracellulaires comme l'appareil de Golgi, le noyau et les mitochondries [81, 82]. On distingue 4 groupes de protéines [83]:

- Les protéines du squelette sarcomérique : titine, protéine C, α -actinine, myoméline et protéine M,
- Les protéines du disque intercalaire qui constituent les jonctions connectant étroitement l'appareil contractile de deux cardiomyocytes adjacents. Trois types de jonctions sont présents : les desmosomes : desmoplakine, desmocolline, desmogleine, desmine ; les jonctions adhérentes : N-cadhérine, caténine, vinculine ; les jonctions communicantes : connexines (Figure 5),

- Les protéines du cytosquelette à proprement parlé : tubuline, desmine, actine,
- Les protéines associées à la membrane : dystrophine, spectrine, taline, vinculine, ankyrine.

Dans l'IC, il existe une diminution des protéines du squelette sarcomérique (titine, myoméline, α -actinine) ce qui se traduit par des zones de rupture des stries Z [84-88]. Les protéines du cytosquelette sont modifiées dans leur ensemble avec une densification des microtubules (tubuline) et une désorganisation de la desmine [85, 89, 90]. Les protéines associées à la membrane sont globalement augmentées [91, 92].

Au niveau du disque intercalaire, il existe des modifications quantitatives et qualitatives des jonctions communicantes, plus particulièrement de la connexine 43, à l'origine d'un ralentissement de la conduction [92-98]. Ces modifications seraient précédées par la diminution d'expression des jonctions adhérentes (β -caténine) [99]. Les altérations des desmosomes ne sont pas la règle [100].

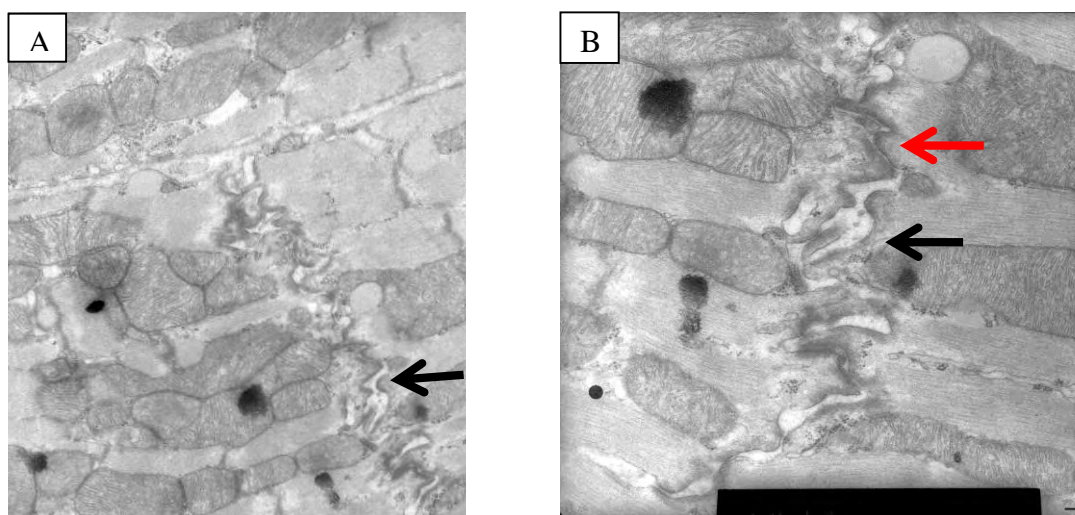


Figure 5 : Aspect ultrastructural du disque intercalaire normal

A : aspect ultrastructural du disque intercalaire (\leftarrow) GX5000 permettant l'alignement de l'appareil contractile entre deux cardiomyocytes. **B** : disque intercalaire composé de jonctions adhérentes (\leftarrow) et de desmosomes (\leftarrow).

1.A.6.b.iii Les modifications de la mitochondrie

La mitochondrie est une organelle clef du cardiomyocyte dont elle occupe 30 % du volume. Les mitochondries situées au contact du sarcomère sont de taille homogène, régulièrement réparties entre deux stries Z, sur une seule rangée. Les mitochondries périnucléaires et périsarcolémales sont hétérogènes en taille, moins organisées et plus mobiles [101]. Dans l'IC la désorganisation du sarcomère s'associe à une désorganisation des mitochondries qui ne sont plus alignées le long de l'appareil contractile. De plus, quelle

que soit l'étiologie de l'IC, on observe une augmentation de leur nombre et une accumulation de petites mitochondries [102-104]. Cette constatation suggère donc une modification de la dynamique mitochondriale. Cette dernière est maintenue grâce à la balance entre fusion et fission (Figure 6). La fission est régulée par l'activité de deux protéines : Drp-1 (Dynamin-related protein-1) et Fis 1 (Fission protein 1). Leur action exacte est encore inconnue, mais il semble qu'elles agissent comme des mechanoenzymes qui sectionneraient les membranes par constriction [105]. Drp-1 est une protéine cytosolique qui est recrutée à la membrane externe de la mitochondrie par Fis 1. Les régulateurs de la fusion mitochondriale chez l'humain et les mammifères sont Mfn (mitofusine) et OPA1 (optic atrophy-1). Mfn a deux isoformes : Mfn1 et Mfn2 qui sont toutes les deux localisées sur la membrane externe de la mitochondrie. Mfn 1 et 2 interagissent pour coordonner la fusion des membranes externes de deux mitochondries voisines [106, 107]. La fusion de la membrane externe ne requiert que de faibles concentrations de GTP. OPA1 est localisé dans l'espace intermembranaire associé à la membrane interne de la mitochondrie. Il participe au remodelage des crêtes, au rapprochement et à la fusion des membranes internes. La fusion des membranes internes nécessite que le potentiel de membrane soit intact. Il requiert de grandes quantités d'ATP. Il est important de noter que la fusion des membranes internes et externes sont deux phénomènes indépendants [108-110].

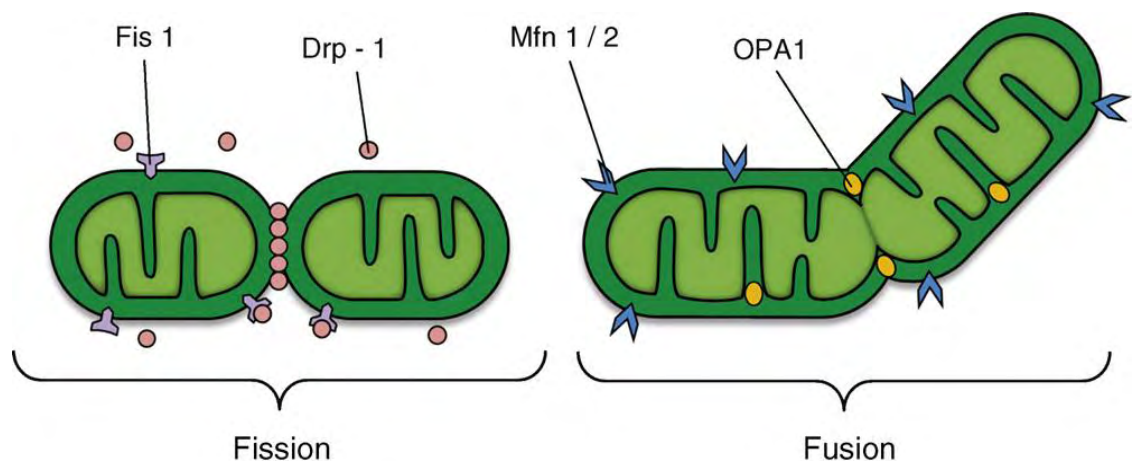


Figure 6 : Représentation schématique de la fusion et de la fission mitochondriale montrant la localisation des principaux régulateurs de la dynamique mitochondriale.

Figure tirée de Kuzmicic et al. 2001 [439].

On connaît surtout le rôle de la dynamique mitochondrial à partir de modèles pathologiques ou délétés. En condition physiologique, la dynamique fission/fusion semblerait jouer un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité électrique et biochimique de la mitochondrie, mais aussi dans son renouvellement, dans la ségrégation et la protection de l'ADNmt [111-113]. La fission faciliterait la distribution à l'identique des mitochondries

dans les cellules-filles au cours de la mitose et permettrait la dégradation sélective des mitochondries endommagées par autophagie [114, 115]. La fusion augmenterait la phosphorylation oxydative [116, 117]. En effet, en créant une continuité physique entre deux mitochondries, elle faciliterait la propagation du potentiel de membrane et la diffusion de métabolites. L'inhibition de la fusion s'accompagne d'une diminution de la consommation d'oxygène et une perte du potentiel de membrane [106, 118]. La fusion met en commun les membranes, mais aussi le contenu de la matrice et l'ADNmt, ce qui permet au génome mitochondrial de devenir mixte. Cette hétéroplasmie est importante en cas de lésion de l'ADNmt. Dans le cas des pathologies en rapport avec des mutations de l'ADNmt, la ségrégation progressive de l'ADNmt pathologique conditionne l'évolution de la maladie. De plus, la perte de la fusion mitochondriale s'accompagne d'une augmentation des mutations ponctuelles, des délétions, voire des déplétions de l'ADNmt [119]. La présence d'un faible nombre de copies d'ADNmt dans une mitochondrie pourrait favoriser la dysfonction mitochondriale en cas de mutation ou délétion de l'ADNmt, car ce dernier code pour les protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative et la synthèse d'ATP. La fusion aurait donc un rôle crucial dans la protection du génome mitochondrial.

La dynamique mitochondriale semble également impliquée dans la mort cellulaire. La fission semblerait liée à la libération de facteurs pro-apoptotiques dans de nombreuses cellules. Il a été montré que la fragmentation des mitochondries est rapide après un stimulus apoptotique. Les mutants dominants négatifs Drp1 n'ont pas de fission mitochondriale et dans certains cas n'ont pas de relargage du cytochrome c [120-123]. Parallèlement, la protéine de fusion de la membrane interne de la mitochondrie Opa1 protégerait du relargage du cytochrome c [124, 125]. De façon intéressante, il a été montré que l'ouverture du pore de transition mitochondrial et la dépolarisation de la membrane mitochondriale activent l'autophagie. Ce qui suggère que l'autophagie joue un rôle protecteur en prévenant la mort [126, 127]. La mise en évidence dans les cellules neuronales de l'activation de l'autophagie par Fis 1 renforce l'hypothèse d'un lien entre fission et autophagie [128].

Dans l'IC les modifications morphologiques de la mitochondrie participent certainement à la pathogenèse et à l'évolution de l'IC. Dans une étude récente, Chen et al [129], ont montré que dans l'IC post-ischémique chez le rat comme chez l'humain, l'accumulation de petites mitochondries résultait d'une diminution du niveau de la protéine de fusion OPA1 et d'une augmentation de la protéine de fission Drp1. Dans le cas des cardiopathies dilatées humaines, les résultats de cette étude sont d'interprétation plus complexe, possiblement en rapport avec le faible nombre d'individus inclus (n=5) et la grande hétérogénéité de cette pathologie. En effet, on observe à la fois une augmentation du

niveau des protéines de fusion (Mfn1 et Mfn2) et de fission (Drp1) avec une variabilité entre les individus. La fonction exacte de cette fission au cours de l'IC reste inconnue bien qu'un lien avec la mort cellulaire par apoptose soit souvent évoqué.

La membrane interne de la mitochondrie forme des invaginations régulières appelées crêtes qui forment un réseau tubulaire régulier, serré ; le diamètre interne des crêtes varie de 10 à 15 nm. Ce réseau compartimentalise la mitochondrie et toute modification de sa morphologie a des effets profonds sur l'activité de la mitochondrie en modifiant la cinétique de diffusion des métabolites et des protéines solubles [130]. Or au cours de l'IC, on observe une ballonnisation des mitochondries avec un aspect clarifié de la matrice, un espacement des crêtes, voire une disposition concentrique de ces dernières [88]. Ce réarrangement des crêtes serait corrélé à l'augmentation de la production de ROS et peut être reproduit chez la souris délétée pour l'enzyme antioxydante mitochondriale superoxyde dismutase [131]. Les causes de l'augmentation du volume de la matrice peuvent être multiples. Elle est observée dans de nombreuses situations comme l'augmentation de la respiration et de la production d'ATP en situation de stress (au cours de l'ischémie reperfusion, par exemple) ; en cas de rupture du potentiel de membrane et de modifications des flux ioniques ou encore au cours de l'apoptose [132].

Les mitochondries au contact du sarcomère permettent la production locale d'ATP. Chaque jour, dans le cœur, la mitochondrie produit environ 30Kg d'ATP [133]. En situation physiologique 95% de l'ATP produit dérivent de la phosphorylation oxydative mitochondriale et 50 à 70 % de la β oxydation des acides gras [134-138]. Au stade de cardiopathie compensée, le substrat préférentiellement utilisé par ces mitochondries correspond aux acides gras libres, qui produisent 3 fois plus d'ATP que le glucose, mais nécessitent beaucoup plus d'oxygène pour leur métabolisme [104, 139]. Au stade décompensé ou en IC terminale, il existe une hypoxie chronique qui entraîne l'augmentation de l'expression de gènes facilitant le métabolisme du glucose et une baisse de l'activité de certaines enzymes du métabolisme des acides gras. L'ensemble est à l'origine d'un transfert vers le métabolisme du glucose et donc d'une baisse de production d'ATP [140-144]. Il s'y ajoute des altérations du système de transport d'énergie par la créatine kinase, gênant la régénération de l'ATP au cours de la contraction. Ces altérations résultent de la baisse d'activité totale de la créatine kinase à l'origine d'un abaissement du ratio phosphocréatine/ATP [145]. Ce ratio serait corrélé aux symptômes cliniques et serait prédictif de la mortalité [146].

La diminution des capacités métaboliques de la mitochondrie au cours de l'IC serait également liée à la diminution d'expression de PGC1 α , facteur impliqué dans la biogénèse mitochondriale. Cette dernière est sous la dépendance d'un réseau complexe interconnecté de corégulateurs et de facteurs de transcription qui régule l'expression de gènes nucléaires impliqués dans la fonction mitochondriale. Parmi eux, PGC1 α (peroxysome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α) est le régulateur clef de la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme de la mitochondrie et la production d'énergie. Via l'interaction avec de multiples facteurs de transcription (Figure 7), PGC1 α augmente l'oxydation des acides gras et la phosphorylation oxydative. Il est également capable d'activer la transcription et la réplication de l'ADNmt et d'avoir une action antioxydante. La diminution d'expression de PGC1 α dans de multiples modèles de pathologie cardiaque suggère que la cascade de transcription contrôlée par PGC1 α est vraiment un acteur clef de la défaillance métabolique dans l'IC [147, 148]. Les études expérimentales chez la souris, avec perte de la fonction de PGC1 α ou délétion du gène, ne montrent pas de modification profonde du phénotype cardiaque à l'état physiologique, probablement en rapport avec la compensation par d'autres coactivateurs de la biogénèse mitochondriale comme PGC1 β [149]. Par contre, il a été noté, chez la souris délétée pour le gène de PGC1 α , une diminution de l'expression de certaines enzymes antioxydantes comme la super-oxyde dismutase 2 ou encore la thioredoxine 2, sans accumulation de dommages oxydatifs à l'état basal [150]. Ces derniers apparaissent après constriction aortique, et s'accompagnent d'une dysfonction cardiaque plus sévère que chez la souris contrôle, avec une létalité plus grande [150].

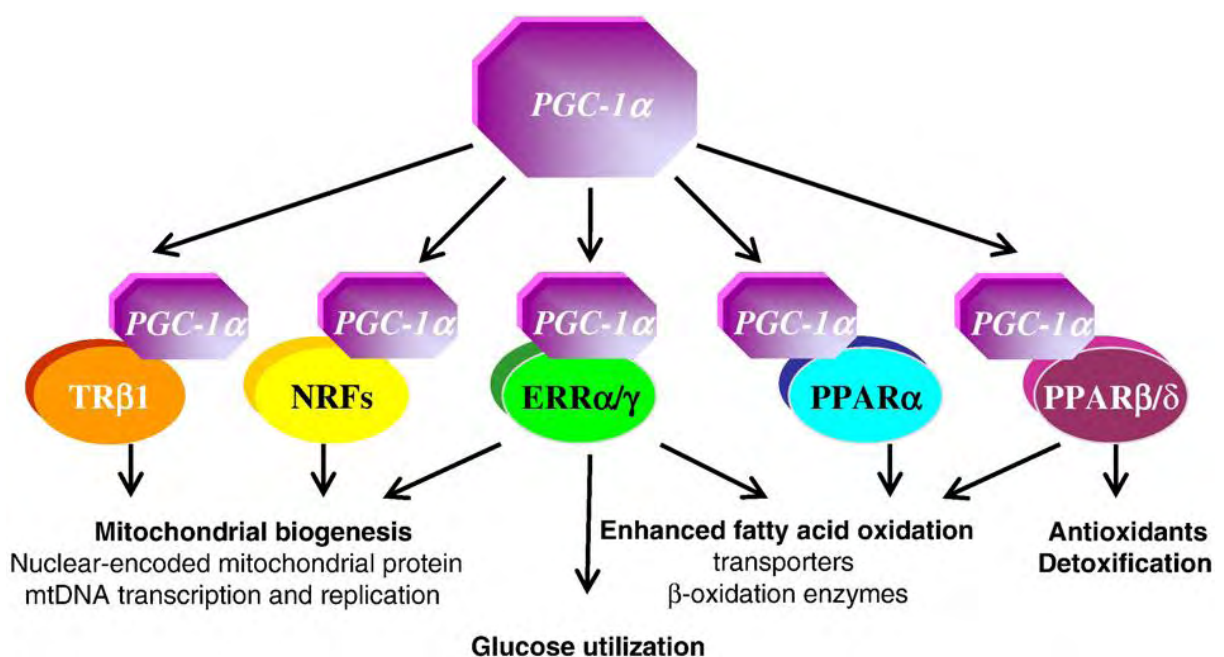


Figure 7 : Cascade de régulation de PGC1 α

PGC1 α coactive des facteurs de transcription impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique incluant la biogénèse mitochondriale, l'oxydation des acides gras et l'activité antioxydante. Figure tirée de Ventura-Clapier R et al. 2011 [147].

I.A.6.b.iv La mort cellulaire

Le cardiomyocyte est une cellule à différenciation terminale. Si dans un myocarde les cardiomyocytes semblent d'âges différents, leur renouvellement est faible et les modalités de ce renouvellement sont controversées. Chez l'humain, il n'est pas constant et son taux diminue avec l'âge. Grâce au ^{14}C intégré dans l'ADN humain au cours d'essais nucléaires pendant la guerre froide, on sait que 50% des cardiomyocytes se renouvellent au cours de la vie et que le taux de renouvellement est de 1% par an à l'âge de 25 ans et n'est plus que de 0,45% à 75 ans [151]. La mort des cardiomyocytes est un événement crucial qui peut compromettre l'homéostasie myocardique et serait un facteur clef de la transition entre pathologie cardiaque et IC [152]. Dans l'IC, on observe une diminution du nombre de cardiomyocytes dont la mort résulterait de mécanismes apoptotiques, autophagiques et nécrotiques.

Dans l'IC, la mort par apoptose des cardiomyocytes est un phénomène précoce qui apparaît dès le stade d'hypertrophie. Mais le nombre de cellules apoptotiques reste très faible (0,08% à 0,25% dans l'IC contre 0,001 à 0,002% dans le cœur normal) et ce n'est qu'au stade d'IC terminale qu'il devient élevé (232 fois) [153]. Il est intéressant de noter que de nombreuses voies de signalisation activées par l'élongation du cardiomyocyte sont également impliquées dans l'apoptose. C'est le cas, par exemple, d'Akt ou de la stimulation adrénergique [154-157].

L'autophagie correspond à la dégradation et au recyclage des composants cytoplasmiques comme les protéines ou les organelles. Elle implique la séquestration de ces éléments dans les autophagosomes et leur dégradation par le lysosome. L'autophagie est considérée comme un mécanisme de survie [158-164]. Des altérations de l'autophagie peuvent être observées dans les cardiomyocytes en mort cellulaire [162, 165, 166] et l'accumulation des protéines polyubiquitinées serait responsable d'un stress du réticulum et d'apoptose [167]. In vitro, sur des cellules H9C2, il a été montré que la mort induite par H_2O_2 pouvait être prévenue par l'inhibition de l'autophagie [168].

La mort par nécrose, longtemps considérée comme appartenant essentiellement aux phénomènes aigus, connaît un regain d'intérêt. En effet, chez les patients insuffisants

cardiaques, même stables cliniquement, la détection sérique de la troponine cardiaque, relarguée par le cardiomyocyte au cours de la nécrose, serait associée à un risque plus élevé de décès, même à faible concentration [169]. La mort par nécrose programmée impliquerait le relargage du calcium par le réticulum sarcoplasmique au niveau de la mitochondrie. Ce relargage entraînerait l'ouverture du pore de transition mitochondriale indépendamment de Bax et Bak et la libération de cytochrome c. Les modèles animaux transgéniques confirment l'implication de la nécrose dans le mécanisme de mort médiée par le réticulum, grâce à la détection de la fraction C9 du complément, considérée comme un marqueur spécifique de la nécrose [170].

Il reste encore à déterminer la contribution de chaque type de mort cellulaire dans la transition vers l'IC.

I.A.6.b.v Les modifications de la matrice extracellulaire

Dans le cœur normal, la matrice extracellulaire (MEC) joue un rôle crucial dans le maintien de la forme, de la taille et de la fonction du ventricule [171]. Elle est riche en fibres de collagène (type I et III) et en fibres élastiques. Des modifications mêmes mineures du collagène ont des répercussions mécaniques majeures [172].

Au cours de l'IC, la fibrose interstitielle va gêner le fonctionnement du cardiomyocyte en entraînant une interruption des fibres et du couplage de la contraction-excitation entre les cardiomyocytes [78, 173]. Elle est responsable d'une perte de compliance myocardique, de l'augmentation du stress mécanique au niveau de la paroi ventriculaire et d'une diminution de la relaxation. Néanmoins, il a été montré qu'il n'existait pas de bénéfice à la dégradation du collagène de la MEC lors de l'IC et qu'au contraire, cette dégradation exacerbait la dysfonction ventriculaire [171]. Cette observation renforce l'idée que le dépôt de collagène seul n'est pas un élément déterminant. La composition du collagène, l'orientation des fibres et leurs liaisons (« cross-linking ») seraient, en fait, les éléments prépondérants. Le collagène de type I est constitué de fibres volumineuses avec de nombreuses liaisons, il est plus rigide que le collagène III (dont les fibres sont fines, avec peu ou pas de liaison) [174]. Dans le cœur normal, ces deux types fibres de collagène sont en proportion globalement identiques. L'augmentation de pression entraîne au stade d'hypertrophie compensatrice, une diminution du rapport I/III du collagène (avec une augmentation du collagène de type III et une diminution du type I). Au cours de la progression vers l'IC, le collagène de type III est remplacé par le type I [175]. Cette augmentation du ratio I/III du collagène est observée dans de nombreux modèles animaux

d'IC, mais aussi chez l'humain [176-180]. De plus, il existe des modifications spatiales du collagène avec notamment une diminution et une fragmentation des structures permettant la jonction collagène/cardiomyocyte [181-184].

I.A.7 MÉCANISMES RESPONSABLES DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

Au cours de l'IC, le stress mécanique, la stimulation neurohormonale et la libération de cytokines pro-inflammatoires seraient à l'origine d'une augmentation des radicaux libres oxygénés (ROS) intracellulaires dès le stade d'hypertrophie adaptative [185]. Ces ROS sont de sources multiples : mitochondrie, xanthine oxydase, NADPH oxydase, nitrique oxyde synthase, MAO [186]. Ils sont de puissants messagers intracellulaires qui sont capables d'agir en fonction de leur concentration sur la différenciation, la prolifération, l'hypertrophie ou la mort cellulaire. Ces notions seront développées dans le chapitre suivant.

Dans l'IC, le stress oxydant chronique entraîne des dommages oxydatifs qui participent au déclin de la fonction cardiaque et dans les modèles animaux, le traitement par antioxydant présente un bénéfice indéniable [187-189]. Pourtant, chez l'humain, les études cliniques sont relativement décevantes et quelques méta-analyses montrent même un effet délétère de certains antioxydants [190]. Ces constatations ne remettent pas en cause le rôle clef du stress oxydant dans l'IC, mais soulignent l'importance de cerner les sources de ROS et de mieux cibler leur mode d'action.

I.A.8 CONCLUSION

L'IC est la résultante d'un déséquilibre entre la demande de l'organisme et les capacités de la pompe cardiaque. Quelle qu'en soit sa cause, elle s'accompagne d'un remodelage d'abord adaptatif, mais qui, à terme, contribue à la défaillance myocardique. La meilleure appréhension des mécanismes à l'origine de ce remodelage permettrait de mieux comprendre les événements à l'origine de la transition hypertrophie/IC.

Les ROS sont présents dès les phases précoces de l'IC. À l'origine de dommages oxydatifs qui s'accumulent au cours de l'évolution de l'IC, ils sont certainement par leur action cellulaire et tissulaire un acteur clef du remodelage et de la défaillance cardiaque.

II LE STRESS OXYDANT

II.A.1 DÉFINITION

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (radicaux libres ou ROS) et les capacités antioxydantes de la cellule. Les ROS correspondent à des espèces chimiques possédant au moins un électron célibataire sur leur couche périphérique. Les principaux ROS sont : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) formé à partir de la réduction d'un électron au niveau d'une molécule d'oxygène, le radical hydroxyle ($\bullet OH$), le radical peroxyde (RO_2^{\bullet}), radical alkoxyde (RO^{\bullet}) ou encore le monoxyde d'azote (NO). Le radical hydroxyle est considéré comme le plus toxique en raison de sa constante de vitesse élevée, mais il est peu diffusible, sans cible privilégiée et sa demi-vie est courte. Il peut oxyder un substrat selon trois modes d'action : arrachement d'un électron, arrachement d'un atome d'hydrogène ou addition sur une double liaison. L'anion superoxyde est celui qui possède la plus faible réactivité. Il est capable notamment d'entraîner la formation d' H_2O_2 , mais aussi d' $\bullet OH$ (Tableau 2).

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) n'est pas en lui-même un ROS puisqu'il n'a pas d'électron manquant. Il est formé après plusieurs réactions métaboliques via la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ par la superoxyde dismutase avec comme produit intermédiaire le radical hydroperoxyde. Il est capable via la réaction de Fenton de donner naissance au radical hydroxyle. Il est perméable aux membranes et plus diffusible que l' $\bullet OH$ et l' $O_2^{\bullet-}$. Il est moins réactif, mais capable de toxicité. Il est plus stable que les ROS et sa demi-vie est plus longue, il est donc plus facilement dosable et détectable.

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$
$O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow HO_2^{\bullet}$ $2 HO_2^{\bullet} \rightarrow H_2O_2 + O_2$
$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + HO^- + \bullet OH$ $Me^{n+} + H_2O_2 \rightarrow Me^{(n+1)+} + HO + \bullet OH$
Réaction de Fenton
$Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + HO^{\bullet} + OH^-$ $Fe(III) + H_2O_2 \rightarrow Fe(II) + HOO^{\bullet} + H^+$

Tableau 2 : Exemples de réactions chimiques entraînant la formation des radicaux libres

II.A.2 SOURCES

Dans les cellules des mammifères, les sources de ROS sont nombreuses et peuvent être d'origine enzymatique comme non enzymatique. Parmi les plus importantes on retiendra : la chaîne respiratoire mitochondriale, la NADPH oxydase (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate), la Nitric Oxide Synthase (NOS), la xanthine oxydase ou encore la lipoxygénase et la MAO-A.

II.A.2.a La mitochondrie

Depuis longtemps, la mitochondrie a été identifiée comme une source de ROS. Elle est capable de produire des ROS via la chaîne respiratoire mitochondriale, mais aussi hors chaîne respiratoire (Figure 8).

La phosphorylation oxydative à l'origine de la production d'ATP se fait par l'intermédiaire de flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire. Ce flux établit un gradient de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie. Les électrons sont extraits au cours de la réduction de substrats et transférés à une molécule d'oxygène à travers une chaîne enzymatique (complexes I à IV). À la dernière étape de la chaîne de transfert d'électrons, la cytochrome c oxydase (complexe IV) assure la réduction complète de l'O₂ en eau. Il arrive que de façon accidentelle, des électrons s'échappent de la chaîne de transfert d'électrons, notamment au niveau des complexes I et III et viennent réagir avec l'O₂ et former un anion superoxyde. Cet événement survient pour environ 2 à 3% de l'O₂ qui transite dans la mitochondrie [191, 192]. L'O₂^{•-} est immédiatement pris en charge par la manganèse superoxyde dismutase (Mn-SOD) dans la matrice mitochondriale et transformé en H₂O₂ [193].

Les sources de ROS hors chaîne respiratoire sont moins étudiées et sont pourtant nombreuses. Parmi elles on retiendra, la p66shc, la MAO, le GPDH et le métabolisme lipidique.

La p66shc est une protéine cytosolique qui est capable d'oxyder directement le complexe IV via une chaîne d'électrons semblable à celle de la chaîne respiratoire et d'être à l'origine de la production d'H₂O₂ [194]. Son implication dans l'IC et la sénescence est de découverte récente. Son rôle semble complexe et elle pourrait être impliquée dans l'apoptose.

La Monoamine oxydase est une enzyme située sur la membrane externe de la mitochondrie. Son rôle est la déamination oxydative des amines biogènes. Son fonctionnement produit de l' H_2O_2 . En condition physiologique, son activité est faible, mais elle augmente de façon importante lorsque le cœur est soumis de façon chronique à un stress hémodynamique, aux neurohormones ou au cours de la sénescence. Elle sera plus largement développée dans le chapitre suivant.

Le GPDH (le glycerol-3-phosphate déshydrogénase) est une enzyme située sur le versant externe de la membrane interne de la mitochondrie qui permet de régénérer le pool cytosolique de NADH en réoxydant NAD^+ . Cette réoxydation libère des ROS de part et d'autre de la membrane interne [195]. Son implication dans l'IC reste à démontrer.

Depuis plusieurs années, il a été montré que lorsque la mitochondrie utilise le palmitoyl-carnitine comme substrat pour sa respiration, elle produit de l' H_2O_2 [196, 197]. Ce lien entre métabolisme lipidique et production de ROS est d'autant plus intéressant que des anomalies du métabolisme lipidique sont observées dans de nombreuses pathologies impliquées dans l'IC comme le diabète ou l'obésité [198].

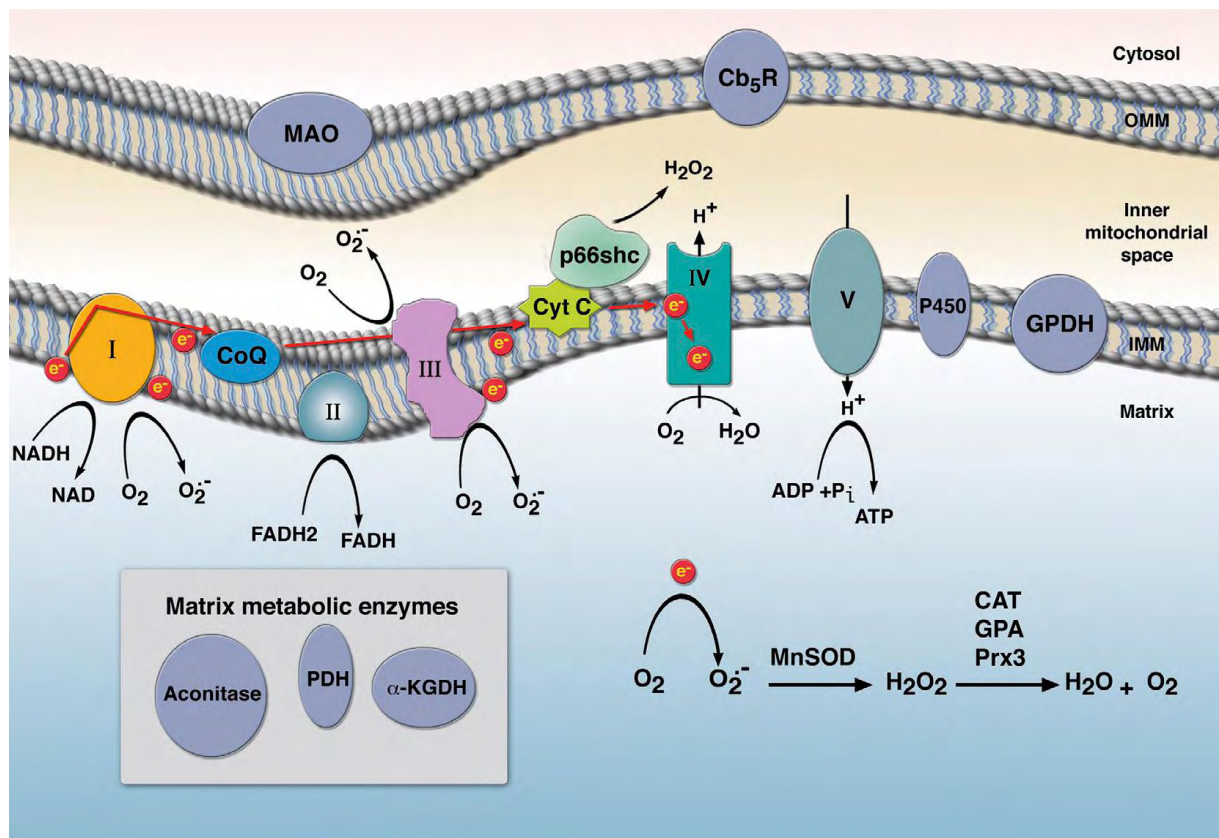


Figure 8 : Sources de ROS mitochondriaux.
Figure tirée de Finkel T 2011 [169]

II.A.2.b La NADPH oxydase

La NADPH oxydase (NOX) est constituée de multiples sous-unités enzymatiques membranaires et cytoplasmiques. Elle catalyse la réduction à un électron de l'oxygène en anion superoxyde. Elle est un élément clef de la défense immunitaire. Elle est très présente dans les polynucléaires neutrophiles et les monocytes dont la production de ROS est utilisée dans la lutte contre les micro-organismes. Il en existe 7 isoformes qui sont également exprimées par des cellules non immunitaires comme la cellule endothéliale, la cellule musculaire lisse, le fibroblaste ou encore le cardiomyocyte [199].

II.A.2.c La NOS

La NOS appartient à une famille enzymatique qui catalyse la conversion de la L-arginine en L-citrulline en produisant de l'oxyde nitrique (NO). Il existe trois isoformes de NOS dont les appellations proviennent du tissu dans lequel elles ont été mises en évidence : une forme neuronale, la nNOS, une forme endothéliale la eNOS et une forme inducible la iNOS. La nNOS et la eNOS sont très présentes dans le système cardiovasculaire tandis que la iNOS est induite par les médiateurs de l'inflammation [200]. La production de ROS par les NOS a été mise en évidence lors de l'étude de la eNOS. La réaction enzymatique de la eNOS est dépendante de cofacteurs et dans certaines circonstances la eNOS n'est pas couplée et réduit une molécule d'oxygène plutôt que la L-arginine et produit de l' $O_2^{\bullet-}$ [201]. La eNOS est exprimée par le cardiomyocyte et des études expérimentales montrent qu'elle est plutôt un facteur protecteur qui diminue l'hypertrophie ventriculaire gauche dans les modèles de sténose aortique [202] et réduit la dysfonction ventriculaire dans l'ischémie myocardique [203-205].

II.A.2.d La xanthine oxydase

La xanthine oxydase et la xanthine déshydrogénase sont deux formes de la même enzyme appelée xanthine oxydoréductase. Elle est très largement répandue dans les tissus des mammifères, notamment dans les cellules endothéliales [206]. Les deux formes catalysent la conversion de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique. Seule la xanthine oxydase produit $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 [207]. En condition physiologique, c'est la forme xanthine déshydrogénase qui est principalement présente. En cas de stress, comme l'hypoxie ou l'ischémie, la forme xanthine oxydase devient prédominante [208-211].

II.A.2.e La lipoxygénase

La lipoxygénase est une enzyme qui contient du fer et qui catalyse l'oxydation des acides gras polyinsaturés [212]. C'est une enzyme clef dans la synthèse des leucotriènes et elle joue donc un rôle dans les réactions anaphylactiques. Dans le système cardiovasculaire, la lipoxygénase est surtout impliquée dans les lésions d'athérosclérose [213].

II.A.3 ANTIOXYDANTS

L'exposition aux ROS, quelle que soit leur source, oblige les cellules à développer des mécanismes antioxydants. Il s'agit de mécanismes préventifs, de réparation et de défense (Figure 9). En condition physiologique, il existe un équilibre entre la production de ROS et le niveau intracellulaire des antioxydants. Leur augmentation traduit la présence du stress oxydant. Les antioxydants peuvent être enzymatiques : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX), la catalase, l'hème-oxygénase ; ou non enzymatiques : le glutathion (GSH), la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (tocopherol), les caroténoïdes, les flavonoïdes... Nous ne développerons que quelques exemples dans ce chapitre.

II.A.3.a La superoxyde dismutase (SOD)

La SOD existe sous deux isoformes la Cu/Zn SOD située dans le cytoplasme et la membrane externe de la mitochondrie et la MnSOD exclusivement située dans la membrane interne mitochondriale [214]. Il s'agit de métalloprotéines qui catalysent la dismutation de l'O₂^{•-} en O₂ et en H₂O₂. Ce dernier est, ensuite, pris en charge par la catalase. Dans le diabète la surexpression du gène de la MnSOD protège la mitochondrie du cardiomyocyte et réduit la sévérité de la cardiopathie diabétique [215].

II.A.3.b La glutathion peroxydase (GSHPx)

La glutathion peroxydase (GSHPx) est une enzyme qui catalyse la réduction de l'H₂O₂ et des hydroperoxydes. La prise en charge de l'H₂O₂ prévient la formation de composés plus réactifs comme l'•OH [216]. La GSHPx possède une plus grande affinité pour l'H₂O₂ que la catalase. Dans le cœur, elle est présente en assez grande quantité dans le compartiment mitochondrial et le cytosol [217]. Elle est considérée comme étant plus protectrice vis-à-vis du stress oxydant que la catalase ou la SOD (dont la dismutation de l'O₂^{•-} produit de l'H₂O₂) [218]. Dans le cœur, l'hyperexpression du gène de la GSHPx

prévient l'IC après ischémie myocardique et diminue le remodelage en atténuant l'hypertrophie des cardiomyocytes, l'apoptose et la fibrose interstitielle [219]. De la même façon, elle atténue le remodelage myocardique et prévient la dysfonction diastolique chez la souris diabétique [220].

II.A.3.c La catalase

La catalase est une enzyme qui contrôle notamment la concentration intracellulaire d' H_2O_2 [221, 222]. La structure stable et tétramérique des molécules de catalase les rend plus résistantes aux variations thermiques, de pH, à la dénaturation ou à la protéolyse que les autres enzymes. Les modèles transgéniques délétés pour la catalase évoluent rapidement vers l'IC et la dilatation [223].

II.A.3.d L'Hème-oxygénase (Hmox)

Il s'agit d'une protéine qui dégrade l'hème en biliverdine, en monoxyde de carbone et en fer [224]. Il en existe trois isoformes. La Hmox-1 est inductible par le stress et a un effet protecteur. Elle atténue les dommages cellulaires par une action antioxydante, antiapoptotique et anti-inflammatoire [224-227]. Chez la souris, on observe un effet bénéfique de la surexpression de la Hmox, après ischémie reperfusion [228]. L'effet protecteur de la Hmox contre le stress oxydant est néanmoins indirect puisqu'il est lié à la bilirubine (issue de la biliverdine) [224, 225].

II.A.3.e Le GSH

Le GSH est un tripeptide, abondant dans le cytosol, le noyau et la mitochondrie. Il est un antioxydant soluble majeur. Il est synthétisé dans le cytosol. Sa forme oxydée est le glutathion disulphide (GSSG). Le ratio GSH/GSSG est un bon marqueur du stress oxydant intracellulaire [229, 230]. Le glutathion protège la cellule par plusieurs voies [231]. Il est un cofacteur d'enzymes antioxydantes comme la glutathion peroxydase ou la glutathion transférase. Il élimine directement le radical hydroxyle, l'anion superoxyde et détoxifie le peroxyde d'hydrogène et les lipides peroxydés par l'action de la glutathion peroxydase. Il est capable de régénérer la vitamine C et E en restituant leur forme active.

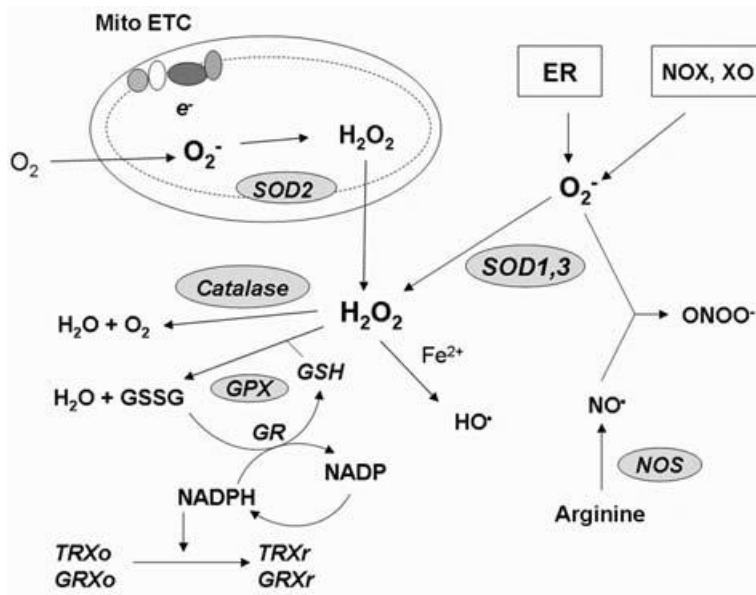


Figure 9 : Homéostasie redox.

Figure tirée Trachootham et al. 2008 [203].

II.A.4 EFFETS SUR LA CELLULE

Les effets physiopathologiques des ROS sur la cellule dépendent du type de ROS, de sa concentration et de son site de production. À faible niveau, ils sont capables d’agir comme seconds messagers et ont un rôle dans la signalisation cellulaire. Quand le niveau local des ROS est élevé, ils tendent à réagir avec de nombreuses protéines, l’ADN, les membranes cellulaires et de nombreux autres substrats bio-organiques. L’ensemble engendre des dommages cellulaires considérables et peut générer d’autres radicaux parfois plus réactifs.

II.A.4.a Les effets sur la signalisation cellulaire

À faible concentration les ROS servent de second messager et cette fonction est appelée « redox-signalling ». Elle est particulièrement le fait de l’H₂O₂, molécule plus stable et plus diffusible que l’O₂•⁻, et du NO [232]. Ce redox-signalling joue un rôle dans de nombreux signaux de transduction. Il a été montré, par exemple, que l’induction de la prolifération cellulaire par les facteurs de croissance (EGF, PDGF, NGF, insuline) s’accompagne d’une augmentation transitoire de l’H₂O₂ intracellulaire, tandis que le traitement par un antioxydant prévient la synthèse d’ADN [233]. L’H₂O₂ est capable d’inactiver des protéines impliquées dans le cycle cellulaire par la formation de ponts intramoléculaires de type disulphide ou sulphenyl-amide [234]. En oxydant la Cystéine ou en inhibant certaines phosphatases, l’H₂O₂ peut activer ou inactiver des facteurs de transcription comme HIF1 α ou NF- κ B [233, 235].

II.A.4.b L'oxydation des constituants cellulaires

II.A.4.b.i La peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides est le fait le plus souvent de l'•OH et de l'O₂•⁻ [236], l'H₂O₂ n'ayant pas les lipides membranaires comme cible principale. Cette peroxydation entraîne la conversion des lipides insaturés en lipides hydroperoxydes. Les membranes deviennent plus fluides, l'activité des protéines membranaires est modifiée ainsi que le flux des solutés cytosoliques. La peroxydation massive des lipides accompagne la mort cellulaire, mais il n'est pas déterminé s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence [237].

II.A.4.b.ii Oxydation de l'ADN

Comme pour la peroxydation des lipides, l'•OH et de l'O₂•⁻ sont les ROS qui altèrent directement l'ADN, mais de nombreux pro-oxydants sont également capables de le léser.

Ils sont capables d'entraîner des cassures doubles ou simples brins, des réarrangements, des ajouts de sucre ou de phosphate au niveau des nucléotides [238]. Ils peuvent léser les protéines nécessaires à la préservation de l'intégrité de l'ADN [239-242].

Ils sont également à l'origine d'une instabilité chromosomique notamment par lésions des télomères. Les télomères sont une séquence nucléotidique, non codante, répétitive (TTAGGG)_n, située à l'extrémité 3' des chromosomes [243, 244]. Organisés en boucle, ils protègent l'extrémité du chromosome et évitent qu'elle ne soit reconnue comme une cassure double-brin. Ils préviennent la fusion des chromosomes par leur extrémité terminale et la dégradation chromosomique [245, 246]. Les télomères sont particulièrement sensibles au stress oxydant du fait de plusieurs mécanismes : ils sont particulièrement riches en guanine (base volontiers oxydée), les cassures simple brin y sont plus fréquentes que sur le reste de l'ADN (7 fois plus), les mécanismes de réparation sont moins efficaces sur les régions télomériques [247-250]. De plus, le stress oxydant diminue l'activité de la télomérase, enzyme dont la fonction principale est de maintenir la longueur des télomères [251, 252].

L'ADNmt est plus vulnérable au stress oxydant que l'ADN nucléaire. Il est lésé 3 fois plus par l'H₂O₂ et 16 fois plus par les ROS en général [253]. Son taux de mutation est 10 à 20 fois supérieur [254]. Les lésions oxydatives de l'ADNmt peuvent entraîner des délétions ou des réarrangements. La majorité de ces délétions est localisée entre les points de réplication. Elles sont la conséquence de cassure double brin, de « slippage » de la

polymérase, de recombinaison homologue, de mutation de la protéine hélicase twinkle ou de défaut de réparation [255-257]. Il est intéressant de noter que les mutations retrouvées dans l'ADNmt varient en fonction des tissus et que pour un tissu spécifique la variation interindividuelle est faible [256, 258].

L'intégrité génomique est maintenue par un système complexe de réparation, correspondant au type de lésion de l'ADN. La BER (Base Excision Repair) prend en charge les lésions simple brin comme les bases oxydées [259, 260]. Le NER (Nucléotide Excision Repair) est un processus multiétape, impliquant de nombreuses protéines, qui corrige les distorsions de la double hélice de l'ADN et les lésions qui bloquent l'élongation transcriptionnelle. Elle n'est pas présente dans la mitochondrie [261-263]. Le NHEJ (Non Homologous End-Joining) répare les cassures double-brin en utilisant la chromatine sœur pour copier l'information manquante. Dans de nombreuses pathologies, il a été montré une accumulation des dommages oxydatifs de l'ADN possiblement en rapport avec la diminution de l'activité des systèmes de réparation [264].

II.A.4.b.iii L'oxydation des protéines

Il est clairement établi que les protéines sont une cible privilégiée des ROS et 50 à 75% des ROS générés vont altérer les protéines [265]. Les lésions oxydatives peuvent être induites directement par les ROS ou indirectement par la production de dérivés secondaires. Ils entraînent des clivages peptidiques, des ponts disulfures, des modifications de la chaîne des acides aminés [265-268]. La structure protéique est alors changée à tous les niveaux (de la structure primaire à la quaternaire) entraînant des modifications physiques parfois dommageables comme l'inhibition enzymatique, l'augmentation de la susceptibilité à l'agrégation ou à la protéolyse, l'augmentation ou la diminution de leur catabolisme (turn-over) [267, 269-273]. La phosphorylation des protéines peut aboutir à leur activation ou leur dégradation en fonction du site de phosphorylation [274]. Le statut phosphorylé des protéines est sous la dépendance de la balance kinase/phosphatase. L'oxydation des phosphotyrosines kinases sur leur résidu thiol entraîne leur activation. A l'inverse, les modifications du résidu thiol par oxydation directe, par ponts disulfures inter ou intramoléculaires peuvent inactiver des protéines tyrosine phosphatases [275]. Cette inhibition déséquilibre la balance kinase/phosphatase maintenant ainsi les protéines dans leur état phosphorylé. La phosphatase lipidique PTEN ou la phosphatase de bas poids moléculaire cdc25 peuvent, comme les protéines tyrosine phosphatases, être modifiées de la même façon [276]. La synthèse protéique peut également être affectée par les ROS. En effet, un certain nombre de facteurs de transcription contient un résidu cystéine, particulièrement

sensible au stress oxydant. Or cette cystéine est souvent localisée au niveau des sites de liaison à l'ADN [277]. L'oxydation du résidu thiol des protéines AP-1, HIF-1, NF κ B ou encore p53 peut empêcher leur liaison à l'ADN [278]. Certains coactivateurs transcriptionnels sont équipés d'une activité d'acétylation des histones qui permet l'accès des facteurs de transcription à l'ADN [279]. Il a été récemment montré que l'enzyme déacétylase des histones était sensible au stress oxydant [280]. Le stress oxydant peut donc réguler l'expression des gènes. Il peut également modifier les processus de translation de l'ARNm, mais en général pour des niveaux modérés de stress oxydant [281, 282].

Pour autant, toutes les protéines n'ont pas la même sensibilité aux ROS. Les facteurs qui déterminent une telle sensibilité sont nombreux, il s'agit de la présence de certains acides aminés (méthionine, cystéine, tryptophane), de certains sites de liaison aux métaux, de la localisation de la protéine dans la cellule, de sa conformation moléculaire et de son taux de dégradation. Les protéines nouvellement synthétisées semblent également être plus vulnérables que celles incorporées dans des complexes protéiques [283, 284]. Les conséquences de l'oxydation des protéines dépendent de leurs fonctions cellulaires, c'est, par exemple, le cas des protéines impliquées dans le métabolisme, comme la GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) ou les protéines du cycle de l'acide citrique. Certains acides aminés (arginine, proline, histidine, lysine) forment des produits carbonylés après oxydation. La détection de ces protéines carbonylées est un bon marqueur de stress oxydant, car cette carbonylation est irréversible. Ces protéines sont destinées à être dégradées par le protéasome, mais la fonction de ce dernier est parfois elle-même altérée par les ROS [285]. L'accumulation de ces protéines carbonylées peut être toxique pour la cellule et leur taux est inversement corrélé à la survie [286]. En condition physiologique, au cours de la division cellulaire, les protéines carbonylées ne sont pas transmises aux cellules filles contrairement aux enzymes antioxydantes comme la catalase [287-289]. Or, lors du stress oxydant, les protéines du cytosquelette comme l'actine sont lésées et cette répartition inégale entre cellule mère et cellules filles est perturbée permettant la transmission des protéines lésées. Ce qui rend ainsi les cellules filles vulnérables.

II.A.5 LES MARQUEURS DU STRESS OXYDANT

Il est difficile de détecter le stress oxydant en raison de l'extrême réactivité et de la demi-vie courte des ROS. Certaines techniques, comme la résonance paramagnétique électronique (electron spin resonance) ou encore l'électroluminescence peuvent être utilisées *in vitro* et *in vivo* pour détecter directement certains ROS [290]. Les molécules

endommagées ou modifiées par les ROS étant plus stables et leur concentration plus élevée, elles peuvent également être un élément de choix pour détecter le stress oxydant [265, 291-297], (Figure 10).

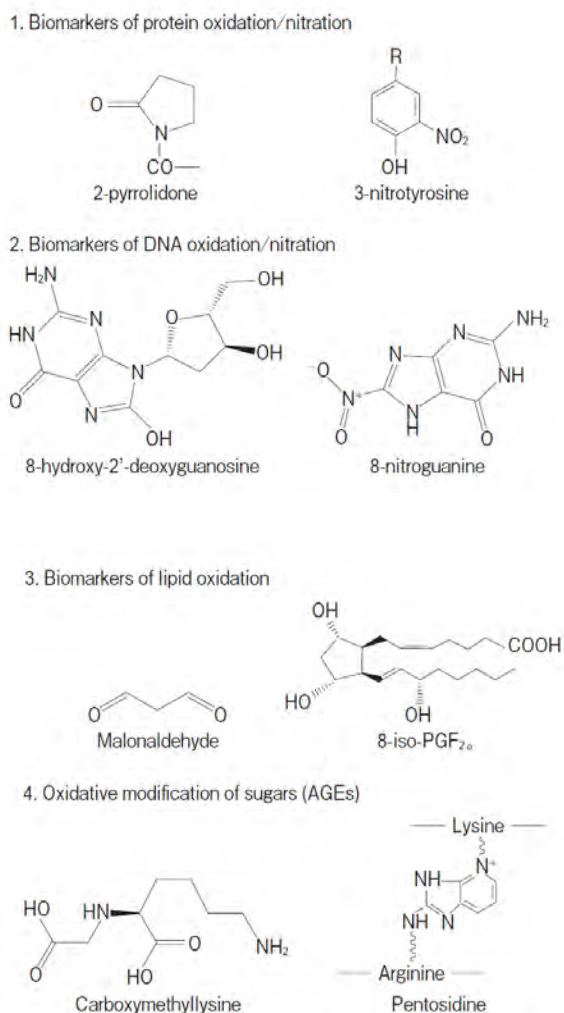


Figure 10 : Structure chimique de quelques biomarqueurs de stress oxydant.

Schéma tiré d'Ogino et al. 2007 [288].

Les lésions oxydatives de l'ADN peuvent être détectées par HPLC et par des techniques immunohistochimiques. Le 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8oxo-dG) qui correspond à la forme oxydée de la base guanine est souvent recherché. Hautement mutagène, il peut être généré sous l'effet du métabolisme oxydatif classique comme d'un stress exogène. L'incorporation de cette base oxydée dans l'ADN entraîne des mésappariements, des mutations, des délétions et des défauts de réplication [298]. Mal réparé par la BER, il est considéré comme un bon marqueur de dommages oxydatifs à l'ADN. Il peut être détecté au niveau de l'ADN génomique comme mitochondriale, sur tissu, dans les urines ou les lymphocytes circulants [292, 299].

La détection des oxydations, des nitrations ou des halogénations des protéines est possible. Les méthodes de détection sont immunologiques ou par HPLC avec détection électrochimique ou par ionisation chimique négative ou par capture d'électrons. Les protéines carbonylées peuvent être détectées *in vitro* et *in vivo*, dans les tissus comme le plasma.

Les lipides péroxydés génèrent une grande variété de composants relativement stables qui peuvent être utilisés comme biomarqueurs. Ces molécules sont détectables dans le plasma et l'urine, mais ils peuvent également être absorbés au cours de l'alimentation et leur dosage n'a de valeur que sous contrôle diététique [300, 301].

II.A.6 RÔLE DES ROS DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE ET LA SENESCENCE

II.A.6.a L'insuffisance cardiaque

L'implication des ROS dans l'IC est largement documentée. Elle ne s'accompagne pas d'une diminution des défenses antioxydantes ce qui suggère donc une augmentation de leur production. La production de ROS dans les PCV a d'abord été observée au cours de l'ischémie reperfusion. Cette production de ROS mais aussi les dommages cellulaires seraient d'ailleurs plus grands au cours de la reperfusion que pendant l'ischémie [302]. Dans les PCV chroniques, la production de ROS n'aurait pas de lien avec la privation d'oxygène. Elle serait un événement commun à de nombreuses conditions pathologiques cardiaques et contribuerait à leur progression. En effet, des niveaux élevés de marqueurs du stress oxydant sont détectés dans l'IC mais aussi dans l'hypertension artérielle, l'hypertrophie ventriculaire ou encore l'athérosclérose [303]. Certains peuvent être utilisés comme marqueurs d'évolution de l'IC. Par exemple, le taux urinaire de 8oxodG ou encore celui de la biopyrine (métabolite oxydé de la bilirubine) seraient plus élevés dans les stades cliniques III/IV NYHA. De plus, le taux urinaire de biopyrine serait corrélé au degré de l'IC quelle que soit son étiologie tandis que le 8 oxo-dG urinaire serait corrélé au degré d'IC uniquement dans les pathologies d'origine ischémique et son taux suivrait la progression de l'athérosclérose coronarienne [304]. Le taux sérique d'acide urique (reflet de l'activation de la xanthine oxydase) augmenterait parallèlement au degré de l'IC et serait un marqueur indépendant de la survie des patients [305].

Les ROS participent largement au remodelage du myocarde au cours de l'IC et de nombreuses anomalies observées lors de l'IC peuvent être induites par les ROS in vitro [306, 307]. Dans de nombreux modèles d'hypertrophie in vitro (angiotensine II, endothéline, NE, TNF, stretch mécanique ou encore traitement par de faibles doses d'H₂O₂) on observe une augmentation de la production de ROS. Leur implication est renforcée par le fait qu'un traitement par antioxydant prévient cette hypertrophie. Les mécanismes mis en place sont complexes et impliquent des MAP kinases et des facteurs de transcription comme NFκB. In vivo, le traitement par antioxydant atténue l'hypertrophie myocardique après constriction aortique tandis que les différents modèles de souris délétées pour une source de ROS (NOX, NOS ou MAO-A) donnent des résultats plus variables, confirmant ainsi la multitude des sources de ROS au cours de l'hypertrophie myocardique [308-310]. La mort des cardiomyocytes est également un facteur d'hypertrophie et au cours de l'IC environ 25% des cardiomyocytes meurent [311]. Or les ROS agissent sur la survie des cardiomyocytes. Les souris délétées pour des protéines impliquées dans l'apoptose ont moins d'hypertrophie ventriculaire que les souris-contrôles après constriction aortique ou après un infarctus du myocarde [312]. De plus, dans les modèles de surexpression d'enzymes antioxydantes (catalase, glutathione peroxydase, peroxiredoxine ...), la mort des cardiomyocytes par apoptose et la dysfonction contractile sont diminuées après ischémie reperfusion [313]. Les mécanismes de mort déclenchés par les ROS au cours de l'IC sont multiples et font intervenir l'apoptose, la nécrose et l'autophagie avec possiblement des interactions et des points communs entre ces trois phénomènes. Les ROS entraînent une augmentation du calcium intracellulaire (via le réticulum sarcoplasmique) [314-318]. Dans le cardiomyocyte la mitochondrie est située à proximité du réticulum sarcoplasmique et peut donc capter le calcium relargué. L'augmentation du calcium intramitochondrial peut entraîner l'ouverture du pore de transition, engendrant ainsi la perte du potentiel de membrane, le gonflement de la mitochondrie, la rupture de la membrane externe et le relargage du cytochrome c. L'ensemble induit alors l'apoptose [314, 319, 320]. Les lésions de l'ADN provoquées par les ROS peuvent être à l'origine de la mort apoptotique notamment via la surexpression et l'activation de p53 [321-323]. Les cardiomyocytes des souris délétées pour p53 résistent à l'apoptose médiée par la Doxorubicine [324]. Quant à la nécrose induite par les ROS, elle passerait également, comme nous l'avons précédemment exposé, par le relargage du calcium et par l'ouverture du pore de transition mitochondrial [325, 326]. Les ROS sont capables d'initier la formation de l'autophagosome et la dégradation autophagique [327]. Dans des lignées de cellules malignes, un traitement par l'H₂O₂ entraîne la mort par autophagie et ce, de façon indépendante de l'apoptose [328]. Chez l'humain, il a été montré que la mort cellulaire, par nécrose et par autophagie, est un facteur indépendant prédictif de décès chez

les sujets souffrant de cardiopathie dilatée idiopathique en IC avancée [329]. Le renouvellement des cardiomyocytes étant faible, leur mort s'accompagne d'une fibrose interstitielle. Or cette dernière est un élément délétère dans l'IC. Les ROS sont des facteurs profibrosants dans de nombreux organes dont le cœur. La souris délétée pour le gène de la NOX-2, par exemple, ne développe pas de fibrose interstitielle dans de nombreuses conditions pathologiques comme le traitement par l'aldostérone, l'angiotensine II ou encore après constriction aortique [310]. Les mécanismes impliqués dans les effets profibrosants des ROS incluent l'expression de facteurs de croissance et de gènes profibrosants ainsi que l'activation de NF-kB [310]. Les ROS favorisent également la prolifération des fibroblastes et activent de façon post-transcriptionnelle les métalloprotéinases.

Les ROS participent également à la dysfonction myocardique en créant des dommages oxydatifs des protéines myocardiques qui vont affecter la conformation, la stabilité et l'activité de divers récepteurs, transporteurs d'ions, facteurs de transcription, mais aussi des protéines indispensables à la contraction et à la morphologie du cardiomyocyte. Il a été récemment montré que l'oxydation directe des protéines sarcomériques diminue les capacités inotropes tandis que leur phosphorylation, par les enzymes activées par les ROS, diminue la sensibilité des myofilaments au calcium [330].

La mitochondrie est une organelle particulièrement sensible aux ROS et subit d'importants dommages au cours de l'IC. En effet, l'augmentation des ROS entraîne une augmentation des lipides peroxydés au niveau de la mitochondrie, une diminution du nombre de copies d'ADNmt, une diminution du nombre de transcrits d'ARNmt et des anomalies de l'activité enzymatique de certains complexes de la chaîne respiratoire. Ces anomalies portent essentiellement sur les complexes codés par l'ADN mitochondrial (complexes I, III, IV) tandis que le complexe II et la citrate synthase (codés par l'ADN nucléaire) n'ont pas de modification de leur activité enzymatique [331]. L'ensemble de ces modifications est à l'origine de la baisse de la production d'ATP et d'une augmentation de la production des ROS par la chaîne respiratoire (Figure 11).

Les ROS ne sont pas seulement impliqués dans le remodelage myocardique au cours de l'IC et dans la dysfonction mitochondriale, ils sont également un acteur de la transition hypertrophie/IC. Dans les modèles murins de surexpression d'enzyme oxydante comme la Nox4, le passage vers l'IC est deux fois plus rapide après constriction aortique que chez les souris contrôles. À l'inverse, la délétion de l'enzyme prévient non seulement cette transition, mais diminue également le remodelage [332]. De même, la surexpression de la catalase prévient l'IC dans un modèle de cardiopathie dilatée par surexpression de la protéine G, Gαq

[333]. On ignore encore de façon précise le type de ROS impliqués dans la transition hypertrophie myocardique/ IC et son mode d'action.

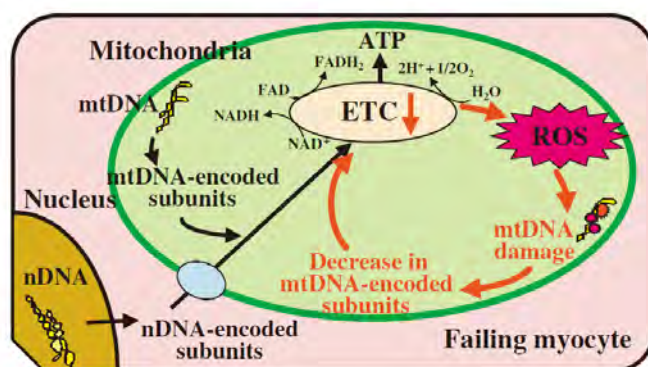


Figure 11 : Représentation schématique du lien existant entre ROS, lésion de l'ADNmt et dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les ROS mitochondriaux peuvent aboutir à un déclin de la fonction mitochondriale catastrophique favorisant la formation de ROS et entraînant des dommages cellulaires. Figure tirée de Tsutsui et al. 2008 [334].

II.A.6.b La sénescence

Le vieillissement est un processus multifactoriel qui associe une diminution du « turnover » des protéines, un raccourcissement des télomères, des mutations somatiques et des modifications chromatinienne [335]. C'est la combinaison de multiples facteurs qui est à l'origine du vieillissement et c'est sans doute pour cette raison qu'il revêt autant de phénotypes et que sa variabilité interindividuelle est si grande. Depuis plusieurs années, de nombreux travaux ont montré l'existence d'une augmentation du stress oxydant avec l'âge à l'origine de la théorie du vieillissement par les ROS [336, 337]

La balance redox est déséquilibrée avec une augmentation des ROS et une diminution des capacités antioxydantes (Figure 12) [338-341]. De plus, il existe une diminution de l'expression des protéines impliquées dans les systèmes de réparation [342]. L'ensemble explique l'accumulation des dommages oxydatifs au cours du temps. Dans les modèles expérimentaux en condition physiologique, les traitements antioxydants semblent allonger la durée de vie [343], tandis que les souris délétées pour une enzyme antioxydante semblent avoir une durée de vie raccourcie. Chez l'humain il existe, au cours de la sénescence, une diminution du niveau des antioxydants non enzymatiques, tandis que les enzymes antioxydantes semblent de niveau inchangé voire augmenté [338-341, 344, 345].

La sénescence s'accompagne d'une accumulation de protéines modifiées et/ou endommagées. Cette accumulation provient du déclin des mécanismes d'élimination de ces protéines et d'une diminution de leur « turn-over » par le système ubiquitine-protéasome et plus particulièrement le protéasome [346-350]. Les protéines oxydées qui ont échappé aux systèmes de défense contre le stress oxydant doivent être reconnues et dégradées par ce protéasome. En présence d'un niveau modéré de stress oxydant, la dégradation de ces protéines augmente. Mais, lorsque le stress oxydant est fort, le protéasome est inhibé [351-353]. Au cours de la sénescence, cette inhibition est multifactorielle : diminution de l'expression des sous-unités protéasomales, modification de leurs activités enzymatiques, inhibition directe par les protéines oxydées [354-357]. Lorsque le protéasome est inefficace ou débordé, il existe physiologiquement une compensation par l'augmentation de l'activité autophagique du lysosome [358, 359]. Or cette activité autophagique diminue au cours de la sénescence [360]. L'ensemble favorise l'accumulation des protéines oxydées qui vont être à l'origine d'une dysfonction cellulaire et peuvent provoquer la mort du cardiomyocyte.

D'un point de vue de l'ADN, il existe, au cours du vieillissement, une accumulation de mutations et de réarrangements génomiques à l'origine d'une forte instabilité génétique et d'une attrition télomérique [361]. Il est important de souligner que le raccourcissement des télomères ne semble pas initier la sénescence et que la surexpression de la hTERT (sous-unité régulatrice de la télomérase, enzyme impliquée dans le maintien de la longueur des télomères) ne protège pas de la sénescence induite par l' H_2O_2 [362]. Si des télomères courts ont été observés chez des sujets en IC, on ignore les conséquences précises du raccourcissement télomériques sur le cardiomyocyte. Il est possible qu'il favorise son apoptose et qu'il participe au développement des PCV et de l'IC [363]. Il a été, par contre, montré que l'attrition télomérique s'accompagne de l'augmentation de l'expression de protéines régulatrices du cycle comme p53, p16, p21 [364-367]. Il est intéressant de noter que ces protéines considérées comme des marqueurs de sénescence répliquative peuvent être détectées au cours du vieillissement dans des cellules en différenciation terminale dont les cardiomyocytes [368-370].

Comme dans l'IC, il existe au cours du temps une accumulation de mutations et de délétions de l'ADNmt [371, 372]. À l'échelle cellulaire, ces mutations de l'ADNmt peuvent être à l'origine d'anomalies de fonctionnement de la chaîne respiratoire et d'un cercle vicieux qui entraîne l'augmentation de la production de ROS [373-376]. Néanmoins, la théorie du cercle vicieux est controversée. En effet, les modèles murins transgéniques et les pathologies mitochondriales humaines qui s'accompagnent de nombreuses mutations de l'ADNmt, ont une sénescence accélérée sans augmentation de la production de stress

oxydant [377-380]. Il est donc possible que l'accumulation des mutations de l'ADNmt au cours de la sénescence entraîne plutôt des anomalies de la signalisation cellulaire qui peuvent induire des dysfonctions cellulaires et la mort.

La production d'ATP diminue dans le myocarde au cours de la sénescence ; le cœur âgé n'étant plus capable de répondre à la demande métabolique [381-383]. D'un point de vue génique, on observe une baisse de l'expression des gènes codants pour les protéines de la chaîne respiratoire qu'elles soient codées par la mitochondrie ou l'ADN nucléaire [384]. Les études avec tri sélectif des mitochondries ont montré que le déclin de l'activité de la chaîne respiratoire (particulièrement les complexes III et IV) concernait préférentiellement les mitochondries interfibrillaires [385-387].

Le rôle central de la mitochondrie et du stress oxydant dans la sénescence semble confirmé par une étude japonaise portant sur des individus centenaires. Elle a montré qu'ils avaient majoritairement un gène mitochondrial variant qui code pour une sous-unité de la NADH dehydrogenase du complexe I de la chaîne respiratoire. Cette protéine produirait moins de stress oxydant. Ces sujets vivent non seulement centenaires, mais sont de plus 2 fois moins hospitalisés, à âge égal, que les sujets-contrôles sans le variant [388, 389].

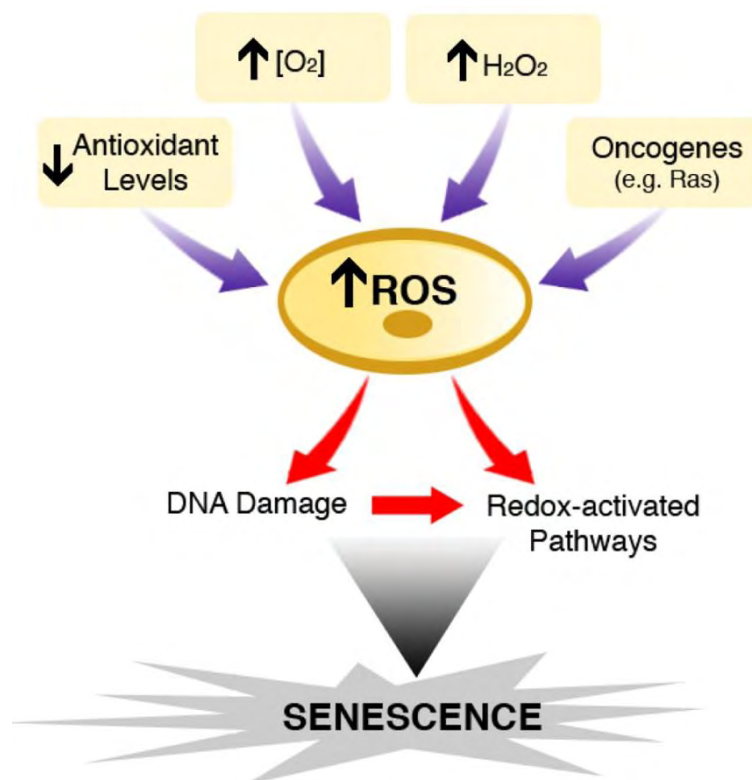


Figure 12 : Représentation schématique du lien entre ROS et sénescence.
Figure tirée de Teng Lu and Toren Finkel 2008 [390]

II.A.7 CONCLUSION

Les ROS sont impliqués dans de nombreux processus pathologiques, mais aussi physiologiques comme le vieillissement. Ils sont toxiques et responsables de dommages au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides. Ils peuvent sévèrement compromettre la viabilité et la fonctionnalité cellulaire. La mitochondrie subit, comme le reste de la cellule, des dommages oxydatifs contribuant à la baisse de production d'ATP. Mais elle est également une source importante de ROS, via la chaîne respiratoire, mais aussi hors chaîne respiratoire.

Les monoamines-oxydases sont des enzymes ubiquitaires situées sur la membrane externe de la mitochondrie. Elles réalisent la déamination oxydative des amines biogènes et produisent de l' H_2O_2 . Leur activité est faible à l'état basal, mais dans de nombreuses conditions pathologiques leur activité augmente. Dans l'IC comme dans la sénescence, la sécrétion chronique des neurohormones s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la MAO-A myocardique, isoforme métabolisant les catécholamines et la sérotonine. La MAO-A pourrait ainsi être un acteur du remodelage au cours de l'IC et de la sénescence et contribuer à la défaillance cardiaque.

III MAO

III.A GÉNÉRALITÉS

La monoamine-oxydase est une enzyme mitochondriale qui catalyse la déamination oxydative des amines alimentaires, de certains neurotransmetteurs et de certaines hormones. Parmi ces multiples substrats, on retiendra les indoléamines comme la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5HT) et la tryptamine ; les catécholamines comme la dopamine (DA), la norépinéphrine (NE) et l'épinéphrine ou encore les composés chimiques organiques comme la bêta-phenylethylamine (PEA), la tyramine et l'octopamine. La réaction chimique catalysée par la MAO engendre la formation d'aldéhydes qui seront à leur tour oxydés en acides par les aldéhydes déshydrogénases (ALDH) ou transformés en alcool ou glycols par une aldéhyde réductase (ALR). Ces réactions sont source d'espèces réactives comme l'ammoniaque et le peroxyde d'hydrogène (Figure 13).

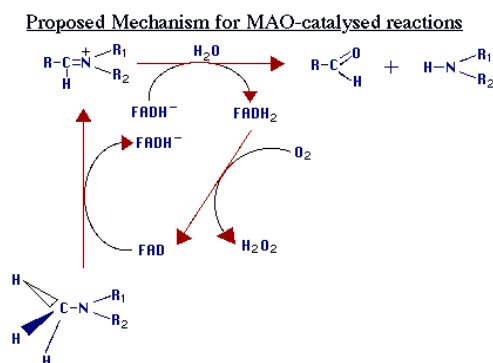


Figure 13 : Déamination oxydative des amines biogènes par la MAO

Figure tirée de Dostert P 1994 [391]

La MAO existe sous deux isoformes : la MAO-A et la MAO-B. Elles se différencient par leurs substrats préférentiels et leurs inhibiteurs. La MAO-A a une forte affinité pour la sérotonine et la NE tandis que le substrat préférentiel de la MAO-B est la PEA. Le métabolisme de la DA et de certaines amines comme la tryptamine et la tyramine est commun aux deux isoformes. Néanmoins le métabolisme de la DA dépend de l'espèce : elle est prise en charge par la MAO-A dans le cerveau de certains rongeurs et par la MAO-B chez les humains et certains primates. La spécificité de ces substrats est relative avec parfois un chevauchement dans leur prise en charge notamment en fonction de leur dose [392-394].

Chez l'humain, il a été montré que la PEA à fortes doses peut être prise en charge par la MAO-A, particulièrement en l'absence de MAO-B. Par contre, en l'absence de MAO-A, les catécholamines sont métabolisées par d'autres enzymes comme la catécholamine-o-méthyltransférase ou l'alcool-déshydrogénase plutôt que par la MAO-B. Le métabolisme de la sérotonine, quant à lui, semble dépendant de la MAO-A. Les inhibiteurs pharmacologiques de ces deux enzymes sont également un critère permettant de les distinguer : la MAO-A est inhibée par de faibles doses de clorgyline et la MAO-B par de faibles doses de deprenyl [395, 396].

Les gènes de ces deux enzymes sont distincts, localisés tous les deux sur le chromosome X en direction opposée [397]. Ils ont le même nombre d'exons et la même disposition entre les introns et les exons, ce qui suggère que ces deux gènes sont issus de la duplication d'un gène ancestral. Les premières séquences de ces deux enzymes contiennent une séquence pentapeptidique (Ser-Gly-Gly-Cys-Tyr) qui lie le cofacteur FAD via un lien covalent thioesther avec la cystéine [398]. C'est dans le segment interne de ces enzymes que se situe la spécificité pour les substrats et les inhibiteurs [399, 400]. Ces deux protéines sont localisées au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, encrées par leur portion C terminale [401].

Les régulateurs de l'activité et de l'expression des MAO sont encore mal connus. L'expression de la MAO-B est régulée par la voie des MAPkinases (Mitogen Activated Protein Kinase). R1 est le répresseur transcriptionnel de la MAO-A. L'activité enzymatique des MAO est régulée par des hormones comme la progestérone, la testostérone et les glucocorticoïdes qui augmentent notamment l'activité de la MAO-A. Tandis que l'action des œstrogènes est plus complexe, ils diminuent l'activité de la MAO-A dans le cerveau et celle de la MAO-B dans les tissus périphériques [402].

Les Monoamines sont relativement ubiquitaires, mais la distribution des isoformes varie en fonction des tissus. Très présentes dans le cerveau notamment dans l'hypothalamus et les noyaux gris (striatum), on les retrouve aussi dans les tissus périphériques comme le foie, le duodénum, le pancréas, la glande surrénale ou encore le cœur (Tableau 3).

Type cellulaire	MAO-A	MAO-B
Cœur		
Cardiomyocytes	+	+
Foie		
Hépatocytes	+	+
Canaux biliaires	+	+
Duodénum		
Entérocytes	+	+
Cellules musculaires lisses	+	+
Vaisseaux		
Endothélium	-	-
Cellules musculaires lisses	+	+
Rein		
Podocytes	+	-
Capsule de Bowman	+	-
Cellules épithéliales tubulaires	+	+
Collecteur	+	-
Poumon		
Pneumocytes	+	+
Epithélium respiratoire	+	+
Cellules de Clara	+	+
Rate		
Cellules réticulaires	+	+
Pancréas exocrine		
acini	+	-
canaux	+	+
Pancréas endocrine		
Cellules α	-	+
Cellules β	+	-
Surrénale		
Corticale	+	+
Medulla	-	-
Cellules ganglionnaires	+	+
Placenta		
Trophoblastes	+	-
Cellules hématopoïétiques		
Plaquettes	-	+
Lymphocytes	-	+
Peau		
Fibroblastes	+	-

Tableau 3: Localisation de la MAO-A et de la MAO-B chez l'homme dans les tissus périphériques.
Tableau tiré de Shih et al. 1999 [367].

Des mutations génétiques, essentiellement inactivantes ont été décrites chez l'homme, certaines intéressent les deux enzymes, comme dans le syndrome de Norrie. Elles sont compatibles avec la vie, mais le tableau clinique est en général dominé par des retards mentaux, des traits autistiques et des troubles de l'humeur, notamment une impulsivité et une agressivité [403-410]. Des études portant sur les SNPs (Single-Nucléotide polymorphisms) ont mis en relation le niveau de MAO et certains risques d'addiction ou de troubles affectifs [411, 412].

III.B LA MAO-B

Le rôle de la MAO-B a essentiellement été exploré dans le cerveau et très peu dans le coeur. Elle est l'isoforme la plus abondante dans les neurones sérotoninergiques et histaminergiques ainsi que dans les cellules gliales [413]. De fortes concentrations de MAO-B sont retrouvées dans le raphe [414]. À la naissance, le niveau d'expression de la MAO-B est faible. Il augmente ensuite progressivement pour atteindre un plateau et réascensionner au cours de la sénescence, sans doute en rapport avec l'augmentation du nombre de cellules gliales [414, 415]. Cette augmentation serait néfaste et participerait à la perte neuronale au cours de la sénescence par la libération de produits de dégradation actifs et neurotoxiques d'une part et par la libération d'H₂O₂ d'autre part. C'est par ces deux mêmes voies que la MAO-B serait associée à la perte des neurones dopaminergiques du locus niger, dans la maladie de Parkinson.

III.C LA MAO-A

Malgré sa forte affinité pour la sérotonine, c'est dans les neurones catécholaminergiques du système nerveux central que la MAO-A est présente. Elle est particulièrement concentrée dans le locus cœruleus. Elle a fait l'objet d'une attention particulière ces dernières années, car elle semble liée aux troubles de l'humeur, aux comportements agressifs et aux addictions (alcool et tabac). Cette agressivité peut être reproduite chez la souris transgénique délétée pour le gène de la MAO-A [416]. Elle serait liée à l'absence d'activité de la MAO-A au stade développemental et est surtout le reflet de l'action de la 5HT sur le développement des axones thalamo-corticaux [410].

Chez l'humain comme chez le rongeur, dès la naissance, le niveau d'expression de la MAO-A est similaire à celui de l'adulte dans la plupart des tissus, il reste relativement stable, mais augmente au cours de la sénescence [417]. Dans les tissus périphériques, la MAO-A est essentiellement étudiée dans le cœur, cible des catécholamines. Elle augmente dans de nombreuses conditions pathologiques qui s'associent à l'augmentation de ses substrats (catécholamines, sérotonine).

III.D MAO-A ET PATHOLOGIES CARDIAQUES

III.D.1 MAO-A ET L'ISCHÉMIE REPERFUSION CARDIAQUE

Au cours de l'ischémie reperfusion, de fortes doses de 5-HT sont relarguées par les plaquettes [418]. Or, il a été montré qu'à forte dose, la 5-HT peut induire, via un mécanisme MAO-A dépendant, un stress oxydant conduisant à l'apoptose des cardiomyocytes. In vitro, dans les cardiomyocytes incubés avec la 5HT, on observe la libération de cytochrome c, une « up-régulation » du facteur pro-apoptotique Bax et une « down-régulation » de Bcl-2, facteur antiapoptotique [419]. In vivo, chez le rat, la taille de l'infarctus est considérablement réduite par l'inhibition de la MAO-A [419]. La MAO-A serait donc une source importante de ROS dans le cœur au cours de l'ischémie-reperfusion cardiaque.

III.D.2 MAO-A AU COURS DE L'HYPERTROPHIE ET L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

L'expression de la MAO-A est augmentée dans l'hypertrophie pathologique (par opposition à l'hypertrophie physiologique de l'exercice physique) et dans IC [420]. L'implication de la MAO-A est complexe et s'accompagne d'une augmentation de la 5HT et de la NE, substrats de la MAO-A [189, 421, 422]. In vitro, l'activation de la MAO-A avec de fortes doses de 5HT ou NE est capable d'induire une hypertrophie des cardiomyocytes qui passe par la génération d'H₂O₂. L'H₂O₂ active ERK1/2 et aboutit à la réponse hypertrophique [189, 423, 424]. Cependant in vivo, l'inhibition pharmacologique ou génétique de la MAO-A ne semble pas prévenir l'hypertrophie compensée en réponse à une surcharge de pression [189, 309]. En revanche son inactivation inhibe la mort des cardiomyocytes et la transition vers l'IC, dans un modèle de constriction aortique. Cependant

les mécanismes d'action délétères de la MAO-A dans le cœur restent peu connus (Figure 14).

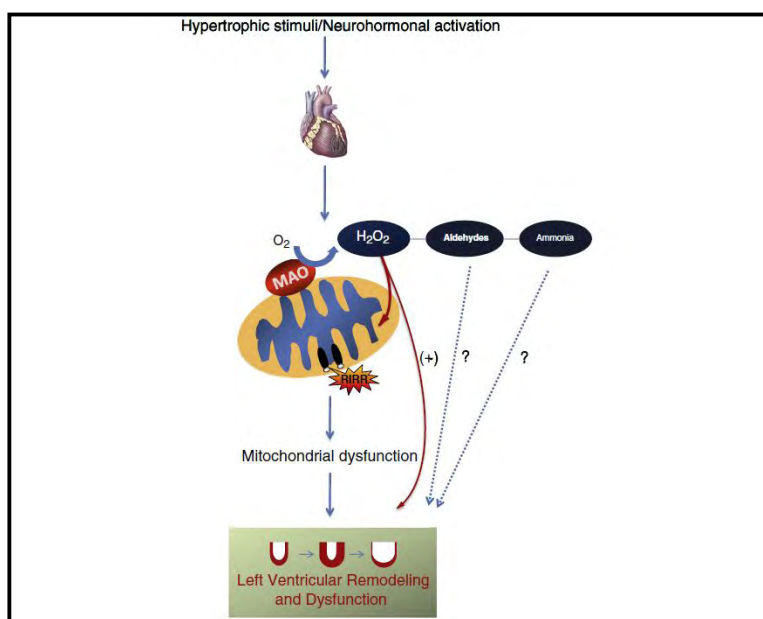


Figure 14 : Représentation schématique du lien entre MAO et IC

Les catécholamines synthétisées au cours du stimulus hypertrophique sont ensuite métabolisées par la MAO. La libération d' H_2O_2 qui en résulte peut directement influencer le remodelage ventriculaire. Mais l' H_2O_2 peut également prendre pour cible la mitochondrie, entraînant l'ouverture du pore de transition mitochondrial et l'augmentation de la production de ROS (RIRR = ROS induced ROS release). Ce qui amplifie les dommages myocardiques. Il n'est pas possible d'exclure la participation d'autres métabolites de la MAO comme l'ammoniaque et les aldéhydes. Tiré de Kaludercic et al. 2011 [425]

III.D.3 MAO-A ET SÉNESCENCE

De nombreuses études ont montré une augmentation de l'expression et de l'activité des monoamines-oxydases au cours de la sénescence dans le cerveau [417]. Comme nous l'avons précisé, la production de l' H_2O_2 qui en résulte serait impliquée dans la perte neuronale [426-430] notamment par un processus d'apoptose. Dans le myocarde, on observe une augmentation de la production intracellulaire de ROS au cours de la sénescence et une diminution des systèmes antioxydants. C'est l'association de ces deux phénomènes qui est à l'origine du déséquilibre de la balance redox et des dommages cellulaires. Les lésions oxydatives au niveau de la mitochondrie entraînent une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale et la production de ROS [431]. Au cours du vieillissement, l'activité de la MAO-A cardiaque augmente de façon drastique atteignant chez le rat de 24 mois, 9 fois le niveau constaté à 1 mois [432, 433]. Cette augmentation pourrait résulter de modifications transcriptionnelles du gène de la MAO-A et/ou d'une plus grande stabilité de son ARNm. Elle s'associe à une forte production d' H_2O_2 engendrant des lésions oxydatives au niveau du

cardiomyocyte et de la mitochondrie [434]. Ces conditions pourraient participer à la mort par apoptose ou nécrose du cardiomyocyte et favoriser le passage vers l'IC [435].

III.E CONCLUSION

La MAO-A est une enzyme mitochondriale qui réalise la déamination oxydative des catécholamines et de la sérotonine, hormones synthétisées dans l'IC comme dans la sénescence. Elle est source de ROS et libère de l' H_2O_2 . Elle pourrait donc être un acteur du remodelage myocardique et de la dysfonction mitochondriale et participer à la survenue de l'IC.

IV PROBLÉMATIQUE

Au cours de l'IC et de la sénescence, on observe une augmentation chronique de la production de ROS qui participe au remodelage myocardique et, à terme, à la défaillance cardiaque. La mitochondrie est une cible des ROS et présente une dysfonction à l'origine d'anomalies métaboliques et d'une baisse de la production d'ATP. Mais elle est également une source importante de ROS via la chaîne respiratoire, ainsi qu'en dehors de la chaîne respiratoire.

La MAO-A est une enzyme mitochondriale dont l'activité augmente dans de nombreuses pathologies cardiaques. Elle est indépendante de la chaîne respiratoire mitochondriale et peut libérer de grandes quantités d'H₂O₂.

L'objectif de notre travail est de déterminer, d'une part les effets et les mécanismes d'action de la MAO-A dans l'IC, de rechercher, d'autre part, son implication dans la sénescence intrinsèque du myocarde et enfin d'étudier son action sur la dynamique mitochondriale.

Dans une première étude, nous avons évalué les conséquences d'une augmentation chronique de la MAO-A au niveau myocardique, d'un point de vue fonctionnel comme tissulaire. Pour cela, dans une première approche *in vivo*, nous avons caractérisé le phénotype cardiaque d'un modèle de souris transgéniques surexprimant la MAO-A uniquement dans les cardiomyocytes adultes. Pour compléter cette étude, nous avons réalisé une approche *in vitro* sur des cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés qui nous a permis de déterminer les voies de signalisation intracellulaires modifiées par cette augmentation chronique.

Dans une seconde étude, nous avons recherché les conséquences de l'augmentation chronique de la MAO-A au cours de la sénescence. Nous avons d'abord réalisé une approche *in vivo* et étudié le myocarde de plusieurs modèles-animaux d'un point de vue microscopique, ultrastructural et moléculaire. Nous avons comparé les souris TG surexprimant la MAO-A dans les cardiomyocytes adultes, les souris KO pour le gène de la MAO-A et un modèle de souris sauvages âgées, ne surexprimant que faiblement la MAO-A au cours de la sénescence. Afin de discriminer les modifications liées à l'IC de celles liées à la sénescence, nous avons étudié en parallèle le rat, modèle de surexpression spontanée et

physiologique de la MAO-A au cours du temps, en dehors de toute IC. Pour déterminer si les modifications de la dynamique mitochondriale pouvaient être en rapport avec le stress oxydant, nous avons complété cette étude par une approche in vitro sur cardiomyocytes de rats adultes que nous avons placés en présence de doses croissantes d'H₂O₂.

V PREMIÈRE ÉTUDE

Evaluation des conséquences d'une augmentation chronique de la MAO-A au niveau myocardique, d'un point de vue fonctionnel comme tissulaire :

p53-PGC-1 α pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-a up-regulation : role in chronic left ventricular dysfunction in mice (l'interaction entre p53 et PGC-1 α médiée par la surexpression de la MAO-A entraîne des dommages oxydatifs mitochondriaux et la nécrose des cardiomyocytes : rôle dans la dysfonction ventriculaire chronique chez la souris).

Christelle Villeneuve, Céline Guilbeau-Frugier, Olivier Lairez, Catherine Ordener, Thibaut Duparc, Damien De Paulis, Bettina Couderc, Odile Spreux-Varoquaux, Florence Tortosa, Anne Garnier, Claude Knauf, Philippe Valet, Dominique Langin, Elisabetta Borchi, Chiara Nediani, Abdallah Gharib, Michel Ovize, Marie-Bernadette Delisle, Angelo Parini, Jeanne Mialet-Perez.

Antioxydants & Redox Signaling

V.A AVANT PROPOS

L'objectif de notre étude a été d'évaluer les conséquences d'une augmentation chronique de la MAO-A au niveau myocardique, d'un point de vue fonctionnel comme tissulaire et de déterminer les voies de signalisation intracellulaire modifiées par cette augmentation chronique. Cette étude a été réalisée à partir d'un modèle de souris transgéniques surexprimant la MAO-A uniquement dans les cardiomyocytes adultes. La MAO-A est une enzyme mitochondriale, source de ROS, qui semble avoir un effet délétère à la phase aiguë de l'IDM et après constriction aortique. Néanmoins, son implication dans le remodelage chronique ventriculaire en condition non pathologique n'a jamais été déterminée et les conséquences mitochondriales d'une augmentation prolongée de la MAO-A dans le myocarde sont encore inconnues.

Notre travail a donc consisté à caractériser le modèle de souris transgéniques surexprimant la MAO-A dans le myocarde et de compléter cette approche in vivo par une étude in vitro sur cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés dont la surexpression de la MAO-A a été obtenue grâce à un adénovirus.

Abstract

Aims—Oxidative stress and mitochondrial dysfunction participate together in the development of heart failure. mRNA levels of monoamine oxidase-A (MAO-A), a mitochondrial enzyme that produces H₂O₂, increase in several models of cardiomyopathies. Therefore, we hypothesized that an increase in cardiac MAO-A could cause cardiac oxidative stress and mitochondrial damage, leading to cardiac dysfunction. In the present study, we evaluated the consequences of cardiac MAO-A augmentation on chronic oxidative damage, cardiomyocyte survival and heart function, and identified the intracellular pathways involved.

Results—We generated transgenic mice (TG) with cardiac-specific MAO-A overexpression. Transgenic mice displayed cardiac MAO-A activity levels similar to those found in heart failure and aging. As expected, TG mice showed a significant decrease in the cardiac amounts of the MAO-A substrates serotonin and noradrenaline. This was associated with enhanced H₂O₂ generation in situ and mitochondrial DNA oxidation. As a consequence, MAO-A TG mice demonstrated progressive loss of cardiomyocytes by necrosis and ventricular failure, which were prevented by chronic treatment with the MAO-A inhibitor clorgyline and the anti-oxidant N-acetyl-cystein. Interestingly, TG hearts exhibited p53 accumulation and down-regulation of PGC-1 α , a master regulator of mitochondrial function. This was concomitant with cardiac mitochondrial ultrastructural defects and ATP depletion. In vitro, MAO-A adenovirus transduction of neonatal cardiomyocytes mimicked the results in MAO-A TG mice, triggering oxidative stress-dependent p53 activation, leading to PGC-1 α down-regulation, mitochondrial impairment and cardiomyocyte necrosis.

Innovation and conclusion—We provide the first evidence that MAO-A upregulation in the heart causes oxidative mitochondrial damage, p53-dependent repression of PGC-1 α , cardiomyocyte necrosis and chronic ventricular dysfunction.

Introduction

Heart failure (HF) is among the most prevalent diseases in developed countries. Reactive oxygen species (ROS) are believed to play a prominent role in triggering ventricular damage, thus accelerating the progression of HF (12). At the molecular level, chronic exposure to ROS leads to accumulation of oxidized DNA, proteins and lipids. This results in cardiomyocyte dysfunction and death, a determining factor in ventricular remodelling and failure(8). Mitochondria in cardiomyocytes are at particular risk for oxidative stress(39). To provide energy to meet the high demand, the heart contains numerous mitochondria and is especially vulnerable to mitochondrial dysfunction. Mitochondrial oxidative damage such as DNA mutations have been related to mitochondrial dysfunction, decline in cardiomyocyte function and death(4,19,39,45). In addition, a decrease in energy metabolism in several animal models of HF and in humans has been linked to the down-regulation of PGC-1 α (34,35), a master regulator of mitochondrial function which could represent a preferential target for ROS.

Despite accumulative evidences of the deleterious effect of ROS in the failing heart, the precise sources of ROS overproduction remain to be identified. Specific targeting of ROS sources could provide a more effective therapy for HF than global anti-oxidant therapies, which have given conflicting results in clinical trials(12). Monoamine oxidase-A (MAO-A) is located in the outer mitochondrial membrane of cardiomyocytes and plays a major role in serotonin and catecholamine metabolism(44). MAO-A catalyses the oxidative deamination of monoamines and generates hydrogen peroxide (H₂O₂), aldehyde and ammonia as by-products (Suppl Fig.1). Thus, MAO-A has been proposed as a relevant source of oxidative stress in the heart. Indeed, a deleterious role for MAO-A/ROS pathway has been demonstrated in acute situations such as ischemia-reperfusion where pharmacological or genetic inactivation of MAO-A prevented cardiomyocyte death(6,32). In addition, genetic and/or pharmacological inhibition of MAO-A prevented the augmentation of ROS and left ventricular dysfunction in mice with ventricular pressure overload(16).

Interestingly, MAO-A mRNA expression appears to be enhanced in several models of HF(16,18) as well as in the aging rat heart(26). However, the effect and downstream targets of such chronic increase in MAO-A expression are presently unknown. To address this question, we combined in vivo and in vitro approaches to analyze the functional consequences of cardiomyocyte MAO-A overexpression using transgenic mice (TG) and

adenoviral transduced cardiomyocytes. We found that increasing MAO-A expression to pathophysiological levels observed in failing and aging hearts was sufficient per se to cause chronic oxidative stress, mitochondrial damage and PGC-1 α down-regulation, thereby contributing to cardiomyocyte necrosis. Consequently, MAO-A transgenic mice died prematurely from dilated HF. Interestingly, we identified for the first time p53 and as a major signalling intermediate in H₂O₂-induced mitochondrial damage, PGC-1 α downregulation and cardiomyocyte necrosis linked to MAO-A activation.

Results

Myocardial MAO-A activity increases during ventricular hypertrophy, failure and aging.

We first analyzed changes in myocardial MAO-A activity in response to various stresses. In a rat model of pressure overload induced by ascendant aortic banding(7), MAO-A activity was significantly increased at the stage of compensated hypertrophy (5 weeks) and decompensated HF (15 weeks), compared to age-matched sham rats (Fig. 1A). Next, we examined the effect of aging on cardiomyocyte MAO-A activity. MAO-A activity increased gradually between 2 and 24 months in cardiac homogenates (Fig. 1B). Interestingly, a profound increase in MAO-A activity was also observed in cardiac myocytes isolated from senescent rats (24-months old) compared to those isolated from 2-months old rats (Fig. 1C).

TG mice overexpress an active MAO-A enzyme in cardiac mitochondria.

In order to mimic changes observed during ventricular pressure overload and aging, we generated mice with cardiomyocyte-specific overexpression of MAO-A under the control of the α -MHC promoter. Two independent lines of TG mice were propagated with different levels of MAO-A activity of 9336 ± 2139 pmol/mg/min for TG 61 and 40291 ± 11912 pmol/mg/min for TG 113 (Fig. 2A). The levels of MAO-A expression in TG61 were similar to those observed in failing and aging hearts (Fig. 1A, B). Western blot analysis demonstrated specific upregulation of MAO-A in cardiac but not liver homogenates compared to non transgenic littermates (NTG) (Fig. 2B). In addition, we verified that overexpressed MAO-A was correctly targeted to mitochondria and maintained its catalytic activity. Double immunofluorescence staining on heart sections showed enhanced levels of MAO-A in TG 61 mice compared to NTG, and colocalization with the mitochondrial protein Cox IV (Fig. 2C). We also found that mitochondria isolated from TG 61 mice produced greater amounts of H_2O_2 in presence of the MAO substrate tyramine compared to NTG, an effect that was inhibited by 96% with the MAO inhibitor pargyline (Fig. 2D). Finally, we measured by HPLC the levels of MAO-A substrates serotonin (5-HT) and norepinephrine (NE), along with their respective MAO metabolites 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and dihydroxyphenylglycol (DHPG) in cardiac homogenates. As shown in Fig. 2E, 2F, the ratios of 5-HIAA/5-HT and DHPG/NE were significantly elevated in TG 61 mice, as a result of both substrate depletion and metabolite accumulation. Altogether, our observations demonstrate that oxidative metabolism of 5-HT and NE at the mitochondria is potentiated in

MAO-A TG mice.

MAO-A TG mice develop dilated cardiomyopathy.

To evaluate the consequences of MAO-A upregulation on cardiac morphology and function, echocardiographies were performed in TG 61 mice at different ages. At 1.5 months, ventricular function was not modified in TG 61 compared to NTG mice (data not shown). However, there was a significant and progressive decrease in fractional shortening (FS) in TG 61 mice between 3 and 7 months, accompanied by left-ventricular dilatation (Table 1). Myocardial hypertrophy was not observed since neither septal wall thickness (DSWT) nor posterior wall thickness (PWT) were modified (Table 1). HF was confirmed in 7-months old TG mice by a significant increase in lung weight/body weight ratio (7.66 ± 0.47 mg/g vs 5.41 ± 0.27 mg/g, $p<0.05$) compared to NTG, indicative of pulmonary congestion. As a consequence, life-span was severely reduced in TG 61 mice with a maximum survival around 9 months (suppl Fig. 2A). To demonstrate that the deleterious effects of MAO-A upregulation depended on its catalytic activity, we performed echocardiographies on TG mice treated with the MAO-A inhibitor clorgyline from the age of 1 to 5 months. Chronic administration of clorgyline (10 mg/kg/day) prevented LV dysfunction and chamber dilatation in TG mice, compared to untreated TG mice (Table 1). It is noteworthy that another line of TG mice (TG 113), which express a higher amount of MAO-A, shows an accelerated cardiomyopathy, with a dramatic drop in FS at 2 months, ventricular dilatation and decreased survival (suppl Fig. 2A, 3). Altogether, our data demonstrate that an increase in MAO-A catalytic activity induces progressive dilated cardiomyopathy and HF in mice.

Evidences of cell death in the hearts of MAO-A TG mice, accompanied by inflammatory response, reactive cellular hypertrophy and fibrosis.

To gain more insights into the deleterious effects of myocardial MAO-A upregulation, we performed histological examinations. The most striking feature in TG hearts was myocardial disarray (Fig. 3A, upper panel). Cardiomyocyte drop-out was also evidenced in TG hearts (Fig. 3A, 3B), starting around the age of 1.5 months (-17 %, non-significant), reaching -51 % ($p<0.01$) at the age of 3 months and remaining stable until 6-months, compared to NTG mice. As a compensatory response, residual cardiomyocytes were hypertrophied and interstitial fibrosis was enhanced in TG mice (Fig. 3A, 3B). Chronic MAO-A inhibition with clorgyline prevented cardiomyocyte drop-out, hypertrophy and fibrosis in TG mice (Fig. 3A, 3B). Interestingly, histological findings were recapitulated in TG 113 mice (suppl Fig. 3). In addition, TG 61 cardiac mRNA expression analysis

confirmed histological findings, with up-regulation of pro-inflammatory cytokines as soon as 1.5 months after birth, re-expression of the fetal gene program and upregulation of extracellular matrix components (suppl Fig. 4).

As we found that cardiomyocyte loss occurred between 1.5 and 3 months in TG mice, we tested for the presence of necrosis and apoptosis to clarify the underlying mechanism of myocyte death at those ages. Regarding necrosis, plasma levels of troponin-I (a sensitive marker of myocyte necrosis) were greatly increased in young TG mice, while they were undetectable in NTG mice (Fig. 3C). This was in agreement with histological observations at 1.5 months, 3 months (not shown) and 6 months (Fig 3A, upper panel) that highlighted necrotic areas with disruption of myofibrils, cell debris, loss of nuclei, smudging and scattered leukocytes in TG mice (see arrow in Fig. 3A). Concerning apoptosis, TUNEL staining (Fig. 3D) or caspase-3 cleavage (Fig. 3E) were not modified in 1.5 months-old TG mice. A small increase in the number of apoptotic nuclei was observed at 3 months but did not correlate with caspase-3 activation (not shown). In contrast, the expression of the cell death intermediate p53 was significantly increased in TG hearts compared to NTG (Fig. 3F) at an early age (1.5 months). As p53 is known to participate, not only in apoptotic but also in necrotic death induction(40,43), our results suggest that it could be linked to cardiomyocyte necrosis signaling in MAO-A TG mice. Altogether, although apoptosis cannot be completely excluded, our results point toward cell necrosis as the predominant mechanism for cardiomyocyte drop-out in MAO-A overexpressing mice.

Real-time H₂O₂ generation and oxidative stress are increased in hearts from MAO-A TG mice and participate in the development of dilated cardiomyopathy.

In order to determine whether H₂O₂ was overproduced in TG 61 mice, we used an H₂O₂-sensitive electrode which detects real-time generation of H₂O₂ in situ by an amperometric method. As shown in Fig. 4A, in vivo levels of H₂O₂ were significantly increased in ventricles from anesthetized TG mice at an early age (1.5 months) compared to NTG mice. Next, we evaluated DNA oxidation, a sensitive marker of oxidative stress, in cardiac sections from TG 61 mice using 8-OH-dG staining. We found that DNA oxidation was significantly increased in TG hearts compared to NTG hearts as soon as 1.5 months, 3 months (suppl Fig. 5A) and 6 months (Fig. 4B). Interestingly, a prominent cytoplasmic staining indicated that mitochondrial DNA was particularly susceptible to oxidation in this model. Chronic treatment of TG mice with clorgyline prevented accumulation of 8-OH-dG (Fig. 4B). Then, we analyzed the regulation of anti-oxidant defenses in cardiac homogenates from NTG and TG mice. Interestingly, we found that the activity of two enzymes specifically

involved in H₂O₂ degradation, glutathion peroxidase (GPX) and catalase (CAT), were modified in TG mice while superoxide dismutase (Mn-SOD) activity remained unchanged (Fig. 4C). To evaluate the participation of oxidative stress in the onset of cardiac dysfunction associated with MAO-A upregulation, we used a pharmacological approach with N-acetylcystein (NAC), a ROS scavenger. Chronic treatment with 1.5 g/kg/day of NAC from 1 to 6 months improved antioxidant status since it was accompanied by an increase in ventricle GSH content (suppl. Fig. 5B). As a consequence, NAC treatment preserved cardiac function (FS) in TG mice at a level comparable to NTG mice, and prevented cardiac dilatation (LVESD) (Fig. 4D). Most interestingly, cell loss was also prevented (Fig. 4D). Altogether, our results provide evidence that chronic H₂O₂ generation by MAO-A participates in progressive oxidative damage, cardiomyocyte drop-out and deterioration of cardiac function in TG mice.

Upregulation of MAO-A is associated with mitochondrial damage in the heart.

Mitochondrial dysfunction plays a major role in HF. Since MAO-A is located in the outer membrane of mitochondria, and mitochondrial DNA is oxidized in TG mice, we hypothesized that this organelle could be at particular risk for H₂O₂-mediated injury. Expression profiling using microarrays indicated a global down-regulation of genes encoding mitochondrial proteins, and emphasized depressed energy metabolism and oxidative phosphorylation in young TG mice accompanied by the downregulation of the PGC-1 α pathway (Fig. 5A, for a list of genes see suppl. Table 1, 2). Therefore, we examined mitochondrial ultrastructure by electronic microscopy in TG mice at the age of 1.5 months. In NTG mice, mitochondria were normal with dense matrices filled, homogeneous matrix granules, intact double membrane and tightly packed cristae (Fig. 5B, left panel). In contrast, TG heart mitochondria tended to make aggregates and were heterogeneous in size (Fig. 5B, right panel). In the same cell, small and numerous mitochondria were observed, alternating with normal or swelling mitochondria. The most obvious change was the appearance of electron-lucent areas in mitochondrial matrix and concentric cristae. These morphological features indicated mitochondrial damage. Accordingly, ATP content was decreased in myocardial samples from 1.5 months-old TG mice, suggesting early impairment in mitochondrial bioenergetics (Fig. 5C). Finally, using real-time RT-PCR, we confirmed that expression of PGC-1 α , a master regulator of mitochondrial biogenesis, was significantly downregulated in TG mice at 1.5 months (Fig. 5D).

Upregulation of MAO-A sensitizes cardiomyocytes to necrosis through p53 activation.

To gain insight into the mechanism involved in MAO-A-dependent cell necrosis, we developed an in vitro model of MAO-A adenoviral vector (AdeMAO-A) transduction in neonatal cardiomyocytes. AdeMAO-A transduction (MOI 5) induced a significant increase in MAO-A activity in cardiomyocytes (Fig. 6A). Interestingly, application of NE (24 hours) induced cardiomyocyte necrosis only in cells transduced with AdeMAO-A, as demonstrated by LDH release (Fig. 6B). Thus, as observed in TG mice, in the presence of a constant substrate concentration, an increase in MAO-A activity sensitizes cardiomyocytes to necrosis. We confirmed this finding with tyramine, another MAO substrate devoid of membrane receptors in the mammalian heart. Tyramine application for 24 hours promoted necrosis in cardiomyocytes transduced with AdeMAO-A (MOI 5), which was prevented by clorgyline and the antioxidants NAC and Trolox (Fig. 6C). Oxidation of the fluorescent probe DCFDA was evidenced 2 hours after tyramine application, only in Ade-MAO-A-transduced cardiomyocytes, and was inhibited with clorgyline and NAC (Fig. 6D). In addition, tyramine application decreased GSH content in Ade-MAO-A-transduced cardiomyocytes but not in NAC-treated cardiomyocytes (Suppl. Fig. 5C). As we observed a significant accumulation of p53 in TG hearts compared to NTG (Fig 3F), we hypothesized that this protein could play an important role in MAO-A-dependent cell necrosis. We examined the kinetic of p53 activation in AdeMAO-A-transduced cardiomyocytes in the presence of tyramine. Interestingly, tyramine treatment induced a rapid increase in phospho(ser15)-p53 (Fig. 6E), which was dependent on ROS generation since it was prevented in the presence of NAC (Fig. 6F). Expression of total p53 was also significantly increased following 6 hours of tyramine treatment (Fig. 6E). Therefore, we tested whether p53 activation played a role in MAO-A-dependent necrosis by a siRNA approach. As shown in Fig. 6G, p53 siRNA transfection inhibited p53 protein expression at 48 and 72 hours compared to Scr-transfected cells. As a consequence, induction of necrosis was significantly reduced in p53-silenced cardiomyocytes compared to Scr (Fig. 6G). Tyramine-induced LDH release was also significantly reduced in cardiomyocytes treated with a pharmacological p53 inhibitor, pifithrin- α , compared to vehicle-treated cardiomyocytes (Fig. 6H). In conclusion, our data demonstrate for the first time that p53 activation plays a major role in MAO-A-mediated cardiomyocyte necrosis.

Mitochondrial damage and PGC-1 α downregulation are key events in MAO-A-dependent cardiomyocyte necrosis, which are both dependent on p53 activation.

Early mitochondrial impairment was observed in MAO-A TG mice. Thus, we asked whether MAO-A activation could be responsible for mitochondrial damage in vitro. As shown in Fig. 7A, as soon as 4 hours following tyramine application, mitochondrial

ultrastructure was severely impaired in AdeMAO-A- transduced cardiomyocytes. These ultrastructural alterations fitted with ATP depletion and PGC-1 α down-regulation, indicating a rapid decline in cell metabolic function in Ade-Mao-A-transduced Cardiomyocytes (Fig. 7C, D). Therefore, we asked whether p53 contributed to MAO-A-induced mitochondrial damage. Most interestingly, p53 silencing attenuated mitochondrial ultrastructural defects (Fig 7A, B) and PGC-1 α down-regulation (Fig. 7D) compared to Scr-transfected cells. This is consistent with recent data that identified p53 as an important and direct repressor of PGC-1 α in the heart, an event that participates in the functional decline of cardiac function during aging(36). Finally, we evaluated the contribution of H₂O₂ and oxidative stress in the regulation of PGC-1 α . We found that treatment with antioxidants NAC or Trolox prevented PGC-1 α mRNA diminution in response to tyramine in MAO-A-overexpressing cardiomyocytes (Fig. 7E) Thus, our results demonstrate that an increase in MAO-A activity sensitizes cardiomyocytes to mitochondrial damage, metabolic decline and cell necrosis through the generation of oxidative stress. In addition, p53-dependent repression of PGC-1 α in cardiomyocytes constitutes an important step in MAO-A-dependent necrosis (Fig. 7F).

Discussion

In the present study, we demonstrate for the first time that a chronic increase in MAO-A engenders mitochondrial oxidative damage, PGC-1 α down-regulation, myocyte necrosis and HF. Importantly, we report that p53 acts as a major downstream effector of MAO-A-dependent mitochondrial injury, PGC-1 α downregulation, and myocyte necrosis.

A deleterious role for MAO-A/H₂O₂ axis has been well documented in acute situations such as cardiac ischemia-reperfusion. In those studies, pharmacological or genetic inactivation of MAO-A prevented post-reperfusion cardiac oxidative stress and cardiomyocyte death(6,32). However, until now, the importance of MAO-A/H₂O₂ axis in chronic situations such as heart failure or aging remained poorly understood. Thus, our observation that enhanced MAO-A activity per se is sufficient to trigger deleterious effects in the heart represents a new finding, particularly relevant in cardiac diseases where MAO-A upregulation appears to be frequently observed(16,18). We found that MAO-A activity was increased in rat heart during pressure overload-induced hypertrophy and failure, and during cardiac aging. At present, the rationale for MAO-A upregulation during cardiac stress remains unknown. Sympathetic activation and NE spillover are major features associated with cardiac aging and failure(11,17). In addition, whole-blood 5-HT levels increase in failing humans hearts(30). Therefore, MAO-A upregulation might be an adaptative mechanism to increased levels of substrates, as previously demonstrated in rat mesangial cells(33). However, on the long term, a chronic increase in 5-HT and catecholamines metabolism by cardiac MAO-A could induce oxidative stress and cardiomyocyte toxicity. Understanding the mechanisms of MAO-A upregulation in the heart seems of major interest and will need to be elucidated in future studies.

In our model, overexpression of MAO-A in mice led to a decrease in cardiac NE and 5-HT, together with an increase in their respective MAO metabolites DHPG and 5-HIAA. This observation is consistent with previous studies showing an accumulation of 5-HT and/or NE levels in the heart after pharmacological or genetic inhibition of MAO-A(16,21). Monoamine neurotransmitters have major functional implications in the heart, especially in the modulation of cardiac inotropy and compensatory hypertrophy(16,21). Thus, it is possible that enhanced catabolism of 5-HT and NE in TG mice contribute to heart dysfunction. On the other hand, monoamine oxidation by MAO-A leads to the generation of H₂O₂, but also aldehyde intermediates, which are rapidly transformed to their corresponding

alcohol DHPG and 5-HIAA. Aldehydes are highly reactive species which are toxic for biological systems and may contribute to cell death together with H₂O₂ (24). Although we could not rule out a role for substrate depletion or aldehyde generation in cardiac dysfunction, we provided evidence that oxidative stress plays a key role in cardiomyocyte drop-out and HF in TG mice. First, using an original approach of direct real-time H₂O₂ detection in mice heart, we showed that TG mice were constantly exposed to high H₂O₂ cardiac level at an early age. This observation correlated with the appearance of DNA oxidative damage. Second, chronic treatment with an anti-oxidant (NAC) increased GSH content and prevented cardiomyocyte death and cardiac failure in TG mice. Altogether, our results put forward that MAO-A upregulation represents an endogenous system of chronic ROS generation leading to heart dysfunction. This is in accordance with a recent study demonstrating a protective effect of MAO-A inhibition on cardiac oxidative stress and failure during pressure overload(16). Interestingly, we found that the activity of two enzymes involved in H₂O₂ degradation, glutathione peroxidase (GPX) and catalase (CAT) were modified in opposite directions in MAO-A TG mice. GPX mRNA (not shown) and activity were upregulated whereas CAT mRNA (not shown) and activity were downregulated. Upregulation of GPX by oxidative stress has been reported in different cell types(23) and may involve the activation of transcription factors such as NFκB or p53(15), the latter being increased in TG mice. On the other hand, CAT gene expression has previously been demonstrated to be downregulated by chronic oxidative stress(27,42). One potential mechanism could involve hypermethylation of the CAT promoter by H₂O₂, which leads to drastic reduction in CAT protein expression(27). Alternatively, inhibition of CAT could be related to the downregulation of PGC-1α in TG mice, which is a co-factor necessary to maintain normal expression of antioxidant genes in coordination with FoxO transcription factors(31).

When examining MAO-A induced cardiomyocyte death, apoptotic nuclei were barely detectable in young TG mice. Considering that caspase-3 was not activated in TG hearts, we concluded that such level of apoptosis was insufficient to explain the major cardiomyocyte loss observed in TG mice. On the other hand, we found that necrosis was strongly enhanced in TG hearts, as assessed by histological examinations and plasma troponin-I measurement. Moreover, MAO-A overexpression in vitro rendered the cardiomyocytes more vulnerable to necrosis in the presence of NE and tyramine. According to its concentration, H₂O₂ has been demonstrated to induce either apoptosis or necrosis in cardiomyocytes(20). In addition, human aged cells with accumulative oxidative damages are more sensitive to necrosis(28). Therefore, MAO-A up-regulation during cardiac failure or

aging could sensitize cardiomyocytes to necrosis. This observation is interesting since, after being neglected for a while, necrosis is now recognized as a major way of cell death during chronic HF(29). Hence, elucidating necrotic signalling cascades in the heart seems of major interest. Here, we provide evidence that p53 accumulates in the hearts of TG mice and can be rapidly activated by tyramine in vitro. Both pharmacological and siRNA approaches demonstrated its involvement in cardiomyocyte necrosis induced by MAO-A. The identification of p53 as a mediator of cardiomyocyte necrosis in response to oxidative stress is consistent with accumulating evidences demonstrating an important role of p53 in HF(25,38). In addition, apart from being a well known pro-apoptotic factor, p53 has been demonstrated to participate in cell necrosis induced by DNA damage or TNF α (40,43).

Based on our observations, overexpression of MAO-A in vitro and in vivo was associated with mitochondrial ultrastructural defects, ATP depletion and PGC-1 α downregulation. In vitro, p53 silencing prevented tyramine-induced mitochondrial damage and PGC-1 α downregulation, indicating that p53 activation played a key role in amplifying mitochondrial injury in response to MAO-A/H₂O₂. Interestingly, such link between mitochondrial oxidative damage and p53 activation has been recently observed in a model of HF induced by doxorubicin(41). Down-regulation of PGC-1 α in our model is interesting since it has been reported to contribute to the maladaptive energetic profile of failing hearts(34). PGC-1 α downregulation could alter mitochondrial biogenesis/bioenergetics(3) or lead to a decrease in antioxidant enzymes, as previously described(22).

In conclusion, our results demonstrate that enhancing MAO-A expression, as observed in different models of cardiomyopathy, induces the activation of p53, which acts as a repressor of PGC-1 α expression and contributes to bioenergetic defects and mitochondrial damage leading to cardiomyocyte necrosis (Fig. 7E). These findings put forward that an increase in cardiac MAO-A could play a major role in the progression of HF, and propose MAO-A as a promising target for the prevention of cardiomyocyte death in chronic diseases.

Innovation

Oxidative stress and mitochondrial dysfunction participate together in the development of HF but the precise source and mechanisms of action are still a matter of debate. In the present manuscript, we show for the first time that enhancing MAO-A expression, as observed in different models of cardiomyopathy, causes oxidative mitochondrial damage, p53-dependent PGC-1 α repression, cardiomyocyte necrosis and chronic ventricular dysfunction leading to HF.

Materials and methods

Generation of TG mice. The cDNA encoding rat MAO-A (genbank NM_033653) provided by Akio Ito (Kyushu University, Japan) was subcloned into the full-length mouse α -myosin heavy-chain (α -MHC) promoter. Briefly, a 2060 bp cDNA, including 6 bp of the 5' and 474 bp of the 3' flanking sequences was subcloned into the Sall site of the polylinker of the α -MHC promoter construct(14). The resulting recombinant plasmid p α MHC-MAO-A, was confirmed by restriction mapping and nucleotide sequencing. A linear 8000 bp DNA fragment was microinjected into fertilized eggs at the "Institut Clinique de la Souris" (Strasbourg, France). Offsprings were genotyped and founders were bred with C57BL6/J mice to establish stable TG mice. Mice were housed in a pathogen-free facility and handled in accordance with the principles and procedures outlined in Council Directive 86/609/EEC. For all experiments, littermates were used as controls.

Assays of MAO activity. MAO-A activities in cardiac tissues were performed as previously described(21). For in vitro assays, 5 μ g of cellular lysates were incubated with 20 μ mol/L MAO-A substrate (MAO-Glo Assay kit, Promega, France) for 20 min at 37°C and non-specific activity was defined in the presence of clorgyline.

Primary cultures of cardiomyocytes. Adult ventricular myocytes were obtained from hearts of male Sprague-Dawley rats at the ages of 2, 12 and 24 months with retrograde perfusion, as previously described(6). For neonatal cardiomyocytes, hearts of 2-3 days old Sprague-Dawley rats were dissociated with collagenase type II, 0.1 % (Biovalley), as previously described(32). Myocyte enrichment was performed by centrifugation through a discontinuous Percoll gradient and resultant suspension of myocytes was plated onto gelatin-coated culture dishes. 24 h following adenovirus transduction, medium was replaced with Ham-F12 medium supplemented with dialysed-FCS 3% and inhibitors (clorgyline, NAC, pifithrin- α), when indicated. Tyramine was added 2 h later for the indicated time. The selected siRNA for p53 is an ON-TARGET plus SMART pool siRNA (Dharmacon, Surrey, United Kingdom). SiRNAs were transfected 24 hours before AdeMAO-A adenovirus transduction, using the Dharmafect reagent according to the manufacturer's recommendations.

Western blot. Ventricular homogenates and cardiomyocyte extracts were electrophoresed and transferred as described(21). Membranes were incubated with anti-MAO-A, anti-GAPDH antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) or

anti-caspase-3, anti-p53, anti-phospho-p53 antibodies (Cell Signaling, Danvers, USA).

Immunofluorescence. Frozen cardiac sections were fixed with PFA 3% for 15 min and neutralized with glycine 100 mmol/L. Following permeabilization with Triton 0.5 %, heart sections were incubated first with MAO-A antibody overnight at 4°C, and CoxIV antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) at room temperature (RT) for 1 h. After washing, sections were incubated for 1 h at RT with Oregon Green 488-conjugated goat anti-rabbit or Alexa 594-conjugated goat anti-mouse antibodies (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Image acquisition was performed using a DM600 microscope (Leica) fitted with a Roper COOLsnap ES CCD camera. Images were denoised using the Nearest Neighbours approach of the 2D Deconvolution setup of Metamorph software (Filter size: 2; Scaling Factor: 0.5; Result Scale : 2).

Heart H₂O₂ real-time measurement. For in situ detection of H₂O₂ in the heart, experiments have been optimized based on the procedure of Duparc et al.(9,10) for real-time measurement of NO release in the hypothalamus of mice with an amperometric probe. The H₂O₂-specific amperometric probe was calibrated as referred to manufacturer's instructions (ISO-HPO-100; World Precision Instruments, Aston, UK). Briefly, the probe was left in 20 ml of PBS buffer. After the sensor had stabilized, solution of H₂O₂ (from 100 to 800 nM) was added in the PBS solution. The current observed was directly proportional to H₂O₂ concentration. The sensitivity of a fresh probe was at least 1 pA/nM. Probes were tested before each experiment to validate their sensitivity. Then, 1.5 months-old mice were given pentobarbital (100 mg/kg ip) and were placed on a heating plate at 37°C. The chest was opened quickly and the probe was implanted in the left ventricle to monitor H₂O₂ release. After 20 min of stabilization of the probe, H₂O₂ concentration in the tissue was measured for 15 min in real-time with the data acquisition system LabTrax (WPI) connected to the free radical analyzer Apollo1000 (WPI). Data acquisition and analysis were performed with DataTrax2 software (WPI).

Electron microscopy. Left ventricles of mice were cut in cubes of 1 mm and placed in glutaraldehyde 2.5%. Semi-thin (1 µm) sections were stained with toluidine blue. Trimmed ultra-thin sections (600 Å) were stained with uranyl acetate and lead citrate. Sections were examined under a transmission electron microscopy (Hitachi 5HU12A).

Mitochondrial H₂O₂ production. Cardiac mitochondria were isolated using the procedure of Gomez et al.(13). Total H₂O₂ production was measured using a fluorimeter F-2500 (Hitachi) and a fluorescent probe Amplex Re® (10 µmol/L) in the presence of 0.6 U/ml

horseradish peroxidase (excitation and emission wavelengths set to 530 and 590 nm, respectively).

Assays of 5-HT, 5-HIAA, NE and DHPG. Snap-frozen ventricular tissues were homogeneously grinded in 1.5 ml water. Assays for 5-HT, 5-HIAA(2), and NE, DHPG(5) were performed using two different HPLC methods with coulometric detection applied to tissues. For 5-HT and 5-HIAA, determinations were made without extraction on the centrifugated supernatants after deproteinization of the aqueous mixture using HClO₄ 0.1 mol/L and ascorbic acid 3.10⁴/L. For NE and DHPG determinations, 500 µl samples of the aqueous centrifugated mixture were extracted using acid-washed alumina columns.

Echocardiography. Animals were anesthetized with 2% isoflurane and examined with non invasive echocardiography (echocardiograph Vivid 7 ultrasound, GE). Cardiac ventricular dimensions were measured on M-mode images at least 5-times for the number of animals indicated.

Histological analysis. Ventricles were incubated in Carnoy's fixative solution (Ethanol 60%, chloroform 30%, acetic acid 10%), embedded in paraffin and transversally sectioned. 5 µm tissue sections were stained with H&E, Masson's Trichrome or PAS. Fibrosis was measured as positively stained area with Masson's Trichrome (green), and expressed as percent of total area, using a computer-based morphometric analysis (Nis-element, Nikon). Cardiomyocyte diameter was evaluated after coloration with PAS (250-300 cells counted per heart) on left ventricle. Number of cardiomyocytes per total myocardial area was measured using manual-counting function of the analysis software in 3 consecutive areas of the left ventricle. For 8-OH-dG (a marker of nuclear and mitochondrial DNA oxidation) immunohistochemistry, antigen retrieval was performed using citrate solution (sodium citrate 1 mol/L, citric acid 1 mol/L, pH 6.0) at 97°C during 40 min. After washing with deionised water, endogenous peroxidase activity was blocked with H₂O₂ 30 % for 10 min. 8-OH-dG mouse monoclonal antibody (1:200) (AbCys, Paris, France) was incubated for 2 h at 37°C and secondary antibody for 30 min at RT. Slides were washed and incubated with 1:50 DAB in substrate buffer for 5 min, and then counterstained with 1:4 Mayer's haematoxylin. Positively stained area was quantified using a computer-based morphometric analysis (Nis-element, Nikon) and calculated as percent of total area. Apoptosis was evaluated by TUNEL staining on cardiac sections as previously described(6).

Real-time RT-PCR. Extraction of RNA from cardiac ventricles was performed using column affinity purification (Qiagen, Courtaboeuf, France). cDNAs were synthesized using

the superscript II RT-PCR system (Invitrogen) with random hexamers. Real-time PCR was performed on a StepOnePlus system (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) in 96-well plates with specific primers and SYBR green mix (Eurogentec, Angers, France). The primers were as followed: mouse PGC-1 α -F: ACGGTTTACATGAACACAGCTGC, mouse PGC-1 α -R: CTTGTTCGTTCTGTTCAGGTGC, Rat PGC-1 α -F: CACCAAACCCACAGAGAACAG, Rat PGC-1 α -R: GCAGTTCCAGAGAGTTCCACA

Plasmatic troponin. Plasmatic troponin-I was detected using an ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Life Diagnostic, West Chester, USA). Briefly, plasma samples were incubated for 1 h at RT with an HRP-conjugated anti-cTn-I antibody in microtiter wells. After extensive wash, HRP substrate was added in each well for 20 min at RT and the reaction stopped with HCl 1 mol/L. Absorbance was measured at 450 nm and plasmatic cTn-I concentration was determined using cTn-I standards.

Antioxidant enzyme activities. Catalase (CAT) activity was determined by the procedure of Aebi(1). For Glutathion Peroxidase (GPX) and Superoxide Dismutase (Mn-SOD), activities were evaluated as previously described(37).

GSH measurements. GSH content was evaluated in ventricle samples and neonatal cardiomyocytes using "Total Glutathione detection kit" from Assay Designs.

Microarray analysis. Total RNA was prepared as described above. The quality of samples was verified with Agilent Bioanalyzer 6000 (Agilent Technologies, Massy, France). Hybridization of RNA was done on Agilent Mouse Genome CGH 44K chip at the Genotoul Biopuces Plate-forme (Toulouse, France). Raw data (median values) were normalized and processed using the R statistical software and the limma package for microarrays. Weights were attributed to flag bad data points and the remaining values were Loess-normalized within arrays and quantile-normalized between arrays. Limma was used to generate log₂ ratios (coefficients) and p-values (using eBayes) in order to select genes with differential expression between groups that were also well behaved in terms of expression within each individual group. Using a log₂ ratio of 0.5 (fold-change 1.4) and a p-value cutoff of 0.005, genes were selected for analysis. GeneSet Enrichment Analysis for categorical feature overrepresentation in each gene list (upregulated or down-regulated) was performed using Toppgene (<http://toppgene.cchmc.org/>). For each enriched Geneset, the enrichment P-value for non-random list intersection (using Bonferroni p-value correction) was converted to a significance score [S=-log (pval)] and a matrix was constructed with colors scaled to significance scores. Common themes were defined among the various overlapping and unique Genesets.

ATP measurement. Snap-frozen cardiac samples (30 mg) were homogenized in 500 μ l ice-cold perchloric acid (10% v/v), sited on ice for 10 min and centrifuged at 14 000 rpm for 10 min at 4°C. Supernatants were neutralized with KOH 2.5 mol/L and centrifuged at 4500 rpm for 5 min. Supernatants from cardiac sample extraction or cell lysates were assayed for ATP assay kit (Bioluminescence assay kit HS II, Roche).

Adenoviral constructs. Replication-deficient (Δ E1, E3) adenoviral vector expressing MAO-A coding region (1.9 kb) under the control of the CMV promoter was constructed with the AdEasy System (Qbiogen, F). Replication-defective MAO-A adenovirus (AdeMAO-A) was generated by transfection of 293A cells with a single isolate of recombinant adenoviral vector, expanded, and purified. Viral titers were initially determined by optical absorbance at 260 nm. Infections were done at a certain MOI based on this definition, e.g. 1×10^6 bav/ 1×10^6 cells = MOI 1

Intracellular ROS measurement. Generation of ROS in cardiomyocytes was evaluated using DCFDA probe as previously described(6).

LDH release assay. For quantitative assessment of cardiomyocyte necrosis, Lactate Dehydrogenase (LDH) release in culture medium was measured using LDH-cytotoxicity Assay Kit according to the manufacturer's instructions (Biovision).

Statistical Analysis. Results are expressed as mean+SEM. Experimental groups were compared using Student's t test or 1-way ANOVA, as appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Acknowledgements

This work was supported by grants from INSERM, Agence Nationale pour la Recherche (ANR), Fondation pour la Recherche Medicale (FRM), Mouse Clinical Institute (MCI) in Strasbourg and Région Midi-Pyrénées. We thank J. S. Iacovoni for bioinformatics. We thank A. Colom (INSERM UMR1048) and E. Couture-Lepetit (INSERM U886) for technological assistance. We thank F. Lezoualc'h (INSERM UMR1048) for critical reading of the manuscript.

Author Disclosure Statement: No competing financial interests exist.

List of abbreviations.

Ade: adenovirus; Clorg: clorgyline, CoxIV: cytochrome c oxidase IV, DHPG: dihydroxyphenylglycol; FS: fraction shortening; GSH: Glutathione reduced; 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid; HPLC: High Performance Liquid Chromatography, 5-HT: 5-hydroxy-tryptamine; LDH: lactate dehydrogenase; LV: left ventricle; LVESD: left ventricular end-systolic diameter; MAO-A: monoamine oxidase-A; MHC: myosin heavy chain; MOI: multiplicity of infection; NAC: N-acetyl-cystein; NE: norepinephrine; NTG: non transgenic; PGC-1 α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ coactivator-1 α ; PWT: posterior wall thickness; ROS: reactive oxygen species; TG: transgenic, TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling.

References

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126, 1984.
2. Alvarez JC, Bothua D, Collignon I, Advenier C, Spreux-Varoquaux O. Simultaneous measurement of dopamine, serotonin, their metabolites and tryptophan in mouse brain homogenates by high-performance liquid chromatography with dual coulometric detection. *Biomed Chromatogr* 13: 293-8, 1999.
3. 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. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* 1: 259-71, 2005.
4. Barja G, Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *Faseb J* 14: 312-8, 2000.
5. Berlin I, Said S, Spreux-Varoquaux O, Olivares R, Launay JM, Puech AJ. Monoamine oxidase A and B activities in heavy smokers. *Biol Psychiatry* 38: 756-61, 1995.
6. Bianchi P, Kunduzova O, Masini E, Cambon C, Bani D, Raimondi L, Seguelas MH, Nistri S, Colucci W, Leducq N, Parini A. Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury. *Circulation* 112: 3297-305, 2005.
7. De Sousa E, Veksler V, Minajeva A, Kaasik A, Mateo P, Mayoux E, Hoerter J, Bigard X, Serrurier B, Ventura-Clapier R. Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure. *Circ Res* 85: 68-76, 1999.
8. Dorn GW, 2nd. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res* 81: 465-73, 2009.
9. Duparc T, Colom A, Cani PD, Massaly N, Rastrelli S, Drougard A, Le Gonidec S, Mouldous L, Frances B, Leclercq I, Llorens-Cortes C, Pospisilik JA, Delzenne NM, Valet P, Castan-Laurell I, Knauf C. Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal* 15: 1477-96, 2011.
10. Duparc T, Naslain D, Colom A, Muccioli GG, Massaly N, Delzenne NM, Valet P, Cani PD, Knauf C. Jejunum inflammation in obese and diabetic mice impairs enteric glucose detection and modifies nitric oxide release in the hypothalamus. *Antioxid Redox Signal* 14: 415-23, 2011.
11. Eisenhofer G, Friberg P, Rundqvist B, Quyyumi AA, Lambert G, Kaye DM, Kopin IJ, Goldstein DS, Esler MD. Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure. *Circulation* 93: 1667-76, 1996.
12. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115: 500-8, 2005.
13. Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* 117: 2761-8, 2008.
14. Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J. Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem* 266: 9180-5, 1991.
15. Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S, Hofseth LJ, Moake M, Nagashima M, Forrester KS, Harris CC. p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res* 64: 2350-6, 2004.
16. Kaludercic N, Takimoto E, Nagayama T, Feng N, Lai EW, Bedja D, Chen K, Gabrielson KL, Blakely RD, Shih JC, Pacak K, Kass DA, Di Lisa F, Paolocci N. Monoamine oxidase A-mediated enhanced catabolism of norepinephrine contributes to adverse remodeling and pump failure in hearts with pressure overload. *Circ Res* 106: 193-202, 2010.
17. Kaye D, Esler M. Sympathetic neuronal regulation of the heart in aging and heart failure. *Cardiovasc Res* 66: 256-64, 2005.

18. Kong SW, Bodyak N, Yue P, Liu Z, Brown J, Izumo S, Kang PM. Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Physiol Genomics* 21: 34-42, 2005.
19. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309: 481-4, 2005.
20. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 35: 615-21, 2003.
21. Lairez O, Calise D, Bianchi P, Ordener C, Spreux-Varoquaux O, Guilbeau-Frugier C, Escourrou G, Seif I, Roncalli J, Pizzinat N, Galinier M, Parini A, Mialet-Perez J. Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* 46: 587-95, 2009.
22. Lu Z, Xu X, Hu X, Fassett J, Zhu G, Tao Y, Li J, Huang Y, Zhang P, Zhao B, Chen Y. PGC-1 α regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal* 13: 1011-22, 2010.
23. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 15: 1957-97, 2011.
24. Marchitti SA, Deitrich RA, Vasiliou V. Neurotoxicity and metabolism of the catecholamine-derived 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde: the role of aldehyde dehydrogenase. *Pharmacol Rev* 59: 125-50, 2007.
25. Matsusaka H, Ide T, Matsushima S, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Kinugawa S, Tsutsui H. Targeted deletion of p53 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res* 70: 457-65, 2006.
26. Maurel A, Hernandez C, Kunduzova O, Bompard G, Cambon C, Parini A, Frances B. Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1460-7, 2003.
27. Min JY, Lim SO, Jung G. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS Lett* 584: 2427-32.
28. Miyoshi N, Oubrahim H, Chock PB, Stadtman ER. Age-dependent cell death and the role of ATP in hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1727-31, 2006.
29. Nakayama H, Chen X, Baines CP, Klevitsky R, Zhang X, Zhang H, Jaleel N, Chua BH, Hewett TE, Robbins J, Houser SR, Molkentin JD. Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest* 117: 2431-44, 2007.
30. Nigmatullina RR, Kirillova VV, Jourjikiya RK, Mukhamedyarov MA, Kudrin VS, Klodt PM, Palotas A. Disrupted Serotonergic and Sympathoadrenal Systems in Patients with Chronic Heart Failure May Serve as New Therapeutic Targets and Novel Biomarkers to Assess Severity, Progression and Response to Treatment. *Cardiology* 113: 277-286, 2009.
31. Olmos Y, Valle I, Borniquel S, Tierrez A, Soria E, Lamas S, Monsalve M. Mutual dependence of Foxo3a and PGC-1 α in the induction of oxidative stress genes. *J Biol Chem* 284: 14476-84, 2009.
32. Pchejetski D, Kunduzova O, Dayon A, Calise D, Seguelas MH, Leducq N, Seif I, Parini A, Cuvillier O. Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis. *Circ Res* 100: 41-9, 2007.
33. Pizzinat N, Marchal-Victorion S, Maurel A, Ordener C, Bompard G, Parini A. Substrate-dependent regulation of MAO-A in rat mesangial cells: involvement of dopamine D₂-like receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F167-74, 2003.
34. Rimbaud S, Garnier A, Ventura-Clapier R. Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacol Rep* 61: 131-8, 2009.
35. Rosca MG, Hoppel CL. Mitochondria in heart failure. *Cardiovasc Res* 88: 40-50, 2010.

36. Sahin E, Colla S, Liesa M, Moslehi J, Muller FL, Guo M, Cooper M, Kotton D, Fabian AJ, Walkey C, Maser RS, Tonon G, Foerster F, Xiong R, Wang YA, Shukla SA, Jaskelioff M, Martin ES, Heffernan TP, Protopopov A, Ivanova E, Mahoney JE, Kost-Alimova M, Perry SR, Bronson R, Liao R, Mulligan R, Shirihai OS, Chin L, DePinho RA. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470: 359-65, 2011.
37. Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borchetti E, Zani M, Feccia M, Mancini M, Petrozza V, Cossarizza A, Gallo P, Taylor RW, d'Amati G. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50: 1362-1369, 2007.
38. Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Oka T, Minamino T, Okada S, Morimoto S, Zhan DY, Terasaki F, Anderson ME, Inoue M, Yao A, Nagai R, Kitaura Y, Sasaguri T, Komuro I. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II δ causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 122: 891-9, 2010.
39. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. *Cardiovasc Res* 81: 449-56, 2009.
40. Tu HC, Ren D, Wang GX, Chen DY, Westergard TD, Kim H, Sasagawa S, Hsieh JJ, Cheng EH. The p53-cathepsin axis cooperates with ROS to activate programmed necrotic death upon DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1093-8, 2009.
41. Velez JM, Miriyala S, Nithipongvanitch R, Noel T, Plabplueng CD, Oberley T, Jungsuwadee P, Van Remmen H, Vore M, St Clair DK. p53 Regulates oxidative stress-mediated retrograde signaling: a novel mechanism for chemotherapy-induced cardiac injury. *PLoS One* 6: e18005, 2011.
42. Venkatesan B, Mahimainathan L, Das F, Ghosh-Choudhury N, Ghosh Choudhury G. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via PI 3 kinase/Akt signaling in mesangial cells. *J Cell Physiol* 211: 457-67, 2007.
43. Waters FJ, Shavlakadze T, McIlldowie MJ, Piggott MJ, Grounds MD. Use of pifithrin to inhibit p53-mediated signalling of TNF in dystrophic muscles of mdx mice. *Mol Cell Biochem* 337: 119-31, 2010.
44. Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 7: 295-309, 2006.
45. Zhang D, Mott JL, Farrar P, Ryerse JS, Chang SW, Stevens M, Denniger G, Zassenhaus HP. Mitochondrial DNA mutations activate the mitochondrial apoptotic pathway and cause dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 57: 147-57, 2003.

Table 1. Echocardiographic measurements of NTG and MAO-A TG mice in control conditions and after chronic treatment with clorgyline

	NTg	Untreated			Clorgyline-treated		
		Tg-3 months	Tg-5 months	Tg-7 months	NTg	Tg-3 months	Tg-5 months
N° of animals	16	11	12	4	5	5	5
DSWT, mm	0.67±0.01	0.64±0.01	0.67±0.01	0.68±0.04	0.63±0.01	0.63±0.02	0.66±0.01
DPWT, mm	0.68±0.02	0.64±0.01	0.69±0.02	0.76±0.09	0.67±0.02	0.65±0.02	0.64±0.01
LVEDD, mm	3.84±0.03	4.40±0.09*	4.50±0.06*	4.88±0.26*	3.93±0.16	4.02±0.17	4.16±0.09
LVESD, mm	2.73±0.05	3.40±0.01*	3.63±0.09*	4.08±0.39*	2.74±0.17	2.92±0.18	3.12±0.07#
FS (%)	28.9±1.0	22.5±1.1*	19.4±1.2*	16.5±3.5*	30.5±2.7	27.1±1.7	25.3±0.7#
HR, bpm	444.4±12.9	475.0±12.5	457.2±17.0	484.8±30.5	406.5±20.7	453.0±29.1	449.5±8.9

Diastolic Septal Wall Thickness (DSWT), Diastolic Posterior Wall Thickness (DPWT), Left-Ventricular End-Diastolic Diameter (LVEDD), Left-Ventricular End-Systolic Diameter (LVESD), Fractional shortening (FS), and Heart Rate (HR) assessment by echocardiography. *p<0.05 in TG vs NTG mice. #p<0.05 clorgyline-treated vs untreated age-matched TG mice

Figure Legends

Figure 1. MAO-A activity is increased in response to hypertrophy, failure and aging in the heart. (A) MAO-A activity in cardiac homogenates from rats with ascendant aortic banding (Band) for 5 weeks (hypertrophy, n=5) or 15 weeks (HF, n=5) compared to age-matched sham (n=5). (B) MAO-A activity in cardiac homogenates from young (2 months), middle age (12 months) and senescent rats (24 months) (n=6). (C) MAO-A activity in isolated rat cardiomyocytes at the ages indicated (n=3-4). (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs indicated value).

Figure 2. MAO-A TG mice overexpress an active MAO-A enzyme, specifically in cardiac mitochondria. (A) Cardiac MAO-A activity in NTG, TG 61 and TG 113 mice at 1.5 months (n=3). The DNA transgene is represented above the histogram, with the α MHC promoter in front of the MAO-A cDNA. (B) Representative MAO-A immunoblot on cardiac and liver homogenates in NTG, TG 61 and TG 113 mice. (C) Double immunofluorescence staining on heart sections using MAO-A and Cox-IV antibodies (x 1000) at 3 months. (D) H₂O₂ measurements on isolated cardiac mitochondria incubated with Tyramine (30 μ mol/L) and pargyline (100 μ mol/L) (n=4-5) at 3 months. (E) 5-HT, 5-HIAA, NE and DHPG contents in cardiac homogenates from NTG and TG mice assessed with HPLC (n=5) at 1.5 months. (*p<0.05, ***p<0.001, §§§p<0.001 vs indicated value).

Figure 3. Evidences of cell death in the hearts of MAO-A TG mice associated with reactive cellular hypertrophy and fibrosis. (A) Histological characterization (x 400) of ventricular pathology by hematoxylin-eosin (HE), periodic acid Schiff (PAS) and Green Masson's Trichrome staining in cardiac sections of NTG, TG 61 and clorgyline-treated TG 61 (TG 61+clorg) mice at 5 months. Arrow indicates 2necrotic area. (B) Quantification of cardiomyocyte number per mm, cardiomyocyte diameter and collagen content on cardiac sections (n=5). (C) Evaluation of troponin-I levels by ELISA in plasma from NTG and TG 61 mice at 1.5 and 3 months (n=4). (D) Quantification of TUNEL-positive apoptotic nuclei related to the total number of nuclei in cardiac sections from NTG and TG 61 mice at 1.5 and 3 months (n=4). (E) Activated caspase-3 and (F) p53 immunoblots on heart homogenates from NTG and TG 61 at 1.5 months. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, §p<0.01, §§p<0.001 vs indicated value).

Figure 4. Oxidative stress is increased in hearts from MAO-A overexpressing mice

and participates in the development of dilated cardiomyopathy. (A) Real-time in situ measurements of H₂O₂ in ventricles from anesthetized TG and NTG mice at 1.5 months. Histogram represents average H₂O₂ concentration from n=5 mice (B) 8-OH-dG immunohistochemistry on cardiac sections from 5 month-old NTG, TG 61 and clorgyline-treated TG 61 (TG 61+clorg) mice (x 400). Quantification of 8-OH-dG staining was expressed as percent of total area (n=5). (C) Activity of anti-oxidant enzymes glutathion peroxidase (GPX), catalase (CAT), and superoxide dismutase (Mn-SOD) in ventricles from 3 month-old NTG and TG 61 mice (n=5-6). (D) Fractional shortening (FS), Left-Ventricular Systolic Diameter (LVESD) and cardiomyocyte number in 5 month-old NTG, TG 61 untreated and N-acetyl-cystein-treated TG 61 (TG61 +NAC) mice (n=6). (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, §p<0.05, §§p<0.01, §§§p<0.001 vs indicated value).

Figure 5. MAO-A overexpression induces mitochondrial injury. (A) Geneset Enrichment Analysis for differentially expressed genes by microarray in TG compared to NTG mice (2 months). Common themes were defined among the various overlapping and unique gene sets. Blue blocks and red blocks represent highly enriched in category among the various downregulated or upregulated genes, respectively. (B) Representative electron micrographs of ventricles from 1.5 months old NTG and TG 61 mice (x 10000).

Cardiomyocytes from TG mice show electron-lucent areas in mitochondrial matrix (arrows) or concentric cristae (asterisk). (C) ATP concentrations in ventricle homogenates at 1.5 months (n=4). (D) Real-time RT-PCR expression of PGC-1 α mRNA at 1.5 months (n=5). (*p<0.05, **p<0.01 vs indicated value).

Figure 6. p53 mediates MAO-A-dependent cardiomyocyte necrosis. (A, B, C and D), neonatal cardiomyocytes were untransduced (MOI 0) or transduced with AdeMAO-A at MOI 5. (A) Quantification of MAO-A activity by luminescence (n=3). (B), LDH release following treatment with 50 μ mol/L NE for 24 hours (n=8-9). (C), LDH release in response to 500 μ mol/L tyramine for 24 hours in the presence of 10 μ mol/L clorgyline (Tyr+clorg), 5 mmol/L NAC (Tyr+NAC) or 1 mmol/L Trolox (Tyr+Trolox), when indicated (n=4-5). (D), ROS generation with DCFDA probe in response to 500 μ mol/L tyramine for 2 hours in the presence of NAC (5 mmol/L) or clorgyline (10 μ mol/L), when indicated (n=9). (E), Analysis of total or phosphor(ser15)-p53 levels by immunoblot in AdeMAO-A-transduced neonatal cardiomyocytes (MOI 5) stimulated with 500 μ mol/L tyramine for the indicated time, (E) in the presence of NAC when indicated (n=3-5). GAPDH was used as a loading control. (F) LDH release in AdeMAO-A-transduced cardiomyocytes (MOI 5) transfected with Scr or p53 siRNA for 48 hours, and stimulated with 500 μ mol/L tyramine for 24 hours

(n=7). Immunoblot illustrates silencing of p53 protein at 48 and 72 hours following siRNA transfection. (G) LDH release in AdeMAO-A-transduced cardiomyocytes (MOI 5) stimulated with 500 $\mu\text{mol/L}$ tyramine for 24 hours in the presence of 20 $\mu\text{mol/L}$ pifithrin, when indicated (n=6-8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ vs indicated values or Ct.

Figure 7. p53 mediates mitochondrial injury and PGC-1 α repression induced by MAO-A activation in neonatal cardiomyocytes transduced with AdeMAO-A (MOI 5). (A) Representative electron micrographs of cardiomyocytes transfected with Scr or p53 siRNA and stimulated with tyramine for 4 hours (Tyr) ($\times 35000$). Tyramine-treated Scr-transfected cardiomyocytes display damaged mitochondria (arrows) which are quantified in (B). (C) Kinetics of ATP content in AdeMAO-A-transduced cardiomyocytes (MOI 5) treated with tyramine (n=3) compared to untransduced (MOI 0) cells. (D) PGC-1 α expression by real-time RT-PCR in cardiomyocytes transfected with Scr or p53 siRNA and stimulated with tyramine for 4 hours (n=8). (E) PGC-1 α expression by real-time RT-PCR in untransduced or AdeMAO-A-transduced cardiomyocytes stimulated with tyramine for 4 hours in the presence of NAC (5 mmol/L) or Trolox (1 mmol/L) (n=4). (F) Schematic representation of MAO-A induced necrosis signalling pathway in cardiomyocytes. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, § $p < 0.05$ vs indicated values

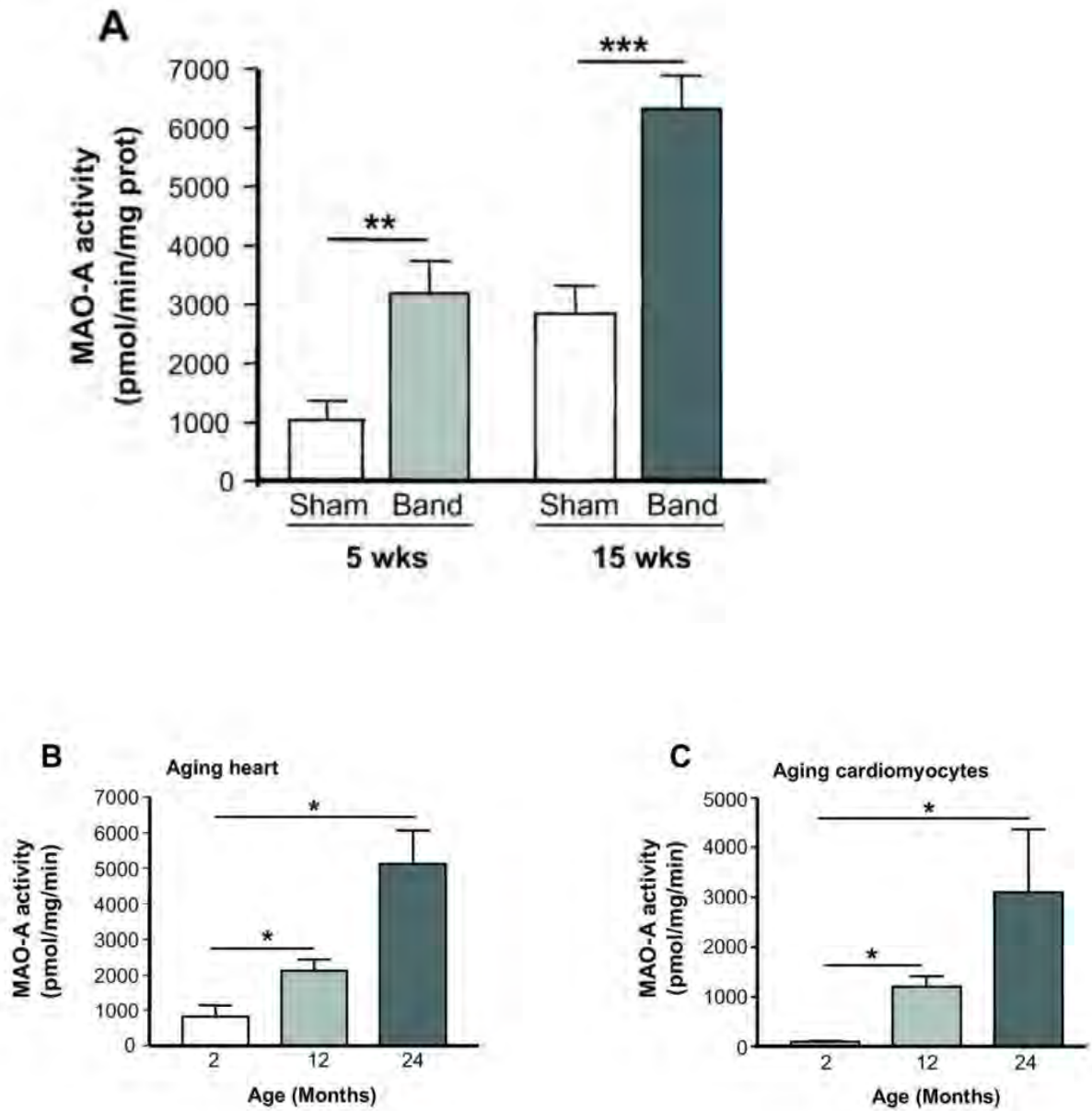


Figure 1 - MAO-A activity is increased in response to hypertrophy, failure and aging in the heart. (A) MAO-A activity in cardiac homogenates from rats with ascendant aortic banding (Band) for 5 weeks (hypertrophy, n=5) or 15 weeks (HF, n=5) compared to age-matched sham (n=5). (B) MAO-A activity in cardiac homogenates from young (2 months), middle age (12 months) and senescent rats (24 months) (n=6). (C) MAO-A activity in isolated rat cardiomyocytes at the ages indicated (n=3-4). (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs indicated value).

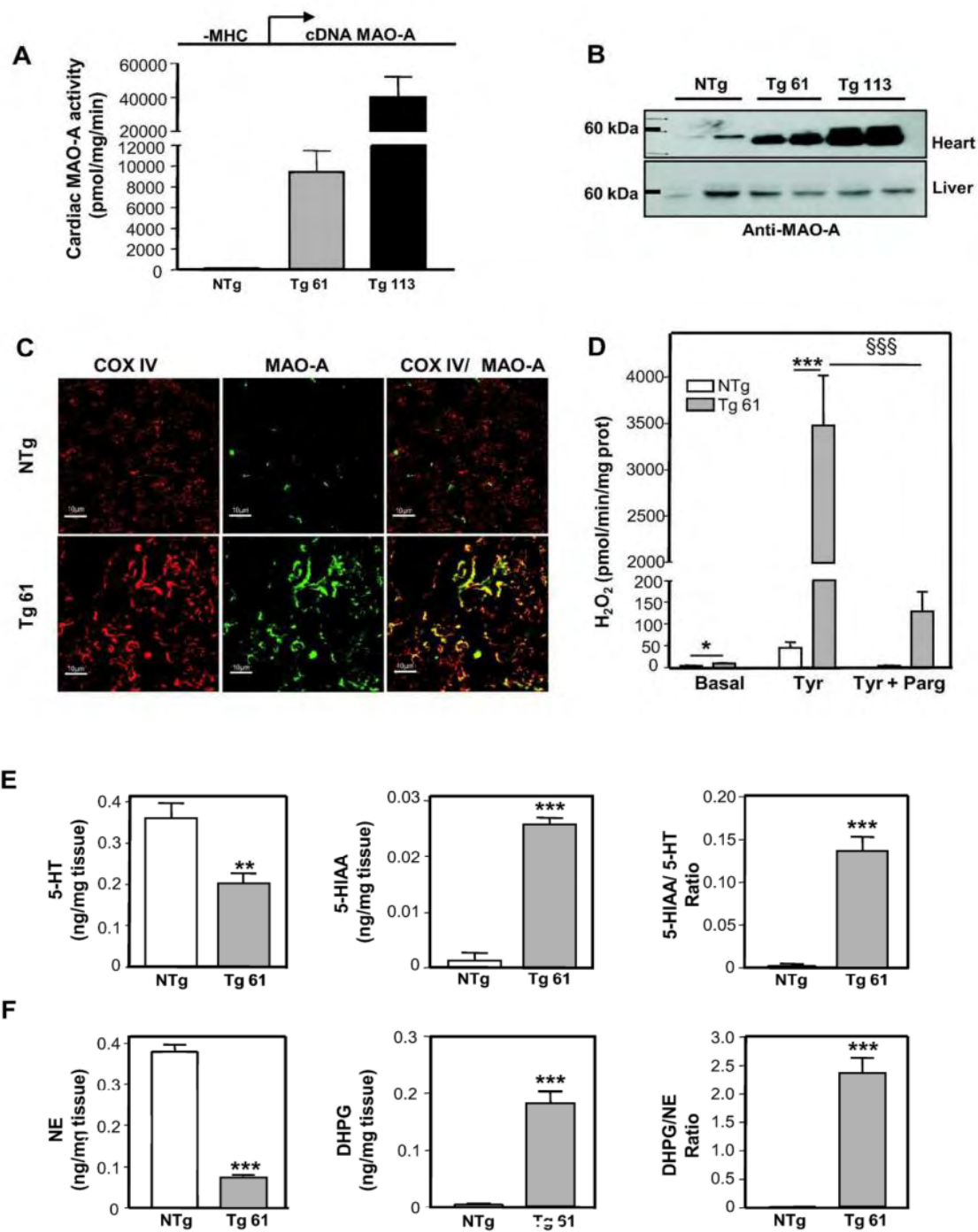


Figure 2 - MAO-A TG mice overexpress an active MAO-A enzyme, specifically in cardiac mitochondria. (A) Cardiac MAO-A activity in NTG, TG 61 and TG 113 mice at 1.5 months (n=3). The DNA transgene is represented above the histogram, with the α MHC promoter in front of the MAO-A cDNA. (B) Representative MAO-A immunoblot on cardiac and liver homogenates in NTG, TG 61 and TG 113 mice. (C) Double immunofluorescence staining on heart sections using MAO-A and Cox-IV antibodies (x 1000) at 3 months. (D) H₂O₂ measurements on isolated cardiac mitochondria incubated with Tyramine (30 μ mol/L) and pargyline (100 μ mol/L) (n=4-5) at 3 months. (E) 5-HT, 5-HIAA, NE and DHPG contents in cardiac homogenates from NTG and TG mice assessed with HPLC (n=5) at 1.5 months. (*p<0.05, ***p<0.001, §§§p<0.001 vs indicated value).

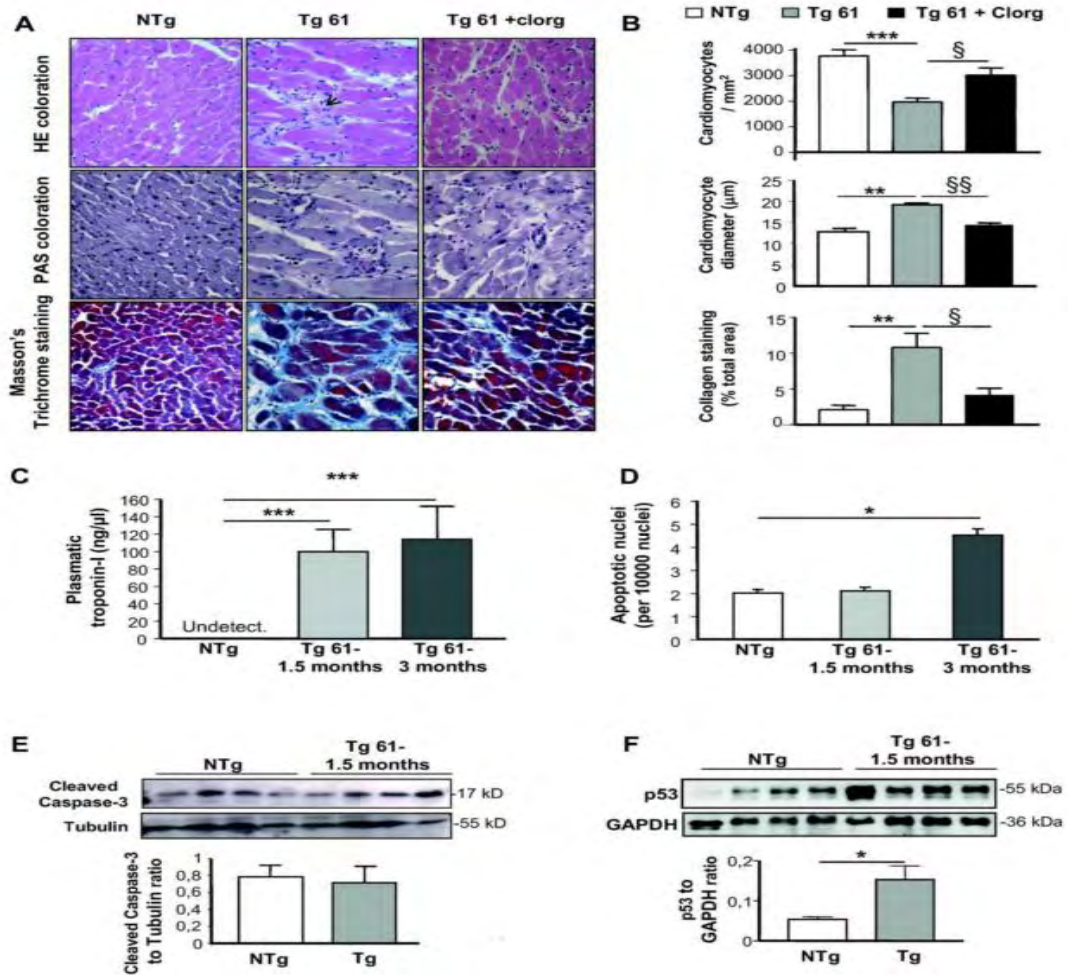


Figure 3 - Evidences of cell death in the hearts of MAO-A TG mice associated with reactive cellular hypertrophy and fibrosis. (A) Histological characterization (x 400) of ventricular pathology by hematoxylin-eosin (HE), periodic acid Schiff (PAS) and Green Masson's Trichrome staining in cardiac sections of NTG, TG 61 and clorgyline-treated TG 61 (TG 61+clorg) mice at 5 months. Arrow indicates necrotic area. (B) Quantification of cardiomyocyte number per mm², cardiomyocyte diameter and collagen content on cardiac sections (n=5). (C) Evaluation of troponin-I levels by ELISA in plasma from NTG and TG 61 mice at 1.5 and 3 months (n=4). (D) Quantification of TUNEL-positive apoptotic nuclei related to the total number of nuclei in cardiac sections from NTG and TG 61 mice at 1.5 and 3 months (n=4). (E) Activated caspase-3 and (F) p53 immunoblots on heart homogenates from NTG and TG 61 at 1.5 months. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, §p<0.01, §§p<0.001 vs indicated value).

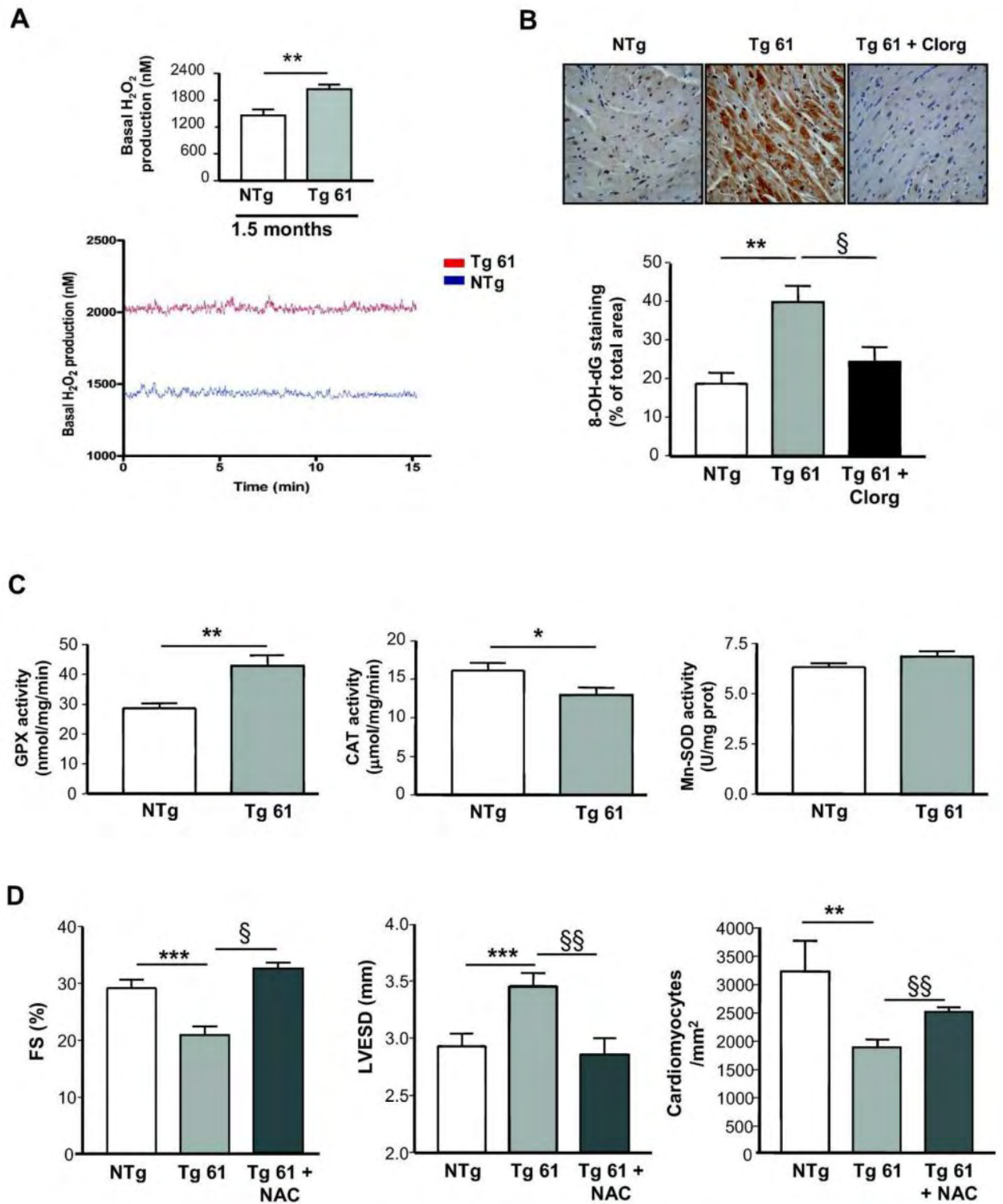


Figure 4 - Oxidative stress is increased in hearts from MAO-A overexpressing mice and participates in the development of dilated cardiomyopathy. **(A)** Real-time in situ measurements of H_2O_2 in ventricles from anesthetized Tg and NTG mice at 1.5 months. Histogram represents average H_2O_2 concentration from n=5 mice **(B)** 8-OH-dG immuno-histochemistry on cardiac sections from 5 month-old NTG, TG 61 and clorgyline-treated TG 61 (TG 61 + clorg) mice (x400). Quantification of 8-OH-dG staining was expressed as percent of total area (n=5). **(C)** Activity of anti-oxidant enzymes glutathion peroxidase (GPX), catalase (CAT) and superoxide dismutase (Mn-SOD) in ventricles from 3 month-old NTG and TG 61 mice (n=5-6). **(D)** Fractional shortening (FS), Left-Ventricular Systolic Diameter (LVESD) and cardiomyocyte number in 5 month-old NTG, TG 61 untreated and N-acetyl-cystein-treated TG 61 (TG61 + NAC) mice (n=6). (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, §p<0.05 §§p<0.01, §§§p<0.001 vs indicated value)

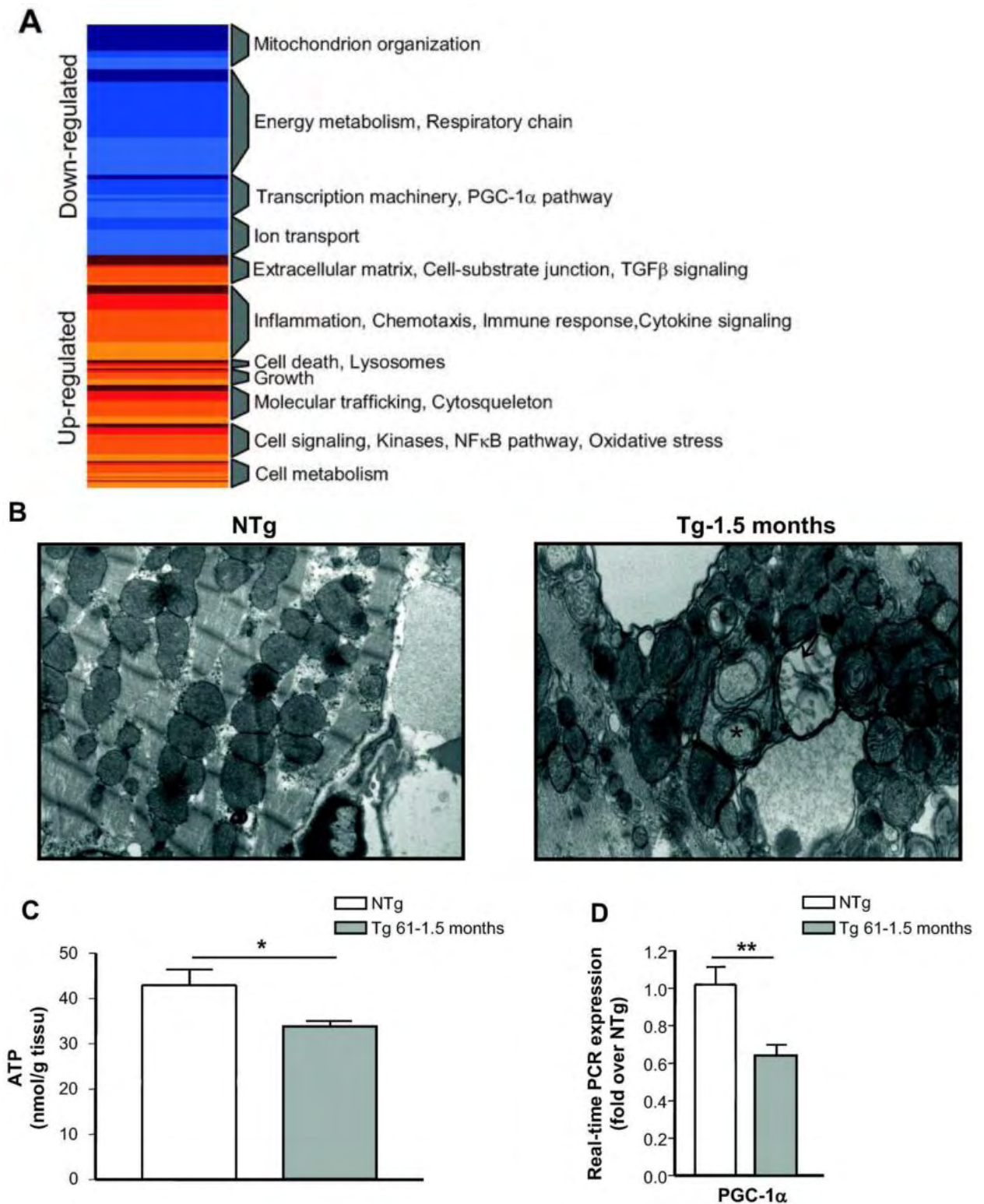


Figure 5 - MAO-A overexpression induces mitochondrial injury. (A) Geneset Enrichment Analysis for differentially expressed genes by microarray in TG compared to NTG mice (2 months). Common themes were defined among the various overlapping and unique gene sets. Blue blocks and red blocks represent highly enriched in category among the various downregulated or upregulated genes, respectively. (B) Representative electron micrographs of ventricles from 1.5 months old NTG and TG 61 mice (x 10000). Cardiomyocytes from TG mice show electron-lucent areas in mitochondrial matrix (arrows) or concentric cristae (asterisk). (C) ATP concentrations in ventricle homogenates at 1.5 months (n=4). (D) Real-time RT-PCR expression of PGC-1 α mRNA at 1.5 months (n=5). (*p<0.05, **p<0.01 vs indicated value).

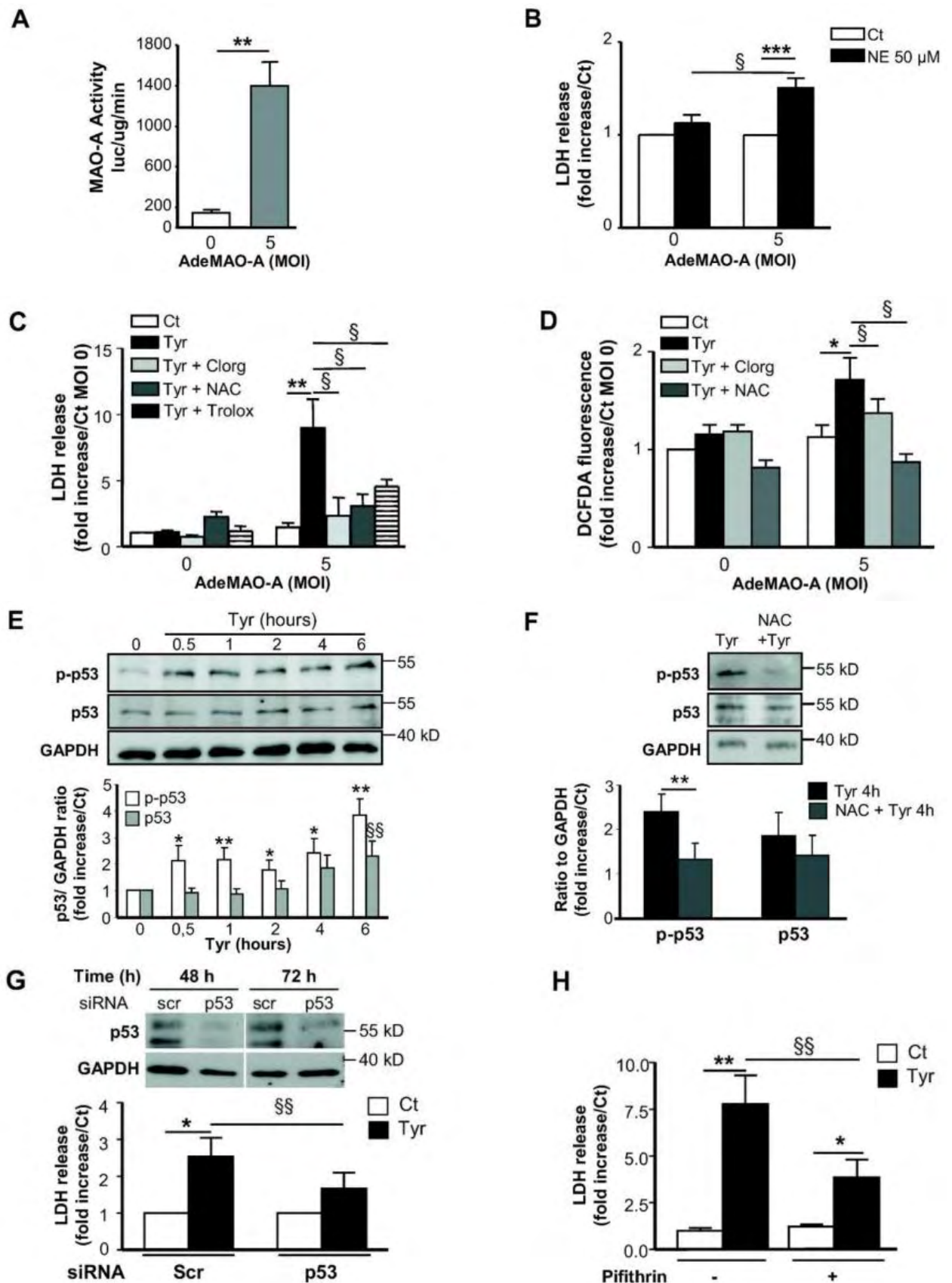


Figure 6 - p53 mediates MAO-A-dependent cardiomyocyte necrosis. (A, B, C and D), neonatal cardiomyocytes were untransduced (MOI 0) or transduced with AdeMAO-A at MOI 5. (A) Quantification of MAO-A activity by luminescence (n=3). (B), LDH release following treatment with 50 μ mol/L NE for 24 hours (n=8-9). (C), LDH release in response to 500 μ mol/L tyramine for 24 hours in the presence of 10 μ mol/L clorgyline (Tyr+clorg), 5 mmol/L NAC (Tyr+NAC) or 1 mmol/L Trolox (Tyr+Trolox), when indicated (n=4-5). (D), ROS generation with DCFDA probe in response to 500 μ mol/L tyramine for 2 hours in the presence of NAC (5 mmol/L) or clorgyline (10 μ mol/L), when indicated (n=9). (E), Analysis of total or phosphor(ser15)-p53 levels by immunoblot in AdeMAO-A-transduced neonatal cardiomyocytes (MOI 5) stimulated with 500

$\mu\text{mol/L}$ tyramine for the indicated time, **(E)** in the presence of NAC when indicated (n=3-5). GAPDH was used as a loading control. **(F)** LDH release in AdeMAO-A-transduced cardiomyocytes (MOI 5) transfected with Scr or p53 siRNA for 48 hours, and stimulated with 500 $\mu\text{mol/L}$ tyramine for 24 hours (n=7). Immunoblot illustrates silencing of p53 protein at 48 and 72 hours following siRNA transfection. **(G)** LDH release in AdeMAO-A-transduced cardiomyocytes (MOI 5) stimulated with 500 $\mu\text{mol/L}$ tyramine for 24 hours in the presence of 20 $\mu\text{mol/L}$ pifithrin, when indicated (n=6-8).

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, §p<0.05, §§p<0.01 vs indicated values or Ct.)

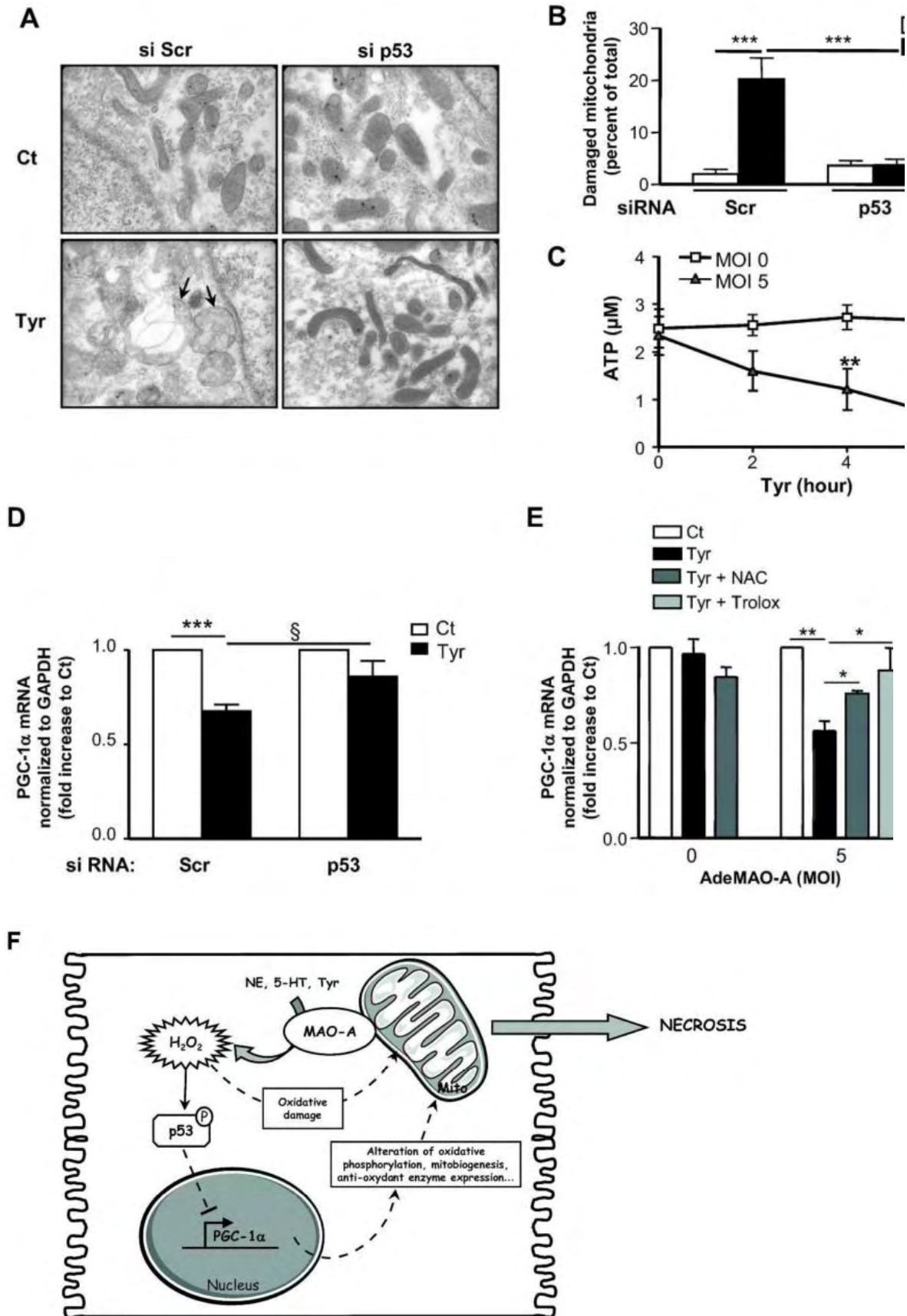


Figure 7 - p53 mediates mitochondrial injury and PGC-1 α repression induced by MAO-A activation in neonatal cardiomyocytes transduced with AdeMAO-A (MOI 5). (A) Representative electron micrographs of cardiomyocytes transfected with Scr or p53 siRNA and stimulated with tyramine for 4 hours (Tyr) (x35000). Tyramine-treated Scr-transfected cardiomyocytes display damaged mitochondria (arrows) which are quantified in (B). (C) Kinetics of ATP content in AdeMAO-A-transduced cardiomyocytes (MOI 5) treated with tyramine (n=3) compared to untransduced (MOI 0) cells. (D) PGC-1 α expression by real-time RT-PCR in cardiomyocytes transfected with Scr or p53 siRNA and stimulated with tyramine for 4 hours (n=8). (E) PGC-

1 α expression by real-time RT-PCR in untransduced or AdeMAO-A-transduced cardiomyocytes stimulated with tyramine for 4 hours in the presence of NAC (5 mmol/L) or Trolox (1 mmol/L) (n=4). (F) Schematic representation of MAO-A induced necrosis signalling pathway in cardiomyocytes. **p<0.01, ***p<0.001, §p<0.05 vs indicated values.

Supplemental legends

Supplemental Figure 1. Oxidative deamination of monoamines by the flavoenzyme MAO-A.

In a first step, binding of the monoamine to the enzyme (E) yields an aldehyde and ammonia by reduction of FAD cofactor. In a second step, the oxidized form of the prosthetic group is restored by the binding of oxygen and the concomitant production of hydrogen peroxide (H₂O₂). FAD, Flavin-Adenine-Dinucleotide.

Supplemental Figure 2. (A) MAO-A cardiac overexpression triggers mice premature death.

Kaplan-Meier analysis of death with aging in NTG (n=26), TG 61 (n=38) and TG 113 mice (n=17). **(B) MAO-A mRNA expression in TG 61 mice at different ages.** Expression was normalized to age-matched NTG mice (N=4).

Supplemental Figure 3. MAO-A transgenic line 113 develops dilated cardiomyopathy and heart failure with cardiomyocytes loss and compensative hypertrophy and fibrosis.

(A) Fractional Shortening (FS) and Left-Ventricular Diastolic Diameter (LVEDD) assessment by echocardiography in 2 months-old NTG or TG 113 mice (n=2-6). (**p<0.001 vs NTG). (B) Histological characterization (x 400) of ventricular pathology by hematoxylin-eosin (HE), periodic acid Schiff (PAS) and Masson's trichrome (green) staining in cardiac sections of NTG and TG 113 at 2 months. Arrow indicates necrotic area. (C) Quantification of cardiomyocyte number per total area (n=4), cardiomyocyte diameter (n=4) and collagen content on cardiac sections (n=4) (*p<0.05, **p<0.01 or ***p<0.001 vs NTG).

Supplemental Figure 4. Transcriptome analysis in MAO-A overexpressing mice at the ages of 1.5 and 3 months.

Expression of genes involved in inflammation (A), cardiac remodelling (B) and cardiac fibrosis (C). Expression of the gene of interest is normalized to the expression of 3 housekeeping genes and results

are expressed as fold over NTG mice (n=4). (*p<0.05 vs NTG). MCP1: Monocyte chemoattractant protein 1 (Ccl2), IL6: Interleukin 6, TNFa: Tumor necrosis factor α , α SKact: Squeletal α actin, α MHC: Myosin heavy chain α , β MHC: Myosin heavy chain β , ANP: Atrial natriuretic peptide, BNP: B-type natriuretic peptide, SERCA: sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase, Coll1a1: Collagen type I α 1, Col3a1: Collagen type III α 1, Fn1: Fibronectin 1, Mmp9: Matrix metalloprotease 9, Vim: Vimentin. (*p<0.05 vs NTG)

Supplemental Figure 5. Oxidative stress measurements in MAO-A TG mice and in neonatal cardiomyocytes. (A) 8-OH-dG immuno-histochemistry on cardiac sections from 1.5 month-old and 3 months-old NTG and TG 61 mice (x 400). Quantification of 8-OH-dG staining was expressed as

percent of total area (n=4). (B) GSH content in ventricle extracts from mice chronically treated for 5 months with vehicle or NAC (n=6). (C) GSH content in neonatal cardiomyocytes that overexpress MAO-A and treated with tyramine (500 μ mol/L) for 2 hours in the presence of NAC (5 mmol/L). (*p<0.05, ***p<0.001 vs indicated value; ns, non significant)

Supplemental Tables

Table 1: Up-regulated genes encoding mitochondrial proteins

Symbol	Protein name	Accession number	Fold over NTG	p value
TSPO	translocator protein (18kDa)	P222657	2,26	7,30E-09
HCLS1	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	P297679	2,22	5,70E-07
MTCH1	mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans)	P458242	2,19	1,13E-04
UCP2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	P297105	2,07	2,58E-05
CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide	P444628	1,99	6,30E-08
RAB32	RAB32, member RAS oncogene family	P293688	1,97	4,69E-08
SLC25A45	solute carrier family 25, member 45	349727	1,92	1,64E-07
GPRC5C	G protein-coupled receptor, family C, group 5,	P309988	1,85	4,54E-06
ASS1	argininosuccinate synthetase 1	P361165	1,85	1,77E-06
GPX1	glutathione peroxidase 1	P684378	1,78	1,59E-06
SLC25A1	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1	P350922	1,77	1,79E-06
GRN	granulin	P192800	1,75	3,94E-05
PISD	phosphatidylserine decarboxylase	P422338	1,69	3,28E-05
VARS	valyl-tRNA synthetase	P203501	1,69	1,12E-04
PRELID1	PRELI domain containing 1	P505337	1,67	3,15E-06
SARDH	sarcosine dehydrogenase	P492676	1,67	1,31E-04
CPT1C	carnitine palmitoyltransferase 1C	P269942	1,64	9,29E-07
RNASEL	ribonuclease L (2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent)	P377760	1,62	9,56E-07
PRDX4	peroxiredoxin 4	P200819	1,62	1,61E-06
HK1	hexokinase 1	P479599	1,60	2,66E-03
CKB	creatine kinase, brain	P425772	1,57	1,56E-03
SFXN1	sideroflexin 1	P418526	1,5	2,90E-07
PYCR1	pyrroline-5-carboxylate reductase 1	P503896	1,54	2,48E-05
TK2	thymidine kinase 2, mitochondrial	P310398	1,50	7,31E-05
CYB5R3	cytochrome b5 reductase 3	P153170	1,48	1,19E-03
CYBA	cytochrome b-245, alpha polypeptide	P131800	1,47	1,92E-03
SLC24A10	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier ;	P404904	1,43	1,39E-03

	dicarboxylate transporter) member 10			
STAR	steroidogenic acute regulatory protein	P274436	1,42	3,04E-04

Table 2: Down-regulated genes encoding mitochondrial proteins

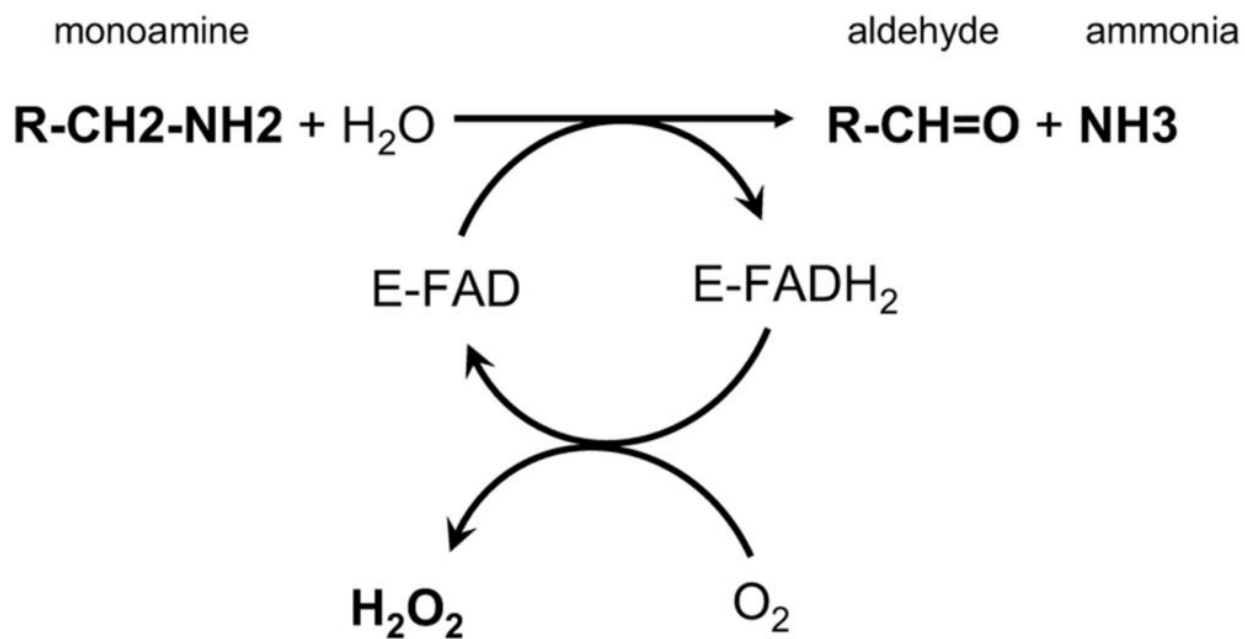
Symbol	Protein name	Accessio n number	Fold over NTG	p value
MRPS33	mitochondrial ribosomal protein S33	P342896	0,37	1,29E-06
LAP3	leucine aminopeptidase 3	P431662	0,38	8,45E-06
MRPS18C	mitochondrial ribosomal protein S18C	P108484	0,39	1,99E-07
MRPL1	mitochondrial ribosomal protein L1	P86073	0,39	7,22E-08
PITRM1	pitrilysin metalloproteinase 1	P474960	0,39	9,45E-07
PPM1K	protein phosphatase 1K (PP2C domain containing)	P265219	0,40	2,52E-07
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	P350453	0,40	8,20E-05
DBT	dihydrolipoamide branched chain transacylase E2	P569348	0,42	3,90E-08
SH3GLB1	SH3-domain GRB2-like endophilin B1	P32249	0,43	6,40E-0
MLYCD	malonyl-CoA decarboxylase	P222283	0,43	9,04E-09
MCEE	methylmalonyl CoA epimerase	P320481	0,43	2,07E-06
TFB2M	transcription factor B2, mitochondrial	P374499	0,45	1,52E-05
UCP3	uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)	P380379	0,45	1,25E-04
ND4L	NADH dehydrogenase, subunit 4L (complex I)	P245525	0,45	7,44E-05
MAOB	monoamine oxidase B	P302566	0,48	1,00E-05
COX16	cytochrome c oxidase assembly homolog (S. cerevisiae)	P404300	0,49	1,07E-06
ATP5F1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit B1	P106929	0,50	6,53E-04
MRPL47	mitochondrial ribosomal protein L47	P302291	0,50	7,80E-09
MRPS35	mitochondrial ribosomal protein S35	P110841	0,51	7,67E-09
CPOX	coproporphyrinogen oxidase	P257258	0,51	3,10E-05
HSDL2	hydroxysteroid dehydrogenase like 2	P281930	0,51	1,24E-07
MRPS25	mitochondrial ribosomal protein S25	P121325	0,51	2,63E-07
ACSS1	acyl-CoA synthetase short-chain family member1	P479321	0,51	1,67E-06
PINK1	PTEN induced putative kinase 1	P196605	0,51	7,29E-07
C5ORF33	chromosome 5 open reading frame 33	P243323	0,52	1,13E-06
DECR1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	P208555	0,52	1,57E-06
CHCHD3	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3	P526335	0,52	8,93E-04
MTFR1	mitochondrial fission regulator 1	P143002	0,55	9,63E-07
MRPS22	mitochondrial ribosomal protein S22	P362903	0,55	6,63E-06
SLC25A46	solute carrier family 25, member 46	P176711	0,55	1,14E-05
MRS2	magnesium homeostasis factor homolog (S. cerevisiae)	P618187	0,55	5,91E-06
AUH	AU RNA binding protein/enoyl-Coenzyme A hydratase	P372473	0,55	9,13E-07

NDUFB11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11, 17.3kDa	P205573	0,55	5,04E-05
DARS2	aspartyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	P102559	0,55	1,06E-08
SLC25A36	solute carrier family 25, member 36	P124121	0,56	1,83E-04
PDHA1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	P581435	0,56	6,01E-06
COQ7	coenzyme Q7 homolog, ubiquinone (yeast)	P161691	0,56	1,39E-07
NNT	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	P113395	0,56	4,98E-06
MARCH5	membrane-associated ring finger (C3HC4) 5	P405668	0,56	2,00E-07
COX7A2	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (liver)	P319031	0,56	2,50E-05
NDUFA6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6, 14kDa	P217474	0,57	2,89E-07
PDHX	pyruvate dehydrogenase complex, component X	P149946	0,57	1,34E-04
MFN1	mitofusin 1	P2732	0,57	5,50E-08
ADH5	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	P404275	0,57	3,60E-06
YARS2	tyrosyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	P373609	0,58	4,37E-07
MUT	methylmalonyl Coenzyme A mutase	P633163	0,58	7,62E-06
MRPS21	mitochondrial ribosomal protein S21	P509012	0,58	1,96E-06
NDUFS6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6, 13kDa (NADH-coenzyme Q reductase) solute carrier family 25 (mitochondrial carrier	P335077	0,58	4,48E-08
SLC25A11	oxoglutarate carrier), member 11 translocase of outer mitochondrial membrane 7	P267454	0,58	7,32E-06
TOMM7	homolog (yeast)	P206547	0,58	5,44E-05
COX15	homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	P354744	0,58	6,47E-04
TTIMM8A	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A (yeast)	P373043	0,59	4,87E-07
DUT	deoxyuridine triphosphatase	P480360	0,59	8,03E-04
LYPLA1	lysophospholipase I	P8227	0,59	3,20E-05
MRPL22	mitochondrial ribosomal protein L22	P322994	0,59	9,60E-07
CLPX	ClpX caseinolytic peptidase X homolog (E. coli)	P304683	0,59	3,40E-05
MTERFD3	MTERF domain containing 3	P202623	0,60	2,05E-05
NDUFA8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8, 19kDa	P475501	0,60	3,78E-03
PHB	prohibitin	P165934	0,60	6,26E-06
KIAA0564	KIAA0564	P221144	0,60	1,07E-04
SUCLA2	succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit	P111554	0,60	5,00E-05
FECH	ferrochelatase (protoporphyrin)	P266763	0,60	2,51E-04
NDUFA12	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12	P458540	0,60	1,73E-04
COX7B	cytochrome c oxidase subunit VIIb	P160664	0,61	1,11E-05
MRPL19	mitochondrial ribosomal protein L19	P604526	0,61	4,45E-07
ADHFE1	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1	P116264	0,61	1,08E-04
UQCRH	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	P350301	0,61	4,20E-05
ATPG3	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C3	P294849	0,61	5,88E-06

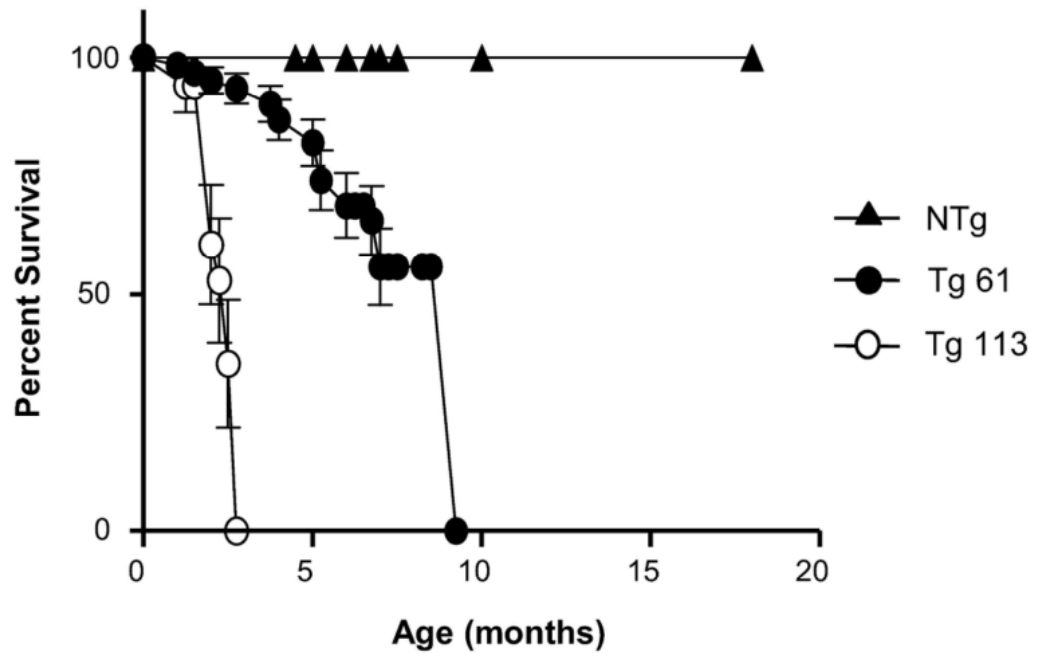
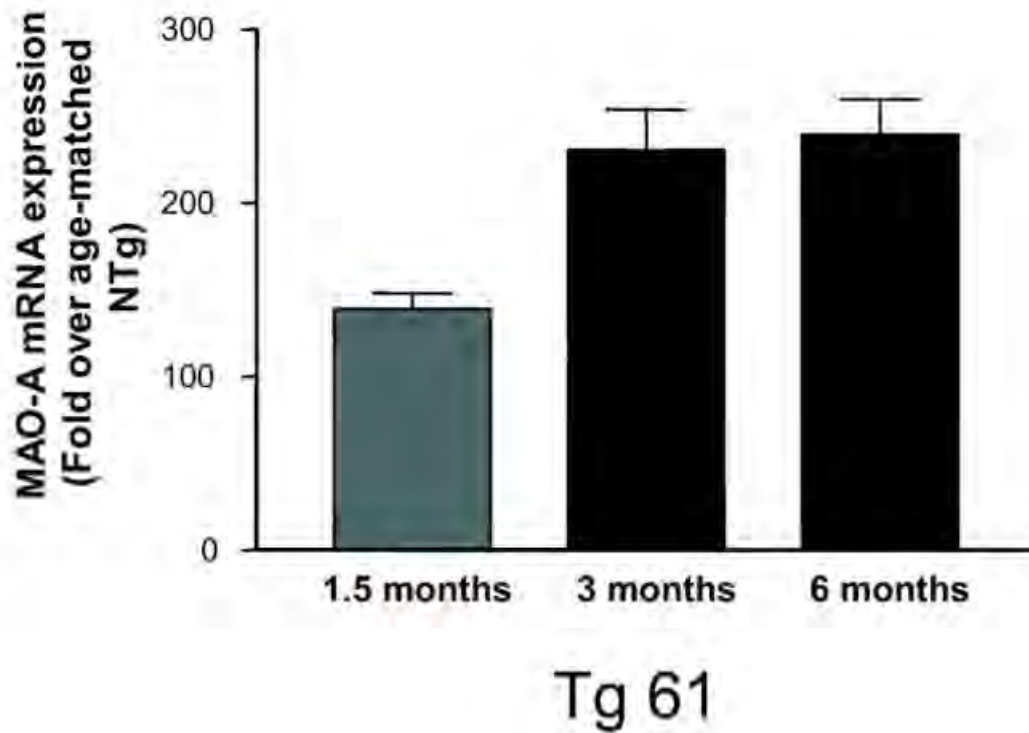
	(subunit 9)			
MTERFD1	MTERF domain containing 1	P507204	0,62	3,94E-04
SYNJ2BP	synaptojanin 2 binding protein	P662001	0,62	5,12E-04
ACOT2	acyl-CoA thioesterase 2	P525183	0,62	2,53E-04
SLC25A37	solute carrier family 25, member 37	P343429	0,62	4,87E-04
ATP5S	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F ₀ complex, subunit s (factor B)	P195798	0,62	1,28E-06
RAB11FIP5	RAB11 family interacting protein 5 (class I)	P529360	0,62	2,83E-05
OXCT1	3-oxoacid CoA transferase 1 succinate dehydrogenase complex, subunit A flavoprotein (Fp)	P107321	0,62	7,76E-07
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	P458708	0,62	3,51E-03
COX7A2L	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like	P434803	0,62	2,19E-06
L2HGDH	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase	P221132	0,62	2,57E-05
ETFDH	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	P161574	0,62	2,21E-04
SLC25A26	solute carrier family 25, member 26	P71544	0,62	1,35E-06
TOMM20	translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast)	P310930	0,62	1,82E-07
C18ORF55	chromosome 18 open reading frame 55	P395842	0,62	5,85E-06
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	P480709	0,63	1,65E-03
ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	P496432	0,63	9,37E-05
PTPMT1	protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1	P226341	0,63	4,09E-08
SLC25A16	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; Graves disease autoantigen), member 16	P458870	0,63	6,08E-06
MRPL50	mitochondrial ribosomal protein L50	P112677	0,63	2,35E-05
DLAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase	P265106	0,63	2,05E-05
MCAT	malonyl CoA:ACP acyltransferase (mitochondrial)	P314855	0,63	3,36E-05
AFG3L1	AFG3 ATPase family gene 3-like 1 (S. cerevisiae)	P598714	0,64	4,11E-04
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	P489903	0,64	2,16E-03
ACSL6	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	P380699	0,64	9,22E-04
SSBP1	single-stranded DNA binding protein 1	P289685	0,64	4,11E-05
PPICC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform	P519508	0,65	1,08E-04
NDUFV3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3, 10kDa	P170054	0,65	9,40E-06
OXSM	3-oxoacyl-ACP synthase, mitochondrial	P312748	0,65	2,31E-05
SLC25A12	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Aralar), member 12	P1196751	0,65	1,32E-03
MTRF1L	mitochondrial translational release factor 1-like	P397548	0,65	2,98E-08

MRPL40	mitochondrial ribosomal protein L40	P420627	0,65	4,15E-05
REEP1	receptor accessory protein 1	P508341	0,66	2,29E-06
SUOX	sulfite oxidase	P249360	0,66	1,20E-04
IMP1	inner mitochondrial membrane peptidase-like (<i>S. cerevisiae</i>)	P3754	0,66	1,30E-04
PACS2	phosphofurin acidic cluster sorting protein 2	P439520	0,66	6,59E-07
MTIF2	mitochondrial translational initiation factor 2	P455597	0,66	3,67E-05
TOMM22	translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	P105339	0,66	1,86E-06
COX11	COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	P214319	0,66	3,00E-06
MRPL18	mitochondrial ribosomal protein L18	P210474	0,66	1,09E-03
CPT1B	carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle)	P232913	0,66	2,28E-04
MCCC1	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha)	P282975	0,66	3,81E-05
ACOT13	acyl-CoA thioesterase 13	P502422	0,67	8,22E-06
ATP5B	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	P328078	0,67	2,13E-04
NDUFA4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa	P552832	0,67	1,53E-05
CAPRIN2	caprin family member 2	P204944	0,67	4,57E-05
MMADHC	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblD type, with homocystinuria	P236721	0,67	2,31E-04
ABCD3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	P394395	0,67	1,54E-05
USMG5	up-regulated during skeletal muscle growth 5 homolog (mouse)	P181365	0,68	3,78E-03
C2ORF56	chromosome 2 open reading frame 56	P180826	0,68	6,56E-07
ECSIT	ECSIT homolog (<i>Drosophila</i>)	P348548	0,68	3,94E-05
MRPL32	mitochondrial ribosomal protein L32	P141818	0,68	2,28E-04
BCAT2	branched chain aminotransferase 2, mitochondrial	P448266	0,68	3,65E-05
ECHDC3	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3	P475378	0,68	1,14E-03
RNASET2	ribonuclease T2	P477019	0,68	8,88E-06
SLC25A33	solute carrier family 25, member 33	P156434	0,68	1,86E-03
SDHD	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	P260871	0,69	1,31E-05
MRPS31	mitochondrial ribosomal protein S31	P319732	0,69	2,80E-05
NDUFS8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8, 23kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	P247441	0,69	6,35E-04
TUSC3	tumor suppressor candidate 3	P515347	0,69	1,32E-03
PARL	presenilin associated, rhomboid-like pyruvate dehydrogenase phosphatase	P247943	0,69	5,87E-05
PDPR	regulatory subunit ATP-binding cassette, sub-family E (OABP)	P137829	0,69	4,66E-04
ABCE1	member 1 cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 2	P332822	0,69	9,62E-06
COX6B2	(testis)	P300506	0,69	3,58E-04
ACN9	ACN9 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) RNA (guanine-9-) methyltransferase domain	P376337	0,70	6,36E-04
RG9MTD1	containing 1	P301994	0,70	1,88E-04

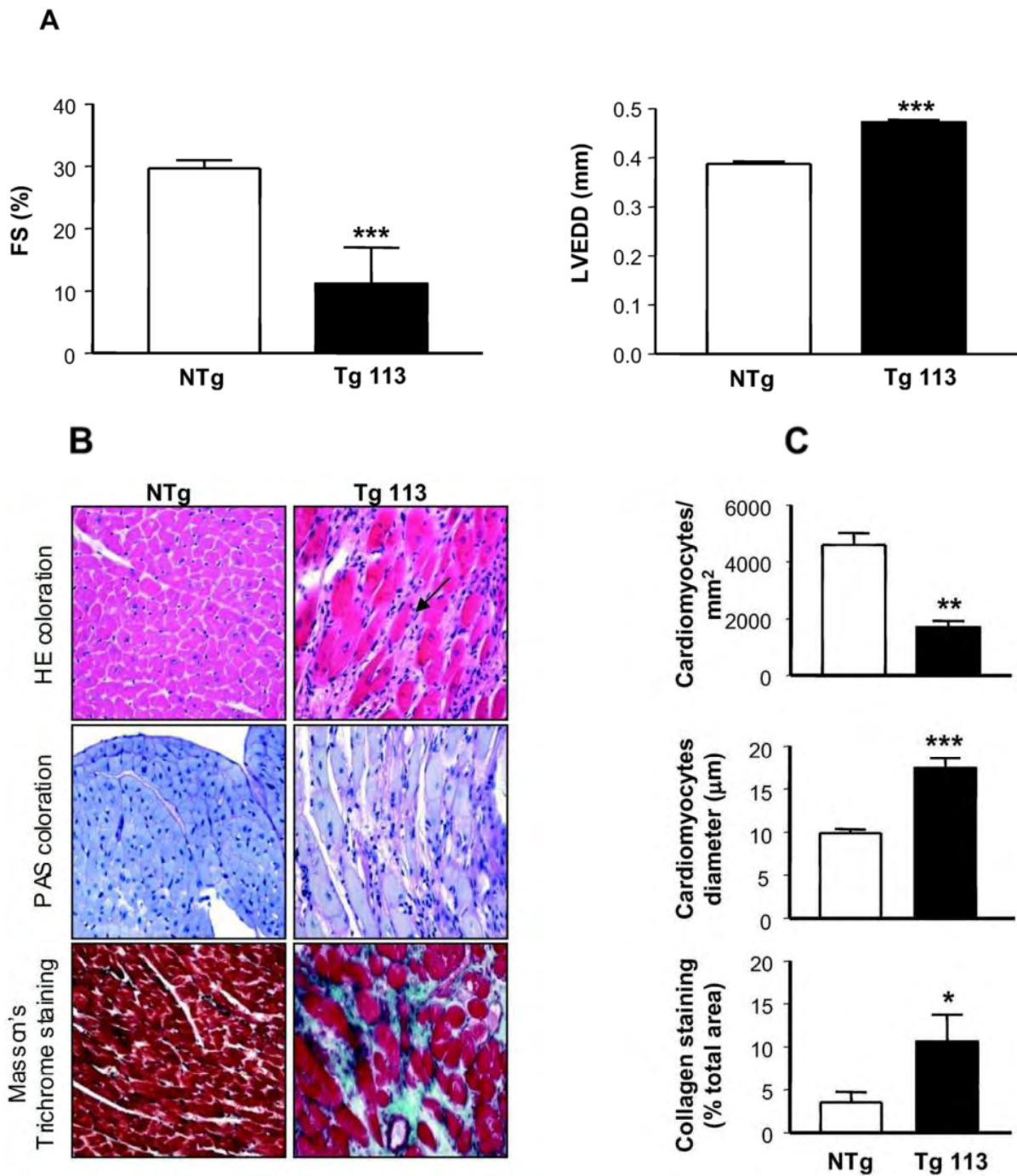
OXA1L	oxidase (cytochrome c) assembly 1-like	p531829	0,70	3,27E-04
MRPL49	mitochondrial ribosomal protein L49	P261351	0,70	4,52E-06
MTCP1	mature T-cell proliferation 1	P452280	0,70	6,41E-05
TOMM40	translocase of outer mitochondrial			
L	membrane 40 homolog (yeast)-like	P86003	0,70	2,06E-04
MRPL42	mitochondrial ribosomal protein L42	P40367	0,71	1,11E-03
GLRX2	glutaredoxin 2	P514107	0,71	8,98E-04



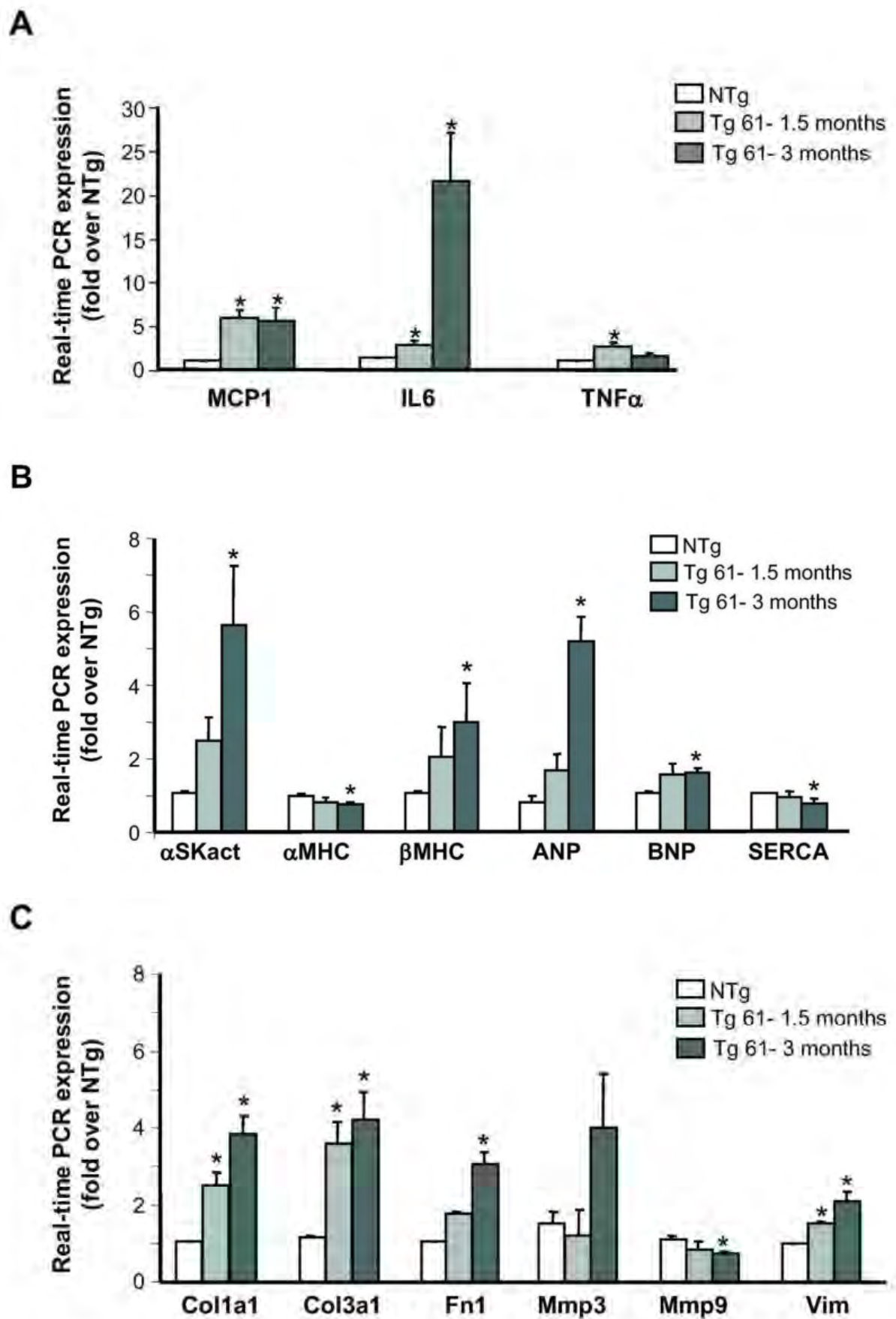
Supplemental figure 1 Oxidative deamination of monoamines by the flavoenzyme MAO-A. In a first step, binding of the monoamine to the enzyme (E) yields an aldehyde and ammonia by reduction of FAD cofactor. In a second step, the oxidized form of the prosthetic group is restored by the binding of oxygen and the concomitant production of hydrogen peroxide (H_2O_2). FAD, Flavin-Adenine-Dinucleotide

A**B**

Supplemental figure 2 : (A) MAO-A cardiac overexpression triggers mice premature death Kaplan-Meier analysis of death with aging in NTG (n=26), TG 61 (n=38) and TG 113 mice (n=17). (B) MAO-A mRNA expression in TG 61 mice at different ages. Expression was normalized to age-matched NTG mice



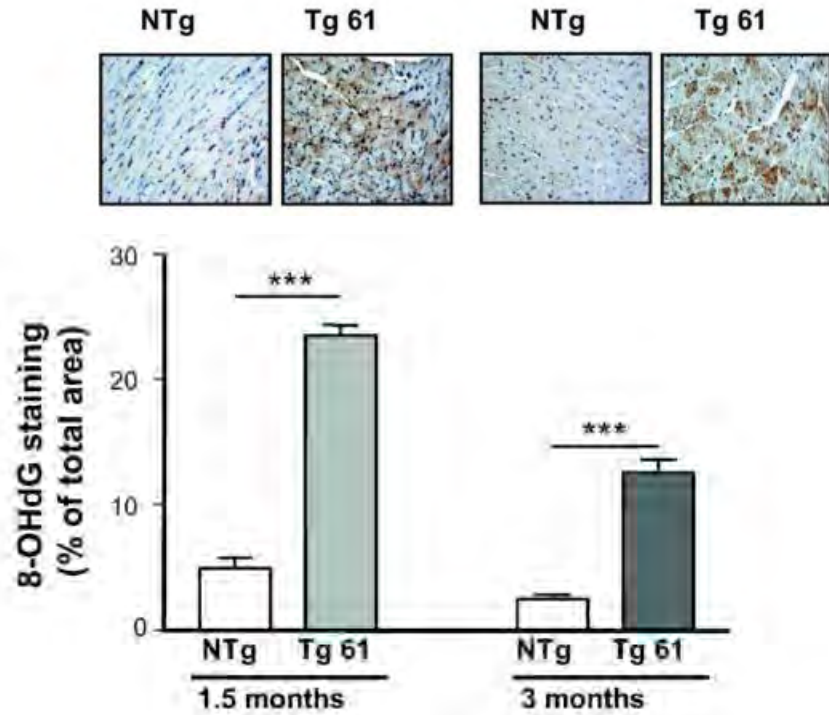
Supplemental figure 3 : MAO-A transgenic line 113 develops dilated cardiomyopathy and heart failure with cardiomyocytes loss and compensative hypertrophy and fibrosis. (A) Fractional Shortening (FS) and Left-Ventricular Diastolic Diameter (LVEDD) assessment by echocardiography in 2 months-old NTG or TG 113 mice (n=2-6). (***) $p < 0.001$ vs NTG). **(B)** Histological characterization (x 400) of ventricular pathology by hematoxylin-eosin (HE), periodic acid Schiff (PAS) and Masson's trichrome (green) staining in cardiac sections of NTG and TG 113 at 2 months. Arrow indicates necrotic area. **(C)** Quantification of cardiomyocyte number per total area (n=4), cardiomyocyte diameter (n=4) and collagen content on cardiac sections (n=4) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ vs NTG).



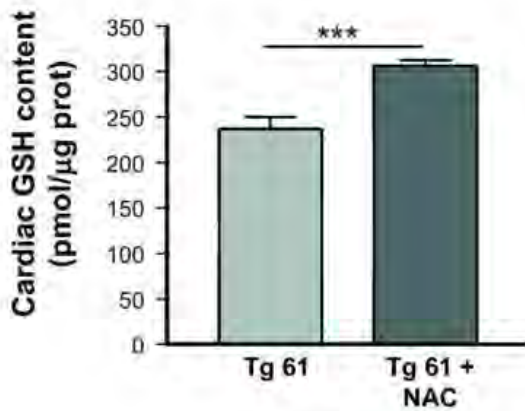
Supplemental figure 4 : Transcriptome analysis in MAO-A overexpressing mice at the ages of 1.5 and 3 months. Expression of genes involved in inflammation (**A**), cardiac remodelling (**B**) and cardiac fibrosis (**C**). Expression of the gene of interest is normalized to the expression of 3 housekeeping genes and results are expressed as fold over NTG mice (n=4). (*p<0.05 vs NTG).

MCP1: Monocyte chemoattractant protein 1 (Ccl2), IL6: Interleukin 6, TNF α : Tumor necrosis factor α , α SAct: Squeletal alpha actin, α MHC: Myosin heavy chain alpha, β MHC: Myosin heavy chain beta, ANP: Atrial natriuretic peptide, BNP: B-type natriuretic peptide, SERCA: sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase, Col1a1: Collagen type I alpha 1, Col3a1: Collagen type III alpha 1, Fn1: Fibronectin 1, Mmp9: Matrix metalloprotease 9, Vim: Vimentin. (* $p < 0.05$ vs NTG)

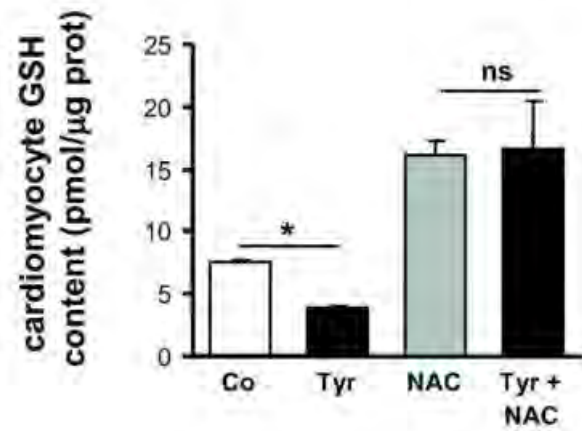
A



B



C



Supplemental figure 5 : Oxidative stress measurements in MAO-A TG mice and in neonatal cardiomyocytes. (A) 8-OH-dG immuno-histochemistry on cardiac sections from 1.5 month-old and 3 months-old NTG and TG 61 mice (x 400). Quantification of 8-OH-dG staining was expressed as percent of total area (n=4). (B) GSH content in ventricle extracts from mice chronically treated for 5 months with vehicle or NAC (n=6). (C) GSH content in neonatal cardiomyocytes that overexpress MAO-A and treated with tyramine (500 μmol/L) for 2 hours in the presence of NAC (5 mmol/L). (*p<0.05, ***p<0.001 vs indicated value; ns, non significant)

V.B CONCLUSION

Nos travaux démontrent, pour la première fois, que l'augmentation chronique de la MAO-A dans le cardiomyocyte adulte, en dehors de toute pathologie, aboutit à l'IC. Elle s'accompagne de dommages oxydatifs notamment mitochondriaux, d'une dysfonction mitochondriale et de la mort par nécrose des cardiomyocytes.

Notre approche in vitro a permis de mettre en évidence que cette mort cellulaire était médiée par p53 et que son inhibition prévenait les dommages mitochondriaux. De plus, nous avons montré que, lors de la surexpression de la MAO-A, p53 était un répresseur de l'expression de PGC1 α , protéine fortement impliquée dans la biogenèse mitochondriale.

Antioxidants & Redox Signaling

Antioxidants & Redox Signaling: <http://mc.manuscriptcentral.com/liebert/ARS>

p53-PGC-1alpha pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice.

Journal:	<i>Antioxidants & Redox Signaling</i>
Manuscript ID:	ARS-2011-4373.R1
Manuscript Type:	Original Research Communication
Date Submitted by the Author:	16-Jan-2012
Complete List of Authors:	Villeneuve, Christelle; I2MC, cardiac remodelling Guilbeau-Frugier, Céline; I2MC, cardiac remodelling Lairez, Olivier; I2MC, cardiac remodelling Ordener, Catherine; I2MC, cardiac remodelling Duparc, Thibaut; INSERM U858, I2MR De Paulis, Damien; INSERM U886, Couderc, Bettina; Institut Claudius Regaud, Spreux-Varoquaux, Odile; Université Versailles, Tortosa, Florence; I2MC, cardiac remodelling Garnier, Anne; INSERM U769, Knauf, Claude; INSERM U858, I2MR Valet, Philippe; INSERM U858, I2MR Langin, Dominique; INSERM U858, I2MR Borchi, Elisabetta; University of Florence, Department of Biochemical Sciences Nediani, Chiara; University of Florence, Department of Biochemical Sciences gharib, abdallah; INSERM U886, Ovize, Michel; INSERM U886, ; Hospices Civils de Lyon, CIC Delisle, Marie-Bernadette; I2MC, cardiac remodelling Parini, Angelo; INSERM U858, Mialet-Perez, Jeanne; INSERM, I2MC
Keyword:	Cardiovascular, Cell Survival and Death, Free Radicals, Mitochondria

SCHOLARONE™
Manuscripts

VI SECONDE ÉTUDE

VI.A AVANT PROPOS

Cette première étude a confirmé l'implication d'une augmentation de la MAO-A dans le remodelage ventriculaire au cours de l'IC. Elle a montré, pour la première fois, que le rôle de la MAO-A dans la mort des cardiomyocytes et dans les dommages mitochondriaux était médié par p53 qui agit comme un répresseur de l'expression de PGC1 α . Récemment, il a été montré que la répression de l'expression de PGC1 α par p53 pouvait être un axe important et précoce de la sénescence, qu'il serait à l'origine de la dysfonction mitochondriale. Il également été proposé que l'augmentation de la production de ROS par la mitochondrie défectueuse serait une conséquence de la diminution de l'expression de PGC1 α [436]. Au cours du vieillissement l'activité de la MAO-A cardiaque augmente de façon drastique. Nous avons donc cherché à savoir si cette enzyme pouvait être un acteur de la dysfonction et des dommages mitochondriaux observés au cours de la sénescence. Nous nous sommes donc intéressée aux dommages mitochondriaux au cours de la sénescence mais aussi à la dynamique mitochondriale, facteur peu étudié dans la littérature, mais semblant néanmoins influencé par PGC1 α et modifié au cours de la sénescence [437].

VI.B INTRODUCTION

La sénescence cellulaire est un acteur important de la diminution de la fonction tissulaire. Elle s'accompagne d'un arrêt définitif de la croissance cellulaire appelé sénescence répllicative. Ce processus identifié dans les cellules de nombreuses espèces peut être fortement accéléré si la cellule est exposée à un stress oxydatif ou génotoxique. Or, comme précédemment décrit, la sénescence s'accompagne d'une augmentation de la production de ROS et d'une accumulation de dommages oxydatifs à l'origine de la théorie du vieillissement par les ROS [336, 337].

Dans le cœur, la sénescence est complexe et encore mal connue, car le cardiomyocyte est une cellule à différenciation terminale. Il semble que l'augmentation du stress oxydant, au cours du temps, engendre un stress génotoxique qui entraîne l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire comme p16, p53, p21 ou encore p27 [368-370]. On ignore encore la

fonction de ces inhibiteurs dans le cardiomyocyte et leur implication dans le phénotype sénescence.

Comme précédemment exposé, il existe au cours de la sénescence une altération de la fonction mitochondriale à l'origine de la production de ROS par la mitochondrie, mais également d'anomalies métaboliques avec une diminution de la production d'ATP ainsi que des modifications de la dynamique mitochondriale [381-383]. En effet, l'âge compromet la plasticité mitochondriale en perturbant la balance fusion/fission et entraîne des modifications morphologiques de la mitochondrie (Figure 15). La dynamique mitochondriale au cours de la sénescence a surtout été étudiée sur les fibroblastes et les cellules endothéliales [438]. Il est admis que le phénotype sénescence s'accompagne, dans ces cellules, d'une accumulation de volumineuses mitochondries (possiblement mal prises en charge par les mécanismes d'autophagie). De plus, ces mitochondries seraient défectueuses, avec un potentiel de membrane faible [439]. Dans le fibroblaste, la surexpression de Fis 1 retarde l'apparition du phénotype sénescence et maintient les cellules dans un statut prolifératif tandis qu'à l'inverse, le blocage de la fission accélère ce phénotype et s'accompagne d'une augmentation de la production de ROS [440, 441]. D'une manière générale, dans le cœur, la dynamique mitochondriale au cours de la sénescence est complexe et mal connue. Dans les cultures de cardiomyocytes nouveau-nés de rats, de volumineuses mitochondries peuvent être observées [442, 443]. Mais il paraît difficile de comparer des cellules en sénescence répliquative avec des cardiomyocytes adultes en différenciation terminale. Il en est de même pour les cardiomyocytes de rats nouveau-nés dont les mitochondries forment un réseau homogène alors que dans les cardiomyocytes adultes, elles se répartissent dans les compartiments interfibrillaires et sous-sarcolemnaux, ce qui rend leur mobilité différente. Cette constatation ne signifie pas que les mitochondries y sont moins dynamiques, au contraire, c'est dans le cœur adulte que la quantité de protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale est la plus grande, par rapport aux autres tissus de l'organisme [444].

Au cours du vieillissement, le déclin du renouvellement (turnover) mitochondrial et/ou la diminution de sa dégradation semblent être des facteurs cruciaux [445]. La plasticité et la capacité de biogenèse de la mitochondrie diminuent avec l'âge et ce phénomène pourrait être lié au stress oxydant. En effet, la production de ROS au cours de la sénescence entraîne le déclin de l'expression de PGC1 α [446, 447]. Or PGC1 α joue un rôle dans la régulation des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras [448]. Dans le muscle strié périphérique, il a clairement été mis en évidence que PGC1 α régule positivement la fusion (via Mfn2). La forte diminution de l'expression PGC1 α dans les pathologies musculaires avec atrophie pourrait expliquer la perturbation de la balance

fusion/fission mitochondriale [449-451]. Dans le cœur, tous les modèles-animaux avec diminution d'expression de PGC1 α au cours de la sénescence s'associent à des pathologies cardiaques.

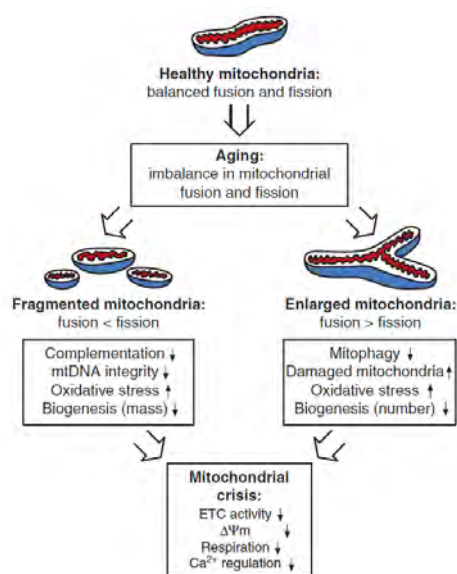


Figure 15 : Représentation schématique de l'influence de la dynamique mitochondriale au cours du vieillissement.

L'âge compromet la plasticité mitochondriale en perturbant la balance fusion/fission et entraîne des modifications morphologiques de la mitochondrie. La présence de mitochondries fragmentées peut compromettre l'intégrité de l'ADNmt, la structure et la fonction de la mitochondrie, l'ensemble pouvant aboutir à la dysfonction mitochondriale. À l'inverse, la fusion peut diminuer le renouvellement mitochondrial en gênant l'autophagocytose, entraînant l'accumulation de mitochondrie. L'âge en perturbant la dynamique mitochondriale est une cause de dysfonction de la mitochondrie et augmente la susceptibilité de la cellule à la mort. Tiré de Seo et al. 2010 [452].

Les études que nous avons effectuées sur les souris TG surexprimant la MAO-A ont montré que cette augmentation d'expression de la MAO-A était associée à des modifications intracellulaires, notamment l'augmentation de p53 et la diminution de PGC1 α et une souffrance mitochondriale, évènement parfois présent au cours du vieillissement cellulaire. L'objectif de cette seconde étude est de déterminer si la MAO-A est impliquée dans la sénescence intrinsèque du myocarde et son influence sur la dynamique mitochondriale.

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une approche in vivo, et étudié en parallèle le modèle de souris TG sur-exprimant la MAO-A et un modèle de souris KO pour le gène de la MAO-A. Nous les avons comparés à des souris sauvages âgées. Les modifications mitochondriales au cours de la sénescence étant proches de celles observées au cours de l'IC, pathologie présentée par les souris TG, nous avons dans un second temps

étudié le rat âgé, modèle physiologique de surexpression de la MAO-A au cours du temps sans IC.

VI.C MATRIELS ET METHODES

VI.C.1 ANIMAUX

Les souris TG-MAO-A : ce modèle de souris TG correspond au modèle précédemment décrit dans la première partie. Il a été obtenu à partir du cDNA de rat codant pour la MAO-A (pSK-MAO-A [453] genbank accession number NM_033653 ; Akio Ito Kyushu University, Fukuoka, Japan), couplé au promoteur de l' α -MHC de souris. Le plasmide recombinant a été injecté dans un embryon de souris C57BL6/J (Institut Clinique de la Souris, Strasbourg, France). Pour le traitement par la clorgyline, les souris ont reçu 10 mg/kg/j per os à partir de l'âge de 3 semaines jusqu'à 23 semaines.

Les souris TG-délétées pour le gène de la MAO-A : ce modèle de souris a été obtenu par une insertion délétion au niveau du locus de la MAO-A de l'ADN d'une cellule embryonnaire de souris C3H/HeOuj [454] (CDTA-CNRS, Orléans). Elles sont âgées de 3 mois (young) et 2 ans (old).

Les souris wild type : les souris étaient des souris C57BL6/après 3 mois (young) et 2 ans (old).

Les rats : les rats étudiés étaient de race Sprague-Dawley adultes, de 3 mois, 12 mois et 2 ans.

VI.C.2 CARDIOMYOCYTES ISOLEES

Les cardiomyocytes ont été isolés à partir de cœur de rats adultes de race Sprague-Dawley âgés de 6 mois.

VI.C.3 MICROSCOPIE

Les ventricules des différents modèles de souris et de rats ont été fixés dans une solution de Carnoy (Ethanol 60%, chloroforme 30%, acide acétique 10%). Ils ont été inclus

en paraffine après section transversale. Des coupes de 5µm ont été réalisées puis colorées par l'H&E, le trichrome de Masson et le PAS (Periodic Acid Schiff).

VI.C.4 IMMUNOHISTOCHIMIE AVEC L'ANTICORPS ANTI-8-OXO-DG

L'immunohistochimie a été réalisée sur coupes en paraffine. Les coupes de 5µm, ont été déparaffinées par des bains de xylène et d'alcool de concentration décroissante puis réhydratées à l'eau distillée. Pour le démasquage antigénique nous avons plongé les lames dans une solution de citrate (15 ml de solution 1M de citrate de sodium et 15 ml d'acide citrique à 1 M dans l'eau distillée, pH 6.0) à 97°C pendant 40 minutes, puis nous les avons laissé refroidir pendant 20 minutes dans cette même solution, à température ambiante. Les lames ont été lavées à l'eau distillée pendant 5 minutes. Pour le blocage des peroxydases endogènes nous avons utilisé de l'eau oxygénée à 30% pendant 10 minutes. Après rinçage pendant 5 minutes à l'eau distillée, le marquage non spécifique a été bloqué par une solution de TBS-Tween et BSA pendant 10 minutes à température ambiante. L'anticorps monoclonal de souris anti-8-oxo-dG a été dilué au 1:200 et incubé pendant 2 heures à 37°C en chambre humide. Les lames ont été lavées dans une solution de TBS-Tween puis l'anticorps secondaire dilué au 1:100 a été incubé pendant 30 minutes à température ambiante. Les lames ont été lavées puis incubées avec de la DAB diluée au 1:50 dans du substrate buffer pendant 5 minutes puis contrecolorées dans une solution d'hématoxyline de Mayer diluée au 1:4 pendant 20 secondes. Les lames ont été ensuite réhydratées.

VI.C.5 MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Les ventricules gauches de souris et de rats ont été coupés en cubes de 1 mm² et fixés dans un mélange de paraformaldéhyde/ glutaraldéhyde à 1 % puis post-fixés par du tetroxide d'osmium à 1% dans une solution tampon de cacodylate à 0,1M pendant une heure. Ils ont été inclus dans une résine méthacrylique puis 4 à 8 coupes semi-fines de 1 µm ont été réalisées pour chaque fragment de myocarde et colorées au bleu de toluidine. Puis les blocs ont fait l'objet de coupes ultrafines (600 Å) qui ont été contrastées à l'acétate d'uranyl 4% pendant 12 heures à 4°C. Les coupes ont ensuite été déshydratées dans des bains successifs d'éthanol (de 50% à 100%), puis incluses dans une résine époxy Des coupes ultrafines (60-80nm) ont été montées sur des grilles et l'observation a été faite sur un microscope électronique à transmission Hitashi HU12A (plateforme CMEAB).

VI.C.6 HISTOMORPHOMETRIE

Les techniques d'analyses histomorphométriques ont été réalisées grâce au logiciel d'analyses morphométriques Nis-element, Nikon. Les lames ont été préalablement scannées par le scanner de lames Hamamatsu 2.RS.

Quantification de la fibrose : elle a été évaluée à partir des lames colorées par le trichrome de Masson et exprimée en pourcentage de fibrose par rapport à la surface totale de la coupe.

Mesure des cardiomyocytes : le diamètre des cardiomyocytes a été mesuré à partir des coupes colorées par le PAS. Le diamètre des cardiomyocytes a été mesuré manuellement sur environ 200 cellules par coupe de ventricule gauche et par animal.

Le compte cellulaire a été compté manuellement à partir des coupes colorées par le PAS, sur trois champs consécutifs à (GX400) et exprimé en nombre de cellules par mm².

Le marquage du 8-oxo-dG a été évalué en quantifiant la surface marquée positivement et exprimée en pourcentage de la surface totale de la coupe.

La taille des mitochondries a été mesurée à partir de photographies numériques réalisées au cours de l'observation en microscopie électronique à transmission. L'aire des mitochondries exprimée en pixel² a été prise en compte. Environ 100 mitochondries ont été mesurées par animal.

Le nombre de mitochondries a été compté manuellement à partir des photographies précédentes et exprimé en nombre de mitochondries par µm².

VI.C.7 WESTERN BLOT

Les western blot ont été réalisés à partir d'homogénat de ventricule. Ce dernier a été placé dans du RIPA Buffer (25 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS). L'électrophorèse a eu lieu dans un gel à 10% Tris/glycine et transférée au PVDF. Les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire (Tableau 4) et les protéines ont été visualisées en utilisant un anticorps secondaire conjugué à l'HRP et

déecté par ECL (GE Healthcare, Saclay, France).

Anticorps primaires	Référence	Concentration
GAPDH	Santa cruz, Inc, Sc-20357	1/1000
p16	Santa cruz, Inc. Sc-1661	1/25
p53	Cell Signaling, 1C12	1/1000
p21	Santa cruz, Inc. Sc-6246	1/1000
p27	Santa cruz, Inc. Sc-528	1/5000

Tableau 4 : Anticorps utilisés en western blot avec leur référence et leur concentration

VI.C.8 RT-PCR EN TEMPS REEL

L'extraction d'ARN à partir des ventricules a été réalisée en utilisant une colonne de purification par affinité (QIAGEN, RNeasy Fibrous Tissue Mini kit). L'ARN total puis le cDNA simple brin a été synthétisé en utilisant le système RT-PCR superscript II (Invitrogen) avec des hexamères randomisés. Un contrôle négatif sans reverse transcriptase a été utilisé pour vérifier l'absence de contamination par l'ADN génomique. La PCR en temps réel a été réalisée avec le système ABI prism 7900 (Applied biosystem) utilisant le Taqman Low density Arrays (Applied Biosystem).

Les gènes ont été exprimés après normalisation d'une moyenne géométrique de 3 gènes de ménage : β -glucuronidase (GUSb), phosphoglycerate kinase (PGK1), hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT), sélectionnés par la méthode mathématique genorm-tool.

VI.C.9 ISOLEMENT DES CARDIOMYOCYTES DE RATS

ADULTES

Les rats adultes sont anesthésiés par une solution contenant 800 μ l de pentobarbital par voie intrapéritonéale. L'abdomen est ouvert et 200 μ l d'héparine sont injectés dans la veine cave.

Le cœur est prélevé et placé immédiatement dans une solution de base non chauffée dont le pH est ajusté à 7,2 (Tableau 5).

L'aorte est ensuite canulée puis le cœur est lavé par la solution 1 à 37°C, à une vitesse de 3ml/minute, pendant 4 minutes (Tableau 6), en circuit ouvert. Le cœur est ensuite lavé pendant 2 minutes avec la solution 2 à 37°C, à une vitesse de 3ml/minute (Tableau 6).

La digestion par la collagénase (solution 3) se déroule à 37°C, à une vitesse de 3ml/minute pendant 20 minutes, en circuit fermé.

Le cœur est ensuite décanulé puis placé dans la solution 4 (Tableau 6). Les oreillettes, les vaisseaux et le tissu adipeux périvasculaire sont retirés pour ne garder que les ventricules. Ces derniers sont alors coupés en morceaux de 1mm². Ils sont placés dans la solution 4 pendant 10 minutes, sous agitation douce par barreau aimanté.

La solution est ensuite filtrée, les cardiomyocytes en suspension sont récupérés puis laissés sédimentés dans la solution 4. Le surnageant est retiré et jeté. Le culot est placé dans la solution 5 pour une seconde étape de sédimentation. Le surnageant est de nouveau retiré et jeté. Les cellules situées dans le culot sont récupérées, placées en milieu chaud M199 (2mM de L-carnitine, 5mM de créatinine, 5mM de Taurine, 5% de sérum, de la pénicilline et de la streptomycine). Les cellules sont alors comptées et environ 300 000 cellules sontensemencées.

Solution de base				Quantité pour (g)		
Ref	Produit	MW	Concentration finale (mM)	0,5 L	1L	2L
31434	NaCl	58,44	130	3,8	7,6	15,2
P5405	KCl	74,55	5,4	0,2	0,4	0,8
M8666	MgCl₂	95,21	1,4	0,067	0,133	0,267
S0751	NaH₂PO₄	120	0,4	0,024	0,048	0,096
H3375	HEPES	238,3	4,2	0,50	1,0	2,0
G6152	Glucose	180,16	10	0,9	1,8	3,6
T0625	Taurine	125,1	20	1,25	2,5	5,0
C3630	Créatine	149	10	0,75	1,5	3,0

Tableau 5 : Composition de la solution de base pour l'isolement des cardiomyocytes adultes

Solutions pour l'isolement

Solutions		Volume sol perfusion (ml)	à ajouter à la solution de base
1-	Lavage	100	750 μM Ca^{2+} (75 μl stock à 1M)
2-	Chelation Ca^{2+}	30	100 μM EGTA (30 μl stock à 100mM)
3-	Digestion	30	100 μM Ca^{2+} (3 μl stock 1M) 1,2 mg/ml Collagenase Type II (200U/mg)
4-	Lavage+ Ca^{2+}	50	0,5 mM Ca^{2+} (25 μl stock 1M) 1% BSA (0,5 g)
5-	Ca^{2+}	50	1 mM Ca^{2+} (50 μl stock 1M)

Tableau 6 : Éléments ajoutés à la composition de base pour réaliser les différentes solutions pour l'isolement des cardiomyocytes adultes

VI.C.10 ETUDE IN VITRO

Les cardiomyocytes de rats adultes isolés selon la méthode précédemment décrite ont été soumis à des concentrations croissantes d' H_2O_2 (0,5 mM, 1mM, 5mM, 10mM et 25mM). Ces cardiomyocytes ont été fixés dans la glutaraldéhyde après 24 heures et 5 jours de culture.

VI.C.11 ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats ont été exprimés en moyenne +/- SEM (écart à la moyenne). La comparaison entre les différents groupes a été réalisée par un test de Student ou par un test ANOVA en fonction de la taille des groupes comparés. Une valeur du $p < 0.05$ était considérée comme significative.

VI.D RÉSULTATS

VI.D.1 LA MAO-A ET LA SENESENCE

Afin d'étudier le lien entre la MAO-A et la sénescence, nous avons analysé en parallèle un modèle de souris KO et un modèle de surexpression de la MAO-A, nous les avons comparés à des souris sauvages (WT) jeunes et âgées qui ne présentent qu'une faible augmentation de la MAO-A au cours du vieillissement.

Le myocarde de la souris TG surexprimant la MAO-A présente un remodelage marqué avec une importante fibrose interstitielle, une perte des cardiomyocytes et une hypertrophie des cardiomyocytes résiduels (Figures 16A, 16B, 16C). Ce remodelage est réduit par la clorgyline. La fibrose diminue fortement (2,5 fois moins de fibrose chez les souris TG traitées par la clorgyline que les souris TG non traitées) mais reste significativement plus élevée que chez la souris contrôle. Le stress oxydant y est marqué et réversé par la clorgyline (Figure 16D). L'expression de PGC1 α est diminuée fortement (expression diminuée d'un facteur 2 entre la souris NTG et la souris TG) et le traitement chronique par la clorgyline prévient cette diminution (Figure 16E). Les dommages mitochondriaux sont très marqués chez la souris TG (Figure 17F).

Dans des travaux antérieurs, nous avons démontré que chez les souris KO-MAO-A, il existait une augmentation de l'hypertrophie ventriculaire gauche accrue après banding aortique en lien avec l'hyperactivation des récepteurs 5HT [309]. A l'état basal, la souris KO MAO-A présente d'emblée un nombre de cardiomyocytes par mm² (Figure 16C), plus faible que la souris sauvage avec une hypertrophie marquée des cardiomyocytes (cardiomyocytes 1,4 fois plus volumineux chez la souris KO jeune par rapport à la souris sauvage jeune). Au cours du temps, chez la souris KO, l'hypertrophie des cardiomyocytes s'accroît très légèrement (coefficient multiplicateur de 1,1) tandis que la perte des cardiomyocytes n'est pas significative (Figures 16B et 16C). La fibrose interstitielle est faible et ne se modifie pas au cours du temps (Figure 16A). Ces résultats confirment la participation de la MAO-A dans le remodelage, notamment en ce qui concerne la perte des cardiomyocytes.

Le stress oxydant (Figure 16D) est fort d'emblée chez la souris KO (3 fois plus que chez la souris sauvage) ; mais son augmentation avec l'âge est moins importante que chez

la souris sauvage (stress oxydant multiplié par 2,6 entre la souris KO âgée et la souris jeune contre 8,8 chez la souris sauvage). Il rejoint le niveau de stress oxydant de la souris TG. Ces résultats confirment que chez la souris, au cours du vieillissement, le stress oxydant est du en partie à la MAO-A mais aussi à d'autres sources.

Il n'est pas noté de dommage mitochondrial chez la souris KO-MAO-A, ce qui conforte le lien entre dommage mitochondrial et MAO-A (Figures 17C et 17 D). De façon intéressante, il n'existe pas de modification significative de l'expression de PGC1 α (Figure 16E).

Comme attendu, le remodelage chez la souris sauvage au cours de la sénescence (Figure 16) associe une perte importante des cardiomyocytes avec une hypertrophie des cardiomyocytes résiduels (Figures 16B et 16C). Étonnamment, nous n'avons pas observé de fibrose interstitielle (Figure 16A). Le stress oxydant (Figure 16D) y est marqué et s'accompagne de dommages mitochondriaux (Figure 17B). Il n'est pas noté de diminution significative de l'expression de l'ARNm de PGC1 α (Figure 16E). Il existe donc au cours de la sénescence des dommages mitochondriaux non médiés par la MAO-A et indépendants de PGC1 α . Par ailleurs, on observe une augmentation significative de p53 et de p21 dans ces trois modèles-animaux (Figure 18). Ce qui indique que l'augmentation de p21 et de p53 est indépendante de la MAO-A au cours de la sénescence. Dans la première étude, nous avons montré que l'inactivation de p53 prévient la mort cellulaire médiée par la MAO-A. L'activation de p53 dans notre modèle de souris TG est donc liée à la mort et non à la sénescence.

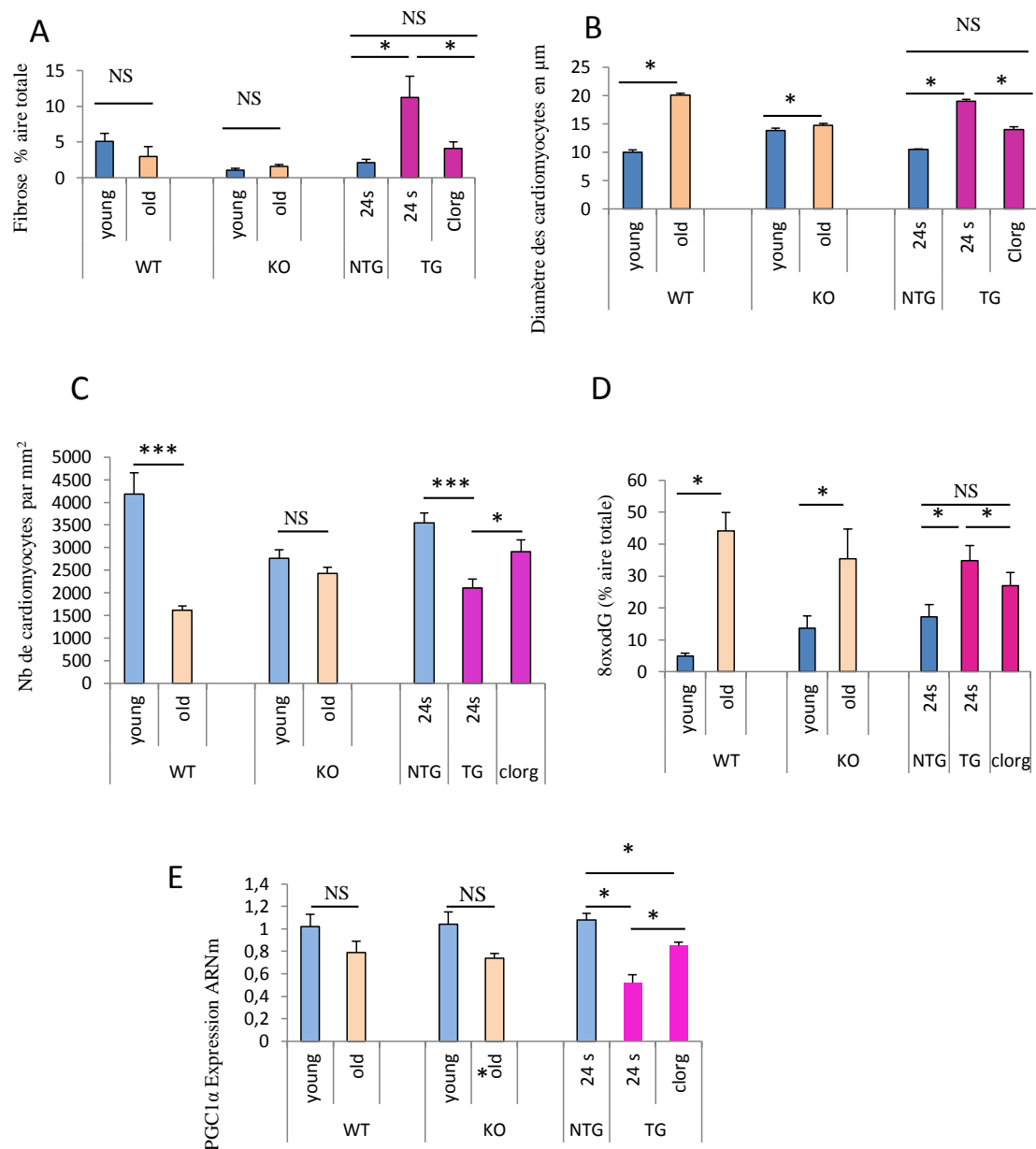


Figure 16 : MAO-A et sénescence

* : $p < 0,05$, *** : $p < 0,005$

A : quantification de la fibrose, par un logiciel d'histomorphométrie, exprimée en pourcentage par rapport à la surface totale de la coupe. Pour chaque groupe $n=4$. **B** : taille des cardiomyocytes mesurée à partir de coupes histologiques colorées au PAS, exprimée en μm . (pour chaque groupe $n=4$). **C** : quantification du nombre de cardiomyocytes, exprimée en nombre total par mm^2 . Calcul réalisé manuellement avec l'aide d'un logiciel d'histomorphométrie. **D** : quantification du stress oxydant par l'étude immunohistochimique avec l'anticorps anti-8oxo-dG ($n=4$ par groupe). La quantification est réalisée par un logiciel et exprimée en pourcentage par rapport à la surface totale de la coupe. **E** : expression de PGC1 α , quantifiée par qPCR (dans chaque groupe $n=4$).

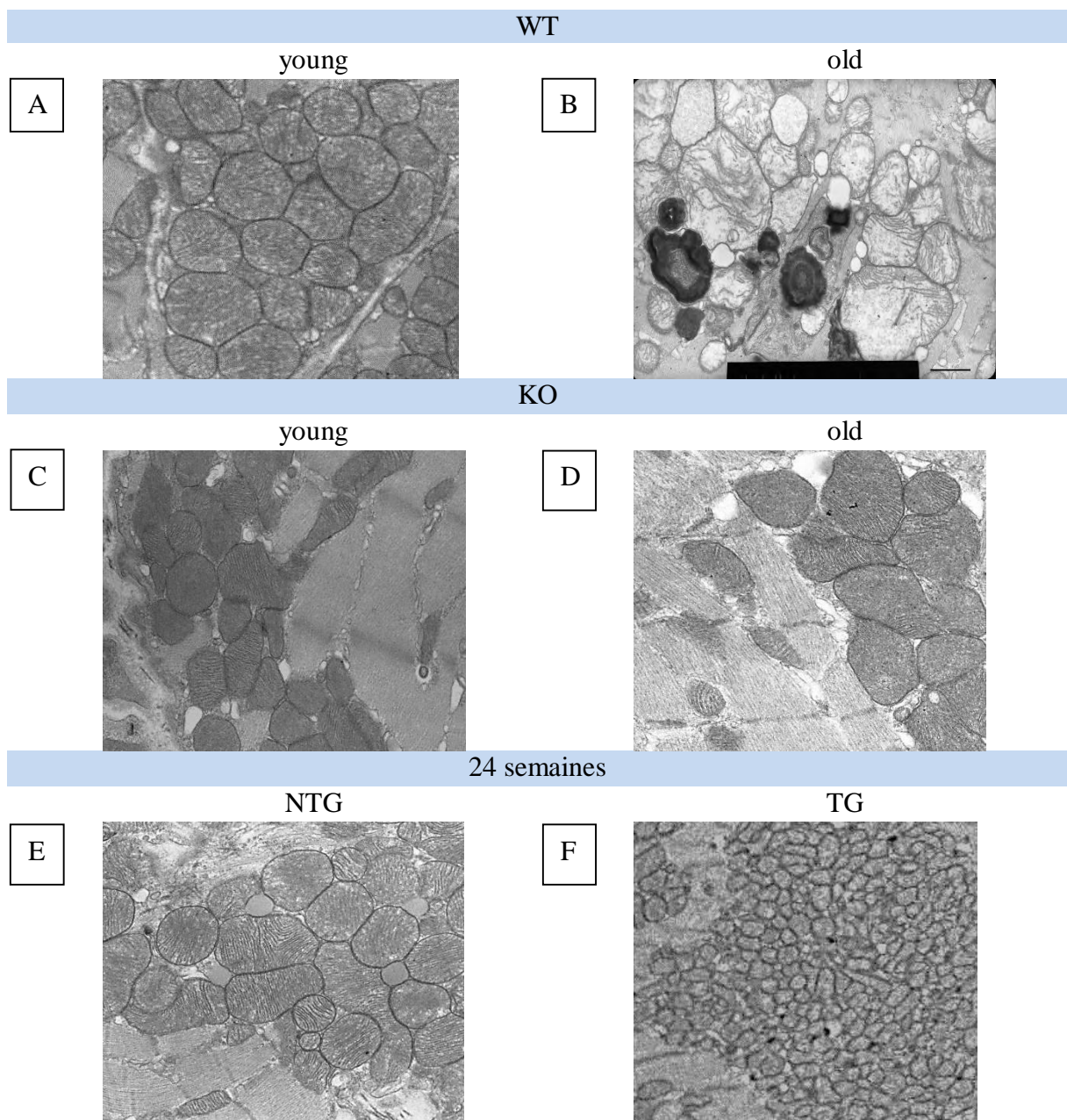


Figure 17 : Aspect ultrastructural des mitochondries dans les différents modèles murins

Photographies prises à G X 12000

A = souris sauvage jeune : mitochondries normales avec aspect régulier des crêtes. **B** = souris sauvage âgée (2 ans) : dommages mitochondriaux majeurs avec clarification mitochondriale, espacement des crêtes. **C** = souris KO MAO-A jeune : absence de dommages mitochondriaux. **D** = souris KO MAO-A âgée : absence de dommages mitochondriaux. **E** = souris NTG 24 semaines : absence de dommages mitochondriaux. **F** = souris TG 20 semaines : amas de petites mitochondries avec quelques aspects plus clarifiés de la matrice.

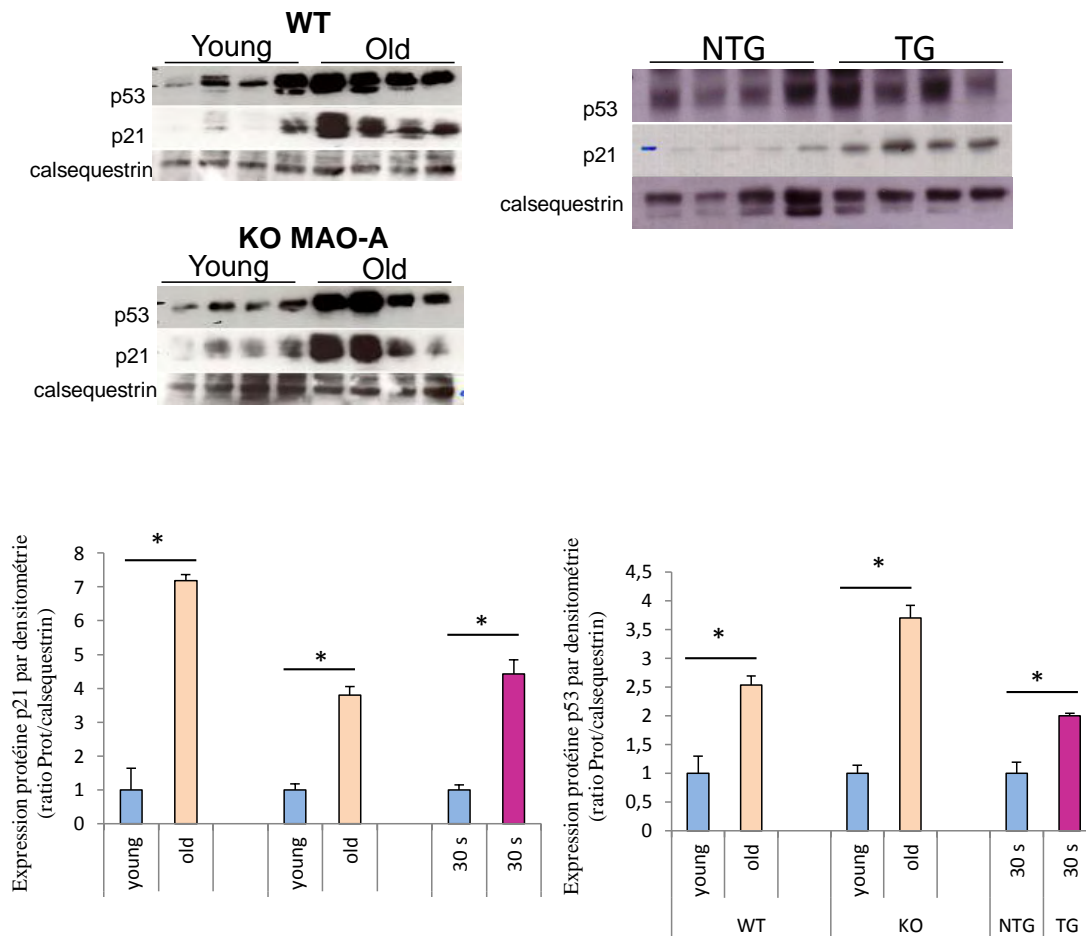


Figure 18 : MAO-A et marqueurs de la sénescence

Quantification des protéines p53 et p21, par western blot chez les souris sauvages jeunes et âgées (n=4), chez les souris KO pour le gène de la MAO-A jeunes et âgées (n=4), chez les souris transgéniques sur-exprimant la MAO-A à 30 semaines (n=4) et chez les souris contrôles non transgéniques du même âge (n=4). La quantification est normalisée par rapport à un gène de ménage, la calsequestrine.

VI.D.2 LIEN MAO-A ET DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE

De façon intéressante, il existe une augmentation du nombre de petites mitochondries chez la souris TG à 30 semaines, mais pas chez la souris KO (Figures 19A et 19B). Ce même aspect est également présent chez la souris âgée (Figure 19A). Ces observations sont confortées par la PCR quantitative qui montre bien une augmentation de Drp1 et de Fis1, protéines impliquées dans la fission, chez la TG et chez la souris WT âgée alors que ces gènes ne sont pas modifiés chez la souris KO, au cours du vieillissement (Figures 19D et 19E). De façon intéressante, l'augmentation de Drp1 après traitement par la clorgyline n'est plus significative par rapport aux NTG (Figure 19D). La régulation de Drp1 pourrait donc avoir un lien avec la MAO-A et ce, de façon indépendante de p53, qui augmente dans ces 3 modèles.

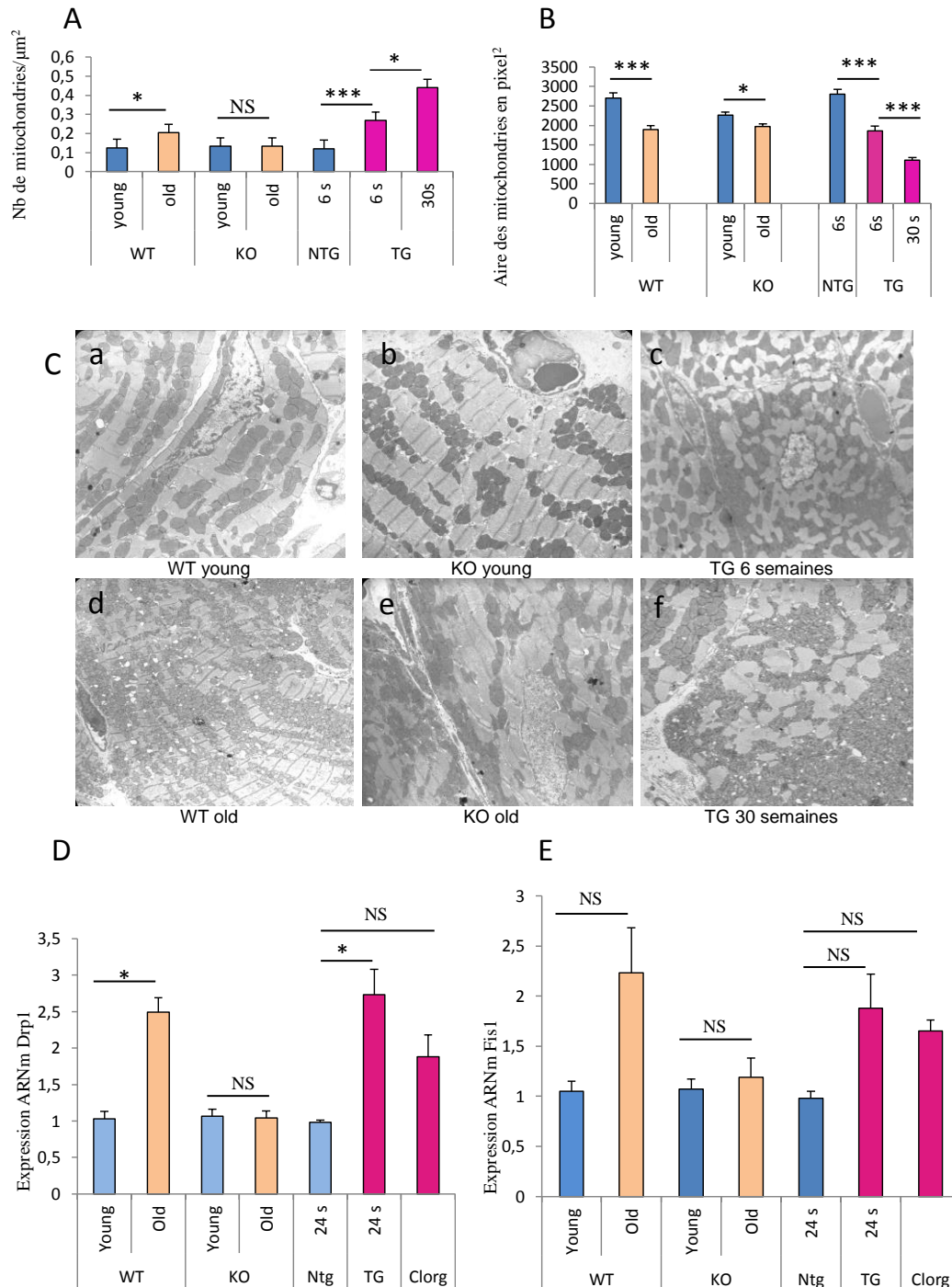


Figure 19 : MAO-A et fission

A : étude de la densité mitochondriale réalisée à partir de photographies numériques prises en microscopie électronique à transmission à GX4000, exprimée en nombre de mitochondries par μm^2 . Pour chaque groupe nous avons analysé 20 photographies provenant de 4 individus différents. **B** : mesure de la taille des mitochondries grâce à un logiciel d’histomorphométrie, à partir d’images numériques prises en microscopie électronique à transmission à GX4000 (pour chaque groupe n=4). **C** : aspect ultrastructural des mitochondries, GX2000 chez les souris sauvages, KO et transgéniques. Chez la souris sauvage âgée, on note une augmentation des petites mitochondries. Il n’existe pas de modification morphologique évidente des mitochondries au cours de la sénescence chez les souris KO MAO-A. Chez la souris transgénique surexprimant la MAO-A, à 20 semaines, on observe de nappes de petites mitochondries, s’interposant entre les sarcomères. Cet aspect n’est pas noté chez la souris contrôle non transgénique du même âge. **D** : étude de l’expression de Drp1 par qPCR (n=4 pour chaque groupe), chez la souris WT jeune et vieille, chez la souris KO jeune et vieille, chez la souris TG de 24 semaines avant et après traitement de 6 mois par un inhibiteur de la MAO-A (clorgyline). **E** : étude de l’expression de Fis1 par qPCR (n=4 pour chaque groupe). * : $p < 0,05$, *** : $p < 0,005$

VI.D.3 LE REMODELAGE MYOCARDIQUE CHEZ LE RAT AU COURS DE LA SÉNESCENCE

Les souris TG évoluent vers l'IC (Annexe 2) et les modifications myocardiques observées au cours de la sénescence et de l'IC sont proches et il est donc difficile de les distinguer dans ce modèle TG. Nous avons alors choisi de confirmer nos données, en changeant de modèle animal et en étudiant le rat, modèle surexprimant la MAO-A spontanément au cours du vieillissement (Figure 20A). Nous avons étudié les rats à différents âges : 3 mois, 12 mois et 23 mois.

On observe, chez le rat, un remodelage myocardique progressif au cours de la sénescence assez proche de celui de la souris TG (Figure 20). On note tout d'abord une fibrose interstitielle (augmentant d'un facteur 4 entre 3 mois et 23 mois). Cette fibrose devient significative ($p=0,02$) à partir de 23 mois (Figure 20B). La fibrose s'accompagne d'une diminution du nombre de cardiomyocytes (d'environ 25% entre 3 mois et 23 mois) ($p= 0,03$), et d'une hypertrophie compensatrice des cardiomyocytes résiduels (Figure 20D). Ces résultats confirment donc que la MAO-A peut être impliquée dans le remodelage avant le stade d'IC (Annexe 2).

On observe, comme chez la souris TG, que l'augmentation de l'expression de la MAO-A chez le rat âgé s'accompagne d'une augmentation significative de la détection de 8-oxo-dG ($p= 0,05$) (Figure 20F). D'un point de vue ultrastructural, on note, dans le cœur de rat de 23 mois, quelques mitochondries qui présentent des signes de souffrance avec un aspect concentrique des crêtes sans qu'il soit possible d'affirmer qu'il s'agit d'une mitophagie (Annexe 3).

Nous avons étudié par western blot, les protéines considérées dans la littérature comme des marqueurs de sénescence (p53, p21, p16 et p27). De façon non surprenante, nous observons, comme dans les différents modèles de souris, une augmentation significative chez le rat âgé de p53 et p21 (Figure 20E). Par contre, contrairement à la souris TG, on ne détecte pas de modification de l'expression de l'ARNm de PGC 1 α (Figure 20G). ce qui tendrait à montrer que dans ce modèle, l'augmentation de p53 ne réprime pas l'expression de PGC 1 α .

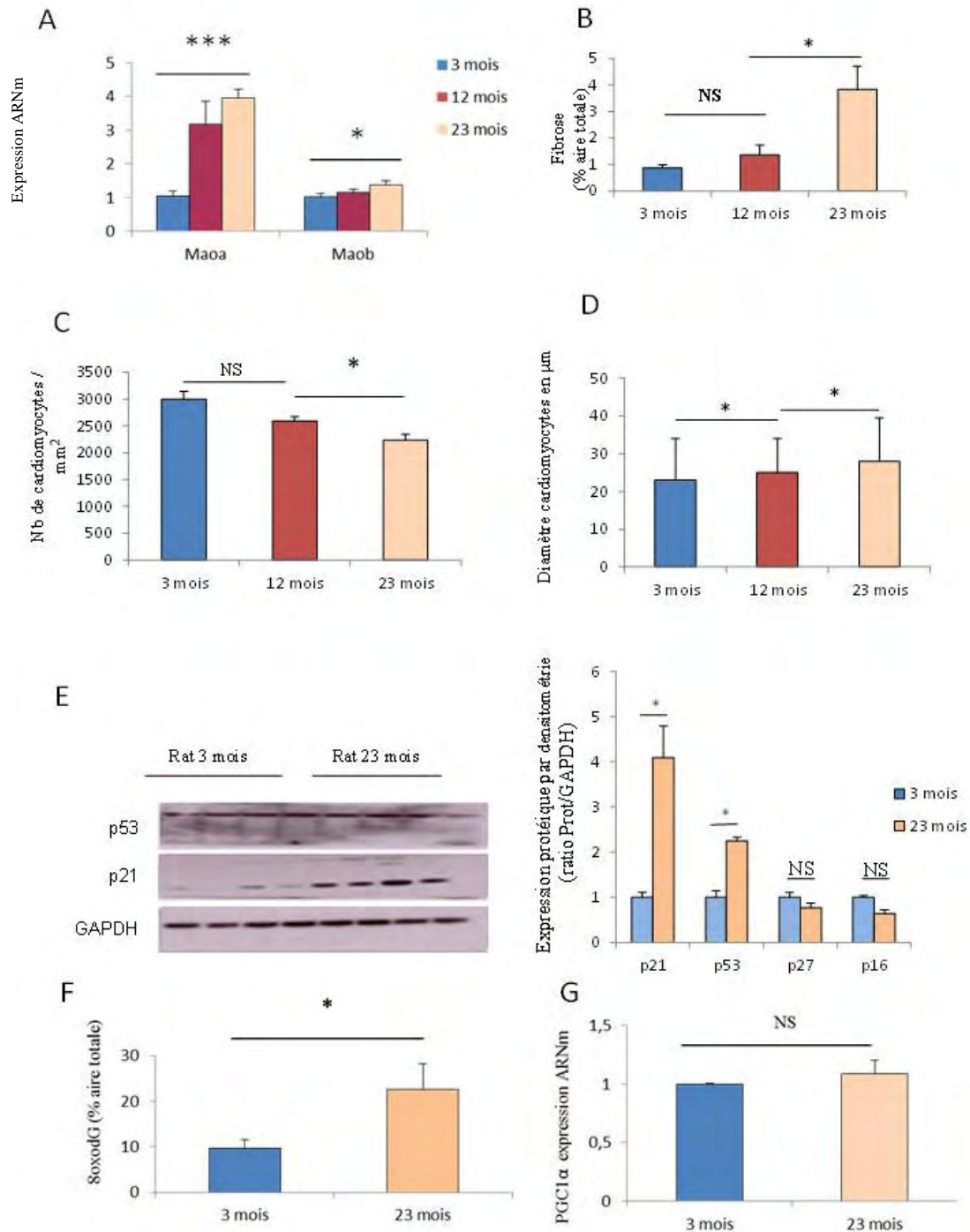


Figure 20 : Remodelage du myocarde au cours de la sénescence chez le rat et évolution des marqueurs de sénescence.

* : $p < 0,05$, ** : $p < 0,005$

A : expression du gène de la MAO-B et de la MAO-A chez le rat à différents âges (n=6 par groupe)
B : quantification de la fibrose, par un logiciel d'histomorphométrie, exprimée en pourcentage par rapport à la surface totale de la coupe. Pour chaque groupe n=6. **C** : quantification du nombre de cardiomyocytes, exprimée en nombre total par mm². Calcul réalisé manuellement avec l'aide d'un logiciel d'histomorphométrie. **D** : taille des cardiomyocytes mesurée à partir de coupes histologiques colorées au PAS, exprimée en µm. pour chaque groupe (n=6). **E** : marqueurs de sénescence quantifiés par western blot, la quantité de protéine est normalisée par rapport à un gène de ménage (GAPDH) (n=6 dans chaque groupe). **F** : quantification du stress oxydant par l'étude immunohistochimique avec l'anticorps anti-8-oxo-dg (n=6). La quantification est réalisée par un logiciel, exprimée en pourcentage par rapport à la surface totale de la coupe **G** : expression de PGC1α, quantifiée par qPCR dans chaque groupe n=4.

VI.D.4 LA SENESCENCE ET LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE CHEZ LE RAT

À l'analyse ultrastructurale des cardiomyocytes (

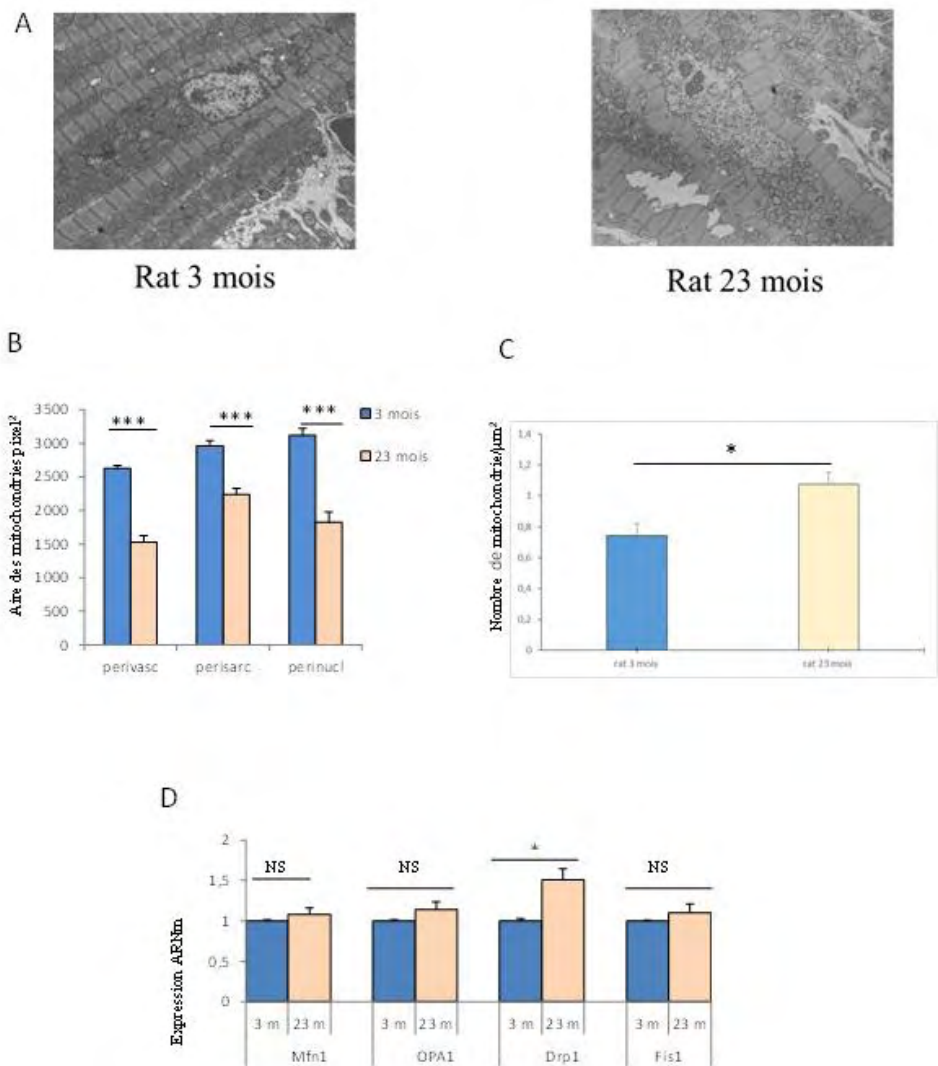


Figure 21), on observe dans tous les secteurs du cardiomyocyte (périsarcomérique, périvasculaire et périnucléaire) des nappes de petites mitochondries qui ne semblent plus alignées le long de l'appareil contractile. Cette observation est confirmée par l'analyse histomorphométrique des mitochondries (Figure 21A). En effet, la densité mitochondriale augmente significativement ($p= 0,017$) entre 3 mois et 23 mois, d'un facteur 1,7 (Figure 21C), identique à celui de la souris TG et plus élevé que celui de la souris WT âgée (densité multipliée par 1,5 entre la souris jeune et âgée WT). Leur taille diminue dans tous les secteurs du cardiomyocyte, mais cette diminution est moins importante au niveau périsarcomérique (diminution d'un facteur 1,3, $p= 3.10^{-7}$) par rapport aux secteurs périnucléaires ($p= 2.10^{-10}$) et périvasculaires ($p= 8.10^{-22}$) dont la taille des mitochondries diminue d'un facteur 1,7 (Figure 21C). D'un point de vue génique, ces données sont confirmées par l'augmentation significative de l'expression de Drp1, protéine impliquée dans la fission mitochondriale (Figure 21D). Ces observations confirment que la fission mitochondriale que nous avons observée est bien en relation avec la MAO-A et non l'IC.

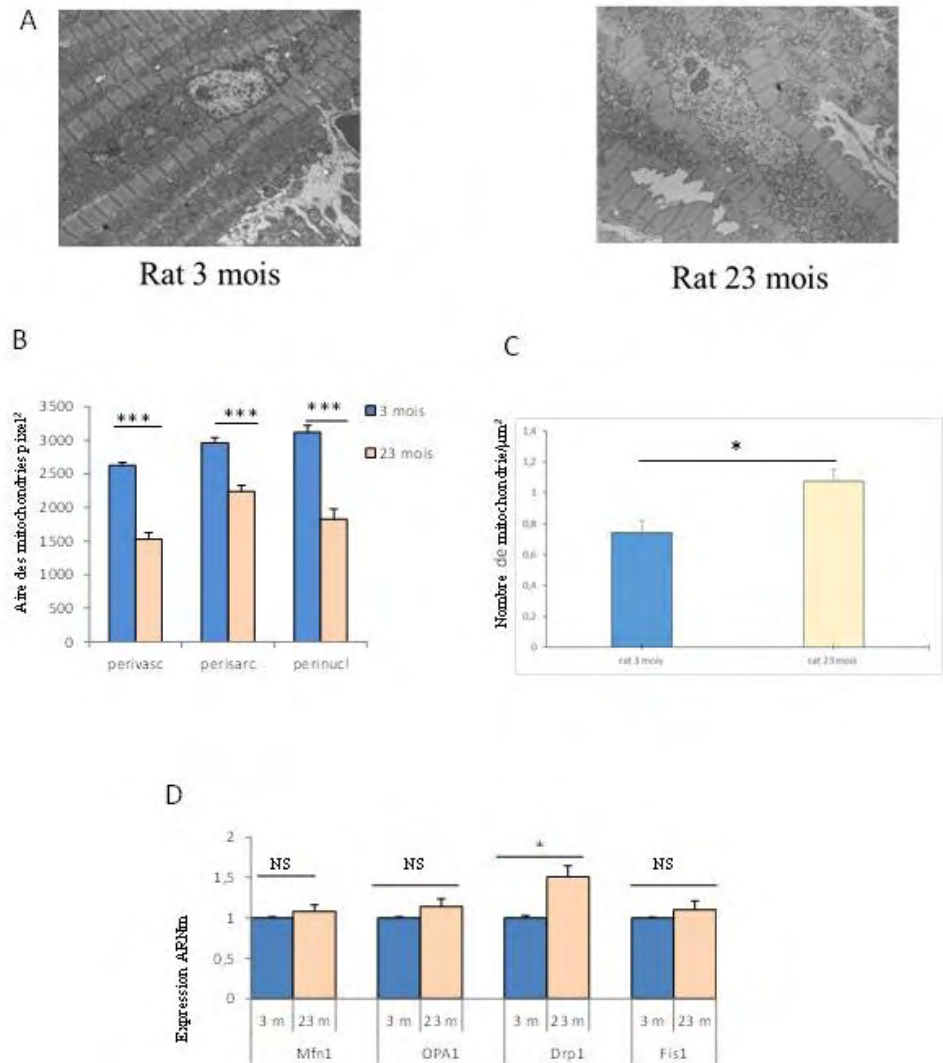


Figure 21 : Sénescence et dynamique mitochondriale chez le rat.

A : aspect ultrastructural de la mitochondrie chez un rat jeune de 3 mois et un rat âgé de 23 mois, photographies prises à GX4000. Chez le rat âgé, on observe des mitochondries plus petites et plus nombreuses. **B** : mesure de la taille des mitochondries grâce à un logiciel d'histomorphométrie, à partir d'images numériques prises en microscopie électronique à GX4000 (n=6). **C** : étude de la densité mitochondriale réalisée à partir de photographies numériques prises en microscopie électronique à GX4000, exprimée en nombre de mitochondries par μm^2 . Pour chaque groupe nous avons analysé 20 photographies provenant de 6 individus différents. **D** : qPCR sur tissu entier (n=6), chez les rats jeunes de 3 mois et les rats âgés de 23 mois. Étude des gènes de la fusion (OPA 1 et Mfn1) et de la fission (Drp1 et Fis 1)

VI.D.5 STRESS OXYDANT ET DYNAMIQUE

MITOCHONDRIALE : ETUDE IN VITRO, RESULTATS PRELIMINAIRES

Tous les modèles animaux étudiés présentent un fort stress oxydant. Afin de rechercher si ce dernier pouvait être à l'origine de la fission mitochondriale, nous avons choisi de réaliser une culture de cardiomyocytes adultes. Nous les avons placés dans un milieu avec des doses croissantes d' H_2O_2 (0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM et 25 μM). À J1, nous n'observons pas de fission mitochondriale en présence d' H_2O_2 quelle que soit la concentration utilisée. À J5, nous observons une mort cellulaire dès 1 μM . À 0,5 μM , il existe bien une fission mitochondriale, mais cette dernière est aussi présente dans les cardiomyocytes contrôles sans H_2O_2 (Figure 22). Cette fission spontanée au cours de la culture cellulaire ne nous permet donc pas d'utiliser ce modèle pour confirmer nos données in vivo.

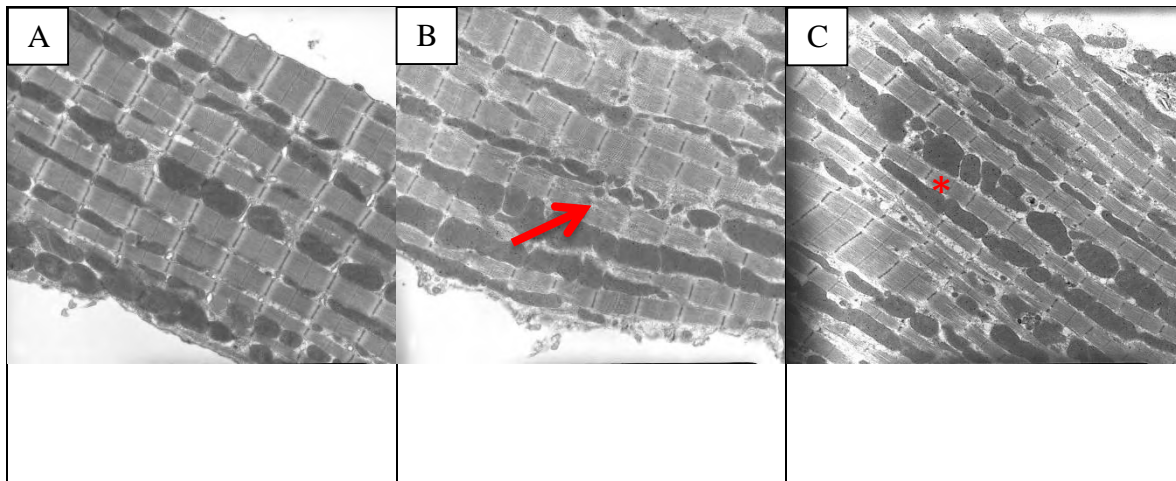


Figure 22 : Aspect ultrastructural d'un cardiomyocyte isolé de rat adulte

Photographies prises à GX6000

A : J1 en présence d' H_2O_2 à 10 μM . Absence de modification morphologique des mitochondries. **B** : J5 en présence d' H_2O_2 à 0,5 μM . Présence de mitochondries plus petites en position périssarcomérique (→). **C** : J5 sans H_2O_2 . Présence également de petites mitochondries en position périssarcomérique (*).

VI.E DISCUSSION

VI.E.1 SENESCENCE ET MAO-A

La sénescence s'accompagne d'un remodelage caractérisé par une fibrose interstitielle, une diminution du nombre de cardiomyocytes et une hypertrophie des cardiomyocytes résiduels [455]. Il est intéressant de noter que ce remodelage est présent chez la souris TG et chez le rat âgé et pour partie, chez la souris sauvage. Chez le rat, l'hypertrophie des cardiomyocytes est significative dès 12 mois alors que la fibrose interstitielle et la perte des cardiomyocytes ne sont significatives qu'à 23 mois. L'hypertrophie à l'échelle cellulaire est donc le premier événement du remodelage. Dans la littérature, c'est surtout l'hétérogénéité de la taille des cardiomyocytes qui est soulignée. En effet, dans le myocarde, quel que soit l'âge, on observe une juxtaposition de petits, de moyens et de volumineux cardiomyocytes. Chez la souris jeune (3 mois), les cardiomyocytes petits et moyens sont prédominants tandis qu'à 22 mois, le nombre de volumineux cardiomyocytes a doublé et les proportions entre les cardiomyocytes de différentes tailles s'égalent [456].

Chez la souris TG, nous observons une importante accumulation de dommages oxydatifs, explorés par l'étude immunohistochimique avec l'anti-8-oxo-dG. Ces dommages oxydatifs s'accompagnent d'un remodelage ainsi que d'une importante et précoce perte des cardiomyocytes. Comme nous l'avons montré dans la première étude, ce remodelage peut être prévenu par l'administration chronique d'un antioxydant, la N-acétyl cystéine. Il existe donc bien un lien chez ces souris entre le remodelage et la production d'H₂O₂ par la MAO-A.

La souris KO-MAO-A, présente un remodelage moindre par rapport à celui de la souris sauvage au cours du vieillissement, ce qui pourrait conforter l'hypothèse d'un lien entre la MAO-A et le vieillissement. La perte des cardiomyocytes au cours du vieillissement n'est pas observée chez les KO MAO-A, la taille des cardiomyocytes augmente modérément par rapport à une souris sauvage et nous avons noté une augmentation moins importante du stress oxydant au cours du temps. L'absence de MAO-A pourrait limiter un peu l'accumulation du stress oxydant au cours du vieillissement dans le cœur et la perte des cardiomyocytes. En revanche, nous observons un remodelage de base chez les souris jeunes qui correspondrait à une hypersérotoninergie [309, 424].

D'après la littérature, il semblerait que le stress oxydant entraîne une augmentation de la β -galactosidase au cours de la sénescence dans le cardiomyocyte, du moins chez le rat [370, 457, 458]. Nous n'avons pas pu confirmer ces données. Les tests que nous avons réalisés dans le cadre de cette thèse (Annexe 1) ont montré une hétérogénéité extrême de la coloration, des résultats contestables et peu reproductibles. En effet, l'utilisation de la coloration cytochimique β -galactosidase est d'interprétation très délicate dans le cœur. Il est difficile de déterminer si la coloration a intéressé des cardiomyocytes ou des cellules non cardiomyocytaires (cellule endothéliale ou fibroblaste). D'après la littérature, cette coloration est particulièrement utilisée pour étudier la sénescence sur le fibroblaste en culture et normalement elle ne colore pas les cellules quiescentes ou les cellules en différenciation terminale [459]. Nous n'avons donc pas utilisé cette technique pour explorer la sénescence du cardiomyocyte.

Dans toute cellule normale, après un nombre limité de divisions cellulaires, il existe un arrêt définitif du cycle appelé sénescence répllicative [460, 461]. Cette sénescence comprend une morphologie particulière, une augmentation de l'activité de la β -galactosidase à pH6, un arrêt du cycle en phase G1 avec expression de régulateurs du cycle et un raccourcissement des télomères [462-465]. Parmi les régulateurs du cycle, on retiendra p53, p16, p21 et p27 (Figure 23).

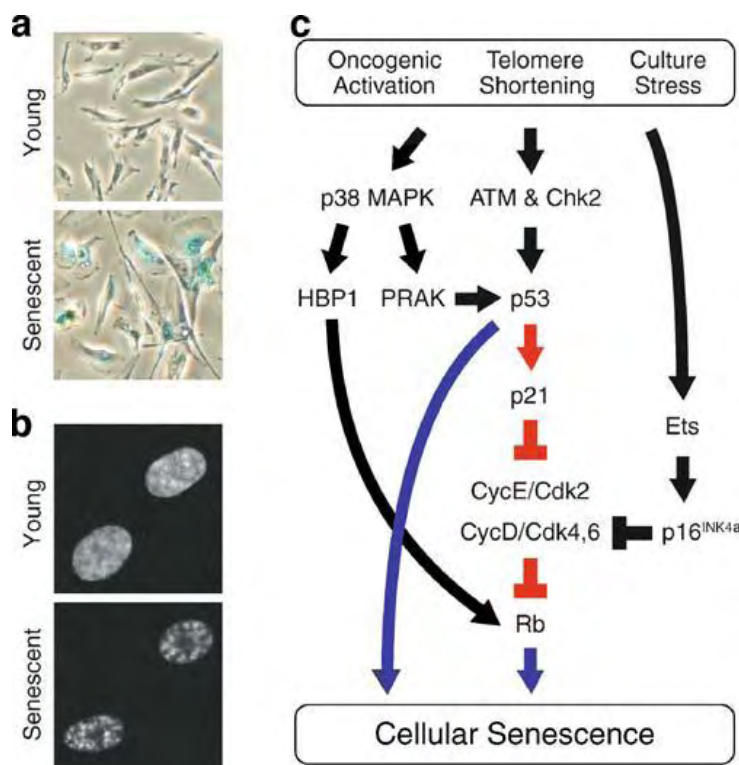


Figure 23 : Cascade cellulaire aboutissant à la sénescence

a et b fibroblastes avec coloration cytochimique par la β -galactosidase (a) ou le DAPI (b). Les cellules sénescents sont plus larges et plus plates, elles ont une activité β -galactosidase augmentée et des foci de condensation de la chromatine. **c** : cascade de signalisation aboutissant à l'arrêt du cycle et à la sénescence cellulaire. Schéma tiré de Funayama et al. 2007 [466].

Dans le cardiomyocyte, la sénescence est complexe à aborder, car il s'agit d'une cellule en différenciation terminale. Néanmoins, comme dans le neurone, il a été décrit un phénotype sénescence proche de celui des cellules répliquatives qui s'accompagne de télomères courts et d'une augmentation des inhibiteurs du cycle [467]. Nous observons dans la sénescence, chez le rat comme chez la souris sauvage, une augmentation de p53 au cours du vieillissement. La protéine p53 tient une place centrale dans l'arrêt de la progression du cycle cellulaire en G1 [468]. Elle intervient dès le début de la sénescence (Figure 23). Elle est d'abord stabilisée et phosphorylée, puis elle vient réguler positivement la transcription du gène codant pour p21 [466]. Son rôle dans la sénescence a été attesté par des modèles de souris transgéniques avec élévation chronique de l'activité de p53 [469, 470]. Ces souris présentaient une sénescence accélérée et un raccourcissement de leur durée de vie. In vitro, les cellules issues de ces animaux rentraient précocement en sénescence. Néanmoins, dans un autre modèle murin, l'augmentation du nombre de copies du gène codant pour la protéine p53 n'entraînait pas de phénotype sénescence ni de modification de la longévité [471]. Il est intéressant de noter que la protéine p53 n'est pas essentielle dans le maintien du phénotype sénescence. En effet, dans des modèles de sénescence induite par des médicaments anticancéreux, il a été montré qu'après le retrait du médicament, l'expression de p53 diminue alors que le phénotype sénescence, lui, persiste [472]. Dans le cœur, le rôle de p53 dans la sénescence intrinsèque est peu connu. De façon intéressante, dans un modèle particulier de sénescence avec instabilité génomique en rapport avec des télomères courts (souris KO pour la Tert ou la Terc), il a été montré que la protéine p53 était activée et que cette dernière réprimait l'expression de PGC1 α et PGC1 β . Les conséquences de cette répression sur la biogénèse mitochondriale pourraient rendre compte de la dysfonction mitochondriale observée au cours de la sénescence. Ces souris évoluent vers l'IC après plusieurs générations, ce qui pourrait impliquer également les télomères et PGC1 α dans la physiopathologie de l'IC [436]. Cette observation est d'autant plus intéressante que nous avons constaté dans notre première étude un lien entre p53-PGC1 α et les dommages mitochondriaux lors de la surexpression de la MAO-A. Cette constatation pourrait suggérer un lien entre le MAO-A et l'expression de PGC1 α , d'autant plus que la souris KO ne présente pas de modification d'expression de la protéine. Il serait donc intéressant de compléter notre étude chez la souris TG par l'évaluation de la longueur des télomères. De façon décevante le rat âgé et la souris âgée ne présentent pas de modification de PGC1 α . Cette observation tend à montrer que la diminution de l'expression de PGC1 α serait plutôt corrélée à un phénotype d'IC (Annexe 2) qu'à la sénescence en elle-même comme l'attestent le rat et la souris sauvage âgés.

Nous observons également, dans l'ensemble de nos modèles animaux, une augmentation de la quantité de la protéine p21. L'augmentation de cette dernière a été mise en évidence au cours de la sénescence dans d'autres études de la littérature, notamment chez le rat [370]. Elle s'accompagnait d'une augmentation de p27, que nous n'avons pas retrouvée. Il a été montré que l'augmentation de la quantité p21 et de p53 pouvait avoir un lien avec le stress oxydant. En effet, face à un stress génotoxique ou une irradiation, l'élévation post-traductionnelle de p53 stimule l'expression du gène p21 [468]. Mais la surexpression de p21 peut induire un phénotype de sénescence, y compris dans des cellules déficientes pour p53 [365]. De plus, après exposition aux agents antitumoraux, non seulement l'induction de p21 est corrélée à l'entrée des cellules en sénescence, mais réciproquement, la perte d'expression de p21 inhibe ce phénomène [472]. Le mécanisme par lequel p21 active la sénescence est encore mal connu. Il a été montré que l'activation constitutive de p38MAPK active p21 et confère en parallèle un phénotype de sénescence [473]. Or, p38MAPK est activé dans de nombreuses conditions de stress (en particulier de stress oxydatif), ce qui renforce l'idée que la fonction pro-sénescence de p21 pourrait être en rapport avec la production de radicaux oxygénés [474]. Dans notre étude, l'augmentation de p21 et de p53 semble plus liée au stress oxydant que directement à la MAO-A. Cette hypothèse est renforcée par l'augmentation de ces deux protéines chez la souris KO MAO-A, au cours du vieillissement. De plus, des études ont bien montré que la sénescence pouvait être induite par l'exposition à des concentrations subtoxiques d'oxydants, par les ultraviolets ou par les ROS tel H_2O_2 [475, 476].

L'augmentation de p16 est considérée dans le cœur comme un bon marqueur de sénescence et est souvent le seul inhibiteur du cycle recherché [456, 477-480]. Nous n'avons pas observé d'augmentation de p16, mais il est possible que l'âge que nous avons choisi pour explorer la sénescence notamment chez le rat, ne permette pas d'observer cette variation. En effet, dans la littérature, p16 semble augmenter dans les modèles de rats, plutôt vers 27 mois [479]. De plus, il a été montré que l'induction du gène p16 survient (dans les fibroblastes humains en culture) lors de la phase terminale de la sénescence et l'induction de p21 précède l'induction de p16 [474]. Ainsi p21 jouerait un rôle important dans l'induction du phénomène sénescence et p16 jouerait un rôle critique dans son maintien [474]. Il est donc possible que nous nous situions à la phase précoce de la sénescence dans notre modèle de rats âgés.

VI.E.2 SENESCENCE ET FISSION

Dans notre étude, nous observons une fission mitochondriale au cours de la sénescence dans le myocarde de rats âgés, comme de souris âgées. Nous confirmons ainsi que la sénescence s'accompagne d'un basculement de la dynamique mitochondriale vers la fission. Nos résultats montrent également pour la première fois que la surexpression de la MAO-A s'accompagne d'une fission mitochondriale. En effet, dans notre modèle de souris surexprimant la MAO-A dans les cardiomyocytes adultes, nous observons une importante fission mitochondriale qui est réversée par l'administration chronique de clorgyline, inhibiteur sélectif de la MAO-A. De plus, les souris KO pour le gène de la MAO-A au cours de la sénescence, ne font pas spontanément de fission mitochondriale comme nous le montrons par deux approches différentes (étude ultrastructurale et PCR en temps réel). Ces constatations permettent d'émettre l'hypothèse qu'il existe un lien entre la MAO-A et la fission, mais le mécanisme d'action de la MAO-A dans la fission reste inconnu.

La MAO-A produit de l' H_2O_2 au cours de la déamination oxydative des amines biogènes. Dans notre étude, le rat âgé, la souris âgée comme la souris transgénique accumulent des dommages oxydatifs. Il n'a jamais été mis en évidence, en condition physiologique, dans le cardiomyocyte adulte de lien entre H_2O_2 et la fission mitochondriale. Néanmoins, dans d'autres types cellulaires, ce lien existe. Il a été montré que l'administration chronique d' H_2O_2 sur des cultures de cellules SH-SY5Y (cellules de neuroblastome) induisait la fission. Tandis que l'irradiation de cellules COS-7 (fibroblastes transformés de rein de singe) induisait une fission mitochondriale réversée par l'administration d'un antioxydant [481, 482]. Cette hypothèse reste pourtant à pondérer. En effet, in vitro, l'administration d' H_2O_2 sur des cardiomyocytes adultes n'induit pas de fission à J1. Une autre hypothèse serait un lien entre les aldéhydes produits par la MAO-A ou un effet direct de la MAO-A sur les protéines de fission.

Dans notre étude, nous observons une augmentation de l'expression de Drp-1, ce qui montre que la fission résulte d'un mécanisme d'induction de l'expression des protéines impliquées dans la fission et non d'une répression des protéines de la fusion. Dans la littérature, les modifications morphologiques mitochondriales semblent plutôt en rapport avec des variations de l'expression des protéines de la fusion, et plus particulièrement OPA-1 qui semble induite ou réprimée [129, 483].

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que la surexpression de MAO-A était associée à l'IC. Cette IC s'accompagne de petites mitochondries et d'une

augmentation de Drp1. Or dans la littérature, des modifications de la structure et de la dynamique des mitochondries ont été rapportées dans les pathologies cardiaques et l'IC suggérant un rôle dans la pathogenèse des cardiopathies. Dans l'IC, l'hibernation myocardique ou encore dans certaines pathologies congénitales cardiaques, on note une augmentation du nombre de petites mitochondries avec une diminution de la densité de leur matrice [129, 484-487]. Ces mêmes anomalies morphologiques sont également décrites dans les biopsies musculaires des patients souffrant de mitochondriopathies ou dans des modèles de cardiopathies dilatées. Néanmoins, il existe d'autres conditions pathologiques qui s'accompagnent de fusion comme la constriction aortique ou encore certains modèles d'hypoxie.

On connaît peu de choses sur la séquence de la fission dans l'IC. La mécanistique est souvent abordée dans la littérature par la culture de cardiomyocytes nouveau-nés de rats qui, comme nous l'avons déjà exposé, ne présentent pas la même dynamique mitochondriale que celle du cardiomyocyte adulte. En effet, au cours de la différenciation du cardiomyocyte, l'augmentation de la demande en énergie s'accompagne d'une modification de la morphologie mitochondriale avec une réduction de l'expression de Drp1 et une augmentation de celle de Mfn2 [488]. Dans ce modèle, en présence de conditions riches en glucose, l'inhibition de la fission prévient la production de ROS, l'ouverture du pore de transition et la mort cellulaire [489]. Néanmoins, la relevance dans le cardiomyocyte adulte est inconnue. Il a, par contre, été démontré que dans le cardiomyocyte adulte, l'augmentation de la concentration cytosolique de calcium, condition fréquente dans l'IC, entraîne la fission mitochondriale via Drp1 et la production de ROS [486]. Il est important de noter que dans notre modèle de souris transgéniques qui correspond à un modèle de stress oxydant chronique, la fission précède l'IC et apparaît dès le stade d'hypertrophie.

Dans ce modèle, il existe également précocement une mort des cardiomyocytes et il n'est pas exclu que la fission observée soit en rapport avec la mort cellulaire. En effet, en réponse à un stimulus apoptotique, les mitochondries sont capables de se fragmenter par un mécanisme de fission. En condition physiologique, il semble que 20% des protéines Drp1 soient spontanément localisées à la mitochondrie. En présence de la protéine Bax, de grandes quantités de Drp1 transloqueraient à la mitochondrie. L'inhibition de l'apoptose par le facteur antiapoptotique BCL-xL préviendrait la mort cellulaire, mais pas la fission mitochondriale [490]. Dans le cardiomyocyte le rôle de la fission dans la mort cellulaire a, encore une fois, été abordé sur culture primaire de cardiomyocytes nouveau-nés de rats. Le céramide induirait la fragmentation mitochondriale, augmenterait le niveau de Drp1 et Fis1 ainsi que la colocalisation de ces deux protéines et entraînerait la mort par apoptose.

L'inhibition de Mfn2 augmenterait la fragmentation des mitochondries, la dépolarisation des membranes et le relargage du cytochrome c [489]. Néanmoins, dans notre modèle de souris transgéniques, nous n'avons pas mis en évidence de mort par apoptose, mais par nécrose. Il n'a jamais été mis en évidence de lien entre nécrose et fission mitochondriale. Nous ne savons donc pas si la fission a pu induire la nécrose ou si elle est présente sans entraîner la mort cellulaire. Dans ce cas la fission serait un mécanisme adaptatif, au moins au stade d'hypertrophie.

Notre travail reste préliminaire. Afin d'attester d'un lien entre la MAO-A et la fission en dehors de l'IC, il serait intéressant de traiter de façon chronique les rats avec un inhibiteur de la MAO-A. Ainsi, il serait possible de rechercher si la fission que nous avons observée chez le rat âgé est induite par la MAO-A ou si elle est purement liée à la sénescence. Il serait également intéressant de traiter les rats avec un antioxydant afin de rechercher un lien entre ROS et fission et de compléter ces observations par l'étude de l'autophagie. En effet, comme nous l'avons précédemment développé, il semble exister un lien entre fission et autophagie. Or, l'autophagie est négativement régulée par les dommages oxydatifs. Dans la sénescence, il existe une augmentation de la production des ROS et un déclin de l'activité du système lysosomal/autophagie en partie lié aux ROS, il n'est donc pas exclu que l'accumulation des mitochondries de petite taille au cours du vieillissement soit liée au dysfonctionnement de l'autophagie [491, 492].

VI.F CONCLUSION

Notre étude a montré que l'augmentation de la MAO-A dans le cœur au cours de la sénescence pouvait participer au remodelage. Nous avons mis en évidence une augmentation de la protéine p21 et p53 dans les souris surexprimant la MAO-A. Malheureusement, l'augmentation de ces deux protéines est également présente chez les souris KO MAO-A, ce qui tendrait à montrer que leur augmentation est plutôt médiée par un mécanisme autre que la MAO-A, comme le stress oxydant.

En parallèle nous avons mis en évidence l'existence d'une fission mitochondriale médiée par Drp1 dans le cardiomyocyte au cours de la sénescence physiologique. Pour la première fois, nous avons montré que ce phénomène est précoce, parallèle à l'hypertrophie des cardiomyocytes et indépendant de l'apparition d'une IC. Nous avons montré un lien possible entre la fission mitochondriale et la MAO-A. L'absence de fission chez les souris KO-MAO-A permet d'appuyer l'hypothèse de ce lien entre fission et MAO-A. Cette dernière est située sur la membrane externe de la mitochondrie, lieu d'action de Drp1. Une interaction directe entre ces deux protéines n'est pas exclue.

VII CONCLUSION GENERALE

La MAO-A est une enzyme mitochondriale qui réalise la déamination oxydative des amines biogènes en libérant de l' H_2O_2 . Dans le cœur, son activité augmente dans de nombreuses conditions pathologiques aiguës (infarctus du myocarde) comme chroniques (constriction aortique). Les raisons de cette augmentation d'activité sont mal connues et peuvent être la résultante de l'augmentation de ses substrats (catécholamines).

Nos travaux démontrent pour la première fois, grâce à un modèle murin transgénique surexprimant la MAO-A, qu'en dehors de toute condition pathologique, la surexpression de la MAO-A aboutit à l'IC. De plus, cette surexpression produit *in situ* de grandes quantités d' H_2O_2 et est responsable d'un stress oxydant chronique dont une des cibles est la mitochondrie. L'ensemble aboutit à la mort des cardiomyocytes par un mécanisme essentiellement nécrotique. Nous avons également montré que cette nécrose était la résultante ultime de l'activation de p53 par phosphorylation. Ce dernier agit comme un répresseur de l'expression de PGC1 α , ce qui augmente la dysfonction mitochondriale et les dommages mitochondriaux créant ainsi un cercle vicieux qui potentialise les effets de l'activation de la MAO-A et entraîne la mort du cardiomyocyte. PGC1 α est un coactivateur de l'expression de nombreux gènes. Il est un modulateur important du métabolisme énergétique mitochondrial. Il est induit, notamment, dans des situations où les acides gras deviennent le substrat énergétique préférentiel. Il a été montré dans d'autres modèles que les ROS pouvaient diminuer l'expression de PGC1 α [493]. Il serait donc intéressant d'étudier s'il existe un lien entre la MAO-A et les modifications du métabolisme cardiaque observé au cours de l'IC (ex : diminution de la β -oxydation) et si ce lien est médié par l' H_2O_2 produit par cette enzyme.

L'augmentation inéluctable de la MAO-A au cours de la dysfonction cardiaque aiguë ou chronique est donc bien délétère pour le cardiomyocyte et participe certainement à l'évolution vers l'IC. Nous pourrions confirmer cette hypothèse en étudiant la progression de l'IC dans un modèle murin KO pour la MAO-A de manière inductible et cardiaque spécifique, après constriction aortique. Ce modèle est disponible dans l'équipe.

L'IC survient dans la majorité des cas après 65 ans. Son pronostic est nettement plus défavorable chez le sujet âgé en raison des comorbidités associées à l'âge, mais aussi en raison de la sénescence intrinsèque du myocarde qui constitue une source de vulnérabilité.

L'activité de la MAO-A augmente, chez le rat au cours de la sénescence. Dans la seconde partie de ce travail, nous avons voulu déterminer si la MAO-A était un acteur de la sénescence intrinsèque du myocarde et s'il existait des modifications de la dynamique mitochondriale.

Nous n'avons pas réussi à montrer de lien entre la MAO-A et la sénescence, notamment en ce qui concerne les marqueurs de la sénescence. L'augmentation des marqueurs de la sénescence que nous avons observée semble surtout médiée par le stress oxydant, indépendamment de la MAO-A. Il serait néanmoins intéressant de traiter de façon chronique les rats âgés surexprimant la MAO-A au cours de la sénescence par la clorgyline et d'observer s'il existe un effet sur leur durée de vie et la fonction cardiaque. D'un point de vue tissulaire, nous pourrions nous attacher à l'étude de la survie des cardiomyocytes puisque c'est sur ce point que la MAO-A semble jouer un rôle important au cours du vieillissement. De plus, il a été montré dans une étude récente de la littérature qu'au cours de la sénescence, induite par un raccourcissement télomérique et aboutissant à une IC, l'activation de p53 et la répression de PGC1 α qui en résulte, entraîne une dysfonction mitochondriale qui ensuite favoriserait la production de ROS par la mitochondrie. Il faudrait vérifier si notre modèle transgénique mime ce modèle et s'il s'accompagne d'un raccourcissement des télomères.

De manière très intéressante, nous avons mis en évidence des modifications de la dynamique mitochondriale dans le cardiomyocyte, au cours de la sénescence physiologique, faisant de la fission un élément important du vieillissement myocardique. Pour la première fois nous avons montré que ce phénomène était précoce, parallèle à l'hypertrophie des cardiomyocytes et indépendant de l'apparition d'une IC. Dans la littérature, il a été montré que la fission permettait l'isolement de mitochondries présentant des dommages irréversibles comme la perméabilisation de la membrane interne et/ou l'oxydation de ses composants par les ROS. Ces mitochondries endommagées sont prises en charge par un processus autophagique appelé mitophagie. Or il semble qu'avec l'âge, dans le cœur comme dans d'autres organes, on assiste à une diminution graduelle de l'autophagie, ce qui participe grandement à l'accumulation de petites mitochondries et la dysfonction cardiaque [494]. Il faudrait vérifier si au cours de la sénescence physiologique cette accumulation de petites mitochondries, en rapport avec une augmentation de la fission, résulte également d'une diminution de la mitophagie.

Nos travaux montrent également qu'il semble exister un lien entre fission et MAO-A au cours du vieillissement. En effet la fission est particulièrement marquée dans notre

modèle de souris surexprimant la MAO-A, dès 6 semaines de vie, et n'apparaît pas dans le modèle murin KO pour la MAO-A. De façon surprenante, la fission que nous avons observée ne semble pas liée au stress oxydant. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en traitant les souris surexprimant la MAO-A par un antioxydant. La MAO-A est située sur la membrane externe de la mitochondrie, lieu d'action de Drp1. Il faudrait rechercher s'il existe une interaction directe entre ces deux protéines et les modalités de cette interaction. La participation des aldéhydes générés par la MAO-A n'est pas exclue. Un tel lien déterminerait une nouvelle fonction de la MAO-A et ouvrirait des perspectives dans le domaine de la dynamique mitochondriale. Enfin, il serait intéressant de mieux comprendre le rôle de cette fission au cours de la sénescence cardiaque. Est-ce un phénomène contribuant à la dysfonction cardiaque ou est-ce un phénomène adaptatif ?

ANNEXES

VIII ANNEXE 1

Protocole utilisé pour la coloration cytochimique de la β -galactosidase à pH 6

Des cryo-coupes à 5 μ m sont réalisées à partir de prélèvements myocardiques congelés. Les lames ne sont pas recongelées et sont techniques immédiatement. Les lames sont d'abord laissées 10 minutes à température ambiante.

Deux lavages de 3 minutes sont réalisés dans du PBS à pH6 (pH ajusté par HCl) puis les lames sont fixées à 4°C pendant 3 minutes dans un mélange formaldéhyde 2% et glutaraldéhyde 0,2%. Les lames sont ensuite rincées deux fois pendant 5 minutes dans du PBS. Sur chaque lame sont ensuite déposés 150 μ l de solution X-Gal (Tableau 7) et laissés toute la nuit à 37°C en chambre humide. Les lames sont ensuite rincées dans du PBS puis contre-colorées par hématoxyline de Meyer pendant 20 secondes puis rincées à l'eau.

Produit	Concentration
Ferrocyanure	5mM
Ferricyanure	5mM
Sodium phosphate	40mM
NaCl	150mM
mgCl	2mL
Eau	40ml pour 50 ml de solution finale
HCl	Jusqu'à pH6
Solution X-Gal	40mg/ml

Tableau 7 : Composition de la solution X-Gal préparée en extemporanée

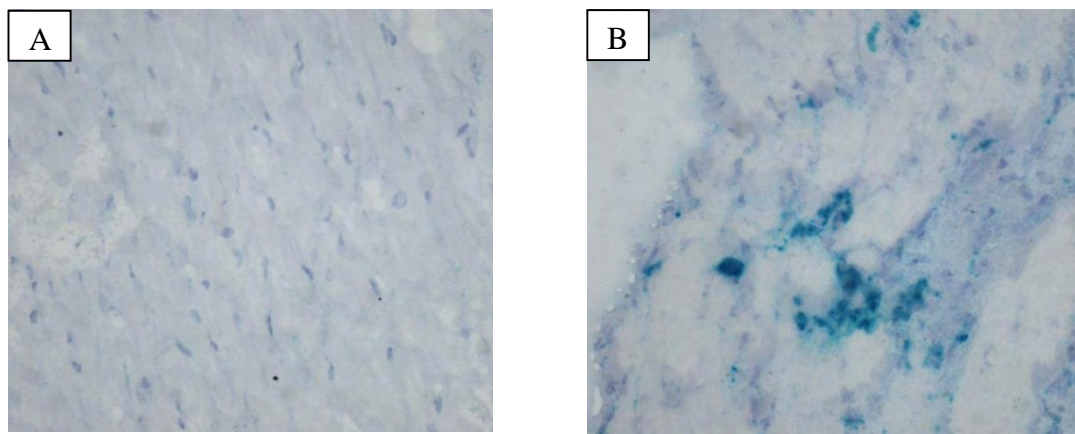


Figure 24 : Coloration cyto-chimique par la β -galactosidase à pH 6.

Marquage obtenu sur cryocoupes de myocarde chez la souris NTG et TG de 20 semaines

A : Souris NTG 20 semaines. Absence de marquage par la β -galactosidase à pH 6, B : Souris TG 20 semaines. Marquage en bleu de la β -galactosidase à pH 6 au niveau d'une zone de fibrose.

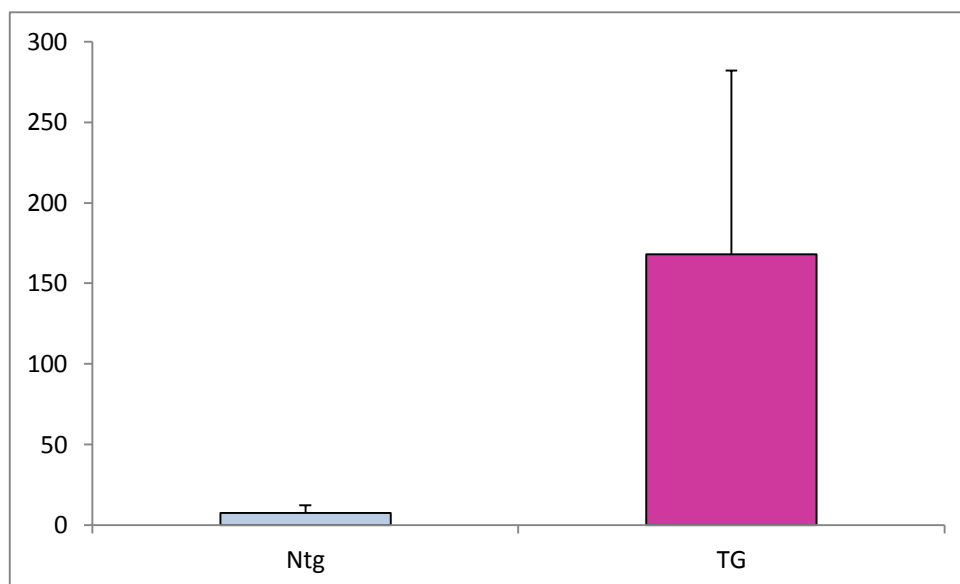


Figure 25 : Représentation graphique du nombre absolu de cellules colorées par la β -galactosidase à pH 6 chez la souris NTG et TG.

Souris NTG (n = 4) et TG (n=5) à 20 semaines.

L'ensemble des cellules marquées a été compté manuellement sans discrimination entre cardiomyocytes et cellules non cardiomyocytaires. La barre d'erreur représentant l'écart à la moyenne illustre l'extrême hétérogénéité de la coloration entre les différentes souris.

IX ANNEXE 2

	KO		TG		NTG	TG	TG clorgyline
	young	old	6 semaines	30 semaines	24 semaines	24 semaines	24 semaines
épaisseur de mur postérieur en systole (cm)	0,117	0,125	0,094	0,077	0,089	0,083	0,094
épaisseur du septum en systole	0,109	0,127	0,101	0,087	0,09	0,098	0,104
FR	37,679	39,027	24,807	12,95	19,851	16,473	25,312
FE	74,289	75,433	55,642	32,423	45,877	39,38	56,562

Tableau 8 : Données échographiques des différentes souris analysées

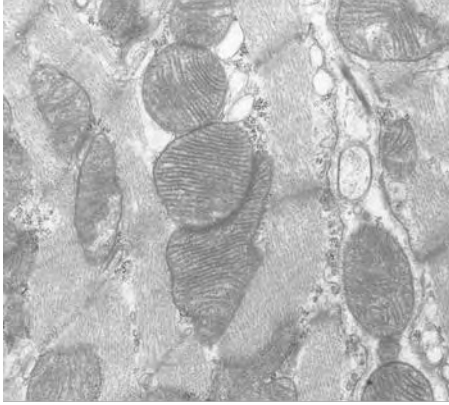
WT				
Souris	âge	poids souris (g)	poids cœur (g)	C/S
1	Young	24,6	0,12	0,50
2		27,6	0,13	0,47
3		20,9	0,09	0,44
4		19,6	0,09	0,46
5		25,6	0,12	0,47
6		18,3	0,09	0,49
moyenne		22,77	0,11	0,47
1	old	48,70	0,39	0,80
2		54,35	0,25	0,46
3		39,45	0,25	0,63
4		36,40	0,17	0,46
moyenne		44,73	0,26	0,59

Tableau 9 : Poids des souris WT et de leur cœur

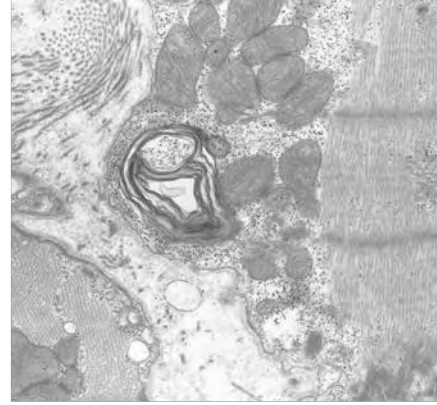
Rats	âge	poids rats (g)	poids cœur (g)	C/R
1	3 mois	375	1,1	0,29
2		402	1,1	0,27
3		423	1,2	0,28
4		443	1,2	0,27
5		409	1,1	0,27
6		457	1,2	0,26
moyenne		418,17	1,15	0,28
1	12 mois	640	1,6	0,25
2		567	1,4	0,25
3		563	1,5	0,27
4		652	1,5	0,23
5		622	1,5	0,24
6		585	1,4	0,24
moyenne		604,83	1,48	0,25
1	23 mois	556	1,6	0,29
2		693	2	0,29
3		715	1,6	0,22
4		596	1,4	0,23
5		735	1,7	0,23
6		718	1,9	0,26
moyenne		668,83	1,70	0,25

Tableau 10 : Poids des rats et de leur cœur

X ANNEXE 3



3 mois



23 mois

Figure 26 : Aspect ultrastructural des mitochondries chez le rat jeune et le rat âgé

(Photographies prises à GX 17 000). On note chez le rat âgé une mitochondrie endommagée avec aspect concentrique des crêtes.

XI ANNEXE 4

Travaux réalisés en collaboration avec l'équipe 8 ; Professeur J-M Senard I2MC
INSERM UMR 1048

Circulation research, 2012

Ephrin-B1 is a novel specific component of the lateral membrane of the cardiomyocyte and is essential for the stability of cardiac tissue architecture cohesion

Gaël Genet * , Céline Guilbeau-Frugier * , Benjamin Honton, Etienne Dague, Michael D. Schneider, Christelle Coatrieux, Denis Calise, Christelle Cardin, Cécile Nieto, Bruno Payré, Caroline Dubroca Pauline Marck, Christophe Heymes, Alexandre Dubrac, Dina Arvanitis, Fabien Despas, Marie-Françoise Altié, Marie-Hélène Seguelas, Marie-Bernadette Delisle, Alice Davy, Jean-Michel Sénard, Atul Pathak, Céline Galés.

Short title : Role of ephrin-B1 in cardiomyocyte architecture

Authors' affiliations :

Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR 1048, (G.G, B.H., C.C., F.D., M.F.A., M.H.S., J.M.S., A.P., C.G., A.D., D.C.; C.D.; P.M.; C. H), Department of Histopathology (C.G.F, M.B.D) and of Clinical Pharmacology (F.D., J.M.S., A.P.), Toulouse University Hospital , CNRS; LAAS, ITAV-UMS3039 (E.D.), Centre de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie, Rangueil Medical faculty (C.N., BP), Development biology center, CNRS, UMR 5547 (D.A., A.D.), Paul Sabatier University Toulouse III, France. National Heart and Lung Institute, British Heart Foundation Centre of Research Excellence, Imperial College London, London, UK (M.D.S.).

Authors contributions :

* G.G. and C.G.F. contributed equally to this work

Corresponding author: Dr Galés Céline.

Address : Inserm U1048 Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires - I2MC 1, avenue Jean-Poulhès - BP84225 31432 Toulouse cedex 4 France

Phone : 33-5-61-32-29-21

Fax : 33-5 62 17 25 54

Email : celine.gales@inserm.fr

The authors declared that no conflict of interest exists.

Abstract

Rationale Cardiac tissue cohesion relying on highly ordered cardiomyocytes (CM) interactions, is critical since most cardiomyopathies are associated with tissue remodelling and architecture alterations.

Objective : Eph/ephrin system constitutes a ubiquitous system coordinating cellular communications which recently emerged as a major regulator in adult organs. We examined if eph/ephrin could participate in cardiac tissue cyto-organization.

Methods and Results : We reported the expression of cardiac ephrin-B1 in both endothelial cells and for the first time in CMs where ephrin-B1 localized specifically at the lateral membrane. Ephrin-B1 knock-out (KO) mice progressively developed cardiac tissue disorganization with loss of adult CM rod-shape and sarcomeric and intercalated disk structural disorganization confirmed in CM-specific ephrin-B1 KO mice (cKO). CMs lateral membrane exhibited abnormal structure by electronic microscopy and, notably increased stiffness by atomic force microscopy. In wild-type CMs, ephrin-B1 interacted with claudin-5/ZO-1 complex at the lateral membrane while the complex disappeared in KO/cKO mice. Ephrin-B1 deficiency resulted in decreased mRNA expression of CM basement membrane components and disorganized fibrillar collagen matrix, independently of classical integrin/dystroglycan system. KO/cKO mice exhibited increased left ventricle diameter and delayed atrioventricular conduction. Under pressure overload stress, KO mice were prone to death and exhibited striking tissue disorganization correlating with heart failure. Finally, failing CMs displayed downregulated ephrin-B1/claudin-5 gene expression linearly related to the ejection fraction.

Conclusions: Ephrin-B1 is necessary for cardiac tissue architecture cohesion by stabilizing the adult CM morphology through regulation of its lateral membrane. Since decreased ephrin-B1 associated with molecular/functional cardiac defects, it could represent a new actor in the transition toward heart failure.

Key Words: cardiomyocyte – extracellular matrix – lateral membrane – cardiac tissue architecture – heart failure

Non standard Abbreviations and Acronyms

AAB Ascendant Aortic Banding

AFM Atomic Force Microscopy

CM Cardiomyocyte

EC EndothelialCell

ECM Extracellularmatrix

HF Heartfailure

I-B4 Isolectine-B4

ID IntercalatedDisk

KO Knock-out

TAC Trans Aortic Banding

WGA Wheat Germ Agglutinin

WT Wild-Type

Introduction

The heart constitutes a particular compact organ relying on strong tissue architecture cohesion and tight cellular interactions that ensure both mechanical and electrochemical coupling. Thus, most cardiopathies are associated with cardiac tissue remodelling and with alterations in architecture involved in disease progression toward heart failure (HF). Despite considerable advances in the field and development of effective drugs, HF still remains a prevalent condition associated with high morbidity and mortality rates. This could be in part explained by still imperfect knowledge of molecular basis at the origin of HF. In fact, to date, most research has focused on cardiomyocyte (CM) contractile dysfunction but has essentially ignored the importance of modifications in CM interactions with their environment in the cardiac tissue. Thus, a thorough analysis of CM interactions involved in the stability of cardiac tissue architecture may help in the identification of new potential therapeutic targets for prevention and treatment of cardiac remodelling leading to heart failure.

Functional adult CMs are organized within the tissue through both cell-cell interactions involving end-to-end contacts via the intercalated disk (ID) and cell-matrix interactions through receptors localized along the sarcolemma. Together, these structures control connections of contractile myofilaments to the plasma membrane of the CM and have garnered attention due to their involvement in cardiac diseases^{1,2}. Despite numerous junctions present at the ID have been well characterized³, little is known regarding the molecular nature of lateral membrane components. To date, only integrin and sarcoglycan systems specifically connecting contractile apparatus of the CM to the extracellular matrix (ECM) have been described^{4,5}.

Eph receptor tyrosine kinases and their membrane-bound ligands ephrins form an essential intercellular communication system associated with cytoskeleton regulations⁶. In the last few years the role of Eph/ephrin system has been extensively investigated mainly in developing tissues, including the central nervous and vascular system. Eph/ephrins have been implicated in various processes including neuronal network formation, guidance of migrating cells, axonal pathfinding but also in the regulation of angiogenesis^{7,8}. More recently, Eph/ephrins have been shown to be major actors in the pathophysiology of cancer⁹. So far, little is known regarding their putative roles in adult tissue but they have been reported to participate in modulation of bone remodelling¹⁰ and insulin secretion¹¹. Finally, their role in the control of cell-cell interactions has been underlined in kidney¹² and crystalline lens¹³ emphasizing the importance of ephrin system in maintaining tissue

architecture.

A role for EphA3 receptor has been identified in heart development and morphogenesis at the embryonic stage ¹⁴. Only a descriptive study reported the Eph/ephrin system expression in adult mouse heart ventricles and investigated the role of EphB4 on the contraction synchronization in fetal cardiomyocytes ¹⁵. Mutations in the ephrin-B1 gene in humans have been associated with Cranio Frontonasal Syndrome which is characterized by craniofacial dysmorphies with some of the mutations associated also with cardiomyopathy ¹⁶. Moreover, several studies have reported specific ephrin-B1 regulation of cellular junctions such as gap junctions ¹⁷, tight junctions ¹⁸ and also ECM receptors ^{19 20}. All of these junctions are important regulators for cell and tissue cohesion and are altered in different models of cardiomyopathy. Thus, we decided to explore the potential cardiac role of ephrin-B1.

In the present study, using an ephrin-B1 knockout (KO) mouse model (*efnb1*^{-/-}), we identified ephrin-B1 as a new structural protein specific for the lateral membrane of the CM involved in adult cardiac tissue architecture stabilization. Using a wide array of approaches from light and electron microscopy, Atomic Force Microscopy and biochemical measurements to in vivo functional assays, we show that the lack of ephrin-B1 leads to cardiac tissue alterations that may predispose to pathological responses under cardiac stress

Methods

An expanded methods section is available in the Online Data Supplement.

Statistical analysis. All data represent the mean \pm S.E.M. of 3 to 10 independent experiments as indicated. Statistical significance of the data was assessed using unpaired 2-tailed Student's t test ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, ns, non significant). In some cases, Chi square test was used instead (Kaplan-Meier curves).

Results

Ephrin-B1 is largely expressed in cardiac muscle and is specific of the endothelial cell and the lateral membrane of the mature adult cardiomyocyte

We first assessed the expression of ephrin-B1 in adult heart from wild-type (WT) mice. Western-blot analysis revealed abundant and specific expression of ephrin-B1 in whole cardiac tissue extracts (Figure 1A). Fluorescence imaging of heart cryosections revealed that ephrin-B1 was expressed in all heart compartments (left and right ventricles, septum) (not shown). Cell membrane Wheat Germ Agglutinin (WGA) co-staining showed that the protein was specifically expressed at the lateral membrane of cardiomyocytes (CMs) with no expression in the intercalated disk (ID) (Figure 1 B-C). Similar pattern of ephrin-B1 expression was obtained in CMs from adult rat cardiac tissue (Online Figure I, A). Beside CM staining, ephrin-B1 was also detected in endothelial cells (ECs) as previously described¹⁵, from both micro- and macrovasculature as demonstrated by co-localization with isolectin-B4 (I-B4), a specific EC marker (Figure 1 B-C). Both CMs and ECs staining were completely lost in KO mice demonstrating the specificity for ephrin-B1 cardiac expression and localization (Figure 1B). Compartmentalizations of ephrin-B1 at both lateral membrane of CMs and ECs were further confirmed by immunogold electron microscopy (Figure 1D). Interestingly, ephrin-B1 localization in the CM was regulated during postnatal myocardial maturation period (3 weeks). Indeed, ephrin-B1 was totally absent from the lateral membrane of the CM the first postnatal days when it was only expressed in the nucleus (Online Figure I, A), while its expression at the lateral membrane correlated with the final adult CM maturation step, most likely indicating a specific role of this protein after birth in the lateral membrane of the mature CM. By opposition, ephrin-B1 expression/localization in adult ECs was already detected in ECs immediately after birth (Online Figure IB).

Ephrin-B1 knockdown disrupts cardiac tissue architecture cohesion and cardiomyocyte morphology

To understand the role of ephrin-B1 in the mature CM, we analyzed the cardiac phenotype of the general ephrin-B1 KO mice which were previously described²¹. We first undertook a histological analysis using H&E staining of cardiac tissue from WT and KO mice at different development stages (3 weeks and 2 months). Three weeks after birth, there was no evidence for cardiac tissue modification in KO mice compared with WT (Figure 2A, upper). However, at 2 months of age, in contrast to WT hearts characterized by a tight and

strong cohesion between CMs, disorganization of CMs with a “wavy” aspect could be visualized randomly in all heart compartments (septum, right and left ventricle) from KO mice (Figure 2A, middle) with some CMs exhibiting whorled appearance (Figure 2A, lower). These changes were detected in all KO mice, but present focal distribution within the tissue. Thus, ephrin-B1 KO mice developed progressive alteration of the cardiac tissue architecture which correlated with the timing of ephrin-B1 lateral membrane expression in the mature adult CM from WT animals. Morphometric analysis of cell membranes by WGA-staining further confirmed modification of CMs morphology that lost their hallmark rod-shape (Figure 2B). Quantification studies demonstrated significant decrease in cross-sectional area of CMs from KO mice in fixated cardiac tissue (Figure 2C) with no difference in cell density (WT: 10.6 ± 0.7 CMs per mm^2 ; KO: 11.3 ± 1.1 CMs cells per mm^2). In agreement with tissue observations, isolated adult KO CMs displayed a significant reduced short axis while increasing their long axis compared with WT (Figure 2D). Even though KO mice displayed CMs morphology abnormalities, this was not correlated with development of cardiac fibrosis (Online Figure II, A). Aberrant cell differentiation during heart development could not account for morphological CM changes in KO mice, since all 3 weeks-old mice exhibited mature rod-shape CMs and tissue alterations were evident only 2 months after birth. It is noteworthy that despite broad expression of ephrin-B1 in the cardiac capillary network, 2-months old KO mice showed no changes in capillary density as quantified by I-B4 ECs-staining (Online Figure II, B) nor evidence for myocardial necrosis or inflammation as visualized on H&E staining, thus demonstrating integrity and functionality of the cardiac vasculature. Altogether, these results supported a role for ephrin-B1 in the maintenance of adult cardiac tissue architecture essentially by controlling CMs morphology.

Ephrin-B1 regulates the cardiomyocyte lateral membrane structure and suggest its potential role nanomechanical properties through stabilization of claudin-5

Given the specific expression of ephrin-B1 at the lateral membrane of the CM, we questioned whether disturbance of the lateral membrane accounted for the abnormal CM morphology in KO mice. Electron microscopy revealed significant structural alterations of the lateral junction characterized by an abnormal non linear appearance compared with WT mice (Figure 3A). To rule out contribution of other cardiac cell types in the CM phenotype, we generated a cardiomyocyte-specific ephrin-B1 KO mice (cKO) (Online Figure III). In cKO mice, we confirmed lateral membrane disorganization of the CM (Online Figure IV,

A). In correlation with the alteration of the CM lateral membrane structure, atomic force microscopy (AFM) study revealed a significant 3 fold increase of Young Modulus (Elasticity) in CMs from KO mice ranging from 35.5 ± 6.4 kPa to 62.4 ± 13.1 kPa compared with 12.5 ± 1.3 kPa to 21.3 ± 3.6 kPa in WT mice (Figure 3B), thus indicating that the lack of ephrin-B1 in the CM increased the stiffness of the lateral membrane. It must be noticed that the repartition of Young Modulus was very homogeneous throughout the lateral membrane of WT CMs, while it showed high heterogeneity in KO CMs as represented by the larger distribution of young modulus frequency (Figure 3B, lower panels), most probably reflecting different levels of morphology modifications at the lateral membrane surface.

To understand the molecular basis accounting for this phenotype and given the interaction of the lateral membrane of the CM with the extracellular matrix (ECM), CM-matrix interactions predominantly regulated by integrin- and dystroglycan-based complexes were first analyzed. We found that localization (Online Figure V, A) and expression (Online Figure V, B) of both $\beta 1$ -integrin and β -sarcoglycan/ α -dystroglycan (glycosylation) complex along the plasma membrane were unchanged in hearts from KO mice compared to WT as shown by immunofluorescence and immunoblot staining respectively, thus demonstrating regular and functional CM-matrix junction complexes in the absence of ephrin-B1. We looked then at the tight junction transmembrane protein claudin-5, a specific endothelial cell tight junction component, which was previously localized at the lateral membrane of the CM and whose downregulation correlated with similar modification of lateral membrane structure in mice models of cardiomyopathy to that observed in ephrin-B1 KO mice²². We confirmed the presence of claudin-5 in the microcirculation and along the lateral membrane of CMs in control hearts (Figure 3C; Online Figure IV, B) and did not detect any labelling in the ID. Specific expression of claudin-5 at the lateral membrane of the CM was more readily detectable in rat heart (Online Figure V, C). By contrast, claudin-5 was completely absent from the lateral membrane in both general and conditional ephrin-B1 KO mice (Figure 3C and Online Figure IV, B) and showed specific downregulation as revealed by the significant decrease in protein (Figure 3D), and gene expression level (Figure 3E), thus suggesting specific regulation of claudin-5 by ephrin-B1. Similarly, the intracellular scaffolding claudin-associated-protein ZO-1, which was detected at both lateral membrane and ID in CMs from control hearts (Figure 3C, left panel and Online Figure IV, C), disappeared from the lateral junction in KO and cKO mice (Figure 3C and Online Figure IV, C). However, ZO-1 further accumulated in the ID as evidence by the significant increase in ZO-1 fluorescent staining (Figure 3C, WT: 112.0 ± 6.2 fluorescence/pixel², KO: 138.3 ± 8.2 fluorescence/pixel², means \pm SEM, $P < 0.05$). Relocalization of ZO-1 was further

supported by the lack of modification of ZO-1 protein (Figure 3D) and gene expression (Figure 3E). Altogether, these results supported a role for ephrin-B1 in the stabilization of claudin-5/ZO-1 junctional complex at the lateral membrane of the CM. The regulation of claudin-5 by ephrin-B1 at the lateral membrane most likely relates to a direct mechanism since both claudin-5 and its ZO-1 partner were found associated with ephrin-B1 in isolated CMs as shown by co-immunoprecipitation (Figure 3F) and claudin-5 could directly interact with ephrin-B1 in BRET experiments (Figure 3G). Specific destabilization of claudin-5/ZO-1 complex in ephrin-B1 KO mice most likely preceded and initiated the lateral membrane disorganization of the CM. Indeed, lack of claudin-5 at the lateral membrane was evident in all CMs from 2 month-old KO mice while modification of their lateral membrane structure was only focal at same age. It follows that ephrin-B1 may regulate the morphology of the CM by controlling lateral membrane structure through a mechanism involving the specific adhesion protein claudin-5.

Ephrin-B1 knockdown impairs basement membrane of the cardiomyocyte and fibrillar collagens organization

Because CMs are anchored to the ECM through their lateral membrane and ephrin-B1 KO mice exhibited structural alteration of the lateral membrane, we examined the morphology of cardiac ECM from KO and WT mice by electron microscopy. In contrast to the well-organized pattern in WT, the basement membrane and the fibrillar collagen bundles were highly disorganized in the KO mice (Figure 4A) as well as in cKO mice (Online Figure IV, D), most likely indicating destabilization of the overall ECM structure. Interstitial space separating two adjacent CMs was irregular in all ephrin-B1KO/cKO mice (Figure 4A, Online Figure IV, D). These modifications correlated well with those of the lateral membrane as they are detectable only in CMs showing high levels of lateral membrane defects. Abnormalities of the ECM structure observed in KO mice most likely related to an impairment of expression of all ECM components/regulators by the CM since their expression levels were all dramatically reduced as measured by quantitative qPCR (Figure 4B). However, the reduced expression of interstitial fibrillar collagens and degradation ECM system by the CM did not impact their expression in the whole cardiac tissue (Online Figure VI). This most probably related to the contribution of the other cardiac cells in the synthesis of the ECM components. In agreement with these observations, we didn't notice any modifications of cardiac collagen I and III levels between WT and KO mice as previously indicated (Online Figure II, A). By contrast, basement membrane components of the CM are

specific for the myocyte cell only. Given the importance of the basement membrane in controlling cell morphology, these results suggest that ephrin-B1 maintains lateral membrane morphology of the adult CM by a new mechanism involving regulation of its interaction with the basement membrane. This specific CM-matrix interaction underlies a novel role in the stabilization and organization of the cardiac ECM.

Ephrin-B1 knockdown results in abnormal intercalated disk and sarcomeric structure

Because lateral membrane of the CM is directly connected at both end to the ID which anchors myofilaments, we next examined whether modifications of the lateral membrane in these mice impacted on the different cell-cell junctions of the ID and the sarcomeric apparatus. In opposition to WT mice characterized by ID-components from adherent junction (N-cadherin), desmosomes (desmoplakin 1/2) and gap junctions (connexin-43) regularly organized along the ID (Figure 5A), these proteins demonstrated a significant spatial disorganization of all in the KO mice showing irregular spread dots labelling along a wider ID with no modification of their expression levels (Online Figure VII, A-C). These modifications most likely emanated from ultrastructural alterations of the ID as shown by the higher degree of circumvolution of the ID in electron micrographs from KO hearts (Figure 5B). Beside abnormal ID structure, there was not clear abnormality in the ID space between CMs from WT and KO mice (Online Figure VII, D) nor apparent disorganization in the electron-dense structures associated with the ID or in the myofilaments attachments at these locations. Generally, alteration of proteins directly participating in ID structure influences expression of other ID components²³. Thus, modification of ID morphology without any modulation of associated-junctional components most likely indicates an indirect consequence of ephrin-B1 deletion linked to the lateral membrane destructuration.

Ephrin-B1 deficient CMs displayed misalignment of both their myofibrils as indicated by rhodamine-phalloïdin staining (Figure 5C, upper panels) despite no change in the total amount of β -actin (Figure 5D). In correlation with myofibrils structure defects, α -actinin staining also revealed Z-lines misalignment (Figure 5C, lower panels) associated with significant loss of α -actinin expression (Figure 5D). These changes were detected in all 2 month-old KO mice but still exhibited focal localization within the heart tissue most likely reflecting an indirect consequence of ephrin-B1 deletion at the lateral membrane. Similar Z-

lines misalignment was reported in mice models with deletion of intermediate filament desmin or desmin-associated proteins^{24 25}. However ephrin-B1 KO phenotype is unlikely to be related to desmin deregulation since desmin expression and attachment to Z-lines was preserved (Online Figure VIII, A and B). Finally, despite structural changes in the myofilaments in KO mice, we did not observe any modification of microtubule networks as indicated by similar expression and distribution of tubulin in CMs from WT and KO mice (Online Figure VIII, C and D). Electron microscopy confirmed structural sarcomeric disorganization that could account for disruption of myofibrillar organization (Figure 5E). Indeed, KO mice exhibited high heterogeneity of their sarcomeres morphology (Online Figure VIII, E-G) together with a lack of actin-enriched I-bands in all sarcomeres (Figure 5E) despite no modification of total actin expression (Figure 5D), most likely indicated relaxed aspect of the sarcomere. Similar ultrastructural abnormalities of sarcomeric apparatus have been observed in the cKO mice (Online Figure IV, E). Again, modification of sarcomeric structure of CMs from KO mice without major modification of its integrity more probably related to indirect consequences of the deletion of ephrin-B1 rather than a direct role of this protein in the contractile apparatus *per se*.

Ephrin-B1 knockdown results in left ventricle chamber dilation and cardiac electrical conduction impairment

To test whether ephrin-B1 played a role in cardiac physiology, we analyzed the cardiac phenotype of *efnb1*^{-/-} mice. At 2 months of age, ephrin-B1 deficient mice (KO, cKO) displayed no difference in heart-to-body weight ratio compared with respective controls (Table 1, upper). Interestingly, echocardiography analysis revealed significant intraventricular dilation in ephrin-B1 KO mice as shown by significant enlargement of the left ventricle at end diastole (LVEDD) with no change in left ventricular wall dimensions (DPWT) or gross alterations in systolic contractile performance compared with WT (Table 1, middle). Enlargement of LVEDD was confirmed in cKO mice but with further significant decrease of IVSTd and DPWT (Table 1, middle). Beside cardiac morphology and contractile function, electric properties of the heart were investigated by electrocardiography. Although depolarization and repolarization of the KO ventricle were normal (QRS complex and QT interval), both *efnb1*^{-/-} KO and cKO mice exhibited significant bradycardia associated with a decrease of the atrioventricular conduction as evidenced by a prolonged PR interval compared with WT mice (Table 1, lower). Taken together, these data indicated that the specific absence of ephrin-B1 in the CM promoted defects in both heart morphology and

conduction.

Ephrin-B1 knockdown confers mice hypersensitivity to pressure overload

Given high modifications of cardiac tissue cohesion detected in *enfb*^{-/-} mice, we assessed its adaptive response to biomechanical stress imposed to the left ventricle under conditions of high blood pressure after ascending aortic banding (AAB) as previously described²⁶. Remarkably, 59 % of the ephrin-B1 KO mice died 24 hrs following AAB, compared with no death in the WT group (Figure 6A). While we are uncertain why ephrin-B1 KO mice perished, banded mice that survived developed significant higher hypertrophy response compared with WT after 30 days of AAB as indicated by higher variation of cross-sectional area of myocytes from KO banded (Figure 6 B) and higher variations in interventricular septum (IVST) or LV posterior wall thickness (DPWT) (Online Figure IX, A, Online Table 1 through 3) measured before and after AAB. Interestingly, we measured similar fetal reprogramming and development of reparative fibrosis in KO and WT mice (Online Figure IX, B and C), most likely indicating that the increased hypertrophy detected in KO mice was more related to the morphological defect of the CMs only and not to an increased gene-related compensatory response. This is further supported by the lack of differences in HW/BW ratio between KO and WT mice after AAB. Interestingly, although systolic function was not significantly different 30 days after AAB between WT and KO mice, high EF variability was noticed exclusively in KO, with some animals showing high EF reduction (Figure 6C) correlating with LVEDD dilatation (Figure 6D), thus indicating that ephrin-B1 deletion predisposed to failure. More striking feature of cardiac tissue from KO banded animals came from histomorphologic analysis that revealed fundamental tissue disarray with loss of CM integrity that reminisces that of human patient with end-stage HF²⁷. Myocytes intersect at various angle and showed whorled appearance, thus indicating a lack of CMs stability within the tissue (Figure 6E, H&E). Modifications in interstitial collagens I and III could not account for the instability of CMs since their gene expression levels were similar in both WT and KO cardiac tissue (Online Figure IX, D). Myofibrils can be seen running in different directions (Figure 6E, H&E, left-middle). Cardiac tissue demonstrated signs of CMs necrosis characterized by cellular swelling, disruption of myofibrils, loss of nuclei and cytoplasmic details and inflammatory cells in close contact to cell debris (Figure 6E, H&E, right). Modifications of CMs were largely evident on WGA-heart sections staining (Figure 6E, WGA). Phenotypic changes of cardiac tissue from KO banded mice also included high dilatation and disorganization of the vessels from the microcirculation which were crossing and interrupting orientation of CMs in the myocardium (Figure 6E, I-B4) despite no change in the capillary network density (Online Figure IX, E). We found high heterogeneity of these features in all KO mice. Interestingly,

morphologic cardiac tissue disorganization correlated perfectly with loss of cardiac performance since KO banded mice demonstrating worst shortening fraction exhibited the more dramatic cardiac tissue architecture disarray. In correlation with a putative role of ephrin-B1 in transition toward heart failure, we found that encoding genes for ephrin-B1 and its cognate claudin-5 partner were significantly reduced in CMs from a mouse model of Trans aortic constriction (TAC)-induced heart failure (Figure 6F, Online Table 4) and that ephrin-B1 gene expression positively correlated with EF (Figure 6G). Thus, cardiac expression of ephrin-B1 is essential for early survival after severe pressure overload and represents a negative regulator of associated cardiac architecture disorganization.

Altogether, these results highlighted the importance of ephrin-B1 in the adaptative response to pressure overload in the transition toward cardiac failure.

Discussion

In this study, we identify ephrin-B1 as a novel component of the lateral membrane of the adult CM. General loss of ephrin-B1 leads to a progressive disorganization of cardiac tissue architecture associated with adult CM morphology defects directly related to the absence of ephrin-B1 at CM the lateral membrane as demonstrated in the conditional cardiomyocyte-specific ephrin-B1 KO mouse model. Ephrin-B1 controls CM morphology through stabilization of the lateral membrane by a novel mechanism most likely involving its interaction with the ECM independently of the mechanotransduction systems. Cardiac architecture abnormalities are associated with an increased left ventricle diameter and delayed atrio-ventricular conduction. Finally, although the absence of ephrin-B1 did not modify compensatory adaptation to pressure overload stress, it precipitates cardiac tissue disorganization classically observed in human HF. These data clearly indicate that ephrin-B1 is an important regulator cardiac tissue architecture that could be involved in cardiac pathologies.

Ephrin-B1 deficiency leads to specific morphological and molecular modification of the lateral membrane of the CM associated with subsequent modifications of the intercalated disk and sarcomeric apparatus structure and loss of ECM integrity. We propose a model whereby ephrin-B1 stabilizes rod-shape adult CM morphology by regulating specific interactions between the lateral membrane and the ECM and thus the tension force distribution at the cell surface (Figure 7). Accordingly, in the absence of ephrin-B1, the CM shrinks and lengthens as a consequence of lateral membrane destabilization thus increasing membrane stiffness as demonstrated by AFM studies. In WT mice, the lateral tension generated by the cell-matrix interaction within the CM could play an indirect role in stretching both sarcomeric apparatus and the ID (Figure 7). To date, only ECM receptors localized all along the sarcolemma of the CM acting were identified as direct lateral tensors for sarcomeres^{1 28-30}. Thus, the lack of ephrin-B1 induces detachment of the lateral membrane from the ECM and as a consequence compresses the ID. As a consequence of ID compaction and because ID structure is known to anchor and stretch myofibrils, CMs exhibit myofibrils misalignment, irregular sarcomere size and loss of visible actin thin strand I-band. Similar modifications have been observed in transgenic mouse models with modifications of ID structure²³. Finally, misalignment of Z-lines in CMs from *efn1b*^{-/-} mice despite the lack of modification in desmin filaments also mostlikely related to the loss of lateral tension at the cell membrane. Thus, the decrease of CM width may probably indirectly relax the desmin network attached to the lateral membrane thus mimicking CM of features observed

in the absence of desmin^{24 25}.

Previous studies have already suggested a role for ephrin-B1 in the maintenance of cytomorphology of epithelial cells in the adult kidney¹² as well as for other members from the eph/ephrin family in different tissues^{13 14}. However, our data provide first evidence for its importance in stabilization of cardiac tissue architecture independently of cell-cell interaction given the absence of CMs connection through the lateral membrane where it is specifically expressed. Several studies have proposed a role for ephrin-B1 independently of its trans interaction with its cognate Eph receptor³¹, for instance by directly interacting in cis with claudin proteins, a core component of the tight junction. Similarly, ephrin-B1 was found to directly interact with claudin-5 in adult CMs to stabilize its localization at the lateral membrane. Unexpectedly, the presence of claudin-5 in the absence of tight junctions at the lateral membrane suggests a new role for claudin-5. The unusual presence of claudin proteins in non-junctional cell membranes was already reported with some isoforms interacting with unrelated transmembrane receptors^{32,33}. However, the functional significance of claudin proteins apart from the intercellular tight junction is currently unknown. Similar observations have already been described for gap junction core components, connexins, another class of adhesion molecule, outside the gap junction, where they exhibit new functions³⁴. The fact that the ephrin-B1/claudin-5 complex was localized all along the plasma membrane could argue for its specific role in directly connecting the lateral membrane of the CM to the ECM. However, whether ephrin-B1 or claudin-5 could act as a direct receptor for ECM components has never been shown. Nevertheless, our observations argue for a new role for ephrin-B1 in stabilization of claudin adhesion molecules at the plasma membrane independently of tight junctions.

Ephrin-B1 expression at the lateral membrane of the CM occurs only following the first postnatal days and only during the CM terminal differentiation process (postnatal days 1 to 20) when it acquires its characteristic rod-shaped morphology. Because the lateral membrane of the adult CM is required for maintenance of its characteristic rod-like shape, its modification in the ephrin-B1 KO mice could alter the paving shape of the CM as readily observed. Nevertheless, if ephrin-B1 actively participates in the establishment of the lateral membrane and thus the adult CM morphology, one would have expected that in its absence, CMs would never achieve their characteristic rod shape. This is however unlikely since CMs still achieve their mature rod shape in KO mice as evidenced in 3-week-old animals and show progressive morphological transformation only after 2 months of age, thus highlighting a role for ephrin-B1 independently of the CM maturation initiation process. Therefore, ephrin-B1 more likely plays a role in stabilizing the lateral membrane of the CM subsequently to

lateral membrane set up. In line with this assumption, alteration of the adult CMs morphology in the absence of ephrin-B1 appears progressively only after 2 months of age correlating with ephrin-B1 late timing set up at the lateral membrane of the adult CM. Thus, adult CMs morphology defects detected in ephrin-B1 KO mice strikingly referred to the role of ephrin-B1 at the lateral membrane of the mature CM.

Our study highlights a new mechanism involved in CM-ECM interaction specific to the lateral membrane but independent from the classical integrin and dystroglycan systems establishing physical connections between the ECM and the intracellular contractile machinery. Accordingly, mice exhibiting defects in one of these two systems clearly demonstrate specific cardiac contractility defects³⁵⁻³⁸. By opposition and in agreement with integrin or dystroglycan independent pathways, contractile function was preserved in ephrin-B1 KO mice, thus correlating with the lack of dramatic changes in sarcomeric apparatus core components. Moreover, integrity/functionality of the integrin system in ephrin-B1 KO mice is further supported by the expected classical adaptation to pressure overload known to be directly sensed by integrins. Finally, the lack of integrin or dystroglycan components did not lead to structural abnormalities of the lateral membrane as observed in ephrin-B1 KO mice.

Also, it appears that this specific CM lateral membrane-ECM interaction supports a new structural role for the cardiac tissue architecture in maintaining overall integrity of both CMs and the ECM. Similar pattern of ECM disorganization has been already described in hearts from mice lacking collagen XV expression which connects basement membrane of the CM to the fibrillar matrix³⁹. The fact that *efn1b*^{-/-} mice exhibited considerable downregulation of all the components of the basement membrane of the CM most probably arised from a consequence of the disruption of lateral membrane/ECM interaction rather than a direct role on basement membrane synthesis per se. In agreement with this hypothesis, 3 weeks old-KO mice show preserved rod-shaped polarized CMs, thus demonstrating the integrity of matrix synthesis at this stage. Similar feedback regulation on laminin synthesis has been already described after disruption of integrin-ECM interaction⁴⁰. Because cellular basement membrane dictates cell morphology, the progressive defects in basement membrane production in ephrin-B1-deficient CMs most probably droved the progressive modification of their rod-shape. The lack of basement membrane components could explain the CMs slippage and thus the tissue architecture disorganization observed following biomechanical stress. Finally, disruption of CM-ECM integrity at the lateral membrane leading to a general lack of cardiac tissue cohesion could account for the increase of the left ventricle diameter measured in KO mice.

One striking feature of *efnb1*^{-/-} mice is their high susceptibility to dazzling death following pressure overload despite higher hypertrophic response, thus suggesting some sort of inadaptation. Although we are not able to determine the exact defect, the observation that KO mice exhibit a delayed atrioventricular conduction together with the morphologic modification of the intercalated disk in CMs with abnormal distribution of connexin 43 could indicate increased arrhythmogenic susceptibility in these mice following pressure overload stress. In line with this assumption, recent study showed the importance of heterogeneous connexin 43 distribution in the development of ventricular arrhythmias⁴¹. The observation that *efnb1*^{-/-} mice exhibit high heterogeneous responses to pressure overload is also quite intriguing. However, this could be easily explained by the fact that these mice exhibited only focal disorganization of the cardiac tissue at 2 months of age. This is further supported by the histological examination of cardiac tissue from banded KO mice which showed high variations in the degree of cardiac tissue disarray, even if all mice presented these modifications while they were absent in WT mice. Finally, we cannot exclude that disorganization of cardiac vessels detected in KO banded mice is also a contributing factor to death. Further studies using targeted ephrin-B1 deletion will be necessary to explore this hypothesis.

Of interest, our study provided evidence that lack of ephrin-B1 at the CM lateral membrane clearly influences the morphology of the adult CM and its elastic properties. It follows that ephrin-B1 most probably enforces a physical constraint to stabilize the lateral membrane and, in its absence, the CM is more susceptible to external/internal pressures which will directly impact on the CM morphology. This is perfectly illustrated by morphological changes observed in KO and cKO mice exhibiting ventricle dilatation without any modifications of HW/BW, nor reduction in CMs numbers or interstitial ECM. Similarly, this could explain peculiar adaptation of the KO mice during aortic banding with exacerbated increase of CMs area while fetal gene reprogramming and changes in HW/BW are similar to those observed in WT mice.

The exacerbated hypertrophic morphology of the CMs correlating with high tendency to HF in KO banded mice with similar fetal reprogramming and fibrotic compensatory response compared with WT mice, suggests that the intrinsic physical properties of the CM lateral membrane can influence by itself the progression of pathological hypertrophy toward HF independently of the classical hypertrophic reprogramming. In line with this hypothesis, phenotype of banded cardiac tissue from *efnb1*^{-/-} mice reminisces that of human end-stage HF exhibiting high tissue disorganization and loss of CM integrity. Moreover, ephrin-B1 and claudin-5 gene expression were considerably downregulated in

CMs from HF mice model. Similar lack of claudin-5 expression was already reported in end-stage HF patients⁴². Finally, EF in mice is directly correlated to the level of ephrin-B1 gene expression.

In summary, we described a previously uncharacterized specific component of the CM lateral membrane, ephrin-B1, which acts as a stabilizer of the CM morphology and the overall cardiac tissue cohesion. Interestingly, ephrin-B1 interacts specifically with claudin-5 which was found to be downregulated in dystrophic mice models or in human end-stage cardiomyopathy^{22,42}. Given our results showing interactions between ephrin-B1 and claudin-5, one might expect similar dysregulation of ephrin-B1 in human cardiomyopathies. In line with this hypothesis, mouse model of DCM associated with claudin-5 downregulation demonstrated similar structural alterations of the lateral membrane as seen in the ephrin-B1 KO mice²². Moreover, *efnb1* gene is subjected to large number of mutations in patients with craniofrontonasal syndrome with some patients exhibiting cardiopathy¹⁶. However, since the role of ephrin-B1 at the adult stage is still new, no study correlating human *efnb1* mutations and the development of cardiomyopathies have been yet performed. To date, HF candidate genes concentrated on proteins involved in regulation/composition of CM contractile apparatus. Our KO model is characterized by an unusual disorganization of the overall cardiac contractile apparatus without classical features observed in models of contractile dysfunction (i.e loss of contractile components, calcium pathway contractile regulators...). Lack of contractile dysfunction in young KO mice suggest the need for future studies in older animal to clarify whether ephrin-B1 is involved in the pathogenesis of cardiomyopathy.

We propose that ephrin-B1, and more generally, structural components of the CM lateral membrane, could directly be involved in occurrence of HF, thus suggesting a novel pathway which needs to be explored beside the classical hypertrophic/ fibrotic one.

Acknowledgements

We thank Dr. T. Hébert, J.L. Samuel and B. Swynghedauw for critical reading of the manuscript; Dr R. D'Angelo, JJ Maoret and Childerick Severac for advice and technical assistance regarding imaging (Cellular Imaging Facility IFR150, Rangueil, TRI Platform), qPCR (IFR150-BMT, Quantitative Transcriptomic Platform) and Atomic Force microscopy experiments (Bionanotechnologies platform, Institut des technologies Avancées en sciences du Vivant (ITAV) UMS 3039) respectively.

Sources of funding

This work was supported by BQR grant from Toulouse III Paul Sabatier University (France). MDS is supported by the British Heart Foundation Simon Marks Chair in Regenerative Cardiology and BHF Centre of Research Excellence.

Disclosures

None

References

1. L. Collagen XV is necessary for modeling of the extracellular matrix and its deficiency predisposes to cardiomyopathy. *Circ Res.* 2010;107:1241-1252.
2. Aumailley M, Pesch M, Tunggal L, Gaill F, Fassler R. Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in (beta)1 integrin-deficient embryoid bodies Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G. Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2006;70:422-433.
3. Li J, Patel VV, Radice GL. Dysregulation of cell adhesion proteins and cardiac arrhythmogenesis. *Clin Med Res.* 2006;4:42-52.
4. Noorman M, van der Heyden MA, van Veen TA, Cox MG, Hauer RN, de Bakker JM, van Rijen HV. Cardiac cell-cell junctions in health and disease: Electrical versus mechanical coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47:23-31.
5. Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res.* 2004;94:1023-1031.
6. Samarel AM. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H2291-2301.
7. Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:475-486.
8. Kuijper S, Turner CJ, Adams RH. Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17:145-151.
9. Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell.* 2008;133:38-52.
10. Merlos-Suarez A, Battle E. Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20:194-200.
11. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Suda T, Matsuo K. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab.* 2006;4:111-121.
12. Konstantinova I, Nikolova G, Ohara-Imaizumi M, Meda P, Kucera T, Zarbalis K, Wurst W, Nagamatsu S, Lammert E. EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell.* 2007;129:359-370.
13. Ogawa K, Wada H, Okada N, Harada I, Nakajima T, Pasquale EB, Tsuyama S. EphB2 and ephrin-B1 expressed in the adult kidney regulate the cytoarchitecture of

- medullary tubule cells through Rho family GTPases. *J Cell Sci.* 2006;119:559-570.
14. Cooper MA, Son AI, Komlos D, Sun Y, Kleiman NJ, Zhou R. Loss of ephrin-A5 function disrupts lens fiber cell packing and leads to cataract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:16620-16625.
 15. Stephen LJ, Fawkes AL, Verhoeve A, Lemke G, Brown A. A critical role for the EphA3 receptor tyrosine kinase in heart development. *Dev Biol.* 2007;302:66-79.
 16. Ishii M, Mueller I, Nakajima T, Pasquale EB, Ogawa K. EphB signaling inhibits gap junctional intercellular communication and synchronized contraction in cultured cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol*;106:1057-1068.
 17. Twigg SR, Matsumoto K, Kidd AM, Goriely A, Taylor IB, Fisher RB, Hoogeboom AJ, Mathijssen IM, Lourenco MT, Morton JE, Sweeney E, Wilson LC, Brunner HG, Mulliken JB, Wall SA, Wilkie AO. The origin of EFNB1 mutations in craniofrontonasal syndrome: frequent somatic mosaicism and explanation of the paucity of carrier males. *Am J Hum Genet.* 2006;78:999-1010.
 18. Davy A, Bush JO, Soriano P. Inhibition of gap junction communication at ectopic Eph/ephrin boundaries underlies craniofrontonasal syndrome. *PLoS Biol.* 2006;4:e315.
 19. Lee HS, Nishanian TG, Mood K, Bong YS, Daar IO. EphrinB1 controls cell-cell junctions through the Par polarity complex. *Nat Cell Biol.* 2008;10:979-986.
 20. Huynh-Do U, Stein E, Lane AA, Liu H, Cerretti DP, Daniel TO. Surface densities of ephrin-B1 determine EphB1-coupled activation of cell attachment through α 5 β 3 and α 5 β 1 integrins. *Embo J.* 1999;18:2165-2173.
 21. Huynh-Do U, Vindis C, Liu H, Cerretti DP, McGrew JT, Enriquez M, Chen J, Daniel TO. Ephrin-B1 transduces signals to activate integrin-mediated migration, attachment and angiogenesis. *J Cell Sci.* 2002;115:3073-3081.
 22. Davy A, Aubin J, Soriano P. EphrinB1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes Dev.* 2004;18:572-583.
 23. Sanford JL, Edwards JD, Mays TA, Gong B, Merriam AP, Rafael-Fortney JA. Claudin-5 localizes to the lateral membranes of cardiomyocytes and is altered in utrophin/dystrophin-deficient cardiomyopathic mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:323-332.
 24. Li J, Patel VV, Kostetskii I, Xiong Y, Chu AF, Jacobson JT, Yu C, Morley GE, Molkenin JD, Radice GL. Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. *Circ Res.* 2005;97:474-481.
 25. Konieczny P, Fuchs P, Reipert S, Kunz WS, Zeold A, Fischer I, Paulin D, Schroder

- R, Wiche G. Myofiber integrity depends on desmin network targeting to Z-disks and costameres via distinct plectin isoforms. *J Cell Biol.* 2008;181:667-681.
26. Wang X, Osinska H, Dorn GW, 2nd, Nieman M, Lorenz JN, Gerdes AM, Witt S, Kimball T, Gulick J, Robbins J. Mouse model of desmin-related cardiomyopathy. *Circulation.* 2001;103:2402-2407.
 27. Lairez O, Calise D, Bianchi P, Ordener C, Spreux-Varoquaux O, Guilbeau-Frugier C, Escourrou G, Seif I, Roncalli J, Pizzinat N, Galinier M, Parini A, Mialet-Perez J. Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:587-595.
 28. Silver MDG. *Chapter 10 - cardiomyopathies* 2001.
 29. Danialou G, Comtois AS, Dudley R, Karpati G, Vincent G, Des Rosiers C, Petrof BJ. Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury. *Faseb J.* 2001;15:1655-1657.
 30. Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res.* 2004;301:1-7.
 31. Ross RS, Borg TK. Integrins and the myocardium. *Circ Res.* 2001;88:1112-1119.
 32. Arvanitis D, Davy A. Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev.* 2008;22:416-429.
 33. Gregory M, Dufresne J, Hermo L, Cyr D. Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. *Endocrinology.* 2001;142:854-863.
 34. Harris HJ, Davis C, Mullins JG, Hu K, Goodall M, Farquhar MJ, Mee CJ, McCaffrey K, Young S, Drummer H, Balfe P, McKeating JA. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem.* 2000;275:21092-21102.
 35. Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:285-294.
 36. Barresi R, Di Blasi C, Negri T, Brugnani R, Vitali A, Felisari G, Salandi A, Daniel S, Cornelio F, Morandi L, Mora M. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J Med Genet.* 2000;37:102-107.
 37. Milner DJ, Taffet GE, Wang X, Pham T, Tamura T, Hartley C, Gerdes AM, Capetanaki Y. The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:2063-2076.
 38. Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, Masaki T, Toyo-oka T, Hanaoka F. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of

- disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:13873-13878.
39. Shai SY, Harpf AE, Babbitt CJ, Jordan MC, Fishbein MC, Chen J, Omura M, Leil TA, Becker KD, Jiang M, Smith DJ, Cherry SR, Loftus JC, Ross RS. Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure. *Circ Res*. 2002;90:458-464.
40. Rasi K, Piuhola J, Czabanka M, Sormunen R, Ilves M, Leskinen H, Rysa J, Kerkela R, Janmey P, Heljasvaara R, Peuhkurinen K, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Vajkoczy P, Pihlajaniemi T, Eklund. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 2:259-268. 16
41. Boulaksil M, Winckels SK, Engelen MA, Stein M, van Veen TA, Jansen JA, Linnenbank AC, Bierhuizen MF, Groenewegen WA, van Oosterhout MF, Kirkels JH, de Jonge N, Varro A, Vos MA, de Bakker JM, van Rijen HV. Heterogeneous Connexin43 distribution in heart failure is associated with dispersed conduction and enhanced susceptibility to ventricular arrhythmias. *Eur J Heart Fail*.
42. Mays TA, Binkley PF, Lesinski A, Doshi AA, Quaile MP, Margulies KB, Janssen PM, Rafael-Fortney JA. Claudin-5 levels are reduced in human end-stage cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45:81-87.

Table 1. Morphometry and cardiac function of 2 month-old ephrin-B1 WT and KO mice, and of 2 month-old control and c KO mice.

	WT	KO	<i>control</i>	c KO
<i>Mice morphometry</i>	(n=13)	(n=18)	(n=6)	(n=6)
BW (g)	30.5 ± 4.7	30.0 ± 3.9	25.5 ± 0.2	25.1 ± 0.6
HW (mg)	149 ± 2	152 ± 2	153 ± 4	146 ± 3
HW/BW (mg/g)	4.9 ± 1.0	5.0 ± 0.4	6.0 ± 0.2	5.9 ± 0.2
LW (mg)	188 ± 2	183 ± 2	151 ± 4	143 ± 3
LW/BW (mg/g)	6.2 ± 0.7	6.2 ± 1.2	5.9 ± 0.1	5.7 ± 0.1
<i>Echocardiography</i>	(n=13)	(n=18)	(n=6)	(n=6)
IVSTd (mm)	0.83 ± 0.06	0.85 ± 0.07	0.86 ± 0.02	0.80 ± 0.01*
DPWT (mm)	0.86 ± 0.07	0.84 ± 0.08	0.90 ± 0.02	0.80 ± 0.01**
LVEDD (mm)	3.01 ± 0.29	3.41 ± 0.38**	3.17 ± 0.05	3.48 ± 0.05**
LVESD (mm)	2.01 ± 0.25	2.25 ± 0.37	2.13 ± 0.06	2.28 ± 0.07
FS (%)	33.3 ± 3.9	34.4 ± 5.3	33.9 ± 1.2	34.2 ± 1.7
EF (%)	68.7 ± 5.5	69.7 ± 7.1	69.7 ± 1.3	70.0 ± 2.2
<i>Electrocardiography</i>	(n=20)	(n=17)	(n=8)	(n=9)
RRi (ms)	172 ± 4	191 ± 6***	132 ± 2	144 ± 3*
PR (ms)	35.4 ± 1.3	39.4 ± 1.1***	37.3 ± 0.5	42.4 ± 1.3*
QRS (ms)	11.7 ± 0.4	11.9 ± 0.8	12.4 ± 1.1	12.8 ± 0.6
QTc (ms)	51.6 ± 3.2	48.5 ± 2.1	51.0 ± 1.7	54.7 ± 2.3

W, body weight; HW, heart weight, LW, lung weight; IVSTd, interventricular septum thickness in diastole; LVEDD, left ventricle end of diastole diameter; DPWT, diastolic posterior wall thickness; LVESD, left ventricle end-systole diameter; FS, fractional shortening; EF, ejection fraction, RRi, RR interval duration; PR, atrio-ventricular conduction time; QRS, complex duration; QTc, duration of QT corrected using Bazett formula.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Localization of ephrin-B1 in the WT mouse heart. (A) Western blot analysis of ephrin-B1 protein levels in cardiac tissue from 2-month old WT mice. Ephrin-B1 cannot be detected in ephrin-B1 KO mice. GAPDH expression was used as reference. (B) Immunofluorescence (IF) localization of ephrin-B1 in hearts from 2 month-old WT and KO mice at the plasma membrane of CMs (1), and micro-(2), macrovasculature (3). Specific ephrin-B1 staining is lost in KO mice. (C) IF co-localization of ephrin-B1 with CMs lateral membrane and with ECs as shown by Wheat-Germ-Agglutinin (WGA) (C, upper) and Isolectin-B4 (I-B4) (C, lower) staining respectively in WT mice. Ephrin-B1 is absent from the intercalated disk (C, upper, inset). (D) Ephrin-B1 immunogold labeling confirmed its localization all along the CM lateral membrane (left) and in EC (right). bars: 20 μm (B and C), 5 μm (C, upper, inset), 1 μm (D).

Figure 2. Progressive cardiac tissue architecture disarray and adult CM morphology alteration in ephrin-B1 KO mice. (A) H&E staining of cardiac tissue from 3-week and 2-month old mice showed cardiac tissue disarray in KO mice starting at 2 months of age. (B) WGA- IF staining highlighted loss of rod-shape morphology of CMs in KO mice at 2 months of age. (C) CMs area from 2-month old mice were measured on WGA-stained heart sections and showed significant decrease of cross-sectional area of CMs from KO mice (n=3-5 per mice lineage group, 50-60 CMs per mouse). (D) CMs isolated from 2-month old KO mice displayed a long axis increase and short axis decrease. (n=2 mice per lineage group, 150-180 CMs per mouse). Scale bars: 50 μm (A and B), 15 μm (B, insets), 100 μm (D).

Figure 3. Ephrin-B1 stabilizes the lateral membrane structure and stiffness of the CM through a claudin-5 dependant mechanism. (A) Electron microscopy shows high disorganization of the lateral membrane in CMs from KO mice. (B) (Upper panel) Representative single Indentation curve (plain line) from AFM studies performed on WT (blue, n=3 mice, 4 CMs per mouse, 470 total curves) or KO (red, n=3 mice, 4 CMs per mouse, 528 total curves) living CMs. In both cases, the Hertz model (dotted line) fitted quite well with experiment. (Lower panel) Distribution of the Young Modulus (Elasticity) was homogeneous in WT CMs whereas KO mice exhibited a high standard deviation (larger E distribution). (C) Immunofluorescence analysis revealed that ephrin-B1 KO mice lost claudin-5 and ZO-1 proteins localization at the lateral membrane of CMs while delocalizing in the ID and showed (D) specific downregulation of claudin-5 protein expression (n=6-7 per mice lineage group) and (E) gene expression (n=6 per mice lineage group; ns) as assessed

by western-blot and qPCR analysis respectively. (F) Ephrin-B1 immunoprecipitation experiments (IP +) followed by western blot analysis on isolated CMs demonstrated the existence of complexes between ephrin-B1, claudin-5 and ZO-1 in WT mice as indicated. Note the lack of ephrin-B1, ZO-1 or claudin-5 immunodetection in KO mice. (IP -), control IP experiments performed in the absence of ephrin-B1 antibody. (G) BRET experiments in HEK-293T cells showed specific direct interaction between ephrin-B1 and claudin-5 compared with controls (Soluble GFP2 or α 2A transmembrane receptor) (n=3). Scale bars: 1 μ m (A), 50 μ m (C), 25 μ m (C, insets).

Figure 4. Extracellular matrix defects in ephrin-B1 2-month old KO mice. (A) Electron micrographs of interstitial space between lateral membrane of two CMs from WT and KO mice. Note high basement membrane disarray (left, Arrowheads) and fibrillar collagens (right, Arrows) and nonfibrillar protein deposit (asterisks) disorganization in KO mice. (B) Comparative qPCR analysis revealed significant decrease of mRNA expression levels of proteins from basement membrane, interstitial ECM (fibrillar collagens), and ECM degradation system (matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)) in total RNA extracts from isolated CMs

from KO mice. (n=6-10 per mice lineage group). Scale bars: 0.2 μ m (A).

Figure 5. Ephrin-B1 KO mice exhibited disorganized intercalated disk (ID) and sarcomeres. (A) Immunofluorescence localization of adherent junction (N-cadherin, upper), desmosomes (desmoplakin 1/2, middle) and gap junction (connexin 43, lower) in heart sections from 2-month old mice revealed an irregular dot-spot localization of the proteins along the ID in KO mice. (B) Distortion of ID ultrastructure could be observed in KO mice (inset highlights simplistic representation of ID morphology). (C) Immunofluorescence staining of myofilaments (Rhodamine-phalloidin) or Z-lines (α -actinin) in heart cryosections from 2-month old mice indicated myofibrils and Z-lines misalignment in KO mice correlating (D) with downregulation of α -actinin protein expression as shown by Western blot analysis in whole cardiac tissue extracts. No modification of total actin levels was detected (n=6-7 per mice lineage group). (E) Ultrastructure of sarcomeres showed loss of I band (WT, arrowheads), misalignment of both myofibrils and sarcomeres in KO mice. Scale bars: 30 μ m (A), 5 μ m (A, insets) 0.5 μ m (B), 10 μ m (C), 3 μ m (C inset), 2 μ m (E), 0.75 μ m (E inset).

Figure 6. Ephrin-B1 is essential for the cardiac adaptation to pressure overload. Two-month old WT or ephrin-B1 KO mice were subjected to ascendant aortic banding

(AAB). (A) Kaplan-Meier survival analysis of WT (n=27) and KO (n=23) mice. (B) CMs area were measured on WGA-stained heart sections and showed significant higher cross-sectional area in KO mice 30 days after AAB (Mean \pm SEM, n=6-12 mice per lineage group; *** $P < 0.001$ versus sham control of the same genotype, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ versus WT of the same group, unpaired 2-tailed Student's t test). (C) Echocardiographic measurements of ejection fraction (EF) or (D) LVEDD 30 days after AAB showed high heterogeneity in KO mice compared with WT with some mice developing heart failure (Mean and experimental points, n=23 WT, n=18 KO). (E) H&E staining of heart sections from WT or KO banded mice identified high disorganization of cardiac tissue architecture in KO mice. Note intersected and whorled CMs (left, middle) as well as CMs necrosis (right, dot-lines, arrowheads). Cell membranes WGA-staining of heart sections confirmed CMs disarray in the myocardium of KO mice. Endothelial cells I-B4 staining of heart sections also identified microcirculation disorganization with some capillaries crossing the myocardium in KO mice (arrowheads). (F) Cardiomyocyte *efnb1*^{-/-} and claudin5 gene expression (qPCR) in WT mice submitted to transverse aortic banding (TAC) for 15 days (n=6) or in controls (n=5). (G) Linear regression analysis showing the existence of a relationship between CM *efnb1*^{-/-} gene expression level (qPCR) and EF (echocardiography) in WT mice submitted or not to TAC. Scale bars: 100 μ m (E).

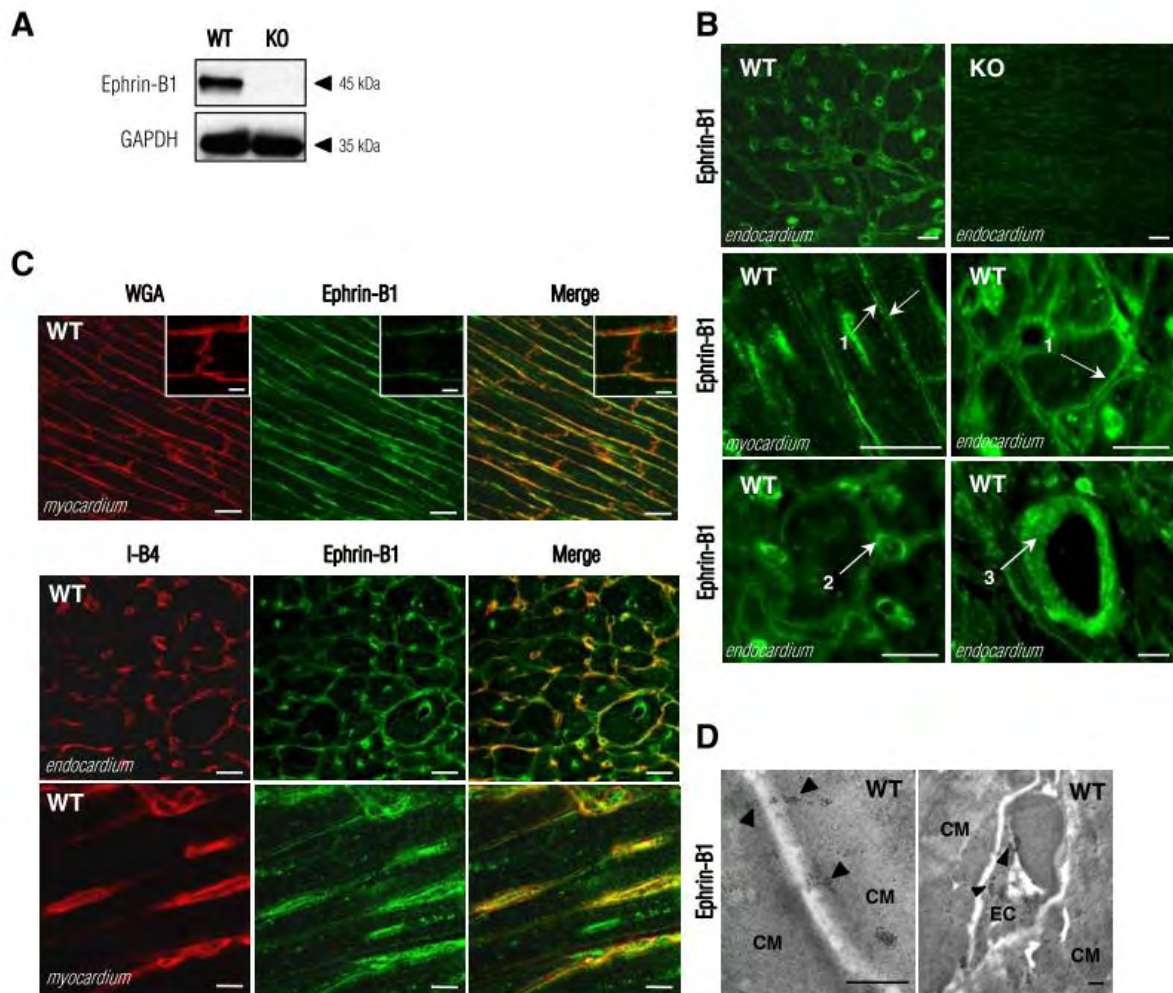


Figure 1. Localization of ephrin-B1 in the WT mouse heart. (A) Western blot analysis of ephrin-B1 protein levels in cardiac tissue from 2-month old WT mice. Ephrin-B1 cannot be detected in ephrin-B1 KO mice. GAPDH expression was used as reference. (B) Immunofluorescence (IF) localization of ephrin-B1 in hearts from 2 month-old WT and KO mice at the plasma membrane of CMs (1), and micro-(2), macrovasculature (3). Specific ephrin-B1 staining is lost in KO mice. (C) IF co-localization of ephrin-B1 with CMs lateral membrane and with ECs as shown by Wheat-Germ-Agglutinin (WGA) (C, upper) and Isolectin-B4 (I-B4) (C, lower) staining respectively in WT mice. Ephrin-B1 is absent from the intercalated disk (C, upper, inset). (D) Ephrin-B1 immunogold labeling confirmed its localization all along the CM lateral membrane (left) and in EC (right). bars: 20 μ m (B and C), 5 μ m (C, upper, inset), 1 μ m (D)

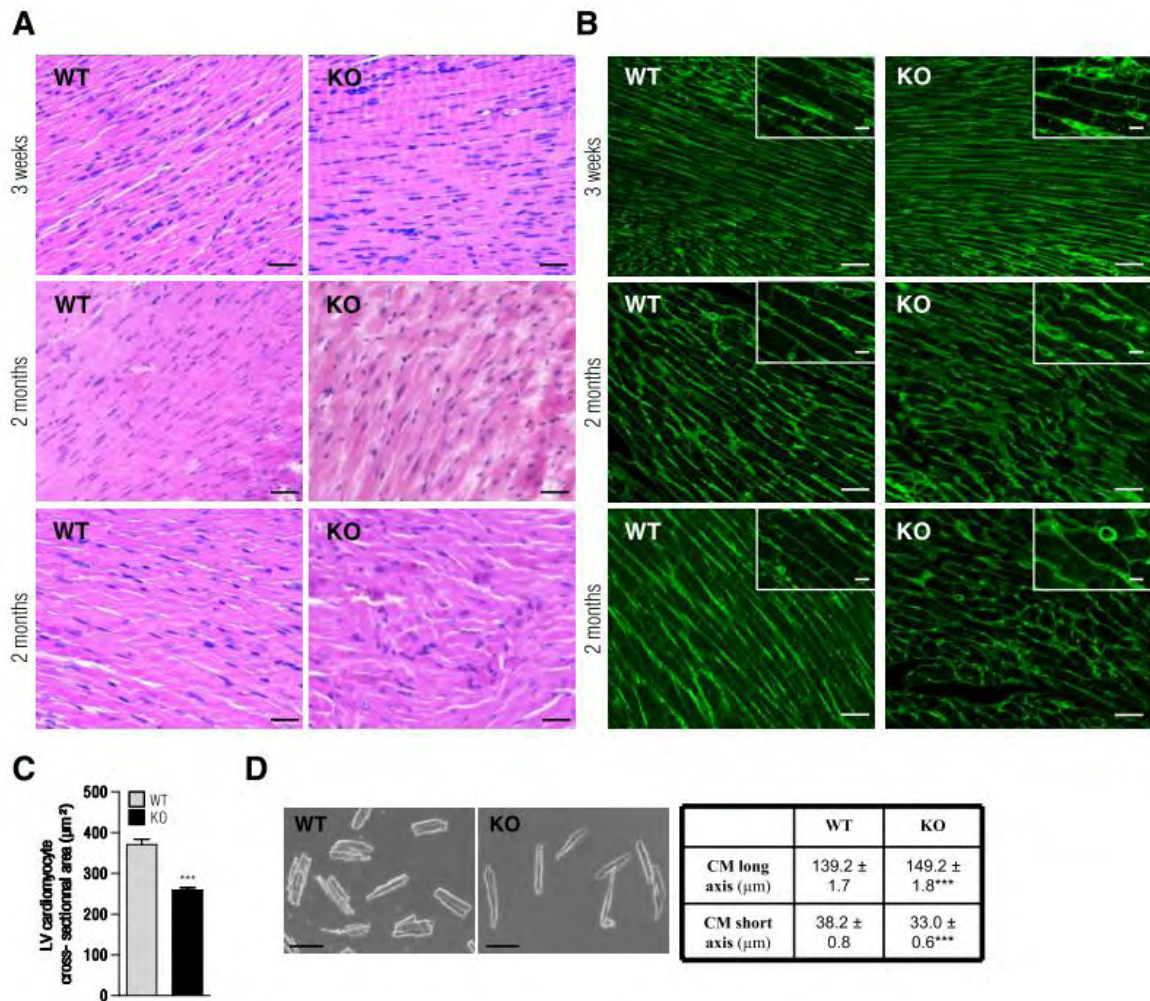


Figure 2. Progressive cardiac tissue architecture disarray and adult CM morphology alteration in ephrin-B1 KO mice. (A) H&E staining of cardiac tissue from 3-week and 2-month old mice showed cardiac tissue disarray in KO mice starting at 2 months of age. (B) WGA- IF staining highlighted loss of rod-shape morphology of CMs in KO mice at 2 months of age. (C) CMs area from 2-month old mice were measured on WGA-stained heart sections and showed significant decrease of cross-sectional area of CMs from KO mice (n=3-5 per mice lineage group, 50-60 CMs per mouse). (D) CMs isolated from 2-month old KO mice displayed a long axis increase and short axis decrease. (n=2 mice per lineage group, 150-180 CMs per mouse). Scale bars: 50 μm (A and B), 15 μm (B, insets), 100 μm (D).

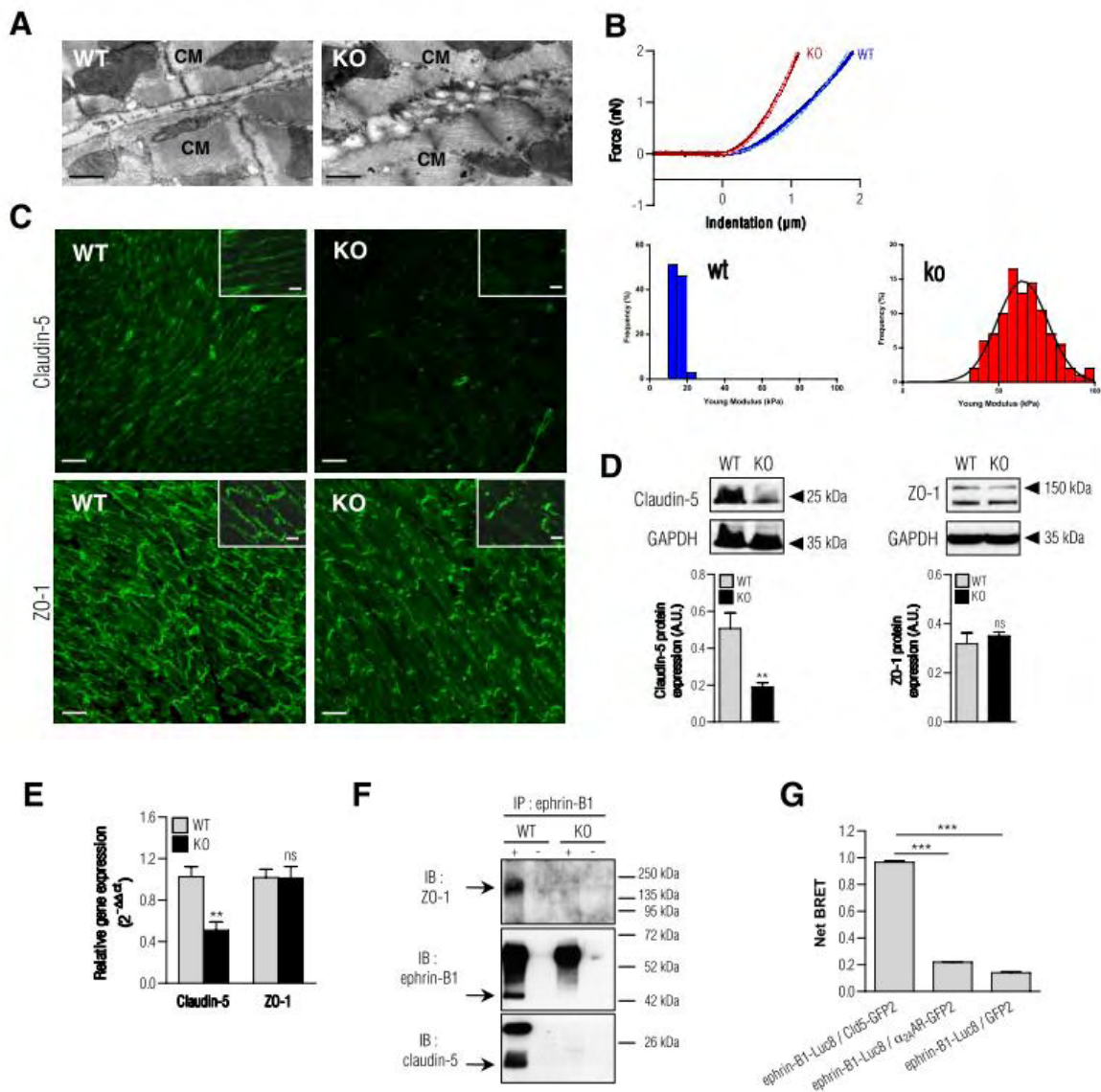


Figure 3. Ephrin-B1 stabilizes the lateral membrane structure and stiffness of the CM through a claudin-5 dependant mechanism. (A) Electron microscopy shows high disorganization of the lateral membrane in CMs from KO mice. (B) (Upper panel) Representative single Indentation curve (plain line) from AFM studies performed on WT (blue, n=3 mice, 4 CMs per mouse, 470 total curves) or KO (red, n=3 mice, 4 CMs per mouse, 528 total curves) living CMs. In both cases, the Hertz model (dotted line) fitted quite well with experiment. (Lower panel) Distribution of the Young Modulus (Elasticity) was homogeneous in WT CMs whereas KO mice exhibited a high standard deviation (larger E distribution). (C) Immunofluorescence analysis revealed that ephrin-B1 KO mice lost claudin-5 and ZO-1 proteins localization at the lateral membrane of CMs while delocalizing in the ID and showed (D) specific downregulation of claudin-5 protein expression (n=6-7 per mice lineage group) and (E) gene expression (n=6 per mice lineage group; ns) as assessed by western-blot and qPCR analysis respectively. (F) Ephrin-B1 immunoprecipitation experiments (IP +) followed by western blot analysis on isolated CMs demonstrated the existence of complexes between ephrin-B1, claudin-5 and ZO-1 in WT mice as indicated. Note the lack of ephrin-B1, ZO-1 or claudin-5 immunodetection in KO mice. (IP -), control IP experiments performed in the absence of ephrin-B1 antibody. (G) BRET experiments in HEK-293T cells showed specific direct interaction between ephrin-B1 and claudin-5 compared with controls (Soluble GFP2 or $\alpha_2\text{A}$ transmembrane receptor) (n=3). Scale bars: 1 μm (A), 50 μm (C), 25 μm (C, insets).

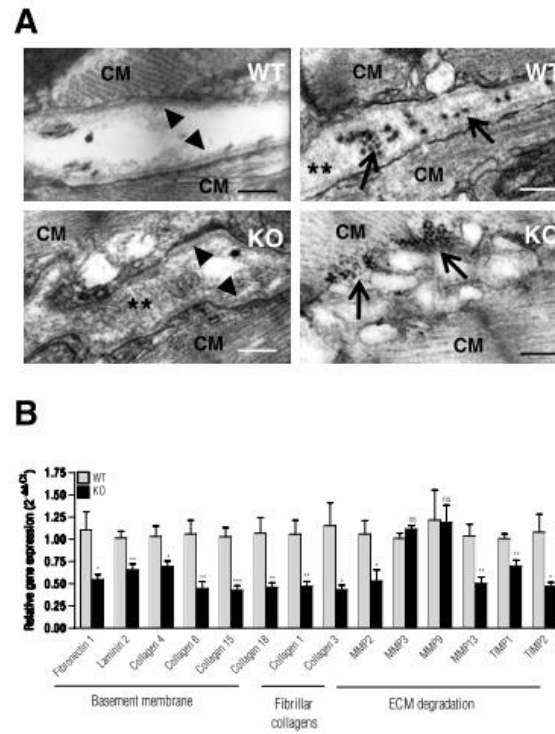


Figure 4. Extracellular matrix defects in Collagen 18Collagen 1ephrin-B1 2-month old KO mice. (A) Electron micrographs of interstitial space between lateral MMP2 membrane of two CMs from WT and KO mice. Note high basement membrane disarray (left, MMP13 Arrowheads) and fibrillar collagens (right, TIMP1 Arrows) and nonfibrillar protein deposit TIMP2 (asterisks) disorganization in KO mice. (B) Comparative qPCR analysis revealed significant decrease of mRNA expression levels of proteins from basement membrane, interstitial ECM (fibrillar collagens), and ECM degradation system (matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)) in total RNA extracts from isolated CMs from KO mice. (n=6-10 per mice lineage group). Scale bars: 0.2 μm (A).

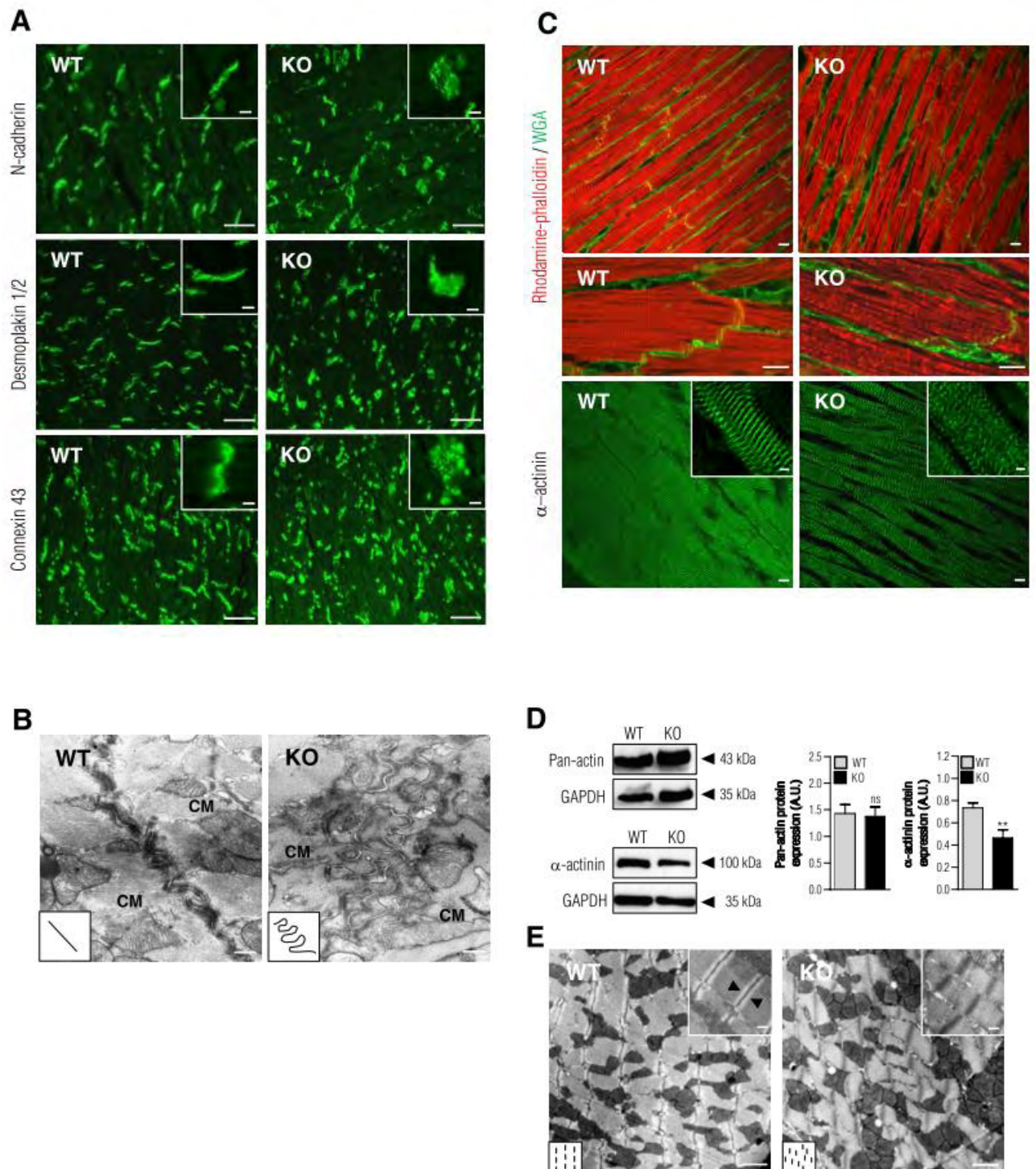


Figure 5. Ephrin-B1 KO mice exhibited disorganized intercalated disk (ID) and sarcomeres. (A) Immunofluorescence localization of adherent junction (N-cadherin, upper), desmosomes (desmoplakin1/2, middle) and gap junction (connexin 43, lower) in heart sections from 2-month old mice revealed an irregular dot-spot localization of the proteins along the ID in KO mice. (B) Distortion of ID ultrastructure could be observed in KO mice (inset highlights simplistic representation of ID morphology). (C) Immunofluorescence staining of myofilaments (Rhodamine-phalloidin) or Z-lines (α -actinin) in heart cryosections from 2-month old

mice indicated myofibrils and Z-lines misalignment in KO mice correlating **(D)** with downregulation of α -actinin protein expression as shown by Western blot analysis in whole cardiac tissue extracts. No modification of total actin levels was detected (n=6-7 per mice lineage group). **(E)**. Ultrastructure of sarcomeres showed loss of I band (WT, arrowheads), misalignment of both myofibrils and sarcomeres in KO mice. Scale bars: 30 μ m (A), 5 μ m (A, insets) 0.5 μ m (B), 10 μ m (C), 3 μ m (C inset), 2 μ m (E), 0.75 μ m (E inset).

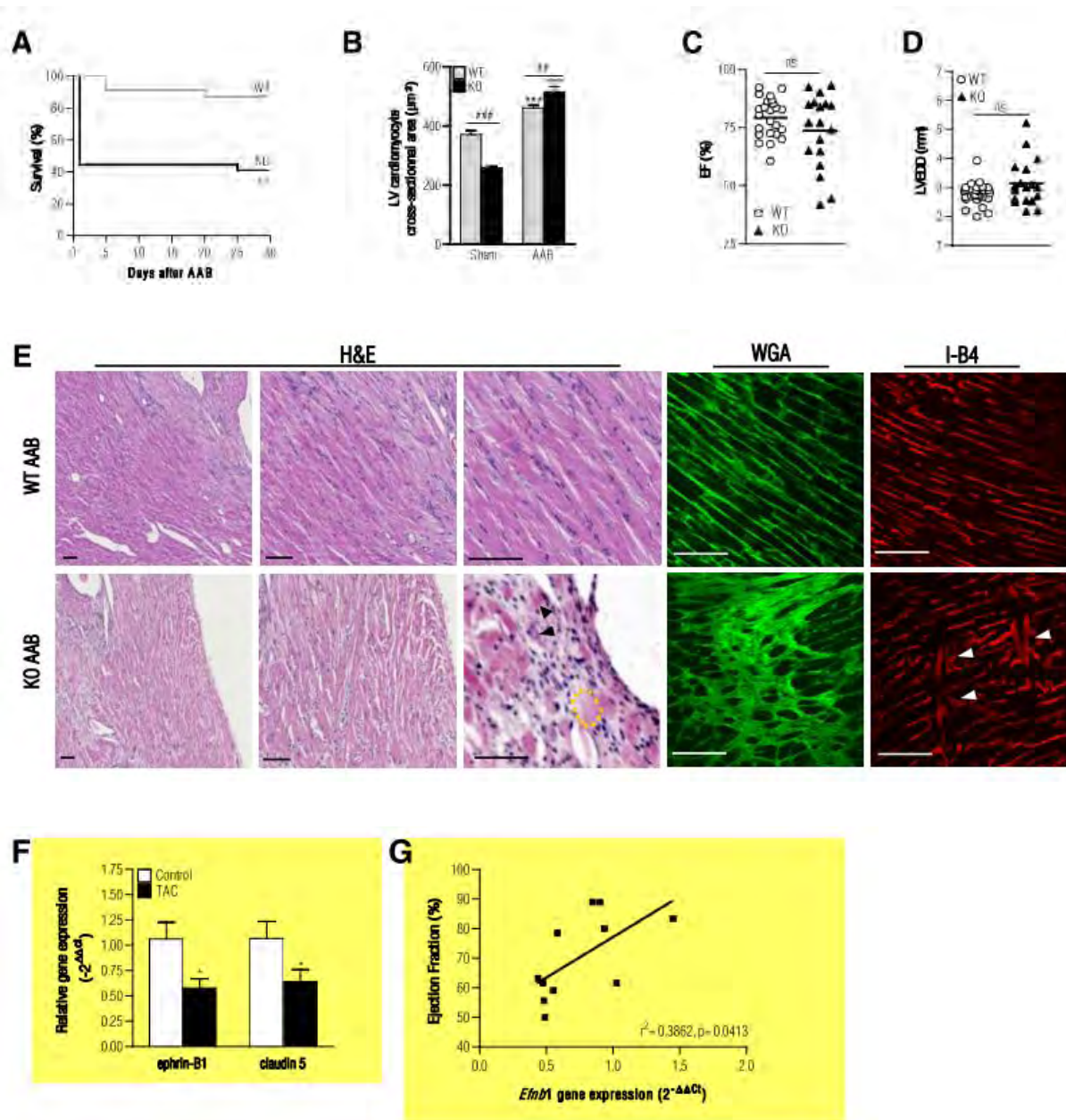


Figure 6. Ephrin-B1 is essential for the cardiac adaptation to pressure overload. Two-month old WT or ephrin-B1 KO mice were subjected to ascendant aortic banding (AAB). **(A)** Kaplan-Meier survival analysis of WT (n=27) and KO (n=23) mice. **(B)** CMs area were measured on WGA-stained heart sections and showed significant higher cross-sectional area in KO mice 30 days after AAB (Mean \pm SEM, n=6-12 mice per lineage group; *** P < 0.001 versus sham control of the same genotype, ## P < 0.01, ### P < 0.001 versus WT of the same group, unpaired 2-tailed Student's t test). **(C)** Echocardiographic measurements of ejection fraction (EF) or **(D)** LVEDD 30 days after AAB showed high heterogeneity in KO mice compared with WT with some mice developing heart failure (Mean and experimental points, n=23 WT, n=18 KO). **(E)** H&E staining of heart sections from WT or KO banded mice identified high disorganization of cardiac tissue architecture in KO mice. Note intersected and whorled CMs (left, middle) as well as CMs necrosis (right, dot-lines, arrowheads). Cell membranes WGA-staining of heart sections confirmed CMs disarray in the myocardium of KO mice. Endothelial cells I-B4 staining of heart sections also identified microcirculation disorganization with some capillaries crossing the myocardium in KO mice (arrowheads). **(F)** Cardiomyocyte *efnb1* and *claudin5* gene expression (qPCR) in WT mice submitted to transverse aortic banding (TAC) for 15 days (n=6) or in controls (n=5). **(G)** Linear regression analysis showing the existence of a relationship between CM *efnb1* gene expression level (qPCR) and EF (echocardiography) in WT mice submitted or not to TAC. Scale bars: 100 μm (E)

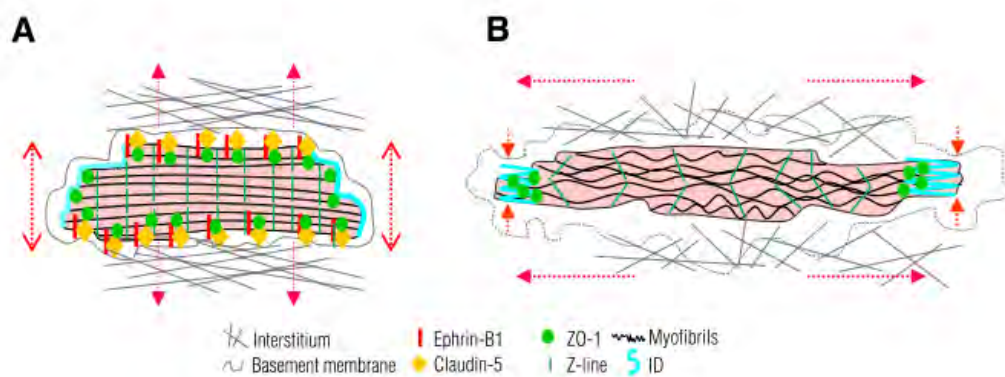


Figure 7. A proposed model for ephrin-B1-mediated stabilization of the adult CM lateral membrane. (A) In normal adult CM, ephrin-B1 interacts with claudin-5/ZO-1 complex and stabilizes its localization at the lateral membrane and the interaction of the lateral membrane with the extracellular matrix, thus exerting mechanical tension and stretching both the ID and Z-lines (Red arrows). This interaction maintains ECM structural integrity. (B) In the absence of ephrin-B1, claudin-5 disappeared from the lateral membrane while ZO-1 delocalized to the ID and the lateral membrane loses anchorage at the ECM. This leads to morphological modifications of the CM characterized by a long axis increase and short axis decrease (Red arrows) which probably accounts for the increased stiffness of the lateral membrane. Altogether, these lateral membrane alterations indirectly impact on ID, Z-lines, basement membrane and interstitial matrix constitution / organization.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Detailed Methods

Animals. *Efnb1* WT and KO mice were kept in a mixed S129/S4 × C57BL/6 genetic background. As described previously¹, in this background, a fraction of hemizygous null males survive to adulthood. Studies were performed only on males from 3 weeks and 2 months of age. All animal procedures were carried out in accordance with the NIH guidelines and were approved by Midi-Pyrénées animal care and use committee.

Generation of cardiomyocyte-specific ephrin-B1 deficient mice. Mice expressing Cre recombinase driven by the α MHC promoter (pure C57BL/6 genetic background) were crossed with *efnb1*^{flox/flox} mice (pure 129S4 genetic background) to create α MHC-Cre-flox/flox *efnb1*^{flox/flox} mice (cKO) or littermate control non-Cre-expressing *efnb1*^{Flox/floxo} mice (control) (mixed C57BL/6×S129/S4 background). Mice carrying a floxed *Efnb1* allele were described previously¹. Both α MHC-Cre and *efnb1*^{flox/flox} mice were provided by M.D. Schneider (Imperial College London, UK) and A. Davy (Development biology center, Toulouse, France) respectively. All experiments using the conditional cardiomyocyte ephrin-B1 KO mice were carried out on males from 2 months of age.

Immunoprecipitation and Western-Blotting. For protein analysis from total cardiac extracts, cardiac tissue samples were directly lysed in RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% NaDoc, 0.1% SDS) in the presence of protease inhibitors cocktail 2(Roche). Immunoprecipitation studies were conducted as previously described² from CMs' lysate. Protein concentration of extracts was determined by the Bradford method (Bio-Rad) and equal amounts of proteins were either immunoprecipitated (2 mg) with monoclonal antibody to ephrin-B1 (R&D) or subjected directly (50 μ g) to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Millipore). Proteins were detected with primary antibodies followed by Horse Radish Peroxydase-conjugated secondary antibodies to goat, mouse, or rabbit IgG (GE Healthcare) using enhanced chemoluminescence detection reagent (GE Healthcare). Proteins quantification was obtained by densitometric analysis using ImageQuant 5.2 software and was normalized to that of GAPDH expression and expressed in arbitrary units (A.U.).

Antibodies. Primary antibodies in this study were : Goat anti-ephrin-B1 (R&D) (It is of note that several commercially available anti-ephrin-B1 antibodies were tested for the ligand detection but only one provided specific staining of the protein as demonstrated by loss of immunodetection in KO mice and this was used for all immunodetection of ephrin-B1); mouse anti- α sarcomeric actinin (Sigma); mouse anti-connexin 43 (Millipore); rabbit anti-N-cadherin (Epitomics); rabbit anti-desmoplakin 1/2 (ARP); mouse anti- β -sarcoglycan (Novacastra); mouse anti- α -dystroglycan (IIH6 clone, Millipore); mouse anti- β 1D integrin (Millipore); mouse anti-ZO-1 (Zymed), rabbit anti-claudin 5 (Acris antibodies); goat anti-pan-actin (SantaCruz); rabbit anti-desmin (Cell Signaling Biotechnology); rabbit anti- α tubulin (Epitomics); mouse anti-GAPDH (Abcam). Secondary antibodies, donkey anti-goat OG-488 Alexa Fluor; goat anti-rabbit OG-488-Alexa Fluor, donkey anti-mouse OG-488 Alexa Fluor, donkey anti-goat Cy3-Alexa Fluor and donkey anti-rat Cy3-Alexa Fluor were all obtained from Invitrogen.

Cell membranes, endothelial cells, nucleus and actin filaments were respectively stained with OG488-conjugated Wheat-Germ-Agglutinin (WGA) (Invitrogen) or OG488-conjugated *Griffonia simplicifolia* isolectin (I-B4) (Invitrogen), TO-PRO-3-iodide (Invitrogen) or tetramethylrhodamine-phalloidine B isothiocyanate (Dako).

Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). Plasmid encoding mouse ephrin-B1 was a generous gift from Dr Alice Davy while mouse claudin-5 was cloned from total RNA extracted from mouse lymphatic endothelial SVEC4-10 cell line before subcloning in 2pcDNA3.1 vector. For BRET² experiments, ephrin-B1 and claudin-5 were both fused to their C-terminal with *Renillia* Luciferase 8 (Luc8) as energy donor (ephrin-B1-Luc8) or GFP2 as energy acceptor (Claudin-5-GFP2) respectively. For BRET experiments, HEK293T cells were transiently transfected using PEI method with plasmids encoding ephrin-B1-Luc8 or Claudin-5-GFP2. Control experiments were performed by transfecting plasmids encoding ephrin-B1-Luc8 together with α 2A-AR (α 2A-AR-GFP2)³ as another unrelated transmembrane receptor or 2soluble GFP2. BRET measurements were carried out using comparable total Luc8 luminescence and GFP2 fluorescence in all transfection conditions and performed as previously described³ using a TECAN INFINITE 500 reader.

Immunohistochemistry and confocal imaging. For histological analysis, hearts were excised and immediately fixed in 10 % formalin, embedded in paraffin and sectioned at 5 μ m for hematoxylin-eosin (H&E) staining. Quantification of cardiac interstitial fibrosis was performed from Masson trichrome -stained paraffin-embedded heart sections using Niselement software (Nikon).

For immunofluorescence studies, heart tissue was embedded in OCT and frozen in liquid nitrogen. Frozen sections (5 μ m) were fixed with ice-cold acetone followed by permeabilization with 0.1 % Triton X-100 in PBS, blocking (Protein Block, Dako) and incubation with primary antibodies in antibody dilution buffer (0.1 % BSA / 0.1 % Tween 20 / 0.5 % Triton X-100 in PBS). Targeted proteins were visualized with appropriate fluorescence-conjugated secondary antibodies in antibody dilution buffer. Images were acquired with an LSM 510 confocal laser scanning microscope equipped with an Axiovert 200M inverted microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). Zo-1 fluorescence was quantified using Nis-Elements BR2.3 (Nikon) software. Fluorescent staining of cell membranes (WGA), endothelial cells (I-B4) or actin filaments (phalloidine) were performed on paraffin-embedded heart sections.

Transmission Electron Microscopy (TEM). Heart samples were fixed with 2% glutaraldehyde in Sorensen's buffer. Post-fixation was performed in 1% OsO₄ in Sorensen's buffer for 1 hr followed by dehydration in ethanol and propylene oxide and embedding in epoxy resin (Epon 812). Ultrathin sections (70 nm) were mounted on 100 mesh collodion-coated copper grids and counterstained with 3% uranyl acetate in 50% ethanol and 8.5% lead citrate before being examined on a HU12A Hitachi electron microscope at 75 KV.

For immunogold staining, tissues were first fixed in 0.1% glutaraldehyde / 2% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), washed with 3,5% sucrose and 0.5 M ammonium chloride in 0.1M phosphate buffer. They were finally washed in 0.05 M maleate buffer and prestained with 2% uranyl acetate aqueous solution. Samples were washed with maleate buffer followed by dehydration in ethanol gradients and then embedded in HM20 resin. After 48 hours of UV-polymerisation, ultrathin sections (70 nm) were mounted on 150 mesh collodion-coated gold grids. Grids were then saturated PBS / 5% BSA and incubated in the presence of anti-ephrin-B1 antibody followed by incubation with secondary gold-labelled anti-goat antibody (10 nm nanogold particles). Grids were finally counterstained with 3% uranyl acetate in 50% ethanol before being examined on a HU12A Hitachi electron microscope at 75 KV.

Cardiomyocytes isolation. For gene expression quantification, ventricular adult CMs were isolated from adult 2 month-old mice using the Langendorff perfusion method as previously described⁴. Briefly, hearts were quickly removed from the chest after euthanasia and the aorta retroperfused with a Ca²⁺-free bicarbonate-based buffer containing 1mg/ml

collagenase (Worthington type II). Following enzymatic digestion, dispersed myocytes were filtered through a 150 µm mesh and harvested after 10 min sedimentation. After rinsing, cells were frozen and further used for RNA purification. For Atomic Force Microscopy, immediately after isolation, CMs were plated 20 min on Laminin (Invitrogen) coated plates in CM culture medium (MEM, 5% Fetal Calf Serum, 100 U.mL⁻¹ Penicilin, 2 mM.L⁻¹ Glutamin) supplemented with 10 mM 2,3-butanedione monoxime (BDM) to inhibit cell contraction.

Measurement of cardiac myocytes surface area and microvascular capillary density. In cardiac tissue, CMs area and capillary density were measured using WGA- or I-B4-stained heart sections respectively. CMs area and capillary density were measured in cross-sectional tissue orientation by manually tracing the cell contour or counting capillaries number respectively on images acquired on Zeiss Observer Z.1 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) at ×400 (CMs) or ×100 (ECs) magnification and using Axio Vision Rel 4.7 software (Carl Zeiss). For measurements of long and short axis of isolated CMs, cells were plated on Laminin (Invitrogen) coated plates for 15min at 37° C immediately after isolation. Phase-contrast images were acquired on Zeiss Observer Z.1 microscope. Cell size was estimated at the focal plane in which the largest surface was detected. CMs longer and shorter axes were measured using Axio Vision Rel 4.7 software at x100 magnification.

Total RNA isolation and real-time quantitative RT-PCR. Extraction of RNA from cardiac ventricles or isolated adult CMs was performed using Qiagen RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit or Qiagen RNeasy Tissue Mini Kit (QIAGEN) respectively. First-strand cDNA was synthesized using the superscript II RT-PCR system (Invitrogen) with random hexamers. Negative controls without reverse transcriptase were made to verify the absence of genomic DNA contamination. Real-time PCR was performed in an ABI 7500 Fast (Applied Biosystems,) in 96-well plates. Fifteen nanograms of cDNA from RT reaction was then mixed with specific primers and EVA green mix (Euromedex). A panel of housekeeping genes (GAPDH, HPRT, 18S, β2myoglobin, and PPIA) were tested for their expression stability⁵, and geometric mean value of the three housekeeping genes most stably expressed across the samples was used for normalization (GAPDH, HPRT, PPIA). Relative gene expression was calculated by the comparative Ct method⁶.

Atomic Force Microscopy (AFM). Atomic Force Microscopy experiments were conducted in CM culture medium, at 37 °C under 5% CO₂ flow, using the perfusing cell from the Bioscope Catalyst (Bruker, Santa Barbara, CA, USA). We used bare MLCT AFM probes which present a pyramidal tip, with a curvature radius of 35°, made of Si₃N₄, manufactured by Bruker. The cantilever spring constants were systematically measured using the thermal tune method⁷ and has been found to range from 10 to 30 pN/nm. The maximal force applied to the cell has been limited to 2 nN in order to probe the cell wall elasticity (Young Modulus) and not the cell turgor pressure as made at higher loading forces^{8,9}. The force (F) versus displacement curves were converted into indentation (δ) curves using a homemade software and fitted to the Hertz model¹⁰ (equation 1) taking into account a conical tip with an opening angle of 35° (α). Finally, the Poisson ratio (ν) has been arbitrary fixed to 0.5

$$F = \frac{2E \tan \alpha}{\pi(1 - \nu^2)} \delta^2 \quad (1)$$

Force curves were recorded on the centre of living cells, on a single point or according to a matrix of 16x16 points on areas of 10 µm². For each force curve the Young Modulus (E) is calculated and the repartition of E plotted on histograms.

Echocardiography. Animals were anesthetized by intraperitoneal injection of 10 µg/g etomidate and underwent noninvasive transthoracic echocardiography using a General Electric Vivid 7[®] (GE Medical System) equipped with a 14-MHz linear probe. Cardiac ventricular dimensions were measured in M-mode images at least 5 times for each animal. FS was calculated as (LVEDD-LVESD)/LVEDD and expressed as percentage. LV ejection fraction (EF) was calculated using Teichholz formula. Measurements were obtained by an examiner blinded to the genotype of the animals.

Surface ECG recording. A 10 min ECG was obtained under light and 1.5 % isoflurane anaesthesia using three limb leads and digitalized at 4000 Hz. Data were analysed on series of at least 150 consecutive QRS complexes using LabChart Pro (v 6.1.1) software (AD Instruments).

Ascendant Aortic Banding (AAB). Two-month old mice were anesthetized with 4 % isoflurane, ventilated and the left thorax was opened at the second intercostals space. Aortic constriction was performed by legating the ascending aorta using a 7-0 Prolene suture under a dissecting microscope. For this purpose, two nots of a 1.5 mm distance (26-gauge needle circumference), were made on the thread which was carefully introduced around the ascending aorta. Both nots were tight together to perform aortic constriction. Age-matched animals underwent identical surgical procedure except for ligation of the aorta (sham-operated mice).

Trans Aortic Banding (TAC). Transverse thoracic aortic constriction (TAC) was performed on six-week-old male C57BL/6J mice. Briefly, mice were anesthetized with isoflurane, the chest opened through a small thoracic window and a 27 G needle placed on the transverse aorta. The band was secured using a prolene suture, the needle was then removed and the chest closed. Fifteen days post-surgery, echocardiography was performed and mice were sacrificed for further cardiomyocytes purification and RNA extraction. Both the surgeon and echocardiographer were blinded to animal genotype.

SUPPLEMENTAL FIGURES

SUPPLEMENTAL FIGURES LEGENDS

Online Figure I. Ephrin-B1 expression during postnatal period of the CM. (A) Ephrin-B1, Topro-3 (nucleus) and WGA (cell membranes) immunofluorescence co-staining in rat heart cryosections revealed that ephrin-B1 was expressed in CMs at neonatal stage (P0) but only localized in their nuclei (upper panels). Localization of ephrin-B1 at the lateral membrane appeared more lately at the end of the maturation step (P20) (middle, lower panels). (B) At neonatal stage, immunofluorescence co-staining revealed that ephrin-B1 was already expressed in endothelial cells (I-B4) (arrow heads). Scale bars: 20 μ m (A and B)

Online Figure II. Histological analysis of cardiac tissue from 2-month old ephrin-B1 WT and KO mice. (A) No differences in fibrosis or (B) capillary density between 2-month old WT and KO hearts as measured by trichrome or I-B4-stained heart sections respectively. (Mean \pm SEM, n=5-7 per mice lineage group, ns, non significant, unpaired 2-tailed Student's *t* test).

Online Figure III. Characterization of α -MHC-Cre^{+/-} -*Efnb1*^{fllox/fllox} mouse (Conditional

KO, cKO). (A) Exons 2-5 from Ephrin-B1 encoding gene (*efnb1*) are flanked by 2 loxP sites. The primers bind before and after the 3' LoxP. (B) A PCR analysis on genomic DNA from tail and isolated cardiomyocytes was performed on 2 month-old α -MHC-Cre *efnb1*^{fllox/fllox} (cKO) and α -MHC-Cre *efnb1* (Control) mice. **Upper and middle panels** show the – MHC-Cre and LoxP (*Efnb1* forward primer n°2 / *efnb1* reverse primer) amplification into the genome while the lower panel shows specific deletion of *efnb1* in ventricular isolated CMs and not from the tail of the same animal as indicated by the detection of the 2 LoxP amplicon in CMs only (*Efnb1* forward primer n°1 / *efnb1* reverse primer). (C) Western-blot analysis of ephrin-B1 protein expression in isolated CMs from 2-month old control and cKO mice. Ephrin-B1 cannot be detected in CMs from ephrin-B1 cKO mice. (D) Immunofluorescence localization of ephrin-B1 in hearts from 2 month-old Control and cKO mice shows a specific deletion of this protein at the lateral membrane of CMs (arrows) from cKO mice while ephrin-B1 expression in endothelial cells (asterisks) is preserved. Scales bars: 20 μ m (D).

Online figure IV. Cardiac characterization of 2 month-old *efnb1* cKO mice. (A) Electron microscopy shows high disorganization of the lateral membrane in CMs from cKO mice. (B) and (C) Immunofluorescence analysis revealed that *efnb1* cKO mice lost claudin-5 and ZO-1 proteins localization at the lateral membrane of CMs specifically (arrows). Note that specific claudin-5 expression in endothelial cells (asterisks) is preserved in cKO mice (D) Electron micrographs of interstitial space between lateral membrane of two CMs from control and cKO mice. Note high disorganization of fibrillar collagens (arrows) in cKO mice. (E) Ultrastructure of sarcomeres show loss of I band (control, arrows), and misalignment of both myofibrils and sarcomeres in cKO mice. Scales bars: 20 μ m (A) 50 μ m (B), 0.75 μ m (C and E), 0.2 μ m (D).

Online Figure V. Expression and localization analysis of cell-matrix junctions of the CMs lateral membrane from 2-month old ephrin-B1 WT and KO mice. (A) No modification of localization or (B) expression of cell-matrix β 1-integrin, β -sarcoglycan and α -dystroglycan proteins in KO mice as assessed by immunofluorescence or Western blot studies respectively (Mean \pm SEM, n=4-8 per mice lineage group, ns, non significant, unpaired 2-tailed Student's *t* test). (C) Claudin-5 localized specifically at the lateral membrane of CMs from rat hearts as shown by immunofluorescence WGA co-staining. (D)

ZO-1 localized at both the lateral membrane and the intercalated disk of isolated CMs as shown by immunofluorescence WGA co-staining. Scale bars: 20 μm (A and C), 10 μm (D).

Online Figure VI. Cell-matrix system expression in total cardiac tissue from 2-month old ephrin-B1 WT and KO mice. Comparative qRT-PCR analysis revealed no difference of mRNA expression levels of proteins from interstitial ECM (fibrillar collagens) and ECM degradation system (matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)) in total RNA cardiac tissue extracts from 2-month old WT and KO mice. (Mean \pm SEM, n=6-10 per mice lineage group, ns, non significant, unpaired 2-tailed Student's *t* test).

Online Figure VII. Quantitative analysis of intercalated disk (ID) proteins expression and ID space in 2-month old ephrin-B1 WT and KO mice. No modification of N-cadherin (A), desmoplakin 1/2 (B) and connexin 43 (C) proteins expression between WT and KO mice as assessed by Western blot analysis of whole cardiac tissue extracts (Mean \pm SEM, n=4-5 mice per mice lineage group, ns, non significant, unpaired 2-tailed Student's *t* test). (D) Measurement of ID space using electron micrographs did not reveal modifications between WT and KO mice. (Mean \pm SEM, n=3 mice per lineage group, ns, non significant, unpaired 2-tailed Student's *t* test).

Online Figure VIII. Quantitative analysis of sarcomere associated myofilaments expression and sarcomere ultrastructure in 2-month old ephrin-B1 WT and KO mice. Immunofluorescence staining of desmin (A) and α -tubulin (C) in heart cryosections and (B and D) western blot analysis on cardiac extracts from ephrin-B1 WT and KO mice did not reveal modifications of these proteins localization or expression in KO hearts. (Mean \pm SEM, n=4 mice per lineage group, ns, non significant, unpaired 2-tailed Student's *t* test). (E, F, G) Quantitative analysis of sarcomere ultrastructure in electron micrographs from WT and KO hearts indicated that KO mice showed a significant decrease of sarcomeres length (E), increase in sarcomeres width (F) and high heterogeneity in Z-lines height (G). (Mean \pm SEM, n=3 mice per lineage group, 100 independent measurements per mouse; *** $P < 0.001$, unpaired 2-tailed Student's *t* test). Scale bars: 5 μm (A), 15 μm (C).

Online Figure IX. Histomorphological and genetic profile of cardiac tissue of 2-month old ephrin-B1 WT and KO mice subjected to ascendant aortic banding (AAB). (A) IVST (left) and DPWT (right) echocardiographic measurements before and 30 days after AAB showed higher hypertrophic response in KO mice (n=20 WT, n=17 KO). (B) WT and KO mice exhibited similar induction of fetal gene program 30 days following AAB (Mean \pm SEM, n=7-10 per mice lineage group, *** $P < 0.001$ versus sham control of the same genotype, ns, non significant versus WT of the same group, One-way ANOVA, Tukey test). (C) WT and KO mice developed comparable fibrosis as quantified by trichrome-Masson-stained heart sections (Mean \pm SEM, n=6-12 mice per lineage group, * $P < 0.05$ versus sham control of the same genotype, ns, non significant versus WT of the same group, unpaired 2-tailed Student's *t* test), in agreement with (D) similar induction of fibrotic genes (Mean \pm SEM, n=7-10 mice per lineage group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ versus sham control of the same genotype, ns, non significant versus WT of the same group, One-way ANOVA, Tukey test). (E) Cardiac pressure overload did not modify capillaries density in ephrin-B1 KO mice. Quantification of capillaries density using I-B4 staining heart sections did not reveal modifications between KO and WT mice 30 days after AAB. (Mean \pm SEM, n= 6-12 mice per lineage group, ns, non significant versus WT of the same group).

SUPPLEMENTAL TABLES

Online Table 1. Variations of echocardiographic parameters in 2 month-old ephrin-B1 WT and KO mice induced by 30 days aortic ascendant banding (AAB).

	WT (n=20)	KO (n=17)
IVST (mm)	0.38 ± 0.17	0.53 ± 0.22*
DPWT (mm)	0.34 ± 0.15	0.49 ± 0.28*
LVEDD (mm)	-0.04 ± 0.39	-0.03 ± 0.69
LVESD (mm)	0.37 ± 0.22	0.58 ± 0.21**
FS (%)	4.6 ± 9.8	4.2 ± 15.8
EF (%)	2.7 ± 9.7	1.0 ± 16.3

IVST, Interventricular septum thickness in diastole; DPWT, diastolic posterior wall thickness; LVEDD, left ventricle end-diastole diameter; LVESD, left ventricle end-systole diameter; FS, fractional shortening; EF, ejection fraction. Results are represented as the difference of the parameters measured 30 days after AAB and before AAB. Results are expressed as mean ± SD. P values were determined using unpaired 2-tailed Student's t test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Online Table 2. Basal echocardiographic parameters in 2 month-old ephrin-B1 WT and KO mice before aortic ascendant banding.

	WT		KO		F	P
	Sham (n=7)	Banded (n=27)	Sham (n=6)	Banded (n=18)		
IVST (mm)	0.88 ± 0.11	0.91 ± 0.11	0.89 ± 0.06	0.84 ± 0.08	2.12	0.239
DPWT (mm)	0.92 ± 0.13	0.93 ± 0.10	0.97 ± 0.11	0.86 ± 0.08	2.66	0.447
LVEDD (mm)	2.93 ± 0.25	2.87 ± 0.30	3.35 ± 0.33	3.21 ± 0.37°	5.74	0.0019
LVESD (mm)	2.01 ± 0.31	1.77 ± 0.34	1.95 ± 0.42	2.02 ± 0.39	2.11	0.1093
FS (%)	33.7 ± 4.4	37.6 ± 6.4	38.9 ± 4.7	36.7 ± 5.6	1.11	0.3516
EF (%)	69.1 ± 5.3	73.9 ± 7.2	75.8 ± 5.6	72.7 ± 7.4	1.68	0.738
HR (bpm)	524 ± 25	520 ± 57	464 ± 68	462 ± 55°°	4.79	0.0053

IVST, Interventricular septum thickness; DPWT, diastolic posterior wall thickness; LVEDD, left ventricle end-diastole diameter; LVESD, left ventricle end-systole diameter; FS, fractional shortening; EF, ejection fraction; HR, heart rate. Results are expressed as mean ± SD. F values were assessed using one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. ° $P < 0.05$, °° $P < 0.01$ when compared to the corresponding value of the WT lineage group.

Online Table 3. Morphometry and cardiac function of 2 month-old ephrin-B1 WT and KO mice 30 days after aortic ascendant banding.

	WT		KO		F	P
	Sham (n=7)	Banded (n=27)	Sham (n=6)	Banded (n=18)		
IVST (mm)	0.91 ± 0.07	1.29 ± 0.19***	0.90 ± 0.03	1.38 ± 0.21°°°	19.07	<0.0001
DPWT (mm)	0.98 ± 0.11	1.27 ± 0.17***	0.86 ± 0.18	1.35 ± 0.30**	11.16	<0.0001
LVEDD (mm)	2.99 ± 0.23	2.77 ± 0.37	3.42 ± 0.52°	3.26 ± 0.77°	4.24	<0.0094
LVESD (mm)	1.98 ± 0.29	1.66 ± 0.42	2.19 ± 0.53	1.97 ± 0.92	1.75	0.1669
FS (%)	33.7 ± 5.2	42.2 ± 11.9	35.2 ± 4.3	41.0 ± 15.4	1.26	0.2964
EF (%)	69.1 ± 7.2	79.3 ± 8.4	71.0 ± 5.7	73.7 ± 15.9	2.16	0.1040
HR (bpm)	504 ± 47	514 ± 58	449 ± 40°	464 ± 80°	3.00	0.0388
BW (g)	31.7 ± 2.4	30.6 ± 1.8	30.9 ± 2.8	27.5 ± 3.0°	4.46	0.0081
HW (mg)	153 ± 24	183 ± 27	148 ± 25	190 ± 17	3.49	0.0235
HW/BW (mg/g)	5.0 ± 0.9	5.8 ± 0.9	4.8 ± 0.4	6.9 ± 1.9*	6.67	0.0010
LW (mg)	186 ± 22	206 ± 27	187 ± 29	189 ± 34	0.96	0.4220
LW/BW (mg/g)	6.1 ± 0.8	6.5 ± 0.3	6.1 ± 1.0	6.9 ± 1.1	1.06	0.3733

IVST, Interventricular septum thickness; DPWT, diastolic posterior wall thickness; LVEDD, left ventricle end-diastole diameter; LVESD, left ventricle end-systole diameter;

FS, fractional shortening; EF, ejection fraction; HR, heart rate; BW, body weight; HW, heart weight; LW, lung weight. Results are expressed as mean \pm SD. F values were assessed using one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared to the sham value of the same lineage group; ° $P < 0.05$, °°° $P < 0.001$ when compared to the corresponding value of the WT lineage group.

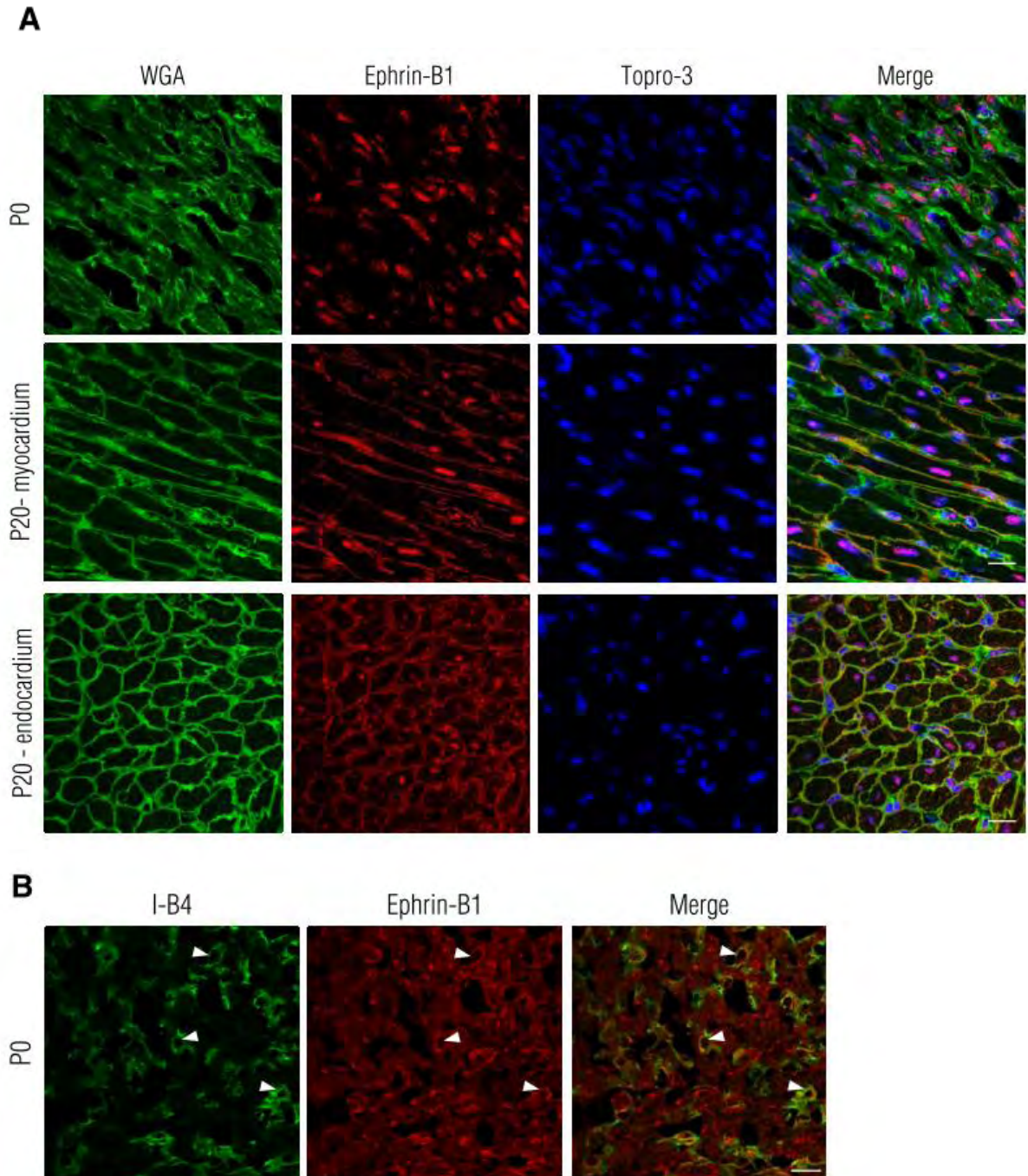
Online Table 4. Morphometry and cardiac function of 2 month-old C57BL6 mice 15 days after Trans Aortic Constriction (TAC).

	Sham (n=6)	TAC (n=6)
IVSTd (mm)	0.60 \pm 0.01	0.83 \pm 0.08*
DPWTd (mm)	0.65 \pm 0.02	0.90 \pm 0.06**
DPWTs (mm)	1.28 \pm 0.03	1.28 \pm 0.07
LVEDD (mm)	3.50 \pm 0.08	4.10 \pm 0.12**
LVESD (mm)	1.91 \pm 0.09	3.03 \pm 0.11***
FS (%)	45.49 \pm 1.36	25.70 \pm 1.24***
EF (%)	82.45 \pm 2.31	58.48 \pm 2.01***

SUPPLEMENTAL REFERENCES

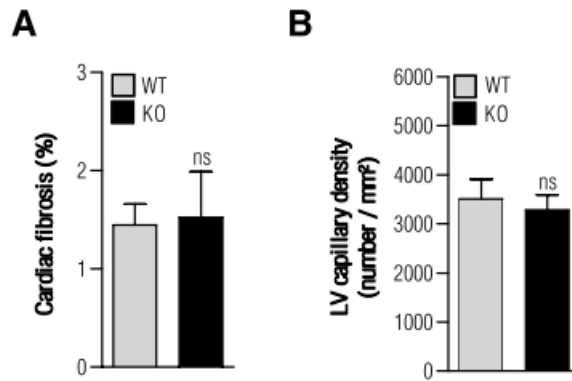
1. Davy A, Aubin J, Soriano P. EphrinB1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes Dev.* 2004;18:572-583.
2. Gales C, Kowalski-Chauvel A, Dufour MN, Seva C, Moroder L, Pradayrol L, Vaysse N, Fourmy D, Silvente-Poirot S. Mutation of Asn-391 within the conserved NPXXY motif of the cholecystokinin B receptor abolishes Gq protein activation without affecting its association with the receptor. *J Biol Chem.* 2000;275:17321-17327.
3. Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H, Bouvier M. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13:778-786.
4. Hilal-Dandan R, Kanter JR, Brunton LL. Characterization of G-protein signaling in ventricular myocytes from the adult mouse heart: differences from the rat. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:1211-1221.
5. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3:RESEARCH0034.
6. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-408.
7. Emerson RJt, Camesano TA. On the importance of precise calibration techniques for an atomic force microscope. *Ultramicroscopy.* 2006;106:413-422.
8. Arnoldi M, Fritz M, Bauerlein E, Radmacher M, Sackmann E, Boulbitch A. Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics.* 2000;62:1034-1044.
9. Yao X, Walter J, Burke S, Stewart M, MH J, Pink D, Hunter R, Beveridge T. Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2002;23:213-230.
10. Hertz H. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die Reine und angewandte mathematik.* 1881;92:156-171.

Online Figure I



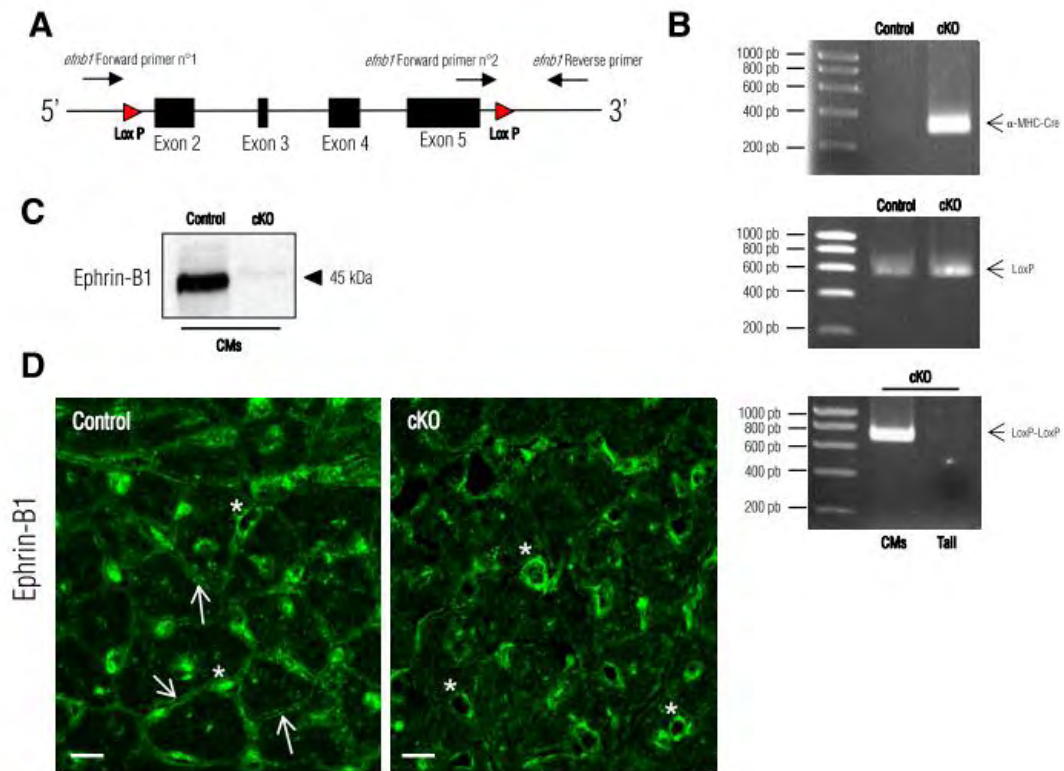
Online Figure I. Ephrin-B1 expression during postnatal period of the CM. (A) Ephrin-B1, Topro-3 (nucleus) and WGA (cell membranes) immunofluorescence co-staining in rat heart cryosections revealed that ephrin-B1 was expressed in CMs at neonatal stage (P0) but only localized in their nuclei (upper panels). Localization of ephrin-B1 at the lateral membrane appeared more lately at the end of the maturation step (P20) (middle, lower panels). (B) At neonatal stage, immunofluorescence co-staining revealed that ephrin-B1 was already expressed in endothelial cells (I-B4) (arrow heads). Scale bars: 20 μ m (A and B).

Online Figure II



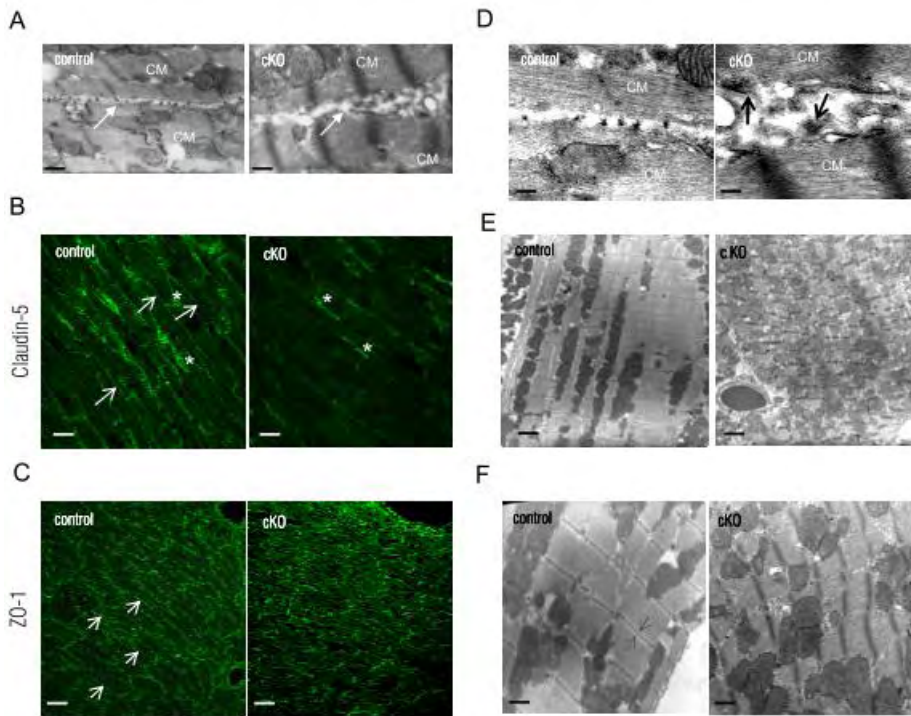
Online Figure II. Histological analysis of cardiac tissue from 2-month old ephrin-B1 WT and KO mice. (A) No differences in fibrosis or (B) capillary density between 2-month old WT and KO hearts as measured by trichrome or I-B4-stained heart sections respectively. (Mean \pm SEM, n=5-7 per mice lineage group, ns, non significant, unpaired 2-tailed Student's *t* test).

Online Figure III



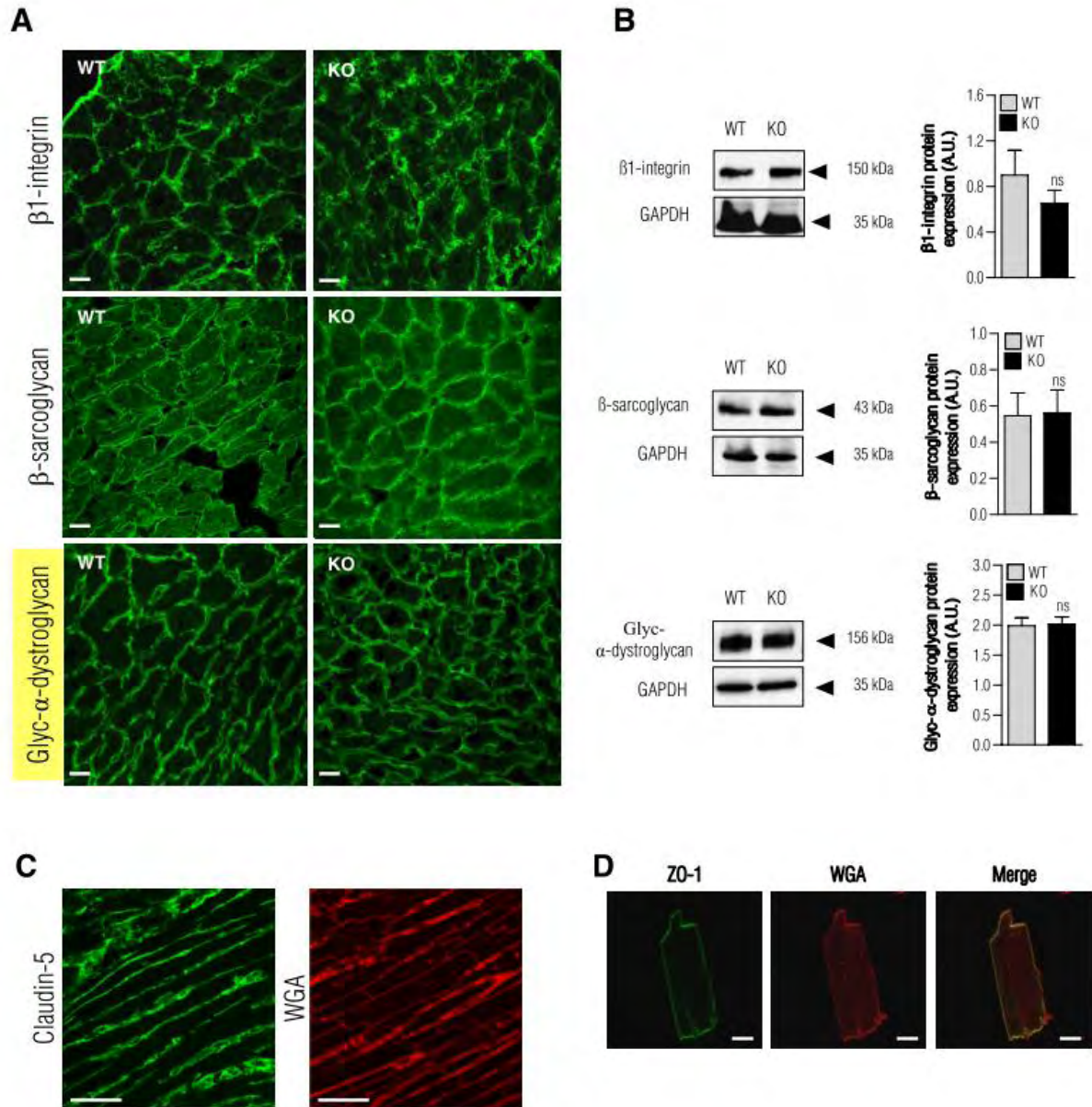
Online Figure III. Characterization of α -MHC-Cre^{+/-}-Efnb1^{lox/lox} mouse (Conditional KO, cKO). (A) Exons 2-5 from Ephrin-B1 encoding gene (*Efnb1*) are flanked by 2 loxP sites. The primers bind before and after the 3' LoxP. (B) A PCR analysis on genomic DNA from tail and isolated cardiomyocytes was performed on 2 month-old α -MHC-Cre^{+/-}-*Efnb1*^{lox/lox} (cKO) and α -MHC-Cre^{-/-}-*Efnb1*^{lox/lox} (Control) mice. Upper and middle panels show the α -MHC-Cre and LoxP (*Efnb1* forward primer n°2 / *Efnb1* reverse primer) amplification into the genome while the lower panel shows specific deletion of *Efnb1* in ventricular isolated CMs and not from the tail of the same animal as indicated by the detection of the 2 LoxP amplicon in CMs only (*Efnb1* forward primer n°1 / *Efnb1* reverse primer). (C) Western-blot analysis of ephrin-B1 protein expression in isolated CMs from 2-month old control and cKO mice. Ephrin-B1 cannot be detected in CMs from ephrin-B1 cKO mice. (D) Immunofluorescence localization of ephrin-B1 in hearts from 2 month-old Control and cKO mice shows a specific deletion of this protein at the lateral membrane of CMs (arrows) from cKO mice while ephrin-B1 expression in endothelial cells (asterisks) is preserved. Scales bars: 20 μ m (D)

Online Figure IV



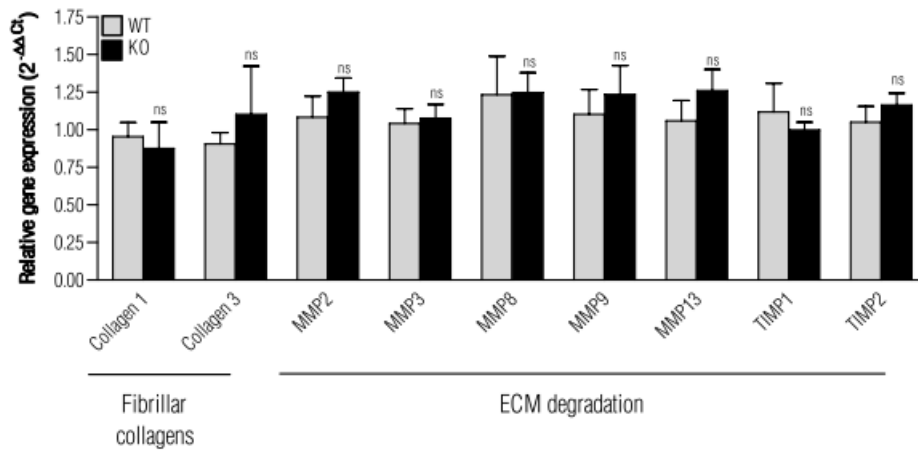
Online figure IV. Cardiac characterization of 2 month-old *efnb1* cKO mice. (A) Electron microscopy shows high disorganization of the lateral membrane in CMs from cKO mice. (B) and (C) Immunofluorescence analysis revealed that *efnb1* cKO mice lost claudin-5 and ZO-1 proteins localization at the lateral membrane of CMs specifically (arrows). Note that specific claudin-5 expression in endothelial cells (asterisks) is preserved in cKO mice (D) Electron micrographs of interstitial space between lateral membrane of two CMs from control and cKO mice. Note high disorganization of fibrillar collagens (arrows) in cKO mice. (E and F) Ultrastructure of sarcomeres show loss misalignment of both myofibrils and sarcomeres (E) and loss of I band (F, control, arrows) in cKO mice. Scales bars: 0.75 μm (A and F) 20 μm (B), 50 μm (C), 0.2 μm (D), 2 μm (E).

Online Figure V



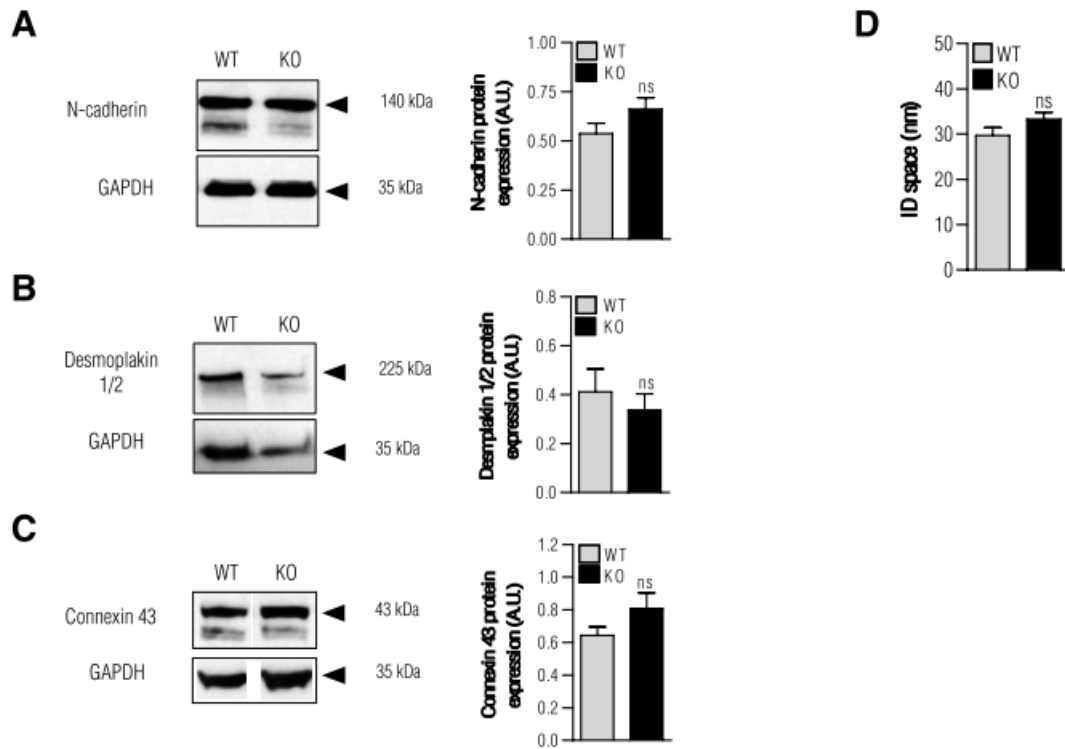
Online Figure V. Expression and localization analysis of cell-matrix junctions of the CMs lateral membrane from 2-month old ephrin-B1 WT and KO mice. (A) No modification of localization or (B) expression of cell-matrix β 1-integrin, β -sarcoglycan and α -dystroglycan proteins in KO mice as assessed by immunofluorescence or Western blot studies respectively (Mean \pm SEM, $n=4-8$ per mice lineage group, ns, non significant, unpaired 2-tailed Student's t test). (C) Claudin-5 localized specifically at the lateral membrane of CMs from rat hearts as shown by immunofluorescence WGA co-staining. (D) ZO-1 localized at both the lateral membrane and the intercalated disk of isolated CMs as shown by immunofluorescence WGA co-staining. Scale bars: 20 μ m (A and C), 10 μ m (D).

Online Figure VI



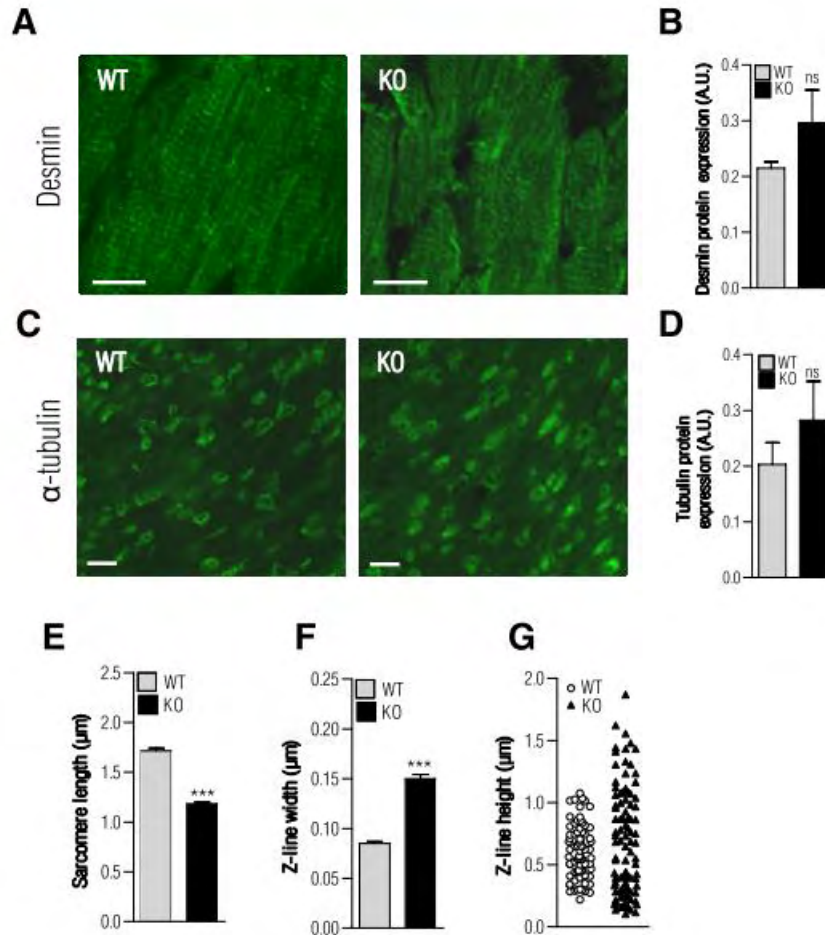
Online Figure VI. Cell-matrix system expression in total cardiac tissue from 2-month old ephrin-B1 MMP3 WT and KO mice. Comparative qRT-PCR analysis revealed no difference of mRNA expression levels of MMP8 proteins from interstitial ECM (fibrillar collagens) and ECM degradation system (matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)) in total RNA cardiac tissue extracts from 2-month MMP9 old WT and KO mice. (Mean \pm SEM, n=6-10 per mice lineage group, ns, non significant, unpaired 2-tailed Student's t test).

Online Figure VII



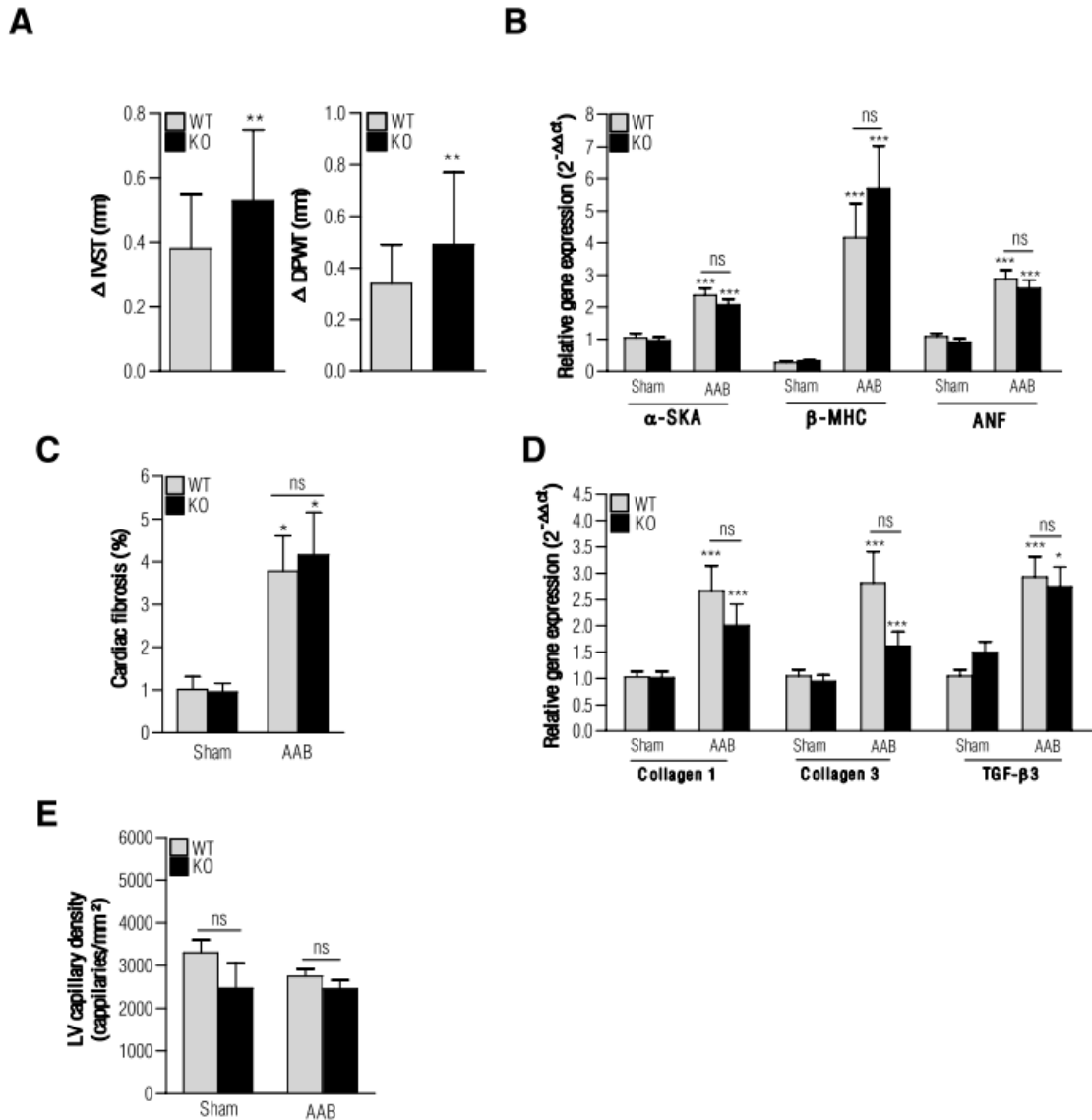
Online Figure VII. Quantitative analysis of intercalated disk (ID) proteins expression and ID space in 2-month old ephrin-B1 WT and KO mice. No modification of N-cadherin (A), desmoplakin 1/2 (B) and connexin 43 (C) proteins expression between WT and KO mice as assessed by Western blot analysis of whole cardiac tissue extracts (Mean \pm SEM, n=4-5 mice per mice lineage group, ns, non significant, unpaired 2-tailed Student's t test). (D) Measurement of ID space using electron micrographs did not reveal modifications between WT and KO mice. (Mean \pm SEM, n=3 mice per lineage group, ns, non significant, unpaired 2-tailed Student's t test).

Online Figure VIII



Online Figure VIII. Quantitative analysis of sarcomere associated myofilaments expression and sarcomere ultrastructure in 2-month old ephrin-B1 WT and KO mice. Immunofluorescence staining of desmin (A) and α -tubulin (C) in heart cryosections and (B and D) western blot analysis on cardiac extracts from ephrin-B1 WT and KO mice did not reveal modifications of these proteins localization or expression in KO hearts. (Mean \pm SEM, $n=4$ mice per lineage group, ns, non significant, unpaired 2-tailed Student's t test). (E, F, G) Quantitative analysis of sarcomere ultrastructure in electron micrographs from WT and KO hearts indicated that KO mice showed a significant decrease of sarcomeres length (E), increase in sarcomeres width (F) and high heterogeneity in Z-lines height (G). (Mean \pm SEM, $n=3$ mice per lineage group, 100 independent measurements per mouse; *** $P < 0.001$, unpaired 2-tailed Student's t test). Scale bars: 5 μm (A), 15 μm (C).

Online Figure IX



Online Figure IX. Histomorphological and genetic profile of cardiac tissue of 2-month old ephrin-B1 WT and KO mice subjected to ascendant aortic banding (AAB). (A) IVST (left) and DPWT (right) echocardiographic measurements before and 30 days after AAB showed higher hypertrophic response in KO mice (n=20 WT, n=17 KO). (B) WT and KO mice exhibited similar induction of fetal gene program 30 days following AAB (Mean \pm SEM, n=7-10 per mice lineage group, *** P < 0.001 versus sham control of the same genotype, ns, non significant versus WT of the same group, One-way ANOVA, Tukey test). (C) WT and KO mice developed comparable fibrosis as quantified by trichrome-Masson-stained heart sections (Mean \pm SEM, n=6-12 mice per lineage group, * P < 0.05 versus sham control of the same genotype, ns, non significant versus WT of the same group, unpaired 2-tailed Student's t test), in agreement with (D) similar induction of fibrotic genes (Mean \pm SEM, n=7-10 mice per lineage group, * P < 0.05, *** P < 0.001 versus sham control of the same genotype, ns, non significant versus WT of the same group, One-way ANOVA, Tukey test). (E) Cardiac pressure overload did not modify capillaries density in ephrin-B1 KO mice. Quantification of capillaries density using I-B4 staining heart sections did not reveal modifications between KO and WT mice 30 days after AAB. (Mean \pm SEM, n= 6-12 mice per lineage group, ns, non significant versus WT of the same group).

XII ANNEXE V

Publications dans des revues à comité de lecture référencées MEDLINE/ PUBMED

Publication en rapport avec la thèse d'Université:

1- Villeneuve C, **Guilbeau-Frugier C**, Lairez O, Ordener C, Duparc T, De Paulis D et al. p53-PGC-1alpha pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice. *Antioxid Redox Signal* (accepté sous réserve de modifications mineures) (AO).

Publications réalisées en collaboration, au cours de la thèse d'Université :

1- Lairez O, Calise D, Bianchi P, Ordener C, Spreux-Varoquaux O, **Guilbeau-Frugier C**, Escourrou G, Seif I, Roncalli J, Pizzinat N, Galinier M, Parini A, Miallet-Perez J. Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy induced by pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* 2009 ;46 :587-95. (AO)

2- Foussal C, Lairez O, Calise D, Pathak A, **Guilbeau-Frugier C**, Valet P, Parini A, Kunduzova O. Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS* ; 2010; 584 : 2363-70 (AO)

3- Chaaya R, Alfarano C, **Guilbeau-Frugier C**, Coatrieux C, Kesteman AS, Parini A; Fares N; Gue M; Bascand J-L. Pargyline reduces renal damage associated with ischemia-reperfusion and cyclosporin. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 26:489-98 (AO)

4- Mayeur N, Minville V, Jaafar A, Allard J, Al Saati T, **Guilbeau-Frugier C**, Fourcade O, Girolami JP, Schaak S, Tack I. Morphological and functional renal impact of acute kidney injury following prolonged hemorrhagic shock in mice. *CCMED* 2011; 39:2131-8 (AO).

5- Pchejetski D , Foussal C, Alfarano C, Lairez O, Calise D, **Guilbeau-Frugier C**, Schaak S, Seguelas MH, Wanecq E, Valet P, Parini A, Kunduzova O. Apelin prevents cardiac

fibroblast activation and collagen production through inhibition of sphingosine kinase 1. *Eur Heart J* 2011 oct (AO).

6- Genet G, **Guilbeau-Frugier C**, Honton B, Dague E, Schneider MD, Coatrieux C, Calise D, Cardin C, Nieto C, Payré B, Dubroca C, Marck P, Heymes C, Dubrac A, Arvanitis D, Despas F, Altié MF, Seguelas MH, Delisle MB, Davy A, Sénard JM, Pathak A, Galés C. Ephrin-B1 is a novel component of the lateral membrane of the cardiomyocyte and is essential for the stability of cardiac tissue architecture cohesion. *Circulation Research* 2012 Fev (AO).

7- Rouzaud-Laborde C, Hanoun N, Baysal I, Rech JS, Mias C, Calise D, Sicard P, **Frugier C**, Seguelas MH, Parini A, Pizzinat N. Role of endothelial AADC in cardiac synthesis of serotonin and nitrates accumulation. *PLoS ONE* (accepté sous presse) (AO).

Autres thématiques de recherche

1- **Guilbeau-Frugier C**, Blanc A, Crubezy E, Delisle MB, Rouge D and Telmon N. Hair Morphology and Anthropological Applications. *Am J Hum Biol* 2006;18:861-4. (AO)

2- Capuani C, Modesto-Segonds A, Huart A, Pourrat J, **Guilbeau-Frugier C**, Delisle MB, A. Gomez-Brouchet A. Une tumeur du rétropéritoine inhabituelle. *Ann Pathol*, 2010;30:36-8. (CC).

Publications en rapport avec l'activité hospitalière

Pathologie rénale

1- Martin L, **Guilbeau C**, Bocrie O, Rageot D, Rifle G, Justrabo E, Mousson C. Expression of TGFbeta-1 and Type I TGFbeta-receptor on sequential biopsies of renal transplants with chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc* 2006;38:2327-9. (AO)

2- Faguer S, Kamar N, **Guilbeaud-Frugier C**, Fort M, Modesto A, Mari A, Ribes D, Cointault O, Lavayssière L, Guitard J, Durand D, Rostaing L. Rituximab therapy for acute humoral rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 2007;83:1277-80. (AO)

- 3- Faguer S, Hirsch HH, Kamar N, **Guilbeaud-Frugier C**, Ribes D, Guitard J, Esposito L, Cointault O, Modesto A, Mengelle C, Rostaing L. Leflunomide Treatment for Polyomavirus BK-associated Nephropathy after Kidney Transplantation. *Transplant Int* 2007;20:962-9. (AO)
- 4- Esposito L, Kamar N, **Guilbeau-Frugier C**, Modesto A, Rostaing L. Linezolid-induced interstitial nephritis in a kidney-transplant patient. *Clin Nephrol* 2007;68:327-9. (CC)
- 5- Kamar N, Izopet J, Alric L, **Guilbeaud-Frugier C**, Rostaing L. Hepatitis C virus-related kidney disease: an overview. *Clin Nephrol* 2008; 69:149-60. (RG)
- 6- Kamar N, Rischmann P, **Guilbeau-Frugier C**, Sallusto F, Delisle MB, Noury D, Fort M, Rostaing L. A cadaveric kidney-allograft recipient with recurrent thrombotic microangiopathy becomes a successful, living, kidney donor. *Am J Kidney Dis* 2008;52:591-94. (CC)
- 7- Weclawiak H, Ribes D, **Guilbeau-Frugier C**, Touchard G, Kamar N, Mehrenberger M, Modesto A, Rostaing L. Relapse of membranous glomerulopathy after kidney transplantation : substained remittance induced by rituximab. *Clin Nephrol* 2008;69:373-76. (CC)
- 8- Kamar N, **Guilbeau-Frugier C**, Rostaing L. Rituximab for humoral rejection after kidney transplantation: an update. *Transplantation* 2009;87:1261. (AO)
- 9- Kamar N, Lavayssière L, Muscari F, Selves J, **Guilbeau-Frugier C**, Esposito L, Cointault O, Nogier M-B, Peron J-M, Otal P, Fort M, Rostaing L. Early plasmapheresis and rituximab therapy to treat acute humoral rejection after an ABO-compatible liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2009;15:3426-30 (AO).
- 10- Tiple A, Kamar N, Esposito L, Mengelle C, Otal P, **Guilbeau-Frugier C**, Rostaing L. Unusual presentation of cytomegalovirus infection in organ-transplant patients. *Exp Clin Transplant* 2009;7:45-9 (CC)
- 11- Rostaing L, **Guilbeau-Frugier C**, Fort M, Mekhlati L, Kamar N. Treatment of symptomatic transplant glomerulopathy with Rituximab. *Transplant Int* 2009;22:906-13 (AO)
- 12- Canivet C, Rostaing L, Galvani S, Böhler T, Gandia P, Mengelle C, **Guilbeau-Frugier C**, Thomsen M, Salvayre R, Negre-Salvayre A, Kamar N. Polyoma BK virus-associated

nephropathy in kidney-transplant patients: effects of leflunomide on T-cell functions and disease outcome. *Int Immunopharmacol* 2009;9:1131-6. (AO).

13- Kamar N, **Guilbeau-Frugier C**, Servais A, Tack I, Thervet E, Cointault O, Esposito L, Guitard J, Lavayssière L, Nogier M-B, Ribes D, Cardeau-Desangles I, Muscari F, Meas-Yedid V, Bureau C, Rostaing L. Kidney histology and function in liver-transplant patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26 : 2355-61 (AO)

14- Weclawiak H, Ould-Mohamed A, Bournet B, **Guilbeau-Frugier C**, Fortenfant F, Muscari F et al. Duodenal villous atrophy: a cause of chronic diarrhea after solid-organ transplantation. *Am J Transplant*. 2011;11:575-82. (AO)

15- Kamar N, Weclawiak H, **Guilbeau-Frugier C**, Legrand-Abravanel F, Cointault O, Ribes D, Esposito L, Cardeau-Desangles I, Guitard J, Sallusto F, Muscari F, Peron JM, Alric L, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E Virus and the Kidney in Solid-Organ Transplant Patients. *Transplantation*. 2012 Jan 31 (AO)

16- Kamar N, Maaroufi, **Guilbeau-Frugier C**, Servais A, Tack I, Thervet E et al. Do kidney histology lesions predict long-term kidney function after liver transplantation? *Transplantation* (accepté sous presse) (AO).

Pathologie cardiaque

1- Maury P, Escourrou G, **Guilbeau C**, Duparc A. Histopathologic effects of endocardial and epicardial percutaneous radio-frequency catheter ablation in dilated non-ischemic cardiomyopathy. *PACE* 2008;31:1218-22. (CC)

2- Rollin A, Maury P, **Guilbeau-Frugier C**, Brugada J. Transient ST Elevation after Ketamine Intoxication : a New Cause of Acquires Brugada ECG Pattern. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2010; 22 : 91-4 (CC).

3- Para M, Lairez O, **Guilbeau-Frugier C**, Marcheix B. Cavernous haemangioma of the right atrium. *Ann Cardiol Angeiol* (Paris) 2011; 60: 173-5 (CC).

4- Montastruc F, Montastruc G, Vigreux P, Bruneval P, Céline Guilbeau-Frugier C, Cron C, Bagheri H, Delisle B, Lapeyre-Mestre M, Pathak A, Montastruc JL. Valvular Heart Disease in a patient taking 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy”). *BJCP* (accepté sous presse) (CC).

Autres

1- **Guilbeau C**, Soubeyrand MS, Devillebichot C, Sage M, Collin F, Arnould L. Nodules muraux de type carcinome anaplasique développés dans un cystadénome mucineux borderline ovarien bilatéral : à propos d'un cas. *Ann Pathol* 2003;23:340-4. (CC)

2- **Guilbeau-Frugier C**, Rambaud C, Dedouit F, Telmon N, Rouge D, Delisle MB. Interest of post mortem analysis in diagnosis and etiopathogeny of ischemic myocardial infarction. *Ann Pathol* 2006;26:427-34. (MP)

3- Dedouit F, **Guilbeau-Frugier C**, Telmon N, Gainza D, Otal P, Joffre F, Rouge D. Virtual autopsy and forensic identification – practical application: a report of one case. *J Forensic Sci* 2007;52:960-4. (CC)

4- Dedouit F, **Guilbeau-Frugier C**, Loubes-Lacroix Fl, Joffre F, Rouge D, Telmon N. Virtual autopsy of a natural mummified fetus: about one case. *J Forensic Sci* 2008;53:208-12. (CC)

5- Dedouit F, Loubes Lacroix Fl, Costagliola R, Otal Ph, **Guilbeau-Frugier C**, Alengrin D, Telmon N, Joffre F, Rouge D. Post-mortem changes of the middle ear: multislice computed tomography study. *Forensic Sci Int* 2008;175:149-54. (AO)

6- Quintyn-Ranty ML, Escourrou G, **Guilbeau C**, Rimailho J, Delisle MB. Carcinome adénoïde kystique vaginal. A propos d'un cas. *Ann Pathol* 2008; 28:135-37. (CC)

7- Dedouit F, **Guilbeau Frugier C**, Capuani,C, Joffre F, Rougé D, Rousseau H, Telmon N. Child Abuse: Practical Case of Autopsic, Radiologic and Microscopic studies. *J Forensic Sci* 2008;53:14234-9. (CC)

8- Edouard T, Stafford DEJ, Oliver I, Jesuran M, Bertozzi AI, Cances C, Boetto S, **Guilbeau-Frugier C**, Delisle MB, Tauber M. Isolated lymphocytic infiltration of pituitary stalk preceding the diagnosis of germinoma in two prepubertal children treated with growth hormone. *Hormone Research* 2009;72:57-62. (CC)

9- Guillermet-Guibert J, Davenne L, Pchejetski D, Saint Laurent N, Brizuela L, **Guilbeau-Frugier C**, Delisle MB, Cuvillier O, Susini C, Bousquet C. Targeting the sphingolipid metabolism to defeat pancreatic cancer cell resistance to the chemotherapeutic gemcitabine drug. *Mol Cancer Ther* 2009 ;8 :809-20. (AO)

- 10- Calviere L, Catalaa I, **Frugier CG**, Albucher JF, Delisle MB, Larrue V. Aspects cliniques et évolutifs de la maladie de Moyamoya chez des adultes français. *Rev Neurol* 2009 ;165 :709-17. (AO)
- 11- Uro-Coste E, Ssi-Yan-Kai G, **Guilbeau-Frugier C**, Boetto S, Bertozzi A-I, Sevely A, Delisle M-B. Desmoplastic infantile astrocytoma with a benign histological phenotype and multiple intracranial localizations at presentation. *J Neuro-Oncol* 2009 dec (CC).
- 12- Uro-Coste E, Russano de Paiva G , **Guilbeau-Frugier C**, Sastre N, Ousset PJ, Laviaille-Guillotreau V, Vellas B, Delisle M-B. Cerebral amyloid angiopathy and microhaemorrhages after amyloid ? Vaccination case report and brief review. *Clin Neuropathol* accepté sous presse (CC).
- 13- Quintyn ML, Escourrou G, Paute A, Viale J, **Guilbeau-Frugier C**, Delisle MB. Maladie de Paget vulvaire microinvasive et métastase ganglionnaire : une même maladie ? *Ann Pathol*, 2011 ; 31 :341-44. (CC).
- 14- Dedouit F, Mallinger B, **Guilbeau-Frugier C**, Rougé D, Rousseau H, Telmon N. Lethal Visceral Traumatic Injuries Secondary to Child Abuse: A Case of Practical Application of Autopsy, Radiological and Microscopic Studies. *Forensic Sci Int.* 2010; 206 :e62-6 (CC)

REFERENCES

1. Rosamond, W., et al., *Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. Circulation, 2008. **117**(4): p. e25-146.
2. McDonagh, T.A., et al., *Symptomatic and asymptomatic left-ventricular systolic dysfunction in an urban population*. Lancet, 1997. **350**(9081): p. 829-33.
3. Kannel, W.B. and A.J. Belanger, *Epidemiology of heart failure*. Am Heart J, 1991. **121**(3 Pt 1): p. 951-7.
4. Bleumink, G.S., et al., *Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study*. Eur Heart J, 2004. **25**(18): p. 1614-9.
5. Rich, M.W., *Heart failure in the 21st century: a cardiogeriatric syndrome*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2001. **56**(2): p. M88-96.
6. Najafi, F., K. Jamrozik, and A.J. Dobson, *Understanding the 'epidemic of heart failure': a systematic review of trends in determinants of heart failure*. Eur J Heart Fail, 2009. **11**(5): p. 472-9.
7. Chaudhry, S.I., et al., *Geriatric conditions and subsequent mortality in older patients with heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(4): p. 309-16.
8. Kalogeropoulos, A., et al., *Epidemiology of incident heart failure in a contemporary elderly cohort: the health, aging, and body composition study*. Arch Intern Med, 2009. **169**(7): p. 708-15.
9. Malaquin, D. and C. Tribouilloy, [*Epidemiology of heart failure*]. Rev Prat, 2010. **60**(7): p. 911-5.
10. Kitzman, D.W., *Heart Failure in the Elderly: Systolic and Diastolic Dysfunction*. Am J Geriatr Cardiol, 1996. **5**(1): p. 20-26.
11. Brutsaert, D.L., S.U. Sys, and T.C. Gillebert, *Diastolic failure: pathophysiology and therapeutic implications*. J Am Coll Cardiol, 1993. **22**(1): p. 318-25.
12. Baicu, C.F., et al., *Left ventricular systolic performance, function, and contractility in patients with diastolic heart failure*. Circulation, 2005. **111**(18): p. 2306-12.
13. Kitzman, D.W., et al., *Efficacy and safety of the novel ultrasound contrast agent perflutren (definity) in patients with suboptimal baseline left ventricular echocardiographic images*. Am J Cardiol, 2000. **86**(6): p. 669-74.
14. Kurland, L.T. and C.A. Molgaard, *The patient record in epidemiology*. Sci Am, 1981. **245**(4): p. 54-63.
15. Zile, M.R. and D.L. Brutsaert, *New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function*. Circulation, 2002. **105**(11): p. 1387-93.
16. Owan, T.E., et al., *Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction*. N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 251-9.

17. Bhatia, R.S., et al., *Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study*. N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 260-9.
18. Daniels, L.B. and A.S. Maisel, *Natriuretic peptides*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(25): p. 2357-68.
19. Dickstein, K., 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 J Heart Fail, 2008. **10**(10): p. 933-89.
20. Maisel, A.S., et al., *Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure*. N Engl J Med, 2002. **347**(3): p. 161-7.
21. Lainchbury, J.G., et al., *Brain natriuretic peptide and n-terminal brain natriuretic peptide in the diagnosis of heart failure in patients with acute shortness of breath*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(4): p. 728-35.
22. Dunavant, S., *Nesiritide vs nitroglycerin for decompensated congestive heart failure*. Jama, 2002. **288**(5): p. 571-2; author reply 572-3.
23. Rattazzi, M., et al., *C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders?* J Hypertens, 2003. **21**(10): p. 1787-803.
24. Mann, D.L., *Recent insights into the role of tumor necrosis factor in the failing heart*. Heart Fail Rev, 2001. **6**(2): p. 71-80.
25. Braunstein, J.B., et al., *Noncardiac comorbidity increases preventable hospitalizations and mortality among Medicare beneficiaries with chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(7): p. 1226-33.
26. Lien, C.T., et al., *Heart failure in frail elderly patients: diagnostic difficulties, comorbidities, polypharmacy and treatment dilemmas*. Eur J Heart Fail, 2002. **4**(1): p. 91-8.
27. Pereira, R.B., et al., *Differences in tail vascular bed reactivity in rats with and without heart failure following myocardial infarction*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(3): p. 1321-5.
28. Sartorio, C.L., et al., *Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction*. Hypertension, 2007. **50**(5): p. 919-25.
29. Bonow, R.O. and J.E. Udelson, *Left ventricular diastolic dysfunction as a cause of congestive heart failure. Mechanisms and management*. Ann Intern Med, 1992. **117**(6): p. 502-10.
30. Redfield, M.M., et al., *Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic*. Jama, 2003. **289**(2): p. 194-202.

31. Devereux, R.B., et al., *Left ventricular hypertrophy in patients with hypertension: importance of blood pressure response to regularly recurring stress*. *Circulation*, 1983. **68**(3): p. 470-6.
32. Hill, J.A. and E.N. Olson, *Cardiac plasticity*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(13): p. 1370-80.
33. Diez, J. and E.D. Frohlich, *A translational approach to hypertensive heart disease*. *Hypertension*, 2010. **55**(1): p. 1-8.
34. He, J., et al., *Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study*. *Arch Intern Med*, 2001. **161**(7): p. 996-1002.
35. Kannel, W.B., M. Hjortland, and W.P. Castelli, *Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study*. *Am J Cardiol*, 1974. **34**(1): p. 29-34.
36. Ginsberg, H.N., *Insulin resistance and cardiovascular disease*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(4): p. 453-8.
37. Reaven, G.M., H. Lithell, and L. Landsberg, *Hypertension and associated metabolic abnormalities--the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(6): p. 374-81.
38. Giles, T.D. and G.E. Sander, *Myocardial disease in hypertensive-diabetic patients*. *Am J Med*, 1989. **87**(6A): p. 23S-28S.
39. Hensrud, D.D. and S. Klein, *Extreme obesity: a new medical crisis in the United States*. *Mayo Clin Proc*, 2006. **81**(10 Suppl): p. S5-10.
40. Kawano, T., et al., *Close association of hypoadiponectinemia with arteriosclerosis obliterans and ischemic heart disease*. *Metabolism*, 2005. **54**(5): p. 653-6.
41. Peterson, L.R., et al., *Alterations in left ventricular structure and function in young healthy obese women: assessment by echocardiography and tissue Doppler imaging*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **43**(8): p. 1399-404.
42. Kenchaiah, S., J.M. Gaziano, and R.S. Vasan, *Impact of obesity on the risk of heart failure and survival after the onset of heart failure*. *Med Clin North Am*, 2004. **88**(5): p. 1273-94.
43. Heckbert, S.R., et al., *Traditional cardiovascular risk factors in relation to left ventricular mass, volume, and systolic function by cardiac magnetic resonance imaging: the Multiethnic Study of Atherosclerosis*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(11): p. 2285-92.
44. Iacobellis, G., *True uncomplicated obesity is not related to increased left ventricular mass and systolic dysfunction*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(11): p. 2257; author reply 2258.
45. Iacobellis, G., et al., *Adapted changes in left ventricular structure and function in severe uncomplicated obesity*. *Obes Res*, 2004. **12**(10): p. 1616-21.

46. Avelar, E., et al., *Left ventricular hypertrophy in severe obesity: interactions among blood pressure, nocturnal hypoxemia, and body mass*. Hypertension, 2007. **49**(1): p. 34-9.
47. Morricone, L., et al., *Echocardiographic abnormalities in normotensive obese patients: relationship with visceral fat*. Obes Res, 2002. **10**(6): p. 489-98.
48. Wong, C.Y., et al., *Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity*. Circulation, 2004. **110**(19): p. 3081-7.
49. *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. Jama, 2001. **285**(19): p. 2486-97.
50. Ford, E.S., W.H. Giles, and W.H. Dietz, *Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey*. Jama, 2002. **287**(3): p. 356-9.
51. Zeller, M., et al., *Prevalence and impact of metabolic syndrome on hospital outcomes in acute myocardial infarction*. Arch Intern Med, 2005. **165**(10): p. 1192-8.
52. Hayflick, L., *The not-so-close relationship between biological aging and age-associated pathologies in humans*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004. **59**(6): p. B547-50; discussion 551-3.
53. Holliday, R., *The close relationship between biological aging and age-associated pathologies in humans*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004. **59**(6): p. B543-6.
54. Dai, D.F. and P.S. Rabinovitch, *Cardiac aging in mice and humans: the role of mitochondrial oxidative stress*. Trends Cardiovasc Med, 2009. **19**(7): p. 213-20.
55. Olivetti, G., et al., *Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy*. Circ Res, 1991. **68**(6): p. 1560-8.
56. Bernhard, D. and G. Laufer, *The aging cardiomyocyte: a mini-review*. Gerontology, 2008. **54**(1): p. 24-31.
57. Gottdiener, J.S., et al., *Outcome of congestive heart failure in elderly persons: influence of left ventricular systolic function. The Cardiovascular Health Study*. Ann Intern Med, 2002. **137**(8): p. 631-9.
58. Cohn, J.N. and G. Johnson, *Heart failure with normal ejection fraction. The V-HeFT Study. Veterans Administration Cooperative Study Group*. Circulation, 1990. **81**(2 Suppl): p. III48-53.
59. Dauterman, K.W., et al., *Congestive heart failure with preserved systolic function in a statewide sample of community hospitals*. J Card Fail, 2001. **7**(3): p. 221-8.
60. Cocchi, A., et al., *Cross-sectional echocardiography: a window on congestive heart failure in the elderly*. Aging (Milano), 1991. **3**(3): p. 257-62.
61. Pernenkil, R., et al., *Course and prognosis in patients > or = 70 years of age with congestive heart failure and normal versus abnormal left ventricular ejection fraction*. Am J Cardiol, 1997. **79**(2): p. 216-9.

62. Taffet, G.E., et al., *Survival of elderly men with congestive heart failure*. Age Ageing, 1992. **21**(1): p. 49-55.
63. *Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF)*. Lancet, 1999. **353**(9169): p. 2001-7.
64. Turakhia, M.P., N.B. Schiller, and M.A. Whooley, *Prognostic significance of increased left ventricular mass index to mortality and sudden death in patients with stable coronary heart disease (from the Heart and Soul Study)*. Am J Cardiol, 2008. **102**(9): p. 1131-5.
65. Curtis, J.P., et al., *The association of left ventricular ejection fraction, mortality, and cause of death in stable outpatients with heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(4): p. 736-42.
66. Dini, F.L., et al., *Patterns of left ventricular remodeling in chronic heart failure: prevalence and prognostic implications*. Am Heart J, 2011. **161**(6): p. 1088-95.
67. Afilalo, J., et al., *Role of frailty in patients with cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 2009. **103**(11): p. 1616-21.
68. Altimir, S., et al., *Sex and age differences in fragility in a heart failure population*. Eur J Heart Fail, 2005. **7**(5): p. 798-802.
69. Wang, R., et al., *Mortality of the institutionalized old-old hospitalized with congestive heart failure*. Arch Intern Med, 1998. **158**(22): p. 2464-8.
70. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 569-82.
71. Brower, G.L., et al., *The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function*. Eur J Cardiothorac Surg, 2006. **30**(4): p. 604-10.
72. Swynghedauw, B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 215-62.
73. Frohlich, E.D., et al., *The heart in hypertension*. N Engl J Med, 1992. **327**(14): p. 998-1008.
74. Aurigemma, G.P., et al., *Geometric changes allow normal ejection fraction despite depressed myocardial shortening in hypertensive left ventricular hypertrophy*. J Am Coll Cardiol, 1995. **26**(1): p. 195-202.
75. Rosen, B.D., et al., *Left ventricular concentric remodeling is associated with decreased global and regional systolic function: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*. Circulation, 2005. **112**(7): p. 984-91.
76. Shimizu, G., et al., *Left ventricular midwall mechanics in systemic arterial hypertension. Myocardial function is depressed in pressure-overload hypertrophy*. Circulation, 1991. **83**(5): p. 1676-84.

77. McMurray, J.J., *Clinical practice. Systolic heart failure*. N Engl J Med. 2010. **362**(3): p. 228-38.
78. Harvey, P.A. and L.A. Leinwand, *The cell biology of disease: cellular mechanisms of cardiomyopathy*. J Cell Biol, 2011. **194**(3): p. 355-65.
79. Palmer, B.M., *Thick filament proteins and performance in human heart failure*. Heart Fail Rev, 2005. **10**(3): p. 187-97.
80. Narolska, N.A., et al., *Myosin heavy chain composition and the economy of contraction in healthy and diseased human myocardium*. J Muscle Res Cell Motil, 2005. **26**(1): p. 39-48.
81. Choquet, D., D.P. Felsenfeld, and M.P. Sheetz, *Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages*. Cell, 1997. **88**(1): p. 39-48.
82. Wang, N. and D.E. Ingber, *Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension*. Biophys J, 1994. **66**(6): p. 2181-9.
83. Hein, S., et al., *The role of the cytoskeleton in heart failure*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(2): p. 273-8.
84. Collins, J.F., et al., *The role of the cytoskeleton in left ventricular pressure overload hypertrophy and failure*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(7): p. 1435-43.
85. Wang, X., et al., *Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: II. Cytoskeletal remodeling*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(2): p. 319-31.
86. Hein, S., et al., *Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 1994. **26**(10): p. 1291-306.
87. Morano, I., et al., *Titin, myosin light chains and C-protein in the developing and failing human heart*. J Mol Cell Cardiol, 1994. **26**(3): p. 361-8.
88. Gupta, A., et al., *Impairment of ultrastructure and cytoskeleton during progression of cardiac hypertrophy to heart failure*. Lab Invest, 2010. **90**(4): p. 520-30.
89. Tagawa, H., et al., *Cytoskeletal role in the transition from compensated to decompensated hypertrophy during adult canine left ventricular pressure overloading*. Circ Res, 1998. **82**(7): p. 751-61.
90. Tagawa, H., et al., *Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of cardiocytes from hypertrophied and failing right ventricular myocardium*. Proc Assoc Am Physicians, 1996. **108**(3): p. 218-29.
91. Schaper, J., et al., *Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1991. **83**(2): p. 504-14.
92. Akar, F.G., et al., *Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonischemic dilated cardiomyopathy*. Circ Res, 2004. **95**(7): p. 717-25.
93. Severs, N.J., et al., *Gap junction alterations in human cardiac disease*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(2): p. 368-77.
94. Toyofuku, T., et al., *Functional role of c-Src in gap junctions of the cardiomyopathic heart*. Circ Res, 1999. **85**(8): p. 672-81.

95. Akar, F.G. and G.F. Tomaselli, *Conduction abnormalities in nonischemic dilated cardiomyopathy: basic mechanisms and arrhythmic consequences*. Trends Cardiovasc Med, 2005. **15**(7): p. 259-64.
96. Kanno, S. and J.E. Saffitz, *The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis*. Cardiovasc Pathol, 2001. **10**(4): p. 169-77.
97. Peters, N.S. and A.L. Wit, *Myocardial architecture and ventricular arrhythmogenesis*. Circulation, 1998. **97**(17): p. 1746-54.
98. Sato, T., et al., *Altered expression of connexin43 contributes to the arrhythmogenic substrate during the development of heart failure in cardiomyopathic hamster*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(3): p. H1164-73.
99. Yoshida, M., et al., *Alterations in adhesion junction precede gap junction remodelling during the development of heart failure in cardiomyopathic hamsters*. Cardiovasc Res, 2011. **92**(1): p. 95-105.
100. Kostin, S., et al., *The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart*. Heart Fail Rev, 2000. **5**(3): p. 271-80.
101. Ong, S.B. and D.J. Hausenloy, *Mitochondrial morphology and cardiovascular disease*. Cardiovasc Res, 2010. **88**(1): p. 16-29.
102. Boudina, S. and E.D. Abel, *Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 250-8.
103. Dong, F., et al., *Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice*. J Endocrinol, 2006. **188**(1): p. 25-36.
104. 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, 2007. **56**(10): p. 2457-66.
105. Bossy-Wetzell, E., et al., *Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 706-16.
106. Chen, H., et al., *Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 189-200.
107. Legros, F., et al., *Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4343-54.
108. Meeusen, S., et al., *Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1*. Cell, 2006. **127**(2): p. 383-95.
109. Olichon, A., et al., *The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space*. FEBS Lett, 2002. **523**(1-3): p. 171-6.
110. Malka, F., et al., *Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes*. EMBO Rep, 2005. **6**(9): p. 853-9.

111. Okamoto, K. and J.M. Shaw, *Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes*. Annu Rev Genet, 2005. **39**: p. 503-36.
112. Hollenbeck, P.J. and W.M. Saxton, *The axonal transport of mitochondria*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 23): p. 5411-9.
113. Westermann, B., *Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion*. EMBO Rep, 2002. **3**(6): p. 527-31.
114. Chen, H. and D.C. Chan, *Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(R2): p. R169-76.
115. Skulachev, V.P., *Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(1): p. 23-9.
116. Pich, S., et al., *The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(11): p. 1405-15.
117. Zanna, C., et al., *OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion*. Brain, 2008. **131**(Pt 2): p. 352-67.
118. Chen, H. and D.C. Chan, *Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission*. Hum Mol Genet, 2005. **14 Spec No. 2**: p. R283-9.
119. Chen, H., et al., *Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations*. Cell, 2010. **141**(2): p. 280-9.
120. Frank, S., et al., *The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis*. Dev Cell, 2001. **1**(4): p. 515-25.
121. Breckenridge, D.G., et al., *Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol*. J Cell Biol, 2003. **160**(7): p. 1115-27.
122. Lee, Y.J., et al., *Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(11): p. 5001-11.
123. Cassidy-Stone, A., et al., *Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization*. Dev Cell, 2008. **14**(2): p. 193-204.
124. Arnoult, D., et al., *Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35742-50.
125. Frezza, C., et al., *OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion*. Cell, 2006. **126**(1): p. 177-89.
126. Elmore, S.P., et al., *The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes*. Faseb J, 2001. **15**(12): p. 2286-7.

127. Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, and J.J. Lemasters, *Selective degradation of mitochondria by mitophagy*. Arch Biochem Biophys, 2007. **462**(2): p. 245-53.
128. Twig, G., et al., *Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy*. Embo J, 2008. **27**(2): p. 433-46.
129. Chen, L., et al., *Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(1): p. 91-9.
130. Mannella, C.A., *Structural diversity of mitochondria: functional implications*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1147**: p. 171-9.
131. Sasaki, S., et al., *Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene*. Acta Neuropathol, 2005. **110**(1): p. 48-56.
132. Kaasik, A., et al., *Regulation of mitochondrial matrix volume*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C157-63.
133. Ashrafian, H. and M.P. Frenneaux, *Metabolic modulation in heart failure: the coming of age*. Cardiovasc Drugs Ther, 2007. **21**(1): p. 5-7.
134. Bing, R.J., et al., *Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism*. Am J Med, 1954. **16**(4): p. 504-15.
135. Lopaschuk, G.D., et al., *Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1213**(3): p. 263-76.
136. Opie, L.H., *Metabolism of the heart in health and disease. I*. Am Heart J, 1968. **76**(5): p. 685-98.
137. Opie, L.H., *Metabolism of the heart in health and disease. II*. Am Heart J, 1969. **77**(1): p. 100-22 contd.
138. Wisneski, J.A., et al., *Effects of acute hyperglycemia on myocardial glycolytic activity in humans*. J Clin Invest, 1990. **85**(5): p. 1648-56.
139. Neubauer, S., *The failing heart--an engine out of fuel*. N Engl J Med, 2007. **356**(11): p. 1140-51.
140. Stanley, W.C., G.D. Lopaschuk, and J.G. McCormack, *Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart*. Cardiovasc Res, 1997. **34**(1): p. 25-33.
141. Kalsi, K.K., et al., *Energetics and function of the failing human heart with dilated or hypertrophic cardiomyopathy*. Eur J Clin Invest, 1999. **29**(6): p. 469-77.
142. Davila-Roman, V.G., et al., *Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(2): p. 271-7.
143. Huang, X.P. and J.F. Du, *Troponin I, cardiac diastolic dysfunction and restrictive cardiomyopathy*. Acta Pharmacol Sin, 2004. **25**(12): p. 1569-75.
144. Sack, M.N., et al., *Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart*. Circulation, 1996. **94**(11): p. 2837-42.

145. Hardy, C.J., et al., *Altered myocardial high-energy phosphate metabolites in patients with dilated cardiomyopathy*. Am Heart J, 1991. **122**(3 Pt 1): p. 795-801.
146. Neubauer, S., et al., *Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1997. **96**(7): p. 2190-6.
147. Ventura-Clapier, R., et al., *Bioenergetics of the failing heart*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(7): p. 1360-72.
148. Faerber, G., et al., *Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: reduced peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator levels and mitochondrial dysfunction*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011. **141**(2): p. 492-500, 500 e1.
149. Hock, M.B. and A. Kralli, *Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function*. Annu Rev Physiol, 2009. **71**: p. 177-203.
150. Lu, Z., et al., *PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(7): p. 1011-22.
151. Bergmann, O., et al., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans*. Science, 2009. **324**(5923): p. 98-102.
152. Garg, S., J. Narula, and Y. Chandrashekhar, *Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(1): p. 73-9.
153. Olivetti, G., et al., *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
154. Communal, C., et al., *Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway*. Circulation, 1998. **98**(13): p. 1329-34.
155. Geng, Y.J., et al., *Apoptosis of cardiac myocytes in Gsalpha transgenic mice*. Circ Res, 1999. **84**(1): p. 34-42.
156. Iwai-Kanai, E., et al., *alpha- and beta-adrenergic pathways differentially regulate cell type-specific apoptosis in rat cardiac myocytes*. Circulation, 1999. **100**(3): p. 305-11.
157. Narula, J., et al., *Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure*. N Engl J Med, 1996. **335**(16): p. 1182-9.
158. Maiuri, M.C., et al., *Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 741-52.
159. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 463-77.
160. Klionsky, D.J. and S.D. Emr, *Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1717-21.

161. Yamamoto, S., et al., *On the nature of cell death during remodeling of hypertrophied human myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(1): p. 161-75.
162. Knaapen, M.W., et al., *Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure*. Cardiovasc Res, 2001. **51**(2): p. 304-12.
163. Shimomura, H., et al., *Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy*. Jpn Circ J, 2001. **65**(11): p. 965-8.
164. Hein, S., et al., *Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms*. Circulation, 2003. **107**(7): p. 984-91.
165. Suda, T., et al., *Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family*. Cell, 1993. **75**(6): p. 1169-78.
166. Kostin, S., et al., *Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts*. Circ Res, 2003. **92**(7): p. 715-24.
167. Tsutsui, H., et al., *Characteristics and outcomes of patients with heart failure in general practices and hospitals*. Circ J, 2007. **71**(4): p. 449-54.
168. Thohan, V.S., SJ. Nagueh, SF. Rivas-Gotz, C. Koerner, MM. Lafuente, and M.N. JA. Loebe, GP. Torre-Amione, G. , *Cellular and hemodynamics responses of failing myocardium to continuous flow mechanical circulatory support using the DeBakey-Noon left ventricular assist device: a comparative analysis with pulsatile-type devices*. J Heart Lung Transplant., 2005. **24**: p. 566 –575.
169. Latini, R., et al., *Prognostic value of very low plasma concentrations of troponin T in patients with stable chronic heart failure*. Circulation, 2007. **116**(11): p. 1242-9.
170. Dorn, G.W., 2nd, *Mechanisms of non-apoptotic programmed cell death in diabetes and heart failure*. Cell Cycle, 2010. **9**(17): p. 3442-8.
171. Baicu, C.F., et al., *Changes in extracellular collagen matrix alter myocardial systolic performance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(1): p. H122-32.
172. Robinson, T.F., et al., *Coiled perimysial fibers of papillary muscle in rat heart: morphology, distribution, and changes in configuration*. Circ Res, 1988. **63**(3): p. 577-92.
173. Menon, S.C., et al., *Diastolic dysfunction and its histopathological correlation in obstructive hypertrophic cardiomyopathy in children and adolescents*. J Am Soc Echocardiogr, 2009. **22**(12): p. 1327-34.
174. Janicki, J.S. and G.L. Brower, *The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function*. J Card Fail, 2002. **8**(6 Suppl): p. S319-25.
175. Weber, K.T., et al., *Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium*. Circ Res, 1988. **62**(4): p. 757-65.
176. Marijianowski, M.M., et al., *Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: a quantitative assessment*. J Am Coll Cardiol, 1995. **25**(6): p. 1263-72.

177. Yang, C.M., et al., *Changes in collagen phenotypes during progression and regression of cardiac hypertrophy*. Cardiovasc Res, 1997. **36**(2): p. 236-45.
178. Mukherjee, D. and S. Sen, *Alteration of cardiac collagen phenotypes in hypertensive hypertrophy: role of blood pressure*. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(2): p. 185-96.
179. Burgess, M.L., et al., *Exercise- and hypertension-induced collagen changes are related to left ventricular function in rat hearts*. Am J Physiol, 1996. **270**(1 Pt 2): p. H151-9.
180. Wei, S., et al., *Left and right ventricular collagen type I/III ratios and remodeling post-myocardial infarction*. J Card Fail, 1999. **5**(2): p. 117-26.
181. Neumann, T., et al., *Diastolic dysfunction and collagen structure in canine pacing-induced heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(1): p. 179-92.
182. Weber, K.T., et al., *Inadequate collagen tethers in dilated cardiopathy*. Am Heart J, 1988. **116**(6 Pt 1): p. 1641-6.
183. Graham, H.K. and A.W. Trafford, *Spatial disruption and enhanced degradation of collagen with the transition from compensated ventricular hypertrophy to symptomatic congestive heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(3): p. H1364-72.
184. Fedak, P.W., et al., *Matrix remodeling in experimental and human heart failure: a possible regulatory role for TIMP-3*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(2): p. H626-34.
185. Grieve, D.J., et al., *Involvement of the nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase isoform Nox2 in cardiac contractile dysfunction occurring in response to pressure overload*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(4): p. 817-26.
186. Maack, C., et al., *Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment*. Circulation, 2003. **108**(13): p. 1567-74.
187. Liu, Y., et al., *NADPH oxidase inhibition ameliorates cardiac dysfunction in rabbits with heart failure*. Mol Cell Biochem, 2010. **343**(1-2): p. 143-53.
188. Qin, F., et al., *Cardiac-specific overexpression of catalase identifies hydrogen peroxide-dependent and -independent phases of myocardial remodeling and prevents the progression to overt heart failure in G(alpha)q-overexpressing transgenic mice*. Circ Heart Fail, 2010. **3**(2): p. 306-13.
189. Kaludercic, N., et al., *Monoamine oxidase A-mediated enhanced catabolism of norepinephrine contributes to adverse remodeling and pump failure in hearts with pressure overload*. Circ Res, 2010. **106**(1): p. 193-202.
190. Vivekananthan, D.P., et al., *Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2003. **361**(9374): p. 2017-23.
191. Kowaltowski, A.J., et al., *Mitochondria and reactive oxygen species*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(4): p. 333-43.

192. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 1-13.
193. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.
194. Migliaccio, E., et al., *The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals*. Nature, 1999. **402**(6759): p. 309-13.
195. Tretter, L., et al., *Characteristics of alpha-glycerophosphate-evoked H₂O₂ generation in brain mitochondria*. J Neurochem, 2007. **100**(3): p. 650-63.
196. Boveris, A., N. Oshino, and B. Chance, *The cellular production of hydrogen peroxide*. Biochem J, 1972. **128**(3): p. 617-30.
197. Boveris, A. and B. Chance, *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen*. Biochem J, 1973. **134**(3): p. 707-16.
198. Adams, S.H., et al., *Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women*. J Nutr, 2009. **139**(6): p. 1073-81.
199. Chen, K., S.E. Craige, and J.F. Keaney, Jr., *Downstream targets and intracellular compartmentalization in Nox signaling*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(10): p. 2467-80.
200. Griffith, O.W. and D.J. Stuehr, *Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 707-36.
201. Vasquez-Vivar, J., et al., *Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9220-5.
202. Ichinose, F., et al., *Pressure overload-induced LV hypertrophy and dysfunction in mice are exacerbated by congenital NOS3 deficiency*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(3): p. H1070-5.
203. Jones, S.P., et al., *Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4891-6.
204. Jones, S.P., et al., *Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(1): p. H276-82.
205. Janssens, S., et al., *Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction*. Circ Res, 2004. **94**(9): p. 1256-62.
206. Jarasch, E.D., et al., *Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium*. Cell, 1981. **25**(1): p. 67-82.
207. Harrison, R., *Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?* Free Radic Biol Med, 2002. **33**(6): p. 774-97.

208. Della Corte, E., et al., *Properties of the xanthine oxidase from human liver*. Biochim Biophys Acta, 1969. **191**(1): p. 164-6.
209. Granger, D.N., M.E. Hollwarth, and D.A. Parks, *Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals*. Acta Physiol Scand Suppl, 1986. **548**: p. 47-63.
210. Granger, D.N., G. Rutili, and J.M. McCord, *Superoxide radicals in feline intestinal ischemia*. Gastroenterology, 1981. **81**(1): p. 22-9.
211. McCord, J.M., *Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury*. N Engl J Med, 1985. **312**(3): p. 159-63.
212. Brash, A.R., *Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 23679-82.
213. Mehrabian, M., et al., *Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice*. Circ Res, 2002. **91**(2): p. 120-6.
214. Sturtz, L.A., et al., *A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 38084-9.
215. Shen, X., et al., *Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy*. Diabetes, 2006. **55**(3): p. 798-805.
216. Bolli, R., et al., *Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury*. Circ Res, 1989. **65**(3): p. 607-22.
217. Le, C.T., et al., *Buthionine sulfoximine reduces the protective capacity of myocytes to withstand peroxide-derived free radical attack*. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(5): p. 519-28.
218. Toussaint, O., A. Houbion, and J. Remacle, *Relationship between the critical level of oxidative stresses and the glutathione peroxidase activity*. Toxicology, 1993. **81**(2): p. 89-101.
219. Shiomi, T., et al., *Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice*. Circulation, 2004. **109**(4): p. 544-9.
220. Matsushima, S., et al., *Overexpression of glutathione peroxidase attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(5): p. H2237-45.
221. Gaetani, G.F., et al., *Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes*. Blood, 1996. **87**(4): p. 1595-9.
222. Mueller, S., H.D. Riedel, and W. Stremmel, *Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂ -removing enzyme in human erythrocytes*. Blood, 1997. **90**(12): p. 4973-8.

223. Wu, S., et al., *Cardiac-specific overexpression of catalase prolongs lifespan and attenuates ageing-induced cardiomyocyte contractile dysfunction and protein damage*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**(1-2): p. 81-7.
224. Otterbein, L.E. and A.M. Choi, *Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(6): p. L1029-37.
225. Abraham, N.G. and A. Kappas, *Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(1): p. 1-25.
226. Brouard, S., et al., *Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1015-26.
227. Lee, T.S. and L.Y. Chau, *Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 240-6.
228. Yet, S.F., et al., *Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice*. Circ Res, 2001. **89**(2): p. 168-73.
229. Nogueira, C.W., G. Zeni, and J.B. Rocha, *Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology*. Chem Rev, 2004. **104**(12): p. 6255-85.
230. Jones, S.P., et al., *Role of intracellular antioxidant enzymes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(1): p. H277-82.
231. Masella, R., et al., *Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes*. J Nutr Biochem, 2005. **16**(10): p. 577-86.
232. Mallat, Z., et al., *Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure*. Circulation, 1998. **97**(16): p. 1536-9.
233. Finkel, T., *Redox-dependent signal transduction*. FEBS Lett, 2000. **476**(1-2): p. 52-4.
234. Sohn, J. and J. Rudolph, *Catalytic and chemical competence of regulation of cdc25 phosphatase by oxidation/reduction*. Biochemistry, 2003. **42**(34): p. 10060-70.
235. Paravicini, T.M. and R.M. Touyz, *Redox signaling in hypertension*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 247-58.
236. Avery, S.V., *Molecular targets of oxidative stress*. Biochem J, 2011. **434**(2): p. 201-10.
237. Mattie, M.D. and J.H. Freedman, *Protective effects of aspirin and vitamin E (alpha-tocopherol) against copper- and cadmium-induced toxicity*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **285**(4): p. 921-5.
238. Friedberg, E.C., L.D. McDaniel, and R.A. Schultz, *The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(1): p. 5-10.

239. Jin, Y.H., et al., *Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair*. Nat Genet, 2003. **34**(3): p. 326-9.
240. Serero, A., et al., *Yeast genes involved in cadmium tolerance: Identification of DNA replication as a target of cadmium toxicity*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(8): p. 1262-75.
241. Youn, C.K., et al., *Cadmium down-regulates human OGG1 through suppression of Sp1 activity*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 25185-95.
242. Thorpe, G.W., et al., *Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(17): p. 6564-9.
243. McLean, M.R., P.B. Goldberg, and J. Roberts, *An ultrastructural study of the effects of age on sympathetic innervation and atrial tissue in the rat*. J Mol Cell Cardiol, 1983. **15**(2): p. 75-92.
244. Rehman, H.U., *Age and the cardiovascular system*. Hosp Med, 1999. **60**(9): p. 645-52.
245. Stratton, J.R., et al., *Cardiovascular responses to exercise. Effects of aging and exercise training in healthy men*. Circulation, 1994. **89**(4): p. 1648-55.
246. Lakatta, E.G., et al., *Diminished inotropic response of aged myocardium to catecholamines*. Circ Res, 1975. **36**(2): p. 262-9.
247. Henle, E.S., et al., *Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated fenton reactions has possible biological implications*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 962-71.
248. Oikawa, S., S. Tada-Oikawa, and S. Kawanishi, *Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening*. Biochemistry, 2001. **40**(15): p. 4763-8.
249. Petersen, S., G. Saretzki, and T. von Zglinicki, *Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts*. Exp Cell Res, 1998. **239**(1): p. 152-60.
250. Kruk, P.A., N.J. Rampino, and V.A. Bohr, *DNA damage and repair in telomeres: relation to aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(1): p. 258-62.
251. Furumoto, K., et al., *Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress*. Life Sci, 1998. **63**(11): p. 935-48.
252. Kurz, D.J., et al., *Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 11): p. 2417-26.
253. Corral-Debrinski, M., et al., *Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age*. Nat Genet, 1992. **2**(4): p. 324-9.
254. Kadenbach, B., et al., *Human aging is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA*. Mutat Res, 1995. **338**(1-6): p. 161-72.

255. Phadnis, N., R.A. Sia, and E.A. Sia, *Analysis of repeat-mediated deletions in the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2005. **171**(4): p. 1549-59.
256. Srivastava, S. and C.T. Moraes, *Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(7): p. 893-902.
257. Zeviani, M., A. Spinazzola, and V. Carelli, *Nuclear genes in mitochondrial disorders*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(3): p. 262-70.
258. Hasty, P., *The impact of DNA damage, genetic mutation and cellular responses on cancer prevention, longevity and aging: observations in humans and mice*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(1): p. 71-7.
259. Barnes, D.E. and T. Lindahl, *Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells*. Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 445-76.
260. Caldecott, K.W., *Single-strand break repair and genetic disease*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(8): p. 619-31.
261. Gillet, L.C. and O.D. Scharer, *Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair*. Chem Rev, 2006. **106**(2): p. 253-76.
262. Sugasawa, K., *UV-induced ubiquitylation of XPC complex, the UV-DDB-ubiquitin ligase complex, and DNA repair*. J Mol Histol, 2006. **37**(5-7): p. 189-202.
263. Foustari, M. and L.H. Mullenders, *Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 73-84.
264. Gorbunova, V., et al., *Changes in DNA repair during aging*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(22): p. 7466-74.
265. Davies, M.J., et al., *Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(11-12): p. 1151-63.
266. Stadtman, E.R. and B.S. Berlett, *Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease*. Chem Res Toxicol, 1997. **10**(5): p. 485-94.
267. Dean, R.T., et al., *Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation*. Biochem J, 1997. **324** (Pt 1): p. 1-18.
268. Davies, M.J., *The oxidative environment and protein damage*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1703**(2): p. 93-109.
269. Grune, T., et al., *Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(3): p. 709-18.
270. Ischiropoulos, H., *Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(3): p. 776-83.
271. Requena, J.R., R.L. Levine, and E.R. Stadtman, *Recent advances in the analysis of oxidized proteins*. Amino Acids, 2003. **25**(3-4): p. 221-6.

272. Stadtman, E.R. and R.L. Levine, *Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins*. Amino Acids, 2003. **25**(3-4): p. 207-18.
273. Stadtman, E.R., J. Moskovitz, and R.L. Levine, *Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences*. Antioxid Redox Signal, 2003. **5**(5): p. 577-82.
274. Johnson, L., *Protein kinases and their therapeutic exploitation*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 1): p. 7-11.
275. Heneberg, P. and P. Draber, *Regulation of cys-based protein tyrosine phosphatases via reactive oxygen and nitrogen species in mast cells and basophils*. Curr Med Chem, 2005. **12**(16): p. 1859-71.
276. Cho, S.H., et al., *Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H(2)O(2) mediated cell signaling*. FEBS Lett, 2004. **560**(1-3): p. 7-13.
277. Haddad, J.J., *Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors*. Cell Signal, 2002. **14**(11): p. 879-97.
278. Turpaev, K.T., *Reactive oxygen species and regulation of gene expression*. Biochemistry (Mosc), 2002. **67**(3): p. 281-92.
279. Ogryzko, V.V., et al., *The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases*. Cell, 1996. **87**(5): p. 953-9.
280. Rahman, I., J. Marwick, and P. Kirkham, *Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(6): p. 1255-67.
281. Othumpangat, S., M. Kashon, and P. Joseph, *Eukaryotic translation initiation factor 4E is a cellular target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 25162-9.
282. Ling, J. and D. Soll, *Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4028-33.
283. Holland, S., et al., *Application of the comprehensive set of heterozygous yeast deletion mutants to elucidate the molecular basis of cellular chromium toxicity*. Genome Biol, 2007. **8**(12): p. R268.
284. Medicherla, B. and A.L. Goldberg, *Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins*. J Cell Biol, 2008. **182**(4): p. 663-73.
285. Wu, M., et al., *Sustained oxidative stress inhibits NF-kappaB activation partially via inactivating the proteasome*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(1): p. 62-9.
286. Desnues, B., et al., *Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable Escherichia coli cells*. EMBO Rep, 2003. **4**(4): p. 400-4.
287. Aguilaniu, H., et al., *Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis*. Science, 2003. **299**(5613): p. 1751-3.

288. Liu, B., et al., *The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates*. Cell, 2010. **140**(2): p. 257-67.
289. Erjavec, N. and T. Nystrom, *Sir2p-dependent protein segregation gives rise to a superior reactive oxygen species management in the progeny of Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(26): p. 10877-81.
290. Marty, J.C., et al., *[Oxidative stress is exacerbated in diabetic patients during cardiopulmonary bypass]*. Ann Cardiol Angeiol (Paris), 2008. **57**(3): p. 155-60.
291. Dalle-Donne, I., et al., *Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics*. Mass Spectrom Rev, 2005. **24**(1): p. 55-99.
292. Halliwell, B. and M. Whiteman, *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* Br J Pharmacol, 2004. **142**(2): p. 231-55.
293. Winterbourn, C.C. and I.H. Buss, *Protein carbonyl measurement by enzyme-linked immunosorbent assay*. Methods Enzymol, 1999. **300**: p. 106-11.
294. Levine, R.L., et al., *Determination of carbonyl groups in oxidized proteins*. Methods Mol Biol, 2000. **99**: p. 15-24.
295. Griffiths, H.R., et al., *Biomarkers*. Mol Aspects Med, 2002. **23**(1-3): p. 101-208.
296. Giustarini, D., et al., *Adaptation of the Griess reaction for detection of nitrite in human plasma*. Free Radic Res, 2004. **38**(11): p. 1235-40.
297. Tarpey, M.M., D.A. Wink, and M.B. Grisham, *Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(3): p. R431-44.
298. Maki, H. and M. Sekiguchi, *MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis*. Nature, 1992. **355**(6357): p. 273-5.
299. Halliwell, B., *Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker?* Free Radic Biol Med, 2002. **32**(10): p. 968-74.
300. Draper, H.H., A.S. Csallany, and M. Hadley, *Urinary aldehydes as indicators of lipid peroxidation in vivo*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(11): p. 1071-7.
301. Wilson, R., et al., *Dietary hydroxy fatty acids are absorbed in humans: implications for the measurement of 'oxidative stress' in vivo*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(2): p. 162-8.
302. Ferrari, R., et al., *Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure*. Eur Heart J, 1998. **19 Suppl B**: p. B2-11.
303. Wattanapitayakul, S.K. and J.A. Bauer, *Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications*. Pharmacol Ther, 2001. **89**(2): p. 187-206.

304. Nagayoshi, Y., et al., *Differences in oxidative stress markers based on the aetiology of heart failure: comparison of oxidative stress in patients with and without coronary artery disease*. Free Radic Res, 2009. **43**(12): p. 1159-66.
305. Krishnan, E., *Hyperuricemia and incident heart failure*. Circ Heart Fail, 2009. **2**(6): p. 556-62.
306. Cave, A., et al., *NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. **360**(1464): p. 2327-34.
307. Tsutsui, H., et al., *Greater susceptibility of failing cardiac myocytes to oxygen free radical-mediated injury*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(1): p. 103-9.
308. Kaludercic, N., et al., *Monoamine oxidase A-mediated enhanced catabolism of norepinephrine contributes to adverse remodeling and pump failure in hearts with pressure overload*. Circ Res, 2010. **106**(1): p. 193-202.
309. Lairez, O., et al., *Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(4): p. 587-95.
310. Seddon, M., Y.H. Looi, and A.M. Shah, *Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure*. Heart, 2007. **93**(8): p. 903-7.
311. Kostin, S., *Types of cardiomyocyte death and clinical outcomes in patients with heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(14): p. 1532-4.
312. Takimoto, E. and D.A. Kass, *Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling*. Hypertension, 2007. **49**(2): p. 241-8.
313. Santos, C.X., et al., *Redox signaling in cardiac myocytes*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(7): p. 777-93.
314. Camello-Almaraz, C., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(5): p. C1082-8.
315. Gen, W., et al., *Mechanisms of Ca²⁺ overload induced by extracellular H₂O₂ in quiescent isolated rat cardiomyocytes*. Basic Res Cardiol, 2001. **96**(6): p. 623-9.
316. Kim, S.Y., et al., *Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca²⁺ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes*. Exp Mol Med, 2006. **38**(5): p. 535-45.
317. Zeng, Q., et al., *Endothelin-1 regulates cardiac L-type calcium channels via NAD(P)H oxidase-derived superoxide*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **326**(3): p. 732-8.
318. Zima, A.V. and L.A. Blatter, *Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 310-21.
319. Childs, A.C., et al., *Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio*. Cancer Res, 2002. **62**(16): p. 4592-8.

320. Deniaud, A., et al., *Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis*. *Oncogene*, 2008. **27**(3): p. 285-99.
321. L'Ecuyer, T., et al., *DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(3): p. H1273-80.
322. Liu, J., et al., *ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **295**(5): p. H1956-65.
323. Liu, X., et al., *Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **286**(3): p. H933-9.
324. Shizukuda, Y., et al., *Targeted disruption of p53 attenuates doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice*. *Mol Cell Biochem*, 2005. **273**(1-2): p. 25-32.
325. Dorn, G.W., 2nd, *Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling*. *Cardiovasc Res*, 2009. **81**(3): p. 465-73.
326. Gustafsson, A.B. and R.A. Gottlieb, *Heart mitochondria: gates of life and death*. *Cardiovasc Res*, 2008. **77**(2): p. 334-43.
327. Scherz-Shouval, R., et al., *Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4*. *Embo J*, 2007. **26**(7): p. 1749-60.
328. Chen, Y., et al., *Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(1): p. 171-82.
329. Vigliano, C.A., et al., *Cardiomyocyte hypertrophy, oncosis, and autophagic vacuolization predict mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy with advanced heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2011. **57**(14): p. 1523-31.
330. Sumandea, M.P. and S.F. Steinberg, *Redox signaling and cardiac sarcomeres*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(12): p. 9921-7.
331. Ide, T., et al., *Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction*. *Circ Res*, 2001. **88**(5): p. 529-35.
332. Kuroda, J., et al., *NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(35): p. 15565-70.
333. Qin, F., et al., *Cardiac-specific overexpression of catalase identifies hydrogen peroxide-dependent and -independent phases of myocardial remodeling and prevents the progression to overt heart failure in G(alpha)q-overexpressing transgenic mice*. *Circ Heart Fail*, 2010. **3**(2): p. 306-13.
334. Tsutsui, H., S. Kinugawa, and S. Matsushima, *Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure*. *Circ J*, 2008. **72 Suppl A**: p. A31-7.
335. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *The definition and measurement of antioxidants in biological systems*. *Free Radic Biol Med*, 1995. **18**(1): p. 125-6.

336. Harman, D., *The biologic clock: the mitochondria?* J Am Geriatr Soc, 1972. **20**(4): p. 145-7.
337. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.* J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
338. Erden-Inal, M., E. Sunal, and G. Kanbak, *Age-related changes in the glutathione redox system.* Cell Biochem Funct, 2002. **20**(1): p. 61-6.
339. Jones, D.P., et al., *Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses.* Free Radic Biol Med, 2002. **33**(9): p. 1290-300.
340. Junqueira, V.B., et al., *Aging and oxidative stress.* Mol Aspects Med, 2004. **25**(1-2): p. 5-16.
341. Gil, L., et al., *Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes.* Free Radic Res, 2006. **40**(5): p. 495-505.
342. Sumandea, M.P. and S.F. Steinberg, *Redox signaling and cardiac sarcomeres* J Biol Chem, 2011. **286** (12): p. 9921-7.
343. Sampayo, J.N., M.S. Gill, and G.J. Lithgow, *Oxidative stress and aging--the use of superoxide dismutase/catalase mimetics to extend lifespan.* Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1305-7.
344. Mecocci, P., et al., *Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians.* Free Radic Biol Med, 2000. **28**(8): p. 1243-8.
345. Ozbay, B. and H. Dulger, *Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking.* Tohoku J Exp Med, 2002. **197**(2): p. 119-24.
346. Conconi, M., et al., *Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative inactivation by heat-shock protein 90.* Arch Biochem Biophys, 1996. **331**(2): p. 232-40.
347. Shibatani, T., M. Nazir, and W.F. Ward, *Alteration of rat liver 20S proteasome activities by age and food restriction.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 1996. **51**(5): p. B316-22.
348. Anselmi, B., et al., *Dietary self-selection can compensate an age-related decrease of rat liver 20 S proteasome activity observed with standard diet.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 1998. **53**(3): p. B173-9.
349. Ponnappan, U., M. Zhong, and G.U. Trebilcock, *Decreased proteasome-mediated degradation in T cells from the elderly: A role in immune senescence.* Cell Immunol, 1999. **192**(2): p. 167-74.
350. Keller, J.N., K.B. Hanni, and W.R. Markesbery, *Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress.* Mech Ageing Dev, 2000. **113**(1): p. 61-70.

351. Ding, Q., E. Dimayuga, and J.N. Keller, *Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(1-2): p. 163-72.
352. Farout, L. and B. Friguet, *Proteasome function in aging and oxidative stress: implications in protein maintenance failure*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(1-2): p. 205-16.
353. Breusing, N. and T. Grune, *Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging*. *Biol Chem*, 2008. **389**(3): p. 203-9.
354. Ly, D.H., et al., *Mitotic misregulation and human aging*. *Science*, 2000. **287**(5462): p. 2486-92.
355. Bulteau, A.L., L.I. Szweda, and B. Friguet, *Age-dependent declines in proteasome activity in the heart*. *Arch Biochem Biophys*, 2002. **397**(2): p. 298-304.
356. Carrard, G., et al., *Impairment of proteasome structure and function in aging*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002. **34**(11): p. 1461-74.
357. Terman, A. and U.T. Brunk, *Myocyte aging and mitochondrial turnover*. *Exp Gerontol*, 2004. **39**(5): p. 701-5.
358. Ding, W.X., et al., *Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability*. *Am J Pathol*, 2007. **171**(2): p. 513-24.
359. Ding, W.X. and X.M. Yin, *Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome*. *Autophagy*, 2008. **4**(2): p. 141-50.
360. Cuervo, A.M. and J.F. Dice, *Age-related decline in chaperone-mediated autophagy*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(40): p. 31505-13.
361. Cristofalo, V.J., et al., *Replicative senescence: a critical review*. *Mech Ageing Dev*, 2004. **125**(10-11): p. 827-48.
362. Gorbunova, V., A. Seluanov, and O.M. Pereira-Smith, *Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(41): p. 38540-9.
363. Wong, L.S., et al., *Telomere biology in cardiovascular disease: the TERC^{-/-} mouse as a model for heart failure and ageing*. *Cardiovasc Res*, 2009. **81**(2): p. 244-52.
364. Alcorta, D.A., et al., *Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(24): p. 13742-7.
365. Fang, L., et al., *p21Waf1/Cip1/Sdi1 induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53*. *Oncogene*, 1999. **18**(18): p. 2789-97.

366. Kagawa, S., et al., *Overexpression of the p21 sdi1 gene induces senescence-like state in human cancer cells: implication for senescence-directed molecular therapy for cancer*. Cell Death Differ, 1999. **6**(8): p. 765-72.
367. Wang, Y., et al., *Induced p53 expression in lung cancer cell line promotes cell senescence and differentially modifies the cytotoxicity of anti-cancer drugs*. Oncogene, 1998. **17**(15): p. 1923-30.
368. Torella, D., et al., *Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression*. Circ Res, 2004. **94**(4): p. 514-24.
369. Park, S.K. and T.A. Prolla, *Gene expression profiling studies of aging in cardiac and skeletal muscles*. Cardiovasc Res, 2005. **66**(2): p. 205-12.
370. Maejima, Y., et al., *Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage*. Aging Cell, 2008. **7**(2): p. 125-36.
371. Liu, V.W., C. Zhang, and P. Nagley, *Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(5): p. 1268-75.
372. Mohamed, S.A., et al., *Mitochondrial DNA deletions and the aging heart*. Exp Gerontol, 2006. **41**(5): p. 508-17.
373. Chomyn, A. and G. Attardi, *MtDNA mutations in aging and apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(3): p. 519-29.
374. Bandy, B. and A.J. Davison, *Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging?* Free Radic Biol Med, 1990. **8**(6): p. 523-39.
375. Seo, A.Y., et al., *Mitochondrial iron accumulation with age and functional consequences*. Aging Cell, 2008. **7**(5): p. 706-16.
376. Kujoth, G.C., C. Leeuwenburgh, and T.A. Prolla, *Mitochondrial DNA mutations and apoptosis in mammalian aging*. Cancer Res, 2006. **66**(15): p. 7386-9.
377. Wallace, D.C. and W. Fan, *The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse*. Genes Dev, 2009. **23**(15): p. 1714-36.
378. Kujoth, G.C., et al., *Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging*. Science, 2005. **309**(5733): p. 481-4.
379. Trifunovic, A., et al., *Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 417-23.
380. Hutter, E., et al., *Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle*. Aging Cell, 2007. **6**(2): p. 245-56.
381. Jahangir, A., et al., *Increased calcium vulnerability of senescent cardiac mitochondria: protective role for a mitochondrial potassium channel opener*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(10): p. 1073-86.

382. Pimentel, A.E., et al., *Greater rate of decline in maximal aerobic capacity with age in endurance-trained than in sedentary men*. J Appl Physiol, 2003. **94**(6): p. 2406-13.
383. Wallace, D.C., *A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing*. Novartis Found Symp, 2001. **235**: p. 247-63; discussion 263-6.
384. Preston, C.C., et al., *Aging-induced alterations in gene transcripts and functional activity of mitochondrial oxidative phosphorylation complexes in the heart*. Mech Ageing Dev, 2008. **129**(6): p. 304-12.
385. Fannin, S.W., et al., *Aging selectively decreases oxidative capacity in rat heart interfibrillar mitochondria*. Arch Biochem Biophys, 1999. **372**(2): p. 399-407.
386. Lesnefsky, E.J. and C.L. Hoppel, *Oxidative phosphorylation and aging*. Ageing Res Rev, 2006. **5**(4): p. 402-33.
387. Suh, J.H., S.H. Heath, and T.M. Hagen, *Two subpopulations of mitochondria in the aging rat heart display heterogenous levels of oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(9): p. 1064-72.
388. Tanaka, M., et al., *Mitochondrial genotype associated with longevity*. Lancet, 1998. **351**(9097): p. 185-6.
389. Camougrand, N. and M. Rigoulet, *Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress*. Respir Physiol, 2001. **128**(3): p. 393-401.
390. Lu, T. and T. Finkel, *Free radicals and senescence*. Exp Cell Res, 2008. **314**(9): p. 1918-22.
391. Dostert, P., *Can our knowledge of monoamine oxidase (MAO) help in the design of better MAO inhibitors?* J Neural Transm Suppl, 1994. **41**: p. 269-79.
392. Guimaraes, J.T., et al., *Differential substrate specificity of monoamine oxidase in the rat heart and renal cortex*. Life Sci, 2003. **73**(8): p. 955-67.
393. Tipton, K.F., A.M. O'Carroll, and J.M. McCrodden, *The catalytic behaviour of monoamine oxidase*. J Neural Transm Suppl, 1987. **23**: p. 25-35.
394. Suzuki, O., Y. Katsumata, and M. Oya, *Oxidation of beta-phenylethylamine by both types of monoamine oxidase: examination of enzymes in brain and liver mitochondria of eight species*. J Neurochem, 1981. **36**(3): p. 1298-301.
395. Johnston, J.P., *Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue*. Biochem Pharmacol, 1968. **17**(7): p. 1285-97.
396. Knoll, J. and K. Magyar, *Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors*. Adv Biochem Psychopharmacol, 1972. **5**: p. 393-408.
397. Lan, N.C., et al., *Human monoamine oxidase A and B genes map to Xp 11.23 and are deleted in a patient with Norrie disease*. Genomics, 1989. **4**(4): p. 552-9.

398. Bach, A.W., et al., *cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4934-8.
399. Shih, J.C., K. Chen, and R.M. Geha, *Determination of regions important for monoamine oxidase (MAO) A and B substrate and inhibitor selectivities*. J Neural Transm Suppl, 1998. **52**: p. 1-8.
400. Tsugeno, Y., et al., *Regions of the molecule responsible for substrate specificity of monoamine oxidase A and B: a chimeric enzyme analysis*. J Biochem, 1995. **118**(5): p. 974-80.
401. Rebrin, I., et al., *Effects of carboxyl-terminal truncations on the activity and solubility of human monoamine oxidase B*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29499-506.
402. Youdim, M.B., D. Edmondson, and K.F. Tipton, *The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(4): p. 295-309.
403. Collins, F.A., et al., *Clinical, biochemical, and neuropsychiatric evaluation of a patient with a contiguous gene syndrome due to a microdeletion Xp11.3 including the Norrie disease locus and monoamine oxidase (MAOA and MAOB) genes*. Am J Med Genet, 1992. **42**(1): p. 127-34.
404. Sims, K.B., et al., *Monoamine oxidase deficiency in males with an X chromosome deletion*. Neuron, 1989. **2**(1): p. 1069-76.
405. Bleeker-Wagemakers, E.M., I. Zweije-Hofman, and A. Gal, *Norrie disease as part of a complex syndrome explained by a submicroscopic deletion of the X chromosome*. Ophthalmic Paediatr Genet, 1988. **9**(3): p. 137-42.
406. Murphy, D.L., et al., *Marked amine and amine metabolite changes in Norrie disease patients with an X-chromosomal deletion affecting monoamine oxidase*. J Neurochem, 1990. **54**(1): p. 242-7.
407. Donnai, D., R.C. Mountford, and A.P. Read, *Norrie disease resulting from a gene deletion: clinical features and DNA studies*. J Med Genet, 1988. **25**(2): p. 73-8.
408. Murphy, D.L., et al., *Plasma amine oxidase activities in Norrie disease patients with an X-chromosomal deletion affecting monoamine oxidase*. J Neural Transm Gen Sect, 1991. **83**(1-2): p. 1-12.
409. Brunner, H.G., et al., *X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism*. Am J Hum Genet, 1993. **52**(6): p. 1032-9.
410. Brunner, H.G., et al., *Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A*. Science, 1993. **262**(5133): p. 578-80.
411. Tadic, A., et al., *Association of a MAOA gene variant with generalized anxiety disorder, but not with panic disorder or major depression*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2003. **117B**(1): p. 1-6.

412. Vanyukov, M.M., et al., *Haplotypes of the monoamine oxidase genes and the risk for substance use disorders*. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2004. **125B**(1): p. 120-5.
413. Jahng, J.W., et al., *Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization*. *Synapse*, 1997. **25**(1): p. 30-6.
414. Shih, J.C., K. Chen, and M.J. Ridd, *Monoamine oxidase: from genes to behavior*. *Annu Rev Neurosci*, 1999. **22**: p. 197-217.
415. Fowler, J.S., et al., *Monoamine oxidase: radiotracer development and human studies*. *Methods*, 2002. **27**(3): p. 263-77.
416. Shih, J.C., *Cloning, after cloning, knock-out mice, and physiological functions of MAO A and B*. *Neurotoxicology*, 2004. **25**(1-2): p. 21-30.
417. Strolin Benedetti, M. and P. Dostert, *Monoamine oxidase, brain ageing and degenerative diseases*. *Biochem Pharmacol*, 1989. **38**(4): p. 555-61.
418. Shimizu, Y., et al., *The role of serotonin in ischemic cellular damage and the infarct size-reducing effect of sarpogrelate, a 5-hydroxytryptamine-2 receptor blocker, in rabbit hearts*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **40**(7): p. 1347-55.
419. Bianchi, P., et al., *Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury*. *Circulation*, 2005. **112**(21): p. 3297-305.
420. Kong, S.W., et al., *Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats*. *Physiol Genomics*, 2005. **21**(1): p. 34-42.
421. Nebigil, C.G., et al., *Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT_{2B} receptor signaling*. *Faseb J*, 2003. **17**(10): p. 1373-5.
422. Nebigil, C.G., et al., *Overexpression of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in heart leads to abnormal mitochondrial function and cardiac hypertrophy*. *Circulation*, 2003. **107**(25): p. 3223-9.
423. Bianchi, P., et al., *A new hypertrophic mechanism of serotonin in cardiac myocytes: receptor-independent ROS generation*. *Faseb J*, 2005. **19**(6): p. 641-3.
424. Villeneuve, C., et al., *Dose-dependent activation of distinct hypertrophic pathways by serotonin in cardiac cells*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **297**(2): p. H821-8.
425. Kaludercic, N., et al., *Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(7): p. 1323-32.
426. Fowler, J.S., et al., *Age-related increases in brain monoamine oxidase B in living healthy human subjects*. *Neurobiol Aging*, 1997. **18**(4): p. 431-5.
427. Mahy, N., et al., *Age-related changes of MAO-A and -B distribution in human and mouse brain*. *Neurobiology (Bp)*, 2000. **8**(1): p. 47-54.

428. Saura, J., et al., *Biphasic and region-specific MAO-B response to aging in normal human brain*. Neurobiol Aging, 1997. **18**(5): p. 497-507.
429. Saura, J., J.G. Richards, and N. Mahy, *Differential age-related changes of MAO-A and MAO-B in mouse brain and peripheral organs*. Neurobiol Aging, 1994. **15**(4): p. 399-408.
430. Saura, J., J.G. Richards, and N. Mahy, *Age-related changes on MAO in Bl/C57 mouse tissues: a quantitative radioautographic study*. J Neural Transm Suppl, 1994. **41**: p. 89-94.
431. Muscari, C., C.M. Caldarera, and C. Guarnieri, *Age-dependent production of mitochondrial hydrogen peroxide, lipid peroxides and fluorescent pigments in the rat heart*. Basic Res Cardiol, 1990. **85**(2): p. 172-8.
432. Cao Danh, H., et al., *Age-related changes in benzylamine oxidase activity in rat tissues*. J Pharm Pharmacol, 1984. **36**(9): p. 592-6.
433. Meco, M., et al., *Enzyme histochemistry of monoamine oxidase in the heart of aged rats*. Mech Ageing Dev, 1987. **38**(2): p. 145-55.
434. Maurel, A., et al., *Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(4): p. H1460-7.
435. Leichtweis, S.B., et al., *Ischaemia-reperfusion induced alterations of mitochondrial function in hypertrophied rat heart*. Acta Physiol Scand, 1996. **156**(1): p. 51-60.
436. Sahin, E., et al., *Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise*. Nature, 2011. **470**(7334): p. 359-65.
437. Soriano, F.X., et al., *Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2*. Diabetes, 2006. **55**(6): p. 1783-91.
438. Solmi, R., et al., *Lack of major mitochondrial bioenergetic changes in cultured skin fibroblasts from aged individuals*. Biochem Mol Biol Int, 1994. **33**(3): p. 477-84.
439. Jendrach, M., et al., *Morpho-dynamic changes of mitochondria during ageing of human endothelial cells*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(6-7): p. 813-21.
440. Lee, B.Y., et al., *Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase*. Aging Cell, 2006. **5**(2): p. 187-95.
441. Yoon, Y.S., et al., *Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1*. J Cell Physiol, 2006. **209**(2): p. 468-80.
442. Terman, A., et al., *Mitochondrial recycling and aging of cardiac myocytes: the role of autophagocytosis*. Exp Gerontol, 2003. **38**(8): p. 863-76.
443. Terman, A., et al., *Aging of cardiac myocytes in culture: oxidative stress, lipofuscin accumulation, and mitochondrial turnover*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1019**: p. 70-7.

444. Hoppel, C.L., et al., *Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(10): p. 1949-56.
445. Terman, A., et al., *Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(4): p. 503-35.
446. Qiang, W., et al., *Aging impairs insulin-stimulated glucose uptake in rat skeletal muscle via suppressing AMPK α* . Exp Mol Med, 2007. **39**(4): p. 535-43.
447. Reznick, R.M., et al., *Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis*. Cell Metab, 2007. **5**(2): p. 151-6.
448. Tiraby, C. and D. Langin, [*PGC-1 α , a transcriptional coactivator involved in metabolism*]. Med Sci (Paris), 2005. **21**(1): p. 49-54.
449. Cartoni, R., et al., *Mitofusins 1/2 and ERR α expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise*. J Physiol, 2005. **567**(Pt 1): p. 349-58.
450. Adhihetty, P.J., et al., *Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2007. **102**(3): p. 1143-51.
451. Sandri, M., et al., *PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(44): p. 16260-5.
452. Seo, A.Y., et al., *New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 15): p. 2533-42.
453. Kuwahara, T., S. Takamoto, and A. Ito, *Primary structure of rat monoamine oxidase A deduced from cDNA and its expression in rat tissues*. Agric Biol Chem, 1990. **54**(1): p. 253-7.
454. Cases, O., et al., *Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1763-6.
455. Anversa, P. and B. Nadal-Ginard, *Myocyte renewal and ventricular remodelling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 240-3.
456. Rota, M., et al., *The young mouse heart is composed of myocytes heterogeneous in age and function*. Circ Res, 2007. **101**(4): p. 387-99.
457. Gartenhaus, R.B., P. Wang, and P. Hoffmann, *Induction of the WAF1/CIP1 protein and apoptosis in human T-cell leukemia virus type I-transformed lymphocytes after treatment with adriamycin by using a p53-independent pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 265-8.
458. Blagosklonny, M.V., et al., *Taxol induction of p21WAF1 and p53 requires c-raf-1*. Cancer Res, 1995. **55**(20): p. 4623-6.
459. Debacq-Chainiaux, F., et al., *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*. Nat Protoc, 2009. **4**(12): p. 1798-806.

460. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
461. Wright, W.E. and J.W. Shay, *Historical claims and current interpretations of replicative aging*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(7): p. 682-8.
462. de Magalhaes, J.P., et al., *Gene expression and regulation in H2O2-induced premature senescence of human foreskin fibroblasts expressing or not telomerase*. Exp Gerontol, 2004. **39**(9): p. 1379-89.
463. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
464. Afshari, C.A., et al., *Investigation of the role of G1/S cell cycle mediators in cellular senescence*. Exp Cell Res, 1993. **209**(2): p. 231-7.
465. Counter, C.M., *The roles of telomeres and telomerase in cell life span*. Mutat Res, 1996. **366**(1): p. 45-63.
466. Funayama, R. and F. Ishikawa, *Cellular senescence and chromatin structure*. Chromosoma, 2007. **116**(5): p. 431-40.
467. Zhang, P., C. Dilley, and M.P. Mattson, *DNA damage responses in neural cells: Focus on the telomere*. Neuroscience, 2007. **145**(4): p. 1439-48.
468. Favaudon, V., *[Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death]*. Cancer Radiother, 2000. **4**(5): p. 355-68.
469. Tyner, S.D., et al., *p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 45-53.
470. Maier, B., et al., *Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53*. Genes Dev, 2004. **18**(3): p. 306-19.
471. Garcia-Cao, I., et al., *"Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally*. Embo J, 2002. **21**(22): p. 6225-35.
472. te Poele, R.H., et al., *DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo*. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1876-83.
473. Haq, R., et al., *Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence*. Cancer Res, 2002. **62**(17): p. 5076-82.
474. Macip, S., et al., *Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence*. Embo J, 2002. **21**(9): p. 2180-8.
475. Chen, Q.M., V.C. Tu, and J. Liu, *Measurements of hydrogen peroxide induced premature senescence: senescence-associated beta-galactosidase and DNA synthesis index in human diploid fibroblasts with down-regulated p53 or Rb*. Biogerontology, 2000. **1**(4): p. 335-9.
476. Wlaschek, M., et al., *Isolation and identification of psoralen plus ultraviolet A (PUVA)-induced genes in human dermal fibroblasts by polymerase chain reaction-based subtractive hybridization*. J Invest Dermatol, 2000. **115**(5): p. 909-13.

477. Leri, A., et al., *Telomerase expression and activity are coupled with myocyte proliferation and preservation of telomeric length in the failing heart*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8626-31.
478. Kajstura, J., et al., *Myocyte turnover in the aging human heart*. Circ Res, 2010. **107**(11): p. 1374-86.
479. Kajstura, J., et al., *Telomere shortening is an in vivo marker of myocyte replication and aging*. Am J Pathol, 2000. **156**(3): p. 813-9.
480. Chimenti, C., et al., *Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure*. Circ Res, 2003. **93**(7): p. 604-13.
481. Wu, S., et al., *Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins*. Febs J, 2011. **278**(6): p. 941-54.
482. Qi, X., et al., *Aberrant mitochondrial fission in neurons induced by protein kinase C δ under oxidative stress conditions in vivo*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(2): p. 256-65.
483. Duvezin-Caubet, S., et al., *Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology*. J Biol Chem, 2006. **281**(49): p. 37972-9.
484. Sharov, V.G., et al., *Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(9): p. 1757-62.
485. Ausma, J., et al., *Dedifferentiated cardiomyocytes from chronic hibernating myocardium are ischemia-tolerant*. Mol Cell Biochem, 1998. **186**(1-2): p. 159-68.
486. Hom, J. and S.S. Sheu, *Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 811-20.
487. Scholz, D., W. Diener, and J. Schaper, *Altered nucleus/cytoplasm relationship and degenerative structural changes in human dilated cardiomyopathy*. Cardioscience, 1994. **5**(2): p. 127-38.
488. Chung, S., et al., *Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2007. **4 Suppl 1**: p. S60-7.
489. Parra, V., et al., *Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(2): p. 387-97.
490. Sheridan, C., et al., *Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release*. Mol Cell, 2008. **31**(4): p. 570-85.
491. Cuervo, A.M. and J.F. Dice, *Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane*. Traffic, 2000. **1**(7): p. 570-83.
492. Wohlgemuth, S.E., et al., *Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise*. Exp Gerontol, 2010. **45**(2): p. 138-48.

493. Borniquel, S., et al., *Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha*. *FASEB J*, 2006. **20**(11): p. 1889-91.
494. Gottlieb, R.A. and R.S. Carreira, *Autophagy in health and disease. 5. Mitophagy as a way of life*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010. **299**(2): p. C203-10.