

UFR SCIENCES & TECHNIQUES COTE BASQUE
Université de Pau et des Pays de l'Adour
Licence Biologie des Organismes

La glutamate déshydrogénase, une enzyme essentielle au phénomène de cardioprotection

ERNAULT Auriane

Stage effectué du 15 Mars 2016 au 15 Juin 2016 à
University of California Los Angeles, Cardiovascular Research
Laboratory, 675 Charles E. Young, Los Angeles, CA 90095
sous la direction scientifique du **Dr Guillaume Calmettes**



"Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil"

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais remercier le Dr James N. Weiss de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je remercie le Dr Guillaume Calmettes, mon maitre de stage, qui a su m'encourager et me guider durant ces trois mois. Je remercie Pauline Morand, qui m'a enseigné de manière précise et rigoureuse comment manipuler. J'aimerais enfin remercier Christopher Ko, Scott Johns, Binh Nguyen, ainsi que les étudiants du laboratoire : Shanker Iyer, Minu Madhvani, Nicole Nguyen, Himani Madnawat, et Maryam Tavanaei.

AVANTS-PROPOS

L'Université de Californie à Los Angeles (UCLA) est une université publique qui compte plus de 41000 étudiants. Elle appartient au groupe des Universités de Californie qui regroupe 10 campus et fait partie de l'un des meilleurs systèmes d'éducation au monde. UCLA comprend 290 unités de recherche et possède une dotation d'environ 1 milliard de dollars consacrée à la recherche : un capital important qui fait de cette université l'un des principaux centres de recherche aux Etats-Unis et l'une des plus grandes institutions de recherche au niveau mondial.

Le laboratoire dans lequel j'ai effectué mon stage, le Centre de Recherche Cardiovasculaire, est rattaché au centre de Cardiologie du département de Recherche de Physiologie/Médecine de UCLA. Le laboratoire compte une dizaine de projets et environ 80 salariés (chercheurs, post-docs, stagiaires). Il est dirigé par le Docteur James N. Weiss, chef de cardiologie à l'hôpital de UCLA. J'ai travaillé durant mon stage avec le Docteur Guillaume Calmettes chercheur spécialisé dans la bioénergétique, cardiaque qui fut mon maître de stage. Pauline Morand, assistante de recherche, m'a appris dans un premier temps à manipuler des produits et à préparer les solutions nécessaires pour les expériences du laboratoire, puis dans un second temps j'ai été formée à des expériences plus complexes, comme le dosage de protéines, l'électrophorèse ou encore la technique de western blot. J'ai également été formée à la culture cellulaire, et à la transfection d'ADN.

De par la vocation du laboratoire à étudier le système cardiaque, la majorité des expériences réalisées implique l'utilisation de modèles animaux : souris, rats et lapins. L'éthique et le respect sont des notions essentielles pour mener à bien les procédures expérimentales sur des modèles vivants. Après avoir observé Pauline et Guillaume effectuer de nombreuses chirurgies et perfusions de cœurs j'ai été formée à l'isolation de cœur de souris et à leurs perfusions. J'étais donc en mesure de réaliser les expériences de manière autonome.

Table des matières

A – INTRODUCTION	1
B - MATERIELS ET METHODES	4
1 – GENERATION DE SOURIS KNOCK-OUT POUR GLUD (SOURIS GLUD ^{-/-}), LE GENE ENCODANT LA GDH, EN UTILISANT LA TECHNIQUE CRE-LOXP.....	4
2 – MODELE DU CŒUR ISOLE PERFUSE DE TYPE LANGENDORFF	5
2.1 - <i>Digestion des cœurs isolés perfusés pour isolation de myocytes cardiaques</i>	7
2.2– <i>Expériences d’ischémie/reperfusion sur cœur isolé perfusé</i>	7
3 – QUANTIFICATION DES NIVEAU DE PHOSPHORYLATION PAR WESTERN BLOT.....	8
3.1 – <i>Dosage de protéines par la méthode Bradford.....</i>	9
3.2 – <i>Electrophorèse des protéines, SDS-Page, et transfert sur membrane PVDF.....</i>	9
3.3 – <i>Détection des protéines sur la membrane par anticorps</i>	10
4 – METHODE DE COMPARAISON DE LA TAILLE DE L’INFARCTUS DES CŒURS: TTC STAINING.	11
5 – ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES	12
5.1 – <i>TTC staining</i>	12
5.2 – <i>Produit Pression Fréquence (PPF).....</i>	12
C - RESULTATS ET DISCUSSIONS	13
1 – REPONSE DES CŒURS DE SOURIS SAUVAGES ET GLUD ^{-/-} A DIFFERENTS PROTOCOLES D’ISCHEMIE/REPERFUSION.....	13
2 – QUANTIFICATION DE L’ACTIVATION DES VOIES DE SIGNALISATIONS PROTECTRICES PAR WESTERN BLOT	17
D – CONCLUSION.....	18
E - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	19
F - ANNEXES.....	20
<u>Annexe 1</u>	20
<u>Annexe 2</u>	21
<u>Annexe 3</u>	22
<u>Annexe 4</u>	22
F – RESUME	23

A – Introduction

Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Elles sont responsables chaque année de plusieurs dizaines de millions de décès (Berthelot-Garciasa, Meulemana et al. 2009). Parmi les nombreuses maladies cardio-vasculaires, les cardiopathies ischémiques, telles que l'arrêt cardiaque et l'infarctus du myocarde, sont les plus fréquentes. Elles sont la conséquence du détachement d'une plaque lipidique ou glucidique de l'artère, engendrant un caillou bloquant le flux sanguin. Nous sommes depuis plusieurs années en mesure de prévenir leur apparition par la pratique d'une angioplastie, à l'aide d'un stent : un ressort est inséré dans l'artère obstruée, compressant la plaque d'athérome et restaurant le flux circulatoire. Il n'existe cependant pas de traitement pour réparer les tissus lésés après ou pendant un infarctus. L'intérêt de faire avancer la recherche dans ce domaine paraît donc indispensable.

Les pathologies cardio-vasculaires sont caractérisées par un stress connu depuis plusieurs années : l'ischémie-reperfusion (I/R). L'ischémie fait référence à l'interruption de l'apport sanguin à un organe. Le cœur, dont le fonctionnement repose principalement sur le métabolisme oxydatif, est particulièrement sensible au phénomène d'I/R. Ainsi, il a été montré qu'une carence en oxygène et en substrats lors d'une période supérieure à 30-45 minutes pouvait entraîner une importante nécrose des tissus et une atteinte de la capacité contractile du cœur de manière irréversible.

De plus, bien qu'une reprise rapide du flux sanguin (reperfusion) soit indispensable afin de limiter la nécrose des tissus et préserver l'intégrité fonctionnelle de l'organe, la reperfusion représente en elle-même un stress à l'origine d'importants dommages cellulaires (M. Cour and Argaud 2010). Le mécanisme responsable de ces dommages est encore sujet à débat, cependant il est établi qu'il repose sur le largage massif d'espèces oxygénées réactives, telles que l' H_2O_2 , dans la mitochondrie au moment de la reperfusion (Figure 1). Cette accumulation d'espèces oxygénées réactives dans la cellule favorise l'ouverture des pores de transitions de perméabilité mitochondriaux (mPTP), engendrant un déséquilibre de l'osmolarité mitochondriale à l'origine du gonflement puis de l'explosion des mitochondries. Cette rupture des membranes mitochondriales est accompagnée par le largage de facteurs pro-apoptotiques activant les voies de signalisation de la mort cellulaire (figure 1).

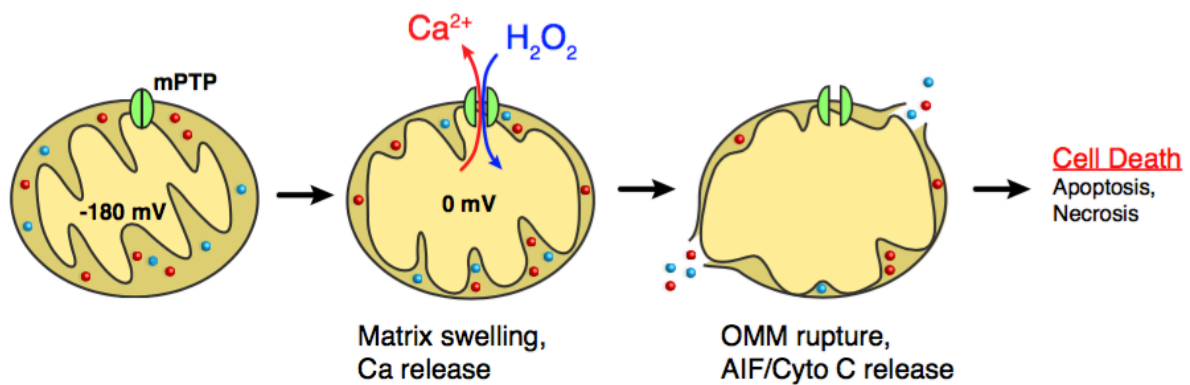


Fig. 1. Rôle des pores de transitions de perméabilité mitochondriaux (mPTP) dans la mort cellulaire. L'ouverture des canaux puis l'entrée du Ca^{2+} dans la matrice entraîne son gonflement, la rupture des membranes, accompagnée par le largage de facteurs pro-apoptotiques, entraînant la mort de la cellule par apoptose et nécrose.

Les espèces oxygénées réactives, aussi appelées « ROS » (de l'anglais « *Reactive Oxygen Species* »), jouent donc un rôle majeur lors de l'I/R. Ces dérivés réactifs de l'oxygène sont produits en majorité par la chaîne respiratoire mitochondriale et certaines déshydrogénases (mitochondriales ou cytoplasmiques). Ce sont des espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leurs couches externes. Ces espèces ont une durée de vie en solution particulièrement courte du fait de leur grande instabilité et du fait qu'elles puissent intervenir dans de nombreuses réactions. Le mécanisme le plus probable de production de ROS durant un épisode d'I/R suit le schéma suivant :

- Lors d'un épisode d'ischémie, en raison du manque d'oxygène, l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (voir [annexe 1](#)) se retrouvent bloqués dans un état réduit (l'oxygène n'étant plus là pour oxyder ces complexes), ce qui résulte en l'accumulation d'électrons ne pouvant plus être transférés à leur accepteur final (l'oxygène).
- Au moment de la reperfusion, la mitochondrie fait face à un apport soudain en oxygène, ce qui relance non seulement la chaîne respiratoire mitochondriale (voir [annexe 1](#)), mais entraîne aussi une production massive de ROS par l'utilisation des nombreux électrons accumulés (Turrens and Boveris 1980).
- Les anions superoxydes sont la forme la plus agressive et abondante des ROS produits dans les mitochondries (Deby 2009). Cette production de radicaux libres lors de la reperfusion est si importante qu'elle va surpasser les mécanismes anti-oxydants de défense cellulaire, impliquant des dommages irréversibles. Ces radicaux libres s'attaquent aux protéines (canaux, récepteurs et transporteurs), aux lipides (endommageant les membranes par peroxydation) et finalement à l'ADN cellulaire (altération de l'expression génétique).

Il est possible de protéger le cœur contre les dommages induits par un épisode d'I/R en soumettant l'organe à de **court épisodes d'ischémie/reperfusion** avant l'épisode prolongé d'ischémie (pré-conditionnement ischémique, IPC) ou au moment de la

reperfusion (post-conditionnement ischémique, PPC). Les premiers essais cliniques testant le post-conditionnement ischémique sur des cas d'infarctus du myocarde chez l'homme sont même très **prometteurs** et permettent d'envisager un espoir thérapeutique pour tous les phénomènes d'I/R. Il apparaît donc essentiel de comprendre quels sont les mécanismes impliqués dans la cardioprotection lors de l'IPC et le PPC.

Il est pour l'instant établi que cette cardioprotection implique l'activation de voies de signalisation intracellulaires visant la mitochondrie (voies de signalisation **RISK** et **SAFE**) et résultant en l'inhibition de l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale. Il semble que la production brève mais répétée de ROS par la mitochondrie lors de ces brefs épisodes d'IPC ou PPC soit à l'origine de l'activation de ces voies de signalisations protectrices. Cependant, l'identité de la protéine à l'origine de cette petite production de ROS protectrice est toujours un sujet de recherche très actif. Le laboratoire dans lequel j'ai effectué mon stage a obtenu des résultats très prometteurs sur mitochondries isolées. Les résultats suggèrent que la **glutamate déshydrogénase** (GDH), une enzyme mitochondriale qui désamine l'acide glutamique en acide α -cétoglutarique dans le cycle de Krebs (cf [annexe 2](#)), serait capable de générer des ROS dans des conditions pertinentes pour l'IPC et le PPC, et pourrait donc jouer un rôle majeur dans la cardioprotection en étant à l'origine de l'activation des voies de signalisations protectrices (les voies de signalisation RISK et SAFE).

Le but de mon stage était donc de répondre à la question suivante : la GDH joue-t-elle un rôle dans l'activation des voies de signalisations de la protection cardiaque suite à un phénomène d'ischémie-reperfusion ? Pour répondre à cette question il s'agira de comparer la réponse de cœurs de souris sauvages avec celle de cœurs de souris KO pour le gène encodant la GDH, face à un épisode d'I/R avec ou sans IPC.

B - Matériels et méthodes

1 – Génération de souris knock-out pour GLUD (souris GLUD^{-/-}), le gène encodant la GDH, en utilisant la technique Cre-loxP

Afin de quantifier l'importance de la GDH dans la cardioprotection le laboratoire a précédemment généré des souris knock-out pour GLUD, le gène encodant pour la GDH, grâce à la technique Cre-loxP. Cette manipulation génétique a été réalisée uniquement dans les tissus cardiaques. En effet, la technique Cre-loxP permet d'invalider un gène de manière tissu-spécifique, évitant ainsi des mutations qui seraient létales si elles étaient présentes de manière globale. Ces souris (GLUD^{-/-}) seront utilisées pour des expériences visant à montrer le rôle de la glutamate déshydrogénase dans la cardioprotection, en les comparant à des souris de type sauvage.

Le système Cre-loxP repose sur la faculté de la Cre recombinase à reconnaître des séquences spécifiques d'ADN appelées loxP (de 34pb). Une fois reconnus, ces fragments seront coupés, excisant de ce fait tout fragment d'ADN (le gène d'intérêt) préalablement inséré entre deux sites loxP. Pour obtenir un KO spécifique de GDH dans les tissus cardiaques, des souris exprimant de manière globale le gène GLUD avec à ses extrémités deux sites loxP, sont croisées avec des souris exprimant la recombinase Cre sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique au niveau cardiaque (Catherine Postic, Franck Mauvais-Jarvis et al. 2002), plus particulièrement la chaîne lourde de myosine.

Les souris résultantes de ce croisement seront donc GLUD^{-/-} spécifiquement dans le cœur (Figure2). L'insertion du site loxP aux extrémités du gène encodant pour la GDH a été réalisée par un laboratoire en Suisse (Stefania Carobbio, Francesca Frigerio et al. January 9, 2009), tandis que les souris exprimant Cre uniquement dans le tissu cardiaque ont été fournies par un laboratoire de UCLA et sont également en vente libre (The Jackson Laboratory).

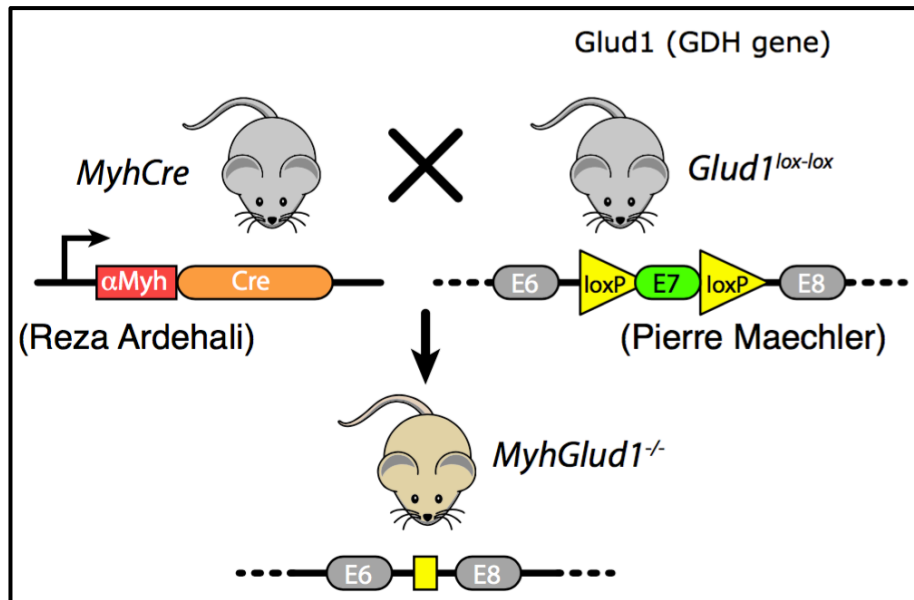


Fig. 2. Schéma du croisement entre une souris exprimant Cre spécifiquement dans les tissus cardiaques et une souris portant loxP aux extrémités de GLUD, gène encodant la GDH. La souris générée est knock-out pour GLUD et est appelée *MyhGlud1^{-/-}* (GLUD^{-/-}).

2 – Modèle du cœur isolé perfusé de type Langendorff

Les souris GLUD^{-/-} seront comparées aux souris sauvages lors d'expériences étudiant différents niveaux d'intégration biologique, que ce soit au niveau cellulaire (analyse des voies de signalisation), ou au niveau de l'organe (expériences d'ischémie/reperfusion). Ces différents types d'expériences reposent sur le modèle du cœur isolé perfusé, que ce soit pour isoler les cellules cardiaques, ou directement étudier la réponse fonctionnelle des cœurs à l'ischémie/reperfusion. Le système expérimental de cœur isolé perfusé pour ces deux modèles d'étude diffère légèrement et des schémas comparant les deux systèmes sont présentés en figures 3 et 4.

La souris est placée dans une chambre anesthésique contenant de l'isoflurane, sous forme volatile. Après perte de conscience, la souris est euthanasiée par dislocation cervicale. Une incision péritonéale puis une seconde diaphragmatique met en évidence le cœur toujours battant. Après excision le cœur est plongé dans une solution de perfusion (Tyrode ou Krebs-Heinselein, voir figures 3 et 4) à 2°C permettant de stopper les battements cardiaques. À l'aide d'une loupe binoculaire et d'une seringue le cœur est canulé par l'aorte, permettant ainsi de perfuser l'ensemble de l'organe avec la solution de perfusion à 37°C et à pression constante (90 mmHg). Cela permet de nettoyer le cœur du sang et des déchets cellulaires accumulés (figure 3).

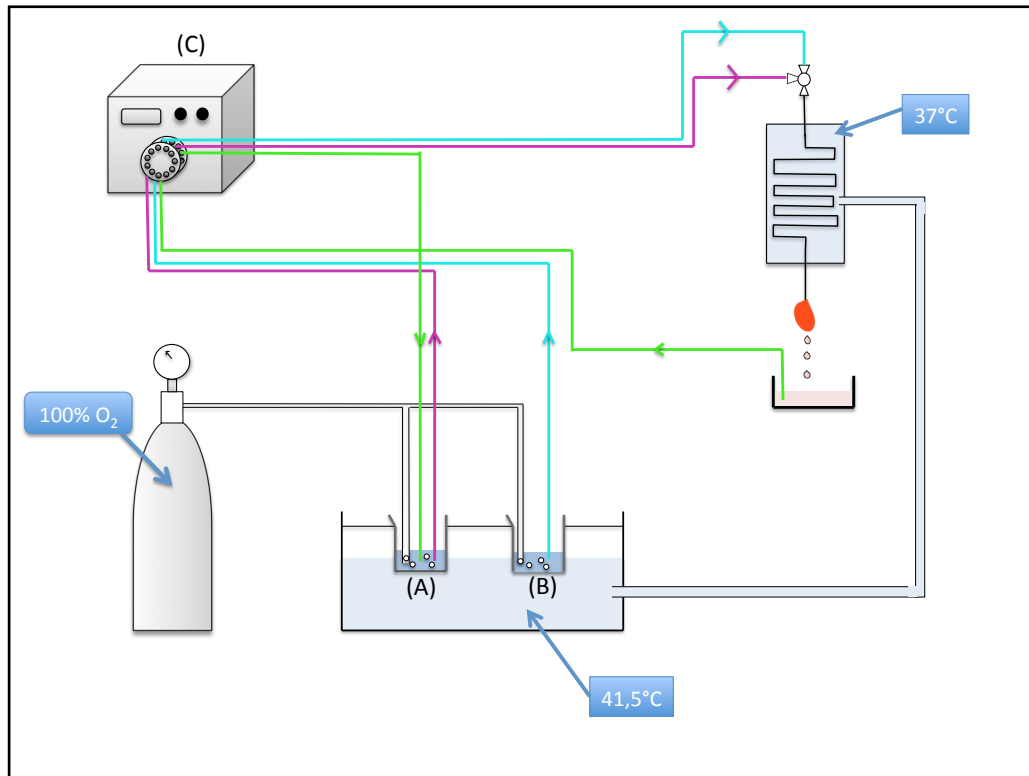


Fig. 3. Schéma de cœur isolé perfusé de type Langendorff pour l'isolation de myocytes cardiaques. Une solution de Tyrodes (B) servant de tampon de perfusion est oxygénée chauffée et perfusée dans le cœur grâce à la pompe (C). Dans un second temps une solution contenant une enzyme (A) est elle aussi chauffée, oxygénée puis perfusée dans le cœur jusqu'à ce que les cellules soient isolées. La solution contenant l'enzyme est recyclée.

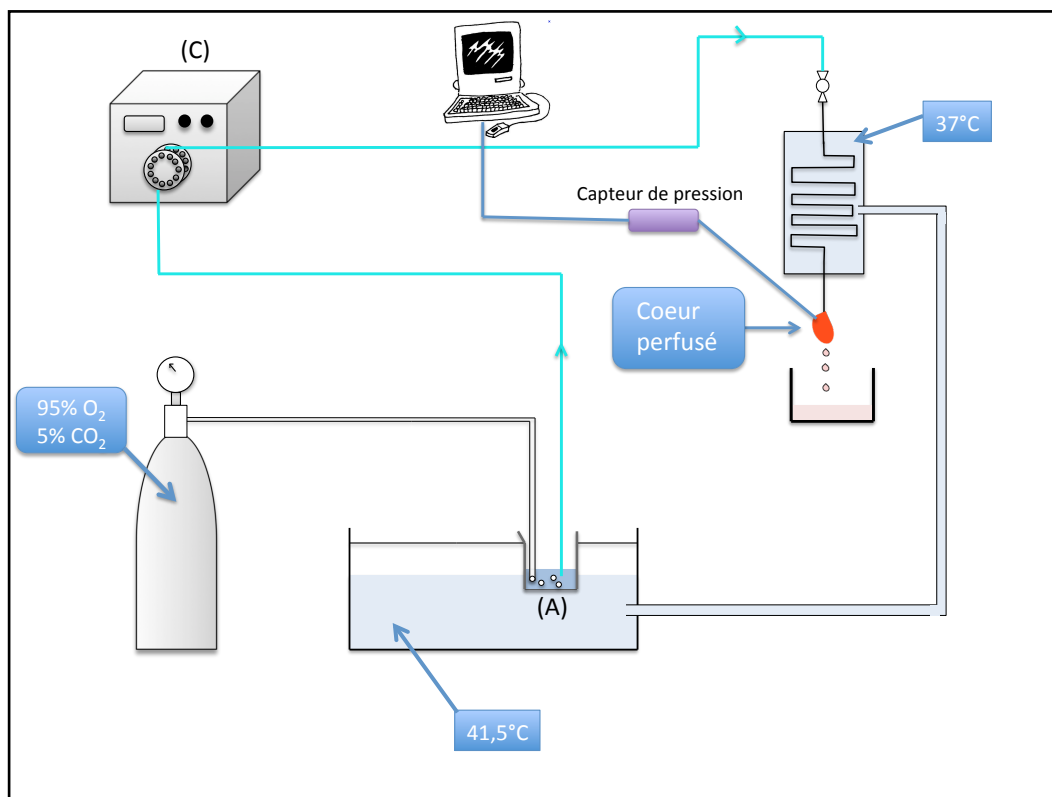


Fig. 4 - Schéma de cœur isolé perfusé de type Langendorff pour les expériences d'ischémie/reperfusion. Une solution de Krebs-Henseleit (A) aux concentrations suivantes : 108mM de NaCl, 5.9mM de KCl, 1.2mM de MgSO₄, 25mM de NaHCO₃, 0.5mM de EDTA, 1.1mM de Mannitol, 10mM de Glucose, et 1.8mM de Calcium, servant de tampon de perfusion est oxygénée/dioxygénée, chauffée et perfusée dans le cœur grâce à une pompe (C).

2.1 - Digestion des cœurs isolés perfusés pour isolation de myocytes cardiaques

L'isolation des myocytes cardiaques permettra une analyse par Western Blot des niveaux de phosphorylation de différentes protéines dans les cellules contractiles cardiaques sans influence du signal provenant des autres types cellulaires cardiaques, comme les fibroblastes. L'isolation des cellules cardiaques requiert une solution de Tyrodes aux concentrations suivantes : NaCl 136mM, KCl 5.4mM, NaH₂PO₄ 0.33mM, MgCl₂ 1.0mM, HEPES 10.0mM.

Après 4-5 minutes de perfusion (figure 3), le cœur est ensuite perfusé avec un tampon de digestion contenant de la collagénase et de la protéase. Le but de cette digestion est d'éliminer le tissu conjonctif qui connecte les cellules entre elles.

Une fois le tissu cardiaque suffisamment digéré, le cœur est émincé dans une solution de Tyrodes permettant aux cellules d'être isolées en solution.

Les cellules cardiaques sont ensuite centrifugées 4min à 200rpm afin de séparer les myocytes des fibroblastes. Après élimination du surnageant (contenant les fibroblastes), les myocytes sont resuspendus dans du Tyrodes, puis lavés une seconde fois. Après le lavage des cellules, le culot est resuspendu dans du SDS 2% et des inhibiteurs de protéases 1X, détergeant servant à lyser les cellules et permettant la solubilisation des protéines tout en protégeant ces dernières de toute dégradation. Les échantillons sont finalement soniqués afin de casser les débris cellulaires (ADN, ARN, membranes...) et permettre une complète solubilisation des protéines.

2.2– Expériences d'ischémie/reperfusion sur cœur isolé perfusé

Les expériences seront réalisées sur deux types de souris : les souris KO-GDH (voir explications [ci-dessus](#)) et les souris sauvages. Ainsi, une différence significative de résultats dans l'un des groupes montrera l'éventuel rôle joué par la GDH dans la cardioprotection. Dans chaque expérience le cœur est perfusé avec une solution de Krebs-Henseleit (figure 4) contenant 118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.18 mM KH₂PO₄, 1.75 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃ et 0.5 mM EDTA. 10 mM glucose sont ajoutés comme substrats, et la solution est bullée avec 95% O₂-5% CO₂ pour équilibrer le pH de la solution à 7,4.

Une fois perfusé, un petit ballonnet connecté à un capteur de pression par le biais d'une ligne d'eau est inséré dans le ventricule gauche du cœur, et permettra de suivre en continu la pression exercée par le cœur lors de la contraction cardiaque (figure 4).

Après 20 minutes de perfusion pour stabiliser les cœurs, on soumettra chaque groupe de souris (KO et sauvage) aux protocoles suivant :

- 5 cœurs seront soumis à une ischémie (25min) puis une reperfusion (2h), et appelés **contrôles**
- 5 cœurs seront soumis à un épisode de pré-conditionning (3x5min) + ischémie (25min) + 2h reperfusion, et appelés **IPC**
- 5 cœurs seront perfusés avec des ROS (eau oxygénée) (pour vérifier que le cœur est bien capable d'activer leur cardioprotection et que c'est bien à cause du KO de GDH qu'il n'y a plus de cardioprotection), appelés **ROS**, 3x3min. ROS :

Le schéma suivant récapitule les expériences réalisées :

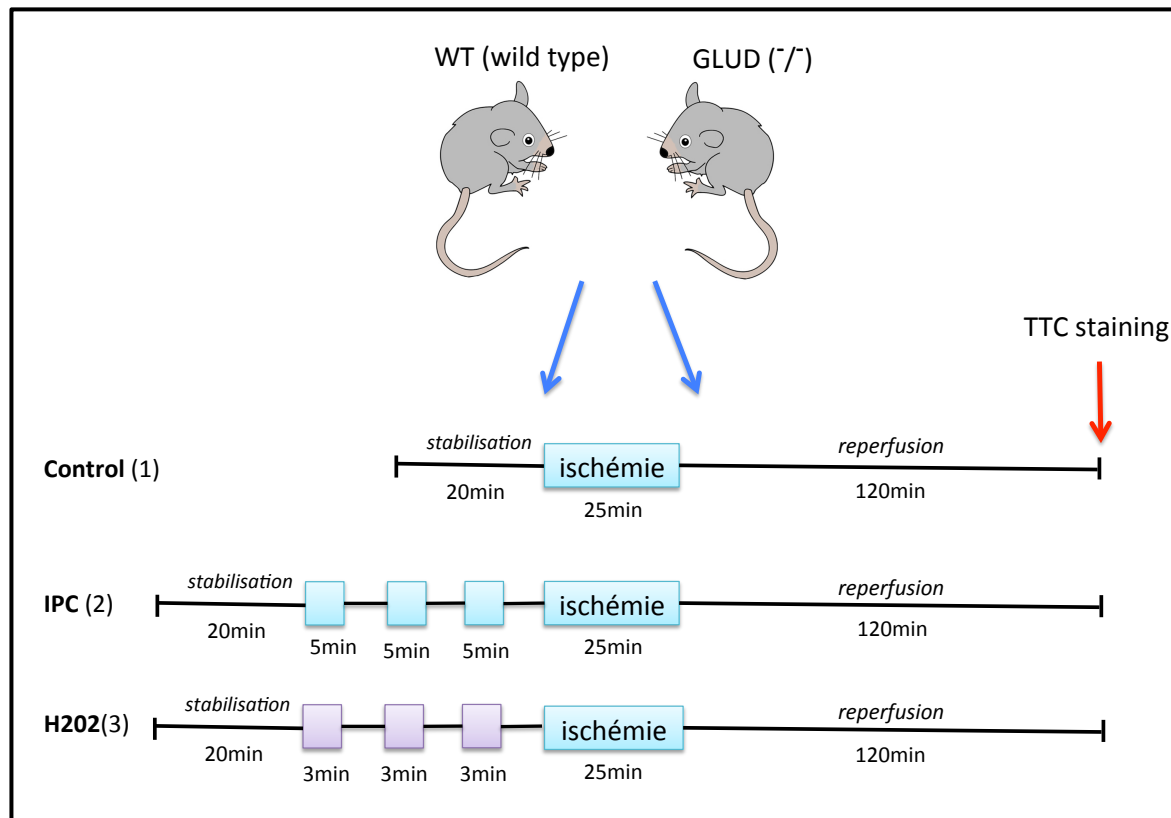


Fig. 5. Schéma du protocole expérimental utilisé pour montrer le rôle de la GDH dans la cardioprotection.

Pour comparer le niveau d'infarctus des cœurs on utilise la méthode de TTC *staining* (tetrazolium) (voir section B.4).

3 – Quantification des niveau de phosphorylation par Western Blot

Afin de réaliser un western blot qui nous permettra de quantifier le niveau de phosphorylation de différentes protéines participant aux voies de signalisations cellulaire, il faut dans un premier temps déterminer la concentration en protéines de nos différents échantillons afin de pouvoir déposer la même quantité d'échantillons et permettre une comparaison directe des intensités de bandes qui seront obtenues.

3.1 – Dosage de protéines par la méthode Bradford

Pour doser les protéines contenues dans les échantillons la technique Bradford fut utilisée grâce à un kit commercial : PierceTM BCA Protein Assay Kit (voir [protocole utilisé](#)). Cette technique permet de réaliser un dosage colorimétrique basé sur le changement d'absorbance. En effet, le bleu de Coomassie mis en contact avec les acides aminés basiques des protéines (arginine, histidine, lysine) ou des résidus hydrophobes change de couleur après liaison. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de colorant lié, ce qui indique la concentration en protéines de l'échantillon. En comparant la gamme étalon du kit (dont on connaît la concentration en protéines en fonction de l'absorbance) avec les échantillons (dont on connaît seulement l'absorbance) cela permet **d'établir une droite avec son équation** et ainsi de déduire la concentration des échantillons. Suite à cela on sait quel volume prélever pour pouvoir faire l'électrophorèse avec des échantillons de concentrations protéiques identiques.

Afin de préparer les échantillons pour l'électrophorèse, il suffit de les mélanger volume à volume avec du tampon Laemmli 2X (complémenté avec du B-mercapto-éthanol afin de dénaturer les protéines ponts di-sulfures).

3.2 – Electrophorèse des protéines, SDS-Page, et transfert sur membrane PVDF

L'électrophorèse est une technique de séparation basée sur le fait que des molécules placées sous un champ électrique migrent à travers un gel de manières différentes en fonction de leurs charges, de leurs masses moléculaires et de leurs structures tridimensionnelle. Dans ce cas, grâce au SDS, les protéines sont chargées négativement et migreront du pôle négatif vers le pôle positif.

Les gels d'acrylamide utilisés pour réaliser les électrophorèses ont été réalisés de la manière suivante :

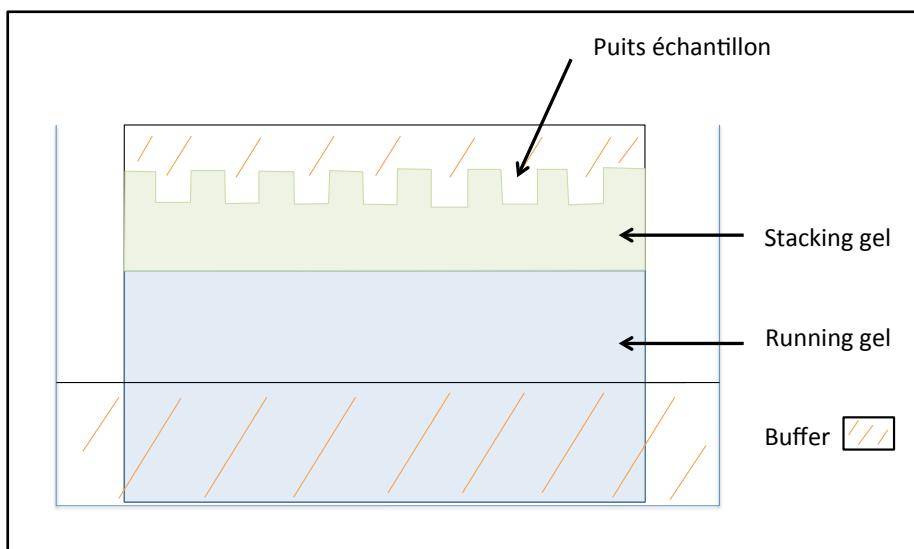


Fig. 6. Schéma de la préparation du gel d'acrylamide. Le stacking gel en vert permet une entrée homogène des échantillons dans le running gel (gel de séparation). Le buffer utilisé est un tampon de migration composé de Tris 25mM, glycine 200mM et SDS 20% 1X

Le gel de polyacrylamide est composé d'un gel de concentration (*stacking gel*) et d'un gel de séparation (*running gel*). Le *stacking gel* permet de concentrer toutes les protéines de l'échantillon afin qu'elle entrent de façon homogène dans le gel de séparation. Le running gel (minigel 10%) et le stacking gel sont composés de : Tris-HCl (3M pour le running gel et 1M pour le stacking gel), bis-acrylamide (30-40%), SDS 2%, H₂O, APS (ammonium persulfate) 10% et TEMED (tetramethylethylenediamine). Le mélange de l'acrylamide avec du TEMED et de l'APS permet la polymérisation du gel.

Chaque échantillon à déposer sera composé de : +/- 10uL de culot (50ug de protéines) et +/- 10uL de Tp2X Laemmli/B-mercapto, et sera bouillit 2min à 100°C. On dépose le ladder dans le premier puits du gel de polyacrylamide, suivi de chaque échantillon. Une fois les échantillons déposés dans les puits du gel, le tampon de migration (composé de Tris 25mM, glycine 200mM et SDS 20% 1X) est ajouté dans la cuve d'électrophorèse. La migration dure environ 1h à 150V. Après la séparation des protéines dans le gel d'acrylamide, il s'agit de les transférer sur une membrane de PVDF grâce à un champ électrique afin de pouvoir réaliser le Western Blot.

3.3 – Détection des protéines sur la membrane par anticorps

La première étape consiste à bloquer la membrane (c'est à dire bloquer les sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps), en la mettant en contact pendant une heure à température ambiante avec une solution d'albumine de sérum bovin (BSA 5%) constituée de protéines diluées. Cela va permettre de réduire le bruit de fond et de rendre la réaction anticorps-antigène plus spécifique.

Une fois la membrane bloquée elle est incubée à 4°C sur la nuit avec l'anticorps primaire *anti-glutamate deshydrogenase* (bovine liver) (LAPIN) diluée au millièmes dans une solution de BSA 5%. Après rinçage de la membrane trois fois avec du PBS Tween 0,1% afin d'éliminer les anticorps primaires non liés, celle-ci est mise en contact avec un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire, dans ce cas anti-lapin. Cet anticorps secondaire est lié à une enzyme (peroxydase) permettant la visualisation de la protéine ciblée sur la membrane. Après rinçage des anticorps secondaires avec du PBS tween 0,1%, la méthode de détection par chimioluminescence est utilisée pour quantifier la GDH sur la membrane.

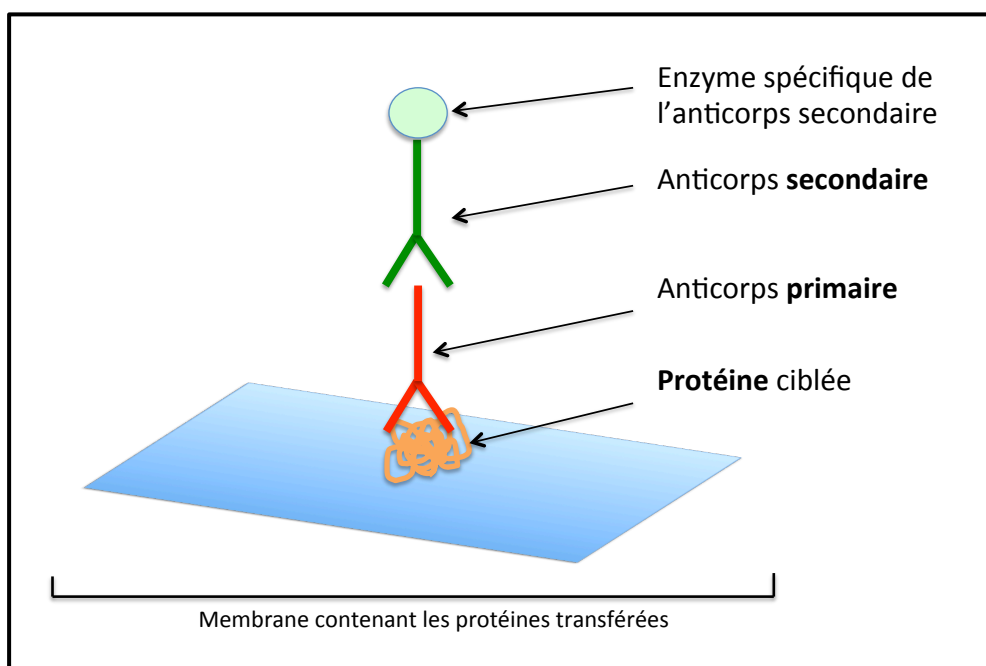


Fig. 7. Schéma de la fixation des anticorps sur les protéines de la membrane. En rouge, l'anticorps primaire, qui s'accroche à la protéine d'intérêt. En vert, l'anticorps secondaire qui reconnaît l'anticorps primaire. La bille verte représente l'enzyme (peroxydase) qui est liée à l'anticorps secondaire. C'est cette enzyme qui permettra la visualisation de la protéine d'intérêt par chemiluminescence.

4 – Méthode de comparaison de la taille de l'infarctus des cœurs : TTC *staining*

A la fin des expériences d'ischémie/reperfusion sur cœur isolé perfusé (voir section B.2.2), la taille d'infarctus induite par le protocole expérimental est déterminée par marquage au TTC.

Cette technique repose sur la capacité des enzyme deshydrogénases et ses cofacteurs présents dans les tissus de réagir avec le tétrazolium (Benedek, Moricz et al. 2006), réaction formant des pigments de couleur rouge. Il est admis que l'absence de ces enzymes et cofacteurs est un signe de la mort des cellules et de la nécrose des tissus. Ainsi, des tissus vivant mis en contact avec le tétrazolium se colorent en rouge, alors que des tissus nécrosés (comme les tissus touchés par l'infarctus) seront blancs. Deux types de tétrazolium peuvent être utilisés : le nitro blue et le triphenyl. On utilise le triphenyltétrazolium car il a la capacité

de passer à travers les membranes et pour cette raison il peut être utilisé pour le tissu cardiaque. Cette technique nous permet de quantifier la taille de l'infarctus, et donc d'en déduire le niveau de cardioprotection des cœurs.

Après perfusion les cœurs sont rapidement séchés, enveloppés dans du film alimentaire, et placés à environ -20°C pendant 10min. Le film alimentaire est important pour éviter la lyophilisation des cœurs. L'étape de congélation permet de faciliter la découpe des cœurs en tranches fines (à l'œil environ 2mm). Le cœur découpé est ensuite plongé dans une solution de TTC pendant 20 minutes (**fig.8**). Après 20 minutes d'incubation le cœur est photographié sur fond noir ou blanc.

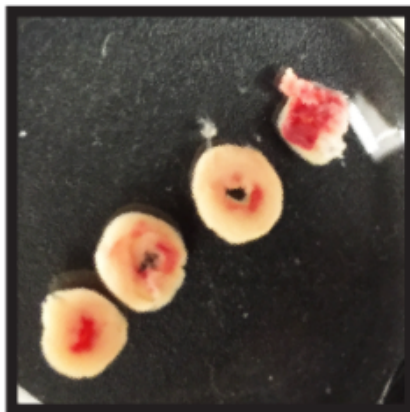


Fig. 6. Photographie de cœur de souris découpé en tranches et mis en contact avec du triphenyltetrazolium pendant 20 minutes. Le rouge marque les tissus encore en vie tandis que le blanc représente les tissus nécrosés touchés par l'infarctus.

La taille de l'infarctus est déterminée en mesurant le pourcentage de zone atteinte sur une série de tranches, et en multipliant la taille de la zone par son épaisseur pour déterminer le volume de chaque tranche. Les volumes sont alors sommés pour calculer le volume total d'infarctus.

L'utilisation du logiciel Photoshop permet de délimiter manuellement les zones de couleurs rouge et blanche et d'obtenir un pourcentage pour chaque zone de couleur.

5 – Analyse statistique des données

5.1 – TTC staining

Dans chaque groupe (sauvage et GLUD^{-/-}) et sous-groupe de souris (contrôle, IPC et ROS) on réalise une moyenne de la taille d'infarctus. Ces moyennes sont ensuite comparées les unes avec les autres. Un graphique est réalisé sur excel avec les données et la moyenne de chaque groupe.

5.2 – Produit Pression Fréquence (PPF)

Le PPF (Produit Pression Fréquence) est un indice utilisé en cardiologie expérimentale pour quantifier la charge de travail à laquelle est soumis le muscle cardiaque (Aksentijevic, Lewis et al. 2016). Il est calculé en multipliant la fréquence cardiaque par la pression développée.

$HR \text{ (heart rate)} \times BP \text{ (blood pressure)} = RPP \text{ (Rate Pressure Product)}$.

Le PPF en fonction du temps pour chaque cœur est normalisé par rapport au travail cardiaque de base (fin de la période de stabilisation) : ainsi, la moyenne des pressions et fréquences cardiaques des 10 premières minutes de la phase de stabilisation et en divisant le tout par 100. Le graphique réalisé pour chaque sous-groupe (control, IPC et H2O2) est calculé avec un intervalle de confiance $\alpha = 5\%$.

C - Résultats et Discussions

1 – Réponse des cœurs de souris sauvages et GLUD-/- à différents protocoles d'ischémie/reperfusion

La première des expériences a été d'étudier l'effet de la délétion de la GDH sur la fonction cardiaque lors d'un protocole d'ischémie reperfusion. Pour cela, des cœurs perfusés de souris sauvages et GLUD-/- ont été soumis à une ischémie prolongée de 25min après la phase de stabilisation, puis reperfusés pendant 2h (fig. 9). Comme montré dans la figure 9, les cœurs de souris sauvages et GLUD-/- répondent de manière similaire à un épisode d'ischémie/reperfusion, avec une récupération de 19% de la fonction d'origine après les 2h de reperfusion.

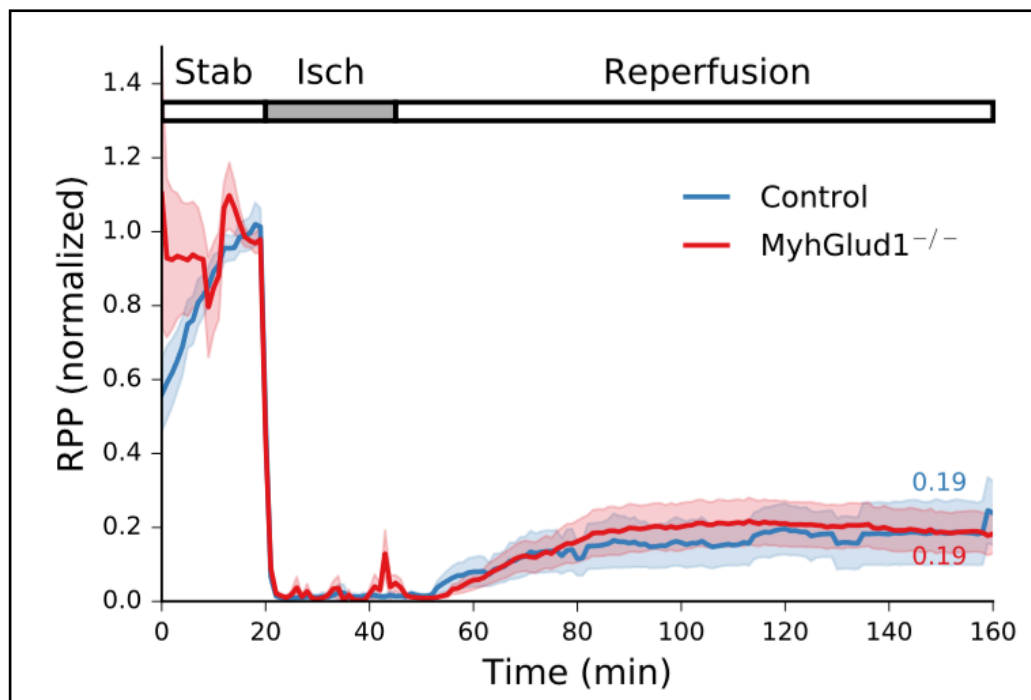


Fig. 9. Produit Pression Fréquence (PPF) des cœurs de souris soumises à un protocole d'ischémie/reperfusion. Le groupe de souris sauvages est représenté par la courbe en bleu, tandis que le groupe de souris GLUD -/- est représenté en rouge.

Lorsque les tailles d'infarctus sont mesurées après ce protocole d'ischémie de 25min et 2h de reperfusion (figure10, control situation), une taille d'infarctus d'environ 75% est observée que ce soit pour les souris sauvages ou GLUD^{-/-}.

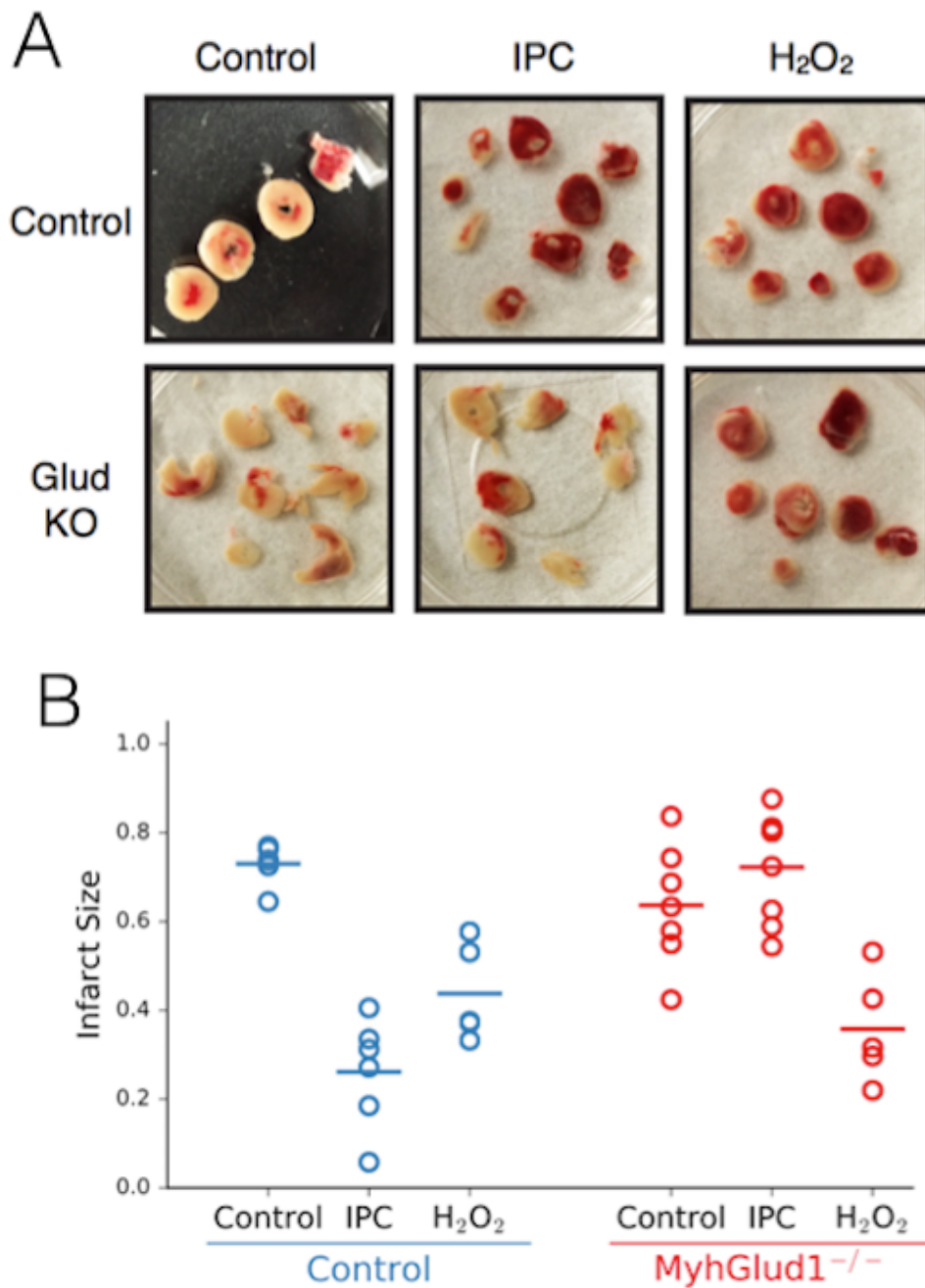


Fig.10. A) Résultats photos du marquage par TTC. B) Scatter plot de la taille d'infarctus dans les différents groupes WT(wild type) et GLUD^{-/-}.

Maintenant qu'une réponse de référence face à l'ischémie/reperfusion est établie pour les souris sauvages et GLUD^{-/-} (figure9), un protocole de pré-conditionnement peut être appliqué avant la période d'ischémie. Pour cela, les cœurs sont soumis à 3 courtes périodes d'ischémie de 5min, entrecoupé d'une période de durée similaire de reperfusion, avant la période d'ischémie de 25min (figure10).

Les résultats montrent que les cœurs de souris sauvages ont une récupération fonctionnelle de 63% après l'ischémie, lorsqu'un protocole d'IPC est appliqué au préalable (figure 11, tracé bleu). De plus, les tailles d'infarctus mesurées sur ces cœurs sauvages sont moins importantes après l'IPC, avec seulement environ 25% de cellules cardiaques mortes (figure 10, situation IPC, points bleus).

Si l'on compare ces résultats à la réponse de ces mêmes cœurs face à l'ischémie sans IPC au préalable (figure 9, tracé bleu, et figure 10, situation contrôle, points bleus), on peut confirmer que le pré-conditionnement ischémique est protecteur, et qu'une meilleure récupération fonctionnelle (63% vs 19%) ainsi qu'une zone d'infarctus plus petite (25% vs 75%) sont observées lorsque l'IPC est présent avant une période d'ischémie.

Cependant, lorsque ce même protocole d'IPC est appliqué sur les cœurs de souris GLUD^{-/-}, l'amélioration de la récupération fonctionnelle des cœurs après ischémie est inhibée, comme le montre la récupération de seulement 12% de la fonction cardiaque initiale (figure 11, tracé rouge). En parallèle, la taille d'infarctus mesurée est sensiblement similaire lors de la situation contrôle, avec un infarctus de 75% (figure 10, situation IPC, points rouges). Ces résultats suggèrent donc que la GDH pourrait jouer un rôle majeur dans le pré-conditionnement ischémique et participerait à la protection du cœur.

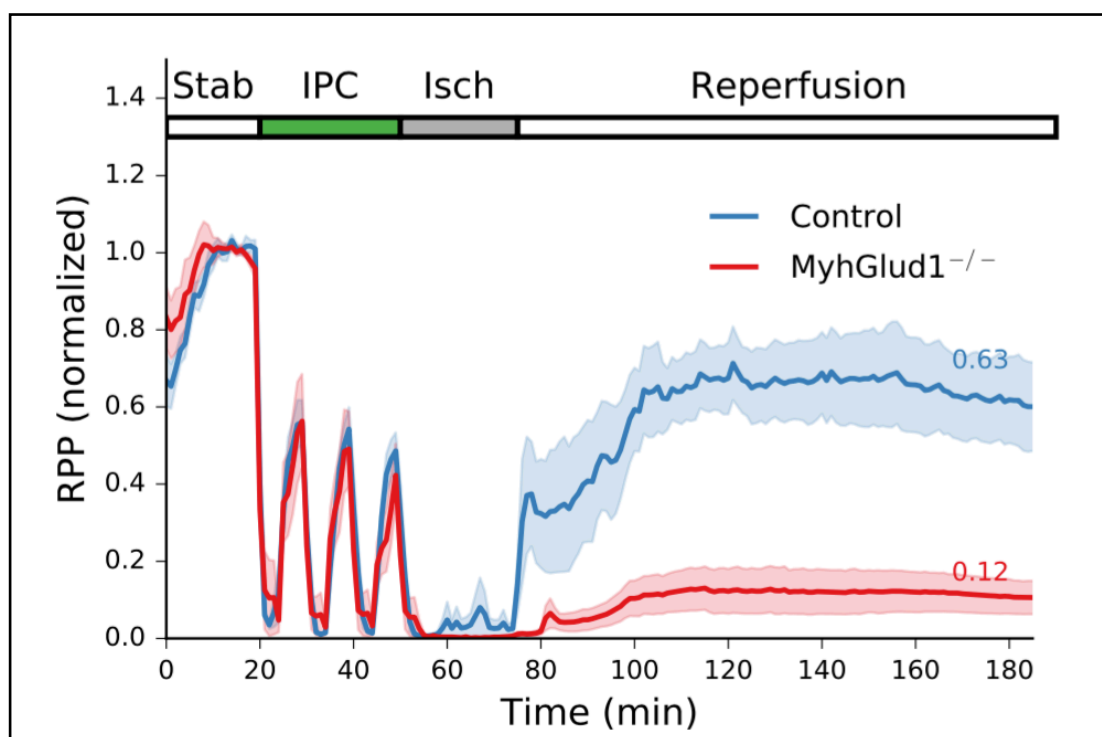


Fig. 11 Produit Pression Fréquence (PPF) des cœurs de souris soumises à un protocole d'IPC. Le groupe de souris sauvages est représenté par la courbe en bleu, tandis que le groupe de souris GLUD^{-/-} est représenté en rouge.

Sachant que la GDH est en mesure de produire de petites quantités de ROS, une des hypothèses serait que la faible production de ROS pendant le pré-conditionnement ischémique par la GDH serait en mesure d'activer les voies de signalisation protectrice du cœur. Pour vérifier si cette hypothèse est valable, une des expériences possibles est de

perfuser les cœur avec de petites quantité de ROS (H_2O_2) avant de les soumettre à une période d'ischémie (figure 12) et voir si même les cœurs GLUD-/- sont protégés dans ce cas.

Comme le montre la figure 12, la perfusion de H_2O_2 avant une période d'ischémie ne semble pas améliorer la récupération fonctionnelle cardiaque, ni sur les cœurs de souris sauvages, ni sur les cœurs de souris GLUD-/- . Cependant, la mesure des tailles d'infarctus après ce protocole montre une diminution significative de la mort des cellules par rapport à la condition contrôle chez les deux groupes, avec un infarctus diminué à environ 40-45% (figure 10, situation H_2O_2).

Ces résultats semblent indiquer qu'une protection des cœurs GLUD-/- est encore possible, montrant donc que les voies de signalisations protectrices sont toujours bien présente dans ces cœurs, et que ce serait leur manque d'activation lors de l'IPC chez les souris GLUD-/- qui résulterait en un manque de protection de ces cœurs par l'IPC.

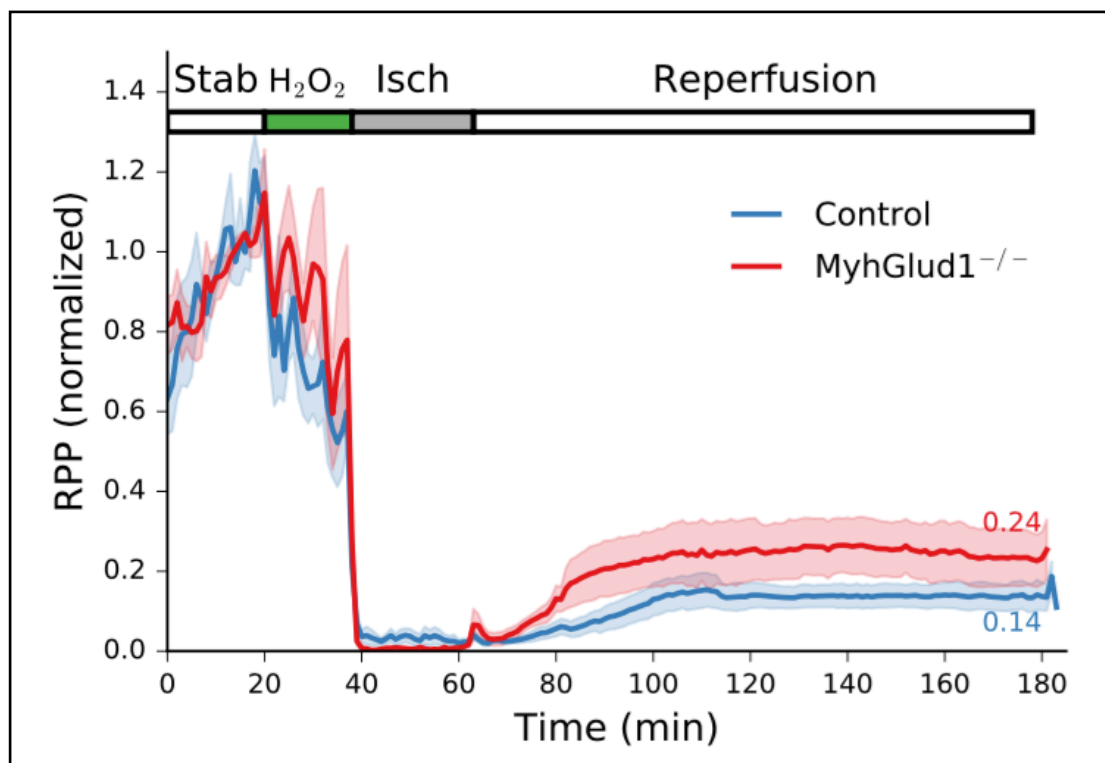


Fig. 12. Produit Pression Fréquence (PPF) des cœurs de souris perfusés avec H_2O_2 3x3min avant une ischémie. Le groupe de souris sauvages est représenté par la courbe en bleu, tandis que le groupe de souris GLUD -/- est représenté en rouge.

Pour vérifier cette **hypothèse**, la mesure de l'activation des voies de signalisations cardio-protectrice dans les cœurs de souris sauvages et GLUD-/- peut être faite par Western Blot.

2 – Quantification de l'activation des voies de signalisations protectrices par western blot

La mise au point des conditions expérimentales pour la mesure de l'activation des voies de signalisation protectrices dans le cœur a été fait sur cœurs de souris sauvages. Les voies de signalisation **RISK** (Reperfusion Injury Salvage Kinase, impliquant les protéines Akt, ERK1/2 et GSK3 β) et **SAFE** (Survivor Activating Factor Enhancement, impliquant notamment les protéines STAT3) sont les principales voies de signalisation connues de la protection cardiaque. Lorsqu'elles sont activées, une augmentation du niveau de phosphorylation des protéines impliquées dans ces voies est observée.

Nous avons pu mesurer le niveau de phosphorylation des protéines principales des voies RISK et SAFE sur cœurs de souris sauvages soumis à un protocole contrôle ou après une période de pré-conditionnement ischémique (figure 13).

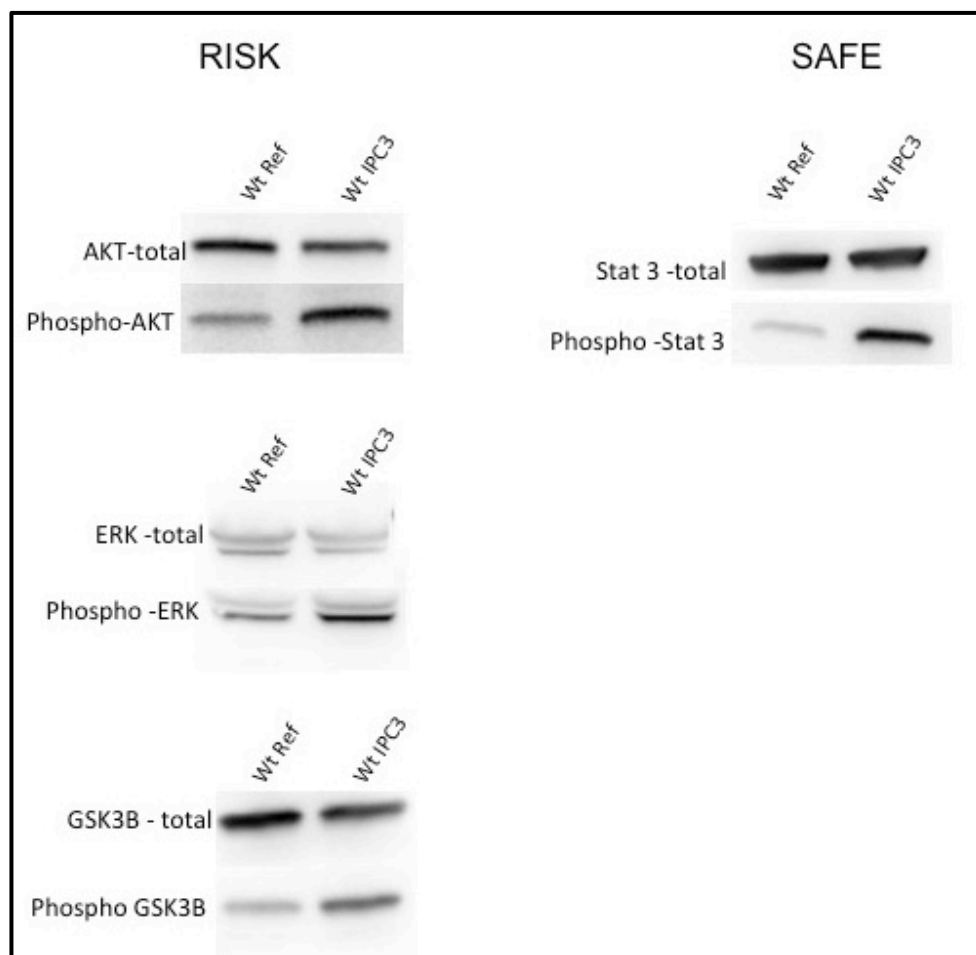


Fig. 13. Mesure des niveaux de phosphorylation des protéines des voies de signalisation RISK et SAFE.

Comme montré par la figure 13, une augmentation du niveau de phosphorylation des principales protéines des voies RISK et SAFE est constatée après le protocole d'IPC. Il va être maintenant intéressant de réaliser ce même type d'expérience sur des cœurs de souris GLUD-/- et voir si cette activation des voies de signalisation est perdue ou inhibée sur ces cœurs. Si c'est le cas, ces résultats suggéreront que c'est bien la GDH qui participe à l'activation des voies de signalisation protectrices dans le cœur lors de l'IPC. Ces expériences vont être effectuées dans les prochaines semaines dans le laboratoire.

D – Conclusion

Ce stage avait pour objet d'étudier le rôle de la glutamate déshydrogénase (GDH) dans la protection des cœurs par un protocole de pré-conditionnement ischémique (IPC) avant une exposition prolongée à une ischémie globale.

Les résultats préliminaires obtenus ont montré que des cœurs ayant été modifiés génétiquement pour ne plus exprimer la GDH perdaient la protection conférée par un protocole d'IPC. Cependant, ces cœurs pouvaient toujours être protégés en les perfusant au préalable avec de faibles doses de ROS, comme le montre la diminution des tailles d'infarctus après perfusion avec H₂O₂.

La GDH étant connue pour produire des ROS en petites quantités, l'hypothèse de travail était de voir si ces ROS produits par la GDH pouvaient donc être responsables de l'activation des voies de signalisation protectrices lors de l'IPC. Nous avons mis au point les conditions expérimentales pour mesurer le niveau de **phosphorylation** des protéines des voies de signalisation protectrices dans les cœurs de souris sauvages.

L'application de ces mêmes expériences sur des cœurs de souris GLUD-/- pourront confirmer ou infirmer que ces voies de signalisation protectrices ne sont plus activées par l'IPC lorsque la GDH n'est pas présente. Une meilleure connaissance des mécanismes à l'origine de la protection cardiaque pourrait permettre le développement de nouvelles thérapies pour limiter les dommages cellulaires lors d'un infarctus du myocarde ou autres pathologies ischémiques.

E - Références bibliographiques

Aksentijevic, D., H. R. Lewis and M. J. Shattock (2016). "Is rate-pressure product of any use in the isolated rat heart? Assessing cardiac 'effort' and oxygen consumption in the Langendorff-perfused heart." Exp Physiol **101**(2): 282-294.

Benedek, A., K. Moricz, Z. Juranyi, G. Gigler, G. Levay, L. G. Harsing, P. Matyus, G. Szenasi and M. Albert (2006). "Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats." Brain Research **1116**: 159-165.

Berthelot-Garciasa, E., C. Meulemana, G. Dufaitrea, S. Ederhya, N. Haddoura, F. Boccaraa, B. Baudinb and A. Cohena (2009). "Données épidémiologiques des maladies cardiovasculaires et prise en charge des accidents cardiovasculaires." Revue Francophone des Laboratoires **2009**(409): 27-39.

Catherine Postic, Franck Mauvais-Jarvis and Jean Girard (2002). "Que nous apprennent les souris génétiquement modifiées sur la physiopathologie du diabète de type 2 ? ." Médecine thérapeutique / Endocrinologie **4**: 53-62.

Deby, C. (2009). "Importance des mitochondries dans le métabolisme de l'oxygène." Première partie : Mitochondries et oxygénation **L'oxygène et la vie: tome II - L'oxygène en pathologie des mammifères**.

M. Cour and L. Argaud (2010). "Ischemia-reperfusion and cellular protection." Réanimation **19**: 185-190.

Stefania Carobbio, Francesca Frigerio, Blanca Rubi, Laurène Vetterli, Maria Bloksgaard, Asllan Gjinojci, Shirin Pournourmohammadi, Pedro L. Herrera, Walter Reith // , Susanne Mandrup and P. Maechler (January 9, 2009). "Deletion of Glutamate Dehydrogenase in β -Cells Abolishes Part of the Insulin Secretory Response Not Required for Glucose Homeostasis." The Journal of Biological Chemistry **284**: 921-929.

Turrens, J. F. and A. Boveris (1980). "Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria." Biochem J **191**(2): 421-427.

The Jackson Laboratory, T. J. STOCK Tg(Myh6-cre)1Jmk/J.

F - Annexes

Annexe 1 (cité dans l'introduction)

Chaine de transport mitochondriale des électrons :

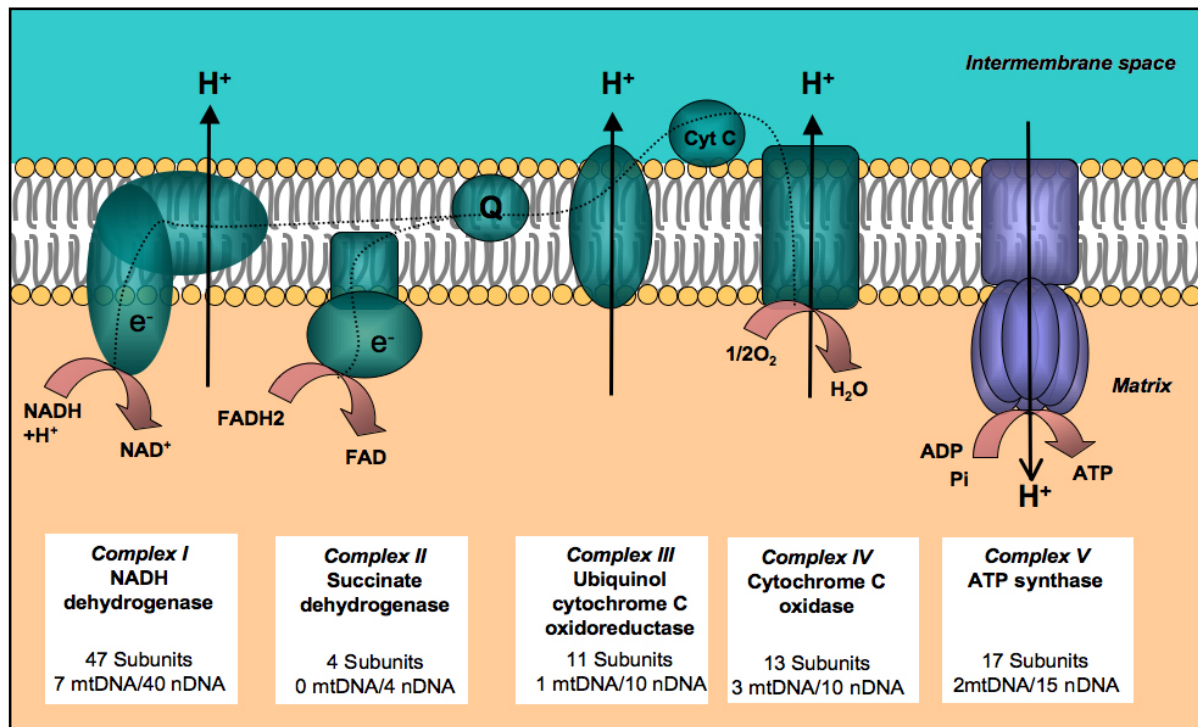


Fig. 14. Schéma de la chaine de transport mitochondriale des électrons.

Source : <http://flipper.diff.org/app/items/6965>

Rôle de la GDH dans le cycle de Kreb's :

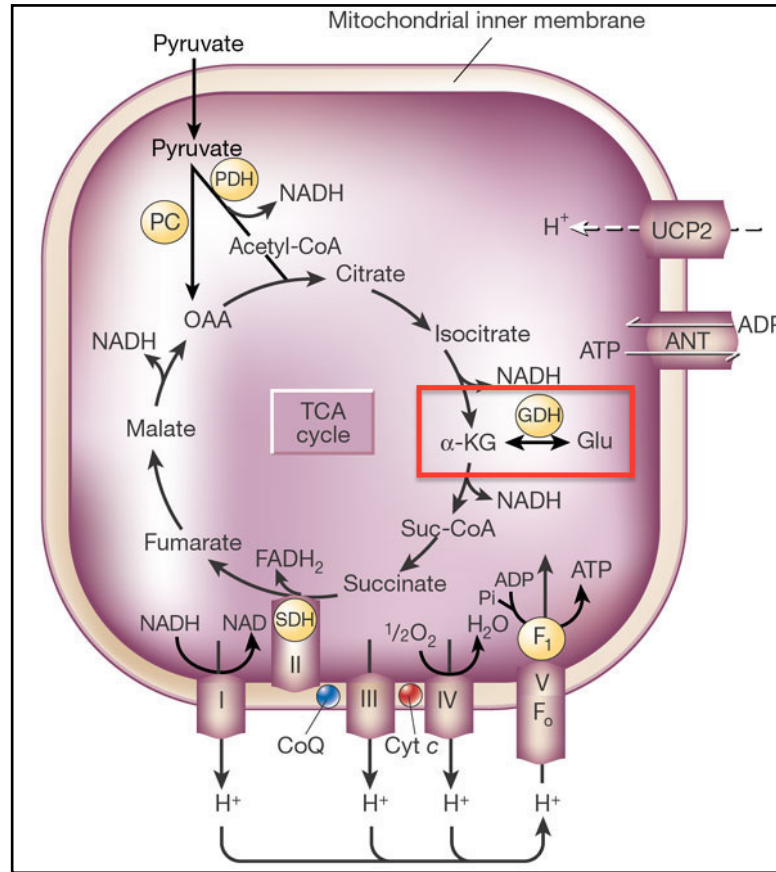


Fig. 15. Schéma du Cycle de Krebs. La GDH est entourée par un encadré rouge pour montrer son action sur l'alpha-kétoglutarate.

Source : [Mitochondrial function in normal and diabetic \$\beta\$ -cells](#), Pierre Maechler & Claes B. Wollheim ; Nature **414**, 807-812(13 December 2001)

Annexe 3

Intervenant	Mise en place protocole	Chirurgie cardiaque	Cœur isolé perfusé	Dosage protéique	Western blot
Principal	GC	GC/PM	AE	AE	AE
Secondaire	AE	AE	GC	PM	PM

Fig. 6. Tableau des tâches durant le stage.

GC : Guillaume Calmettes, maître de stage

PM : Pauline Morand, technicienne de laboratoire

AE : Auriane Ernault, stagiaire

Annexe 4

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13
Bibliographie													
Mise en place protocole													
Rédaction													
Expérimentation													

Fig. 7. Calendrier de stage de la semaine 1 (S1) à la semaine 13 (S13).

F – Résumé

L'ischémie fait référence à l'interruption de l'apport sanguin d'un organe. Lorsque la reperfusion a lieu dans le coeur, cela engendre au niveau cellulaire un phénomène d'hypoxie-réoxygénation caractéristique de nombreuses pathologies comme l'arrêt cardiaque, l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral. Lorsque le coeur est confronté à une phase d'ischémie-reperfusion (I/R), on observe une production massive d'**espèces oxygénées réactives** (ROS), et ce sont ces dérivés oxygénés présents en grande quantité qui endommagent les tissus. Parallèlement, lorsque l'on soumet le coeur à plusieurs brefs épisodes d'ischémie avant une ischémie prolongée (*pré-conditionnement ischémique*) non seulement la production massive de ROS observée à la reperfusion est atténuée, mais on observe également une **diminution des dommages cellulaires**. La **glutamate déshydrogénase** (GDH), une enzyme mitochondriale inhibée en conditions normales par les hautes concentrations d'ATP, pourrait être un acteur majeur à l'origine de la production de ROS lors du pré-conditionnement ischémique durant lequel une petite baisse d'ATP est observée.

En utilisant la technique Cre-Lox le laboratoire a pu générer des souris knock-out pour le gène encodant la GDH (GLUD -/-). La réponse cardiaque de ces souris GLUD (-/-) à différents protocoles d'ischémie/reperfusion, avec ou sans pré-conditionnement/ ischémique, a ensuite pu être comparée à celle de coeur contrôles. Ces expériences ont montré que i) le pré-conditionnement ischémique n'avait pas d'effet protecteur sur les coeurs GLUD (-/-), mais ii) qu'il était toujours possible de protéger les coeurs GLUD (-/-) en perfusant de faibles quantités de ROS avant la phase prolongée d'ischémie. Ces résultats suggèrent que GDH participe activement à la faible production de ROS (qui active les différentes voies de signalisation cellulaire entraînant la cardioprotection) observée durant le pré-conditionnement ischémique. La suite du projet s'attache par la suite à identifier les voies de signalisation spécifiques activées par la production de ROS par GDH, en comparant les niveaux de phosphorylation des différentes protéines entrant en jeu dans les coeurs GLUD (-/-) et contrôles avant et après le pré-conditionnement ischémique.

Mots clés ischémie, reperfusion, mitochondrie, cardioprotection, post-conditionnement ischémique, glutamate déshydrogénase