

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2016

THESES 2016 / TOU3 / 2085

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Obtenu après soutenance du

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES de PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 18 octobre 2016

par

**Gauthier FOUCRAS**

**Vieillesse cardiaque : Caractérisation de la  
sénescence des cardiomyocytes et du rôle de la  
monoamine oxydase A**

Directeur de thèse : Dr Jeanne MIALET-PEREZ

**JURY**

Président : Pr Daniel CUSSAC  
1er assesseur : Dr Mathieu TAFANI  
2ème assesseur : Dr Benoît NICOL  
3ème assesseur : Dr Jean GRELLET  
4ème assesseur : Dr Jeanne MIALET-PEREZ

**PERSONNEL ENSEIGNANT**  
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier  
au 1<sup>er</sup> octobre 2014

**Professeurs Émérites**

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ J	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

**Professeurs des Universités**

**Hospitalo-Universitaires**

M. CHATELUT E	Pharmacologie
M. FAVRE G	Biochimie
M. HOUIN G	Pharmacologie
M. PARINI A	Physiologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique
M. SIÉ P	Hématologie
M. VALENTIN A	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BARRE A	Biologie
Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. BENOIST H	Immunologie
Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B	Biochimie
M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. FABRE N	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
Mme MULLER-STAU MONT C	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F	Chimie analytique
M. SALLES B	Toxicologie
Mme SAUTEREAU A-M	Pharmacie galénique
M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

## Maîtres de Conférences des Universités

### Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P	Pharmacie Clinique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie
Mme THOMAS F	Pharmacologie

### Universitaires

Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H	Parasitologie
M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C	Biophysique
M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C	Physiologie
Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
Mme COSTE A (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N	Biochimie
Mme DERAËVE C	Chimie Thérapeutique
Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F	Toxicologie
Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
Mme LEFEVRE L	Physiologie
Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
M. LEMARIE A	Biochimie
M. MARTI G	Pharmacognosie
Mme MIREY G (*)	Toxicologie
Mme MONTFERRAN S	Biochimie
M. OLICHON A	Biochimie
M. PERE D	Pharmacognosie
Mme PHILIBERT C	Toxicologie
Mme PORTHE G	Immunologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D	Hématologie
Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELENDT M	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(\*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

### Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme COOL C (**)	Physiologie
Mme FONTAN C	Biophysique
Mme KELLER L	Biochimie
M. PÉRES M. (**)	Immunologie
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique

(\*\*) Nomination au 1<sup>er</sup> novembre 2014

### Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche

Mme PALOQUE L	Parasitologie
Mme GIRARDI C	Pharmacognosie
M IBRAHIM H	Chimie anal. - galénique

# Remerciements :

---

**Aux membres de mon jury de thèse,**

***Monsieur le Professeur Daniel CUSSAC***

Je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

***Madame le Docteur Jeanne MIALET-PEREZ***

Je vous remercie d'avoir accepté d'encadrer mon travail au cours de mon master et de ma thèse. Je tiens également à vous remercier pour toutes les connaissances que vous m'avez apportées, ainsi que pour vos précieux conseils. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

***Monsieur le Docteur Jean GRELLET***

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger à mon jury de thèse et de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon respect et de ma gratitude.

***Monsieur le Docteur Mathieu TAFANI***

Votre rencontre fut déterminante dans mon internat (et externat). Merci de m'avoir fait découvrir et aimer la radiopharmacie, ainsi que de m'avoir permis de réaliser le DESC de radiopharmacie. Merci également de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ce master lors de mon année recherche. Pour toutes ces raisons et bien d'autres, votre présence dans mon jury comptait beaucoup à mes yeux.

***Monsieur le Docteur Benoît NICOL***

Merci pour ton soutien tout au long de cette (difficile) période de rédaction et de dépôt de thèse. Merci pour ta bonne humeur durant tout ce stage, pour m'avoir fait découvrir la gastronomie albigeoise, pour le chocolat antidépresseur de 17h, pour les joies de l'HAD... Enfin un grand merci pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

**À toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail,**

À Monsieur le Professeur Angelo PARINI, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe à l'I2MC.

À Damien « Dam's », pour avoir été mon thésard durant ce master, pour m'avoir permis de préparer tant de Krebs (ma grande passion), pour les pause-pommes, « et compagnie »,...

À toute l'équipe de l'I2MC, pour votre accueil et votre aide au cours de mon master 2.

### **À tous les pharmaciens et internes croisés au cours de mon internat,**

Aux pharmaciens d'Albi, Jacqueline, Véronique, Olivia et Benoît. Merci pour votre bonne humeur et toutes les connaissances que vous m'avez apportées. Merci également à toute l'équipe des préparateurs.

À toutes l'équipe de la radiopharmacie toulousaine. Charlotte, Anne-So et Mathieu pour leur contribution à ma formation et leur bonne humeur quotidienne. Merci également à l'équipe des préparateurs.

À tous les pharmaciens et préparateurs du CHU avec qui j'ai eu la chance de travailler. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté.

À tous les internes que j'ai croisés durant mon internat.

### **À mes amis**

À mon senseï Nicolas pour toutes les connaissances qu'il m'a apporté, la confiance qu'il m'a accordé et pour m'avoir donné l'opportunité d'aller m'entraîner au Japon.

À tous les membres du Jinenkan pour m'avoir servi de cobaye à un moment ou un autre.

À l'équipe des 4 fantastiques : François, Marc, Mélanie et Vincent. Merci pour votre amitié. Les soirées jeux, les road-trips à Bessines-sur-Gartempe et nos « petites » conversations de fin de cours me manqueront. Même si je pars dans le grand Nord, je surveillerai votre progression de près ! Et je sais que vous penserez à moi chaque fois que vous ferez des burpees !

À Miki senseï et tous les élèves du cours de japonais : ありがとう! La route est encore longue avant de devenir bilingues, mais nous sommes sur la bonne voie !

À Marc I., ami de longue date. Rencontre fortuite sur les bancs de la fac qui a conduit à une belle amitié. J'espère que les verts pâturages escalquinois ne te manquent pas trop !

### **À ma famille,**

Merci pour votre soutien durant toutes ces années.

~

一期一会

~

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS :</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES :</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX :</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTE DES ANNEXES :</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS :</b> .....	<b>10</b>
<b>PARTIE I : CONTEXTE</b> .....	<b>13</b>
<b>I. VIEILLISSEMENT ET PATHOLOGIES CARDIAQUES</b> .....	<b>14</b>
A. GENERALITES SUR LE VIEILLISSEMENT .....	14
B. INSUFFISANCE CARDIAQUE .....	17
1. <i>Epidémiologie</i> .....	17
2. <i>Définition</i> .....	18
3. <i>Symptômes</i> .....	19
4. <i>Classification</i> .....	20
5. <i>Diagnostic</i> .....	21
6. <i>Etiologie</i> .....	23
7. <i>Complications</i> .....	23
8. <i>Traitement</i> .....	24
<b>II. VIEILLISSEMENT ET SENESCENCE CELLULAIRE</b> .....	<b>26</b>
A. VIEILLISSEMENT CARDIAQUE .....	26
B. GENERALITES SUR LA SENESCENCE CELLULAIRE .....	27
1. <i>Mécanismes et grands marqueurs de la sénescence cellulaire</i> .....	27
2. <i>Rôles et conséquences de la sénescence</i> .....	34
C. SENESCENCE CARDIAQUE .....	38
1. <i>Sénescence répllicative et sénescence post-mitotique</i> .....	38
2. <i>Sénescence des cardiomyocytes</i> .....	40
3. <i>Problématique des marqueurs de sénescence actuels</i> .....	41
<b>III. LA MONOAMINE OXYDASE</b> .....	<b>42</b>
A. GENERALITES .....	42
B. LA MAO : CIBLE THERAPEUTIQUE ? .....	45
1. <i>Pathologies dues à la MAO</i> .....	45
2. <i>Traitements ciblant la MAO</i> .....	46
C. MAO-A, STRESS OXYDANT ET SENESCENCE CARDIAQUE .....	47

<b>PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE DE LA SENESCENCE DES CARDIOMYOCYTES ET ROLE DE LA MAO-A.....</b>	<b>49</b>
<b>IV. PROBLEMATIQUE:.....</b>	<b>50</b>
<b>V. MATERIEL ET METHODES:.....</b>	<b>52</b>
A. MODELES UTILISES :.....	52
1. <i>Modèle de vieillissement physiologique</i> :.....	52
2. <i>Modèle de surexpression de la MAO-A cardiaque</i> :.....	52
B. PRELEVEMENT DE CŒUR ENTIER :.....	52
C. ISOLEMENT DES CARDIOMYOCYTES :.....	52
D. EXTRACTION DES ARN :.....	53
E. ANALYSE PAR RT-PCR :.....	54
1. <i>Synthèse des ADNc par Reverse Transcriptase</i> :.....	54
2. <i>Réalisation de la PCR</i> :.....	54
F. MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA MAO-A :.....	55
G. ECHOGRAPHIES CARDIAQUES :.....	55
H. TEST DE STRESS OXYDANT PAR DCFDA :.....	55
I. ANALYSE DES DONNEES :.....	56
<b>VI. RESULTATS:.....</b>	<b>57</b>
A. CARACTERISATION DU VIEILLISSEMENT CARDIAQUE :.....	57
1. <i>Echographies cardiaques chez les souris âgées</i> :.....	57
2. <i>RT-PCR sur cœur entier de souris âgées</i> :.....	58
3. <i>RT-PCR sur cardiomyocytes isolés de souris âgées</i> :.....	59
B. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DE LA MAO-A ET DU STRESS OXYDANT DU A LA MAO-A DANS LA SENESCENCE CARDIAQUE :.....	61
1. <i>Dosage de l'activité enzymatique de la MAO-A chez les souris âgées</i> :.....	61
2. <i>Test de stress oxydant par DCFDA chez les souris âgées</i> :.....	62
C. SUREXPRESSION DE LA MAO-A COMME MODELE DE SENESCENCE CARDIAQUE :.....	63
1. <i>Dosage de l'activité enzymatique de la MAO-A chez les souris Tg-MAO</i> :.....	63
2. <i>Test de stress oxydant par DCFDA chez les souris Tg-MAO</i> :.....	64
3. <i>RT-PCR sur cœur entier de souris Tg-MAO</i> :.....	65
<b>VII. DISCUSSION:.....</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE:.....</b>	<b>73</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>86</b>

# Liste des figures :

---

<b>Figure 1:</b> Pyramide des âges, en France, par sexe, au 01/01/2005 et projection en 2060 .....	14
<b>Figure 2 :</b> Espérance de vie à la naissance, en France, par sexe et par année, depuis 1945... 15	15
<b>Figure 3 :</b> Prévalence des maladies chroniques dans l'Europe en 2010, par sexe et âge .....	16
<b>Figure 4 :</b> Prévalence déclarée de l'insuffisance cardiaque selon le sexe et l'âge en France.. 17	17
<b>Figure 5:</b> Interprétation des taux de peptides natriurétiques dans le diagnostic de l'IC .....	22
<b>Figure 6:</b> Modifications physiologiques liées au vieillissement au niveau cardiaque.....	26
<b>Figure 7:</b> Représentation schématique du lien entre ROS et sénescence.....	30
<b>Figure 8:</b> Différents mécanismes mettant en jeu les EROs au cours de la sénescence .....	31
<b>Figure 9:</b> Conséquences de la sénescence.....	37
<b>Figure 10:</b> Structure du tissu cardiaque.....	39
<b>Figure 11:</b> Résultats des échographies cardiaques réalisées chez les souris WT âgées de 3 mois ou 20 mois.....	57
<b>Figure 12:</b> Analyse par RT-PCR des niveaux d'expression des ARNm, normalisés par la GAPDH, dans les cœurs entiers de souris WT, âgées de 3 mois ou de 20 mois. (n=10).....	58
<b>Figure 13:</b> Analyse par RT-PCR des niveaux d'expression des ARNm, normalisés par la GAPDH, dans les cardiomyocytes isolés de souris WT, âgées de 3 mois ou de 20 mois.....	59
<b>Figure 14:</b> Dosage de l'activité enzymatique de la MAO-A, à l'aide du test MAO-Glo, sur cardiomyocytes isolés de souris WT, âgées de 3 mois ou de 20 mois (n=8).....	61
<b>Figure 15:</b> Evaluation du stress oxydant, à l'aide du test au DCFDA, sur cardiomyocytes isolés de souris WT, âgées de 3 mois ou de 20 mois (n=4).....	62
<b>Figure 16:</b> Dosage de l'activité enzymatique de la MAO-A, à l'aide du test MAO-Glo, sur cardiomyocytes isolés de souris Tg MAO-A ou WT (n=3).....	63
<b>Figure 17:</b> Evaluation du stress oxydant, à l'aide du test au DCFDA, sur cardiomyocytes isolés de souris WT ou Tg MAO-A (n=4).....	64
<b>Figure 18:</b> Analyse par RT-PCR des niveaux d'expression des ARNm, normalisés par la GAPDH, dans les cœurs entiers de souris WT ou Tg MAO-A (n=6).....	65

## Liste des tableaux :

---

<b>Tableau 1</b> : Classification NYHA, comportant les 4 stades cliniques.....	20
<b>Tableau 2</b> : Localisation de la MAO-A et de la MAO-B chez l'homme dans les tissus périphériques .....	44
<b>Tableau 3</b> : Inhibiteurs réversibles et irréversibles des monoamines oxydases utilisés ou ayant été utilisés en médecine.....	46

# Liste des annexes :

---

<b>Annexe 1</b> : Facteurs de risque de complications de l'IC.....	86
<b>Annexe 2</b> : Algorithme de prise en charge de l'ICS.....	87
<b>Annexe 3</b> : Prise en charge thérapeutique de l'ICS.....	88
<b>Annexe 4</b> : Prise en charge thérapeutique de l'ICFEP.....	89
<b>Annexe 5</b> : Séquences des amorces utilisées en PCR en temps réel.....	90

# Liste des abréviations :

---

**ADN (= DNA)** : Acide désoxyribonucléique  
**ADNc** : ADN complémentaire  
**ADNmt** : ADN mitochondrial  
**AGTR1** : Angiotensin II receptor, type 1  
**ALDH**: Aldéhyde Déshydrogénase  
**ALR** : Aldéhyde Réductase  
**ARA-II** : Antagoniste des Récepteurs à l'Angiotensine II  
**AVC** : Accident vasculaire cérébral  
**ARNm (= RNAm)** : Acide ribonucléique messenger  
**BNP** : Brain Natriuretic Peptide  
**BPCO** : Broncho pneumopathie chronique obstructive  
**BSA** : Bovine Serum Albumin  
**Ccl2** : Chemokine ligand 2  
**CORO1** : Coronin-1  
**DA** : Dopamine  
**DAI** : Défibrillateur Automatique Implantable  
**DCFDA** : 2',7'-dichlorofluorescinediacétate  
**DDR** : DNA Damage Response  
**DFG** : Débit de Filtration Glomérulaire  
**dNTP** : desoxy-Adenine/Thymine/Guanine/Cytosine-Tri-Phosphate  
**EGF** : Epidermal Growth Factor  
**FA** : Fibrillation Auriculaire  
**FEVG** : Fraction d'éjection ventriculaire gauche  
**Gadd45** : Growth Arrest and DNA Damage 45  
**GAPDH** : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase  
**GPX** : Glutathion Peroxydase  
**HAS** : Haute Autorité de Santé  
**HEPES** : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
**HGF** : Hepatocyte Growth Factor  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Hypochlorite de sodium  
**5-HT** : Sérotonine (5-hydroxytryptamine)

**HTA** : Hypertension Artérielle  
**HTAP** : Hypertension Artérielle Pulmonaire  
**IC** : Insuffisance cardiaque  
**ICFEP** : Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée  
**ICS** : Insuffisance cardiaque systolique  
**IDM** : Infarctus du myocarde  
**IEC** : Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion  
**Il-6** : Interleukine 6  
**IMAO** : Inhibiteur de la Monoamine Oxydase  
**INSEE** : Institut national de la statistique et des études économiques  
**IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique  
**IVD** : Insuffisance ventriculaire droite  
**IVG** : Insuffisance ventriculaire gauche  
**KCl** : Chlorure de potassium  
**MAO-A** : Monoamine Oxydase A  
**MgCl<sub>2</sub>** : Dichlorure de magnésium  
 **$\alpha$ -MHC** :  $\alpha$ -Myosin Heavy Chain  
 **$\beta$ -MHC** :  $\beta$ -Myosin Heavy Chain  
**MMP** : Matrix Metalloproteinase  
**NA** : Noradrénaline  
**NaCl** : Chlorure de sodium  
**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Dihydrogénophosphate de sodium  
**NaOH** : Hydroxyde de sodium  
**NT-proBNP** : N-terminal pro-brain natriuretic peptide (précurseur du BNP)  
**NYHA** : New-York Heart Association  
**p38MAPK** : p38 mitogen-activated protein kinase  
**PAI-1** : Plasminogen activator inhibitor-1  
**PBS** : Phosphate buffered saline  
**PEA** : bêta-phényléthylamine  
**ROS (= EROs)** : Reactive Oxygen Species (= Espèces réactives de l'oxygène)  
**RT-PCR** : Reverse transcription polymerase chain reaction  
**SA- $\beta$ -GAL** : Senescence-Associated  $\beta$ -Galactosidase  
**SASP** : Senescence-Associated Secretory Phenotype  
**SIPS** : Stress-Induced Premature Senescence

**SOD** : Superoxide dismutase

**TGF- $\beta$**  : Transforming growth factor  $\beta$

**Tg-MAO** : Souris transgénique surexprimant la MAO-A

**NTg** : Souris non transgénique (= wild type)

**UE** : Union Européenne

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor

**VG** : Ventricule gauche

**WT** : Wild Type

# Partie I : Contexte

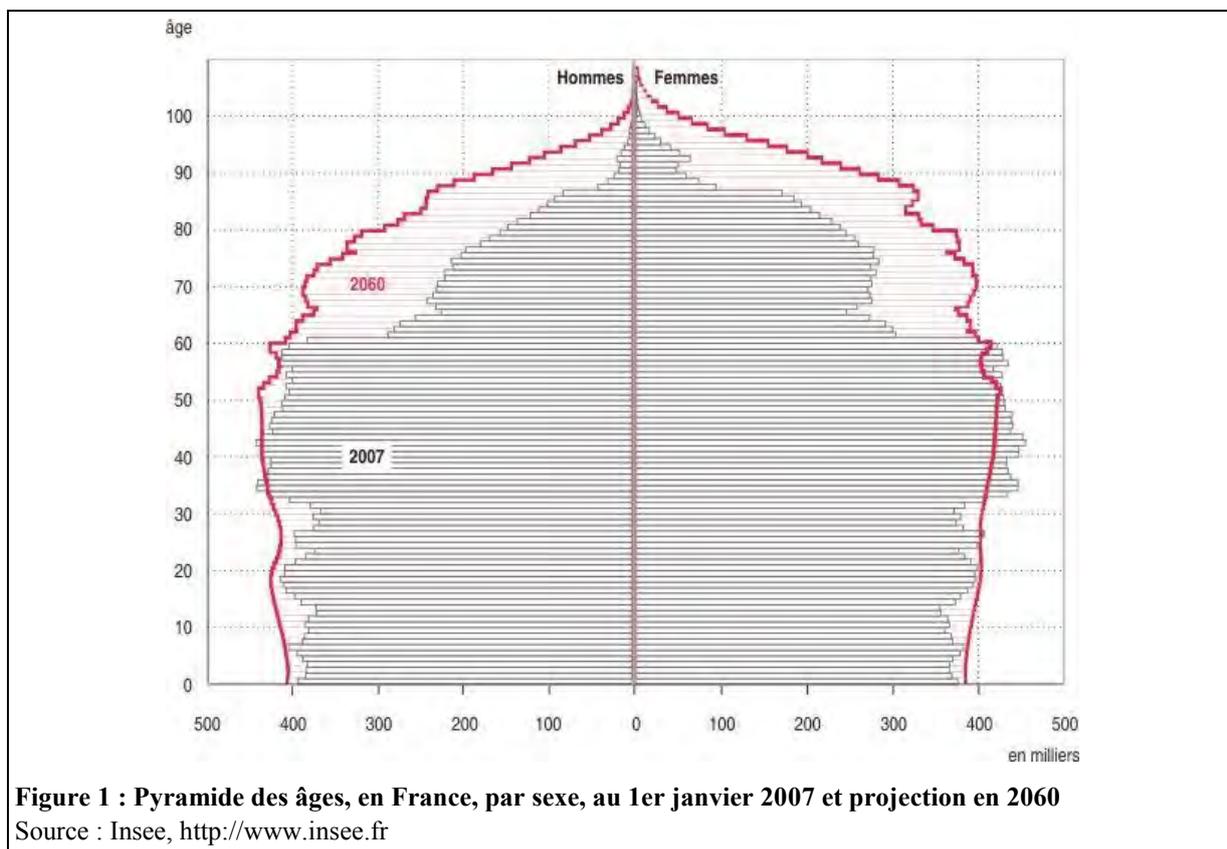
---

# I. Vieillesse et pathologies cardiaques

## A. Généralités sur le vieillissement

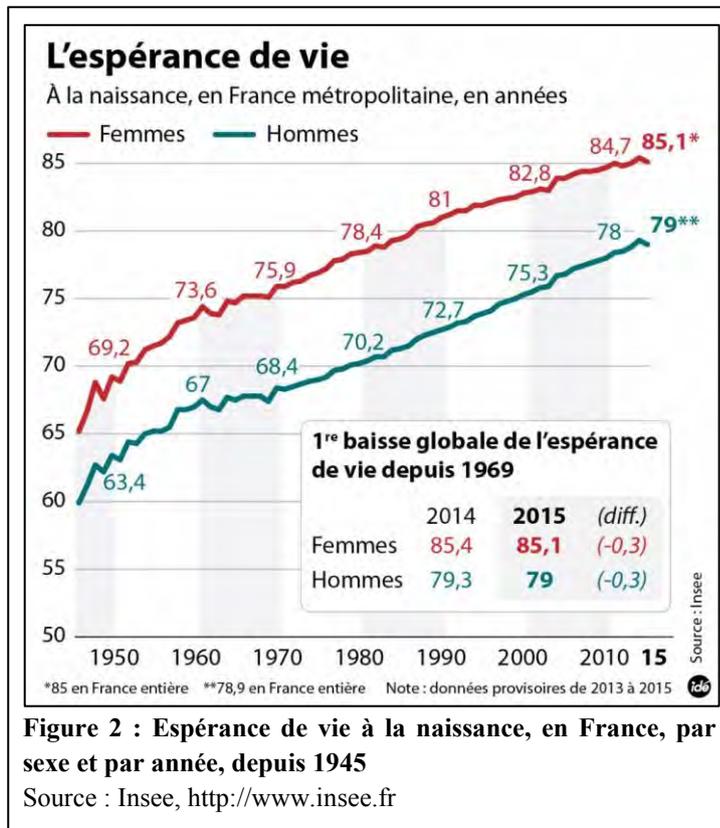
Ces dernières années, l'espérance de vie et le nombre de personnes âgées dans le monde n'ont pas cessé d'augmenter.

Selon les projections de l'INSEE (1), au 1er janvier 2060, la population française devrait compter 73,6 millions d'habitants dont 23,6 millions de personnes âgées de plus de 60 ans, contre 12,6 millions en 2007 (Fig.1). Près d'un habitant sur trois serait donc âgé de 60 ans et plus, contre environ un habitant sur cinq en 2007. Cela représente une hausse de presque 80% en 55 ans. Cette augmentation de la population âgée s'explique, en partie, par l'arrivée à un âge avancé de la génération des baby-boomers.



En parallèle, nous observons aussi une progression de l'espérance de vie qui participe également à ce vieillissement global de la population. L'espérance de vie à la naissance en 2015 est le nombre d'année que peut espérer vivre un enfant né en 2015.

L'espérance de vie à la naissance a connu une progression constante au cours des dernières



**Figure 2 : Espérance de vie à la naissance, en France, par sexe et par année, depuis 1945**  
Source : Insee, <http://www.insee.fr>

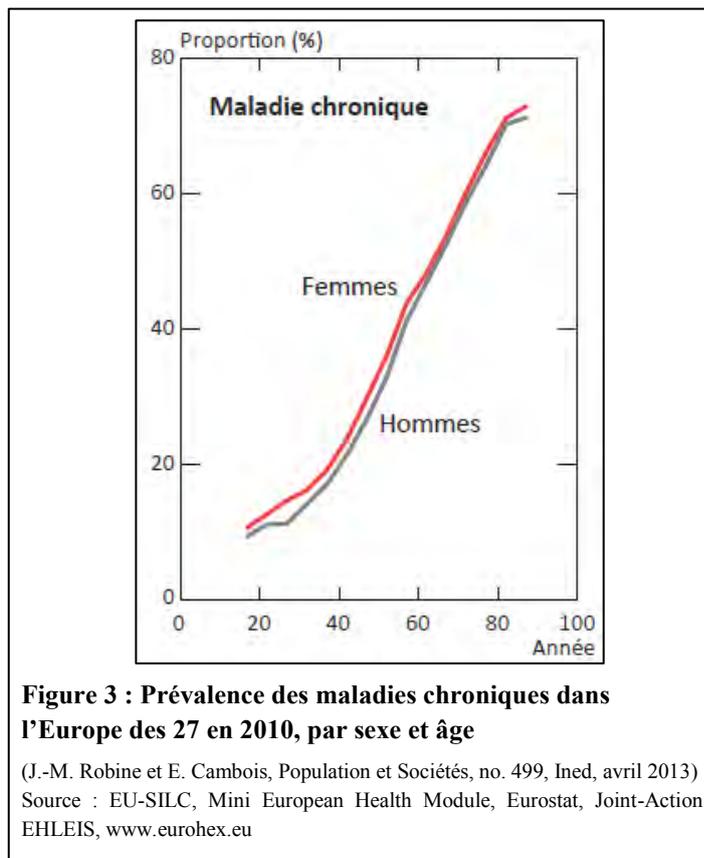
années, aussi bien chez les hommes que chez les femmes. Toutefois, cette progression ne sera pas infinie, et un palier sera atteint tôt ou tard. En 2015, la première baisse globale de l'espérance de vie à même était observée en France depuis 1969 (Fig.2). Avec, en moyenne, -0.3 années d'espérance de vie en 2015, aussi bien chez les hommes que chez les femmes, cette baisse pourrait-être un des premiers signes de l'arrêt de la progression de l'espérance de vie.

A l'heure actuelle, les femmes présentent une espérance de vie

supérieure à celle des hommes ; respectivement de 85.1 ans pour les femmes en 2015 et de 79 ans pour les hommes. Toutefois, au fil des années, l'écart entre les deux sexes se réduit progressivement. A un peu plus de 8 ans dans les années 90, cet écart est passé à 6.2 ans en 2015.

Si l'augmentation de la longévité est sans doute un phénomène positif, celle-ci doit être accompagnée par un maintien de la qualité de vie, non seulement pour préserver le bien être des individus, mais également afin de maîtriser l'augmentation des coûts liés à la prise en charge médicale, sociale et économique des personnes âgées. Pour cela, un autre indicateur, l'espérance de vie en bonne santé, a été développé. Cet indicateur permet d'évaluer l'espérance de vie d'un individu, sans maladies chroniques, limitation d'activité et avec une bonne santé perçue.

En 2014, Eurostat a évalué l'espérance de vie en bonne santé des ressortissants de l'UE (2). Il en ressort qu'en France métropolitaine, en 2012, l'espérance de vie en bonne santé était



estimée à 64,2 ans pour les femmes et à 63,4 ans pour les hommes. En comparant aux espérances de vie à la naissance, 85,5 années pour les femmes et 79,3 années pour les hommes en 2014, et au vu de l'écart important entre ces deux indicateurs, on constate que vieillissement est bien souvent synonyme de mauvaise santé. Cela est confirmé lorsqu'on observe les chiffres fournis par l'Institut national d'études démographiques (3) sur la prévalence des maladies chroniques en 2010, en Europe, en fonction de l'âge (Fig.3).

Ces principales maladies chroniques sont (4):

- Les maladies cardio-vasculaires (IDM, AVC, IC,...)
- Les cancers, 1<sup>ère</sup> cause de décès en France depuis 2004
- Les maladies métaboliques, dont principalement, le diabète
- Les maladies respiratoires chroniques (asthme et BPCO)
- Les maladies neurologiques et psychiatriques

Un diagnostic précoce de ces maladies chroniques permet, bien souvent, de limiter les conséquences néfastes de ces pathologies. En effet, prises en charge suffisamment tôt, ces maladies peuvent souvent rester sous contrôle, sans s'aggraver. Ceci permet d'améliorer les conditions de vie du patient, ou tout du moins, d'éviter que celles-ci se dégradent du fait de l'aggravation de sa pathologie. D'autre part, cela permet également de réduire les coûts pour la société, car qui dit aggravation d'une pathologie chronique, dit bien souvent hospitalisation du patient ainsi que traitement plus lourd et donc plus onéreux.

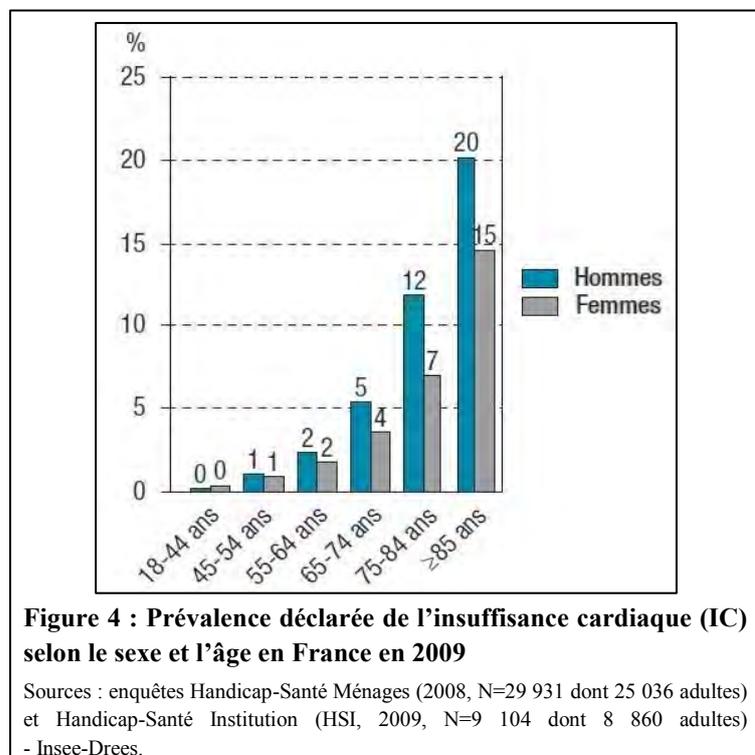
## B. Insuffisance cardiaque

Le vieillissement étant considéré comme un facteur majeur de risque pour les maladies chroniques (5), cette augmentation de l'espérance de vie a conduit à une progression importante des pathologies liées au vieillissement, dont l'insuffisance cardiaque (IC). L'apparition de l'IC va contribuer à la dépendance et la fragilité de la personne âgée.

### 1. Epidémiologie

L'IC est une pathologie fréquente qui touche environ 2.3% de la population adulte, soit 1 130 000 personnes en 2009 (6). Ce chiffre passe à plus de 10% chez les personnes âgées

de 70 ans et plus (7). Les études de prévalence menée par l'Insee révèlent une corrélation marquée entre âge et prévalence de l'IC, avec une hausse marquée de celle-ci dès 60-65 ans (Fig.4). Ceci démontre clairement que le risque de déclarer une IC augmente avec l'âge. L'étude Framingham évalue ce risque, après 40 ans, à 21 % chez les hommes et 20 % chez les femmes (8). Selon l'étude plus récente de Bleuminck, après 55



ans, ce risque passe à 33 % chez les hommes et 28,5 % chez les femmes, soit près d'une personne sur trois (9). L'IC reste l'une des premières causes d'hospitalisation chez les patients âgés de plus de 65 ans (10).

La mortalité de cette pathologie est également très importante. En 2011, environ 70 000 décès recensés en France étaient dus à l'IC, dont 30 000 décès directement imputables à la maladie (11). On estime que le taux de mortalité est de 50 % à 5 ans à partir de l'apparition des premiers symptômes. Ceci s'explique par le fait que, bien souvent, la maladie évolue à bas bruit durant des années, et les symptômes cliniques ne font leur apparition que bien plus tard,

lorsque la maladie a déjà atteint un stade avancé. Ce diagnostic et cette prise en charge tardive de l'IC explique son taux de mortalité encore important de nos jours.

## 2. Définition

L'insuffisance cardiaque est définie comme étant l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin nécessaire aux besoins de l'organisme. Ce débit sanguin trop faible va se révéler insuffisant pour permettre le transport aux organes, de l'oxygène et des éléments nutritifs essentiels à leur fonctionnement.

Le stress chronique du myocarde, engendré par différentes situations pathologiques, va entraîner une réponse adaptative de celui-ci. Celle-ci va comprendre une hypertrophie myocardique du ventricule gauche (VG), un remodelage fonctionnel et une adaptation métabolique. Mais si ce stress dépasse les capacités adaptatives du myocarde ou s'il est prolongé, il va entraîner une hypertrophie excessive du myocarde, une dilatation progressive du VG, des anomalies de contraction du muscle cardiaque et, à terme, une défaillance cardiaque. Si la défaillance touche le ventricule gauche, on parlera d'insuffisance ventriculaire gauche (IVG) ; si elle touche le ventricule droit, on parlera d'insuffisance ventriculaire droite (IVD) ; enfin, si cette défaillance touche le cœur droit et gauche, on parlera d'insuffisance cardiaque globale. L'insuffisance cardiaque gauche est de loin la plus fréquente.

L'IC peut également être classée en deux autres catégories : l'IC diastolique et l'IC systolique (12). L'IC diastolique est définie 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. » (13). Cette altération de la fonction diastolique résulte d'anomalies de la relaxation du muscle cardiaque, ainsi que du remplissage ventriculaire. La contractilité et les performances du ventricule restent normales (14). La fonction systolique du ventricule gauche est généralement conservée ou subnormale (55 à 80% des cas) (15).

L'IC systolique correspond, quant à elle, à une diminution des capacités contractiles du myocarde et aboutit à une diminution de la fraction d'éjection ventriculaire. Environ 50 à 60% des IC s'accompagnent d'une dilatation de la chambre ventriculaire gauche ainsi que d'une altération de la fraction d'éjection ventriculaire.

Du point de vue clinique, chez une personne âgée en bonne santé, la fréquence cardiaque, le volume systolique et le débit cardiaques sont normaux. En revanche, on observe une

diminution de l'adaptation à l'effort, du fait d'une augmentation insuffisante de la fréquence cardiaque. Avec l'avancement de l'âge, la fonction et la morphologie cardiaque s'altèrent et conduisent à un cadre clinique caractéristique, proche de l'IC diastolique, l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP) (16). Chez la personne âgée, l'ICFEP est caractérisée par des symptômes d'insuffisance cardiaque, une fraction d'éjection proche de la normalité (>45%), une dysfonction diastolique et une diminution de la tolérance à l'effort (17). Très souvent, la présence de comorbidités chez la personne âgée conduit à une perte progressive de la fonction cardiaque et au développement d'une insuffisance cardiaque dilatée, avec une diminution de la fraction d'éjection ventriculaire (18).

### 3. Symptômes

Ces symptômes sont l'expression directe, au niveau de l'organisme, de cette circulation sanguine moindre, et de cette dette en oxygène et en nutriments des différents organes. On peut retrouver des symptômes caractéristiques selon le type d'IC. En général, les conséquences de l'IC se verront sur les organes en amont du ventricule touché.

Lors d'IVG, il y aura une répercussion pulmonaire importante, avec un essoufflement survenant d'abord à l'effort, puis au repos lors des stades avancés de la maladie ; cette dyspnée pouvant entraîner des difficultés à réaliser les activités quotidiennes. On pourra également retrouver d'autres signes pulmonaires tels qu'une toux nocturne.

Lors d'IVD, les signes pulmonaires seront beaucoup moins marqués ; en revanche, la symptomatologie au niveau périphérique sera beaucoup plus importante. On retrouvera notamment une atteinte au niveau hépatique avec hépatomégalie et un reflux hépato-jugulaire caractéristique de la pathologie. On notera également l'apparition d'œdèmes périphériques parfois importants.

Dans le cadre d'IC globale, on pourra retrouver un tableau clinique comportant simultanément la symptomatologie des IVG et IVD.

D'autres signes moins spécifiques, tel qu'une asthénie, une prise de poids rapide ou une perte d'autonomie du patient, pourront conduire à un diagnostic tardif de la pathologie.

## 4. Classification

Nous avons vu que l'IC pouvait être classée selon la zone cardiaque atteinte (IVG, IVD ou IC globale), ou selon la phase du cycle cardiaque impactée (IC systolique ou diastolique). Il existe également divers systèmes de classification permettant d'évaluer la gravité et le stade de l'IC.

La classification de la *New York Heart Association* (NYHA) reste la classification internationale la plus communément utilisée dans ce cas-là. C'est également sur cette classification que reposent les recommandations de l'HAS quant à la prise en charge de l'IC. Cette classification se base sur la symptomatologie clinique et les répercussions sur la vie de tous les jours de la pathologie, afin d'évaluer le stade de l'IC (Tab.1).

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

**Tableau 1 : Classification NYHA, comportant les 4 stades cliniques**

De cette classification dépendra la prise en charge du patient, et le choix du traitement approprié, dans l'arsenal thérapeutique.

## 5. Diagnostic

Comme nous avons vu précédemment, la symptomatologie de l'IC est finalement assez peu spécifique de la pathologie, mis-à-part pour des maladies à un stade avancé. De ce fait, le diagnostic ne se fera pas uniquement sur la clinique. L'utilisation de l'imagerie et de la biologie aura également un rôle majeur à jouer afin de poser le diagnostic d'IC.

A l'heure actuelle, et selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) (19), le diagnostic d'une IC est posé lorsque 2 principaux critères sont réunis:

- Des symptômes (dyspnée, fatigue) et des signes caractéristiques de l'IC (tachycardie, polypnée, râles crépitants pulmonaires, épanchement pleural, turgescence jugulaire, œdèmes périphériques, hépatomégalie)

Et

- Une preuve objective d'une anomalie structurelle ou fonctionnelle du cœur au repos (cardiomégalie, 3<sup>e</sup> bruit cardiaque, souffle cardiaque, anomalie à l'échocardiogramme ou à l'échographie, élévation du dosage des peptides natriurétiques).

### *a. Imagerie médicale*

L'imagerie médicale est importante pour la diagnostic, car elle permet notamment de calculer la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) et de mesurer la taille du ventricule gauche (VG), l'épaisseur pariétale, la qualité de l'éjection et du remplissage ventriculaire gauche. Elle permet donc de détecter une éventuelle dilatation de la cavité ventriculaire, ou une hypertrophie du muscle myocardique. De plus, une diminution de la FEVG permet de poser le diagnostic d'IC systolique. Une FEVG inférieure à 40-50 % affirme le diagnostic d'IC systolique (ICS). En cas de FEVG supérieure à 40-50 %, un diagnostic d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP) est plutôt évoqué, si des critères de trouble de la relaxation et de dysfonction diastolique sont également retrouvés.

De nombreuses techniques d'imagerie peuvent être utilisées :

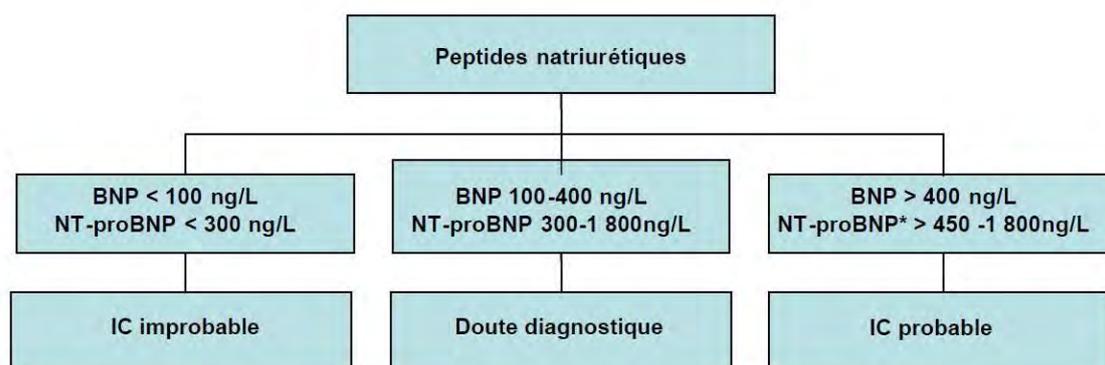
- En pratique quotidienne, l'échocardiographie Doppler est la méthode la plus utilisée afin d'évaluer la FEVG ou les modifications structurelles du myocarde.
- La ventriculographie isotopique, technique de médecine nucléaire, permet de calculer très précisément la FEVG du patient.

- L'IRM permet également d'évaluer les modifications morphologiques du myocarde, ainsi que la FEVG.
- La radiographie du thorax permet de repérer une éventuelle cardiomégalie due à une hypertrophie du myocarde.

### b. Biologie

Le dosage d'un peptide natriurétique, le *Brain Natriuretic Peptide* (BNP), ou de son précurseur (NT-proBNP) permet de confirmer ou infirmer le diagnostic d'IC. En effet, ce peptide, produit par les cellules musculaires cardiaques, verra sa synthèse et son excrétion augmentées en cas de distension des tissus, ce qui survient typiquement lors de la dilatation des ventricules durant l'IC.

Une IC sera donc très peu probable en cas de concentrations de BNP inférieures à 100 ng/L ou de NT-proBNP inférieures à 300 ng/L. A l'inverse, elle sera probable si les concentrations de BNP sont supérieures à 400 ng/L ou celles de NT-proBNP sont supérieures à 450-1800 ng/L selon l'âge.



\* IC probable si NT-proBNP > 450 ng/L (< 50 ans), > 900 ng/L (50-75 ans), > 1 800 ng/L (> 75 ans)

**Figure 5: Interprétation des taux de peptides natriurétiques dans le diagnostic de l'IC**

Sources : Guide du parcours de soins «Insuffisance cardiaque» de l'HAS (19)

Cependant, ces éléments ne permettent un diagnostic de l'IC qu'à posteriori, une fois que celle-ci a atteint un stade avancé et que les symptômes sont déjà bien développés. Il n'y a, à l'heure actuelle, aucun élément permettant un diagnostic suffisamment précoce de la maladie. Ce diagnostic précoce permettrait pourtant une prise en charge rapide du patient, avant que la maladie ne puisse se développer, et préviendrait ainsi l'apparition des symptômes graves, et souvent irréversibles, dus à la pathologie. Cependant, de nombreux biomarqueurs sont actuellement en développement, afin de pallier ce manque. Citons par exemple, les micro-ARN (20) ou la galectin-3 (21).

## 6. Etiologie

Les étiologies de l'IC sont extrêmement variées. En effet, de nombreuses pathologies ou facteurs de risques peuvent déclencher, aggraver ou décompenser une IC. Malgré cela, un grand nombre d'IC restent des IC idiopathiques, sans origines clairement identifiées.

Deux grands mécanismes d'action peuvent conduire à une IC :

- Une atteinte directe des cellules cardiaques avec altération de la fonction musculaire. C'est notamment le cas lors d'infarctus du myocarde, cardiomyopathies primitives ou toxiques (anthracyclines).
- Une atteinte secondaire due à une surcharge barométrique, comme dans l'HTA, ou une surcharge volumétrique, comme dans l'insuffisance mitrale par exemple.

Egalement, les étiologies des IVG et IVD seront différentes. L'IVG reste l'IC la plus fréquente, et possède de nombreuses étiologies. L'IVD en revanche ne possède que peu d'étiologies connues ; les deux principales sont une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), ou secondairement à une IVG conduisant ainsi à un IC globale.

Néanmoins, les facteurs d'apparition de l'IC étant encore assez mal connus, il est difficile de distinguer clairement les éléments déclencheurs, des éléments aggravants de cette pathologie.

## 7. Complications

La principale complication à redouter lors d'une IC est la décompensation cardiaque. Cette décompensation est parfois l'élément qui permet la découverte de la maladie. Bien souvent, elle conduit à l'hospitalisation du patient. Les taux de survie, suite à une décompensation cardiaque, restent encore faibles. Dans 7.5% des cas, cette décompensation se solde par un décès lors de l'hospitalisation (22). La mortalité à un an atteint 46.5% ; et celle-ci atteint même les 62.5%, si on inclut les patients décédés avant d'avoir pu être hospitalisés (23).

Les principaux facteurs de risque pouvant favoriser l'apparition d'une décompensation cardiaque sont un âge avancé, une IC importante à un stade III-IV sur l'échelle de la NYHA ou avec un FEVG très abaissé (< 30%), la présence de troubles du rythme associés, une hyponatrémie ou une insuffisance rénale sévère (DFG < 30 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) (Annexe 1).

Egalement, on peut craindre une poursuite du développement de la pathologie, ce qui conduira à une aggravation du stade de la maladie.

## 8. Traitement

La prise en charge de l'IC est une prise en charge qui se fait à différents niveaux. Il y a tout d'abord une prise en charge de la cause de l'IC, ainsi que des différents facteurs de risques préexistants chez le patient. Il y a également une prise en charge hygiéno-diététique qui a un rôle majeur dans le contrôle de la maladie. Enfin, si la maladie a déjà atteint un stade trop avancé avec une FEVG impactée (<40%), une prise en charge pharmacologique est nécessaire. Dans les cas les plus graves, un recours à la chirurgie est bien souvent la seule solution de traitement. La prise en charge peut varier en fonction du type d'IC (Annexes 2-4).

### *a. Traitement étiologique*

Si des facteurs de risques sont retrouvés, il est nécessaire de les traiter également, en parallèle de l'IC, afin d'éviter qu'ils n'aggravent celle-ci.

C'est notamment le cas de l'HTA qui doit être systématiquement traitée afin de réduire la charge de travail du muscle cardiaque, et ceci en réduisant les résistances périphériques lors de la systole.

Egalement, les troubles du rythme, qui peuvent favoriser la survenue d'IC, seront aussi à prendre en charge. Les anti-arythmiques de classe I (flécainide, hydroquinidine,...) étant contre-indiqués lors d'une IC, le traitement de choix de la FA, dans ce cadre, sera la digoxine et l'amiodarone.

### *b. Prise en charge hygiéno-diététique*

Celle-ci vise à réduire la charge de travail du muscle myocardique. Pour cela, il faut mettre en place une restriction sodée (< 6 g/j) afin d'éviter toute surcharge hydrosodée. Pour détecter celle-ci le plus précocement possible, le patient doit se peser régulièrement et être alerté par toute prise de poids rapide.

Une réadaptation du muscle cardiaque à l'effort, ainsi qu'une activité physique adaptée, doivent être mis en place afin de permettre au patient de regagner au maximum en autonomie.

Enfin, un arrêt du tabac doit être vivement encouragé chez les patients, du fait du caractère fortement délétère du tabac sur le muscle cardiaque et sur les pathologies cardio-vasculaires de façon plus large.

### *c. Prise en charge pharmacologique*

La prise en charge pharmacologique de l'IC dépend du type d'IC concernée.

Pour les IC diastolique, il n'y a pas de traitement médicamenteux spécifique. Il y a uniquement une prise en charge des facteurs de risques associés, ainsi qu'une prise en charge hygiéno-diététique.

Dans l'IC systolique en revanche, la prise en charge pharmacologique joue un rôle majeur. Son objectif est, comme pour la prise en charge hygiéno-diététique, de diminuer la charge de travail du myocarde. Pour cela, le traitement médicamenteux vise à abaisser la tension pour diminuer la surcharge barométrique.

Le traitement dépend du stade de l'IC, selon la classification NYHA :

- Stade I : pas de traitement pharmacologique. Prise en charge hygiéno-diététique et traitement des causes associées uniquement
- Stade II : idem stade I et ajout d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) + un  $\beta$ -bloquant
- Stade III : idem stade II + aldostérone ou antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II (ARA-II)
- Stade III-IV : le recours à la chirurgie est à envisager

Enfin, dans tous les cas, un traitement symptomatique sera mis en place, avec notamment, des diurétiques de l'anse en cas de rétention hydrosodée.

Du fait des répercussions au niveau pulmonaire, et de l'âge souvent important des patients, une vaccination antigrippale et anti-pneumococcique est également recommandée.

### *d. Prise en charge chirurgicale*

Cette prise en charge chirurgicale survient pour les stades les plus avancés de la maladie et constitue bien souvent le dernier recours des patients se retrouvant dans une impasse thérapeutique.

Les trois principales prises en charges chirurgicales sont :

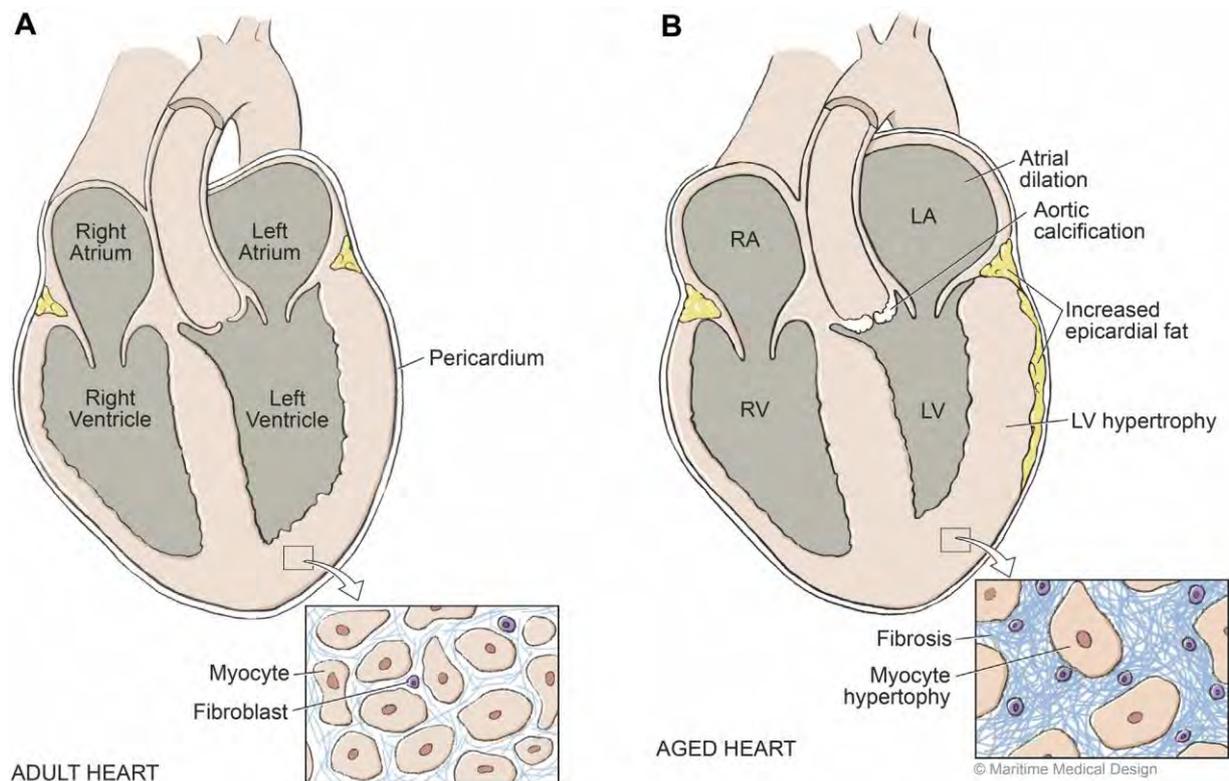
- Le défibrillateur implantable (DAI)
- Le dispositif d'assistance ventriculaire gauche
- La transplantation cardiaque

## II. Vieillessement et sénescence cellulaire

### A. Vieillessement cardiaque

Au niveau macroscopique, le vieillissement a de multiples répercussions sur le tissu cardiaque et de nombreuses modifications morphologiques vont survenir au cours du vieillissement de l'organe (24).

Avec l'âge, une diminution importante du nombre de cardiomyocytes est observée. Celle-ci est due à une mort accrue des cardiomyocytes sénescents, non compensée par l'activité régénératrice locale. Il va également survenir une hypertrophie compensatoire des cardiomyocytes restants. Enfin, cette mort cellulaire importante, et non compensée, va conduire à une fibrose interstitielle du tissu cardiaque (Fig.8).



**Figure 6: Modifications physiologiques liées au vieillissement au niveau cardiaque.**

Source : Figure tirée de Keller et al., 2016 (24)

Cependant, les cardiomyocytes restants ne vont pas parvenir à compenser cette perte cellulaire longtemps, et inexorablement, les capacités cardiaques vont diminuer. Ainsi, de nombreuses anomalies fonctionnelles vont apparaître : altération de la fréquence cardiaque en réponse au stress, altération de la relaxation myocardique et diminution de la compliande. Toutes ces

modifications morphologiques expliquent pourquoi le vieillissement cardiaque évolue souvent vers une IC (25,26). Cette IC survient lorsque le « capital » des cardiomyocytes aura été trop impacté. On peut également comprendre que plus ces phénomènes de vieillissement surviendront précocement au cours de la vie, plus une IC aura de chances de se développer chez le sujet âgé avec une issue, bien souvent, plus défavorable.

Cependant, les mécanismes qui vont conduire à l'entrée en sénescence des cellules cardiaques restent encore à ce jour assez mal connus. Il est donc d'autant plus difficile de prévoir l'apparition d'une éventuelle IC, ou d'identifier d'éventuelles cibles pharmacologiques.

## **B. Généralités sur la sénescence cellulaire**

Bien souvent, l'âge civil et l'âge physique des patients coïncident rarement. En effet, les phénomènes de vieillissement vont toucher différemment chaque individu, et nous sommes loin d'être tous égaux devant ce vieillissement. La faute en revient en grande partie aux phénomènes de sénescence cellulaire.

C'est, en effet, le processus de sénescence cellulaire qui serait en cause dans le déclin des fonctions organiques et le vieillissement des tissus de l'organisme. Les changements anatomiques et physiologiques associés à la vieillesse débutent ainsi plusieurs années avant l'apparition des signes extérieurs. Plusieurs de ces altérations commencent à se manifester progressivement à partir de quarante ans et se poursuivent jusqu'à la mort, c'est-à-dire jusqu'à ce que l'organisme ne puisse plus s'adapter. C'est la différence d'intensité, de vitesse d'apparition et de développement de cette sénescence cellulaire, qui va expliquer cette différence de vieillissement entre les individus, et va également expliquer la différence entre vieillissement physiologique et vieillissement pathologique.

### **1. Mécanismes et grands marqueurs de la sénescence cellulaire**

Le vieillissement de l'organisme est principalement lié à la sénescence cellulaire. La sénescence cellulaire a été décrite pour la première fois par L. Hayflick (27). Celui-ci a montré que des cellules diploïdes cessent de se diviser après un certain nombre de mitoses. Il a confirmé par la suite, que ces cellules somatiques humaines ont un nombre de mitoses limité à environ 50 (28).

### **a. Rôle des télomères**

Plusieurs études ont montré que cet arrêt de la prolifération cellulaire est principalement dû au raccourcissement des télomères, structures nucléoprotéiques situées aux extrémités des chromosomes (29,30). Au cours des divisions cellulaires, les télomères préviennent le raccourcissement de la partie codante des chromosomes et leur fusion. Toutefois, au cours de chaque division, la DNA polymérase ne pouvant pas répliquer complètement l'extrémité terminale du brin d'ADN, les télomères subissent un raccourcissement et lorsqu'ils atteignent une taille critique, la cellule entre en arrêt de prolifération irréversible. Une seule enzyme, la télomérase, possède la capacité de répliquer ce fragment terminal d'ADN, et conduit donc à une conservation de la longueur des télomères. Cette enzyme n'est pas exprimée dans les cellules somatiques adultes, expliquant cet inévitable arrêt du cycle cellulaire. Egalement, des expériences ont montré, *in vitro*, que l'expression de la télomérase, au niveau des cellules somatiques, confère une immortalité à ces cellules (30).

Mais les télomères semblent également jouer un rôle dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN (DDR pour *DNA Damage Response*). En effet les voies de signalisation activées lors d'un raccourcissement excessif des télomères ou lors d'un dommage de l'ADN semblent similaires (29).

### **b. Réponse aux dommages de l'ADN (DDR)**

Lors de cassure double brins de l'ADN, que ce soit au niveau intra ou extra-télomérique, la réponse aux dommages de l'ADN va être activée. Cette réponse cellulaire va conduire, si la lésion de l'ADN n'est pas réparée, à un arrêt du cycle cellulaire, l'entrée en sénescence de la cellule, et finalement son apoptose.

Lors de cassure double brins de l'ADN, ou lorsque le raccourcissement critique des télomères est atteint, il y a activation de la réponse aux dommages de l'ADN. Celle-ci va passer par l'activation de p53, un gène suppresseur de tumeur, et l'augmentation d'inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p16<sup>Ink4a</sup>, et p21<sup>Cip1</sup> avec un arrêt irréversible des mitoses (31–34). Les protéines codées par le locus *Ink4/Arf* se retrouvent particulièrement surexprimées lors de la sénescence (35–37). Notamment, les protéines p16<sup>Ink4a</sup>, p19<sup>Arf</sup> et p15<sup>Ink4b</sup> voient leur expression augmentée lors de la sénescence cellulaire ainsi que lors de pathologies liées au vieillissement (38,39). Ces protéines régulatrices du cycle cellulaire, p16<sup>Ink4a</sup> et p19<sup>Arf</sup>,

interviennent respectivement dans les voies de signalisation p16<sup>Ink4a</sup>/Rb and p19<sup>Arf</sup>/p53 qui vont conduire à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose de la cellule (40–42).

D'autres protéines régulatrices semblent également jouer un rôle dans cette DDR. C'est notamment le cas de *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38MAPK) (43–45), ou de *Growth Arrest and DNA Damage* (Gadd45) (46,47), qui interviendraient aussi dans l'arrêt du cycle cellulaire.

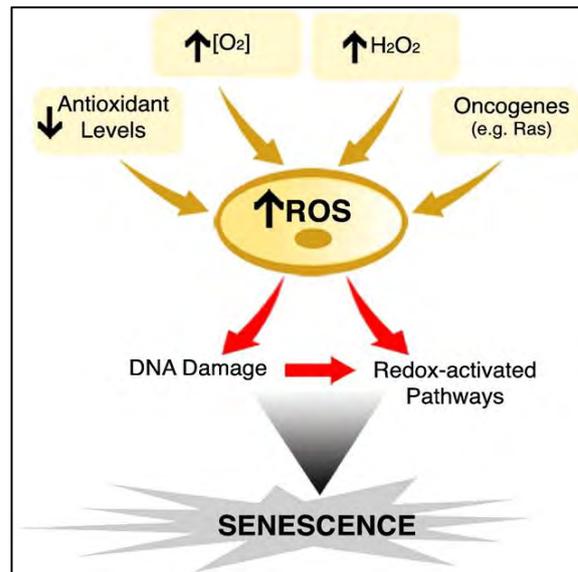
### ***c. Dysfonctionnement mitochondrial et rôle du stress oxydant***

Les mitochondries sont les principales sources d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) au niveau cellulaire. Les EROs sont produits principalement sous forme d'anion superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) par la chaîne respiratoire. L'anion superoxide diffuse dans la matrice mitochondriale et le cytosol où il est en partie converti en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par la superoxide dismutase (SOD) (48). Les EROs peuvent également être produits directement sous forme d' $H_2O_2$  par des systèmes enzymatiques tels que les monoamines oxydases. Dans les cas d'une production limitée, les EROs sont inactivés par les enzymes antioxydants présents au niveau cellulaire, tel que la SOD, la glutathion peroxydase (GPX) ou la catalase, mais également par des systèmes non enzymatiques tel que les glutathion ou l'acide ascorbique (vitamine C).

Si la production d'EROs est excessive, ou si les systèmes antioxydants de la cellule sont défaillants, il va y avoir une accumulation d'EROs au niveau cellulaire, ce qui va générer un stress oxydant (49). Celui-ci va avoir un impact direct sur la cellule, que ce soit en créant des lésions au niveau de l'ADN, ou en oxydant les protéines cytoplasmiques ou les lipides membranaires. Ce stress oxydant aura donc un impact direct sur l'ensemble des composantes cellulaires.

Tout comme l'ADN nucléaire, l'ADN mitochondrial (ADNmt) subit au cours du temps une accumulation de mutations et de délétions (50). Celles-ci peuvent résulter de stress exogènes. 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 d'EROs (51–53).

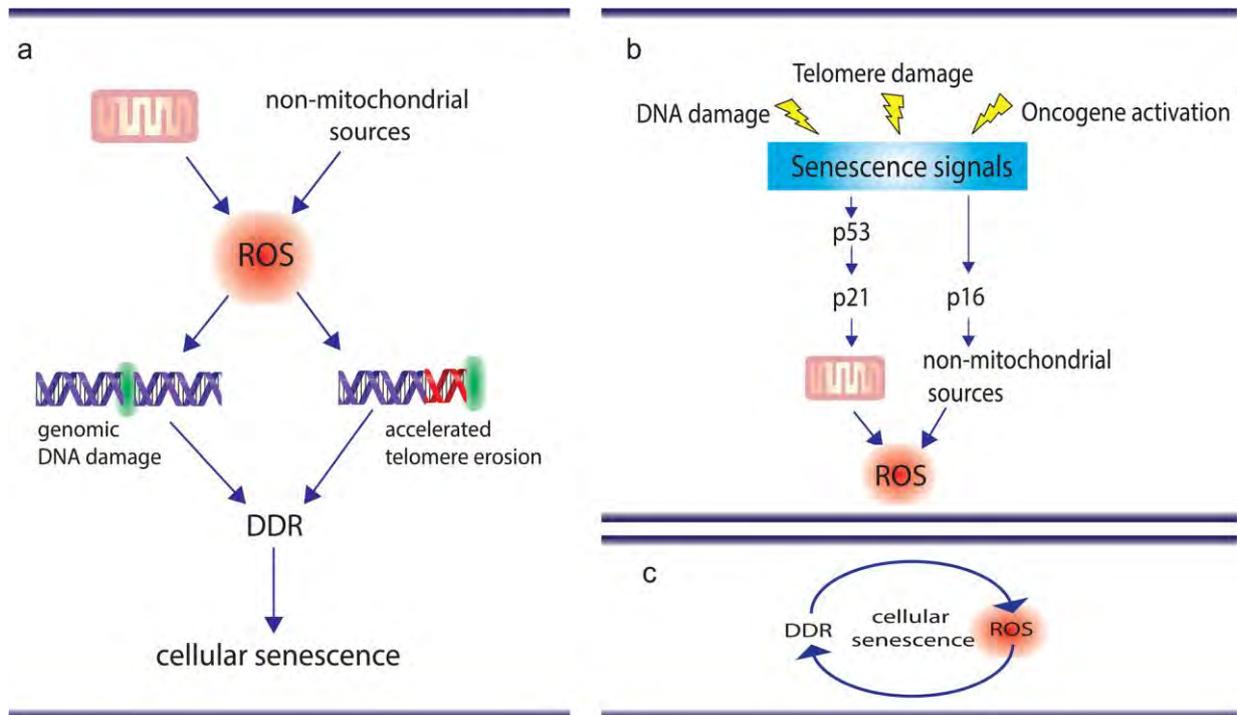
Depuis plusieurs années, de nombreux travaux ont montré l'existence d'une augmentation du stress oxydant avec l'âge à l'origine de la théorie du vieillissement par les EROs (Fig.6). Lors du vieillissement, la balance redox est déséquilibrée avec une augmentation des EROs et une diminution des capacités antioxydantes (54–57). 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 (58).



**Figure 7: Représentation schématique du lien entre ROS et sénescence.**

Source : Figure tirée de Lu T. and Finkel T., 2008 (54)

Le stress oxydant joue également un rôle majeur dans les mécanismes de sénescence (59,60). Celui-ci participe aux dommages à l'ADN et aux télomères, conduisant ainsi à l'activation de la DDR (Fig.7a). La DDR conduisant elle-même à la production d'EROs, elle va également entretenir ce phénomène (Fig.7c). Ceci permet de renforcer les signaux de sénescence au niveau cellulaire (61). Le stress oxydant va également induire des dommages au niveau des mitochondries, augmentant d'autant plus la production d'EROs (62). Enfin, les EROs, en tant que messager cellulaire, vont participer à l'induction de l'apoptose (Fig.7b) (63). Par exemple, certains suppresseurs de tumeurs, tel que p53, produisent des EROs nécessaires à leur signalisation. Comme nous avons vu, une surexpression de p53 est anti-mitogène et pro-apoptotique, elle va également générer des EROs intracellulaires. Cette production est indispensable à l'activité de p53 ; en effet, lorsqu'elle est supprimée, l'effet pro-apoptotique de p53 est diminué (64).



**Figure 8: Différents mécanismes mettant en jeu les EROs (ROS) au cours de la sénescence.**  
Source : Figure tirée de Correia-Melo et al., 2014 (60)

- (a) Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par des sources mitochondriales et non mitochondriales peuvent induire des dommages à l'ADN génomique et accélérer le raccourcissement/endommagement des télomères, les deux phénomènes contribuant à l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR).
- (b) Les EROs peuvent jouer un rôle de molécules de signalisation au cours de la sénescence. L'activation de "signaux de sénescence" conduit à une augmentation de la production d'EROs (mitochondriale et non mitochondriale). Les EROs jouent un rôle dans de nombreuses voies de signalisation qui pourrait favoriser l'arrêt du cycle cellulaire induit par la sénescence.
- (c) Lien simplifié entre les EROs et les dommages de l'ADN. Le raccourcissement des télomères ou les dommages de l'ADN déclenchent une DDR qui conduit à une production d'EROs. Cette production d'EROs conduit à d'avantage de dommages de l'ADN, renforce la DDR et favorise l'entrée en sénescence de la cellule.

#### d. Modification du sécrétome

Une des modifications les plus importantes survenant au cours de la sénescence, est la modification du sécrétome de la cellule. En effet, la cellule sénescence va acquérir un phénotype sécrétoire spécifique dénommé en anglais « *senescence-associated secretory phenotype* » (SASP). Celui-ci va jouer un rôle majeur dans les communications intercellulaires au cours de la sénescence (65). Cette acquisition du SASP concerne toutes les cellules entrant en sénescence, que celles-ci soient sécrétantes par nature ou non. Ainsi des cellules non sécrétantes en temps normal peuvent acquérir un phénotype sécrétant au cours de la sénescence.

Le SASP est constitué de trois grandes catégories de protéines (66):

- Des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires, telles que IL-1, IL-6, IL-8 ou TGF-  $\beta$
- Des métalloprotéases (MMP pour *matrix metalloproteinase*) régulatrices de la matrice extracellulaire, ainsi que des inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAI-1)
- Des facteurs de croissances, comme l'HGF (*hepatocyte growth factor*), l'EGF (*epidermal growth factor*) ou le VEGF (*vascular endothelial growth factor*)

Le SASP a une activité autocrine mais également paracrine. Au niveau autocrine, le SASP va stimuler la production des autres éléments du SASP, ainsi que la progression de la sénescence de la cellule (67). Au niveau paracrine, l'activité pro-inflammatoire du SASP va permettre de recruter les cellules inflammatoires résidentes du tissu cardiaque, et favoriser l'élimination des cellules sénescents par le système immunitaire (68). Le SASP va également jouer un rôle dans le remodelage tissulaire, principalement via ses MMP (69). Enfin, le SASP pourrait également favoriser l'entrée en sénescence des cellules avoisinantes par un effet de voisinage, ou effet *bystander*, conduisant à la création du concept de « *bystander senescence* » (70).

L'expression du SASP est principalement due à la DDR. En parallèle, p38MAPK active également le SASP, mais de façon indépendante de la DDR (71). A l'inverse, p53 aurait un rôle régulateur en inhibant le SASP (72).

#### ***e. Autres changements survenant au niveau cellulaire***

Lors de la sénescence, de nombreuses autres modifications vont survenir au niveau cellulaire. Le lien entre ces différentes modifications et les mécanismes y conduisant n'ont pas encore été entièrement éclaircis à l'heure actuelle.

L'un des marqueurs de sénescence les plus couramment utilisés à l'heure actuelle est la *senescence-associated  $\beta$ -galactosidase* (SA- $\beta$ -Gal) (73). Ce marqueur est spécifique des cellules sénescents, et son taux augmente régulièrement au cours de la sénescence. L'expression de la SA- $\beta$ -Gal est due à un blocage de l'activité lysosomale et une dysfonction de l'autophagie au cours de la sénescence (74).

Un des phénomènes couramment observé au cours de la sénescence, est l'hypertrophie cellulaire (75,76). En effet, l'arrêt du cycle cellulaire n'implique pas l'arrêt de la croissance cellulaire. Au contraire, entre l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose effective de la cellule, la

synthèse protéique de celle-ci va se poursuivre. Du fait de l'augmentation du contenu protéique de la cellule, et de l'absence de division de celle-ci, on va observer une hypertrophie cellulaire. Ce phénomène est d'autant plus accentué que le SASP peut également contenir divers facteurs de croissance qui, par effet autocrine ou paracrine, vont stimuler l'hypertrophie de la cellule.

Mais les mécanismes conduisant à l'entrée en sénescence sont multiples et de nombreux restent encore mal connus à ce jour.

Par exemple, l'un d'entre eux impliquerait l'angiotensine II. Celle-ci pourrait conduire à une sénescence prématurée des cellules via un mécanisme impliquant p53 et p21 (77). Cet effet pourrait passer par le récepteur à l'angiotensine II de type 1 (AGTR1), car une étude a montré que l'inhibition de ce récepteur à l'angiotensine permet d'augmenter l'espérance de vie des souris (78).

## *f. Conclusion*

Nous avons vu que les mécanismes mis en jeu au cours de la sénescence étaient multiples. Les voies de signalisations impliquées dans ces différents mécanismes sont également nombreuses. Ces voies de sénescence, bien qu'interconnectées, ne sont pas toutes systématiquement présentes. Ceci rend d'autant difficile la compréhension du phénomène de sénescence cellulaire.

De ces différentes études, il ressort tout de même quatre principaux phénomènes caractéristiques de la sénescence (79–82):

- 1) Lésions de l'ADN : une accumulation des dommages à l'ADN est observée au niveau nucléaire, mais également mitochondrial, conduisant à l'activation des voies de dommages de l'ADN, faisant notamment intervenir p21, Gadd45 ou p38MAPK.
- 2) Arrêt du cycle cellulaire et surexpression de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs tels que p15, p16, p19, p27 ou p53.
- 3) Modification du sécrétome avec acquisition d'un phénotype sécrétant (= SASP) : les cellules sénescents vont notamment sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme TGF- $\beta$ , IL-6 ou IL-8.
- 4) Apparition d'une hypertrophie cellulaire : augmentation de la taille des cellules due, en partie, à une augmentation de la synthèse protéique.

## 2. Rôles et conséquences de la sénescence

De nombreuses études ont essayé d'analyser le rôle physiologique de ce phénomène de sénescence. S'agit-il d'un mécanisme uniquement délétère pour l'organisme ? Et si oui, pourquoi un tel mécanisme s'est-il développé en premier lieu ? De plus, la sénescence cellulaire peut-elle donc être considérée comme une pathologie en tant que telle ?

Comme nombres de mécanismes cellulaires au sein de l'organisme, la réponse va dépendre de l'intensité dudit mécanisme. Ainsi, une sénescence modérée aura des effets bénéfiques sur l'organisme, mais à contrario, une sénescence trop importante conduira à des effets délétères sur celui-ci (Fig.7) (83–85).

### a. *Effets bénéfiques de la sénescence cellulaire*

Au fil du temps, toutes les cellules subissent des lésions, que ce soit au niveau de leur ADN, de leurs mitochondries ou de leurs différents organelles et protéines cellulaires. Ces lésions, si non contrôlées, peuvent conduire à des défauts de fonctionnement de l'organe et être potentiellement oncogéniques.

La première ligne de défense de l'organisme, contre ces lésions, sera les divers mécanismes de réparation, qui viseront à corriger ces lésions. Toutefois, pour des cellules âgées, la quantité de lésions sera trop importante pour pouvoir être réparées. C'est ici qu'entre en jeu le phénomène de sénescence.

Tout d'abord, en activant divers gènes suppresseurs de tumeurs, tels que p16<sup>Ink4a</sup>, p15<sup>Ink4b</sup> ou p53 (38,86), la sénescence conduit à l'arrêt du cycle cellulaire, et permet de lutter contre la réplication des cellules âgées ayant des lésions de l'ADN. Ceci évite la transmission de mutations délétères aux cellules filles et bloque le potentiel oncogénique de ces cellules endommagées (38,87,88).

Egalement, en stimulant le système immunitaire, notamment par l'intermédiaire du SASP, la sénescence va contribuer à l'élimination des cellules sénescents de l'organisme, permettant ainsi de lutter contre la perte de fonction de l'organe ou du tissu, du fait de l'accumulation de ces cellules défaillantes (89).

Ainsi, à un niveau modéré, le phénomène de sénescence est un mécanisme bénéfique pour l'organisme. En effet, en stoppant la multiplication des cellules âgées endommagées, et en favorisant leur élimination par le système immunitaire, la sénescence cellulaire va

présenter, d'une part, un effet suppresseur de tumeur, et d'autre part, permettre le maintien de l'activité de l'organe, en épurant les cellules ne fonctionnant plus ou mal.

### ***b. Effets délétères de la sénescence cellulaire***

Au fur et à mesure du vieillissement, le nombre de cellules entrant en sénescence va augmenter. En parallèle, les fonctions physiologiques de l'organisme vont progressivement diminuer, notamment l'activité du système immunitaire. Ceci va avoir pour conséquence une diminution de la clairance, par l'organisme, des cellules sénescents.

Ces deux phénomènes conjugués vont conduire à une accumulation importante des cellules sénescents au sein des différents organes et tissus de l'organisme (90). Cette accumulation de cellules sénescents va conduire à une perturbation de la structure des tissus, ainsi que du fonctionnement des organes. En effet, avec l'âge, le stock de cellules embryonnaire va diminuer, et les cellules sénescents entrant en apoptose seront de moins en moins remplacées. Ceci va mécaniquement conduire à une diminution du nombre de cellules fonctionnelles de l'organe et donc de sa fonction. Egalement, les cellules fonctionnelles vont avoir tendance à être remplacées par des cellules non fonctionnelles, c'est typiquement le cas lors de la formation de fibrose au niveau des différents tissus (91,92).

Plusieurs études ont ainsi démontré que cet excès de cellules sénescents conduit à l'expression de nombreuses pathologies (5,84,85).

Cet effet délétère des cellules sénescents a notamment été démontré dans l'étude de 2011 de Baker *et al.* (93). Dans cette étude, Baker et son équipe ont analysé les effets d'une élimination des cellules sénescents exprimant p16<sup>Ink4a</sup>, chez des souris transgéniques présentant un profil progéroïde. L'apoptose chimio-induite de ces cellules sénescents permet de retarder l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement chez les souris jeunes, principalement celles touchant les tissus musculaires, adipeux, et les yeux. Chez les souris âgées, cette clairance des cellules sénescents permet de ralentir la progression de ces pathologies. Cependant, l'espérance de vie des souris n'était pas améliorée, car certaines pathologies, notamment cardiaques, n'étaient pas corrigées. Il faut noter que le cœur n'exprimait que faiblement ces cellules sénescents surexprimant p16<sup>Ink4a</sup>, ce qui peut expliquer le manque d'effet du traitement sur les pathologies cardiaques durant l'expérience. Plus intéressant encore, en 2016 l'équipe de Baker a montré que la clairance des cellules surexprimant p16<sup>Ink4a</sup>, chez des souris WT permettait également de retarder l'apparition de pathologies liées au vieillissement ainsi que de tumeurs (94). A la différence des souris

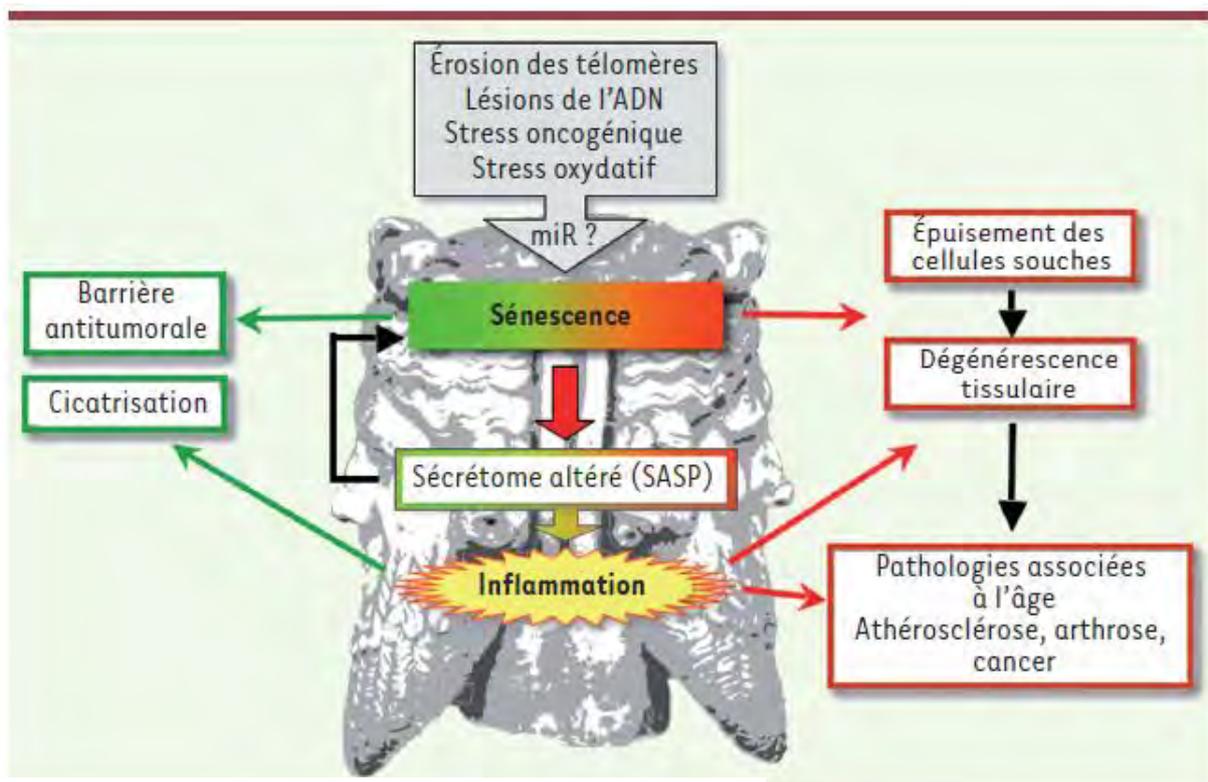
transgéniques, la suppression des cellules sénescents a permis d'augmenter l'espérance de vie des souris WT. Egalement les souris âgées traitées ont présenté une hypertrophie cardiaque moindre que les souris non traitées. Ceci semble donc démontrer le rôle important des cellules sénescents dans le remodelage cardiaque au cours du vieillissement.

Ces données posent la question de l'utilisation de la clairance des cellules sénescents en thérapeutique, et du rôle que ce procédé pourrait jouer dans la prévention et le traitement des pathologies liées au vieillissement (95).

Nous avons vu que le SASP, par son activité pro-inflammatoire, présentait un effet anti-tumoral. Mais, de façon paradoxale, le SASP présente également un effet pro-tumoral. En effet, en sécrétant des facteurs de croissance, des cytokines pro-inflammatoires ou des métalloprotéases, le SASP va favoriser la croissance tumorale ainsi que la diffusion métastatique (96).

Egalement, le SASP, du fait de son activité pro-inflammatoire, peut conduire à une réponse inflammatoire chronique chez le sujet âgé, également appelée « *inflammaging* » (97,98). Cette inflammation chronique peut favoriser le développement et la progression de remodelages des organes au cours de pathologies chroniques liées au vieillissement. Notamment, on retrouve un effet profibrotique du SASP, au niveau de la matrice extracellulaire (96).

Enfin, les phénomènes de sénescence cellulaire peuvent être induits ou accélérés par différents facteurs endogènes ou exogènes : stress oxydatif, facteurs métaboliques, agents génotoxiques (99). On parle alors de « sénescence prématurée induite par le stress » (SIPS) (100,101). Cette SIPS va prédisposer les individus à un vieillissement accéléré, ainsi qu'à un développement précoce de maladies chroniques associées au vieillissement.



**Figure 9: Conséquences de la sénescence.**

Source : Figure tirée de Brondello et al., 2012 (83)

## C. Sénescence cardiaque

### 1. Sénescence répllicative et sénescence post-mitotique

Pendant de nombreuses années, la sénescence cellulaire a été définie comme un arrêt permanent du cycle et de la prolifération cellulaire. Les cellules ne se multipliant pas, comme les neurones ou les cardiomyocytes, ne semblaient donc pas concernées par le phénomène de sénescence. Cependant, il est devenu clair, ces dernières années, que la sénescence ne se limite pas uniquement à une perte de la capacité répllicative de la cellule, mais qu'elle comprend également des changements au niveau du métabolisme cellulaire, de l'expression des gènes ainsi que de la synthèse protéique.

Récemment, un phénotype sénescence a été observé chez les neurones. Ces cellules, qui sont en phase post-mitotique, ne semblaient pas sujettes aux phénomènes de sénescence. Cependant, de récentes études ont retrouvé de nombreux marqueurs de sénescence au niveau de ces cellules (102). Ainsi, une surexpression de nombreux oncogènes tel que p21 ou p53 a été observée (103,104). Egalement, chez ces cellules qui ne sont pas sécrétantes *per se*, a été observé l'acquisition d'un SASP au cours du vieillissement (105). Enfin, certains marqueurs spécifiques de la sénescence, tel que la SA- $\beta$ -Gal, étaient également surexprimés au sein de ces neurones âgés (106). Ces découvertes ont prouvées que ces cellules, qui ne se multiplient plus, subissent pourtant des phénomènes de sénescence.

Suite à cette découverte, la notion de sénescence a grandement évoluée. Désormais celle-ci est divisée en deux grands types qui, loin d'être opposés, se révèlent complémentaires. Ainsi, on distingue désormais :

- La sénescence répllicative : qui est la sénescence qui touche les cellules en phase répllicative, et qui se traduit principalement par un arrêt du cycle cellulaire.
- La sénescence non répllicative ou post-mitotique : qui est la sénescence qui touche les cellules en phase post-mitotique, et qui sera plus marquée par les modifications au niveau du sécrétome ou de l'expression génique.

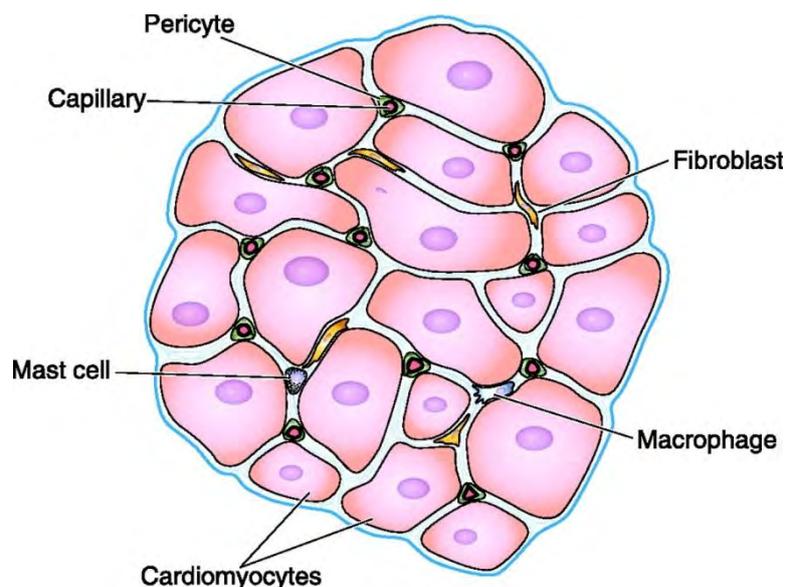
Pendant longtemps, les télomères n'ont pas été impliqués dans la sénescence post-mitotique. En effet, dans ce type de sénescence, les télomères ont déjà atteint leur longueur minimale et ne sont pas « régénérés » par la télomérase. Pourtant, il a récemment été montré que les télomères jouent un rôle clés dans la sénescence post-mitotique, ainsi que dans la SIPS, en participant à la DDR (29,107).

Un organe est généralement constitué d'un grand nombre de types cellulaires différents. L'expression protéique et l'activité enzymatique au sein de ces différentes classes de cellules est également différent. Au niveau cardiaque, ces types cellulaires sont habituellement classés en deux grandes catégories :

- Les cellules impliquées dans l'activité contractile du cœur, tel que les cardiomyocytes ou les cellules cardionectrices; ce sont les cellules fonctionnelles du cœur.
- Le stroma, qui regroupe des familles cellulaires variées, que ce soit des cellules immunitaires résidentes, des cellules du tissu conjonctif, comme les fibroblastes, mais également des cellules progénitrices ou des cellules musculaires lisses.

L'IC est principalement dû à un défaut fonctionnel des cardiomyocytes qui ne peuvent plus se contracter correctement, ou qui se retrouvent en trop faible nombre pour assurer une activité contractile suffisante.

Dans le cœur, les phénomènes de sénescence concernent aussi bien les cellules directement impliquées dans l'activité contractile cardiaque, notamment les cardiomyocytes, que les cellules du stroma. Les cardiomyocytes, les cellules cardionectrices et les cellules du tissu de conduction sont des cellules post-mitotiques et de ce fait sont concernées par une sénescence post-mitotique. Les fibroblastes, les cellules progénitrices et les cellules musculaires lisses sont des cellules à potentiel prolifératif et sont plutôt caractérisées par une sénescence répliquative. En revanche, le SIPS peut toucher tous les types cellulaires présents au niveau cardiaque.



**Figure 10: Structure du tissu cardiaque.**

Source : Figure tirée de Frangogiannis et al., 2012 (108)

## 2. Sénescence des cardiomyocytes

Ces différentes modifications structurales survenant au cours du vieillissement du cœur, tendent à prouver qu'il existe une sénescence au niveau cardiaque. On peut logiquement supposer que les cardiomyocytes, tout comme les neurones, subissent également une sénescence post-mitotique. Cependant, à l'heure actuelle, nous ne disposons que de peu de données sur le sujet.

Les études actuelles ne permettent pas de savoir avec certitude si la DDR joue un rôle dans la sénescence des cardiomyocytes. Une surexpression de p53, mais également de p21 et p27, a notamment été relevée (109), mais du fait des nombreux rôles de la protéine p53 au niveau cellulaire, il est difficile de savoir si cette surexpression est due à la DDR.

Les cardiomyocytes étant des cellules post-mitotiques, la sénescence ne peut pas être initiée par un raccourcissement des télomères, cependant, ceux-ci pourraient jouer un rôle en initiant la DDR. Egalement, il a été récemment montré que les télomères pourraient jouer un rôle dans la sénescence des cardiomyocytes en diminuant la biogénèse des mitochondries, mais également en augmentant les dysfonctions mitochondriales et, de ce fait, le stress oxydant (110,111). Cette dysfonction mitochondriale semble jouer un rôle prépondérant dans la sénescence des cardiomyocytes (112,113). Ceci peut s'expliquer en partie par la richesse en mitochondries de ces cellules.

L'hypertrophie des cardiomyocytes s'accompagne logiquement d'une augmentation des marqueurs de l'hypertrophie. L'un des plus présents est la *β-Myosin Heavy Chain* (β-MHC) (114). Cette protéine, principal constituant de la myosine, joue un rôle majeur dans la contraction cardiaque. Celle-ci existe sous deux isoformes : l'α-MHC et la β-MHC. Chez le rat et la souris, l'isoforme α-MHC est majoritaire chez l'adulte. Lors du vieillissement, l'expression de l'isoforme β-MHC va progressivement croître jusqu'à se retrouver majoritaire chez les individus âgés. Chez l'humain à l'inverse, l'isoforme β-MHC est majoritaire tout au long de la vie, bien qu'une augmentation de son expression soit également observée au cours du vieillissement (115).

Mais la sénescence des cardiomyocytes est encore mal connue à ce jour, et des études expérimentales sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans ce phénomène.

### 3. Problématique des marqueurs de sénescence actuels

Une autre problématique de l'étude de la sénescence est le manque de biomarqueurs spécifiques de celle-ci. Pour pallier ce manque, différents marqueurs ont été proposés, au cours de ces dernières années, afin de suivre les phénomènes de sénescence cellulaires et systémiques. Cependant, ces biomarqueurs ne sont ni spécifiques du vieillissement, ni spécifiques du tissu concerné (107).

Ainsi, certains marqueurs du cycle cellulaire, comme p53 ou p16, sont exprimés lors de l'apoptose, que celle-ci soit due ou non au processus de sénescence (116). Ceux-ci sont également surexprimés lors de cancers (86).

A l'inverse, la SA- $\beta$ -Gal, un autre marqueur, habituellement utilisé comme marqueur de la sénescence, est retrouvée presque exclusivement au sein des cellules sénescents (117). Cependant, cela n'est pas le cas au sein des cardiomyocytes sénescents où les niveaux de SA- $\beta$ -Gal restent constants.

Enfin, les marqueurs de l'hypertrophie comme la  $\beta$ -MHC, sont présents dans tous les types d'hypertrophie, que celle-ci soit due à la sénescence, ou à une pathologie comme l'IC (115).

La recherche de nouveaux marqueurs de la sénescence est primordiale afin de permettre l'étude de celle-ci, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Ces marqueurs permettront d'obtenir une meilleure connaissance des voies de signalisation et des mécanismes à l'origine de la sénescence myocardique. A terme, ils pourraient également permettre le diagnostic de sénescences pathologiques, telle que la SIPS, chez l'être humain, ou d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

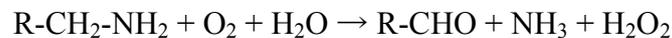
# III. La Monoamine Oxydase

---

## A. Généralités

La monoamine-oxydase (MAO) est une enzyme mitochondriale qui catalyse la déamination oxydative d'amines, aussi bien endogènes, comme certains neurotransmetteurs et de certaines hormones, qu'exogènes telles que des amines alimentaires. Parmi ces multiples substrats, on retrouve les indolamines comme la sérotonine (5-hydroxytryptamine ou 5-HT) et la tryptamine ; les catécholamines comme la dopamine (DA), l'adrénaline et la noradrénaline (NA) ; ou encore les composés chimiques organiques comme la bêta-phényléthylamine (PEA) et la tyramine. Elle joue donc un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie des monoamines et catécholamines endogènes en contrôlant leurs concentrations, notamment au niveau du système nerveux. Elle intervient également dans la détoxification de composés exogènes, notamment par le métabolisme des monoamines alimentaires (118).

La MAO catalyse une réaction chimique dite de « désamination oxydative ». Cette réaction enzymatique va permettre, par oxydation, le départ du groupement amine du substrat :



Cette réaction conduit à la formation d'un aldéhyde qui sera à son tour oxydé en acide par une aldéhyde déshydrogénase (ALDH) ou transformé en alcool ou glycol par une aldéhyde réductase (ALR). Ces réactions sont source d'espèces réactives comme l'ammoniaque et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (119,120).

Il existe deux isoformes de cette enzyme : la MAO-A et la MAO-B. Historiquement, ces deux isoformes ont été différenciées par la sélectivité de certains inhibiteurs à bloquer l'une ou l'autre des deux formes : la clorgyline bloquant la MAO-A (121) et le déprényl étant spécifique de la MAO-B (122,123). Ces deux isoformes de la MAO possèdent également des localisations, ainsi que des affinités pour chacun des substrats, différentes. Ainsi, la MAO-A a une forte affinité pour la sérotonine, l'adrénaline et la NA, tandis que le substrat préférentiel de la MAO-B est la PEA (124,125). Le métabolisme de la DA et de certaines amines comme la tryptamine et la tyramine est, quant à lui, commun aux deux isoformes (126,127).

La MAO est localisée au niveau de la membrane externe des mitochondries des cellules de l'organisme. Cette enzyme est présente de façon ubiquitaire dans l'organisme (128). Très présente dans le cerveau notamment dans l'hypothalamus et les noyaux gris (striatum), on la retrouve aussi dans les tissus périphériques comme le foie, le duodénum, le pancréas, la glande surrénale ou encore le cœur. Mais selon le tissu ou l'organe concerné, la répartition des isoformes peut varier (Fig.7).

La répartition des deux isoformes de la MAO, a été principalement étudiée au niveau du cerveau. Chacune des deux isoformes est localisée dans des zones distinctes de celui-ci. Ainsi, 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. La MAO-B, à l'inverse, est l'isoforme la plus abondante dans les neurones sérotoninergiques et histaminergiques ainsi que dans les cellules gliales. De fortes concentrations de MAO-B sont également retrouvées dans le raphé (124,129).

Au niveau des tissus périphériques, l'expression des deux isoformes de la MAO sera beaucoup plus ubiquitaires, mais la proportion de chaque isoforme pourra varier (130–132). Ainsi, chez l'adulte, la MAO-A est exprimée de façon majoritaire au niveau du placenta, où elle est la seule isoforme exprimée (133), du pancréas, de la thyroïde, ou des glandes surrénales (134). La MAO-B, à l'inverse, est la seule isoforme présente au niveau des plaquettes ou des lymphocytes. Elle est également fortement exprimée au niveau rénal ou hépatique (135).

Mais l'expression protéique d'une isoforme n'est pas forcément corrélée à son activité enzymatique au sein de la cellule. Ainsi, la MAO-A est majoritairement active dans le foie, les reins et les glandes surrénales. Elle est également fortement active au niveau du cœur, des poumons et de l'intestin. A l'exception des muscles squelettiques, la MAO-B présente une activité plus faible au niveau des tissus périphériques. En effet, la plupart des tissus périphériques présentent une activité de la MAO-A plus importante que celle de la MAO-B, malgré leur expression généralement équivalente ; c'est l'inverse de ce qui peut être observé au niveau du cerveau, où la MAO-B est l'isoforme la plus active.

Cette différence entre le taux d'expression et l'activité enzymatique des deux isoformes peut s'expliquer, en partie, par le fait que la MAO-A présente une affinité beaucoup plus importante que la MAO-B pour les principaux substrats utilisés, à l'exception du PEA (136). Ainsi, l'expression ou non de la MAO au niveau d'un tissu ne s'accompagnera pas forcément d'une activité enzymatique, ni d'un éventuel impact *in vivo*.

Tissue and cell type	MAO-A protein	MAO-B protein
<b>Liver</b>		
Hepatocytes	++	+++
Bile ducts cells	++	++
<b>Duodenum</b>		
Enterocytes of villi	+++	+++
Cryptive cells	+++	+++
Muscularis mucosa	++	++
Submucosal cells	+	+
Muscularis externa	++	++
<b>Exocrine pancreas</b>		
Acinar cells	++	-
Centroacinar cells	++	+
Duct epithelial cells	++	++
<b>Adrenal gland</b>		
Capsule	+	-
Interstitial cells	+	-
Cortical secretory cells	+	+
Medullar secretory cells	-	-
<b>Blood vessels</b>		
Endothelial cells	-/+	-/+
Media	-	-
Fibroblasts	+	+
Adventitia	+	+
<b>Placenta</b>		
Syncytiotrophoblasts	+++	-
Intermediate trophoblasts	+++	-
<b>Heart</b>		
Cardiomyocytes	++	+
Myocardial capillaries	+	+
<b>Kidney</b>		
Bowman's capsule	-/+	-/+
Glomerulus	-/+	-/+
Loop of Henle	++	+++
Proximal tubes	++	+++
Distal tubules	++	+++
Collecting tubules	++	-/+
<b>Endocrine pancreas</b>		
$\alpha$ -Cells	-	++
$\beta$ -Cells	++	-
<b>Thyroid gland</b>		
Follicular cells	++	-/+
Parafollicular cells	++	-/+
<b>Lungs</b>		
Bronchiole/alveolar smooth muscle	++	++
Epithelial cells	++	++
Alveolar pneumocytes	++	++
<b>Blood cells</b>		
Peripheral lymphocytes	-	+
Platelets	-	+

*Key to scoring:* -: no antibody labelling detected; -/+: very weak labelling; +: weak labelling; ++: moderate labelling; +++: strong labelling.

**Tableau 2 : Localisation de la MAO-A et de la MAO-B chez l'homme dans les tissus périphériques.**  
(d'après Billet (132) )

## B. La MAO : cible thérapeutique ?

### 1. Pathologies dues à la MAO

La sur ou la sous-expression de la MAO peut conduire à un grand nombre de pathologies. Les mieux connues à ce jour restent les maladies neurologiques liées à la MAO. En effet, une sur- ou une sous-activité de la MAO conduit à un déséquilibre dans la production ou la dégradation des catécholamines et de la sérotonine, ce qui impacte de façon importante le système nerveux central.

Ainsi parmi les pathologies liées à une sous-expression de la MAO, on retrouve principalement des mutations génétiques inactivantes. Parfois ces mutations impactent les deux isoformes de l'enzyme, c'est notamment le cas dans le syndrome de Norrie. Ces mutations 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 (125,137–143). La MAO-A 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) (144–146).

A l'inverse, un certain nombre de pathologies sont liées à une surexpression de l'enzyme. Ainsi, au niveau du cerveau, le niveau d'expression de la MAO-B est faible à la naissance. Il augmente ensuite progressivement pour atteindre rapidement un plateau, avant de ré-augmenter au cours de la sénescence (124,147–149). 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' $H_2O_2$  d'autre part. C'est par ces deux voies que la MAO-B serait également associée à la perte des neurones dopaminergiques du locus niger, dans la maladie de Parkinson (150,151).

## 2. Traitements ciblant la MAO

La principale classe thérapeutique ciblant la MAO est celle des inhibiteurs de la MAO (IMAO). Celle-ci est utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson, ainsi que dans la dépression. En effet, en inhibant la MAO, ces molécules permettent de diminuer la dégradation de la dopamine et de la sérotonine par celle-ci et permettent ainsi de réaugmenter les taux de ces neurotransmetteurs au niveau du cerveau.

Ces inhibiteurs peuvent : soit être sélectifs d'une isoforme de l'enzyme, et inhiber spécifiquement la MAO-A ou la MAO-B ; soit être non sélectifs et inhiber indifféremment les deux isoformes de l'enzyme. Dans le traitement de la dépression, sont utilisés aussi bien des IMAO non sélectifs, que des IMAO sélectifs de la MAO-A, du fait de son rôle prépondérant dans le métabolisme de la 5-HT. Dans la maladie de Parkinson à l'inverse, seul les IMAO sélectifs de la MAO-B sont utilisés ; celle-ci métabolisant majoritairement la dopamine, qui joue un rôle central dans le développement de la maladie (152,153).

	Sélectivité	Réversibilité	Indication
<i><b>IMAO non sélectifs</b></i>			
<b>Iproniazide (Marsilid)</b>	A+B	Irréversible	<i><b>Dépression</b></i>
<b>Phénelzine (Nardil, Nardelzine)</b>	A+B	Irréversible	
<b>Tranylcypromide</b>	A+B	Irréversible	
<b>Isocarboxazide</b>	A+B	Irréversible	
<b>Nialamide</b>	A+B	Irréversible	
<b>Iproclozide</b>	A+B	Irréversible	
<i><b>IMAO sélectifs</b></i>			
<i>Clorgyline</i>	A	Irréversible	<i><b>Dépression</b></i>
<b>Moclobémide (Moclamine)</b>	A	Réversible	
<i>Brofaromide</i>	A	Réversible	
<i>Toloxatone</i>	A	Réversible	
<b>Sélégiline (Déprényl)</b>	B	Irréversible	<i><b>Parkinson</b></i>
<b>Rasagiline (Azilect)</b>	B	Irréversible	
<i>Lazabémide</i>	B	Réversible	

**Tableau 3 : Inhibiteurs réversibles et irréversibles des monoamines oxydases utilisés ou ayant été utilisés en médecine** (en gras, les inhibiteurs encore utilisés en thérapeutiques en 2016)

Cependant, l'inhibition de la MAO n'est pas sans conséquence. Les premiers IMAO mis sur le marché étaient des inhibiteurs irréversibles et non sélectifs des MAO. Ils présentaient de nombreux effets indésirables comme une hépatotoxicité ou de nombreuses interactions avec

les autres antidépresseurs, notamment tricycliques. Mais l'effet indésirable le plus connu des IMAO irréversibles reste le « Cheese effect » ou « Effet fromage ». Cet effet indésirable survient lors d'apport alimentaire important en tyramine, notamment lors de la consommation de fromage, mais cet effet indésirable est également rencontré avec tous les aliments riches en tyramine, tel que la charcuterie, le chocolat ou les boissons alcoolisées. Du fait de l'inhibition des MAO digestives, cette tyramine va pouvoir passer directement dans la circulation générale sans être dégradée. Cette arrivée massive de tyramine va provoquer une crise hypertensive chez le patient (154). Cette crise hypertensive va se traduire par une hypertension brutale et importante, des céphalées ainsi que des troubles du rythme cardiaque. De plus, cette crise hypertensive peut parfois se révéler létale (155).

Cet effet indésirable est particulièrement marqué en cas de traitement par des inhibiteurs irréversibles de la MAO. De ce fait, ceux-ci ont été, pour la plupart, retiré du marché. A l'heure actuelle, la majorité des IMAO sont des inhibiteurs réversibles de la MAO, ou des inhibiteurs sélectifs d'une isoforme, ce qui permet de maintenir partiellement une dégradation des amines d'origine alimentaire. La MAO-A étant l'isoenzyme à l'activité majoritaire au niveau périphérique, les IMAO-B sont relativement dépourvus d'effets indésirables à ce niveau-là, et notamment, ils ne provoquent pas de crise hypertensive (122,156,157).

### **C. MAO-A, stress oxydant et sénescence cardiaque**

Nous avons vu que les deux isoformes de la MAO sont présentes au niveau périphérique, et notamment au niveau cardiaque. Cependant, il existe de grandes variations inter-espèce quant à la distribution de ces deux isoformes. Ainsi, chez le rat, la MAO-A prédomine au niveau des cardiomyocytes. A l'inverse, chez la souris, c'est l'isoforme MAO-B qui est prédominante au niveau cardiaque. Chez l'homme, les expressions des deux isoformes sont équivalentes (132,158–160).

De nombreuses études ont montré une augmentation de l'expression et de l'activité de la MAO au cours de la sénescence, que ce soit au niveau du cerveau (161,162), mais également au niveau cardiaque. Ainsi, chez le rat, l'activité de la MAO-A cardiaque augmente de façon importante au cours du vieillissement, atteignant à 24 mois 9 fois le niveau constaté à 1 mois (163,164). Mais cette augmentation n'est pas aussi marquée chez toutes les espèces. Ainsi chez la souris, l'augmentation de l'expression de la MAO-A au niveau cardiaque reste plus

modérée que chez le rat (165). A l'heure actuelle, on connaît encore mal les mécanismes à l'origine de cette augmentation de l'expression de la MAO-A au cours de la sénescence. Cependant, l'augmentation de l'expression de l'ARNm tend à prouver que des mécanismes géniques seraient en jeu. Ainsi, la surexpression de la MAO-A pourrait, notamment, être induite par p38MAPK, suite à son activation durant la sénescence (166).

Au cours du vieillissement au niveau du cœur, et en parallèle de l'augmentation de l'expression de la MAO, une augmentation de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi que du stress oxydant est également observée. Comme nous avons vu précédemment, la réaction de désamination oxydative réalisée par la MAO conduit à la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, une espèce réactive de l'oxygène. Il a été effectivement démontré que cette augmentation de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau cardiaque était due à l'augmentation de l'activité de la MAO-A dans cet organe (167,168).

La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la MAO passe nécessairement par la désamination oxydative d'une amine. Au niveau cardiaque, les substrats les plus évidents de la MAO-A sont la noradrénaline (169), mais également l'adrénaline, connue pour être présente au niveau des cardiomyocytes (170). La MAO peut aussi métaboliser la dopamine, également présente au niveau du cœur.

L'activation de la MAO-A est capable, via la génération d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, d'induire une hypertrophie des cardiomyocytes ainsi que de favoriser la survenue d'une IC (171–174). Cette forte production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> engendre également des lésions oxydatives au niveau du cardiomyocyte et notamment de la mitochondrie (167,175,176). Ces lésions oxydatives au niveau de la mitochondrie entraînent une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale et une production encore plus importante d'EROs (177). Dans le myocarde, on observe non seulement une augmentation de la production intracellulaire d'EROs au cours de la sénescence, mais également 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. Ces conditions pourraient participer à la mort par apoptose ou nécrose du cardiomyocyte et ainsi favoriser la transition vers l'IC (178).

A l'heure actuelle, il est encore difficile de connaître exactement le rôle joué par la MAO-A au cours de la sénescence. En effet, nous ne savons pas avec précision quels sont les mécanismes cellulaires qui conduisent à la surexpression de la MAO-A, ni quel est l'impact réel de cette surexpression sur l'initiation et le développement des processus de sénescence.

## Partie II : Etude expérimentale de la sénescence des cardiomyocytes et rôle de la MAO-A

---

## IV. Problématique:

---

Ces dernières années, l'espérance de vie et le nombre de personnes âgées dans le monde n'ont cessé d'augmenter. Le vieillissement étant considéré comme un facteur majeur de risque pour les maladies chroniques, cette augmentation de l'espérance de vie a conduit à une progression importante des pathologies liées au vieillissement, dont notamment l'insuffisance cardiaque.

Afin de prévenir le développement de l'insuffisance cardiaque au cours du vieillissement, physiologique ou pathologique, il est important de mieux comprendre le vieillissement cardiaque, ainsi que ses mécanismes.

Au niveau cardiaque, les phénomènes de vieillissement vont se traduire par une hypertrophie cardiaque, une diminution de la contractilité des cardiomyocytes et une fibrose du myocarde avec l'apparition de cellules sénescents (179).

Le lien entre vieillissement d'un organisme et sénescence cellulaire, ainsi que les mécanismes de la sénescence cellulaire pouvant conduire à des pathologies telles que l'insuffisance cardiaque, restent encore mal connus.

La sénescence cellulaire semble jouer un rôle majeur dans la diminution de la fonction de nombreux organes ainsi que dans l'apparition de nombreuses pathologies (93). Elle est caractérisée par 4 principaux phénomènes (79):

- 1) Lésions de l'ADN : une accumulation des dommages à l'ADN est observée au niveau nucléaire, mais également mitochondrial, conduisant à l'activation des voies de dommages de l'ADN, faisant notamment intervenir p21, Gadd45 ou p38MAPK (45).
- 2) Modification du sécrétome avec acquisition d'un phénotype sécrétant (SASP) : les cellules sénescents vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que TGF- $\beta$  ou Il-6.
- 3) Arrêt du cycle cellulaire et surexpression de nombreux gènes suppresseurs de tumeur comme p15, p16, p19, p27 ou p53 (80).
- 4) Apparition d'une hypertrophie cellulaire : augmentation de la taille des cellules et surexpression de certains marqueurs de l'hypertrophie tel que la  $\beta$ -MHC pour les cardiomyocytes.

Au niveau du cœur, les phénomènes de sénescence concernent aussi bien les cellules impliquées dans l'activité contractile cardiaque (cardiomyocytes) que les cellules du stroma

(fibroblastes, cellules souches/progénitrices, cellules musculaires lisses). Les cardiomyocytes sont concernées par la sénescence post-mitotique, alors que les cellules stromales sont caractérisées par une sénescence réplivative.

Du fait de la présence de ces deux populations cellulaires, la participation des cardiomyocytes dans le vieillissement cardiaque demeure mal comprise. En effet, la plupart des études actuelles sur la sénescence cardiaque porte sur le cœur entier, et non sur une population cellulaire spécifique. Les cardiomyocytes et les cellules stromales subissant deux mécanismes de sénescence différents, il est donc difficile de savoir duquel de ces mécanismes découlent les marqueurs de sénescence observés au niveau du cœur entier.

Jusqu'à présent, peu d'études se sont attachées à étudier la sénescence des cardiomyocytes. En effet, partant du principe que ces cellules étaient déjà en arrêt du cycle et n'étaient pas des cellules sécrétoires, elles ne paraissent pas jouer un rôle majeur dans la sénescence cardiaque. Pourtant, il a été récemment montré que les neurones de souris âgées, des cellules également en phase post-mitotique, présentaient toutes les caractéristiques des cellules sénescents, avec activation de la réponse aux dommages de l'ADN, surexpression des protéines du cycle et acquisition d'un phénotype sécrétoire (103). De ce fait, et les cardiomyocytes étant les cellules majoritaires au niveau cardiaque, leur impact sur la sénescence de cet organe peut être majeur.

Il est donc intéressant de caractériser, de manière spécifique, les cardiomyocytes sénescents.

Les études ont montré que le stress oxydant semble jouer un rôle prépondérant dans ces phénomènes de sénescence (59).

La monoamine oxydase A (MAO-A) est une enzyme présente au niveau des mitochondries. Cette enzyme va réaliser la déamination oxydative des amines biogènes, processus qui conduira à la production de diverses espèces réactives de l'oxygène (ROS), tel que l' $H_2O_2$ , favorisant ainsi le stress oxydant au niveau cellulaire (168).

Compte tenu du rôle de la MAO-A dans la génération du stress oxydant, nous allons étudier son implication dans l'induction du processus de sénescence au niveau des cardiomyocytes.

Au cours de cette étude, nous avons tout d'abord essayé de caractériser le vieillissement cardiaque et notamment les mécanismes de sénescence touchant les cardiomyocytes, du fait de leur rôle prépondérant dans l'activité contractile du cœur. Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre l'impact du stress oxydant généré par la MAO-A dans l'induction de cette sénescence.

## V. Matériel et méthodes:

---

### A. Modèles utilisés :

#### 1. Modèle de vieillissement physiologique :

Nous avons utilisé des souris mâles C57BL6/J âgées de 20 mois comme modèle de vieillissement physiologique. Des souris mâles jeunes, âgés de 3 mois, étaient utilisées comme contrôle. Les souris étaient fournies par Janvier Labs.

#### 2. Modèle de surexpression de la MAO-A cardiaque :

Afin d'étudier le rôle spécifique de la MAO-A dans la sénescence cardiaque, nous avons utilisé des souris transgéniques surexprimant la MAO-A de façon spécifique au niveau des cardiomyocytes, sous le contrôle d'un promoteur de l' $\alpha$ -Myosin Heavy Chain ( $\alpha$ -MHC) (180). Des pathologies cardiaques survenant précocement chez les souris Tg, nous avons utilisé des souris Tg mâles et des souris témoins NTg mâles âgées de 6 semaines, avant la survenue de l'IC.

### B. Prélèvement de cœur entier :

Afin de prélever les cœurs entiers de souris, les souris ont reçu une injection d'héparine 5000 UI/mL (100  $\mu$ L) ainsi qu'une dose létale de pentobarbital (150  $\mu$ L). Le cœur était ensuite prélevé et congelé à -80°C.

### C. Isolement des cardiomyocytes :

Afin d'isoler les cardiomyocytes, les souris ont reçu une injection d'héparine 5000 UI/mL (100  $\mu$ L) ainsi qu'une dose létale de pentobarbital (150  $\mu$ L). Le cœur était ensuite prélevé et l'aorte rapidement canulée sur un système de perfusion rétrograde de type Langendorff. Le cœur était d'abord lavé à l'aide d'une solution de Krebs (NaCl : 7.6g/L ; KCl : 0.4g/L ; MgCl<sub>2</sub> : 133mg/mL ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 56.8mg/mL ; HEPES : 1.2g/L ; Glucose : 1.8g/L ; Taurine : 2.5g/L ; Créatine monohydrate : 1.5g/L ; ajout de NaOH pour obtenir pH=7.3) et ensuite digéré à l'aide d'une solution de libérase (0.1 mg/mL). Une fois suffisamment digéré, le cœur était découpé dans une boîte de pétri, afin de libérer les

cardiomyocytes. La digestion était ensuite stoppée à l'aide d'une solution de BSA (Bovine Serum Albumin) à 10g/L. Le broyat obtenu était filtré, à l'aide d'un filtre de 180 µm, afin de retirer les parties non digérées du cœur. Enfin, les cardiomyocytes étaient séparés des cellules stromales, beaucoup plus légères, par sédimentation. Après retrait du surnageant contenant les cellules stromales, le culot était ensuite, soit repris dans du RNA Stabilization Reagent (RNAlater de chez Quiagen®) + β-mercaptoéthanol 1% et congelé à -80°C avant une analyse génomique ultérieure par RT-PCR, soit congelé tel quel pour une analyse protéique ultérieure, soit mis en culture pour une analyse des activités enzymatiques au niveau des cardiomyocytes.

#### **D. Extraction des ARN :**

Afin d'extraire l'ARN des cœurs entiers ou des cardiomyocytes, nous avons utilisé un kit d'extraction d'ARN *RNeasy* de chez Quiagen®.

Tout d'abord, nous avons ajouté une protéinase K et mis à incuber à 55°C pendant 10 min, pour poursuivre la digestion des tissus et dégrader les protéines présentes dans le lysat, afin d'augmenter le rendement de l'extraction d'ARN. Nous avons centrifugé à 12000 G pendant 3 min à température ambiante.

Le surnageant a été ensuite transféré dans un eppendorf et 0,5 volume d'éthanol 100% ont été ajoutés. Après homogénéisation, le contenu de l'eppendorf a été déposé sur une colonne d'extraction, et centrifugé pendant 30 sec à 8000 G. 350 µL de tampon RW1 ont été ajoutés, et la colonne a été centrifugée 30 sec à 8000 G. 10 µL de DNase I et 70 µL de tampon RDD ont été ensuite déposés sur la colonne et laissés 15 min à température ambiante. 350 µL de tampon RW1 ont été ensuite ajoutés, et la colonne a été centrifugée 30 sec à 8000 G. La colonne a été ensuite rincée à 2 reprises avec 500 µL de tampon RPE et centrifugée 30 sec à 8000 G. Pour éliminer toute trace résiduelle de tampon, la colonne a été ensuite centrifugée pendant 2 min à 10000 G. Enfin, après avoir transféré la colonne sur un tube eppendorf, l'ARN présent sur la colonne a été récupéré après ajout de 40 µL d'H<sub>2</sub>O Rnase free et centrifugation pendant 1 min à 10000 G.

Les ARN ainsi obtenus ont été ensuite dosés par spectrophotométrie sur un NanoDrop® (Thermo Scientific), puis conservés à -80°C.

## **E. Analyse par RT-PCR :**

### **1. Synthèse des ADNc par Reverse Transcriptase :**

Les ARN extraits des cœurs entiers ou des cardiomyocytes isolés, ont été ensuite reverse transcrits en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de chez Applied Biosystems™. Après dosage des ARN extraits, un volume équivalent à 0,4 µg d'ARN a été prélevé pour chaque échantillon, et de l'eau RNase free a été ajoutée pour obtenir un volume final de 13,2 µL. A chaque échantillon ont été ensuite ajouté 2 µL de 10X RT Buffer, 0.8 µL de 25X dNTP Mix à 100 nM, 2 µL de 10X RT Random Primer, 1 µL de RNase inhibiteur, et enfin, 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µL), pour un volume final de 20 µL. Des témoins négatifs RT- ont également été préparés, en suivant le même protocole que précédemment, mais sans ajouter de MultiScribe™ Reverse Transcriptase.

La synthèse d'ADNc a ensuite été effectuée en plaçant les échantillons ainsi préparés dans un thermocycleur Mastercycler® (Eppendorf) et en utilisant le programme suivant : 10 min à 25°C (fixation des hexamères), 60 min à 37°C (élongation), 5 min à 85°C (dénaturation du dimère ADNc/ARN).

### **2. Réalisation de la PCR :**

Après synthèse des ADNc, 40 ng d'ADNc et 8µL de préparation Master Mix (SYBR® Premix Ex Taq 2X, ROX Reference Dye 50X, Primers Forward et Reverse [300 nM]) ont été déposés sur une plaque 384 puits MicroAmp® (Applied Biosystems™) et l'analyse a été réalisée sur un appareil StepOne™ (Applied Biosystems™) permettant de réaliser l'amplification des ADNc selon la séquence suivante : 20s à 95°C (activation de l'enzyme), puis 40 cycles d'amplification de 3s à 95°C (dénaturation des ADNc) et de 30s à 60°C (hybridation des amorces et élongation). L'expression de l'ARNm a été déterminée par la méthode des doubles Ct et normalisée par la GAPDH.

La liste des primers utilisés est présente en annexe (Annexe 5).

## **F. Mesure de l'activité enzymatique de la MAO-A :**

Des culots de cardiomyocytes ont été repris dans du Tampon Phosphate (pH 7,4) et dilués pour obtenir une concentration de 300 µg de protéines/150 µL. 50 µg de protéines ont été répartis dans chaque puits, avant ajout du substrat de la MAO-A (MAO-Glo™ Assay Kit, Promega, France). Le dosage MAO-Glo™ est réalisé en incubant l'enzyme avec un substrat luminogène de la MAO. Le substrat du dosage MAO-Glo™ est un dérivé de luciférine, la [(4S)-4,5-dihydro-2-(6-hydroxybenzothiazolyl)-4-thiazolecarboxylique]. La MAO va métaboliser ce dérivé de la luciférine en méthyl-ester-luciférin. A la fin de la réaction, la « Luciferin detection agent » est ajoutée et va convertir la méthyl-ester-luciférin en luciférine et produire de la lumière. La quantité de lumière produite est directement proportionnelle à l'activité de la MAO. Après l'ajout de la « Luciferin detection agent », la plaque a été mise à incuber pendant 20 min à température ambiante. La luminescence a ensuite été intégrée pendant 1 seconde sur un luminomètre Mithras (Berthold Technologies). L'activité non spécifique a été évaluée en ajoutant de la clorgyline, un inhibiteur de la MAO-A, à une partie des puits.

## **G. Echographies cardiaques :**

Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane à 2% et nous avons effectué une échocardiographie non invasive (Echocardiographe Vivid 7 Ultrasound, GE Healthcare). Les dimensions ventriculaires cardiaques ont été mesurées sur des images en mode TM (Time Motion), avec une moyenne de 5 mesures pour chacune des souris.

## **H. Test de stress oxydant par DCFDA :**

Sur une plaque pour fluorimétrie, préalablement coatée pendant 2h avec de la laminine, ont été déposés 80 µL de cardiomyocytes isolés. 120 µL de milieu de culture ont été ajoutés dans chaque puits. La clorgyline, un inhibiteur irréversible de la MAO-A, a été ajoutée dans les puits concernés, à une concentration finale de 1 µM, 15 min avant l'ajout de la sonde DCFDA. La sonde DCFDA a été ensuite ajoutée dans les puits, à une concentration finale de 5 µM. La plaque a été mise à l'incubateur à 37°C, pendant 60 min. Nous avons ensuite ajouté aux puits concernés, un substrat de la MAO-A, la tyramine, à une concentration finale de 500 µM, ou, en tant que témoin positif une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à une concentration finale de 100 µM. La plaque a été remise à l'incubateur à 37°C pendant 30 min. Les milieux de culture ainsi que

les réactifs ont été retirés et les puits ont été rincés à l'aide de PBS à 37°C. Enfin, la plaque a été lue au fluorimètre Infinite<sup>®</sup> 200 PRO (Tecan), à la longueur d'onde de 540 nm, après excitation à une longueur d'onde de 492 nm.

Comme témoins négatifs, nous avons utilisé des puits contenant des échantillons, mais pas de sondes DCFDA. Nous avons traité certains puits par de la clorgyline seule, un inhibiteur de la MAO-A, afin de mesurer le stress oxydant non dû à la MAO-A. Nous avons également traité certains puits avec de la tyramine, un substrat de la MAO-A, ou par de la tyramine associée à de la clorgyline, afin d'évaluer la capacité de production de stress oxydant par la MAO-A, en présence de substrat. Le stress oxydant spécifiquement dû à la MAO-A correspondait au stress oxydant total mesuré, moins le stress oxydant mesuré en présence de clorgyline.

## **I. Analyse des données :**

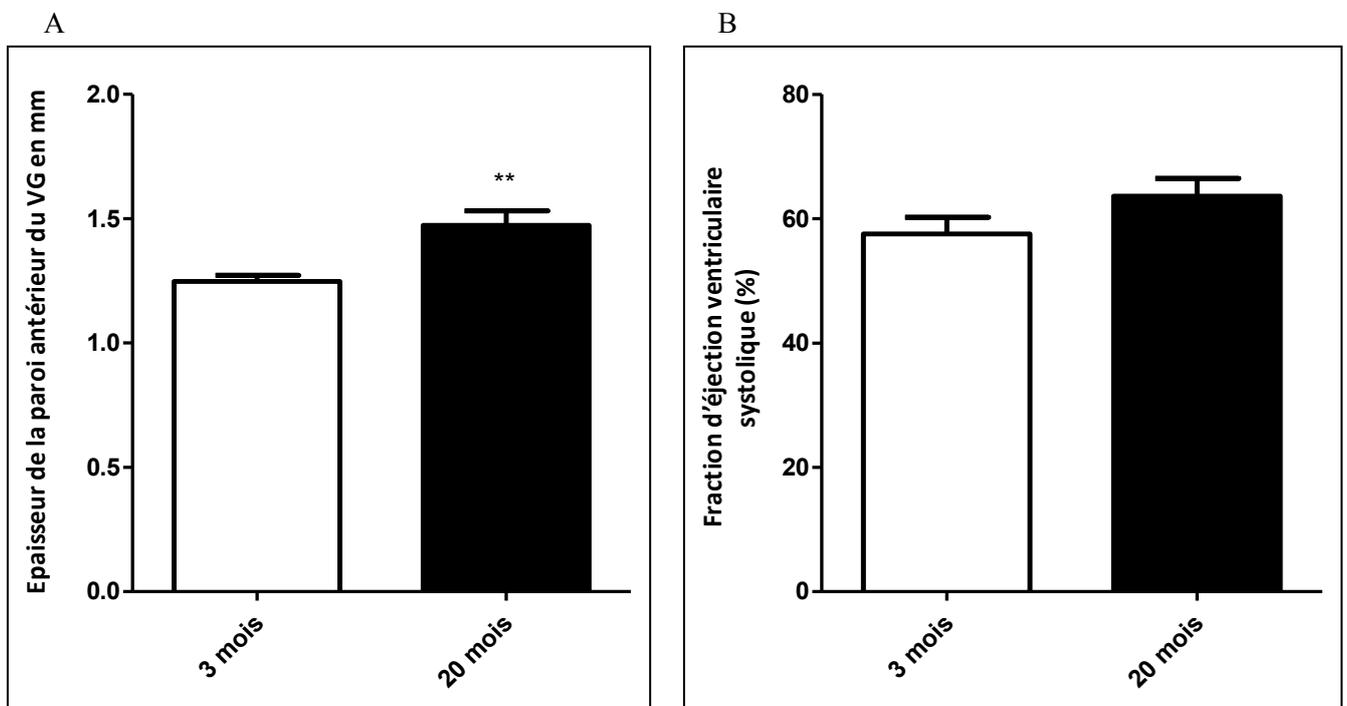
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM (Erreur standard à la moyenne). La significativité des résultats a été réalisée à l'aide d'un T-test (logiciel Prism). Une différence est considérée comme significative (\*) si le pourcentage d'erreur calculé « p » est inférieur ou égal à 0,05.

## VI. Résultats:

### A. Caractérisation du vieillissement cardiaque :

#### 1. Echographies cardiaques chez les souris WT âgées :

Les souris WT âgées de 20 mois présentent une augmentation de l'épaisseur de la paroi du ventricule gauche, par rapport aux souris WT de 3 mois ( $p < 0.01$ ), signant une hypertrophie cardiaque (Fig.11A). En revanche, la fraction d'éjection ventriculaire n'est pas significativement modifiée entre les deux groupes, signifiant l'absence de dysfonction systolique à ce stade du vieillissement (Fig.11B).



**Figure 11: Résultats des échographies cardiaques réalisées chez les souris WT âgées de 3 mois ou 20 mois.**

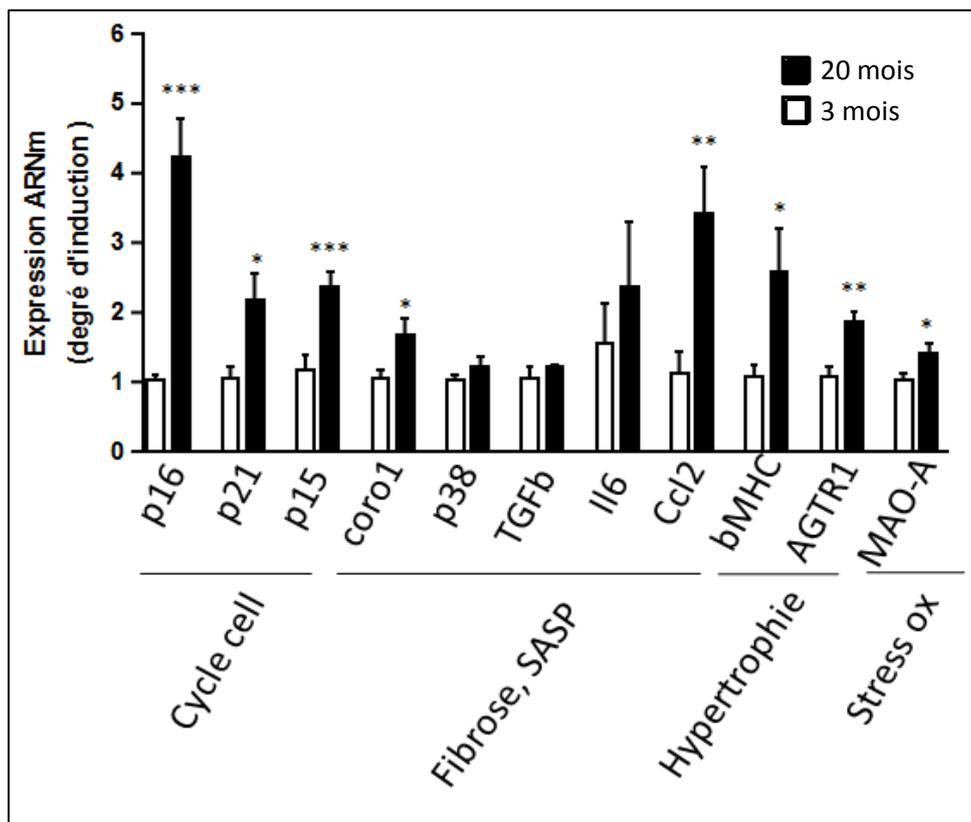
A). Epaisseur de la paroi antérieure du ventricule gauche en mm,

B). Fraction d'éjection ventriculaire systolique, évaluée par échocardiographie chez des souris WT âgées de 3 mois ou de 20 mois. (n=8)

## 2. RT-PCR sur cœur entier de souris WT âgées :

Nous avons réalisé une PCR sur les cœurs entiers de souris WT jeunes et âgées, en recherchant spécifiquement les gènes marqueurs de sénescence précédemment cités dans la littérature, afin d'identifier les gènes surexprimés dans la sénescence cardiaque.

Chez les souris WT âgées de 20 mois, nous avons observé une tendance à l'augmentation de l'expression de différents gènes (Fig.12), dont certains de façon significative. C'était notamment le cas de trois gènes du cycle cellulaire, p15, p16 ( $p < 0.001$ ) et p21 ( $p < 0.05$ ), d'un marqueur de l'hypertrophie cellulaire, la  $\beta$ -MHC (Myosin Heavy Chain) ( $p < 0.05$ ), du récepteur à l'angiotensine AGTR1 ( $p < 0.01$ ), de Coro1 ( $p < 0.05$ ) et de Ccl2 ( $p < 0.01$ ). L'expression de la MAO-A était également significativement augmentée dans le groupe des souris âgées ( $p < 0.05$ ). D'autres gènes tels qu'Il-6 voyaient leur expression augmentée mais sans différence significative entre les deux groupes.



**Figure 12: Analyse par RT-PCR des niveaux d'expression des ARNm, normalisés par la GAPDH, dans les cœurs entiers de souris WT, âgées de 3 mois ou de 20 mois. (n=10)**

Les résultats correspondent aux degrés d'induction par rapport aux souris âgées de 3 mois et représentent les moyennes +/- ESM. \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$

### 3. RT-PCR sur cardiomyocytes isolés de souris WT âgées :

Le cœur est constitué de différentes populations cellulaires, d'une part les cardiomyocytes, qui sont des cellules en phase post-mitotique et ne se multipliant plus, et les cellules stromales d'autre part. Les cardiomyocytes, étant les cellules musculaires à l'origine de l'activité contractile du cœur, leur rôle est fondamental dans l'activité fonctionnelle du cœur. Ceci explique l'intérêt d'analyser les marqueurs de sénescence spécifique des cardiomyocytes.

Dans les cardiomyocytes isolés de souris WT âgées de 20 mois, nous avons observé l'augmentation de l'expression de différents gènes (Fig.13).

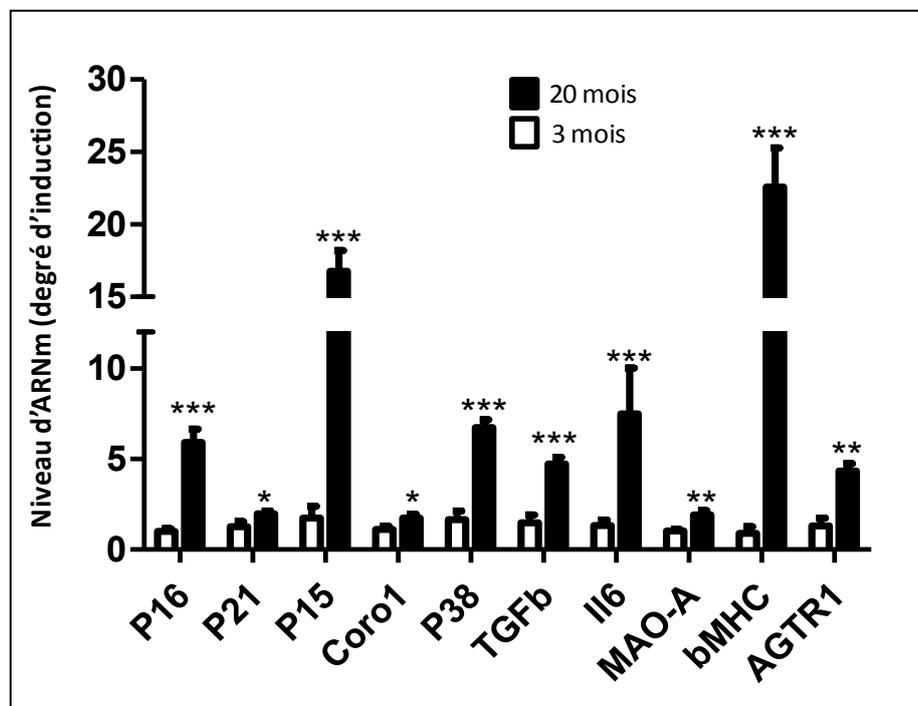


Figure 13: Analyse par RT-PCR des niveaux d'expression des ARNm, normalisés par la GAPDH, dans les cardiomyocytes isolés de souris WT, âgées de 3 mois ou de 20 mois (n=8).

Les résultats correspondent aux degrés d'induction par rapport aux souris âgées de 3 mois et représentent les moyennes +/- ESM. \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$

Ainsi, la  $\beta$ -MHC (Myosin Heavy Chain), constituant majeur des fibres de myosine, était 20 fois plus exprimée chez les souris de 20 mois, comparées aux souris de 3 mois ( $p < 0.001$ ).

Nous avons également observé une augmentation importante de certains gènes du cycle cellulaire tel que p15 ou p16 qui étaient exprimés 5 à 10 fois plus chez les souris âgées ( $p < 0.001$ ), ou, de façon plus modérée, comme p21, qui a vu son expression multipliée par 2 chez les souris âgées, par rapport aux souris jeunes ( $p < 0.05$ ).

Certains gènes codant pour des cytokines, comme TGF- $\beta$  et Il-6 étaient également fortement augmentés avec des niveaux d'expression respectivement 4 fois et 7 fois plus élevés chez les souris de 20 mois par rapport aux souris de 3 mois ( $p < 0.001$ ).

D'autres gènes ont également vu leur niveau d'expression augmenté, c'était notamment le cas pour Coro1, p38 ou AGTR1.

Enfin, la MAO-A était également surexprimée chez les souris de 20 mois, avec des taux 2 fois plus élevés que chez les souris de 3 mois ( $p < 0.01$ ).

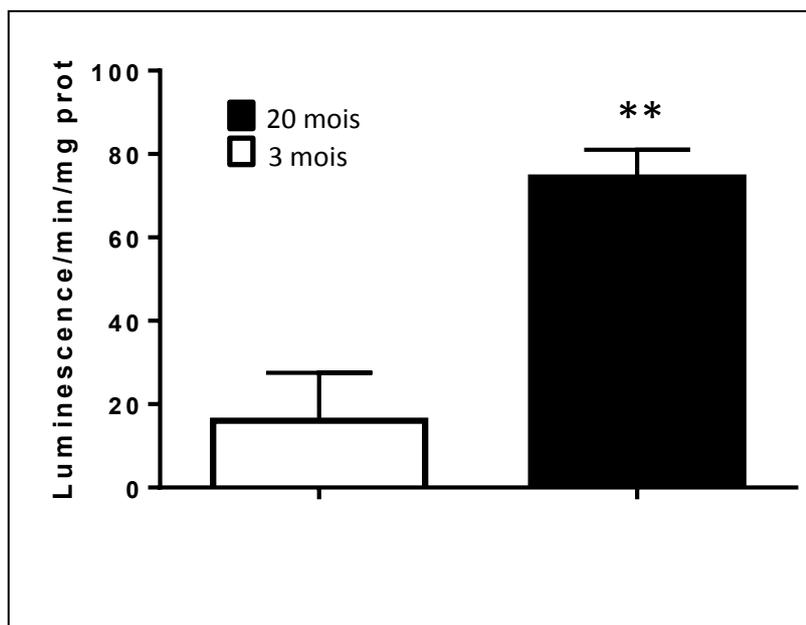
Ces résultats permettent de mettre en évidence une sénescence des cardiomyocytes, avec l'augmentation de marqueurs typiques tels que p16, p21, p15, ainsi que des marqueurs spécifiques du SASP que sont TGF- $\beta$  et Il-6.

## B. Caractérisation de l'activité de la MAO-A et du stress oxydant dû à la MAO-A dans la sénescence cardiaque :

### 1. Dosage de l'activité enzymatique de la MAO-A chez les souris WT âgées :

Nous avons ensuite voulu savoir si l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la MAO-A se traduisait par une augmentation de l'expression de l'enzyme et donc, par une augmentation de son activité. Pour cela, nous avons effectué un dosage de l'activité enzymatique de la MAO-A au niveau des cardiomyocytes isolés de souris WT.

La différence entre l'activité enzymatique à l'état basal, et l'activité enzymatique après inhibition de la MAO-A par la clorgyline, différence correspondant à l'activité spécifique de la MAO-A, est statistiquement plus élevée dans le groupe des souris âgées, avec des activités près de 4.5 fois supérieures à celles du groupe témoins (Fig.14).



**Figure 14: Dosage de l'activité enzymatique de la MAO-A, à l'aide du test MAO-Glo, sur cardiomyocytes isolés de souris WT, âgées de 3 mois ou de 20 mois (n=8).**

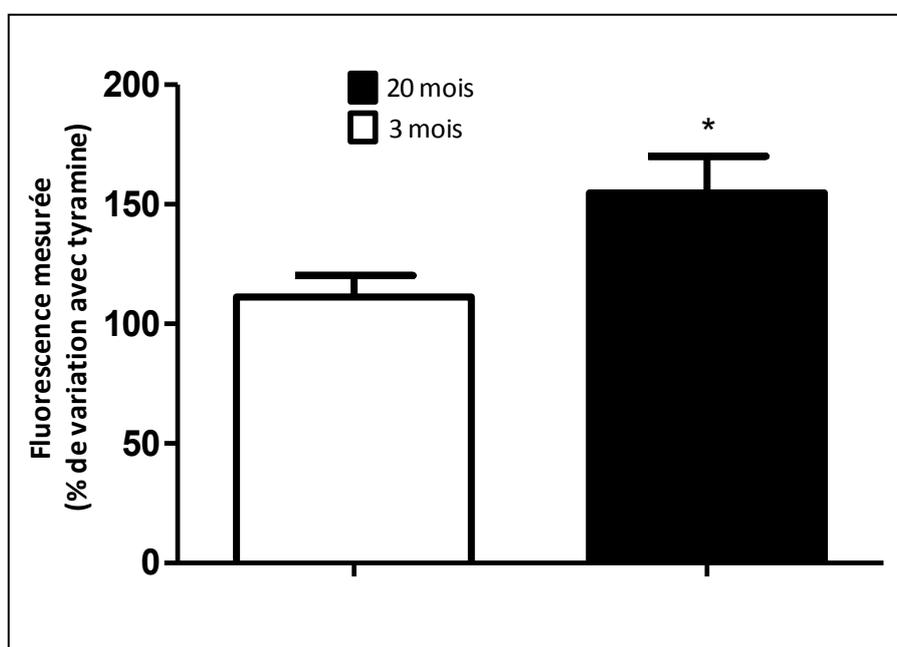
Résultats exprimés en luminescence par minute, par  $\mu\text{g}$  de protéines.

Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  ESM. \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$

## 2. Test de stress oxydant par DCFDA chez les souris WT âgées :

Le test au DCFDA permet de doser les espèces réactives de l'oxygène. Au niveau cellulaire, une augmentation de ces espèces réactives de l'oxygène traduit une augmentation du stress oxydant.

L'augmentation du stress oxydant en présence de tyramine, comparé au taux en présence de tyramine + clorgyline, était 1,5 fois plus importante chez les souris WT âgées, par rapport aux souris WT jeunes ( $p < 0.05$ ) (Fig.15). Ceci montre que le stress oxydant, spécifiquement dû à la MAO-A, est plus important dans les cardiomyocytes de souris âgées, par rapport aux cardiomyocytes de souris jeunes.



**Figure 15: Evaluation du stress oxydant, à l'aide du test au DCFDA, sur cardiomyocytes isolés de souris WT, âgées de 3 mois ou de 20 mois (n=4).**

Mesures réalisées à 540 nm après excitation à 492 nm. Résultats exprimés en pourcentage de variation du taux de stress oxydant lors du traitement par tyramine seule vs traitement par tyramine + clorgyline. Les résultats représentent les moyennes +/- ESM. \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$

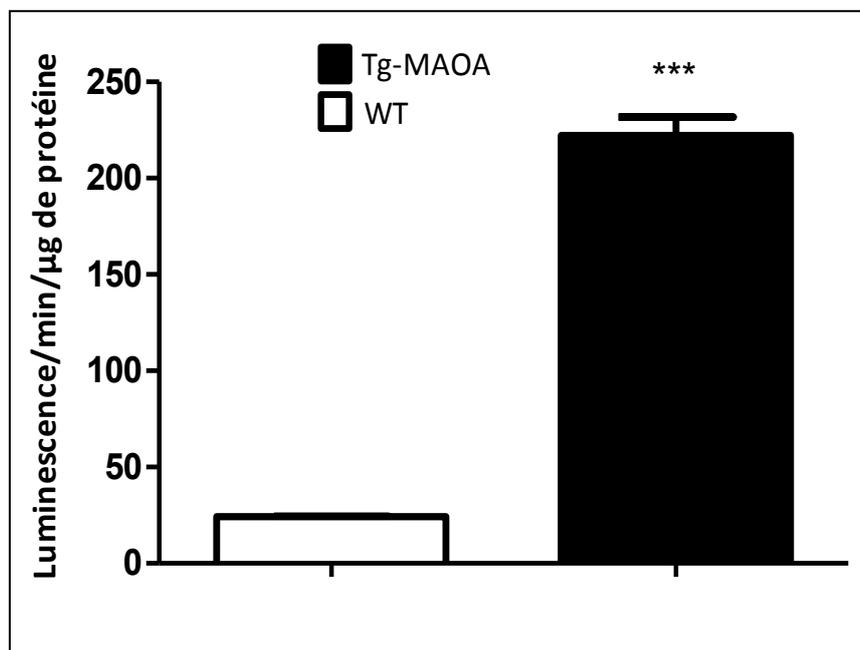
Ainsi, l'augmentation de l'expression génique de la MAO-A, observée dans les cardiomyocytes des souris WT âgée (Fig.13), se traduit également par une augmentation de l'activité de l'enzyme (Fig.14) ainsi que du stress oxydant (Fig.15), généré par la MAO-A, au niveau des cardiomyocytes.

## C. Surexpression de la MAO-A comme modèle de sénescence cardiaque :

### 1. Dosage de l'activité enzymatique de la MAO-A chez les souris Tg-MAO:

Nous avons ensuite utilisé comme modèle des souris transgénique surexprimant la MAO-A au niveau de leurs cardiomyocytes. Ceci nous permettant d'étudier les effets spécifiques de la surexpression de cette enzyme sur le stress oxydant et la sénescence cellulaire.

Nous avons, tout d'abord, dosé l'activité enzymatique de la MAO-A au niveau des cardiomyocytes. La différence entre l'activité enzymatique à l'état basal, et l'activité enzymatique après inhibition de la MAO-A par la clorgyline, était près de 9 fois plus élevée chez les souris Tg MAO-A, comparées aux souris NTg. ( $p < 0.001$ ) (Fig.16).

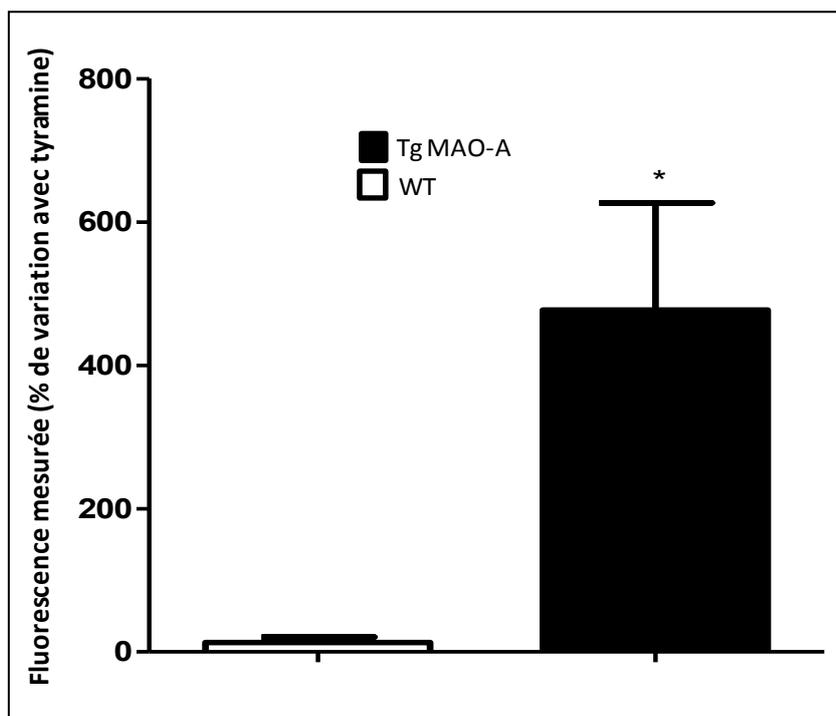


**Figure 16: Dosage de l'activité enzymatique de la MAO-A, à l'aide du test MAO-Glo, sur cardiomyocytes isolés de souris Tg MAO-A ou WT (n=3).**

Résultats exprimés en luminescence par minute, par µg de protéines. Les résultats représentent les moyennes +/- ESM. \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$

## 2. Test de stress oxydant par DCFDA chez les souris Tg-MAO :

L'ajout de tyramine a conduit à une augmentation du stress oxydant, par rapport au traitement tyramine + clorgyline, chez les 2 groupes de souris. Cependant, l'augmentation du stress oxydant était 4,5 fois plus importante chez les souris Tg-MAO comparée aux souris WT ( $p < 0.05$ ) (Fig.17).



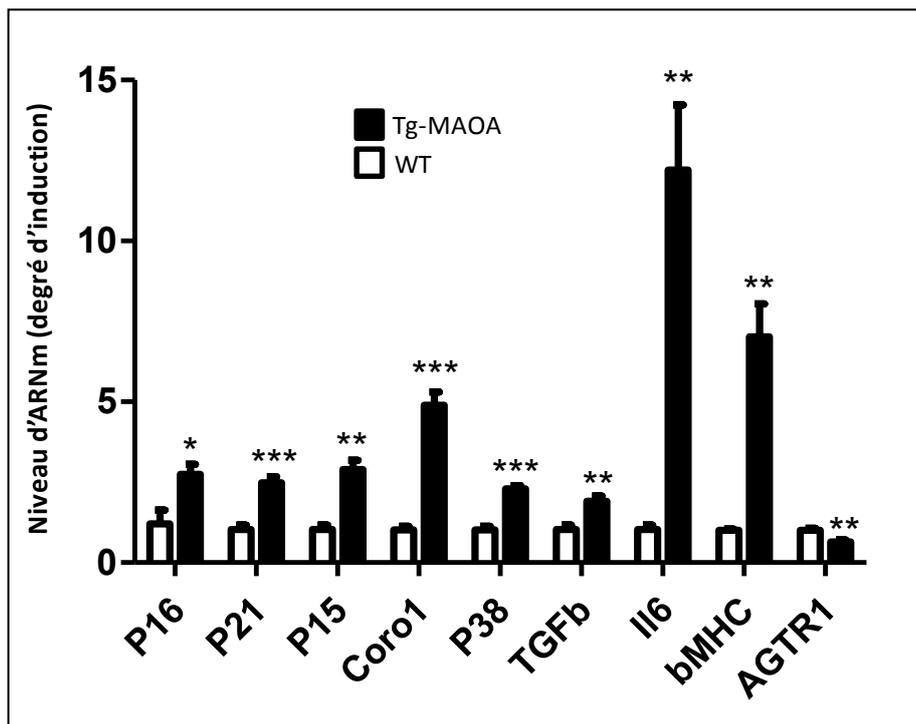
**Figure 17: Evaluation du stress oxydant, à l'aide du test au DCFDA, sur cardiomyocytes isolés de souris WT ou Tg MAO-A (n=4).**

Mesures réalisées à 540 nm après excitation à 492 nm. Résultats exprimés en pourcentage de variation du taux de stress oxydant lors du traitement par tyramine seule vs traitement par tyramine + clorgyline. Les résultats représentent les moyennes +/- ESM. \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$

### 3. RT-PCR sur cœur entier de souris Tg-MAO :

Afin de voir si une augmentation de l'expression de la MAO-A, au sein des cardiomyocytes, peut conduire à de la sénescence cardiaque, nous avons mesuré les marqueurs de sénescence, précédemment retrouvés chez les souris WT âgées, chez des souris transgéniques.

Le profil d'expression des ARNm chez les souris transgéniques est similaire à celui observé dans les cœurs de souris âgées (Fig.18).



**Figure 18: Analyse par RT-PCR des niveaux d'expression des ARNm, normalisés par la GAPDH, dans les cœurs entiers de souris WT ou Tg MAO-A (n=6).**

Les résultats correspondent aux degrés d'induction par rapport aux souris âgées de 3 mois et représentent les moyennes +/- ESM. \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$

Nous avons observé une forte hausse de l'expression de la  $\beta$ -MHC, qui était 7 fois plus exprimée chez les souris Tg MAO-A, comparées aux souris NTg ( $p < 0.01$ ).

Nous avons également observé l'augmentation de l'expression de gènes du cycle cellulaire, comme p15, p16 et p21, qui étaient exprimés 2 à 3 fois plus chez les souris Tg MAO-A. Certains gènes codant pour des cytokines, comme TGF- $\beta$  et Il-6 étaient également augmentés avec des niveaux d'expression 2 fois plus élevés pour le TGF- $\beta$  et 8 fois plus élevés pour l'Il-6, chez les souris Tg MAO-A, comparées aux souris NTg ( $p < 0.01$ ).

D'autres gènes ont également vu leur niveau d'expression augmenté, de façon similaire à ce qui avait été observé chez les souris âgées, c'était notamment le cas pour *Coro1* et *p38* ( $p < 0.001$ ). A l'inverse, il a été observé une diminution de l'expression d'*AGTR1* chez les souris Tg MAO-A ( $p < 0.01$ ).

Ainsi, les modèles de souris transgéniques surexprimant la MAO-A voient bien l'activité de l'enzyme (Fig.16), ainsi que le stress oxydant généré par celle-ci (Fig.17), augmenter. Egalement, on constate que cette surexpression de la MAO-A conduit à un profil d'expression génique (Fig.18) similaire à celui retrouvé au sein des cœurs (Fig.12) et des cardiomyocytes (Fig.13) des souris WT âgées.

## VII. Discussion:

---

Le vieillissement, qu'il soit physiologique ou pathologique, conduit à de nombreuses modifications au niveau de l'organisme, aussi bien au niveau tissulaire que cellulaire.

Du point de vue morphologique, le vieillissement cardiaque est caractérisé par une diminution du nombre des cardiomyocytes, non compensée par l'activité régénératrice locale (181), une hypertrophie compensatoire des cardiomyocytes restants et une fibrose interstitielle (25). Ces modifications physiologiques peuvent conduire à une diminution de la fraction d'éjection ventriculaire, et à terme à des signes d'insuffisance cardiaque.

Ainsi, chez les souris WT âgées de 20 mois, les échographies cardiaques ont révélé une hypertrophie ventriculaire avec épaissement de la paroi ventriculaire (Fig.11), suggérant des modifications dans la physiologie cardiaque, liées à l'âge, y compris dans les modèles murins. La conservation de la FEV au cours du vieillissement n'est pas surprenante ; en effet, les souris WT ne développent pas spontanément d'insuffisance cardiaque, ceci explique le recours aux méthodes chimiques ou chirurgicales afin d'induire une insuffisance cardiaque chez les modèles murins (182).

Le vieillissement de l'organisme est lié en grande partie à la sénescence cellulaire (85), suggérant que ces modifications cardiaques pourraient donc être induites par des phénomènes de sénescence cellulaire (94,95).

Au niveau cellulaire, les phénomènes de sénescence conduisent à la modification du profil d'expression d'un grand nombre de gènes.

Au cours du vieillissement chez les souris WT, nous pouvons observer l'augmentation de plusieurs familles de gènes, au niveau du cœur entier, ainsi certains gènes du cycle cellulaire, tels que p15, p16 ou p21, ou de l'hypertrophie, comme la  $\beta$ -MHC, sont significativement augmentés (Fig.12).

Sur les cardiomyocytes isolés, on retrouve un profil d'expression similaire, avec toutefois des différences plus marquées et statistiquement significatives, ainsi que l'apparition de nouveaux marqueurs, entre le groupe des souris jeunes et celui des souris âgées (Fig.13). Ceci peut s'expliquer par la présence de différents types cellulaires au niveau cardiaque, chacun ne subissant pas les mêmes mécanismes de sénescence, et n'exprimant donc pas les mêmes

marqueurs de sénescence. L'isolement des cardiomyocytes permet donc de détecter les marqueurs de sénescence spécifique à ce type cellulaire.

Au niveau des cardiomyocytes isolés, des différences beaucoup plus marquées apparaissent dans l'expression génique, entre les souris WT, jeunes et âgées.

Ainsi, des gènes caractéristiques de l'hypertrophie cellulaire, tel que la  $\beta$ -MHC, augmentent lors de la sénescence, ce qui est en accord avec les résultats obtenus lors des échographies cardiaques effectuées sur nos modèles murins. Une augmentation importante de l'expression de l'AGTR1 est également observée. Des études ont montré qu'une augmentation des taux d'angiotensine au niveau plasmatique pouvait conduire à une hypertrophie ainsi qu'à un dysfonctionnement cardiaque (183). Egalement, chez les souris, une inactivation du gène AGTR1 permet d'augmenter l'espérance de vie des souris, tout en diminuant les pathologies liées au vieillissement, notamment au niveau cardiaque (78). Cette augmentation de l'expression de l'AGTR1 cardiaque au cours du vieillissement (184) est certainement à l'origine d'une augmentation des effets de l'angiotensine au niveau cardiaque, et expliquerait, en partie, l'hypertrophie et les troubles cardiaques observés lors du vieillissement.

De nombreux gènes du cycle cellulaire se trouvent également surexprimés chez les cardiomyocytes de souris âgées, c'est notamment le cas de p15, p16 et p21. Ces gènes interviennent dans les deux voies majeures de sénescence : la voie p53/p21 et la voie p16. Ainsi, bien que les cardiomyocytes soient en phase post-mitotique, la DDR semble, tout de même, jouer un rôle au cours de leur sénescence. En revanche, il nous est impossible de savoir avec certitude, à l'heure actuelle, si cette DDR est activée par des lésions au niveau de l'ADN génomique ou au niveau des télomères.

De même, un phénotype sécrétoire semble apparaître chez les cardiomyocytes de souris âgées, avec l'augmentation de l'expression des gènes de différentes cytokines, comme l'Il-6 ou le TGF- $\beta$ , évoquant le SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) caractéristique des cellules en sénescence. Cependant, la forte expression de Ccl2, une chimiokine, pourrait conduire à un recrutement important des cellules inflammatoires au niveau du cœur. Ainsi, il n'est pas totalement exclu que la surexpression des cytokines Il-6 et TGF- $\beta$  soit due à une contamination de notre isolat de cardiomyocytes par des cellules inflammatoires, principalement des macrophages.

Enfin, une augmentation de l'expression de la MAO-A est également observée au niveau du cœur entier des souris âgées, ainsi que des cardiomyocytes âgés. L'augmentation étant plus importante sur les cardiomyocytes isolés, ceci tend à prouver que la surexpression de la

MAO-A a lieu spécifiquement au niveau de ces cardiomyocytes, et que ces cellules seront donc les premières impactées par cette surexpression.

La différence dans l'expression génique entre les PCR sur cœur entier et sur cardiomyocytes isolés montre clairement la surexpression spécifique aux cardiomyocytes de certains gènes tel que p15, p16, p21, p38,  $\beta$ -MHC et MAO-A. On note également une augmentation de l'expression d'Il-6 et de TGF- $\beta$ , cependant il est nécessaire de vérifier l'absence de contamination par des cellules inflammatoires qui pourraient fausser les résultats. La présence de ces différents marqueurs démontre clairement que les cardiomyocytes subissent des phénomènes de sénescence et acquièrent également des caractéristiques de cellules sénescents.

Différents mécanismes peuvent conduire à la sénescence cellulaire, dont, notamment, le stress oxydant dû aux espèces réactives de l'oxygène (95). Les espèces réactives de l'oxygène induisent la sénescence cellulaire par différents mécanismes, notamment par l'intermédiaire des dommages de l'ADN nucléaire et mitochondrial et l'oxydation de protéines et de lipides cellulaires. La MAO-A, en dégradant les amines biogènes, va conduire à la formation d' $H_2O_2$ , participant ainsi à la production de stress oxydant (168). Nous avons noté que l'expression de la MAO-A dans les cardiomyocytes de souris âgées était deux fois supérieure à celle dans les cardiomyocytes de souris jeunes (Fig.13). Également, une étude a montré que la MAO-A voyait son activité multipliée par trente chez les cardiomyocytes de rats âgés comparés aux rats jeunes (167). Ceci démontre clairement qu'il existe une importante variation inter-espèces de l'expression de la MAO-A au niveau cardiaque lors du vieillissement. Cela questionne également sur l'expression de cette MAO-A chez l'homme, et de l'impact du vieillissement sur son expression. Chez l'homme, nous savons que l'expression de cette enzyme augmente de façon importante dans le cerveau lors du vieillissement (185), il est donc légitime de supposer que son expression pourrait, de la même façon, être augmentée au niveau cardiaque.

Cependant, il est nécessaire de savoir si cette augmentation de l'expression de la MAO-A, au niveau cardiaque, se traduit également par une augmentation du stress oxydant au niveau des cardiomyocytes, ce qui pourrait conduire à l'entrée en sénescence de ces cellules.

Tout d'abord, le dosage de l'activité enzymatique spécifique de la MAO-A, a permis de voir si l'augmentation de l'ARNm codant pour cette enzyme se traduisait également par une

augmentation de l'activité enzymatique (Fig.14). Ainsi, dans notre modèle de vieillissement physiologique, l'activité enzymatique de la MAO-A est effectivement plus élevée chez les souris âgées.

Il est également nécessaire de savoir si cette augmentation de l'activité de la MAO-A se traduit par une augmentation du stress oxydant au niveau des cardiomyocytes, ou si l'excès d' $H_2O_2$  produit est immédiatement pris en charge par la cellule et n'entraîne pas d'augmentation du stress oxydant. Nous avons donc évalué le stress oxydant, au sein des cardiomyocytes de souris âgées, à l'aide du test au DCFDA (Fig.15). Ainsi, lors de ce test, l'ajout de la tyramine révèle une augmentation importante du stress oxydant au niveau des cardiomyocytes. Un traitement conjoint par clorgyline, un inhibiteur sélectif de la MAO-A, permet d'évaluer le stress oxydatif non spécifique. Ceci nous permet de noter que le stress oxydant, spécifiquement dû à la MAO-A, est statistiquement plus élevé chez les souris âgées. Ainsi, lors de notre expérience, les taux d'EROs générées par la MAO-A étaient 1.5 fois plus élevés dans les cardiomyocytes de souris âgées.

Ces données tendent à prouver que, lors du vieillissement, une augmentation de l'expression de la MAO-A est observée au niveau des cardiomyocytes. Cette augmentation va conduire à un accroissement du stress oxydant au niveau cellulaire, ce qui, via l'augmentation des lésions de l'ADN dues aux EROs, pourrait favoriser l'entrée en sénescence des cardiomyocytes.

Il est cependant nécessaire de savoir si cette surexpression de la MAO-A est suffisante pour induire une entrée en sénescence du cardiomyocyte. Pour cela, nous avons utilisé des modèles de souris transgéniques surexprimant spécifiquement la MAO-A au niveau de leurs cardiomyocytes. Ces souris sont notamment connues pour développer précocement des pathologies cardiaques (180).

Le dosage de l'activité enzymatique (Fig.16) a confirmé que la MAO-A était bien surexprimée sous une forme active. Le dosage des taux de stress oxydant chez les souris transgéniques (Fig.17) a, quant-à-lui, montré lors de l'ajout de la tyramine, une forte augmentation du stress oxydant chez les souris Tg MAO-A, augmentation due en très grande partie au stress oxydant généré spécifiquement par la MAO-A. Ceci confirme donc bien que la surexpression de la MAO-A, dans notre modèle transgénique, se traduit par une augmentation du stress oxydant dans les cardiomyocytes de ces souris.

Des PCR sur les cœurs entiers de souris Tg MAO-A ont donc été réalisées, afin de savoir si la surexpression de la MAO-A, à elle seule, permettait d'obtenir un profil d'expression génique similaire à celui obtenu chez les souris âgées.

On constate que le profil d'expression génique, retrouvé sur les PCR de cœur entier, chez les souris Tg MAO-A (Fig.18), est proche de celui rencontré chez les cardiomyocytes isolés de souris âgées. Cela semble donc confirmer l'entrée en sénescence des cardiomyocytes et, possiblement, également des cellules stromales avoisinantes. Ceci pourrait s'expliquer par le stress oxydant majeur engendré par la surexpression importante de la MAO-A. En effet, ce stress oxydant va conduire à l'entrée en sénescence, non seulement du cardiomyocyte, mais également, par un effet *bystander* (70), à l'entrée en sénescence des cellules stromales avoisinantes. De plus, ce stress oxydant majeur va pouvoir conduire à la nécrose des cardiomyocytes, phénomène qui va accélérer l'entrée en sénescence des cellules avoisinantes.

Cette étude démontre que, lors du vieillissement, une augmentation de l'expression de la MAO-A est observée au niveau des cardiomyocytes. Cette augmentation de l'expression de la MAO-A se traduit également par une augmentation de son activité, ainsi que du stress oxydant généré par celle-ci. Egalement, à l'aide de notre modèle de souris transgénique Tg MAO-A, nous avons vu que la surexpression de la MAO-A permettait d'induire un phénotype de sénescence au niveau des cardiomyocytes.

Cette augmentation de l'expression de la MAO-A conduit à un accroissement du stress oxydant au niveau cellulaire, ce qui, via l'augmentation des lésions de l'ADN dues aux EROs, peut favoriser l'entrée en sénescence des cardiomyocytes. Cependant, la MAO-A étant localisée au niveau des mitochondries, celles-ci seront les premières et les plus durement touchées par cette augmentation du stress oxydant. En effet, plusieurs études ont montré que la MAO-A, via la production d'EROs, pouvait conduire à la formation de lésions mitochondriales, aussi bien au niveau de l'ADN mitochondrial (ADNmt) que de la chaîne respiratoire, conduisant à une production accrue d'EROs (186). Les dysfonctionnements mitochondriaux, et la production d'EROs qui s'en suit, sont un des principaux mécanismes déclencheurs des phénomènes de sénescence (187). Il a également été montré que, via une voie de signalisation impliquant p53, une surexpression de la MAO-A pouvait conduire à des dommages oxydatifs au niveau des mitochondries, ainsi qu'à un phénomène de nécrose des cardiomyocytes (180).

Il a été précédemment montré que la MAO-A jouait un rôle important dans la survenue de certaines pathologies cardiaques. En effet, celle-ci favorise l'évolution de l'hypertrophie cardiaque vers l'insuffisance cardiaque, et elle favorise également la mort cellulaire lors de l'ischémie-reperfusion (188). Notre étude a permis de montrer que la MAO-A jouait également un rôle dans la survenue et le maintien de la sénescence au niveau des cardiomyocytes, via la génération d'EROs.

L'entrée en sénescence des cardiomyocytes est un élément majeur à l'origine du remodelage cardiaque précédant l'insuffisance cardiaque. Les mécanismes conduisant à l'entrée en sénescence d'une cellule sont multiples, toutefois cette étude montre le rôle prépondérant du stress oxydant, notamment dû à la surexpression de la MAO-A, dans l'entrée en sénescence des cardiomyocytes. Une meilleure caractérisation des mécanismes cellulaires impliqués dans la sénescence des cellules cardiaques est un prérequis indispensable pour permettre l'identification de biomarqueurs et la mise au point de stratégies de prévention et de thérapies spécifiques dans le cadre de sénescence pathologique.

# Bibliographie:

---

1. Insee. Tableaux de l'économie française: Population par âge. Insee Réf. mars 2016;26-7.
2. Eurostat. Healthy life years statistics [Internet]. 2016 [cité 22 juin 2016]. Disponible sur: [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Healthy\\_life\\_years\\_statistics](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Healthy_life_years_statistics)
3. Cambois E, Robine J-M. Les espérances de vie en bonne santé des Européens. [cité 23 juin 2016]; Disponible sur: <http://www.cor-retraites.fr/IMG/pdf/doc-2236.pdf>
4. Briançon S, Guérin G, Sandrin-Berthon B. Maladies chroniques. ADSP. sept 2010;72:11-53.
5. Niccoli T, Partridge L. Ageing as a Risk Factor for Disease. *Curr Biol.* sept 2012;22(17):R741-52.
6. de Peretti C, Pérel C, Tuppin P, Iliou M-C, Juillièrre Y, Gabet A, et al. Prévalences et statut fonctionnel des cardiopathies ischémiques et de l'insuffisance cardiaque dans la population adulte en France : apports des enquêtes déclaratives. *Bull Epidémiol Hebd.* avr 2014;(9-10):172-81.
7. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* juill 2012;33(14):1787-847.
8. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, et al. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 10 déc 2002;106(24):3068-72.
9. Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MCJM, Straus SMJM, Hofman A, Deckers JW, et al. Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J.* sept 2004;25(18):1614-9.
10. Gabet A, Juillièrre Y, Lamarche-Vadel A, Vernay M, Olié V. National trends in rate of patients hospitalized for heart failure and heart failure mortality in France, 2000-2012: Trends in hospitalization rates for HF and HF mortality in France. *Eur J Heart Fail.* juin 2015;17(6):583-90.
11. Gabet A, Lamarche-Vadel A, Chin F, Juillièrre Y, de Peretti C, Olié V. Mortalité due à l'insuffisance cardiaque en France, évolutions 2000-2010. *Bull Epidémiol Hebd.* avr 2014;(21-22):386-94.
12. Kitzman DW. Heart Failure in the Elderly: Systolic and Diastolic Dysfunction. *Am J Geriatr Cardiol.* janv 1996;5(1):20-6.
13. Brutsaert DL, Sys SU, Gillebert TC. Diastolic failure: pathophysiology and therapeutic implications. *J Am Coll Cardiol.* juill 1993;22(1):318-25.

14. Baicu CF, Zile MR, Aurigemma GP, Gaasch WH. Left ventricular systolic performance, function, and contractility in patients with diastolic heart failure. *Circulation*. 10 mai 2005;111(18):2306-12.
15. Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function. *Circulation*. 19 mars 2002;105(11):1387-93.
16. Sharma K, Kass DA. Heart failure with preserved ejection fraction: mechanisms, clinical features, and therapies. *Circ Res*. 20 juin 2014;115(1):79-96.
17. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 20 juill 2006;355(3):251-9.
18. Bhatia RS, Tu JV, Lee DS, Austin PC, Fang J, Haouzi A, et al. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med*. 20 juill 2006;355(3):260-9.
19. Haute Autorité de Santé. Guide du parcours de soins de l'Insuffisance cardiaque [Internet]. 2014 Juin. Disponible sur: [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/r\\_1505207/fr/insuffisance-cardiaque-parcours-de-soins](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/r_1505207/fr/insuffisance-cardiaque-parcours-de-soins)
20. Liu X, Meng H, Jiang C, Yang S, Cui F, Yang P. Differential microRNA Expression and Regulation in the Rat Model of Post-Infarction Heart Failure. Yue J, éditeur. *PLOS ONE*. 9 août 2016;11(8):e0160920.
21. Sygitowicz G, Tomaniak M, Filipiak K, Kołtowski Ł, Sitkiewicz D. Galectin-3 in Patients with Acute Heart Failure: Preliminary Report on First Polish Experience. *Adv Clin Exp Med*. 2016;25(4):617-23.
22. Pérel C, Chin F, Tuppin P, Danchin D, Alla F, Juillière Y, et al. Taux de patients hospitalisés pour insuffisance cardiaque en 2008 et évolutions en 2002–2008, France. *Bull Épidémiologique Hebd*. 2012;41:466–470.
23. Zannad F, Mebazaa A, Juillière Y, Cohen-Solal A, Guize L, Alla F, et al. Clinical profile, contemporary management and one-year mortality in patients with severe acute heart failure syndromes: The EFICA study. *Eur J Heart Fail*. nov 2006;8(7):697-705.
24. Keller KM, Howlett SE. Sex Differences in the Biology and Pathology of the Aging Heart. *Can J Cardiol* [Internet]. avr 2016 [cité 27 juill 2016]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0828282X16300071>
25. Olivetti G, Melissari M, Capasso JM, Anversa P. Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ Res*. 1991;68(6):1560–1568.
26. Chimenti C. Senescence and Death of Primitive Cells and Myocytes Lead to Premature Cardiac Aging and Heart Failure. *Circ Res*. 3 oct 2003;93(7):604-13.
27. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. déc 1961;25:585-621.

28. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* mars 1965;37(3):614-36.
29. Rossiello F, Herbig U, Longhese MP, Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F. Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signalling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing. *Curr Opin Genet Dev.* juin 2014;26:89-95.
30. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 16 janv 1998;279(5349):349-52.
31. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(24):13742-13747.
32. Wang Y, Blandino G, Oren M, Givol D. Induced p53 expression in lung cancer cell line promotes cell senescence and differentially modifies the cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Oncogene.* 1998;17(15):1923-1930.
33. Kagawa S, Fujiwara T, Kadowaki Y, Fukazawa T, Sok-Joo R, Roth JA, 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* [Internet]. 1999 [cité 24 juill 2016];6(8). Disponible sur: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=13509047&AN=8851213&h=i%2FjRbqABDjD3%2BCajg%2F2q%2FOLB1170p8cNJPwOPNHjYpelkpzOWkxCifDQPgjDj%2B8R1o4uALpZORK6UrljQ0R%2BwA%3D%3D&crl=c>
34. Fang L, Igarashi M, Leung J, Sugrue MM, Lee SW, Aaronson SA. p21Waf1/Cip1/Sdi1 induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53. *Oncogene.* 1999;18(18):2789-2797.
35. Jeck WR, Siebold AP, Sharpless NE. Review: a meta-analysis of GWAS and age-associated diseases. *Aging Cell.* oct 2012;11(5):727-31.
36. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest.* 1 nov 2004;114(9):1299-307.
37. Collins CJ, Sedivy JM. Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence. *Aging Cell.* juin 2003;2(3):145-50.
38. Matheu A, Maraver A, Collado M, Garcia-Cao I, Cañamero M, Borras C, et al. Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging Cell.* avr 2009;8(2):152-61.
39. Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Durr P, et al. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell.* oct 2006;5(5):379-89.
40. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16 INK4a. *Cell.* 1997;88(5):593-602.

41. Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Investig JMI*. août 2004;51(3-4):146-53.
42. Chen J. Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. *AJP Heart Circ Physiol*. 9 déc 2005;290(4):H1575-86.
43. Deng Q, Liao R, Wu B-L, Sun P. High Intensity ras Signaling Induces Premature Senescence by Activating p38 Pathway in Primary Human Fibroblasts. *J Biol Chem*. 9 janv 2004;279(2):1050-9.
44. Wang W, Chen JX, Liao R, Deng Q, Zhou JJ, Huang S, et al. Sequential Activation of the MEK-Extracellular Signal-Regulated Kinase and MKK3/6-p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediates Oncogenic ras-Induced Premature Senescence. *Mol Cell Biol*. 15 mai 2002;22(10):3389-403.
45. Iwasa H, Han J, Ishikawa F. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells*. 2003;8(2):131-144.
46. Moskalev AA, Smit-McBride Z, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, et al. Gadd45 proteins: Relevance to aging, longevity and age-related pathologies. *Ageing Res Rev*. janv 2012;11(1):51-66.
47. Zhang L, Yang Z, Liu Y. GADD45 proteins: roles in cellular senescence and tumor development. *Exp Biol Med* Maywood NJ. 28 mai 2014;239(7):773-8.
48. Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*. 2001;52(3-5):159-164.
49. Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, et al. Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med*. févr 2004;25(1-2):5-16.
50. Liu VW, Zhang C, Nagley P. Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucleic Acids Res*. 1 mars 1998;26(5):1268-75.
51. Bandy B, Davison AJ. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med*. 1990;8(6):523-39.
52. Chomyn A, Attardi G. MtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 9 mai 2003;304(3):519-29.
53. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 15 juill 2005;309(5733):481-4.
54. Lu T, Finkel T. Free radicals and senescence. *Exp Cell Res*. mai 2008;314(9):1918-22.
55. Jones DP, Mody VC, Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg P. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med*. 1 nov 2002;33(9):1290-300.

56. Erden-Inal M, Sunal E, Kanbak G. Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochem Funct.* mars 2002;20(1):61-6.
57. Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, et al. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic Res.* mai 2006;40(5):495-505.
58. Ozbay B, Dülger H. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking. *Tohoku J Exp Med.* juin 2002;197(2):119-24.
59. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol.* sept 2007;8(9):722-8.
60. Correia-Melo C, Hewitt G, Passos JF. Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence. *Longev Heal.* 2014;3(1):1.
61. Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol [Internet].* 16 févr 2010 [cité 8 juill 2016];6. Disponible sur: <http://msb.embopress.org/cgi/doi/10.1038/msb.2010.5>
62. Ballinger SW, Patterson C, Yan C-N, Doan R, Burow DL, Young CG, et al. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res.* 2000;86(9):960-966.
63. Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Pieraggi MT, Arnal JF, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurintricarboxylic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* févr 1997;17(2):331-9.
64. Ge J, Wang C, Nie X, Yang J, Lu H, Song X, et al. ROS-mediated apoptosis of HAPI microglia through p53 signaling following PFOS exposure. *Environ Toxicol Pharmacol.* sept 2016;46:9-16.
65. Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer.* févr 2009;9(2):81-94.
66. Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, Campisi J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* janv 2010;5(1):99-118.
67. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell.* juin 2008;133(6):1019-31.
68. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 8 févr 2007;445(7128):656-60.
69. Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev.* 15 janv 2014;28(2):99-114.

70. Hubackova S, Krejcikova K, Bartek J, Hodny Z. IL1-and TGFbeta-Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine' bystander senescence'. *Aging*. 2012;4(12):932–51.
71. Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J*. 2011;30(8):1536–1548.
72. Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *Downward J, éditeur. PLoS Biol*. 2 déc 2008;6(12):e301.
73. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92(20):9363–9367.
74. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2000;113(20):3613–3622.
75. Demidenko ZN, Blagosklonny MV. Quantifying pharmacologic suppression of cellular senescence: prevention of cellular hypertrophy versus preservation of proliferative potential. *Aging*. 2009;1(12):1008–1016.
76. Demidenko ZN, Blagosklonny MV. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell Cycle*. nov 2008;7(21):3355–61.
77. Kunieda T, Minamino T, Nishi J -i., Tateno K, Oyama T, Katsuno T, et al. Angiotensin II Induces Premature Senescence of Vascular Smooth Muscle Cells and Accelerates the Development of Atherosclerosis via a p21-Dependent Pathway. *Circulation*. 29 août 2006;114(9):953–60.
78. Benigni A, Corna D, Zoja C, Sonzogni A, Latini R, Salio M, et al. Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. *J Clin Invest*. 2 mars 2009;119(3):524–30.
79. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011;192(4):547–556.
80. de Jesus BB, Blasco MA. Assessing Cell and Organ Senescence Biomarkers. *Circ Res*. 22 juin 2012;111(1):97–109.
81. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. juin 2013;153(6):1194–217.
82. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. sept 2007;8(9):729–40.
83. Brondello J-M, Prieur A, Philipot D, Lemaitre J-M, Lenaers G, Piette J, et al. La sénescence cellulaire: Un nouveau mythe de Janus ? *médecine/sciences*. mars 2012;28(3):288–96.
84. Burton DGA, Krizhanovsky V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell Mol Life Sci*. nov 2014;71(22):4373–86.
85. Burton DGA. Cellular senescence, ageing and disease. *AGE*. mars 2009;31(1):1–9.

86. Burd CE, Sorrentino JA, Clark KS, Darr DB, Krishnamurthy J, Deal AM, et al. Monitoring Tumorigenesis and Senescence In Vivo with a p16INK4a-Luciferase Model. *Cell*. janv 2013;152(1-2):340-51.
87. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 30 nov 2006;444(7119):633-7.
88. Diao QX, Zhang JZ, Zhao T, Xue F, Gao F, Ma SM, et al. Vitamin E promotes breast cancer cell proliferation by reducing ROS production and p53 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. juin 2016;20(12):2710-7.
89. Matheu A, Maraver A, Klatt P, Flores I, Garcia-Cao I, Borras C, et al. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature*. 19 juill 2007;448(7151):375-9.
90. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell*. juin 2009;8(3):311-23.
91. Hecker L, Thannickal VJ. Getting to the core of fibrosis: targeting redox imbalance in aging. *Ann Transl Med*. mars 2016;4(5):93-93.
92. Gagliano N, Arosio B, Santambrogio D, Balestrieri MR, Padoani G, Tagliabue J, et al. Age-dependent expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in rat kidney cortex. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2000;55(8):B365-B372.
93. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2 nov 2011;479(7372):232-6.
94. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, et al. Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. 3 févr 2016;530(7589):184-9.
95. Naylor RM, Baker DJ, van Deursen JM. Senescent Cells: A Novel Therapeutic Target for Aging and Age-Related Diseases. *Clin Pharmacol Ther*. janv 2013;93(1):105-16.
96. Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: A link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol* [Internet]. sept 2011 [cité 27 juill 2016]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X11000502>
97. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, de Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;908(1):244-254.
98. Wagner K-H, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B. Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology. *Nutrients*. 2 juin 2016;8(6):338.
99. Melk A, Kittikowit W, Sandhu I, Halloran KM, Grimm P, Schmidt BMW, et al. Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int*. juin 2003;63(6):2134-43.
100. Serrano M, Blasco MA. Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(6):748-753.

101. Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol.* oct 2000;35(8):927-45.
102. Tan FCC, Hutchison ER, Eitan E, Mattson MP. Are there roles for brain cell senescence in aging and neurodegenerative disorders? *Biogerontology.* déc 2014;15(6):643-60.
103. Jurk D, Wang C, Miwa S, Maddick M, Korolchuk V, Tsolou A, et al. Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response: A senescence-like phenotype in postmitotic neurons. *Aging Cell.* déc 2012;11(6):996-1004.
104. Chato W, Abdouh M, Bernier G. p53 pro-oxidant activity in the central nervous system: implication in aging and neurodegenerative diseases. *Antioxid Redox Signal.* 15 sept 2011;15(6):1729-37.
105. Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, Haapasalo A, Hiltunen M, Soininen H. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype: Astrocyte senescence in aging brain. *Eur J Neurosci.* juill 2011;34(1):3-11.
106. Geng Y-Q, Guan J-T, Xu X-H, Fu Y-C. Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* juin 2010;396(4):866-9.
107. Sikora E, Arendt T, Bennett M, Narita M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev.* janv 2011;10(1):146-52.
108. Frangogiannis NG. Matricellular Proteins in Cardiac Adaptation and Disease. *Physiol Rev.* 1 avr 2012;92(2):635-88.
109. Maejima Y, Adachi S, Ito H, Hirao K, Isobe M. Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage. *Aging Cell.* avr 2008;7(2):125-36.
110. Sahin E, Colla S, Liesa M, Moslehi J, Müller FL, Guo M, et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature.* 17 févr 2011;470(7334):359-65.
111. Moslehi J, DePinho RA, Sahin E. Telomeres and Mitochondria in the Aging Heart. *Circ Res.* 27 avr 2012;110(9):1226-37.
112. Dai D-F, Rabinovitch PS. Cardiac Aging in Mice and Humans: The Role of Mitochondrial Oxidative Stress. *Trends Cardiovasc Med.* oct 2009;19(7):213-20.
113. Tatarková Z, Kuka S, Račay P, Lehotský J, Dobrota D, Mištuna D, et al. Effects of aging on activities of mitochondrial electron transport chain complexes and oxidative damage in rat heart. *Physiol Res Acad Sci Bohemoslov.* 2011;60(2):281-9.
114. Pandya K, Smithies O.  $\beta$ -MyHC and Cardiac Hypertrophy: Size Does Matter. *Circ Res.* 2 sept 2011;109(6):609-10.
115. Krenz M, Robbins J. Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. *J Am Coll Cardiol.* déc 2004;44(12):2390-7.

116. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 8 déc 2003;22(56):9030-40.
117. Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ. Is  $\beta$ -Galactosidase Staining a Marker of Senescence in Vitro and in Vivo? *Exp Cell Res*. mai 2000;257(1):162-71.
118. Ilett KF, George CF, Davies DS. The effect of monoamine oxidase inhibitors on 'first-pass' metabolism of tyramine in dog intestine. *Biochem Pharmacol*. 1980;29(19):2551-2556.
119. Dostert P. Can our knowledge of monoamine oxidase (MAO) help in the design of better MAO inhibitors? *J Neural Transm Suppl*. 1994;41:269-79.
120. Edmondson DE. Hydrogen peroxide produced by mitochondrial monoamine oxidase catalysis: biological implications. *Curr Pharm Des*. 2014;20(2):155-60.
121. Johnson GA, Kim EG, Platz PA, Mickelson MM. Comparative aspects of tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase inhibition: arterenones and dihydroxyphenylacetamide (H 22-54). *Biochem Pharmacol*. mars 1968;17(3):403-10.
122. Knoll J, Magyar K. Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1972;5:393-408.
123. Fowler CJ, Mantle TJ, Tipton KF. The nature of the inhibition of rat liver monoamine oxidase types A and B by the acetylenic inhibitors clorgyline, l-deprenyl and pargyline. *Biochem Pharmacol*. nov 1982;31(22):3555-61.
124. Shih JC, Chen K, Ridd MJ. Monoamine Oxidase: From Genes to Behavior. *Annu Rev Neurosci*. mars 1999;22(1):197-217.
125. Shih JC, Chen K, Ridd MJ. Role of MAO A and B in neurotransmitter metabolism and behavior. *Pol J Pharmacol*. févr 1999;51(1):25-9.
126. O'Carroll A-M, Fowler CJ, Phillips JP, Tobbia I, Tipton KF. The deamination of dopamine by human brain monoamine oxidase: Specificity for the two enzyme forms in seven brain regions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1983;322(3):198-202.
127. Glover V, Sandler M, Owen F, Riley GJ. Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. *Nature*. 6 janv 1977;265(5589):80-1.
128. Saura J, Nadal E, van den Berg B, Vila M, Bombi JA, Mahy N. Localization of monoamine oxidases in human peripheral tissues. *Life Sci*. 1996;59(16):1341-9.
129. Jahng JW, Houpt TA, Wessel TC, Chen K, Shih JC, Joh TH. Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization. *Synap N Y N*. janv 1997;25(1):30-6.
130. Thorpe LW, Westlund KN, Kochersperger LM, Abell CW, Denney RM. Immunocytochemical localization of monoamine oxidases A and B in human peripheral tissues and brain. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. janv 1987;35(1):23-32.
131. Rodríguez MJ, Saura J, Billett EE, Finch CC, Mahy N. Cellular localization of monoamine oxidase A and B in human tissues outside of the central nervous system. *Cell Tissue Res*. mai 2001;304(2):215-20.

132. Billett E. Monoamine Oxidase (MAO) in Human Peripheral Tissues. *NeuroToxicology*. janv 2004;25(1-2):139-48.
133. Auda GR, Kirk SH, Billett MA, Billett EE. Localization of Monoamine Oxidase mRNA in Human Placenta. *J Histochem Cytochem*. 1 déc 1998;46(12):1393-400.
134. Rodríguez MJ, Saura J, Finch CC, Mahy N, Billett EE. Localization of monoamine oxidase A and B in human pancreas, thyroid, and adrenal glands. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. janv 2000;48(1):147-51.
135. Rodríguez MJ, Saura J, Billett E, Finch C, Mahy N. MAO-A and MAO-B localisation in human lung and spleen. *Neurobiol Bp Hung*. 2000;8(3-4):243-8.
136. Riley LA, Denney RM. Problems with the measurement of monoamine oxidase A protein concentration in mitochondrial preparations. Revised molecular activities and implications for estimating ratios of MAO A:MAO B molecules from radiochemical assay data. *Biochem Pharmacol*. 24 oct 1991;42(10):1953-9.
137. Brunner HG, Nelen MR, van Zandvoort P, Abeling NG, van Gennip AH, Wolters EC, et al. X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. *Am J Hum Genet*. juin 1993;52(6):1032-9.
138. Bleeker-Wagemakers EM, Zweije-Hofman I, Gal A. Norrie disease as part of a complex syndrome explained by a submicroscopic deletion of the X chromosome. *Ophthalmic Paediatr Genet*. nov 1988;9(3):137-42.
139. Collins FA, Murphy DL, Reiss AL, Sims KB, Lewis JG, Freund L, 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*. 1 janv 1992;42(1):127-34.
140. Donnai D, Mountford RC, Read AP. Norrie disease resulting from a gene deletion: clinical features and DNA studies. *J Med Genet*. févr 1988;25(2):73-8.
141. Murphy DL, Sims KB, Karoum F, de la Chapelle A, Norio R, Sankila EM, et al. Marked amine and amine metabolite changes in Norrie disease patients with an X-chromosomal deletion affecting monoamine oxidase. *J Neurochem*. janv 1990;54(1):242-7.
142. Murphy DL, Sims KB, Karoum F, Garrick NA, de la Chapelle A, Sankila EM, 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):1-12.
143. Sims KB, de la Chapelle A, Norio R, Sankila EM, Hsu YP, Rinehart WB, et al. Monoamine oxidase deficiency in males with an X chromosome deletion. *Neuron*. janv 1989;2(1):1069-76.
144. Brunner HG, Nelen M, Breakefield XO, Ropers HH, van Oost BA. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science*. 22 oct 1993;262(5133):578-80.
145. Tadic A, Rujescu D, Szegedi A, Giegling I, Singer P, Möller H-J, et al. Association of a MAOA gene variant with generalized anxiety disorder, but not with panic disorder or major

- depression. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet*. févr 2003;117B(1):1-6.
146. Vanyukov MM, Maher BS, Devlin B, Tarter RE, Kirillova GP, Yu L-M, et al. Haplotypes of the monoamine oxidase genes and the risk for substance use disorders. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet*. 15 févr 2004;125B(1):120-5.
  147. Fowler JS, Logan J, Volkow ND, Wang G-J, MacGregor RR, Ding Y-S. Monoamine oxidase: radiotracer development and human studies. *Methods San Diego Calif*. juill 2002;27(3):263-77.
  148. Fowler JS, Logan J, Shumay E, Alia-Klein N, Wang G-J, Volkow ND. Monoamine oxidase: radiotracer chemistry and human studies. *J Label Compd Radiopharm*. mars 2015;58(3):51-64.
  149. Saura J, Richards JG, Mahy N. Differential age-related changes of MAO-A and MAO-B in mouse brain and peripheral organs. *Neurobiol Aging*. août 1994;15(4):399-408.
  150. Khakimova GR, Kozina EA, Buneeva OA, Aksenova LN, Medvedev AE, Ugryumov MV. Activity of Monoamine Oxidase in the Nigrostriatal System at Presymptomatic and Early Symptomatic Stages of Parkinsonism in Mice. *Bull Exp Biol Med*. août 2015;159(4):456-8.
  151. Hoekstra JG, Montine KS, Zhang J, Montine TJ. Mitochondrial therapeutics in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2011;3(3):1.
  152. Cesura AM, Pletscher A. The new generation of monoamine oxidase inhibitors. *Prog Drug Res Fortschritte Arzneimittelforschung Prog Rech Pharm*. 1992;38:171-297.
  153. Yamada M. Clinical Pharmacology of MAO Inhibitors: Safety and Future. *NeuroToxicology*. janv 2004;25(1-2):215-21.
  154. Flockhart DA. Dietary restrictions and drug interactions with monoamine oxidase inhibitors: an update. *J Clin Psychiatry*. 2012;73 Suppl 1:17-24.
  155. Yeragani V, Sathyanarayana Rao T. Hypertensive crisis and cheese. *Indian J Psychiatry*. 2009;51(1):65.
  156. Anderson MC, Hasan F, McCrodden JM, Tipton KF. Monoamine oxidase inhibitors and the cheese effect. *Neurochem Res*. nov 1993;18(11):1145-9.
  157. Rudorfer MV. Monoamine oxidase inhibitors: reversible and irreversible. *Psychopharmacol Bull*. 1992;28(1):45-57.
  158. Guimarães J., Vindis C, Soares-da-Silva P, Parini A. Differential substrate specificity of monoamine oxidase in the rat heart and renal cortex. *Life Sci*. juill 2003;73(8):955-67.
  159. Guimarães JT, Soares-Da-Silva P. Unusual pattern of beta-phenylethylamine deamination in the rat heart. *Biochem Soc Trans*. nov 1997;25(4):S622.
  160. Sivasubramaniam SD, Finch CC, Rodriguez MJ, Mahy N, Billett EE. A comparative study of the expression of monoamine oxidase-A and -B mRNA and protein in non-CNS human tissues. *Cell Tissue Res*. 1 sept 2003;313(3):291-300.

161. Adolfsson R, Gottfries CG, Oreland L, Wiberg \AA, Winblad B. Increased activity of brain and platelet monoamine oxidase in dementia of Alzheimer type. *Life Sci.* 1980;27(12):1029–1034.
162. Banerjee S, Poddar MK. Carnosine: effect on aging-induced increase in brain regional monoamine oxidase-A activity. *Neurosci Res.* mars 2015;92:62-70.
163. Meco M, Bonifati V, Collier WL, Ramacci MT, Amenta F. Enzyme histochemistry of monoamine oxidase in the heart of aged rats. *Mech Ageing Dev.* 1987;38(2):145–155.
164. Cao Danh H, Strolin Benedetti M, Dostert P, Mousset A. Age-related changes in benzylamine oxidase activity in rat tissues. *J Pharm Pharmacol.* sept 1984;36(9):592-6.
165. Strolin Benedetti M, Thomassin J, Tocchetti P, Dostert P, Kettler R, Da Prada M. Species differences in changes of heart monoamine oxidase activities with age. *J Neural Transm Suppl.* 1994;41:83-7.
166. De Zutter GS, Davis RJ. Pro-apoptotic gene expression mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(11):6168–6173.
167. Maurel A, Hernandez C, Kunduzova O, Bompard G, Cambon C, Parini A, et al. Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 1 avr 2003;284(4):H1460-7.
168. Kaludercic N, Mialet-Perez J, Paolocci N, Parini A, Di Lisa F. Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* août 2014;73:34-42.
169. Babin-Ebell J, Gliese M. Extraneuronal uptake of noradrenaline in human tissue (uptake<sub>2</sub>). *Heart Vessels.* 1995;10(3):151–153.
170. Lloyd RV, Sisson JC, Shapiro B, Verhofstad AA. Immunohistochemical localization of epinephrine, norepinephrine, catecholamine-synthesizing enzymes, and chromogranin in neuroendocrine cells and tumors. *Am J Pathol.* 1986;125(1):45.
171. Kaludercic N, Takimoto E, Nagayama T, Feng N, Lai EW, Bedja D, et al. Monoamine Oxidase A-Mediated Enhanced Catabolism of Norepinephrine Contributes to Adverse Remodeling and Pump Failure in Hearts With Pressure Overload. *Circ Res.* 8 janv 2010;106(1):193-202.
172. Villeneuve C, Caudrillier A, Ordener C, Pizzinat N, Parini A, Mialet-Perez J. Dose-dependent activation of distinct hypertrophic pathways by serotonin in cardiac cells. *AJP Heart Circ Physiol.* 1 août 2009;297(2):H821-8.
173. Bianchi P, Pimentel DR, Murphy MP, Colucci WS, Parini A. A new hypertrophic mechanism of serotonin in cardiac myocytes: receptor-independent ROS generation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* avr 2005;19(6):641-3.
174. Bianchi P. Oxidative Stress by Monoamine Oxidase Mediates Receptor-Independent Cardiomyocyte Apoptosis by Serotonin and Postischemic Myocardial Injury. *Circulation.* 22 nov 2005;112(21):3297-305.
175. Santin Y, Sicard P, Vigneron F, Guilbeau-Frugier C, Dutaur M, Lairez O, et al. Oxidative Stress by Monoamine Oxidase-A Impairs Transcription Factor EB Activation and Autophagosome Clearance, Leading to Cardiomyocyte Necrosis and Heart Failure. *Antioxid Redox Signal.* 1 juill 2016;25(1):10-27.

176. Duicu OM, Lighezan R, Sturza A, Balica R, Vaduva A, Feier H, et al. Assessment of Mitochondrial Dysfunction and Monoamine Oxidase Contribution to Oxidative Stress in Human Diabetic Hearts. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1-12.
177. Muscari C, Caldarera CM, Guarnieri C. Age-dependent production of mitochondrial hydrogen peroxide, lipid peroxides and fluorescent pigments in the rat heart. *Basic Res Cardiol*. avr 1990;85(2):172-8.
178. Leichtweis SB, Leeuwenburgh C, Chandwaney R, Parmelee DJ, Ji LL. Ischaemia-reperfusion induced alterations of mitochondrial function in hypertrophied rat heart. *Acta Physiol Scand*. 1996;156(1):51-60.
179. Sheydina A, Riordon DR, Boheler KR. Molecular mechanisms of cardiomyocyte aging. *Clin Sci*. 1 oct 2011;121(8):315-29.
180. Villeneuve C, Guilbeau-Frugier C, Sicard P, Lairez O, Ordener C, Duparc T, et al. p53-PGC-1 $\alpha$  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*. janv 2013;18(1):5-18.
181. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science*. 3 avr 2009;324(5923):98-102.
182. Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, et al. Animal Models of Cardiovascular Diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:1-13.
183. Domenighetti AA, Wang Q, Egger M, Richards SM, Pedrazzini T, Delbridge LMD. Angiotensin II-Mediated Phenotypic Cardiomyocyte Remodeling Leads to Age-Dependent Cardiac Dysfunction and Failure. *Hypertension*. 1 août 2005;46(2):426-32.
184. Heymes C, Silvestre J-S, Llorens-Cortes C, Marotte F, Chevalier B, Levy BI, et al. Cardiac Senescence Is Associated with Enhanced Expression of Angiotensin II Receptor Subtypes 1. *Endocrinology*. 1998;139(5):2579-2587.
185. Benedetti MS, Dostert P. Monoamine oxidase, brain ageing and degenerative diseases. *Biochem Pharmacol*. févr 1989;38(4):555-61.
186. Hauptmann N, Grimsby J, Shih JC, Cadenas E. The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys*. 1996;335(2):295-304.
187. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. août 2000;29(3-4):222-30.
188. Kaludercic N, Carpi A, Menabò R, Di Lisa F, Paolocci N. Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. juill 2011;1813(7):1323-32.

# Annexes

**Annexe 1** : Facteurs de risque de complications de l'IC (Source : HAS)

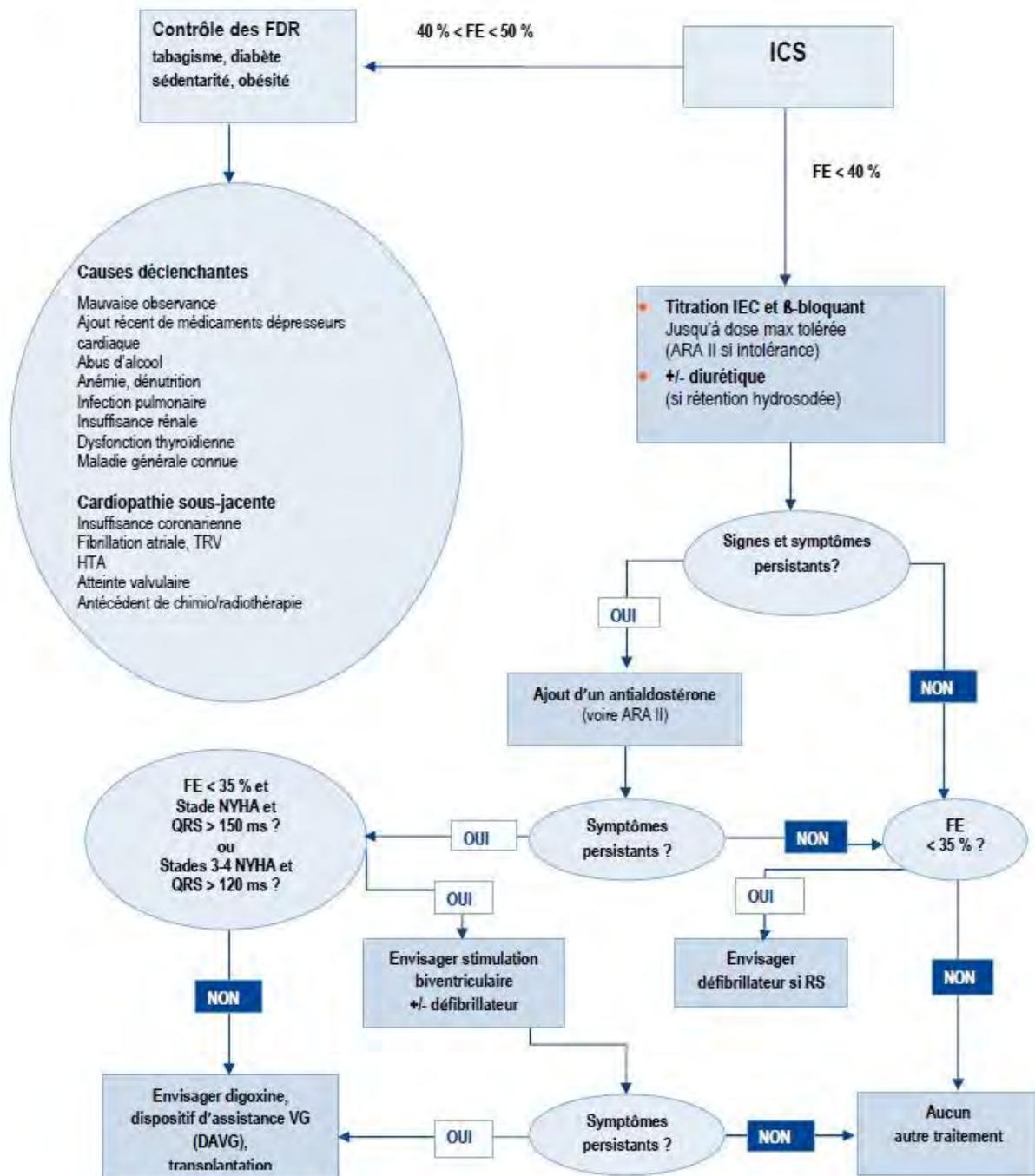
Terrain et contexte	Clinique	Électrophysiologie	Tolérance fonctionnelle / à l'effort	Biologie	Imagerie
Grand âge*	Hypotension*	Tachycardie Ondes Q	Capacité d'effort réduite Pic de VO <sub>2</sub> * abaissé	Élévation marquée du BNP/NTpro-BNP*	FEVG abaissée*
Origine ischémique*	Classe fonctionnelle NYHA III-IV*	QRS élargi*		Hyponatrémie*	
Arrêt cardiaque ressuscité*	Antécédent d'hospitalisation pour IC	HVG Arythmies ventriculaires complexes*		Élévation de la troponine* Élévation des biomarqueurs, activation neurohumorale*	
Mauvaise compliance	Tachycardie	Faible variabilité de la FC Fibrillation atriale	Test de marche 6 min bas	Élévation de la créatininémie	Augmentation des volumes VG
Insuffisance rénale	Crépitants pulmonaires	Alternance des ondes T	Pente VE/VC <sup>2</sup> élevée	Hyperbilirubinémie Anémie	Index cardiaque abaissé
Diabète	Sténose aortique		Respiration périodique	Hyperuricémie	Pressions de remplissage VG élevées
Anémie	IMC abaissé				Profil de remplissage mitral restrictif, HTP
BPCO	SAS				Altération de la fonction VD
Dépression					

\*: forte valeur prédictive

Source : European Society of Cardiology, Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). Eur Heart J 2008;29(19):2388-442.

Annexe 2 : Algorithme de prise en charge de l'ICS (Source : HAS)

Algorithme de prise en charge de l'ICS



Extrait du guide du parcours de soins « Insuffisance cardiaque », publié par la Haute Autorité de Santé en mai 2012.

Annexe 3 : Prise en charge thérapeutique de l'ICS (Source : HAS)

**Prise en charge thérapeutique\* selon le stade fonctionnel NYHA de l'insuffisance cardiaque systolique (ICS)**

Stade I NYHA	Stade II NYHA	Stade III NYHA	Stade IV NYHA
<b>Caractéristiques</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Pas de symptômes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Symptômes pour effort important</li> <li>■ Réduction modérée de l'activité physique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Symptômes à l'effort</li> <li>■ Réduction marquée de l'activité physique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Symptômes au repos</li> <li>■ Limitation sévère de l'activité physique</li> </ul>
<b>Traitement systématique</b>			
<b>Implication du patient dans sa prise en charge</b> : tous les professionnels de santé			
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Connaissance de la maladie et des signes d'alerte, mesure régulière du poids noté, éviter l'automédication</li> <li>● Régime sans sel modéré, activité physique adaptée</li> </ul>			
<b>IEC + <math>\beta</math>-bloquant</b> : titration progressive par médecin ayant l'expérience de l'IC chronique, après avis du cardiologue			
<b>Vaccinations antigrippale tous les ans et antipneumococcique</b> : médecin traitant			
<b>Traitement selon les symptômes</b>			
<b>Diurétiques</b> si signes congestifs : médecin traitant			
<b>Antialdostérone ou ARA II (ne JAMAIS associer)</b> après avis cardiologue			
<b>Traitement de la FA (anticoagulants oraux, digoxine, amiodarone)</b> : médecin traitant et/ou cardiologue			
<b>Réadaptation cardiaque</b> , selon avis cardiologue			
<b>Stimulation biventriculaire +/- DAI</b> , selon avis cardiologue			
<b>Dispositif d'assistance ventriculaire gauche</b> DAVG Transplantation cardiaque			

\* Hors épisodes aigus

Extrait du guide du parcours de soins « Insuffisance cardiaque », publié par la Haute Autorité de Santé en mai 2012.

Annexe 4 : Prise en charge thérapeutique de l'ICFEP (Source : HAS)

**Prise en charge thérapeutique\* selon le stade fonctionnel NYHA de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP)**

Stade I NYHA	Stade II	Stade III	Stade IV
<b>Caractéristiques</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Pas de symptômes</li> </ul>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Symptômes pour effort important</li> <li>■ Réduction modérée de l'activité physique</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Symptômes à l'effort</li> <li>■ Réduction marquée de l'activité physique</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Symptômes au repos</li> <li>■ Limitation sévère de l'activité physique</li> </ul>			
<b>Traitement systématique</b>			
<b>Implication du patient dans sa prise en charge</b> : tous les professionnels de santé			
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Connaissance de la maladie et des signes d'alerte, mesure régulière du poids noté, éviter l'automédication</li> <li>● Régime sans sel modéré, activité physique adaptée</li> </ul>			
<b>Prise en charge des FDR CVS</b> : tous les professionnels de santé			
Vaccinations antigrippale et antipneumococcique : médecin traitant			
<b>Traitement selon les symptômes</b>			
Diurétiques (courte période), si signes congestifs : médecin traitant			
<b>Traitement de la cardiopathie sous-jacente</b>			
<b>Traitement de la cardiopathie sous-jacente si elle existe</b> : HTA, insuffisance coronarienne, diabète			
<b>Traitement des facteurs déclenchants</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Contrôle FC (<math>\beta</math>-bloquant ou vérapamil) : médecin traitant et/ou cardiologue</li> <li>● Traitement FA (ACO, digoxine, amiodarone ; Anti-arythmiques classe 1 et sotalol contre-indiqués) : médecin traitant et/ou cardiologue</li> <li>● Traitement des infections : médecin traitant</li> <li>● Corriger l'anémie : médecin traitant</li> <li>● S'assurer de l'observance thérapeutique et rechercher l'automédication : médecin traitant</li> </ul>			
* Hors épisodes aigus.			

**Annexe 5 : Séquences des amorces utilisées en PCR en temps réel**

	<b>Séquence sens</b>	<b>Séquence anti-sens</b>
<b>P16</b>	CCGAACCTTTTCGGTCGTACCC	CTGCTACGTGAACGTTGCCCA
<b>P21</b>	CAGGCGCAGATCCACAGCGA	GCACACTTTGCTCCTGTGCGGA
<b>P15</b>	AGATCCCAACGCCCTGAAC	CAGTTGGGTTCTGCTCCGT
<b>Coro1</b>	TGCAGCTCCTCCATCCTTCTCT	TTTGCTGGAGCGAACCACCTG
<b>P38</b>	CCCAGAGATCATGCTGA AT	ACAACGTTCTCCGGTCAAC
<b>TGFb</b>	AGGGCTACCATGCCAATTCT	CCGGGTTGTGTTGGTTGTAGA
<b>Il6</b>	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTCATACA
<b>MAO-A</b>	GGAAGCCCGGGATAGAGTTG	TGGGTTGGTCCCACATAAGC
<b>bMHC</b>	AGGTGGCTCCGAGAAAGGAA	TGAGCCTTGGATTCTCAAACGT
<b>AGTR1</b>	TCTCCAGCTCTGCTGCTCT	CACTTGATCTGGTGATGGCTTTC
<b>GAPDH</b>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

---

**TITLE**

**Cardiac aging: Characterization of cardiomyocyte's senescence and the role of monoamine oxidase A**

---

**ABSTRACT**

The increase of life expectancy leads to many age-related diseases, including heart failure. In this study, we wanted to characterize the cardiac aging, including the senescence's mechanisms affecting the cardiomyocytes, due to their key role in the heart's contractile activity. Secondly, we sought to understand the impact of oxidative stress generated by MAO-A in this senescence.

The senescence phenomena lead to the modification of the expression's profile of many genes. In WT mice aged 20 months, we found such changes on whole heart, and also on isolated cardiomyocytes. We observed in cardiomyocytes, increased cellular hypertrophy's gene ( $\beta$ -MHC), cell cycle (p15, p16 and p21) or the appearance of a secretory phenotype (IL-6 and TGF  $-\beta$ ). MAO-A was also overexpressed in WT aged mice, leading to an increased MAO-A activity and oxidative stress in cardiomyocytes.

Using a transgenic mouse model (Tg) overexpressing MAO-A at heart level, we studied the effects of overexpression on senescence. These Tg mice showed a significant oxidative stress. We also found that the gene expression profile, found on whole heart of Tg mice was similar to that seen in older WT mice.

This study shows the important role of oxidative stress, including due to overexpression of MAO-A, in the entry into senescence of the cardiomyocytes.

---

**KEY WORDS** : Heart, Ageing, Monoamine Oxidase, Oxidative Stress

---

---

**TITRE**

**Vieillesse cardiaque : Caractérisation de la sénescence des cardiomyocytes et du rôle de la monoamine oxydase A**

---

**RESUME**

L'augmentation de l'espérance de vie conduit à de nombreuses pathologies liées au vieillissement, dont l'insuffisance cardiaque. Lors de cette étude, nous avons voulu caractériser le vieillissement cardiaque et notamment les mécanismes de sénescence touchant les cardiomyocytes, du fait de leur rôle majeur dans l'activité contractile du cœur. Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre l'impact du stress oxydant, généré par la MAO-A, dans cette sénescence.

Les phénomènes de sénescence conduisent à la modification du profil d'expression de nombreux gènes. Chez des souris WT âgées de 20 mois, nous avons retrouvé de telles modifications, sur cœur entier, et également sur cardiomyocytes isolés. Nous avons observé, chez les cardiomyocytes, une augmentation de gènes de l'hypertrophie cellulaire ( $\beta$ -MHC), du cycle cellulaire (p15, p 16 et p21) ou encore l'apparition d'un phénotype sécrétoire (Il-6 et TGF- $\beta$ ). La MAO-A était également surexprimé chez les souris WT âgées, conduisant à une activité MAO-A et un stress oxydant accrus au niveau des cardiomyocytes.

A l'aide d'un modèle de souris transgénique (Tg) surexprimant la MAO-A au niveau cardiaque, nous avons étudié les effets de cette surexpression sur la sénescence. Ces souris Tg présentaient un stress oxydant important. Nous avons également constaté que le profil d'expression génique, retrouvé sur cœur entier de souris Tg, était similaire à celui rencontré chez les souris WT âgées.

Cette étude montre le rôle majeur du stress oxydant, notamment dû à la surexpression de la MAO-A, dans l'entrée en sénescence des cardiomyocytes.

---

**DISCIPLINE administrative** : DES de Pharmacie Hospitalière

---

**MOTS-CLES** : Cœur, Sénescence, Monoamine Oxydase, Stress Oxydant

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :**

Inserm/UPS UMR 1048 - I2MC  
Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires  
1 avenue Jean Poulhès  
BP 84225  
31432 Toulouse Cedex 4

**Directeur de thèse:** Dr Jeanne MIALET-PEREZ