

Université de Montréal

**Rôle du TRPV1 dans la régulation cardio-protectrice des voies de
signalisation locale et distale**

Par

Jennifer BEN SALEM

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Philosophae Doctor* (Ph. D.)
en sciences vétérinaires, option pharmacologie

Juin 2022

© Jennifer Ben Salem, 2022

Cette thèse intitulée

**Rôle de TRPV1 dans la régulation cardio-protectrice des voies de
signalisation locale et distale**

Présentée par

Jennifer Ben Salem

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Pr Younès Chorfi

Président

Pr Francis Beaudry

Directeur de recherche

Dre Constandina Arvanitis

Codirectrice

Pr Mohamed Rhouma

Membre du jury

Pr Imourana Alassane-Kpembi

Membre du jury

Pr Reza Sharif

Membre du jury

Pr Arnaud Salvador

Membre du jury

Résumé

L'insuffisance cardiaque (IC) est l'une des principales causes de décès dans le monde. Les maladies cardiovasculaires sont devenues une préoccupation majeure de santé publique et le resteront probablement à l'avenir avec le vieillissement de la population et l'augmentation du taux de survie des patients atteints de maladies cardiovasculaires. L'infarctus du myocarde (IM) est le principal facteur de risque favorisant le développement de l'IC. L'une des principales caractéristiques de l'IC est une dérégulation du fonctionnement du système nerveux autonome (SNA), en particulier une hyperactivité du système nerveux sympathique (SNS) qui contribue largement à la progression de la maladie et à l'augmentation de la morbidité. Le mécanisme de l'hyperactivité du SNS n'est que partiellement connu. En ce qui concerne la progression de l'IM à l'IC, des études suggèrent un engagement concerté du cerveau (médulla), du nerf vague et des nerfs sympathiques, en plus du tissu cardiaque qui serait à l'origine de la maladie systémique. En plus des altérations du SNA, des exemples de comorbidités de l'IC comprennent des troubles cognitifs tel que l'anxiété et la dépression ainsi que des modifications atrophiques des régions cérébrales chez les patients atteints d'IC. L'ensemble, de ces données montrent l'importance du système nerveux central et périphérique dans l'IC. En plus du système nerveux cardiaque intrinsèque, qui comprend un réseau de ganglions intracardiaques et de neurones interconnectés, le cœur, en particulier l'épicarde, possède des milliers de neurones intégrés, dont beaucoup expriment le récepteur vanilloïde 1 (TRPV1). Au cours des dernières années, des études scientifiques ont montré que l'application épicaudique de résinifératoxine (RTX), un agoniste spécifique de TRPV1, au moment de l'IM induit, conduit à une réduction de la fibrose cardiaque, prévient l'hyperactivation du SNS et améliore la fonction cardiaque dans plusieurs modèles. La thèse visait à mieux caractériser la fonction de ces fibres exprimant TRPV1 dans l'IM et l'IC qui en découle. Les principaux objectifs de présente étude sont les suivants : 1) Identifier si les fibres épicaudiques exprimant TRPV1 entraînent des modifications des fonctions cérébrales. 2) Éclaircir les mécanismes moléculaires sous-jacents dans les tissus du système nerveux en aval des traitements IM et RTX en utilisant la protéomique ; et 3) Déterminer si les stimuli nociceptifs dans un modèle alternatif, *C. elegans*, via la modulation des récepteurs vanilloïdes orthologues par RTX, peuvent entraîner une modification du comportement et des mécanismes moléculaires associés aux effets induits par l'exposition à RTX. Pour répondre à ces objectifs, nous avons combiné la dénervation des afférences

sympathiques cardiaques, via l'application épiscopique de RTX, avec un modèle IM validé. Des études comportementales ont été menées pour évaluer la dépression et l'anxiété des animaux après le début de l'IC. L'analyse protéomique a été réalisée sur plusieurs tissus dont le cortex frontal, le ventricule gauche, le bulbe rachidien (médulla), la moelle épinière et le nerf vague. Les principaux résultats de cette thèse ont montré que la dénervation afférente cardiaque sympathique par RTX atténue le remodelage cardiaque et restaure la fonction cardiaque lors d'un IM dans un modèle murin. L'analyse comportementale a démontré que les souris IM sont déprimées et anxieuses et que le traitement RTX réduit significativement l'expression du phénotype anxieux. La protéomique réalisée sur des cortex frontaux isolés a identifié des signatures protéiques uniques pour chacun des groupes (IM, RTX et IM/RTX), indiquant des voies partagées et uniques attribuées par IM et RTX. Les analyses bio-informatiques ont montré un enrichissement significatif des voies métaboliques dans tous les tissus et traitements, et à tout moment, suggérant un rôle central de la fonction mitochondriale après les traitements IM et RTX. Des voies fonctionnelles enrichies dans ces tissus, y compris le cytosquelette, les vésicules et la transduction du signal, peuvent être en aval des réponses initiées par les mitochondries en raison de modifications du taux d'impulsion neuronale après un IM ou d'une altération de la communication cœur-cerveau après l'application de RTX. Certaines voies et molécules communes ont aussi été observées chez *C. elegans*, comme la voie de signalisation de Wnt, ce qui suggère des effets semblables de RTX. La thèse contribue à une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques des nerfs exprimant TRPV1 et offre des informations clés pour comprendre les mécanismes sous-jacents aux troubles neurologiques d'origine cardiaque. Le modèle de *C. elegans* peut servir de futur modèle pour tester des molécules pharmacologiquement actives pour de futures thérapies.

Mots-clés : Afférences cardiaques, TRPV1, Résinifératoxine, Insuffisance cardiaque, protéomique, dépression, voies métaboliques, *C. elegans*.

Abstract

Heart failure (HF) is one of the leading causes of death worldwide. Cardiovascular diseases are therefore becoming a major health problem and will probably continue to be so in the future with the aging of the population and the increase in the survival rate of patients with cardiovascular disease. Myocardial infarction (MI) is the main risk factor for developing HF. One of the prominent features of HF is a dysregulation in the functioning of the autonomic nervous system (ANS), in particular a sympathetic nervous system (SNS) hyperactivity that largely contributes to disease progression and increased morbidity. The mechanism for the SNS hyperactivity is only partially known. Regarding the progression from MI to HF, studies suggest a concerted engagement of the brain (medulla oblongata), the vagus nerve and the sympathetic nerves, in addition to cardiac tissue that are thought to instigate systemic disease. In addition to the alterations in the ANS, examples of HF comorbidities include cognitive impairment and atrophic changes in brain regions in HF patients. Together these data show the importance of the central and peripheral nervous system in HF. In addition to the intrinsic cardiac nervous system, which includes a network of intracardiac ganglia and interconnecting neurons, the heart, especially the epicardium, has thousands of embedded neurons, many of which express the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1). Over recent years studies have shown that the epicardial application of resiniferatoxin (RTX), a specific agonist of TRPV1, at the time of induced MI, leads to a reduction of cardiac fibrosis, prevents hyperactivation of the SNS and improves the heart function in several model systems. The thesis was aimed to better characterize the function of these TRPV1-positive fibers in MI and resulting HF. The main objectives of the current study were : 1) To identify whether the TRPV1 expressing epicardial fibers lead to changes in brain activity and function. 2) To elucidate the underlying molecular mechanisms in nervous system tissue downstream from MI and RTX treatments using proteomics; and 3) To determine if nociceptive stimuli in an alternate model, *C. elegans*, via the modulation of orthologous vanilloid receptors by RTX, can lead to altered behavior and molecular mechanisms associated with RTX exposure-induced effects. To meet these objectives, we combined denervation of cardiac sympathetic afferents, via epicardial application of RTX, with a validated MI model. Behavioral studies were carried out to evaluate the depression and anxiety of the animals after the onset of HFt. Proteomic analysis was carried out on several tissues including the frontal cortex, left ventricle, medulla oblongata, spinal cord,

and vagus nerve. The major findings of this thesis are that sympathetic cardiac afferent denervation by RTX attenuates cardiac remodeling and restores cardiac function during MI in a mouse model. Behavioral analysis demonstrated that MI mice are depressed and anxious and that RTX treatment significantly reduced the expression of the anxious phenotype. Proteomics performed on isolated frontal cortices identified unique protein signatures for each of the groups (MI, RTX and MI/RTX), indicating shared and unique pathways attributed by MI and RTX. Bioinformatic analyses showed a significant enrichment for metabolic pathways in all tissues and treatments, and at all time points, suggesting a central role of mitochondria function following MI and RTX treatments. Enriched functional pathways in these tissues, including cytoskeleton, vesicles, and signal transduction, may be downstream of mitochondria-initiated responses due to changes in neural impulse rate after MI or altered heart-brain communication following RTX application. Some common pathways and molecules were observed in *C. elegans*, such as the Wnt signaling pathway, suggesting similar effects of RTX. The current thesis contributes to a better understanding of the physiological mechanisms of the TRPV1 expressing nerves and offers key information to understand the mechanisms underlying neurological disorders of cardiac origin. The *C. elegans* model may serve as a future model for testing pharmacologically active molecules for future therapeutics.

Keywords : Cardiac afferences, TRPV1, Resiniferatoxin, Heart failure, proteomic, depression, metabolic pathways, *C. elegans*.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Table des matières	7
Liste des tableaux	10
Liste des figures	11
Liste des abréviations	16
Remerciements	19
Chapitre 1 – Revue de littérature	25
1. Anatomie et physiologie générale du cœur	25
2. Neurocardiologie	28
2.1. Innervation cardiaque	28
2.2. Système nerveux parasympathique (SNP)	29
2.3. Système nerveux sympathique (SNS)	30
2.4. Système nerveux cardiaque intrinsèque (SNCI)	30
2.5. Les fibres afférentes cardiaques	32
3. Insuffisance cardiaque (IC)	33
3.1. Infarctus du myocarde	34
3.2. Modèles d'étude	34
3.3. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'IC	37
3.3.1. Mécanismes de remodelage cardiaque	37
3.3.2. Mécanismes neuro-hormonaux	38
3.3.3. Effets de l'activation du SNS dans l'IC	40
3.3.4. Les médiateurs chimiques dans l'IC	40
3.3.5. Neuropeptides	42
4. Physiologie et physiopathologie de la douleur	43
4.1. Définition et classification	43
4.2. Différents types de douleur	43
4.2.1. Processus de Nociception	44
4.2.2. Neurones sensoriels primaires	45
4.2.3. Canaux ioniques	47
4.2.4. Les nocicepteurs	48
4.2.5. Rôle de la première synapse dans la ME	50
4.2.6. Nociception cardiaque	51
5. La famille des TRP	52
5.1. Historique	52

5.2. Les différentes familles	52
5.2.1. Structure des TRP	53
5.2.2. La sous-famille des TRPV (Vanilloïde)	54
5.3. TRPV1	56
5.3.1. Structure de TRPV1	56
5.3.2. Localisation de TRPV1	58
5.3.3. Mécanisme d'action	59
5.3.3.1. Les tachykinines	60
5.3.3.2. Le CGRP	61
5.3.3.3. Processus protéolytique	61
5.3.4. Ligands au TRPV1	63
5.3.5. Fonctions de TRPV1	67
5.3.5.1. Rôle dans la nociception	67
5.3.5.2. Rôle dans l'infarctus du myocarde	68
6. Introduction sur <i>Caenorhabditis elegans</i>	72
6.1. Neuroanatomie et neurophysiologie de <i>C. elegans</i>	72
6.2. Nocicepteurs chez <i>C. elegans</i>	74
6.2.1. OSM-9 et OCR-2	74
6.2.2. Fonction de OSM-9 et OCR-2 chez <i>C. elegans</i>	75
6.2.3. Régulation des canaux TRP chez <i>C. elegans</i>	76
6.3. Neurotransmission chez <i>C. elegans</i>	77
6.4. Biosynthèse des neuropeptides chez <i>C. elegans</i>	79
7. La spectrométrie de masse pour l'analyse protéomique	81
7.1. Principe général	81
7.2. Les sources d'ionisation électrospray (ESI)	82
7.3. Analyseurs	83
7.3.1. Quadrupôle	84
7.3.2. Orbitrap	84
7.3.3. Q Exactive plus	85
7.4. Analyse protéomique	86
7.4.1. Approche globale et ciblée	87
7.4.2. Principe de la protéomique ascendante dite « bottom-up »	89
7.4.3. Quantification sans marquage ou « Label free »	90
7.4.4. Analyse bioinformatique	91
7.4.4.1. Identification des termes GO et analyse d'enrichissement	91
7.4.4.2. Analyse des voies de signalisation	91
7.4.4.3. Analyse des interactions protéine-protéine	92
Chapitre 2 : Les articles	95
Article 1 : Deciphering the Role of EGL-3 for Neuropeptides Processing in <i>Caenorhabditis elegans</i> using High-Resolution Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry	96
Article 2 : Resiniferatoxin hampers the nocifensive response of <i>Caenorhabditis elegans</i> to noxious heat, and pathway analysis revealed that the Wnt signaling pathway is involved	120
Article 3 : Cardiac sensory afferents modulate susceptibility to anxio-depressive behaviour in a mouse model of chronic heart failure	145
Article 4 : Proteomics reveals long-term alterations in signaling and metabolic pathways following both myocardial infarction and chemically induced denervation	184
Article 5 : Evaluation of Upconverting nanoparticles towards heart theranostics	222
Chapitre 3 – Discussion générale	240
1. Les résultats obtenus	242

1.1.	Mécanismes de biosynthèse de neuropeptides chez <i>C. elegans</i> similaires à celui des mammifères	242
1.2.	Activation des récepteurs vanilloïdes chez <i>C. elegans</i>	243
1.3.	Activation cardiaque de TRPV1 améliore les paramètres hémodynamiques du cœur	243
1.4.	Activation cardiaque de TRPV1 module le phénotype cérébral en ayant une action sur le comportement dépressif	244
1.5.	Activation cardiaque de TRPV1 module la signalisation et les voies métaboliques	245
1.6.	Rôle de TRPV1 au niveau cardiaque tout en contrôlant la libération spatiotemporelle de RTX	245
2.	Discussion sur l'implication des résultats	246
3.	Perspectives envisagées	247
4.	Limites de l'étude	253
Conclusion		255
Références bibliographiques		256
Annexes		273
	Article 2 :	273
	Article 4 :	290

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principaux modèles expérimentaux d'IC développés chez les rongeurs. Tableau issu de la publication (Patten R.D. et Hall-Porter M.R. 2009). _____ 36

Tableau 2 : Caractéristiques générales pour distinguer les deux grandes catégories de douleur : la douleur neuropathique et la douleur nociceptive⁸⁴⁻⁹¹. _____ 44

Tableau 3 : Les différents et principaux ligands de TRPV1 connus soit agoniste ou antagoniste¹⁷¹⁻¹⁷³. _____ 64

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie et physiologie du cœur : différentes parties du cœur montrant le flux sanguin intracardiaque (flèches). Le cœur est un muscle strié composé de 4 cavités possédant chacune leur propre fonction : 2 oreillettes et 2 ventricules. L'oreillette droite (OD) et l'oreillette gauche (OG) sont situées à la base du cœur et sont séparées par le septum intra-auriculaire. Le ventricule droit (VD) et le ventricule gauche (VG), situés à l'apex du cœur, sont séparés par le septum interventriculaire. (Figure issue du site CHUV de Lausanne Suisse, service de Cardiologie)

26

Figure 2 : Péricarde pariétal et péricarde viscéral. Le péricarde est la séreuse du cœur qui a deux composantes une pariétale et une viscérale. Le péricarde pariétal est composé de deux couches : une séreuse (ligne fine rouge) et une fibreuse (ligne plus épaisse jaune). Le péricarde viscéral est composé d'une seule couche séreuse couvrant tout le cœur (ligne rouge au contact du myocarde en bleu). Il faut noter les couches séreuses des deux péricardes sont continue et constituées de cellules mésothéliales et ces deux couches se font face. L'espace situé entre les deux couches séreuses des deux péricardes pariétal et viscéral est la cavité péricardique. Figure adaptée de la publication (Rodriguez E.R. et Tan C.D., 2017).

27

Figure 3 : L'innervation du cœur est établie par deux grands systèmes nerveux : le système sympathique et le système parasympathique. Le système sympathique a une origine au niveau thoracique de la moelle épinière et fait relais dans la chaîne sympathique dorsale au niveau de ganglions et les nerfs se distribuent ensuite à l'ensemble du tissu cardiaque que ce soit les structures nodales ou myocardiques. Le système parasympathique implique les nerfs vague droit et gauche, dont le droit va innerver le nœud sinusal (NS) et le myocarde auriculaire droit tandis que le nerf gauche régule l'activité de l'oreillette gauche et le nœud auriculoventriculaire (NAV). Figure adaptée de la publication (Shen M.J. et al. 2014).

29

Figure 4 : Les voies de communication neuronales qui interagissent entre le cœur et le cerveau qui constituent l'innervation du cœur par deux grands systèmes nerveux et un système nerveux cardiaque intrinsèque. Le système nerveux cardiaque intrinsèque intègre des informations provenant du système nerveux extrinsèque et des nerfs sensoriels du cœur. Les ganglions cardiaques extrinsèques situés dans la cavité thoracique sont indirectement connectés via la moelle épinière. Le nerf vague qui fait partie du système parasympathique est principalement constitué de fibres afférentes situé au niveau du nœud du sinus auriculaire et qui se connectent à la moelle et se termine dans la région du tronc cérébral la médulla. Le système sympathique est composé de fibres afférentes provenant de la région thoraco-cervicale de nerfs spinaux au niveau du nœud auriculo-ventriculaire et du nœud du sinus auriculaire. Figure adaptée de la publication (Mccrarty R. 2016).

31

Figure 5 : Neurotransmission cardiaque à partir des fibres afférentes cardiaques intrinsèques. Le contrôle autonome du cœur est composé d'une série de boucles de rétroaction imbriquées, des neurones intracardiaques aux neurones extracardiaques intrathoraciques et au système nerveux central. (SG ganglion sympathique DRG ganglion de la racine dorsale). Figure adaptée de la publication (Hanna P. et al. 2018).

33

Figure 6 : Illustration du modèle d'étude par ligature de l'artère coronaire gauche en tant que modèle d'infarctus du myocarde. Une thoracotomie du côté gauche est effectuée sur une souris anesthésiée et une ligature avec un fil est faite au ventricule gauche obstruant l'artère coronaire gauche. L'acte chirurgical entraîne une occlusion permanente de l'artère coronaire interventriculaire antérieure gauche interrompant le flux sanguin dans le ventricule gauche, provoquant une hypoxie irréversible qui va par la suite former la zone infarctée. L'infarctus est une cicatrice permanente dans le myocarde ventriculaire.

37

Figure 7 : Activation des systèmes neurohormonaux dans l'IC comme le système rénine angiotensine aldostérone. La diminution du débit cardiaque chez les patient atteint d'insuffisance cardiaque avec une fraction d'éjection réduite entraîne le déchargement des barorécepteurs à hautes pression (point noire sur la figure) dans le ventricule gauche, le sinus carotidien et l'arc aortique. Cette décharge conduit à la génération de signaux afférents au SNC qui à son tour conduit à l'activation des voies efférentes du système nerveux sympathique qui innervent le cœur, le rein, le système vasculaire périphérique et les muscles squelettiques. Cette décharge conduit

également à des signaux afférents du SNC qui stimulent les centres cardiorégulateurs du cerveau qui stimule la libération de vasopressine au niveau de l'hypophyse. Figure adaptée de la publication (Hartupee J. et Mann D.L. 2017). _____ 39

Figure 8 : Différents médiateurs chimiques ont une influence directe sur l'activité du cœur et du système vasculaire en condition pathologique d'insuffisance cardiaque. L'activation du système nerveux sympathique, du SRAA, et de la réponse inflammatoire sont des mécanismes importants dans la progression de l'IC induisant au niveau du cœur le remodelage cardiaque. L'activation de la voie du TNF- α a des effets cardioprotecteurs en réduisant l'ischémie et la lésion lors de reperfusion dans des modèle de cœurs isolé. Mais en condition chronique d'IC il y a une forte augmentation de médiateurs inflammatoires conduisant au développement et à la progression de l'IC comprenant l'activation des cytokines et des chimiokines impliquées dans la migration des leucocytes et favorisant l'inflammation et l'apoptose cellulaire au niveau du cœur et des vaisseaux sanguins. Figure adaptée de la publication (Grosman-Rimon L. et al. 2020). _____ 41

Figure 9 : Schéma général du principe du processus de nociception. En périphérie, les neurones sensoriels primaires sont activés à la suite d'une stimulation excessive dites nocive, ce qui entraîne l'activation de nocicepteur tel que TRPV1. En suite l'information est transmise au niveau de la moelle épinière jusqu'à être acheminée à différentes régions cérébrales^{93,94}. _____ 45

Figure 10 : Caractéristiques des différentes fibres sensorielles impliquées dans la perception de la douleur. Les fibres sont actives à différents stade de la douleur comme montré sur les diagramme. Dans notre cas ce sont les fibres A δ et C qui sont intéressantes afin de comprendre la nociception. Figure adaptée de la publication (Julius D. et Basbaum A. 2001). _____ 46

Figure 11 : Représentation schématique de l'organisation des fibres sensorielles primaires se projetant dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les fibres nociceptives sensorielles se terminent principalement dans la corne dorsale superficielle. Les fibres A δ se terminent au niveau des couches laminaires I et V et les fibres C sont au niveau des laminae II et V. Tandis que les fibres A β mécaniques ont leurs terminaisons localisées au niveau de couches laminaires plus profondes. Figure adaptée de la publication (Comitato A. et Bardoni R. 2021). _____ 47

Figure 12 : Sensibilisation périphérique et propagation du signal par les nocicepteurs. Les terminaisons périphériques répondent aux stimuli nocifs par le biais de canaux ioniques tels que les récepteur TRP, ASIC HCN et P2X et des récepteurs RCPG tels que la bradykinine (BK), la neurokinine (NK) et les récepteurs P2Y qui modulent indirectement les canaux ioniques et les voies de signalisation intracellulaires. Lorsqu'un seuil de dépolarisation est atteint, les canaux sodium et calcium voltage dépendants (NaV et CaV) sont activés ce qui génère un potentiel d'action. Alors que les canaux potassique voltage dépendant (Kv) s'ouvrent et repolarise la membrane inactivant les canaux Nav et ramenant le neurone dans un état de repos. Le potentiel d'action se propage le long de l'axone ce qui est le processus de transduction. Figure adaptée du site <https://www.news-medical.net/whitepaper/20190817/Ion-Channels-Involved-in-Pain.aspx>. _____ 49

Figure 13 : Schéma des voies de perception de la douleur. La douleur est initiée en périphérie par une stimulation excessive des nocicepteurs présents à la terminaison des fibres sensorielles primaires, il y a transduction est conduction du signal vers la moelle épinière (première synapse) puis la transmission de l'influx nerveux vers les voies ascendantes passant par des centres intégrateurs, la médulla, le mésencéphale, le thalamus pour être perçu au niveau du cortex. Ce sont les voies spinothalamiques. Mais il y a aussi une modulation de la perception de la douleur par l'implication de voies descendantes inhibitrices tel que les peptides opioïdes ou encore norépinephrine. _____ 50

Figure 14 : Arbre phylogénétique des TRP montrant les liens de parenté entre différentes espèces. Notamment la famille des TRPV chez les mammifères comme la souris présente des similitudes et de l'orthologie avec des récepteurs présents chez des espèces inférieures comme chez C. elegans (nématode). Figure adaptée de la publication (Christensen A.P. et Corey D.P. 2007) _____ 53

Figure 15 : Organisation structurale de l'ensemble des sous familles des TRP et les caractéristiques générales de plusieurs récepteurs TRP sensible à la chaleur et connus pour être activés par différentes molécules d'intérêt pharmacologique. Figure adapté de la publication (Montell C. 2005) et de la thèse de Mouna Saidi. _____ 54

Figure 16 : Différents rôles connus des canaux TRPV dans le tissu cardiaque en condition physiologique. Les TRPV sont distribués dans tout le système cardiovasculaire, du myocarde et dans le système nerveux intrinsèque du cœur. Ils exercent des fonctions bien spécifiques en fonction de leur localisation. Figure adaptée de la publication (Miller M. et al. 2021). _____ 55

Figure 17 : Différents rôles connus de la réponse des canaux TRPV aux stimuli pathologiques au sein du tissu cardiaque. TRPV1 est un récepteur présent et sensible à l'ischémie myocardique mais peu de fonctions bien définies sont décrites. Figure adaptée de la publication (Miller M. et al. 2021) _____ 56

Figure 18 : Schéma illustrant les principales caractéristiques structurales du contrôle et de la régulation du récepteur TRPV1. Le canal TRPV1 est une protéine à six domaines transmembranaires, il peut être activé par différents effecteurs tels que la chaleur, les protons et bien entendu les vanilloïdes comme la capsaïcine. L'interaction des différents effecteurs se réalise sur différents sites soit extracellulaire soit intracellulaire comme c'est le cas pour la capsaïcine. Figure adaptée des publications (Leonelli M. et al. 2011) et (Latorre R. et al. 2007). _____ 58

Figure 19 : Cascade de l'activation de TRPV1. Le récepteur TRPV1 est sensible à différents agonistes endogènes ou exogènes comme la capsaïcine. Son activation induit l'ouverture des canaux calciques et sodiques entraînant une dépolarisation cellulaire et la sensibilisation centrale et périphérique. _____ 60

Figure 20 : Schéma général de la neurotransmission médiée par des neurotransmetteurs peptidiques : les neuropeptides. Les neuropeptides sont des médiateurs chimiques importants dans la communication synaptique entre neurone. Les neuropeptides sont synthétisés dans des vésicules de sécrétion qui sont transportées du corps cellulaire vers la terminaison axonale. Le proneuropeptide est stocké dans des vésicules nouvellement formées dans le corps cellulaire et le clivage protéolytique de la protéine précurseur se produit durant le transport axonal et la maturation des vésicules. Les neuropeptides actifs sont alors contenus dans des vésicules qui les sécrètent par exocytose dans l'espace intersynaptique. Les neuropeptides actifs libérés peuvent à leur tour interagir avec leur récepteur post synaptique afin d'activer les voies de neurotransmission ascendante. Figure adaptée de la publication (Hook V. et al. 2008). _____ 62

Figure 21 : Représentation schématisée du processus protéolytique mis en place pour obtenir un neuropeptide actif à partir d'un proneuropeptide précurseur. Il existe plusieurs voies afin d'obtenir un neuropeptide biologiquement actif. Les clivages protéolytiques sont tous réalisés au niveau de résidus basiques soit dibasiques ou monobasiques pour les deux voies ce qui correspond au numéro 1, 2 et 3. La première voie met en évidence l'action de la cathepsine L qui a une préférence pour cliver du côté N-terminal des sites dibasiques (numéro 1) qui donne des intermédiaires peptidiques avec des résidus au niveau de la terminaison NH₂, qui sont ensuite éliminés par une Arg/Lys aminopeptidase. Alors que la seconde voie implique les protéases convertases (PC1 et PC2) qui clivent préférentiellement du côté C-terminal des sites dibasiques donnant des intermédiaires peptidiques avec des extensions de résidus basiques à leur extrémité COOH qui sont ensuite éliminés par une carboxypeptidase E/H. Figure adaptée de la publication (Hook V. et al. 2008). _____ 63

Figure 22 : Structures des agonistes vanilloïdes de TRPV1, la Capsaïcine (CAP) molécule responsable du piquant dans le piment fort et la résinifératoxine (RTX) molécule irritante extraite de Euphorbia. La partie rouge des molécules représente le pharmacophore le noyau vanillyl. La partie bleue permet de faire la liaison avec la partie hydrophobe (noire) pour la capsaïcine c'est une fonction ester et pour RTX c'est une fonction amide. Figure adaptée de la publication (Lee J.H. et al. 2011). _____ 65

Figure 23 : Images confocales montrant le marquage par immunofluorescence des récepteurs TRPV1 dans le ventricule gauche du cœur (barres d'échelle : 15 µm en A et B) et les ganglions de la racine dorsale thoracique (DRG, barres d'échelle : 30 µm en C et D) chez des rats traités soit par véhicule (contrôle) ou soit des rats traités par RTX. L'immunofluorescence au TRPV1 est dotée plus intense au niveau de la surface épicaudique du cœur chez le rat contrôle. _____ 68

Figure 24 : Images de microscopie confocale montrant l'expression de TRPV1 au niveau des terminaisons nerveuses sensorielles à la surface épicaudique ventriculaire sous un objectif 40x chez des souris TRPV1cre-tdTomato+/- (TRPV1cre-Tom+/-). Les flèches blanches pointent les terminaisons nerveuses sensorielles TRPV1 GFP-positives.

PGP9.5 : marqueur spécifique des neurones et des terminaisons nerveuses. n = 5/groupe témoin tdTomato, n = 7/TRPV1cre-tdTomato+/- groupe. _____ 69

Figure 25 : Images de microscopie confocale montrant une absence de fluorescence positive GFP dans les cardiomyocytes. Pour le panneau d'images de droite ce sont des cardiomyocytes ventriculaires observés sous l'objectif 10x (A) et l'objectif 40x (B) chez les souris TRPV1cre-tdTomato+/- (TRPV1cre-Tom+/-) et tdTomato. Pour le panneau de gauche ce sont des cardiomyocytes auriculaires observés aussi à l'objectif 10x (A) et 40x (B) dans les deux modèles de souris. DAPI : 4,6-diamidino-2-phénylindole, un marqueur du noyau cellulaire. Troponin I : marqueur des cardiomyocytes. n = 5/groupe tdTomato, n = 7/TRPV1cre-tdTomato+/- groupe. _____ 69

Figure 26 : Schéma explicatif du système nerveux de *C. elegans*. Le système nerveux de *C. elegans* est défini comme simple et constitue généralement par un anneau nerveux et des ganglions au niveau de la tête, le long du corps une corde nerveuse ventrale et dorsale et au niveau de la queue des ganglions. La majorité des neurones sensoriels sont localisés au niveau de la tête notamment ceux impliqués dans les mécanismes de nociception et de thermosensation nocive : ASH, AFD et AWC. _____ 73

Figure 27 : Schéma explicatif des mécanismes mis en place suite à l'activation de récepteurs homologues de TRPV1 chez *C. elegans*. Des récepteurs homologues de TRPV1 sont présents chez *C. elegans* comme les OCR-1 à 4 et OSM-9. Suite à l'exposition à RTX ou à la capsaïcine, une entrée massive de calcium se produit et entraîne une dépolarisation membranaire et un changement de conformation du récepteur qui provoque la fermeture du canal. Une migration des vésicules est déclenchée entraînant le ralargage de neurotransmetteurs et de neuropeptides au niveau de la fente synaptique. Ces derniers pourront agir sur des récepteurs post synaptique afin de produire un message d'alerte pour l'organisme par exemple comme le comportement d'évitement suite à une stimulation à la chaleur nocive. _____ 79

Figure 28 : Représentation schématique du processus protéolytique mis en place pour obtenir un neuropeptide actif à partir d'un proneuropeptide précurseur chez *C. elegans*. Il existe plusieurs voies afin d'obtenir un neuropeptide biologiquement actif. Les clivages protéolytiques sont tous réalisés au niveau de résidus basiques soit dibasiques ou monobasique. La première voie met en évidence l'action de différentes enzymes comme KCP-1, BLI-4 ou AEX-5 qui ont une préférence pour cliver du côté N-terminal des sites dibasiques (numéro 1) qui donne des intermédiaires peptidiques avec résidus au niveau de la terminaison NH₂, qui sont ensuite éliminés par CPD-1 ou CPD-2. Alors que la seconde voie implique EGL-3 qui clive préférentiellement du côté C-terminal des sites dibasiques donnant des intermédiaires peptidiques avec des extensions de résidus basiques à leur extrémité COOH qui sont ensuite éliminés par EGL-21. Figure adaptée de la publication (Hook V. et al. 2008). _____ 80

Figure 29 : Représentation simplifiée d'un spectromètre de masse. Il est constitué de différentes parties : une source d'ionisation permettant l'ionisation de l'échantillon, un analyseur de masse qui sépare les ions produits en fonction de leur rapport m/z, un détecteur qui convertit le courant ionique en courant électrique, ensuite il y a le traitement du signal par l'ordinateur qui représente les données dans un spectre de masse qui est un graphique exprimant l'abondance en fonction de leur rapport m/z des ions. Il peut se produire une fragmentation de type MS/MS des ions parents donnant des ions fragments pour des spectre MS/MS. Figure issue du centre suisse de contrôle de qualité. _____ 81

Figure 30 : Processus de l'électrospray, schéma représentant l'obtention d'ions en spectrométrie de masse dans la source d'ionisation de type ESI avec la formation de gouttelettes. Figure issue de la thèse de Ludovic Beuvier. _____ 83

Figure 31 : Schéma du principe de l'analyseur de masse quadripôle. L'ionisation se produit au niveau de la source. Les ions sont ensuite accélérés et focalisés par une lentille dans le quadripôle. Les tiges opposées ont le même potentiel appliqué. Les tensions appliquées aux barres sont utilisées pour contrôler le parcours des ions lorsqu'ils se déplacent le long de la trajectoire des ions en vol au centre des quatre barres. La flèche rouge représente la trajectoire de vol d'un ion résonnant alors que la flèche bleue est la trajectoire de vol d'un ion non résonnant. Figure adaptée de l'Université : University of Bristol, NERC life sciences mass spectrometry facility. _____ 84

Figure 32 : Schéma représentatif d'un analyseur de masse Orbitrap. Dans l'Orbitrap les ions oscillent autour d'une électrode centrale en forme de broche tout en oscillant également dans la dimension axiale. L'oscillation axiale est détectée par des électrodes pour produire un transitoire, qui est transformé en spectre de masse résultant par

*la transformation de Fourier. Le transitoire est la fréquence d'oscillation des ions dans la dimension axiale et sera unique pour chaque m/z. Figure adaptée de la publication (Savaryn J.P. et al. 2016).*_____ 85

*Figure 33 : Schéma illustrant un Q exactive plus. Figure issue du site de ThermoFisher scientific.*_____ 86

Liste des abréviations

ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine
ACG : Artère coronaire gauche
ACh : Acétylcholine
C. elegans : *Caenorhabditis elegans*
Ca²⁺ : Ion calcium
CAP : Capsaïcine
CAPZ : Capzazépine
CaV : Canaux voltage dépendant du calcium
CGRP : Peptide lié au gène de la calcitonine
DRG : Dorsal root ganglion (ganglion de la racine dorsale)
ESI : Electrospray ionization (Ionisation par électrovaporisation)
GO : Gene ontology (terme GO)
HPLC : High performance liquid chromatography (Chromatographie liquide à haute performance)
IC : Insuffisance cardiaque (Heart failure HR)
IM : Infarctus du myocarde (Myocardial infarct MI)
IM/RTX : Groupe de souris ayant subi l'infarctus du myocarde et l'injection de RTX (MI/RTX)
K⁺ : Ion potassium
K : Lysine
m/z : Ratio masse sur charge
min : Minute
MALDI : Matrix assisted laser desorption ionization (Désorption ionisation laser assistée par une matrice)
ME : Moelle épinière
MS : Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse)
MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
NE : Norépinéphrine
NKA : Neurokine A
NSA : Nœud sinusal auriculaire
NAV : Nœud auriculoventriculaire

NTS : Noyau du tractus solitaire
OCR-1 à 4 : Récepteur orthologue à TRPV1 chez *C. elegans*
OD : Oreillette droite
OG : Oreillette gauche
OSM-9 : récepteur orthologue à TRPV1 chez *C. elegans*
PC : Protéine convertase
ppm : partie par million
SG : Ganglion sympathique
Sham : Groupe contrôle de souris ayant subi la thoracotomie seulement
SP : Substance P
SNA : Système nerveux autonome
SNC : Système nerveux central
SNCI : Système nerveux cardiaque intrinsèque
SNP : Système nerveux parasympathique
SNS : Système nerveux sympathique
SRAA : Système rénine angiotensine aldostérone
R : Arginine
RTX : Résinifératoxine
TAC : Constriction de l'aorte ascendante
TAC1 : Protachykinine 1
TNF- α : Facteur de nécrose tumoral α
TRP : Transient receptor potential
TRPV1 : Transient receptor potential vanilloid 1
UNCP : Up converting nanoparticle (Nanoparticule dites "up converting")
VD : Ventricule droit
VG : Ventricule gauche

Le travail de cette thèse se résume dans ces phrases : « La vie n'est pas facile pour aucun de nous, mais quoi, il faut avoir de la persévérance et surtout de la confiance en soi. Il faut croire que l'on est doué pour quelque chose et que cette chose il faut l'atteindre coûte que coûte. »

Marie Curie

« Le succès vient de la curiosité, de la concentration, de la persévérance et de l'autocritique »

Albert Einstein

Remerciements

Personne ne peut savoir comment j'ai pu me sentir durant ces années mais je tiens à remercier toute personne de mon entourage qui a été présent de près ou de loin pour m'apporter réconfort durant les situations les plus difficiles. Mais je sais que je n'ai rien lâché et cette thèse est le fruit de ma persévérance qui est je pense devenue ma force à ce jour.

Dans un premier temps, je souhaiterais adresser mes sincères remerciements aux professeurs Reza Sharif, Arnaud Salvador, Imourana Alassane-Kpembé, Mohamed Rhouma et Younès Chorfi d'avoir accepté de faire partie des membres de mon jury pour évaluer mon travail de recherche. Merci à vous pour vos corrections et vos commentaires qui permettront de finaliser l'écriture et la soutenance de cette thèse.

Je souhaite particulièrement remercier mes directeurs de thèse Dre Constandina Arvanitis et Dr Francis Beaudry sans lequel ces travaux n'auraient pas pu voir le jour. Grâce à vous j'ai pu poursuivre mes études en réalisant un PhD en cotutelle (qui j'avoue n'a pas toujours été facile) dans les deux pays qui me tenaient à cœur. Je tiens à vous remercier de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir permis d'intégrer vos laboratoires à chacun qui m'a donné la chance d'avoir des expertises complètement différentes dans divers domaines. Vos expertises différentes que j'ai pu bénéficier ont fait que nous avons pu créer un projet multidisciplinaire et riche de nombreux défis, que nous avons partagé et discuté ensemble. Merci à vous deux de m'avoir encadrée le long de ce projet et de m'avoir apporté vos connaissances afin de pouvoir devenir chercheuse. A vous Francis, je voulais vous remercier chaleureusement de tout ce que vous avez pu m'apporter depuis janvier 2017, autant sur le plan recherche, vous m'avez permis d'évoluer et de croire en moi avec la chance d'acquérir des prix ou des bourses qui m'ont permis de valoriser mes travaux. Mais aussi sur le plan personnel, vous être une personne à l'écoute et humaine capable de trouver des solutions et m'a fait comprendre que la thèse est non un combat (valeur négative) mais une aventure d'une vie (bien plus positif comme pensée). Je sais que cette thèse m'a aussi permis de découvrir réellement l'anxiété et le stress d'une vie mais grâce à vous j'ai essayé de surmonter étape après étape et on peut être fiers du travail parcouru ensemble et merci d'avoir été présent dans la dernière partie de cette thèse qui à mon sens a été la plus dure (contexte de pandémie en plus). J'espère bien que cette collaboration scientifique entre nous sera le début de nombreuses autres collaborations.

Puis, je tiens à remercier tous les gens que j'ai rencontré au sein de la Faculté de médecine vétérinaire, à commencer par les secrétaires Christine Blondin, Sophie Bilodeau et Diana Rodier qui m'ont permis de gérer beaucoup de soucis administratifs. Les étudiants qui ont partagé le bureau 2990, Aly, Soma, Amir, Soleman, Bruno, Abdul, Fatma, merci d'avoir partagé des moments de rire, de discussions scientifiques mais aussi lorsque que j'avais un coup de blues. Je tiens à mentionner un merci spécial à Aly qui est devenu un ami et je ne pourrais

pas oublier nos longues discussions western blot, ou sur tes explications sur TRIB2 et tes cellules de granulosa mais aussi ce que j'admire chez toi c'est ta patience. Bruno, toi mon collègue depuis des années je ne peux pas oublier nos débats sur la France qui domine le monde (hahaha) et sur la Chine ce pays dont tu es en admiration mais qui laisse parfois prétendre que la vie stricte serait la bienvenue dans certaine situation. A tous les autres étudiants avec qui j'ai partagé des surveillances d'examen, ou collaborer pour leur projet de recherche merci, Daryna (tu incarnes la délicatesse et la gentillesse), Marilyn (ton écoute dans la période de rédaction et aussi c'est grâce à toi que j'ai mon petit minou d'amour), Noélie, Kelsey, Marianne (ton écoute m'a permis de remonter la pente quand j'en avais besoin merci et j'admire ton courage et ta détermination notamment dans tes nouveaux projets), Rebecca, Sarah A. et Sarah I. (merci à vous trois et aussi à Marianne pour nos petites soirées resto), Charlotte (merci infiniment de ton écoute et de ton côté rassurant pour affronter les difficultés rencontrées). Je tiens aussi à remercier certains professeurs de la faculté comme ceux qui ont participé à mon examen général de synthèse Dr Kalidou Ndiaye et Dr Younes Chorfi mais aussi tout ce qui m'ont apporté leurs conseils et avec qui j'ai pu échanger. Je m'excuse si j'ai oublié des gens mais merci infiniment à toutes personnes que j'ai pu rencontrer au sein de cette faculté et qui ont pris de leur temps pour m'aider, m'épauler me soutenir afin de parvenir à l'accomplissement de devenir une chercheuse.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'équipe 8 et de l'institut de l'I2MC qui m'ont permis de passer une merveilleuse année auprès de vous certes cela a été court nous avons passé seulement une année ensemble mais merci de votre collaboration et de votre aide Véronique Pons, Céline Galès, Michel Sénard, Marie Héléne, Anne et Du. Merci à vous nos techniciens de labo notamment M-H et Florie, pour nos moments de rigolade dans le bureau, d'avoir partagé cette folie que parfois personne ne pouvait comprendre et surtout un grand merci à toi M-H pour ton expertise à faire marcher ses malheureux anticorps pour nos immunohistochimies et tes conseils ancestraux sur les WB. Je peux vous garantir que même au Canada je n'ai trouvé personne qui m'a fait autant rire que vous deux ensemble, vous avez été des personnes rayonnante de cette thèse. A toi ma Florie, tu sais que tu es devenue une amie et qui m'a apporté beaucoup durant ces années loin de la France et tu connais la recherche alors tu as été pour moi une grande confidente, et aujourd'hui j'attends une seule chose t'accueillir au Canada et pouvoir te faire découvrir ce magnifique pays. Et tous les autres étudiants qui comprenaient mon quotidien de thésard, Roberto, Marion et Loubna, merci. Je tiens également à remercier tous nos collaborateurs nanoparticule en particulier Clément Roux et Robert Mauricot qui m'ont permis de me focaliser sur la partie nanoparticule et qui m'ont aidé à surmonter les problèmes d'expériences durant cette année à Toulouse.

Merci aux étudiants dont j'ai eu la chance de superviser lors de leur stage (Camille, Djamila, Hugo, Jade et Fanny). Vous m'avez permis de découvrir un volet qui est essentiel dans le parcours d'un chercheur apprendre à partager nos connaissances, à s'adapter à notre auditoire et accompagner une personne dans le développement de son cursus académique.

Enfin je souhaite remercier mes proches qui parfois sont loin de comprendre la recherche. Mais durant ces années de thèse j'ai essayé bien que mal de faire comprendre le rôle

d'un thésard qui je pense reste toujours flou pour certain. Je commencerai par remercier tous mes colocataires que j'ai pu rencontrer en venant au Canada qui m'ont permis d'évacuer et oublier le rôle de doctorant, mais une mention spéciale à Antoine et Loréna avec qui j'ai développé une complicité et une amitié durant ces 9 mois partagés ensemble dans cette maison de dingue. Je ne peux pas oublier cet anniversaire avec nos fabuleux chapeaux animaux et combien de fois on a pu mourir de rire ou plutôt mourir étouffer à cause d'une certaine odeur. Un grand merci à mes amis qui ont su m'apporter leur soutien même à des milliers de kilomètres et qui malgré le décalage horaire ont été présent. Un grand merci à Arielle et sa petite famille vous pouvez pas savoir comment vous êtes important et comment tes conseils sont les bienvenus. Je tiens à remercier particulièrement mon groupe de poulette qui même après 10 ans on continu à être présente l'une pour l'autre et même avec la distance, Lénaïk, Elodie, Diana, Fafa (j'admire ta force et ton courage, tu es une sacrée battante et je te souhaite beaucoup de courage dans ta thèse). Depuis mon premier départ au Canada j'ai toujours près de moi ce fameux T-shirt avec vos petits mots, je peux vous dire que souvent je le prends et je relis comme si vous étiez près de moi car je sais que je pourrais compter sur vous et vous me l'avez prouvé avec votre accompagnement auprès de moi durant ces longues années qui ont challengé ma vie. Diana, je sais que tu comprends ce que j'ai pu vivre avec cette montagne russe qui est la thèse car toi-même tu es devenu un Lady Docteur (durant le master tu étais juste au grade de Lady D mais là tu as atteint the grade), et je suis la première fière de toi.

Je tiens à remercier Kévin, celui qui partage ma vie, celui qui je l'espère sera fière de mon accomplissement en tant que chercheuse. Ce départ au Canada a été pour moi un renouveau pour beaucoup et a remis en question beaucoup de chose sur mon avenir comme savoir ou je continuerais ma carrière. Mais grâce à toi je sais que je peux compter sur ton écoute, ton soutien et ton amour pour vouloir construire un avenir au Canada, et je ne serais jamais seule car avec vous j'ai trouvé une famille qui a su m'accueillir merci à tes princesses et à toi. Je savais déjà que le Canada était pour moi mon pays de cœur mais j'espère bien qu'aujourd'hui il sera mon pays adoptif. Une des qualités que j'admire en toi mon amour c'est ta patience et dieu seul sait que tu en as eu pour affronter mon comportement de stressée et essayer de comprendre mon travail de recherche durant cette dernière année, alors un grand merci à toi.

Et pour finir je tiens à remercier ma famille même si ce mot fait écho dans ma tête. Le peu de gens qui ont été là, qui m'ont apporté des mots bienveillants et votre amour à distance, je souhaite vous en remercier la famille Bourgade, ma tata Lulu. Mais cette thèse ne serait pas existante sans le soutien et l'amour de mon frerot d'amour Damien (et aussi Olivier). Tu es celui dont j'ai toujours voulu suivre comme exemple dans la vie, tu es ma grande fierté à moi et jamais j'aurais cru que dès notre enfance que je deviendrais un jour docteur. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir pousser à continuer mes études et surtout d'essayer de comprendre mon projet de recherche comme si tu étais un expert. Je te dédie cette thèse à toi Damien, mon frère dont même à distance l'amour fraternel est triomphant.

A mon petit partenaire à 4 pattes, mon fidèle compagnon Colibri, tu es bien plus qu'un animal tu es un véritable soutien moral, tu as été mon assistant de thèse comme je l'ai souvent dit pour cette rédaction et je te remercie de faire partie de ma petite vie, car je sais que tu viens

du refuge de la faculté et j'aurais toujours un petit truc qui me lie à cette endroit qui m'a tant apporté.

Ce projet n'aurait pas débuter sans aide financière, je tenais à remercier fortement la fondation de France qui m'a permis de soutenir notre projet durant ma première année en France, mais aussi tous les organismes subventionnaires avec qui Dr Francis Beaudry est partenaire, le CRSNG, Innovation. Je tiens à remercier les ESP de l'université de Montréal, la FMV et un merci particulier au FRQS qui m'ont permis d'obtenir des bourses permettant de valoriser mon projet de recherche et mon parcours académique.

Sans vous cette thèse n'aurait aucun sens.

Introduction

La neurocardiologie est un domaine relativement jeune qui découvre un lien important entre le cœur et le cerveau. La recherche et les observations cliniques découvrent des liens majeurs entre les maladies du cerveau et du cœur, y compris la façon dont elles se développent et progressent. Par exemple, les patients souffrant d'insuffisance cardiaque (IC) sont à risque de dépression, de troubles cognitifs et de troubles du sommeil. Pourtant, malgré cela, les affections cérébrales et cardiaques sont fréquemment traitées séparément, même si elles surviennent chez le même patient. De plus, nous ne savons pas comment l'IC peut entraîner des problèmes émotionnels comme la dépression et cognitifs même si, dans de nombreux cas, cela a été attribué à une diminution de la perfusion cérébrale ; et/ou, réactions indésirables aux médicaments. Les altérations de la structure cérébrale et des performances cognitives dans l'IC sont des composants essentiels de son spectre de comorbidité. Les afférences autonomes qui proviennent des fibres sensorielles cardiaques montrent une activité accrue avec IC chronique. La désensibilisation de ces fibres par application locale de résinifératoxine (RTX) au cours de l'infarctus du myocarde (IM) est connue pour prévenir l'hypertrophie cardiaque, l'hyperactivité sympathique et l'IC. On ne sait pas si ces afférences médient l'allostase cérébrale. L'objectif général du projet est d'évaluer, à l'aide d'approches pharmacologiques et protéomiques, la fonction des fibres sensorielles épicaudiques exprimant le récepteur vanilloïde 1 (TRPV1) dans un modèle d'IC murin afin de faire progresser le traitement de l'IM et ses comorbidités. La thèse a 3 objectifs spécifiques pour la partie du modèle d'IC murin. Le premier objectif est d'identifier les effets de la désensibilisation de ces afférences sur l'architecture du tissu cardiaque dans le modèle d'IC et les effets distaux au niveau cérébral. Nous avons constaté que la désensibilisation des afférences cardiaques soulage les caractéristiques d'un état de type anxio/dépressif chez la souris. Des signatures protéiques uniques et des voies de régulation dans des cortex frontaux (CF) isolées de chaque traitement révèlent le degré de complexité inhérent à la réponse des CF aux stress provenant du cœur. Alors que le traitement combiné (IM/RTX) n'a pas conservé les signatures protéiques des groupes de traitement individuels, les trois groupes souffrent d'une dérégulation de l'entraînement circadien. Le second objectif est d'identifier les mécanismes par lesquels la neurotransmission cœur cerveau dépendante des fibres nerveuses exprimant le TRPV1 est établie lors d'IC. Ainsi, nous avons proposé des voies centrales pour l'allostase métabolique systémique au dysfonctionnement cardiaque et ajoutons à l'important corpus croissant de

preuves pour les réponses physiopathologiques systémiques et intégratives régulées par les fibres sensorielles cardiaques dans l'IC. Ces résultats devraient aider à établir de futures expériences pour illustrer comment les changements métaboliques dans les tissus neuronaux peuvent améliorer efficacement les effets physiologiques négatifs de l'IM via l'application RTX. Le troisième objectif est de comprendre le rôle de l'activation de TRPV1 au niveau épicaudique dans un modèle expérimental d'IC tout en contrôlant la libération spatiotemporelle de RTX. Nous avons décidé d'utiliser des nanoparticules dites « up converting » (UCNP) au sein du myocarde et/ou de l'espace péricardique. Dans un premier temps, nous avons évalué le potentiel des nanoparticules à se maintenir dans la région cardiaque. Les UCNP injectées dans le myocarde ont montré une localisation présente au niveau du cœur mais il n'y avait aucune accumulation détectable dans le foie ou les reins. Alors que les injections intra myocardique permettent une administration localisée pour les applications cliniques et de recherche, une rétention incomplète et même une fuite immédiate du cœur ont été signalées pour l'administration intra myocardique. Ce phénotype est attribué à la vascularisation et à l'environnement dynamique du myocarde. Une rétention améliorée, cohérente et à plus long terme a été observée pour les nanoparticules injectées dans l'espace péricardique. Nous avons constaté que les nanoparticules injectées dans le sac péricardique entraînent la rétention la plus élevée. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), un organisme modèle, a été utilisé dans le cadre de la présente étude, pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires en lien avec la communication synaptique, d'étudier le phénotype d'évitement thermique et d'identifier les mécanismes de signalisation à l'activation de récepteurs orthologues au TRPV1 tel que les OCR de 1 à 4 et OSM-9.

Chapitre 1 – Revue de littérature

1. Anatomie et physiologie générale du cœur

Le cœur est situé au niveau de la cage thoracique entre les deux poumons, localisé dans le médiastin antérieur. Il est un organe musculaire enveloppé du péricarde et joue le rôle de pompe permettant de faire circuler le sang au sein de l'organisme. Il est responsable de l'apport en oxygène et des nutriments vers tous les tissus tout en assurant l'élimination des déchets métaboliques. La fonction cardiaque est assurée par des contractions rythmiques régulées par le système nerveux autonome. Il comprend 4 cavités dont 2 oreillettes et 2 ventricules (Figure 1). L'oreillette droite (OD) est la partie du cœur qui reçoit le sang veineux par le biais de la veine cave supérieure et inférieure et communique avec le ventricule droit (VD) par l'intermédiaire de la valve tricuspide. La contraction du VD permet l'éjection du sang veineux dans la circulation pulmonaire en passant dans l'artère pulmonaire par l'intermédiaire de la valve pulmonaire. Le sang désoxygéné est alors envoyé vers les poumons où il se réapprovisionne en oxygène et se décharge du dioxyde de carbone. Le sang oxygéné revient ensuite vers les cavités cardiaques gauches par l'intermédiaire des 4 veines pulmonaires qui communiquent avec l'oreillette gauche (OG). Cette dernière communique ensuite avec le ventricule gauche (VG) par l'intermédiaire de la valve mitrale. La contraction du VG permet l'éjection du sang oxygéné dans la circulation systémique dans l'aorte par l'intermédiaire de la valve aortique. Les phases de contraction cardiaque sont appelées systoles auriculaires ou ventriculaires alors que les phases correspondantes à la relaxation cardiaque sont appelées diastole¹. La fonction principale du muscle cardiaque est de pomper continuellement et régulièrement le sang dans tout le corps sans aucun repos. Le VG est la composante anatomique du cœur la plus importante, car il assure à lui seul environ 80% de la fonction cardiaque. Ainsi bien que toutes les cavités cardiaques puissent être étudiées, l'analyse de la fonction contractile du myocarde se restreint souvent à l'étude du VG. Dans notre projet, nous avons décidé de se focaliser sur celui-ci, que ça soit pour enregistrer les paramètres physiologiques ou pour les aspects histologiques et moléculaires.

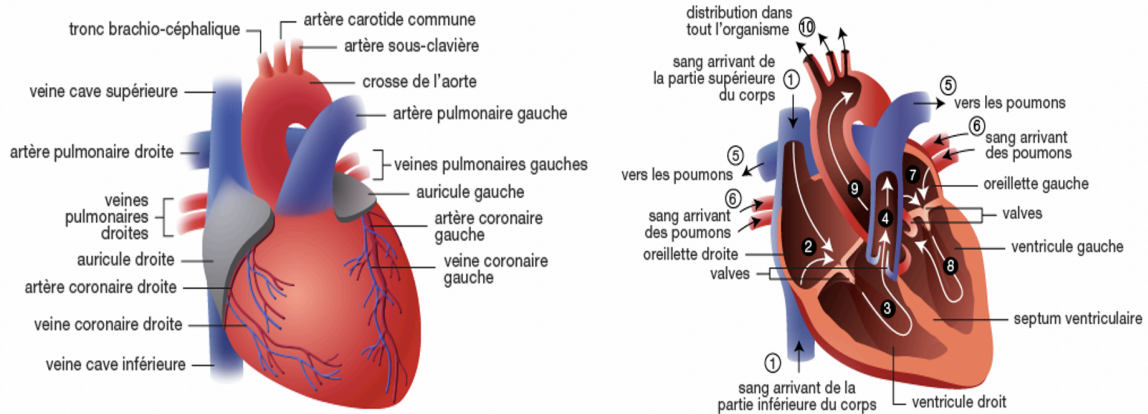


Figure 1 : Anatomie et physiologie du cœur : différentes parties du cœur montrant le flux sanguin intracardiaque (flèches). Le cœur est un muscle strié composé de 4 cavités possédant chacune leur propre fonction : 2 oreillettes et 2 ventricules. L'oreillette droite (OD) et l'oreillette gauche (OG) sont situées à la base du cœur et sont séparées par le septum intra-auriculaire. Le ventricule droit (VD) et le ventricule gauche (VG), situés à l'apex du cœur, sont séparés par le septum interventriculaire. (Figure issue du site CHUV de Lausanne Suisse, service de Cardiologie)

Sur le plan tissulaire, le cœur est composé de 3 tuniques ayant toutes des fonctions différentes. L'endocarde qui est une mince membrane endothéliale tapissant l'intérieur du cœur et des vaisseaux participant à la régulation de la contraction cardiaque par l'activation hormonale endocrine des cellules contractiles du myocarde appelées cardiomyocytes².

Le myocarde qui est la partie musculaire du cœur proprement parlée. C'est un muscle strié capable de se contracter régulièrement et de façon autonome, sensible aux stimulations hormonales et neuronales. Le myocarde est constitué de majoritairement de cardiomyocytes mais également de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses et de fibroblastes.

Le péricarde est un sac fibreux à double paroi (Figure 2)³ contenant à la fois le cœur et la racine des gros vaisseaux. Il est constitué de deux parties : le péricarde viscéral appelé aussi épicaire qui adhère directement au myocarde et le péricarde pariétal (attache du cœur au thorax)^{1,3}. Le péricarde pariétal est constitué d'un sac externe de tissu conjonctif fibreux tapissé de séreuse il est donc organisé en 2 couches, la séreuse (la plus interne) formée de cellules mésothéliales et la fibreuse. La couche fibreuse du péricarde pariétal a une épaisseur comprise entre 0,8 et 1mm plus épaisse que la couche séreuse. Alors que le péricarde viscéral est formé de seulement une couche fibreuse comprenant des cellules mésothéliales³. Les cellules mésothéliales sont des cellules épithéliales plates à cubiques riches en microvillosités qui sont très importantes pour la formation et la réabsorption du liquide péricardique. Tandis que la couche fibreuse est essentiellement composée de faisceaux de collagène denses avec des rares fibres élastiques

intercalées³. Ces péricardes sont séparés par l'espace inter-péricardique contenant du liquide péricardique permettant au cœur d'assurer une meilleure fluidité des mouvements cardiaques. L'épicaarde est fortement vascularisé et peut assurer un transfert de liquide vers les cellules mésothéliales. Le péricarde reçoit une innervation sensitive, sympathique et parasympathique. Les corps cellulaires de l'innervation sympathique sont situés dans les cinq premiers niveaux thoraciques de la moelle épinière tandis que l'innervation parasympathique fonctionne à travers les branches du nerf vague. Le péricarde est innervé par le nerf phrénique qui dérive principalement du nerf cervical 4 mais il y a des contributions de la région allant de C3-C5. De plus comme la majorité des tissus, le péricarde possède un vaste ensemble de mécanorécepteurs et de chimiorécepteurs qui sont responsables de certains réflexes. C'est pourquoi nous nous intéressons aux récepteurs TRPV1 exprimés au niveau des fibres sensorielles épicaardiques. Dans les conditions physiologiques normales le péricarde exerce des effets biologiques importants sur les fonctions ventriculaires, la pression et le volume du cœur. Le péricarde joue un rôle important lors d'insuffisance cardiaque notamment dans la force de compression au niveau de la surface du myocarde vu que dans cette situation, le volume cardiaque est plus élevé. Ceci a un impact sur les fonctions hémodynamiques ventriculaires du cœur.

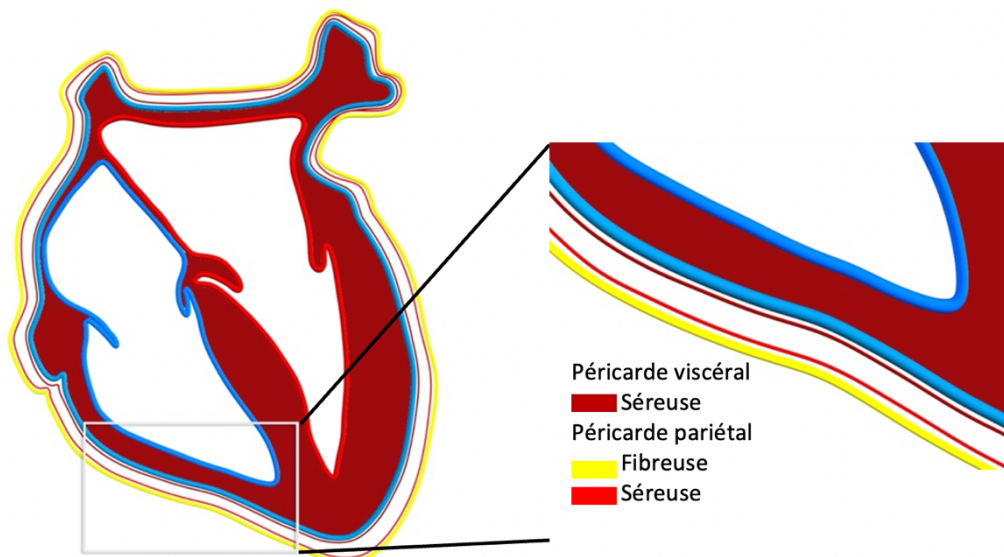


Figure 2 : Péricarde pariétal et péricarde viscéral. Le péricarde est la séreuse du cœur qui a deux composantes une pariétale et une viscérale. Le péricarde pariétal est composé de deux couches : une séreuse (ligne fine rouge) et une fibreuse (ligne plus épaisse jaune). Le péricarde viscéral est composé d'une seule couche séreuse couvrant tout le cœur (ligne rouge au contact du myocarde en bleu). Il faut noter les couches séreuses des deux péricardes sont continues et constituées de cellules mésothéliales et ces deux couches séreuses se font face. L'espace situé entre les deux couches séreuses des deux péricardes pariétal et viscéral est la cavité péricardique. Figure adaptée de la publication (Rodriguez E.R. et Tan C.D., 2017).

2. Neurocardiologie

L'activité du cœur est régulée par le système nerveux autonome (SNA). Le SNA se distribue vers la plupart des organes et des glandes de l'organisme dont leurs fonctions automatiques et involontaires sont contrôlées par celui-ci. Le SNA est composé de deux parties : la partie sympathique, et de la partie dite parasympathique qui se différencient au niveau anatomique et fonctionnel⁴. Le SNA est organisé avec des voies neuronales afférentes, efférentes et des interconnexions organisées en voies ascendantes et voies descendantes et en arcs reflexes. L'organisation de base repose sur deux neurones contrôlés par une régulation centrale⁵. La partie centrale, modulatrice du SNA est localisée à des différents niveaux: cortex prémoteur frontal, tronc cérébral et moelle épinière. La médulla située dans le tronc cérébral, est un site majeur dans le cerveau pour réguler le flux nerveux autonome vers le cœur et les vaisseaux sanguins et elle contient des corps cellulaires pour les deux systèmes nerveux parasympathique et sympathique.

2.1. Innervation cardiaque

Le système neuronal cardiaque est constitué de voies neuronales afférentes, efférentes et d'interconnexion qui se comportent comme un système d'intégration des informations. Le cœur est innervé par des fibres sympathiques qui proviennent de la moelle épinière (ME) dans la région cervico-thoracique et par des fibres parasympathiques venant des branches cardiaques des nerfs vagues⁶ (Figure 3)⁷. Les fibres sympathiques pré-ganglionnaires cardiaques quittent la moelle épinière (ME) via les racines ventrales des premiers nerfs spinaux thoraciques pour arriver aux noyaux adjacents de la chaîne sympathique. Certaines fibres ont une terminaison synaptique au niveau de la ME, et d'autres remontent vers le tronc sympathique pour former des synapses avec des ganglions cervicaux qui donnent lieu à des nerfs cardiaques. Les fibres post-ganglionnaires passent par le plexus cardiaque sans interruption synaptique pour se distribuer sur les parois du myocarde et des vaisseaux⁸.

Les fibres parasympathiques pré-ganglionnaires sont représentées par les axones des neurones de noyau dorsal du nerf vague, ils font synapse dans les ganglions du plexus cardiaque ou dans les ganglions cardiaques intrinsèques⁸. Les fibres nerveuses sympathiques cardiaques situées au niveau épicaudique, cheminent le long des principales artères coronaires et représentent le système autonome prédominant dans les ventricules. L'innervation sympathique ventriculaire est caractérisée par un gradient depuis la base jusqu'à l'apex. Les récepteurs cardiaques et les

terminaisons nerveuses du cœur envoient des afférences par des prolongements de neurones afférents périphériques des ganglions de la racine postérieure. Certains de ces neurones afférents sont impliqués dans des arcs réflexes spinaux tandis que d'autres remontent au noyau dorsal du nerf vague, à la formation réticulée, à l'hypothalamus et au cortex.

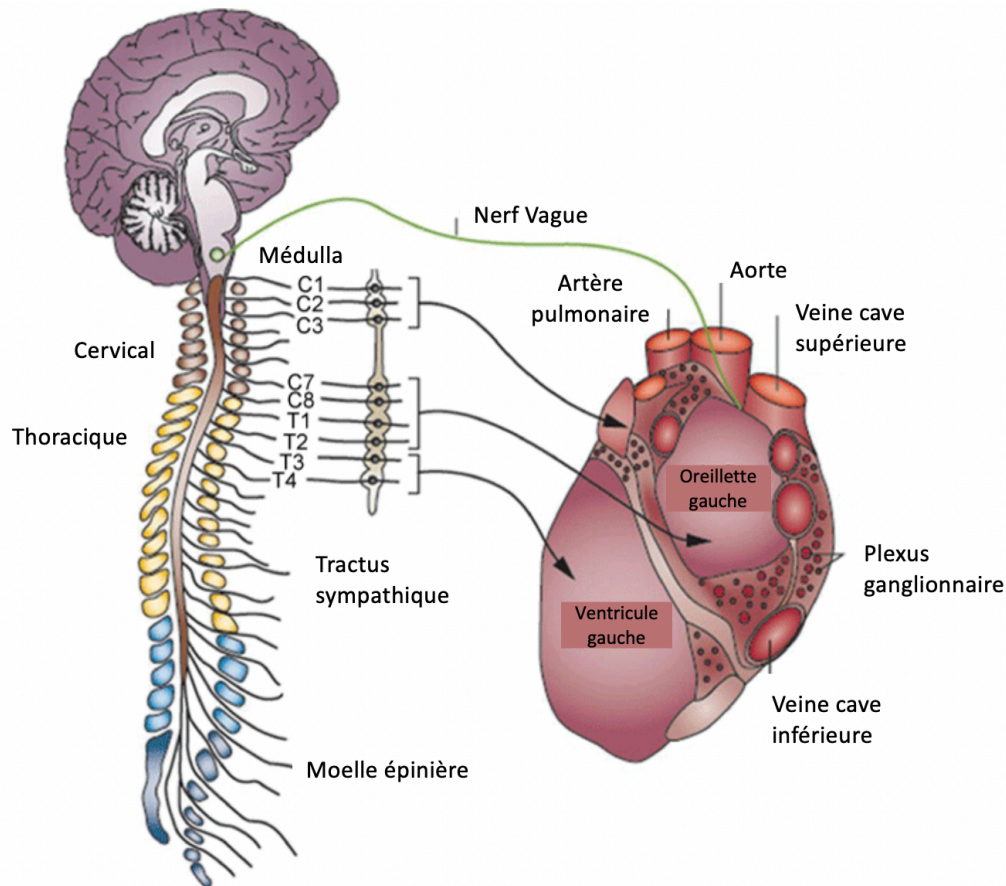


Figure 3 : L'innervation du cœur est établie par deux grands systèmes nerveux : le système sympathique et le système parasympathique. Le système sympathique a une origine au niveau thoracique de la moelle épinière et fait relais dans la chaîne sympathique dorsale au niveau de ganglions et les nerfs se distribuent ensuite à l'ensemble du tissu cardiaque que ce soit les structures nodales ou myocardiques. Le système parasympathique implique les nerfs vague droit et gauche, dont le droit va innerver le nœud sinusal (NS) et le myocarde auriculaire droit tandis que le nerf gauche régule l'activité de l'oreillette gauche et le nœud auriculoventriculaire (NAV). Figure adaptée de la publication (Shen M.J. et al. 2014).

2.2. Système nerveux parasympathique (SNP)

Le système nerveux parasympathique provient de sites médullaires médiaux comme le noyau du tractus solitaire (NTS) et est modulé par l'hypothalamus. Les fibres efférentes vagales s'étendent de la ME aux nerfs postganglionnaires qui innervent les oreillettes. Le nerf vague droit innerve principalement le nœud sinusal auriculaire (NSA), tandis que le nerf vague gauche innerve le nœud auriculoventriculaire (NAV). Le muscle auriculaire est également innervé par des fibres efférentes vagaux, alors que le myocarde ventriculaire n'est que faiblement innervé

par des fibres efférentes vagues. Les effets parasympathiques sur la fonction cardiaque sont médiés par les récepteurs muscariniques. La stimulation du système parasympathique ralentit le rythme cardiaque ce qui désigne un effet chronotrope négatif, et elle réduit la vitesse de conduction ce qui est appelé d'effet dromotrope négatif. La libération d'acétylcholine (ACh) de ces nerfs parasympathiques, qui se lie aux récepteurs muscariniques de l'ACh, a une action vasodilatatrice directe (couplée à la formation d'oxyde nitrique et à l'activation de la guanylylcyclase). Cet effet est dû à une augmentation spécifique de la conductance potassique qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire au K^+ . Celle-ci accélère la phase de repolarisation, hyperpolarise la membrane et abaisse la pente de dépolarisation diastolique. En présence d'ACh, la vitesse de la libération de K^+ à partir des tissus est augmentée⁹.

2.3.Système nerveux sympathique (SNS)

Les nerfs efférents sympathiques sont présents dans les oreillettes (en particulier dans le NSA) et les ventricules, y compris le système de conduction du cœur. Les effets sympathiques sur la fonction cardiaque sont médiés par les récepteurs β -adrénergiques. La stimulation sympathique a une action inverse de celle du parasympathique. Il accélère le cœur. Il a des effets chronotropes et dromotropes positifs. Cette action est réalisée par la libération de neurotransmetteurs tels que les catécholamines agissant sur les récepteurs β -adrénergiques. La catécholamine libérée est la norépinephrine. La stimulation sympathique augmente la fréquence et la force de contraction cardiaque, augmente la vitesse de conduction à travers le NAV, l'oreillette et les ventricules, et augmente la tendance des fibres de Purkinje à montrer une activité pacemaker^{10,11}.

2.4.Système nerveux cardiaque intrinsèque (SNCI)

Le système nerveux est décrit depuis bien longtemps comme deux systèmes uniques qui exercent un contrôle réciproque sur les paramètres cardiaques. Il y a bien un contrôle mis en place par la régulation du système parasympathique (cholinergique) et sympathique (adrénergique) par l'activité neuronale des efférences pré-ganglionnaires¹². Cependant il y a aussi été découvert que le cœur lui-même avait un système nerveux qui influencerait l'activité du SNA (Figure 4)¹³.

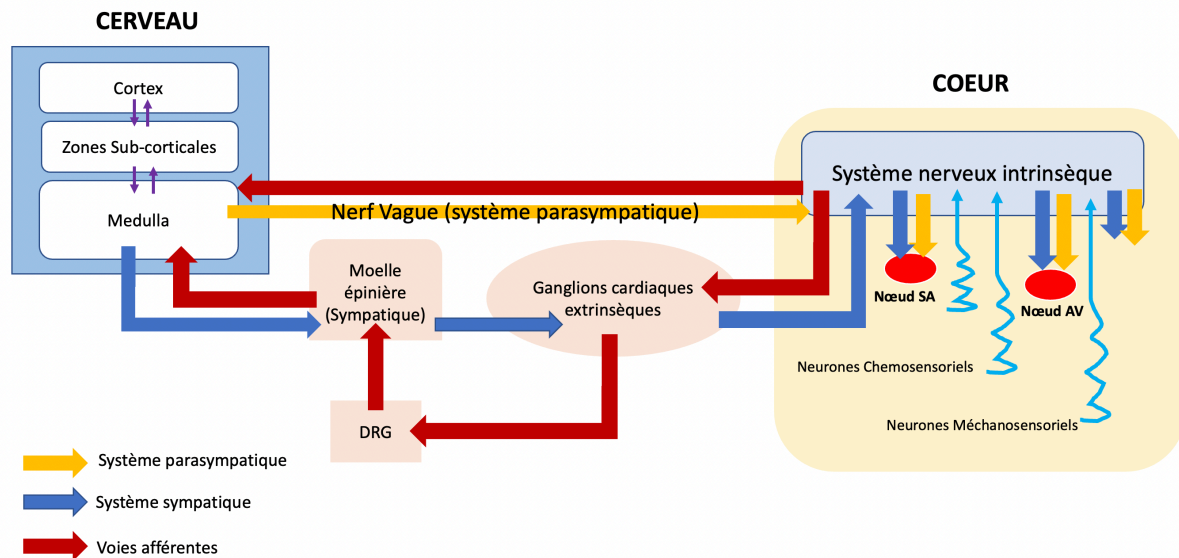


Figure 4 : Les voies de communication neuronales qui interagissent entre le cœur et le cerveau qui constituent l'innervation du cœur par deux grands systèmes nerveux et un système nerveux cardiaque intrinsèque. Le système nerveux cardiaque intrinsèque intègre des informations provenant du système nerveux extrinsèque et des nerfs sensoriels du cœur. Les ganglions cardiaques extrinsèques situés dans la cavité thoracique sont indirectement connectés via la moelle épinière. Le nerf vague qui fait partie du système parasympathique est principalement constitué de fibres afférentes situées au niveau du nœud du sinus auriculaire et qui se connectent à la moelle et se terminent dans la région du tronc cérébral la médulla. Le système sympathique est composé de fibres afférentes provenant de la région thoraco-cervicale de nerfs spinaux au niveau du nœud auriculo-ventriculaire et du nœud du sinus auriculaire. Figure adaptée de la publication (McCraty R. 2016).

Il a été montré sur la paroi cardiaque, la présence de projections provenant soit des nerfs droit et gauche (neurones pré-ganglionnaires efférents) ou soit des ganglions stellaires droit et gauche et des ganglions cervicaux (neurones efférents sympathiques). Ces neurones sont capables d'affecter la fonction contractile du cœur¹⁴⁻¹⁶. Les cellules ganglionnaires intracardiaques sont principalement situées dans le tissu conjonctif et adipeux de l'épicarde en association avec un ou plusieurs troncs nerveux¹⁷. Leur fonction d'intégration est toujours sous l'influence tonique des neurones du tronc cérébral et de la moelle épinière, ainsi que des hormones circulantes.

Le SNCI a souvent été décrit comme contenant seulement des neurones post-ganglionnaires efférents parasympathiques qui reçoivent les projections de neurones efférents pré-ganglionnaires parasympathiques médullaires. Le SNCI jouerait le rôle de simple relais des projections neuronales parasympathiques efférentes vers le cœur. Le principal contrôle autonome du cœur s'exerce au niveau du tronc cérébral et de la ME. Mais depuis peu il a été démontré que les fonctions cardiaques pouvaient être contrôlées par son propre réseau neuronal intrinsèque au niveau du cœur. Le SNCI contient toutes parties nécessaires et importantes pour traiter les informations nerveuses. Il comprend des neurones afférents avec leurs axones

sensoriels, des neurones efférents qui innervent le cœur et des neurones d'interconnexions cardiaques afférents et efférents.

2.5. Les fibres afférentes cardiaques

Les neurones afférents sont des cellules pseudo unipolaires localisées dans les ganglions de la racine dorsale des nerfs spinaux et dans les ganglions de certains nerfs crâniens (X et XI). Les prolongements centraux des cellules pseudo-unipolaires pénètrent dans la ME et, à ce niveau, certaines d'entre elles sont impliquées dans la formation d'arcs réflexes, par exemple formant des synapses avec les cellules placées au niveau des colonnes latérales de la substance grise de la ME (Figure 5)¹⁸. Les seconds neurones des voies afférentes transmettent le message nerveux vers le SNC, principalement grâce à des faisceaux situés dans la substance blanche de la ME. Les fibres atteignent ensuite le thalamus et l'hypothalamus et établissent une synapse avec les neurones du cortex, au niveau de la zone prémotrice et orbital de lobes frontaux notamment au niveau du télencéphale (3e neurone)⁸. Les afférences du système cardiovasculaire se projettent dans le NTS dans le tronc cérébral (Figure 5)¹⁸. Leurs activités sont déclenchées par la pression intraluminale (barorécepteurs artériels) ou la modification de volume d'éjection. Certains sont chémo-sensibles (comme les chémorécepteurs artériels carotidiens). Ces afférences sont impliquées dans les réflexes spinaux spécifiques et dans la douleur cardiaque⁴. Dans le cœur, la stimulation de fibres post-ganglionnaires sympathiques augmente fréquence et contractilité cardiaque (passant par les récepteurs β -adrénergique) et provoque la constriction du muscle lisse vasculaire des coronaires (passant par les récepteurs β -adrénergiques).

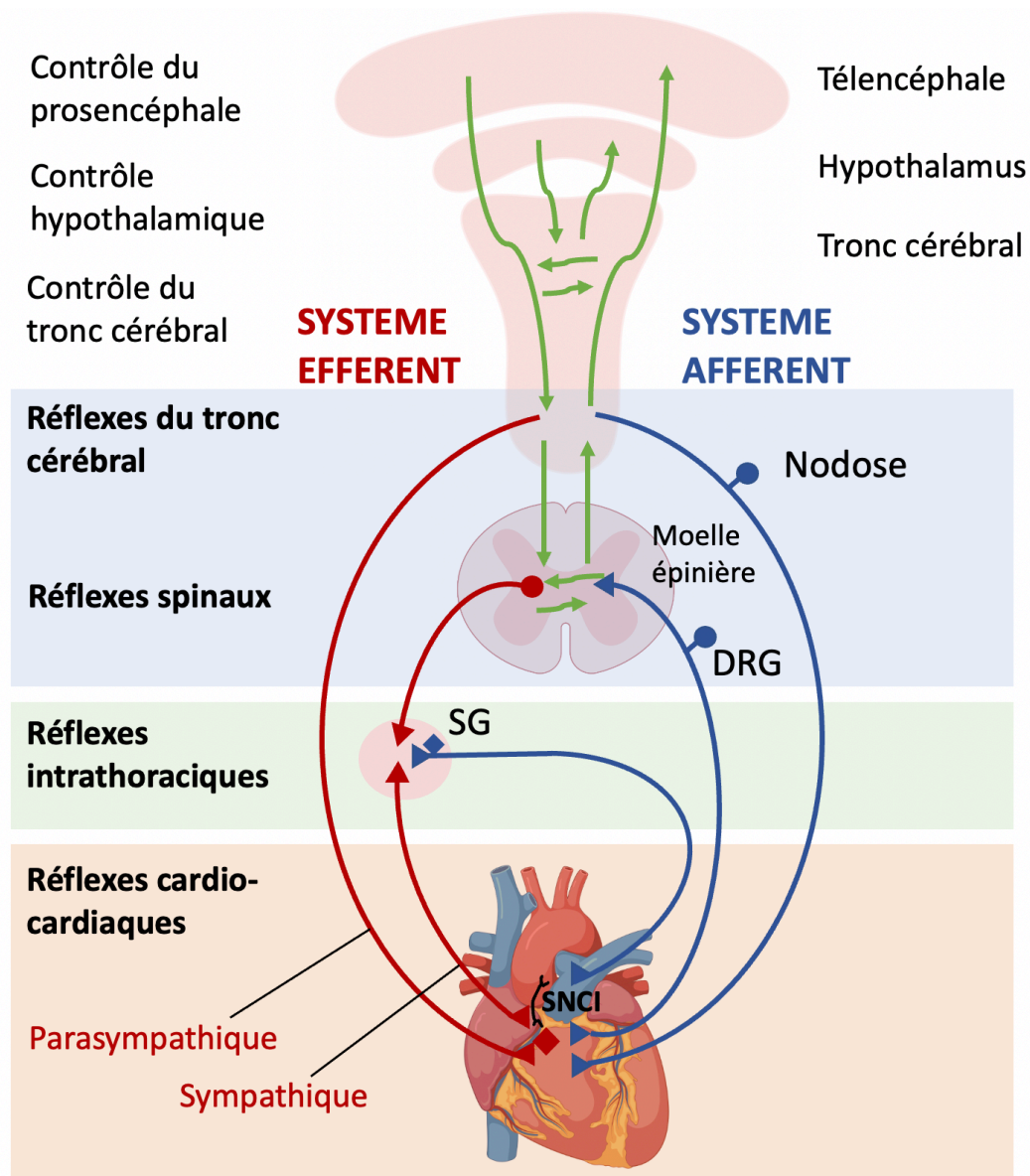


Figure 5 : Neurotransmission cardiaque à partir des fibres afférentes cardiaques intrinsèques. Le contrôle autonome du cœur est composé d'une série de boucles de rétroaction imbriquées, des neurones intracardiaques aux neurones extracardiaques intrathoraciques et au système nerveux central. (SG ganglion sympathique DRG ganglion de la racine dorsale). Figure adaptée de la publication (Hanna P. et al. 2018).

3. Insuffisance cardiaque (IC)

Actuellement, les maladies cardiovasculaires et principalement l'infarctus du myocarde (IM) sont recensé comme étant la première cause de morbi-mortalité dans le monde¹⁹⁻²¹. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) chiffre les décès liés à ces maladies à 17,9 millions de décès par an^{22,23}. Les maladies cardiovasculaires regroupent une large diversité de maladies

comme les cardiopathies et les maladies coronaires notamment l'IM qui peut entraîner par la suite à l'insuffisance cardiaque (IC). De plus il faut savoir que de nombreuses comorbidités accompagnent fréquemment l'IC chronique, contribuant à la morbidité et mortalité accrues et altèrent la qualité de vie des patients. Parmi les comorbidités associées à l'IC il y a la dépression et l'anxiété (maladie mentale) qui partagent beaucoup de mécanisme commun avec l'IC^{21,24}. Ceci pourrait expliquer qu'il peut y avoir des conséquences au niveau local du cœur et des répercussion à différents niveaux plus distale notamment dans le cerveau²⁵ mais cependant peu d'études ont mis en jeux les mécanismes impliqués.

3.1. Infarctus du myocarde

L'IM, comme la majorité des pathologies cardiovasculaires, est une pathologie dite multifactorielle pour laquelle il existe de nombreux facteurs de risque tant génétiques qu'environnementaux agissant le plus souvent en synergie. Ces facteurs de risque sont communs aux principales pathologies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose, dont l'IM. Sur le plan physiopathologique, l'IM se définit comme une nécrose d'une partie plus ou moins importante du myocarde induite par une ischémie prolongée, c'est à dire une diminution de l'apport sanguin en oxygène par les artères coronaires qui irriguent le cœur¹⁹. Dans la majorité des cas, l'IM est une complication aiguë de l'athérosclérose coronaire. L'athérosclérose désigne l'ensemble des changements de la paroi des artères de gros et moyen diamètre. La plaque d'athérome constitue l'élément caractéristique de l'athérosclérose et sa rupture est à l'origine de l'IM. Cette plaque correspond à une accumulation de lipides, de glucides, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires. Ceci entraîne une incapacité du myocarde à maintenir un débit cardiaque suffisant pour couvrir les besoins énergétiques de l'organisme provoquant des dommages locaux au niveau du tissu cardiaque mais aussi des répercussions beaucoup plus distales sur le système nerveux étant donné que le flux sanguin est diminué. A ce jour il a été montré, que des anomalies des voies métaboliques lors d'IC entraînent une diminution de production de l'énergie, du transfert d'énergie et de l'utilisation de l'énergie par le biais d'une baisse considérable de l'expression de facteurs de transcription mitochondriaux et des protéines mitochondriales²⁶.

3.2. Modèles d'étude

L'étude de l'IC nécessite l'utilisation de modèles animaux viables permettant de quantifier la dysfonction du VG dans le but d'étudier la mise en place de la physiopathologie de l'IC et de

développer de nouvelles approches thérapeutiques pour cette pathologie²⁷. Les principaux modèles expérimentaux d'IC ont été développés chez les rongeurs en raison des coûts réduits et de la possibilité d'obtenir un grand nombre d'animaux (Tableau 1)²⁷. De nombreux modèles d'étude ont été développés chez le rat et la souris afin de comprendre le processus de l'IC tout en prenant en compte des avantages et des inconvénients de la stratégie mise en place. Mon projet de thèse a utilisé le modèle expérimental d'IC de souris chez lequel un IM est induit par ligature de la branche descendante de l'artère coronaire gauche (ACG)²⁸ (Figure 6)²⁹. Une thoracotomie gauche est effectuée au niveau du 4e espace intercostal du rongeur anesthésié et ventilé afin de visualiser le cœur. Ensuite, la ligature de l'ACG est réalisée à hauteur de la pointe de l'oreillette. Ceci crée la zone d'infarctus au niveau du VG qui peut être contrôlé visiblement par l'apparition du blanchiment du tissu cardiaque en aval de la ligature. Cette ligature permanente au niveau de l'ACG entraîne de grands infarctus dont la taille moyenne de l'infarctus a tendance à se situer entre 30% et 40% de la surface du myocarde³⁰. Il faut aussi prendre en compte que plus la taille de l'infarctus est importante plus le taux de survie est faible dû au fait que les individus ont de fortes chances de développer l'IC. Cette technique permettant d'induire l'IM est différente de celle de l'ischémie-reperfusion où la circulation est restaurée par retrait de la ligature après un certain délai et elle permet également de développer l'IC dans les 10 semaines post-chirurgie. C'est le modèle expérimental qui est le plus couramment utilisé. Il a été à l'origine de la découverte de l'effet bénéfique des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) dans l'IC³¹. Ce modèle est idéal dans le fait que tous les animaux ayant subi la ligature de l'ACG développent une IC comparable à ce qui est observé chez l'homme, mais sans développer d'autres pathologies²⁹.

Tableau 1 : Les principaux modèles expérimentaux d'IC développés chez les rongeurs. Tableau issu de la publication (Patten R.D. et Hall-Porter M.R. 2009).

Espèces	Modèles	Cause de l'IC	Avantages	Inconvénients	Références
Rat	Ligature de l'artère coronaire gauche	IM	Technique de chirurgie plus facile que chez la souris	Pas de modèle transgénique	32.33.34.31.35.36
	Ischémie-reperfusion		Accès à la fonction cardiaque	Résultats pas toujours reproductibles dans des études cliniques	
			Obtention du tissu cardiaque		
	Constriction de l'aorte ascendante (TAC)		Surcharge de pression graduelle	Hypertension graduelle	
		Accès à la fonction cardiaque	Résultats pas toujours reproductibles dans les études cliniques		
		Obtention du tissu cardiaque			
	Rat Dahl-salt sensitive	Surcharge de pression chronique	Pas de chirurgie	Coût élevé dû à la longue période de développement de l'IC	42
	Rat spontanément hypertendu	Surcharge de pression chronique	IC induite graduellement	Coût élevé dû à la longue période de développement de l'IC	43
Souris	Ligature de l'artère coronaire gauche	IM	Cout inférieur au rats	Chirurgie plus complexe que pour le rat	44.45.46.47
	Ischémie-reperfusion		Accès à la fonction cardiaque	Quantité de tissu plus faible	
			Existence de modèle transgénique		
	Constriction de l'aorte ascendante (TAC)		Surcharge de pression aigue	Développement rapide d'une hypertrophie	
	Souris inactivée pour lim	Cardiomyopathie dilatée	Pas de chirurgie	Coût élevé dû à la longue période de développement de l'IC	52.53
	Souris inactivée pour le TNFα	Cardiomyopathie dilatée	Pas de chirurgie	Effet secondaires importants	54.55.56

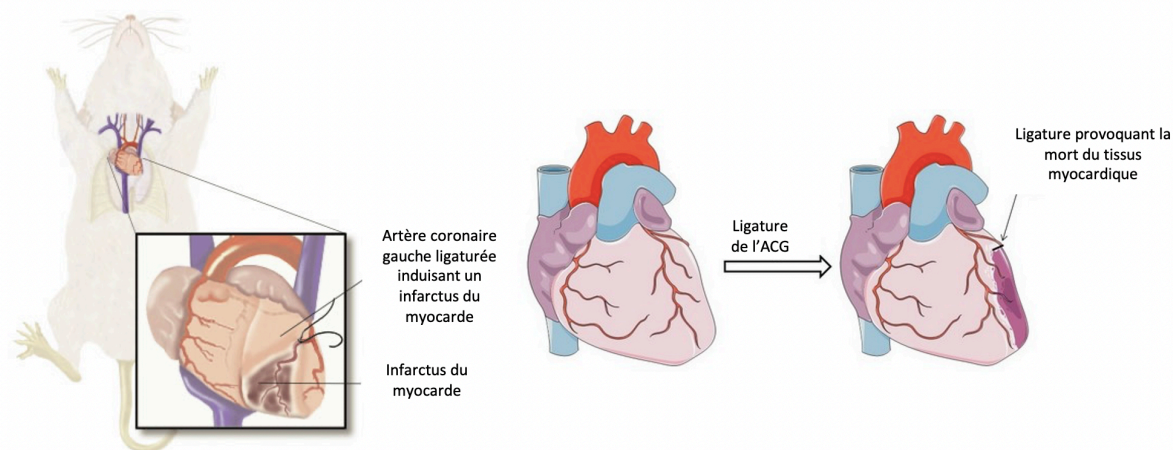


Figure 6 : Illustration du modèle d'étude par ligature de l'artère coronaire gauche en tant que modèle d'infarctus du myocarde. Une thoracotomie du côté gauche est effectuée sur une souris anesthésiée et une ligature avec un fil est faite au ventricule gauche obstruant l'artère coronaire gauche. L'acte chirurgical entraîne une occlusion permanente de l'artère coronaire interventriculaire antérieure gauche interrompant le flux sanguin dans le ventricule gauche, provoquant une hypoxie irréversible qui va par la suite former la zone infarctée. L'infarctus est une cicatrice permanente dans le myocarde ventriculaire.

3.3.Mécanismes moléculaires impliqués dans l'IC

L'IC se caractérise par une interaction entre la dysfonction myocardique et l'activation de nombreux mécanismes compensatoires, afin de maintenir le débit cardiaque notamment par le biais de l'activation du système neuro-hormonal ou du remodelage structural au niveau du VG. Initialement, ces systèmes sont capables de compenser l'altération présente au niveau des fonctions cardiaques. Cependant, leurs activations à plus long terme induisent des effets délétères sur les structures cardiaques et sur leurs performances⁵⁷.

3.3.1. Mécanismes de remodelage cardiaque

Lors d'un IM, des mécanismes se mettent en place entraînant des modifications de l'architecture du tissu cardiaque dont le remodelage cardiaque. Le remodelage cardiaque est caractérisé par une augmentation du volume cardiaque engendrant des adaptations du myocarde afin d'éviter une surcharge de pression. Pour cela, il se produit une hypertrophie des cellules contractiles cardiaques qui sont les cardiomyocytes. Un des premiers processus mis en place est la mort cellulaire par l'apoptose principalement, mais aussi de la nécrose. La nécrose du tissu cardiaque active des réactions inflammatoires qui vont amener à de la fibrose du myocarde qui est l'une des caractéristiques du remodelage. Au niveau moléculaire, il y a des marqueurs

spécifiques de la réponse inflammatoires tel que les cytokines qui sont souvent retrouvées lors d'une importante lésion du myocarde avec une forte expression du facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), de l'interleukine I β (IL-I β) et de l'interleukine 6 (IL-6), mais aussi l'augmentation de peptides comme le peptide natriurétique auriculaire (ANP) et le peptide natriurétique B (BNP)⁵⁸.

3.3.2. Mécanismes neuro-hormonaux

Parmi les mécanismes neuro-hormonaux, il y a une élévation de l'activité du système nerveux sympathique et du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Au cours de l'IC les concentrations plasmatiques de noradrénaline, adrénaline, angiotensine II, et diverses cytokines sont toutes significativement élevés^{57,59}. L'augmentation du niveau plasmatique de ces substances est corrélée à la gravité et l'importance de l'IC. Lors de l'altération du myocarde dès les premiers instants il y a l'activation neuro-humoral qui est bénéfique pour l'organisme en préservant la pression artérielle et en augmentant le débit cardiaque. Or, ce sont ces mêmes mécanismes compensatoires qui engendrent l'apparition de l'IC à plus long terme. L'activation neuro-humoral a donc un rôle clé dans l'IC. L'activité du SRAA (Figure 7)⁶⁰ préserve l'homéostasie circulatoire et aide à réguler la pression artérielle. Elle est largement augmentée chez des patients insuffisants cardiaques par une hypoperfusion rénal et l'activation du SNS. La rénine, l'angiotensine II et l'aldostérone sont les substances clés de ce mécanisme. L'augmentation de l'activité sympathique va induire l'activation du SRAA à la suite d'une baisse de pression artérielle en produisant au niveau rénal la rénine qui va ensuite être libérée dans la circulation sanguine. La rénine a pour rôle de cliver la protéine angiotensinogène pour donner l'angiotensine I. Cette dernière est inactive va être prise en charge par l'ACE donnant l'angiotensine II l'hormone active. L'angiotensine II provoque une vasoconstriction des artères ce qui augmente la pression artérielle. De plus elle déclenche également la libération de l'aldostérone par les glandes surrénales et la vasopressine par l'hypophyse. L'aldostérone et la vasopressine jouent un rôle sur les reins dont ils retiennent le sodium. L'augmentation du sodium provoque une rétention d'eau ce qui augmente le volume sanguin et par conséquent la pression artérielle.

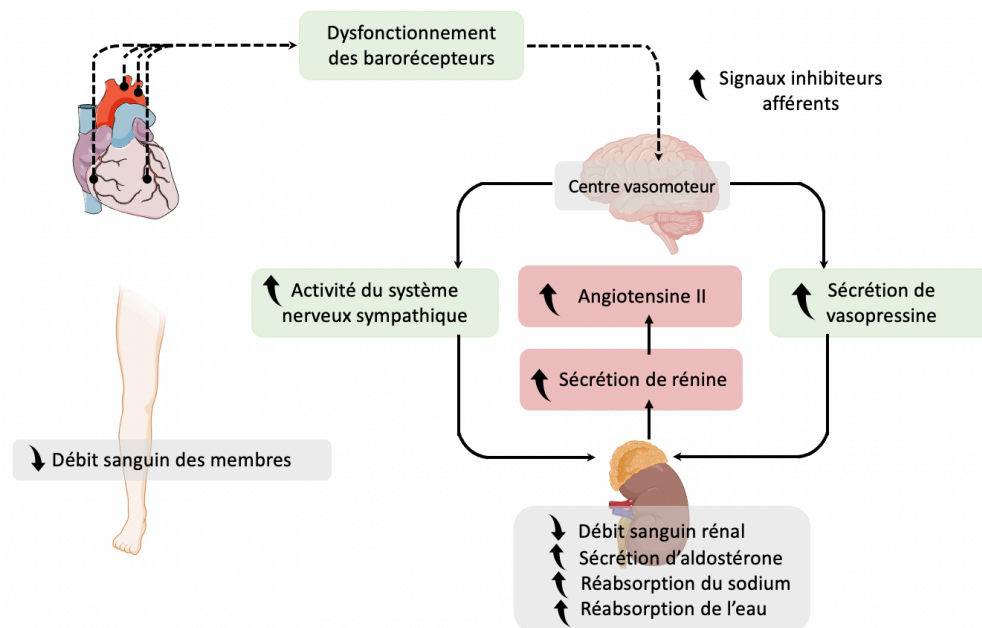


Figure 7 : Activation des systèmes neurohormonaux dans l'IC comme le système rénine angiotensine aldostérone. La diminution du débit cardiaque chez les patient atteint d'insuffisance cardiaque avec une fraction d'éjection réduite entraîne le déchargement des barorécepteurs à hautes pression (point noire sur la figure) dans le ventricule gauche, le sinus carotidien et l'arc aortique. Cette décharge conduit à la génération de signaux afférents au SNC qui à son tour conduit à l'activation des voies efférentes du système nerveux sympathique qui innervent le cœur, le rein, le système vasculaire périphérique et les muscles squelettiques. Cette décharge conduit également à des signaux afférents du SNC qui stimulent les centres cardiorégulateurs du cerveau qui stimule la libération de vasopressine au niveau de l'hypophyse. Figure adaptée de la publication (Hartupee J. et Mann D.L. 2017).

L'IC se traduit aussi par des modifications du fonctionnement du système nerveux entraînant une hyperactivité du SNS^{61,62} qui provoque une diminution de la fraction d'éjection systolique. Il semblerait que cette hyperactivité des fibres afférentes cardiaques amplifierait les dommages causés par la maladie. Dans la physiopathologie de l'IC l'inhibition de ces systèmes que ça soit du système rénine-angiotensine ou le SNS sont actuellement un enjeu majeur pour la thérapie de l'IC. Donc il est nécessaire de comprendre l'implication du SNA dans le développement de l'IC car la diminution du débit cardiaque est néfaste pas seulement pour le cœur, mais aussi pour d'autres organes comme les poumons et les reins. C'est pourquoi nous avons travaillé sur un modèle d'insuffisance murin afin de mieux comprendre la communication cœur-cerveau. Mais peu de travaux encore expliquent les mécanismes mis en place au niveau neuronal entre ces deux organes afin de comprendre le système de douleur lors d'un IM et les conséquences au niveau du système nerveux.

3.3.3. Effets de l'activation du SNS dans l'IC

L'hyperactivité du SNS a de graves conséquences contribuant à la progression de l'IC⁵⁷. L'importance de l'augmentation de l'activité du SNS au niveau du cœur et des reins dans l'IC se traduit par une augmentation de 62% de la concentration totale de noradrénaline plasmatique chez les patients insuffisants cardiaques⁶³. L'hyperactivité du SNS est directement corrélée au degré de sévérité de l'IC et au pronostic de la maladie⁶⁴. Le niveau élevé de noradrénaline cardiaque libérée, au cours de l'IC, a des effets délétères au niveau du cœur dans des modèles animaux et chez l'homme. Des niveaux excessifs de noradrénaline provoquent une régulation négative des récepteurs β -adrénergiques cardiaques et entraînent des effets toxiques sur les terminaisons nerveuses sympathiques par la formation de radicaux libres dérivés de la noradrénaline⁶⁵, ces deux effets agissent en réduisant les propriétés inotropes et chronotropes de la noradrénaline. La libération excessive de noradrénaline induit également la fibrose et une hypertrophie au niveau ventriculaire gauche⁶⁶. L'hyperactivation sympathique est donc le marqueur pronostique le plus puissant chez les patients insuffisants cardiaques⁶⁷. Les mécanismes fondamentaux responsable de l'activation du SNS au cours de l'IC restent encore mal connu. On sait que les processus impliqués dans le dysfonctionnement sympathique semblent être complexes et multifactoriels. Il serait du surement à des modifications des boucles réflexes autonomes : baroréflexes⁶⁸ et chémoréflexes⁶⁹, des changement dans SNC notamment au niveau des centres intégrateurs⁷⁰, mais aussi des modifications du niveaux d'expression d'hormones et de médiateurs chimiques comme la noradrénaline mais surtout des neuropeptides⁷¹.

3.3.4. Les médiateurs chimiques dans l'IC

Des modifications des niveaux d'hormones circulantes et des médiateurs chimiques telle que la norépinéphrine (NE) ont été aussi impliquées dans l'hyperactivité sympathique observée dans l'IC^{72,73} (Figure 8)⁷³. En plus des afférences sympathiques agissant sur les centres cardiovasculaires, au niveau cérébral il a été également prouvé que l'augmentation des niveaux d'hormones circulantes peut augmenter l'activité sympathique par une action sur les ventricules. Mais aussi que des changements dans les voies centrales peuvent amplifier les effets d'autres afférences⁷⁴. Dans l'IC, les taux circulants de l'angiotensine sont augmentés, ce qui, peut augmenter le flux sympathique par des effets centraux et périphériques. L'angiotensine II peut faciliter la neurotransmission sympathique par une action stimulante sur les ganglions

sympathiques, en augmentant la libération de neurotransmetteurs au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques et en empêchant l'absorption de la NE au niveau de terminaisons nerveuses sympathiques⁷⁵. Par rapport aux effets centraux de l'angiotensine II il est bien établi que la stimulation des récepteurs AT₁ de l'angiotensine dans le cerveau a des actions puissantes sur le système nerveux sympathique⁷⁴. L'observation que la concentration de l'angiotensine II dans le liquide céphalo-rachidien soit augmentée dans l'IC sévère soutient l'hypothèse que ce système soit hyperactif au niveau central dans cette pathologie⁷⁶. De plus le système de l'angiotensine est activé dans certaines régions du cerveau puisqu'il a été observé une augmentation des protéines pour les récepteurs AT₁ dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus des animaux avec IC⁷⁶. Ces éléments suggèrent que les mécanismes angiotensinergiques centraux jouent un rôle crucial dans la l'augmentation de l'activité du SNS dans l'IC⁷⁴. Ces observations expliquent le bénéfice des bloqueurs du SRAA dans la prise en charge des IC avec une amélioration de l'état général des patients et une réduction de la mortalité⁷⁷.

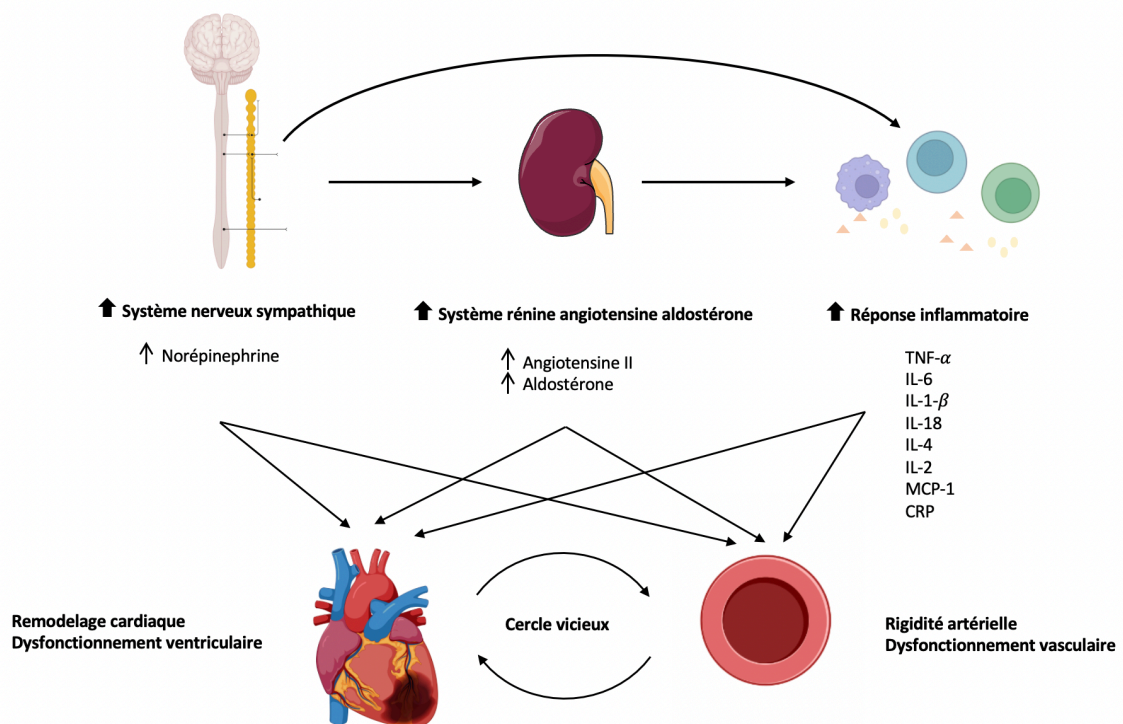


Figure 8 : Différents médiateurs chimiques ont une influence directe sur l'activité du cœur et du système vasculaire en condition pathologique d'insuffisance cardiaque. L'activation du système nerveux sympathique, du SRAA, et de la réponse inflammatoire sont des mécanismes importants dans la progression de l'IC induisant au niveau du cœur le remodelage cardiaque. L'activation de la voie du TNF- α a des effets cardioprotecteurs en réduisant l'ischémie et la lésion lors de reperfusion dans des modèle de cœurs isolé. Mais en condition chronique d'IC il y a une forte augmentation de médiateurs inflammatoires conduisant au développement et à la progression de l'IC comprenant l'activation des cytokines et des chimiokines impliquées dans la migration des leucocytes et favorisant l'inflammation et l'apoptose cellulaire au niveau du cœur et des vaisseaux sanguins. Figure adaptée de la publication (Grosman-Rimon L. et al. 2020).

3.3.5. Neuropeptides

Le contrôle de la fréquence cardiaque est bien connu par le SNA. Cependant, des peptides, notamment les neuropeptides, joueraient un rôle dans la modulation de l'activité du nœud sinusal et par conséquent pourraient être des modulateurs de l'activité neuronale du SNA. Un neuropeptide libéré localement pourrait avoir 3 fonctions différentes de neurotransmetteur, de neuromodulateur, ou de neurohormone⁷⁸. Mais il se pourrait qu'ils aient un effet indépendant sur la fonction cardiaque.

Le SNA est un système beaucoup plus complexe qu'on ne le pensait. En fait, il semble être capable, en synthétisant de nombreux neuropeptides, de moduler les signaux et contrôler les fonctions cellulaires liées à la transmission adrénergique ou cholinergique au niveau du cœur. De plus les neuropeptides sont souvent transportés par les mêmes vésicules et co-localisés avec des neurotransmetteurs. Ce nouveau rôle a été décrit depuis qu'il a été montré la coexistence de la norépinephrine et des neuropeptides comme la somatostatine dans les neurones périphériques⁷⁹. De nombreux autres neuropeptides ont également été localisés dans les neurones autonomes du nœud sinusal, comme le neuropeptide Y (NPY), le peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP), le peptide intestinal vasoactif (VIP), et la substance P (SP)^{80,81}. Le peptide VIP semblerait être un co-transmetteur avec l'acétylcholine dans les neurones parasympathiques intracardiaque, tandis que la neurotensine et le neuropeptide Y semblent eux aussi être co-localisés avec la NE dans les fibres sympathiques⁸².

Alors que la SP et le CGRP sont stockés dans les nerfs sensoriels primaires. Les actions physiologiques de ces neuropeptides sont bien connues⁸³ dans certains cas mais dans leur contribution au niveau de l'IC, il reste beaucoup de choses à comprendre sur leur rôle et leur implication. Certains neuropeptides sont cardioprotecteurs, d'autres favorisent un remodelage cardiaque et le développement de l'IC mais beaucoup d'entre eux ont leur fonction qui reste à être éclairci. Comprendre leur effet dans l'IC serait une avancée considérable notamment en regardant l'implication au niveau local du cœur et au niveau du système nerveux, les neuropeptides pourraient être considérés comme de potentielles cibles thérapeutiques. Étant donné que les neuropeptides sont associés au processus de douleur et de neuroinflammation on peut se demander si dans l'IC ils sont caractéristiques d'une mise en place de douleur qui impliquerait le système nerveux.

4. Physiologie et physiopathologie de la douleur

4.1. Définition et classification

La douleur survenant lors d'une insuffisance cardiaque reste un défi d'interprétation et de compréhension toujours d'actualité. En ce sens, le présent travail étudie les voies neuronales impliquées dans le système de douleur dans la mise en place de l'IC.

La douleur a été définie par l'IASP (International Association for Study of Pain) comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en des termes évoquant une telle lésion »⁸⁴. La douleur en elle-même peut être engendrée par diverses méthodes notamment des blessures physiques, de l'infection ou encore des stimulations nocives. Cette définition laisse entrevoir la difficulté à décrire simplement la nature de l'expérience douloureuse pourtant si commune, mais complexe à la fois. Woolf propose de classer la douleur en deux grands types : la douleur nociceptive et la douleur pathologique ou neuropathique⁸⁵.

4.2. Différents types de douleur

Le tableau 2 résume la classification des deux types de douleurs. Afin de caractériser la douleur, l'origine, le type de stimulus et le mécanisme responsable sont pris en considération.

Tableau 2 : Caractéristiques générales pour distinguer les deux grandes catégories de douleur : la douleur neuropathique et la douleur nociceptive⁸⁶⁻⁹³.

	Douleur Neuropathique	Douleur Nociceptive
Définition	Douleur causée par une lésion primaire des nerfs périphériques, ou du DRG ou d'un dysfonctionnement du système nerveux central	Douleur causée par des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou d'une stimulation excessive de nocicepteur
Origine	Provient de lésions du système nerveux	Provient de l'activation de nocicepteurs
Type de stimulus	Stimulus nocif souvent absent	Stimulus nocif présent
Mécanisme	Génération d'impulsions ectopiques Hyperalgésie : stimulation accrue et prolongée aux stimuli nocifs résultant d'un traitement anormal des nocicepteurs Allodynie : provoquée par un stimulus inoffensif	Voie de la douleur intacte, transduction physiologique naturelle de la périphérie vers le système nerveux central, système de réflexes
Types de fibres	Fibres A myélinisées ou non myélinisées et Fibres C	Fibres A δ et fibres C
Localisation	Rayonnante et spécifique Confiné au territoire d'innervation de la structure nerveuse lésée	Localisée et limitée
Symptômes	Sensation étrange, se manifeste par une sensation de brûlure ou de douleur brûlante, douleur persistante lors d'altération des fibres C, douleur aiguë si altération des fibres A	Sensation douloureuse ordinaire, se manifeste par une douleur constante arquée lancinante, douleur aiguë qui disparaît quand la lésion est guérie
Traitement	Répond souvent mal aux analgésiques traditionnels	Sensible aux analgésiques traditionnels (opioïdes)
Exemple clinique	Lacération superficielle Brûlure superficielle Spasmes intestinaux ou menstruels Angine Calcul rénaux	Amputation Neuropathie périphérique Névralgie

4.2.1. Processus de Nociception

Le processus de nociception comprend des mécanismes moléculaires par lesquels les neurones sensoriels primaires détectent des stimuli nocifs au niveau de tissus et la transmission de cette information vers le cerveau. Ce mécanisme de plus en plus étudié est présent dans les systèmes sensoriels des mammifères mais aussi chez des espèces invertébrées. Cependant ces derniers ne ressentent pas la douleur en soi, mais ils possèdent des mécanismes de transduction qui leur permettent de détecter les stimuli potentiellement nocifs dans leur environnement. Les neurones afférents présentent à leur terminaison des nocicepteurs responsables de l'activation de la transduction des stimuli nocifs permettant de déclencher un potentiel d'action⁹⁴. L'information émise par le potentiel d'action est ensuite transmise par l'intermédiaire de neurones afférents situés dans la corne dorsale de la moelle épinière, où une transmission synaptique se produira avec les neurones du deuxième ordre. Les informations sensorielles sont ensuite acheminées

par les neurones d'ordre secondaire vers des structures supra-spinales où elles sont transmises et finalement perçues comme douleur⁹⁰ (Figure 9).

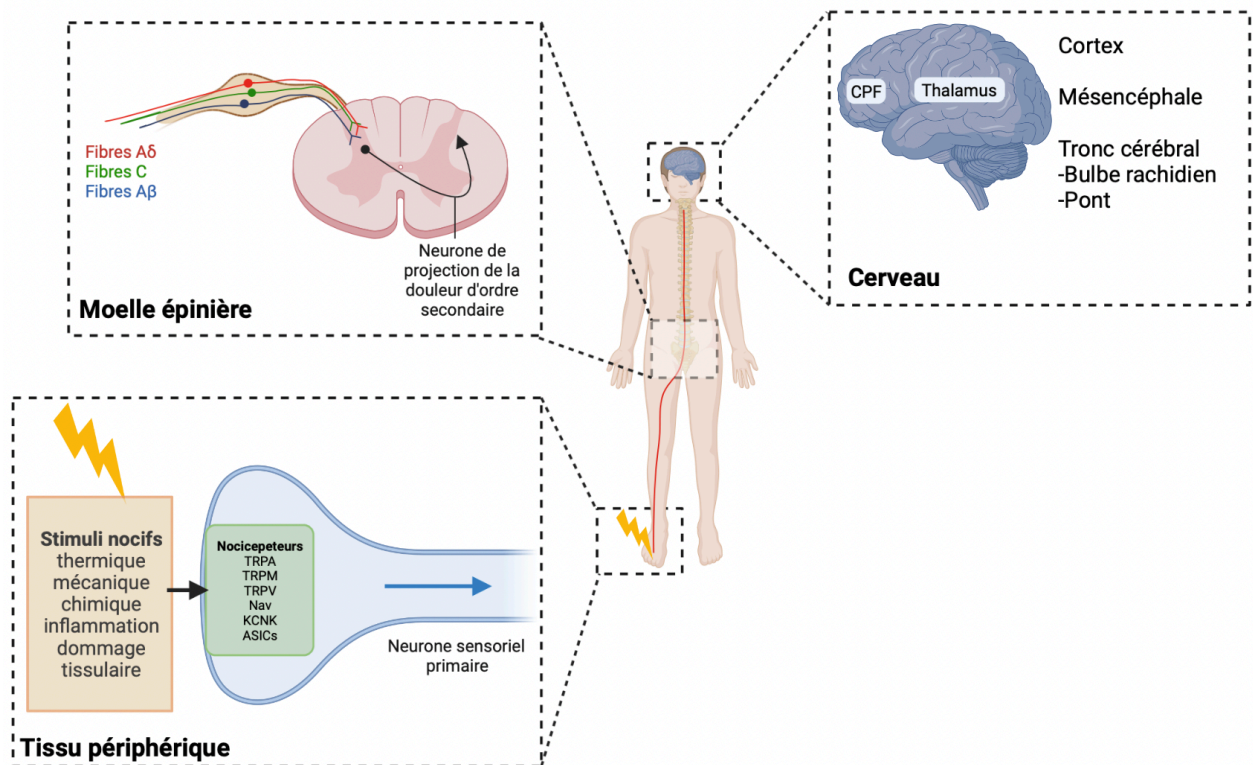


Figure 9 : Schéma général du principe du processus de nociception. En périphérie, les neurones sensoriels primaires sont activés à la suite d'une stimulation excessive dites nocive, ce qui entraîne l'activation de nocicepteur tel que TRPV1. En suite l'information est transmise au niveau de la moelle épinière jusqu'à être acheminée à différentes régions cérébrales^{95,96}.

4.2.2. Neurones sensoriels primaires

De nombreuses études ont démontré l'existence de différents types de neurones impliqués dans le processus de nociception. Un neurone sensoriel primaire peut être activé par des stimuli capable d'entraîner des lésions tissulaires. Ils peuvent avoir des seuils ou des sensibilités différentes qui permet de les distinguer des autres fibres nerveuses sensorielles. Des études électrophysiologiques ont mis en évidence l'existence de neurones sensoriels pouvant être activé par la chaleur nocive, une forte pression, ou encore des substances chimiques. Les fibres sensorielles primaires proviennent des corps cellulaires du trijumeau et des ganglions de la racine dorsale (DRG) relayant des informations sur les perceptions nocives allant de la périphérie au SNC, formant ainsi le système dit nociceptif. Les neurones sensoriels primaires

sont activés par stimulation des nocicepteurs. Les neurones sensoriels primaires sont classés en trois groupes selon leurs critères anatomiques et fonctionnels.

Les fibres C et les fibres A δ sont considérées comme les fibres afférentes impliquées dans le système nociceptif, tandis que les fibres A β ne sont pas impliquées dans la transmission de la douleur et envoient généralement des informations concernant les perceptions inoffensives telles que le toucher léger, la pression et la sensation de chaleur ou de froid⁹⁷ (Figure 10)⁹⁵.

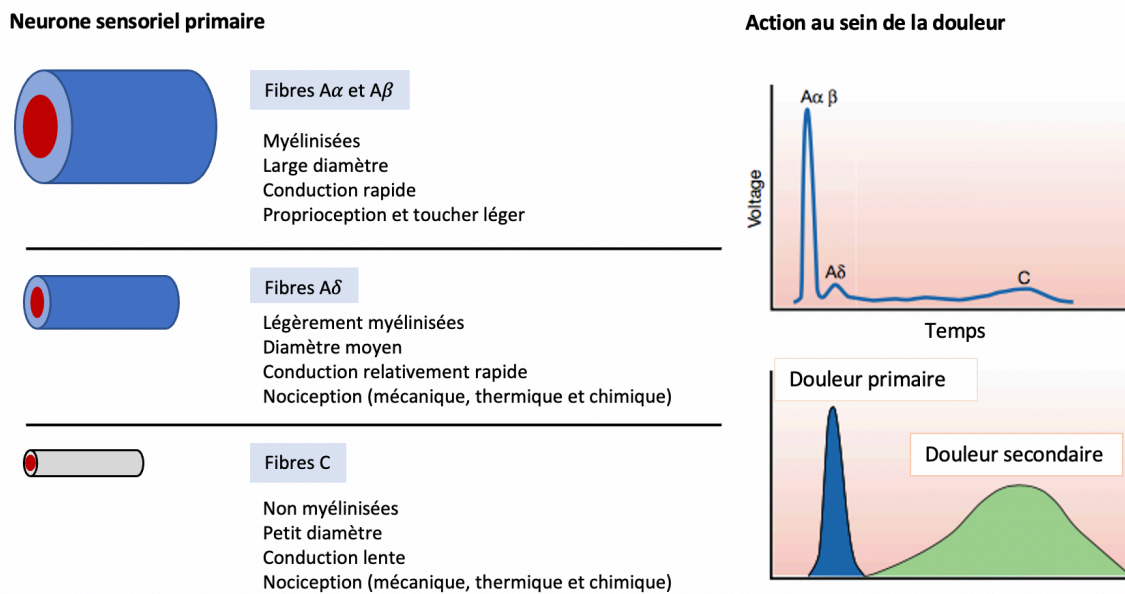


Figure 10 : Caractéristiques des différentes fibres sensorielles impliquées dans la perception de la douleur. Les fibres sont actives à différents stades de la douleur comme montré sur les diagrammes. Dans notre cas ce sont les fibres A δ et C qui sont intéressantes afin de comprendre la nociception. Figure adaptée de la publication (Julius D. et Basbaum A. 2001).

Les fibres A β sont de plus gros diamètre et myélinisées. La myéline permet de conférer une vitesse élevée de propagation des impulsions nerveuses, la transmission est beaucoup plus rapide pour ces fibres⁹⁸. Les fibres A δ sont des fibres de diamètre moyen et également myélinisées. Elles sont polymodales et jouent un rôle central dans la transmission et la perception de chaleur nocive, mécanique et chimique. La vitesse de propagation des stimuli nocifs à travers ces fibres est élevée, dû à leur myélinisation et leur diamètre. Ces fibres sont impliquées dans la perception de la douleur aiguë et rapide qui est la douleur primaire⁹⁹. Les fibres C sont de plus petit diamètre et ne sont pas myélinisées. Leur faible diamètre et l'absence de myélinisation entraînent une vitesse de conduction lente¹⁰⁰. Ces fibres transmettent la douleur dite secondaire ou lente. Les fibres C sont également polymodales et répondent aux stimuli thermiques, mécaniques et chimiques⁹⁷. Les fibres A δ et C ont un seuil d'activation

élevé et sont impliquées dans la perception des stimulus nocifs⁸⁹. Chacune des catégories des fibres sensorielles sont connectées à une partie bien définie au niveau de la corne dorsale de la ME dans les six couches laminaires ceci est illustré dans la Figure 11¹⁰¹ ci-dessous.

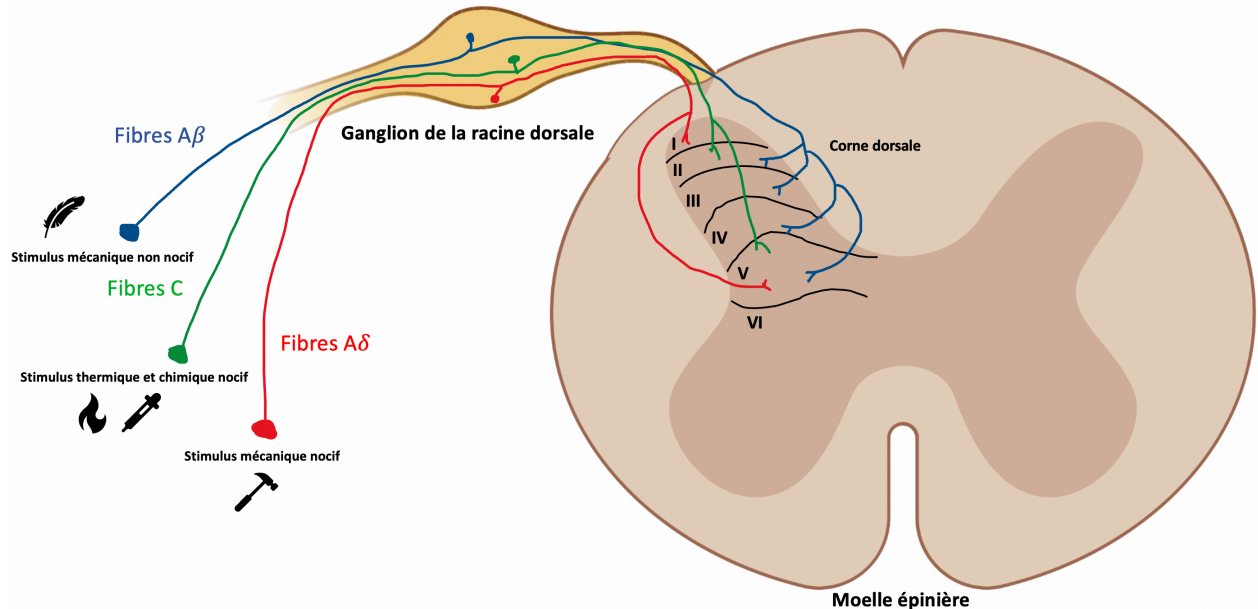


Figure 11 : Représentation schématique de l'organisation des fibres sensorielles primaires se projetant dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les fibres nociceptives sensorielles se terminent principalement dans la corne dorsale superficielle. Les fibres A δ se terminent au niveau des couches laminaires I et V et les fibres C sont au niveau des laminae II et V. Tandis que les fibres A β mécaniques ont leurs terminaisons localisées au niveau de couches laminaires plus profondes. Figure adaptée de la publication (Comitato A. et Bardoni R. 2021).

4.2.3. Canaux ioniques

La perception des stimuli est médiée dans un premier temps par des canaux ioniques voltage-dépendants composés de protéines transmembranaires complexes. L'activation des canaux ioniques entraîne l'efflux ou l'influx d'ions spécifiques à travers le canal, ce qui entraîne une polarisation ou une dépolarisation de la membrane cellulaire modulant l'excitabilité électrique des neurones. Une grande majorité des nocicepteurs sont des canaux ioniques permettant une dépolarisation rapide de la membrane¹⁰². Des canaux ioniques perméables à différents ions ont été identifiés le long du SNC. Ils jouent un rôle fondamental dans la génération de potentiels d'action et leur propagation à travers des fibres afférentes. Dans les cellules neuronales, les canaux voltage-dépendants du calcium (Cav) sont les principaux canaux ioniques impliqués dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs pendant la transmission synaptique. Cav2.2, situé sur les terminaisons nerveuses, a été décrit comme essentiel pour déclencher la

libération de neurotransmetteur présynaptique par les cellules neuronales en réponse à l'influx de Ca^{2+} ^{103, 104}. De plus, l'influx de Ca^{2+} s'établit par le Cav dans le cytosol, et il est également crucial pour réguler l'activité des enzymes cytosoliques et d'autres processus biochimiques¹⁰⁵. En outre, plusieurs nocicepteurs, tels que les récepteurs TRPV, ont des mécanismes semblable au Cav, dont l'activation conduit à une dépolarisation de la membrane et à la génération de potentiels d'action¹⁰².

4.2.4. Les nocicepteurs

La douleur débute généralement par l'activation de récepteurs sensoriels appelés nocicepteurs^{85,106}. Les nocicepteurs sont des neurones sensoriels périphériques spécialisé dans la détection de stimuli douloureux. Les nocicepteurs sont capables de répondre de manière sélective à différentes stimulations⁸⁶. Leur activation peut résulter d'une perception nocive de la chaleur et du froid, de stimuli chimiques ou mécaniques (Figure 9)⁸⁹. Le seuil d'activation de ces différents nocicepteurs dépend du tissu innervé. De plus, la sensibilité des nocicepteurs peut être modifiée après une lésion tissulaire dû à la libération de substances chimiques inflammatoires réduisant leur seuil d'activation¹⁰⁷. L'excitation des nocicepteurs par des stimuli mécaniques, thermiques et chimiques provoque une dépolarisation de la membrane, conduisant à la génération d'un potentiel d'action⁸⁶. Il existe donc différentes classes de nocicepteurs dépendant de leur type de stimulation (Figure 12) tel que des récepteurs dit sensible à la chaleur comme les « transient potential receptor vanilloid » (TRPV), des récepteurs sensibles à aux composés chimiques comme les récepteurs canaux ioniques à détection d'acide (ASIC) ou des mécanorécepteurs répondant à un stimulus mécanique comme par exemple la pression.

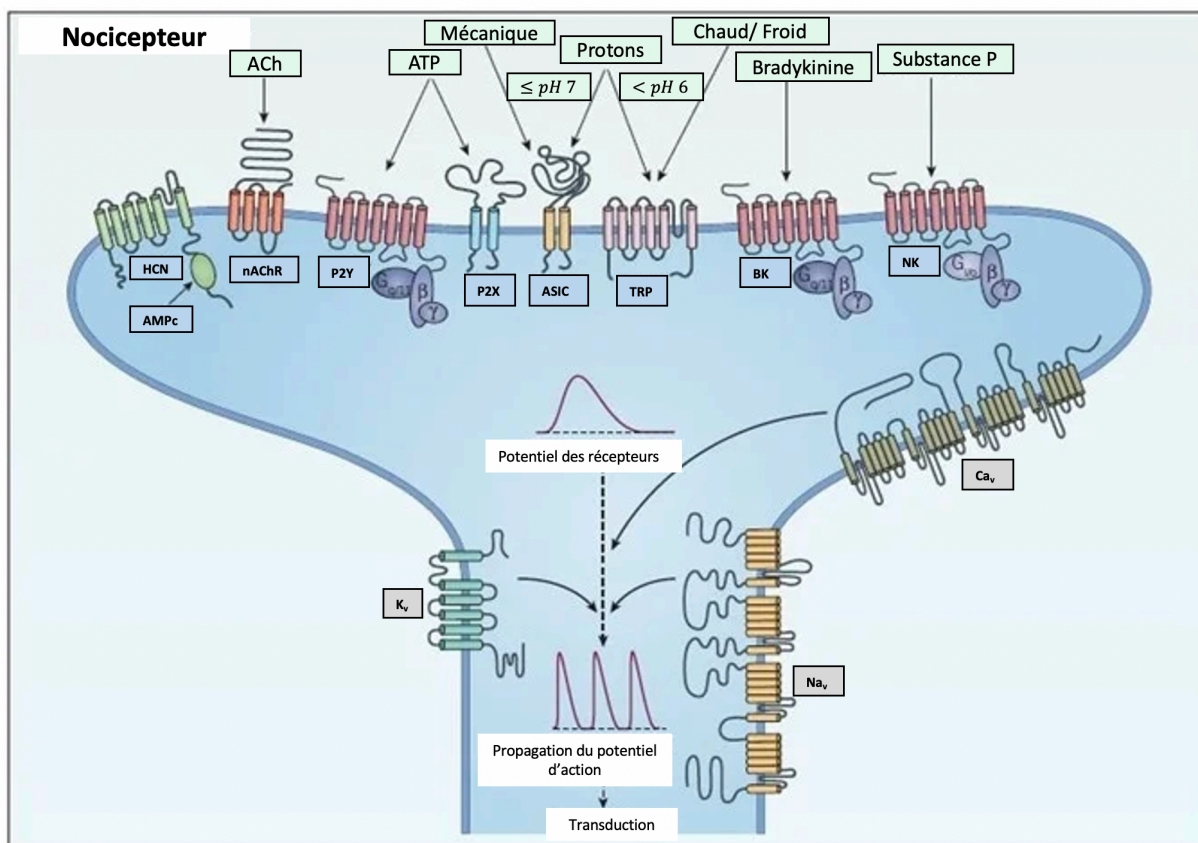


Figure 12 : Sensibilisation périphérique et propagation du signal par les nocicepteurs. Les terminaisons périphériques répondent aux stimuli nocifs par le biais de canaux ioniques tels que les récepteur TRP, ASIC HCN et P2X et des récepteurs RCPG tels que la bradykinine (BK), la neurokinine (NK) et les récepteurs P2Y qui modulent indirectement les canaux ioniques et les voies de signalisation intracellulaires. Lorsqu'un seuil de dépolarisation est atteint, les canaux sodium et calcium voltage dépendants (Na_v et Ca_v) sont activés ce qui génère un potentiel d'action. Alors que les canaux potassique voltage dépendant (K_v) s'ouvrent et repolarise la membrane inactivant les canaux Nav et ramenant le neurone dans un état de repos. Le potentiel d'action se propage le long de l'axone ce qui est le processus de transduction. Figure adaptée du site <https://www.news-medical.net/whitepaper/20190817/Ion-Channels-Involved-in-Pain.aspx>.

Les informations sensorielles perçues par les nocicepteurs sont acheminées par les neurones afférents primaires jusqu'à la ME. La voie ascendante comprend le processus de signalisation entre les neurones afférents primaires et les neurones d'ordre secondaire au niveau de la ME, ainsi que l'ascension de l'information par les neurones d'ordre secondaire aux structures supra-spinales notamment le thalamus, on parle d'un système spinothalamique (Figure 13). Dans le cerveau, les informations sont traduites et ensuite perçues comme des stimuli nocifs. Mais qu'est ce qui en est de ce qui se passe lorsqu'un IM se produit. Un IM crée des dommages tissulaires, et nous pouvons donc nous interroger sur cette communication de la périphérie au centre intégrateur établie entre le cœur et le cerveau. Le processus de signalisation entre les neurones afférents primaires et les neurones d'ordre secondaire est connu sous le nom de première synapse. Ce processus a lieu au niveau de la ME et permet la communication entre neurones via la libération de neurotransmetteurs.

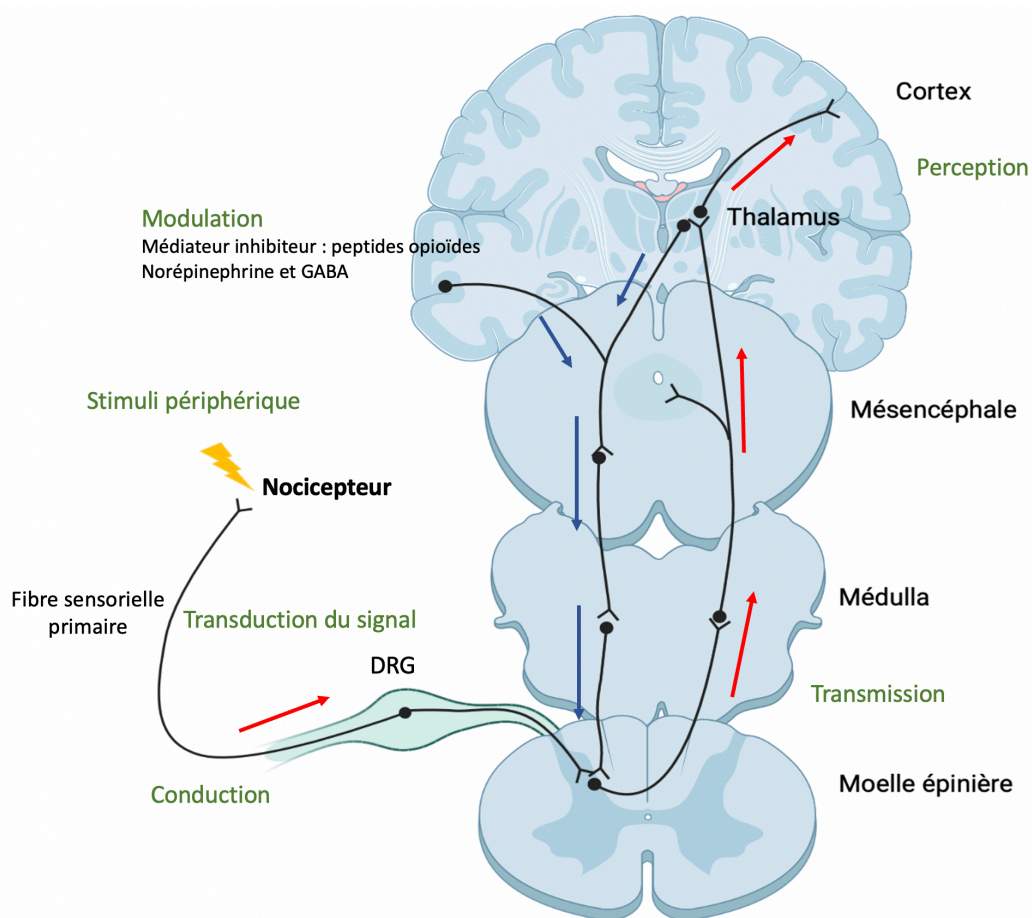


Figure 13 : Schéma des voies de perception de la douleur. La douleur est initiée en périphérie par une stimulation excessive des nocicepteurs présents à la terminaison des fibres sensorielles primaires, il y a transduction et conduction du signal vers la moelle épinière (première synapse) puis la transmission de l'influx nerveux vers les voies ascendantes passant par des centres intégrateurs, la médulla, le mésencéphale, le thalamus pour être perçue au niveau du cortex. Ce sont les voies spinothalamiques. Mais il y a aussi une modulation de la perception de la douleur par l'implication de voies descendantes inhibitrices tel que les peptides opioïdes ou encore norépinephrine.

4.2.5. Rôle de la première synapse dans la ME

La communication neuronale est établie par une transmission dite synaptique¹⁰⁸. Cette communication est notamment induite par la libération de neurotransmetteurs excitateurs à partir des terminaisons de neurones primaires. Grâce à l'interaction de ces neurotransmetteurs libérés avec leurs récepteurs situés sur des neurones secondaires, les neurones secondaires sont activés et l'information peut être transférée. La première synapse est le processus par lequel le système nerveux périphérique et SNC sont en connexion. Cette dernière est réalisée au niveau de la corne dorsale de la ME au sein des lamines I à V et permet la signalisation entre neurones afférents et secondaires qui transmettent des informations à des structures supra-spinales⁹⁷.

Le processus synaptique est un mécanisme dynamique de libération des neurotransmetteurs qui maintient une activité basale des neurones sensoriels. Cependant, des stimulations nocives du système nerveux périphérique et du SNC renforcent l'activité de la première synapse. Les potentiels d'action générés à la suite d'une perception par les nocicepteurs, sont propagés par des neurones sensoriels primaires stimulant la synthèse de neurotransmetteurs peptidergiques spécifiques au niveau du DRG ainsi que par l'ouverture des canaux Ca^{2+} au niveau de la terminaison du neurone. Ces peptides impliqués dans la signalisation d'informations nocives entre neurones sont empaquetés dans des vésicules de sécrétion et sont acheminés par les axones jusqu'à la terminaison présynaptique¹⁰⁹. Les fortes concentrations de Ca^{2+} au terminal, causées par l'afflux de Ca^{2+} par les canaux Ca^{2+} activés par le potentiel d'action, facilitent la libération du contenu vésiculaire du terminal présynaptique dans l'espace synaptique par exocytose^{110,111}. L'interaction entre les neurotransmetteurs libérés et des récepteurs postsynaptiques spécifiques stimule le terminal postsynaptique et génère un nouveau potentiel d'action au niveau du neurone d'ordre secondaire¹¹².

4.2.6. Nociception cardiaque

L'IM induit une lésion tissulaire souvent irréversible et est la source de réponse neuronales des voies afférentes cardiaques tel que le système sympathique et parasympathique. Le rôle des afférences sympathiques¹¹³ dans la nociception cardiaque est reconnu mais beaucoup d'incompréhension des mécanismes moléculaires et fonctionnels reste à être éclairci. Des études sur des patients ont démontré que la sensation de douleur n'est pas directement liée au degré de maladie causée par l'ischémie ou à la gravité et à la durée de l'ischémie myocardique^{114,115}. Lors de douleur d'ordre viscérale comme celle causée lors d'IM il y a des informations transmises par les afférences sympathiques de la périphérie provenant de la zone infarctée (fibres C et $\text{A}\delta$) aux ganglions de la racine dorsale qui implique les voies spinothalamiques¹¹⁵. Mais il a également été montré que les fibres issues de l'innervation vagale reliées au NTS sont impliquées dans la conduction afférente des stimuli¹¹⁵. Des innovations pharmacologiques ont permis de comprendre d'avantage la signalisation moléculaires au niveau des terminaisons sensorielles afin de définir le rôle des récepteurs vanilloïdes tels que les TRPV qui sont sensibles à l'ischémie tissulaire¹¹⁶. Lors d'une ischémie, une production d'acide lactique et une libération de lipides et de médiateurs inflammatoires sont entraînée

pouvant induire la stimulation du TRPV1 exprimé au niveau de neurones sensoriels cardiaques^{115,117}.

5. La famille des TRP

Les canaux appartenant à la famille des TRP « Transient Receptor Potential » sont très bien conservés dans le règne animal et largement exprimés chez les organismes de la levure à l'Homme. Ces canaux ont des rôles clés en tant que transducteurs majeurs de stimuli physico-chimiques liés aux sensations. En effet, ils contribuent aux cinq sens et également à la thermosensation. Ils présentent également une diversité de mode d'activation et de sélectivité ionique, leur accordant un rôle à la fois en conditions saine et pathologique.

5.1. Historique

Les canaux TRP furent découverts pour la première fois en 1969 suite à la caractérisation d'un mutant de *Drosophila melanogaster*¹¹⁸. L'exposition prolongée à une lumière continue chez ce mutant montre que la réponse des photorécepteurs diminuait au seuil basal. C'est ainsi qu'apparut le mot « TRP », caractérisant ces canaux sensibles à la lumière dans les photorécepteurs de Drosophile¹¹⁹. En 1989, le gène *trp* fut cloné pour la première fois afin de l'étudier plus en détail¹²⁰. Il fut alors déterminé que le gène *trp* code pour un canal sensible à la lumière activé en aval de la cascade de signalisation initiée par la PLC¹²¹. Puis entre 1993 et 2003, six sous-familles de TRP furent découvertes de façon indépendante, à la fois chez les invertébrés, les vertébrés inférieurs et les mammifères. Enfin, c'est en 1997 que fut découvert le canal le mieux caractérisé de la famille des TRP et celui qui nous intéresse fortement dans notre projet, TRPV1¹²².

5.2. Les différentes familles

L'analyse phylogénétique des 28 gènes que regroupe la famille des canaux TRP a permis de les classer en 6 sous-familles : TRPC (Canonical), TRPP (Polycystin), TRPM (Melastatin), TRPA (Ankyrin), TRPML (MucoLipin) et TRPV (Vanilloid)^{123,124} (Figure 14)¹²⁵.

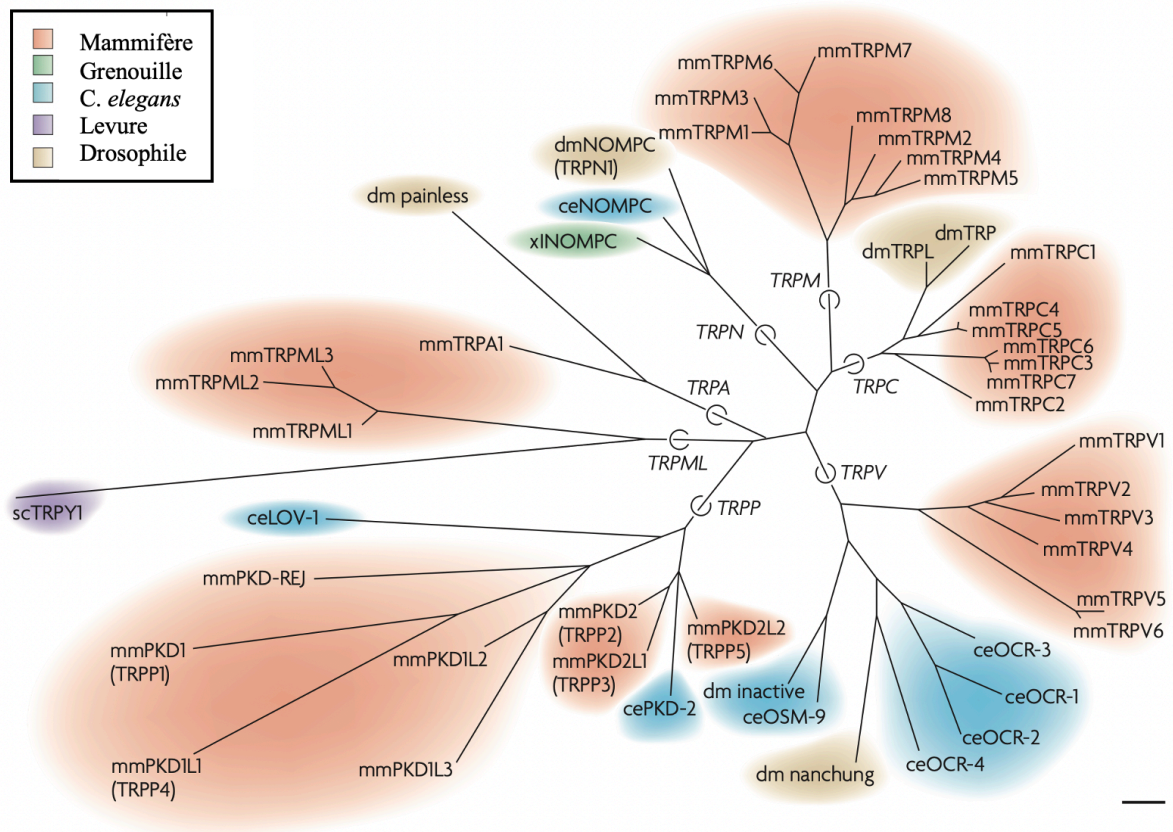


Figure 14 : Arbre phylogénétique des TRP montrant les liens de parenté entre différentes espèces. Notamment la famille des TRPV chez les mammifères comme la souris présente des similitudes et de l'orthologie avec des récepteurs présents chez des espèces inférieures comme chez *C. elegans* (nématode). Figure adaptée de la publication (Christensen A.P. et Corey D.P. 2007)

5.2.1. Structure des TRP

L'ensemble de cette famille présente une homologie structurale. Tous les membres ont une structure quaternaire tétramérique^{126,127} composée de six segments transmembranaires (S1 à S6) contribuant chacun à un filtre de sélectivité (Figure 15)^{128,129}. Enchâssé entre le S5 et le S6, on retrouve un domaine pore hydrophobe permettant une conduction des ions, similaire aux canaux potassiques¹²⁷. Ces canaux présentent également des terminaisons amine (N-terminale) et carboxyle (C-terminale)^{126,127}. Au sein de la partie C-terminale, on retrouve un domaine conservé chez tous les TRP (à l'exception des TRPP et TRPA), le domaine TRP. Il s'agit d'un bloc d'environ 25 acides aminés allant du S6 jusqu'à la partie C-terminale^{123,128}. Ce domaine comprend la TRP box et une région riche en proline (dénommé TRP box 2). La TRP box correspond à une séquence de six acides aminés I-W-K-L-Q-R chez tous les TRP, sauf les TRPC¹²⁸. De façon plus générale, les acides aminés du domaine TRP sont nécessaires à la

liaison du PIP2, qui est un lipide polaire régulateur ubiquitaire des fonctions de transporteur et du canal. Néanmoins, il est intrigant de voir que PIP2 stimule certains canaux (TRPM5, TRPM7, TRPM8 et TRPV5)^{130,131}, alors qu'il en inhibe d'autres (TRPV1)^{132,133}. La calmoduline (CaM) est également une protéine qui s'associe avec tous les TRP¹³⁴. D'un point de vue structure fonction, les TRP ne présentent que très peu de résidus arginine. Sachant qu'une série de résidus arginine agit normalement en tant que senseur du potentiel électrique transmembranaire, la rareté de ces résidus chez les TRP expliquerait pourquoi ces canaux présentent une faible dépendance au voltage¹²⁸.

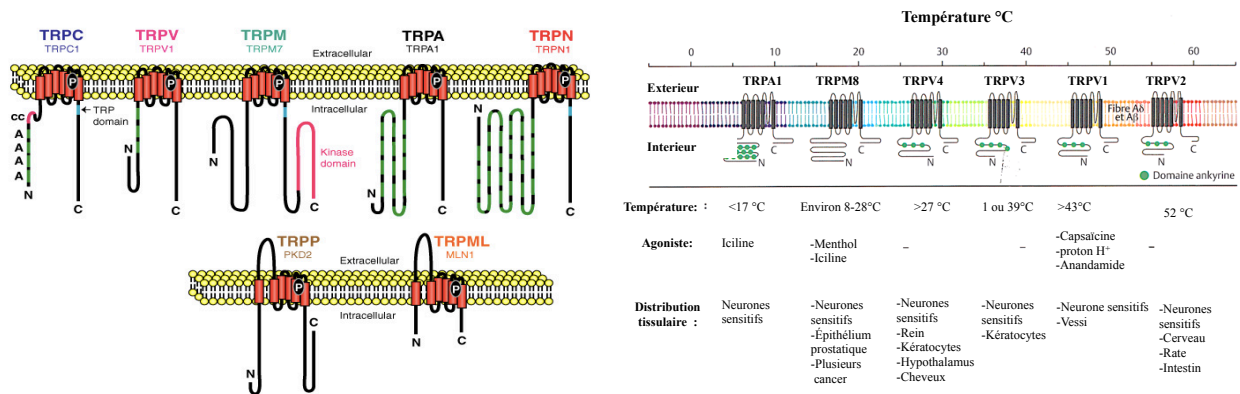


Figure 15 : Organisation structurale de l'ensemble des sous-familles des TRP et les caractéristiques générales de plusieurs récepteurs TRP sensible à la chaleur et connus pour être activés par différentes molécules d'intérêt pharmacologique. Figure adaptée de la publication (Montell C. 2005) et de la thèse de Mouna Saïdi.

5.2.2. La sous-famille des TRPV (Vanilloïde)

La famille des TRPV regroupe six membres (TRPV1 à TRPV6) impliqués dans diverses fonctions physiologiques^{135,136}. Les membres de cette famille peuvent être activés par une multitude de stimuli différents, tant mécaniques que chimiques, à la fois endogènes (pH et température) et exogènes (molécules pharmacologiques). Les protéines TRPV nous intéressent fortement car elles sont largement distribuées au niveau du cœur : dans les cellules des muscles lisses vasculaires, les cellules endothéliales et les nerfs péri-vasculaires¹³⁷ (Figure 16)¹³⁸. Au niveau cardiaque, l'ouverture de ces canaux régulerait les fonctions systoliques et diastoliques en modulant les taux calciques intracellulaire¹³⁸. En condition pathologique, les TRPV participeraient à différents événements tels que le remodelage cardiaque, la propagation des lésions d'Ischiémie-Reperfusion et la progression de l'IC^{139,140} (Figure 17)¹³⁸. Au sein de cette famille, « Transient Receptor Potential Vannilloïd 1 » (TRPV1) fut historiquement le premier membre découvert et est actuellement le mieux caractérisé chez les vertébrés. Également connu

sous les noms de « récepteur des vanilloïdes » et « récepteur à la capsaïcine », le TRPV1 est une protéine membranaire intégrale de 95kDa¹²². Plus précisément, TRPV1 est un canal cationique non sélectif impliqué dans différents mécanismes (nociception, inflammation ect.). Au cours de ces processus, TRPV1 exerce un rôle d'intégrateur de nombreux stimuli physiques et chimiques, tant endogènes qu'exogènes^{122,141,142}.

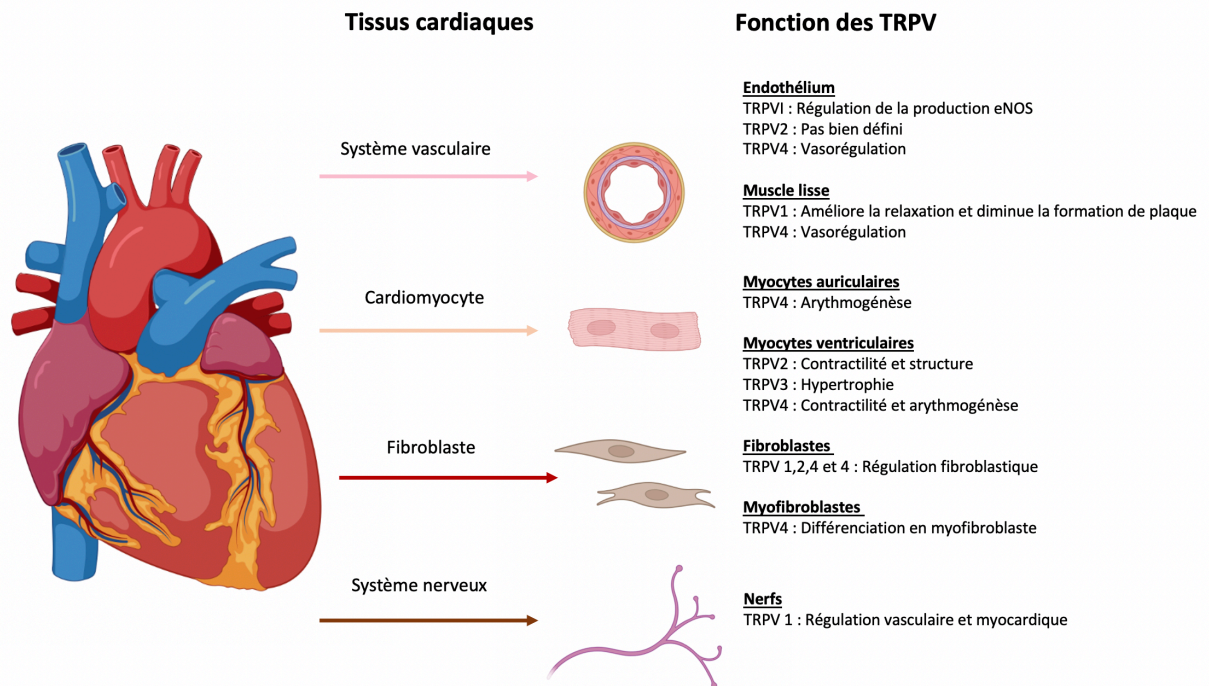
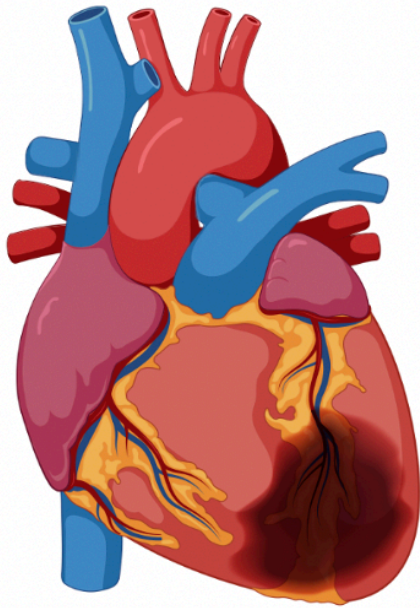


Figure 16 : Différents rôles connus des canaux TRPV dans le tissu cardiaque en condition physiologique. Les TRPV sont distribués dans tout le système cardiovasculaire, du myocarde et dans le système nerveux intrinsèque du cœur. Ils exercent des fonctions bien spécifiques en fonction de leur localisation. Figure adaptée de la publication (Miller M. et al. 2021).



Infarctus du Myocarde

TRPV1

?? Surcharge de pression, hypertrophie

TRPV2

- ↑ Ischémie, Infarctus du myocarde
- ↑ Dystrophie musculaire
- ↑ Surcharge de pression, hypertrophie

TRPV3

- ↑ Ischémie, Infarctus du myocarde
- ↑ Surcharge de pression, hypertrophie

TRPV4

- ↑ Vieillissement
- ↑ Fibrillation auriculaire
- ↑ Ischémie, Infarctus du myocarde
- ↑ Surcharge de pression, hypertrophie

Figure 17 : Différents rôles connus de la réponse des canaux TRPV aux stimuli pathologique au sein du tissu cardiaque. TRPV1 est un récepteur présent et sensible à l'ischémie myocardique mais peu de fonctions bien définies sont décrites. Figure adaptée de la publication (Miller M. et al. 2021)

5.3. TRPV1

Tout au long de mon projet de thèse, on s'intéresse particulièrement à l'activation du TRPV1 chez le modèle murin cardiaque mais aussi aux orthologues du récepteur TRPV1 dans le modèle alternatif *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

5.3.1. Structure de TRPV1

Suite à une expression de TRPV1 dans des ovocytes de Xénope, il fut déterminé que son ADNc contient un cadre de lecture ouvert de 2514 nucléotides, codant pour une protéine de 838 acides aminés. TRPV1 est une protéine tétramérique de 95 kDa. Chaque sous-unité est composée de six segments transmembranaires (S1 à S6) qui sont principalement des feuilletts β (Figure 18)^{143,144}. On retrouve une région amphipathique entre le S5 et le S6 qui forme le pore conducteur du canal. Cette région contient des acides glutamiques impliqués dans la cible du pore de façon dépendante au pH¹⁴¹. La partie N-terminale hydrophyle de 432 acides aminés présente un domaine riche en proline suivi par trois à six A-R-D. Ici, les A-R-D sont impliqués

dans les interactions protéine-protéine de TRPV1 avec les protéines cytosoliques et celles ayant des séquences consensus avec les protéines kinases, mais pourraient également interagir avec des facteurs régulateurs. Le N-terminal contient également un site capable de lier la calmoduline (CaM) de façon dépendante au calcium¹⁴⁵. Ce site est situé à proximité du premier domaine A-R-D, et est compris entre les résidus d'acides aminés F189 et E222. La partie C-terminale de 154 acides aminés comprend un domaine TRP hautement conservé parmi tous les canaux TRP. Il y a 25 acides aminés qui correspondent à la TRP box¹²⁷. Un motif coiled-coil se situe entre les résidus E684 et R721 et se chevauche avec la TRP box. Il s'agit d'un domaine d'association protéine-protéine qui semble être un déterminant moléculaire de la tétramérisation du canal¹⁴⁶. Les domaines S2 et S3 sont impliqués dans la liaison des agonistes et antagonistes de TRPV1, mais ils n'influencent pas l'activation par la température¹⁴⁷. Par exemple dans le S3 la capsaïcine (CAP), un agoniste de TRPV1, se lie aux résidus R491, Y511 et S512 alors que la capsazépine (CAPZ), un antagoniste de TRPV1, se fixe entre les résidus 481 et 550^{147,148}. Des mutations de certains acides aminés de TRPV1 peuvent engendrer des perturbations de liaison avec ses agonistes et antagonistes. En effet, TRPV1 présente un site de glycosylation au niveau de l'acide aminé N604¹⁴⁹ et une mutation ponctuelle de N604T empêche la glycosylation et modifie la liaison avec la CAP. TRPV1 présente une faible dépendance au voltage, probablement à cause de la rareté des charges positives présentes dans le S4. En effet, TRPV1 ne présente qu'un seul résidu arginine au niveau de son S4. Pour terminer, TRPV1 est un canal cationique laissant passer les ions mono et divalents dont la perméabilité aux ions est la suivante : $Ca^{2+} > Mg^{2+} > Na^+ \sim K^+ \sim Cs^+$ ¹²².

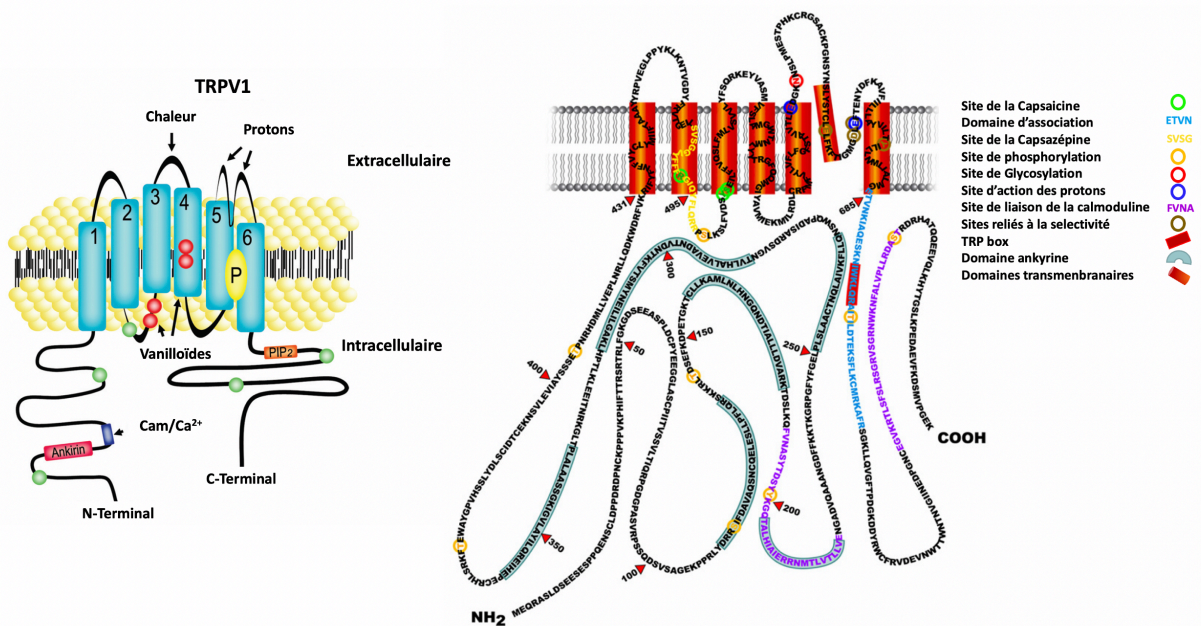


Figure 18 : Schéma illustrant les principales caractéristiques structurales du contrôle et de la régulation du récepteur TRPV1. Le canal TRPV1 est une protéine à six domaines transmembranaires, il peut être activé par différents effecteurs tel que la chaleur, les protons et bien entendu les vanilloïdes comme la capsaïcine. L'interaction des différents effecteurs se réalise sur différents sites soit extracellulaire soit intracellulaire comme c'est le cas pour la capsaïcine. Figure adaptée des publications (Leonelli M. et al. 2011) et (Latorre R. et al. 2007).

5.3.2. Localisation de TRPV1

Depuis sa découverte en 1997, l'expression de TRPV1 fut largement étudiée à travers différents modèles. De nombreuses études furent réalisées afin de déterminer sa localisation, mais aussi comprendre son fonctionnement, à la fois en conditions physiologiques saine et/ou pathologique.

TRPV1 est exprimé à la fois dans différents tissus neuronaux et non neuronaux. Parmi les tissus neuronaux, TRPV1 est retrouvé au niveau des ganglions de la racine dorsale, de la moelle épinière, des cellules dendritiques, de l'hypothalamus, du thalamus, des noyaux du trijumeau, des noyaux jugulaires, de l'hippocampe, du cortex, du cervelet, du bulbe olfactif et du mésencéphale¹⁵⁰. TRPV1 est également fortement exprimé dans les neurones sensoriels primaires et afférents, les fibres sensorielles C et les fibres A δ ¹⁵¹, mais aussi dans les terminaisons des neurones sensoriels primaires et centraux^{152,153}. TRPV1 est surtout retrouvé abondamment dans les neurones afférents primaires innervant la peau et les organes internes¹²². En ce qui concerne le système cardiovasculaire, des nerfs sensoriels exprimant TRPV1 sont connus^{154,155}. TRPV1 est exprimé au niveau du cœur et du système circulatoire^{138,139,154,156}. Cependant, sa fonction au niveau du cœur reste à être élucidée que ça soit en condition

physiologique ou pathologique alors que d'autres TRPV sont connus comme essentiels lors de pathologies tel que l'infarctus du myocarde.

5.3.3. Mécanisme d'action

L'activation de TRPV1 induit l'ouverture du canal provoquant alors un afflux d'ions calcium et sodium dans la cellule nerveuse sensorielle qui à son tour initie une cascade d'évènements entraînant une dépolarisation membranaire, une décharge neuronale et une transduction des messages nerveux (Figure 19). Au sein de la ME, l'activation du TRPV1 va induire une relâche de neurotransmetteurs incluant la libération de peptides pro-nociceptifs : la substance P (SP) qui est issue de la maturation de la protachykinine TAC1¹⁵⁷. D'autres peptides clés de la réponse à la douleur comme le peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP) sont relargués dans l'espace intersynaptique. Ces deux peptides SP et CGRP sont essentiels lors de la transmission de l'influx nerveux suite à l'activation du TRPV1¹⁵⁸. Cependant il a aussi été démontré que les neurones exprimant TRPV1 utilisent du glutamate, de l'ATP comme neurotransmetteurs afin d'établir la connexion neuronale^{159,160}. Lors d'une activation de TRPV1 prolongée par exemple par la CAP, il y a un changement conformationnel et fermeture du récepteur entraînant un effet analgésique¹⁶¹. Quand le récepteur se trouve désactivé, il se produit une diminution marquée de la libération de neuropeptides. Alors que la SP joue un rôle crucial dans la transmission de la douleur au niveau central, la modulation des récepteurs TRPV1 centraux affectera la transmission de la douleur. Le récepteur TRPV1 est déterminant dans la libération des tachykinines, ainsi que dans la sensation douloureuse et de l'hyperalgésie induites par des lésions tissulaires¹⁶².

Activateurs de TRPV1

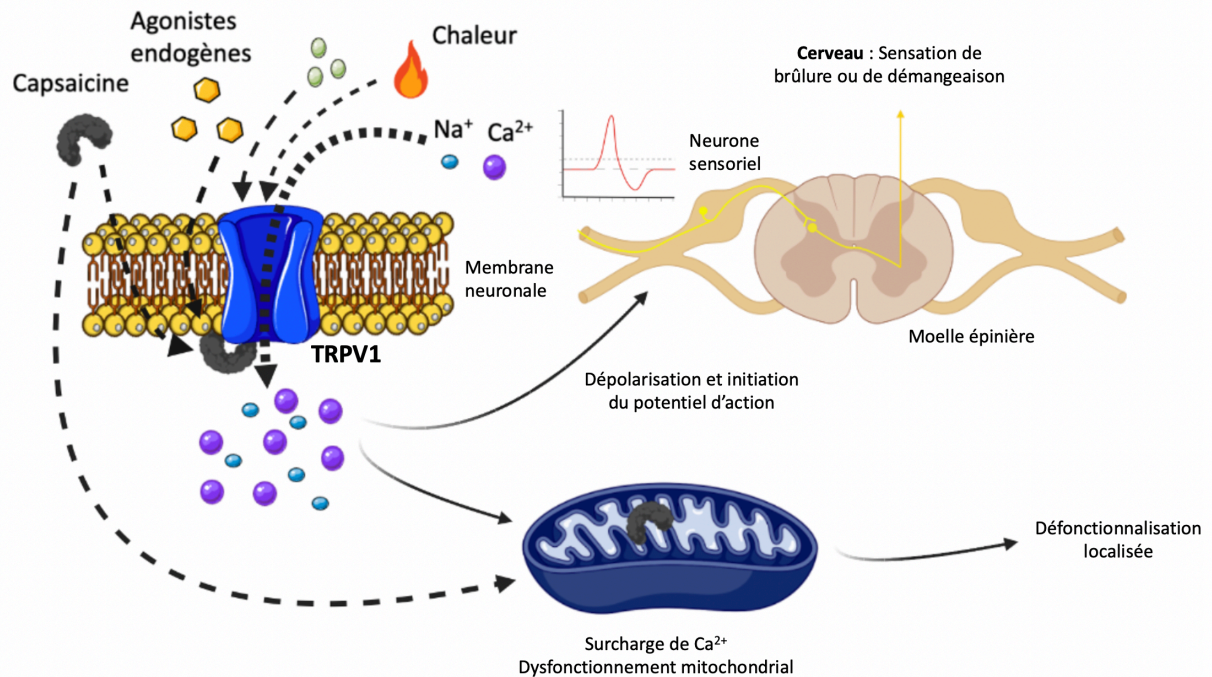


Figure 19 : Cascade de l'activation de TRPV1. Le récepteur TRPV1 est sensible à différents agonistes endogènes ou exogènes comme la capsaïcine. Son activation induit l'ouverture des canaux calciques et sodiques entraînant une dépolarisation cellulaire et la sensibilisation central et périphérique.

5.3.3.1. Les tachykinines

Les tachykinines sont une famille de neuropeptides qui partagent une extrémité C-terminale commune et essentielle pour leurs activités biologiques, du type Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂¹⁶³. Cette famille contient SP, la neurokinine A (NKA) et la neurokinine B (NKB), qui sont les plus abondantes au niveau du système nerveux des mammifères. Elles agissent avec différentes affinités sur les trois récepteurs NK1, NK2 et NK3. Les tachykinines proviennent de plusieurs gènes. Le gène TAC1 permet de produire la protéine précurseur qui doit subir la maturation protéolytique afin de donner les neuropeptides bioactifs tels que SP, NKA et NPK.

La substance P (SP) est un peptide constitué de 11 acide aminés (HRPKPQQFFGLM-NH₂). Au niveau du SNC, SP est synthétisée dans les neurones primaires afférents situés dans les lamina I et II de la moelle épinière de la corne dorsale (fibres C et A δ)¹⁵⁸ et participe à l'augmentation du stress et de l'anxiété lors d'un syndrome de douleur neuropathique. Elle agit sur les trois récepteurs des neurokinines mais a une plus forte affinité pour le récepteur NK1¹⁶³. Les neurones de la corne dorsale peuvent être activés lors d'une stimulation nociceptive même si la concentration de SP dans la moelle épinière est faible. SP est libérée à partir des grosses

vésicules à la suite d'un clivage protéolytique. Lors d'une lésion située en périphérie la SP est libérée au niveau du site de la lésion et agit comme vasodilatateur en induisant la production de différents médiateurs comme bradikinine et l'histamine. On peut aussi caractériser SP comme ayant une action pro-inflammatoire avec la libération de cytokines tel que les interleukines IL-6 et IL-8¹⁵⁷.

5.3.3.2. *Le CGRP*

Le peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP) est un neuropeptide de 37 acides aminés¹⁶⁴. Le CGRP a été découvert en 1982 par Rosenfeld lorsqu'il a démontré que l'épissage alternatif de l'ARNm de la calcitonine dans la thyroïde de rat vieillissant conduisait à la production de CGRP¹⁶⁵. Le CGRP a deux formes principales α et β . Le CGRP est principalement localisé dans les tissus neuronaux et plus précisément dans les fibres C et A δ ¹⁵⁸ mais il a également été retrouvé dans les tissus non neuronaux, dont sa fonction reste mal comprise. Il appartient à un groupe de peptides qui interagissent avec le récepteur de la calcitonine (CLR).

À l'origine, il a été démontré que le CGRP régule les voies sympathiques du cerveau¹⁶⁶. Cependant, il a été rapidement établi que CGRP avait une activité dominante sur le système cardiovasculaire notamment en agissant comme vasodilatateur et cardio-protecteur¹⁶⁷. Cependant, les fibres sensorielles dans lesquelles on retrouve CGRP sont également associées aux processus de la douleur¹⁶⁸. Ce qui a conduit à différentes études avec la CAP qui active les récepteurs TRPV1, retrouvés sur les fibres sensorielles C et A δ . La CAP est connue pour provoquer des douleurs et des rougeurs lors d'une application aiguë, ainsi sa capacité à libérer le CGRP et la SP co-localisés dans la ME¹⁶⁹. Le CGRP s'est avéré être libéré et actif au niveau cérébral. De plus, le CGRP n'est pas seulement un puissant vasodilatateur, il a également une interaction réciproque étroite avec le système nerveux sympathique à la périphérie. D'autres études démontrent que CGRP jouerait un rôle dans l'inflammation, avec une action à la fois pro- et anti-inflammatoire, selon la situation¹⁷⁰.

5.3.3.3. *Processus protéolytique*

Les neuropeptides sont dérivés de précurseurs protéiques appelés proneuropeptides. Les proneuropeptides sont définis comme étant des précurseurs protéiques de neurotransmetteur de nature peptidique. Le précurseur protéique doit subir un traitement spécifique pour générer des neuropeptides actifs. Ce traitement implique un processus protéolytique qui est nécessaire afin

de produire les neuropeptides biologiquement actifs ceci a lieu durant le transport axonal (Figure 20)¹⁷¹.

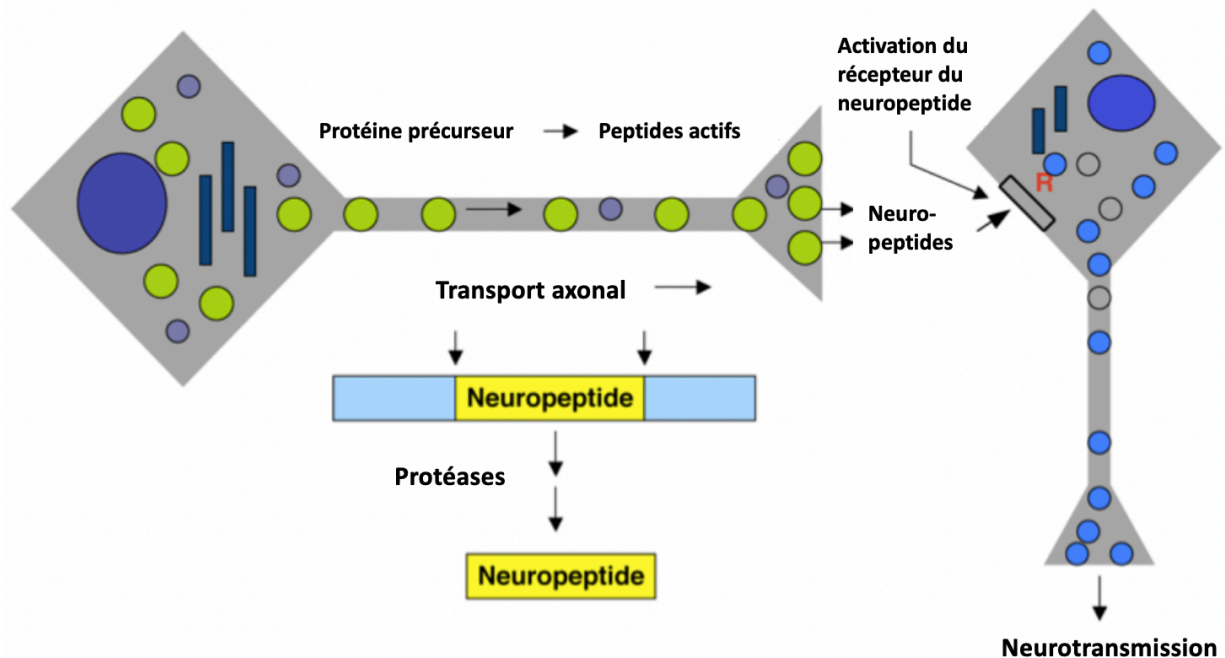


Figure 20 : Schéma général de la neurotransmission médiée par des neurotransmetteurs peptidiques : les neuropeptides. Les neuropeptides sont des médiateurs chimiques importants dans la communication synaptique entre neurone. Les neuropeptides sont synthétisés dans des vésicules de sécrétion qui sont transportées du corps cellulaire vers la terminaison axonale. Le proneuropeptide est stocké dans des vésicules nouvellement formées dans le corps cellulaire et le clivage protéolytique de la protéine précurseur se produit durant le transport axonal et la maturation des vésicules. Les neuropeptides actifs sont alors contenus dans des vésicules qui les sécrètent par exocytose dans l'espace intersynaptique. Les neuropeptides actifs libérés peuvent à leur interagir avec leur récepteur post synaptique afin d'activer les voies de neurotransmission ascendante. Figure adaptée de la publication (Hook V. et al. 2008).

Chaque proneuropeptide inactif possède une séquence distincte, et le clivage protéolytique se produit au niveau des sites de résidus dibasiques de la séquence de la protéine. Les résidus dibasiques sont composés de lysine (K) et d'arginine (R). La biosynthèse des neuropeptides commence au niveau de l'axone où les proneuropeptides sont stockés dans des vésicules. Durant le transport axonal les vésicules migrent tout en réalisant la maturation protéolytique des neuropeptides. Il y a lieu le clivage qui est effectué par les protéines convertases (PC1 et PC2) au niveau du côté C-terminal des sites dibasiques ce qui génère des intermédiaires peptidiques avec une extension de résidus au niveau du coté C-terminal qui sont ensuite éliminés par une carboxypeptidase pour donner le neuropeptide mature (Figure 21)¹⁷¹. Les clivages peuvent aussi se réaliser du côté N-terminal des résidus dibasiques ce qui fait intervenir la

cathépsine L puis une aminopeptidase pour enlever l'extension KR du côté N-terminal afin d'obtenir le neuropeptide biologiquement actif (Figure 21)¹⁷¹.

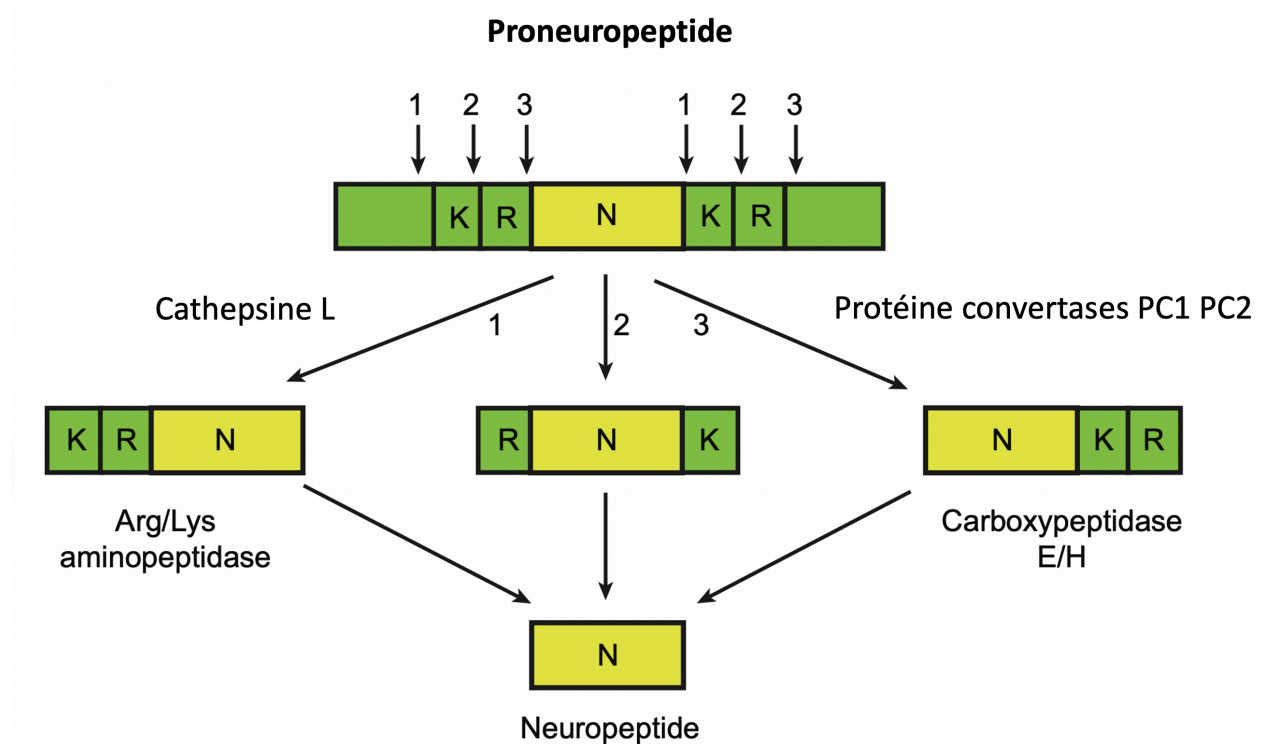


Figure 21 : Représentation schématique du processus protéolytique mis en place pour obtenir un neuropeptide actif à partir d'un proneuropeptide précurseur. Il existe plusieurs voies afin d'obtenir un neuropeptide biologiquement actif. Les clivages protéolytiques sont tous réalisés au niveau de résidus basiques soit dibasiques ou monobasiques pour les deux voies ce qui correspond au numéro 1, 2 et 3. La première voie met en évidence l'action de la cathépsine L qui a une préférence pour cliver du côté N-terminal des sites dibasiques (numéro 1) qui donne des intermédiaires peptidiques avec résidus au niveau de la terminaison NH₂, qui sont ensuite éliminés par une Arg/Lys aminopeptidase. Alors que la seconde voie implique les protéines convertases (PC1 et PC2) qui clivent préférentiellement du côté C-terminal des sites dibasiques donnant des intermédiaires peptidiques avec des extensions de résidus basiques à leur extrémité COOH qui sont ensuite éliminés par une carboxypeptidase E/H. Figure adaptée de la publication (Hook V. et al. 2008).

5.3.4. Ligands au TRPV1

La structure de TRPV1 présente de nombreux sites de fixation à différentes molécules pharmacologiques. La découverte de ces sites peut être de nouveaux enjeux pour la recherche de traitements de certaines pathologies impliquant le TRPV1 comme potentielle cible.

De nombreuses études ont été réalisées afin de caractériser certaines molécules pouvant avoir une action de ligand sur le récepteur TRPV1. On les classifie en deux catégories agoniste et antagoniste de TRPV1. Les agonistes sont des molécules permettant une activation du canal donc favorisant son ouverture. Cependant, une exposition prolongée de TRPV1 aux agonistes en présence de calcium engendre une désensibilisation du canal, entraînant sa fermeture¹⁷². Cette désensibilisation est induite par une phosphorylation d'un résidu au niveau C-terminal de

TRPV1. Son activation du canal peut être réalisée de façon directe ou indirecte. TRPV1 peut être activé par des agonistes endogènes ou exogènes. Contrairement aux agonistes, les antagonistes du TRPV1 sont principalement des composés de synthèse chimique. Dans cette catégorie de molécules, une distinction doit être faite entre les antagonistes compétitifs et les non-compétitifs. Les premiers se lient sur le même site de TRPV1 que leur agoniste correspondant, bloquant ainsi le canal en configuration fermée, et donc dans un état non conducteur. Les seconds interagissent avec des sites de liaison allostériques sur la structure de TRPV1, empêchant ainsi son ouverture par un agoniste¹⁷³.

Tableau 3 : Les différents et principaux ligands de TRPV1 connus soit agoniste ou antagoniste¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

Agonistes		Antagonistes
Endogènes	Exogènes	
Lipides :	Chaleur	Capsazépine
- Dérivés de l'acide oléique	Vanilloïdes :	Analogue de l'urée : BCTC
- Prostaglandines	- Capsaïcine	Analogue de l'cinnamide
Endocannabinoïdes	- Olvanil	5-iodo résinifératoxine
Anandamide	- Curcumin	
ATP	- Eugénol	
Protons	- Gingérol	
Bradykine	- Résinifératoxine	
Cytokines		

La capsaïcine (CAP), est probablement l'agoniste le plus connu de TRPV1. Également connue sous le nom de N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-8-methylnon-6-encamide, la CAP est une molécule faisant partie de la famille des vanilloïdes, retrouvée dans le piment et responsable de l'effet brûlant et irritant du piment. Tous les vanilloïdes ont une structure comprenant un pharmacophore identique qui comprend le noyau vanillyl. La CAP est composée d'un noyau aromatique vanillé hydrogéné couplé à une liaison amide ou ester lié à un groupe lipophile (Figure 22)¹⁷⁷. Cette partie lipophile se lie dans la partie intracellulaire des domaines S2 et S3 de TRPV1, expliquant ainsi la lente cinétique d'activation de la CAP, alors que la partie vanilloïde interagit avec plusieurs résidus (dont le Y511) afin d'activer TRPV1¹⁴⁷. La CAP reste un composé important avec des propriétés thérapeutiques pour traiter la douleur mais aussi pour soigner certaines maladies cardiovasculaires, respiratoires ou encore le diabète. Des études se sont intéressées à comprendre le rôle de la CAP dans la physiopathologie de la douleur et de différentes maladies¹⁷⁸. La CAP stimule sélectivement les neurones nociceptifs par le biais de

nocicepteur tel que le TRPV1. La stimulation des nocicepteurs par la CAP entraîne une augmentation de l'afflux d'ions tel que le Ca^{2+} dans les neurone des DRG^{179,180}, on parle d'un effet « piquant ». La découverte du récepteur TRPV1 a permis de comprendre le mécanisme par lequel la CAP induit la douleur démontrant que la CAP provoque un comportement pseudo douloureux par l'activation des TRPV1 exprimés au niveau des fibres afférentes primaires¹²². Si on s'intéresse aux effets de la CAP sur les maladies cardiovasculaires, des études ont démontré des effets bénéfiques de cette dernière sur le système cardiovasculaire notamment en permettant la libération de neurotransmetteur comme le CGRP et la SP¹⁸¹⁻¹⁸⁴. La CAP stimule la libération de CGRP par l'activation de TRPV1 et diminue donc la pression artérielle¹⁸⁵. De plus des études réalisées sur l'activation à long terme de TRPV1 par la CAP ont montré que cela entraînait une diminution du stockage des lipides et des lésion athéroscléreuses dans le sinus aortique chez la souris¹⁸⁶. Cependant la CAP reste une molécule qui induit beaucoup d'effets secondaires désagréables comme de l'irritation et des brûlures importantes.

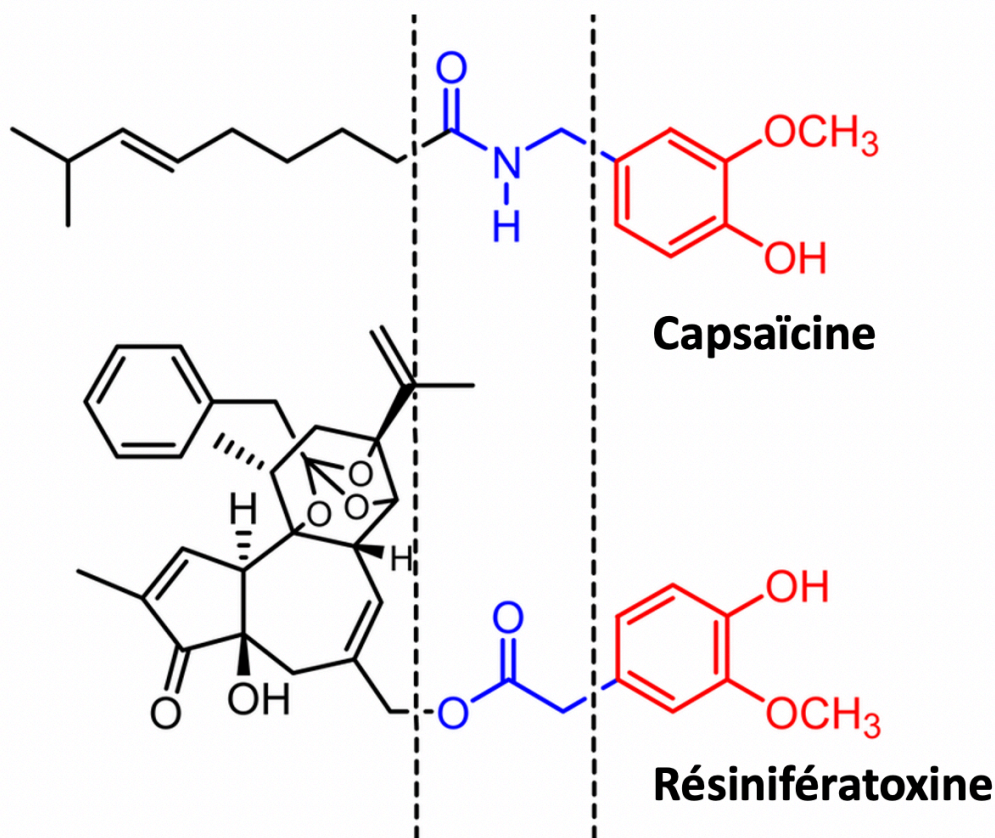


Figure 22 : Structures des agonistes vanilloïdes de TRPV1, la Capsaïcine (CAP) molécule responsable du piquant dans le piment fort et la résinifératoxine (RTX) molécule irritante extraite de Euphorbia. La partie rouge des molécules représente le pharmacophore le noyau vanillyl. La partie bleue permet de faire la liaison avec la partie hydrophobe (noire) pour la capsaïcine c'est une fonction ester et pour RTX c'est une fonction amide. Figure adaptée de la publication (Lee J.H. et al. 2011).

La résinifératoxine (RTX) est également un composé vanilloïde extrait de la plante *Euphorbia resinifera* (Figure 22)¹⁷⁷. Elle a été isolée pour la première fois en 1975 par Hecker. Bien qu'étant analogue à la CAP, RTX s'est avéré être significativement plus puissante que la CAP¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. La RTX se trouve être le plus puissant des agonistes connus pour TRPV1. Une exposition prolongée de RTX provoque une ouverture des canaux TRPV1 suivi d'un afflux de Ca^{2+} entraînant une cytotoxicité pour les fibres exprimant le TRPV1¹⁹⁰. Pour le côté clinique, RTX est pourtant peu utilisée de par sa rareté dans les ressources naturelles et sa complexité de synthèse mais reste un composé très intéressant en pharmacologie et dotant plus dans le développement de traitement de l'insuffisance cardiaque¹⁹¹⁻¹⁹³. Elle a notamment été utilisée pour traiter différentes formes de douleur comme le soulagement de la douleur neuropathique par exemple mais aussi le traitement de douleur liée au cancer et à l'arthrose de genou¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Dans de nombreuses études, la RTX a été administrée afin de visualiser son effet dans hyperalgésie thermique et sa réponse à la douleur dans un modèle de douleur bien défini^{197,198}. Dans ces études, la RTX a empêché le développement d'hyperalgésie thermique et améliore la réponse à la douleur réduisant le besoin d'analgésiques. L'administration intrathécale et intraganglionnaire de RTX conduit à un ciblage sélectif et à une suppression des corps cellulaires neuronaux des fibres A δ et C exprimant TRPV1 dans les DRG^{199,200}. La perte de ces neurones sensoriels interrompt la transmission des informations sur la douleur au niveau du neurone secondaire dans la ME qui normalement transmet les informations au cerveau. Alors que la mécano-sensation nocives et non nocives, la proprioception et la capacité locomotrice sont conservés¹⁹⁹. Cette chimio-ablation sélective de neurone spécifiques est une nouvelle approche pour contrôler les mécanisme de douleur chronique²⁰¹. Il a été démontré comme étant le vanilloïde ultra puissant car RTX se lie avec une affinité de l'ordre du nanomolaire avec les cellules exprimant TRPV1¹⁹⁰. Cependant il a été montré que l'expression de TRPV1 est essentielle pour induire la dénervation par exposition à RTX, aucun effet n'a été remarqué dans les cellules n'exprimant pas TRPV1 et les neurones qui ne l'expriment pas semblent rester intact. Même si ces neurones sont adjacents à des neurones exprimant TRPV1 qui eux subissent les dommages dus à l'activation de TRPV1 par RTX. Cette études a permis de conclure ces faits grâce à l'utilisation de l'imagerie sur des cellules vivantes de neurones DRG et de cellules transfectées de manière transitoire et stable avec TRPV1²⁰². De plus RTX reste une approche de traitement très efficace pour obtenir une analgésie de longue durée dans toutes les études animales déjà réalisées. La RTX serait donc une alternative intéressante à la CAP dans de nombreux traitements dû à son efficacité plus importante.

5.3.5. Fonctions de TRPV1

5.3.5.1. Rôle dans la nociception

In vitro, TRPV1 présente un seuil d'activation maximale lorsque la température ambiante dépasse 43°C. D'ailleurs, ce seuil correspond à la gamme de températures connue pour susciter la douleur chez l'humain, mais aussi à des comportements animaux associés à la douleur¹²². *In vivo*, TRPV1 serait donc lié à la régulation de la température corporelle et à la perception de sensations telles que la chaleur nocive, la notion de piquant et la nociception via plusieurs de ces agonistes et antagonistes, à la fois en conditions saine et pathologique^{123,200,203}. Les antagonistes de TRPV1 comme la capsazépine n'entraîne pas d'entrée massive de calcium dans le neurone (effet « piquant ») et ne semble pas être impliquée dans le déclenchement d'hyperthermie lors d'études de thermorégulation réalisées chez le rat et la souris^{204,205}. Au contraire, l'efficacité analgésique de la capsazépine fut prouvée dans des modèles murins présentant une hyperalgie induite chimiquement, des douleurs inflammatoires ou encore une inflammation neurogénique²⁰⁶⁻²⁰⁸. D'autre part, sur animal entier, un prétraitement à la CAP semble réduire la réactivité à un stimuli thermique nocif dans divers troubles douloureux, allant des neuropathies virales et diabétiques à l'arthrite rhumatoïde^{203,209}. De plus, chez les mammifères, une exposition des nocicepteurs terminaux à la CAP induit une excitation neuronale, conduisant à la perception de la douleur et à la libération locale de divers médiateurs inflammatoires²⁰⁹. D'autre part, un rôle de TRPV1 fut démontré lors du développement pathologique de l'hyperalgésie mécanique et thermique²¹⁰⁻²¹². Via la voie cAMP/PKA, des doses aiguës de morphine inhibent l'activité de TRPV1, initialement induite par la CAP, et par conséquent l'hyperalgésie thermique²¹³. A l'inverse, par la voie des MAPK, des doses chroniques de morphine induisant TRPV1 contribuent à la tolérance morphinique associée à l'hyperalgésie thermique¹⁷². Ces doses de morphine suggèrent que l'activité de TRPV1, modulée par différentes doses de morphine, joue un rôle différent dans le cadre de l'hyperalgésie thermique.

5.3.5.2. Rôle dans l'infarctus du myocarde

Comme déjà mentionné, au niveau du système cardiovasculaire, TRPV1 est exprimé dans le muscle lisse vasculaire, les cellules endothéliales, les cellules épocardiques (Figure 23)²¹⁴ et dans les fibres sensorielles qui innervent le cœur¹⁵⁶. L'expression de TRPV1 dans le cardiomyocyte a été longtemps controversée, mais une étude récente de Hong et al. a identifié l'expression, à l'aide d'un modèle transgénique de souris rapporteur tdTomato-GFP, pour le récepteur TRPV1. Cependant, les auteurs de cette étude n'ont pas visualisé de fluorescence dans les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires (Figure 25)²¹⁵. Cette étude affirme que l'expression de TRPV1 est essentiellement retrouvée au niveau des vaisseaux cardiaques et des terminaisons nerveuses cardiaque notamment au niveau l'épicaarde (Figure 24). Cependant, les études de Gao et al. ont détecté l'expression de la protéine TRPV1 dans des cellules ventriculaires gauches isolées de souris et des cellules H9c2²¹⁶. Alors que la fonction de TRPV1 au sein du myocarde n'a pas encore été clairement définie, de nombreuses études ont étudié l'expression de TRPV1 dans les fibres sensorielles et son association avec le développement de l'IC.

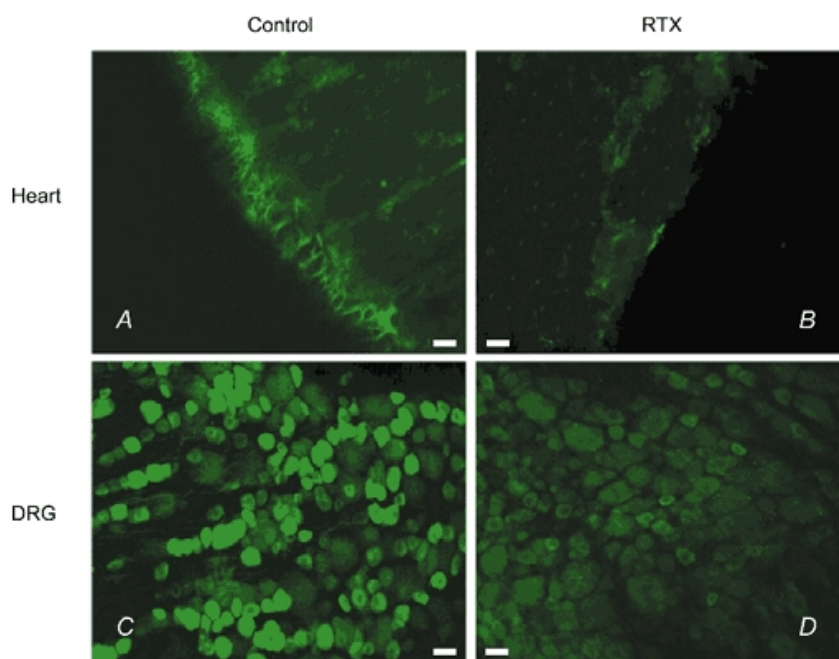


Figure 23 : Images confocales montrant le marquage par immunofluorescence des récepteurs TRPV1 dans le ventricule gauche du cœur (barres d'échelle : 15 µm en A et B) et les ganglions de la racine dorsale thoracique (DRG, barres d'échelle : 30 µm en C et D) chez des rats traités soit par véhicule (contrôle) ou soit des rats traités par RTX. L'immunofluorescence au TRPV1 est dotant plus intense au niveau de la surface épicaarde du cœur chez le rat contrôle.

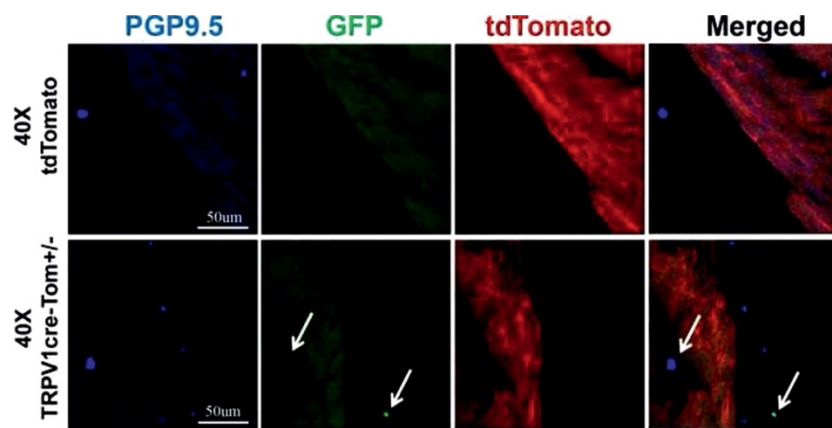


Figure 24 : Images de microscopie confocale montrant l'expression de TRPV1 au niveau des terminaisons nerveuses sensorielles à la surface épicaudique ventriculaire sous un objectif 40x chez des souris TRPV1cre-tdTomato+/- (TRPV1cre-Tom+/-). Les flèches blanches pointent les terminaisons nerveuses sensorielles TRPV1 GFP-positives. PGP9.5 : marqueur spécifique des neurones et des terminaisons nerveuses. n = 5/groupe témoin tdTomato, n = 7/TRPV1cre-tdTomato+/- groupe.

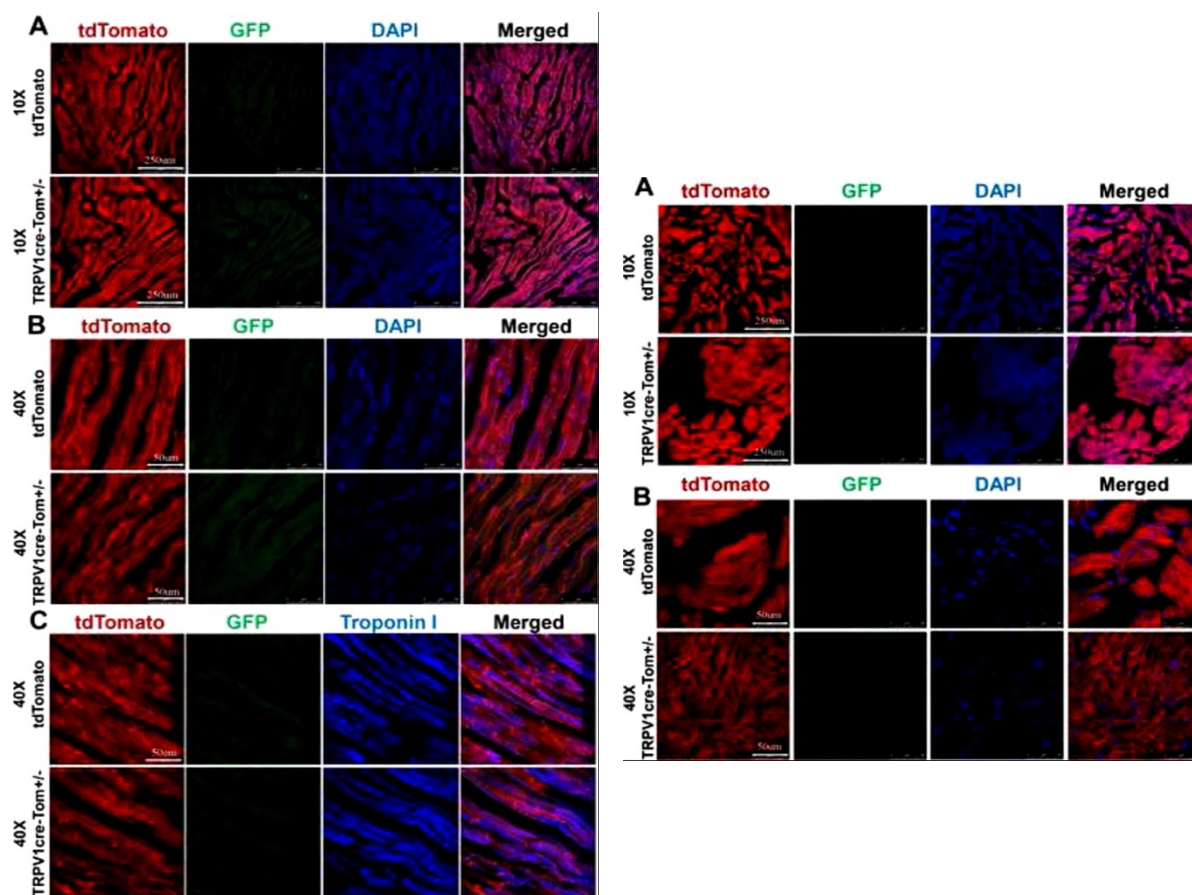


Figure 25 : Images de microscopie confocale montrant une absence de fluorescence positive GFP dans les cardiomyocytes. Pour le pannel d'images de droite ce sont des cardiomyocytes ventriculaires observés sous l'objectif 10x (A) et l'objectif 40x (B) chez les souris TRPV1cre-tdTomato+/- (TRPV1cre-Tom+/-) et tdTomato. Pour le pannel de gauche ce sont des cardiomyocytes auriculaires observés aussi à l'objectif 10x (A) et 40x (B) dans les deux modèles de souris. DAPI : 4,6-diamidino-2-phénylindole, un marqueur du noyau cellulaire. Troponin I : marqueur des cardiomyocytes. n = 5/groupe tdTomato, n = 7/TRPV1cre-tdTomato+/- groupe.

Tout d'abord de nombreuses études ont recensé un rôle de TRPV1 au sein de pathologies cardiaques tel que l'IM. Lors d'une ischémie myocardique, des protons et de la bradykinine sont libérés, et peuvent activer ou sensibiliser le TRPV1 exprimé dans les terminaisons des fibres sensorielles cardiaques, les fibres C et les fibres A δ , pour provoquer une angine de poitrine^{214,217}. En effet, il a été démontré que la stimulation ischémique des fibres afférentes cardiaques est médiée par l'activation de TRPV1¹¹⁶. Il a été aussi démontré par une étude sur des cellules cardiaques isolées et perfusée, que le TRPV1 protège le cœur des lésions de reperfusion post ischémique en augmentant la libération de SP au niveau des terminaisons nerveuses²¹⁸. L'IM s'accompagne d'un processus inflammatoire²¹⁹ et des études ont montré que la délétion des gènes codant pour TRPV1 chez des animaux est associée à une production accrue de cytokines pro-inflammatoires tel que le TNF- α et l'interleukine-6 et à un remodelage cardiaque pathologique post infarctus²²⁰. En utilisant des souris knock-out du gène TRPV1 et de type sauvage (WT), il a été démontré que l'activation des récepteurs TRPV1 protège les cœurs de l'inflammation et de l'apoptose chez les souris soumises à une lésion ischémie/reperfusion en libérant du CGRP au niveau des terminaisons nerveuses afférentes²²¹. De plus, TRPV1 contribue aux effets bénéfiques du préconditionnement du cœur contre les lésions d'ischémie-reperfusion en déclenchant la libération de SP et/ou CGRP^{222,223}. En 2016, il a été démontré que la CAP (0,1, 0,3, 1,0 mg/kg) réduit la taille de l'infarctus lorsqu'elle est administrée avant ou après l'ischémie. La CAP a montré un effet maximal de réduction de l'infarctus à une dose de 0,3 mg/kg par voie intraveineuse^{224,225}. Dans une étude avec un cœur isolé de cobaye perfusé, il a été montré que la CAP (1 μ M) induit une libération de CGRP dans l'effluent coronaire²²⁶. La libération de CGRP induite par la CAP était dépendante du Ca²⁺. La CAP induit une augmentation de la fréquence cardiaque et une diminution de la force de contraction²²⁶. Plusieurs études ont mis en évidence que le récepteur TRPV1 est impliqué dans la formation de l'hypertrophie cardiaque. Une étude sur les cardiomyocytes en culture a également rapporté que l'activation de TRPV1 augmentait la taille des cellules et les effets sur le niveau de calcium intracellulaire via les kinases de la protéine activée par le mitogène p38 (MAP)²²⁷. Il semblerait que TRPV1 jouerait aussi un rôle dans le remodelage cardiaque en ayant une action sur la fibrose. En effet, des études inhibant le TRPV1 ont révélé un effet sur la fibrose avec une taille d'infarctus augmentée soit en inactivant génétiquement le TRPV1 Zhong²²² soit en utilisant un antagoniste puissant de TRPV1 BCTC²²⁸. En s'appuyant sur le rôle bénéfique de TRPV1 démontré par toutes les études antérieures, les travaux de Gao et al. ont étudié les effets de la CAP alimentaire chez des souris WT et TRPV1 $-/-$. Il a été observé que la CAP améliorait la fonction cardiaque, réduisait le développement de l'hypertrophie et de

la fibrose cardiaque, régulait positivement les récepteurs activés par la prolifération des peroxyosomes δ (PPAR- δ) et UCP2, et diminuait l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) chez les souris WT²¹⁶. Mais il a été également démontré une forte implication de le TRPV1 dans le réflexe afférent sympathique cardiaque, qui aide à réguler le tonus sympathique du myocarde. L'administration de certains agonistes de TRPV1 tels que la CAP ou RTX peut émousser les fibres sensibles à la CAP et diminuer ce réflexe afférent sympathique^{215,229}. Des études ont montré que la désensibilisation de ces fibres sensorielles via la capsaïcine peut diminuer la relaxation du cœur et même exagérer le dysfonctionnement cardiaque après induction de l'IC avec le traitement à la doxorubicine un médicament considéré cardiotoxique¹⁵⁶. Contrastant ces résultats, des études plus récentes de Wang et al. ont montré des effets protecteurs par ablation des canaux TRPV1 au niveau des fibres sensorielles. Les modèles de rats utilisés dans cette étude ont été soumis à une constriction de l'aorte ascendante, avec RTX administré localement aux niveaux spinaux T1 et T4 pour enlever les nerfs sensoriels cardiaques 5 jours avant la chirurgie. RTX est un puissant agoniste de TRPV1 qui peut également atténuer les afférences sensorielles à des concentrations élevées. Les résultats de cette étude ont montré que l'administration de RTX était associée à de meilleures mesures de l'insuffisance cardiaque. Le traitement RTX a diminué la pression télédiastolique ventriculaire gauche et a aidé à prévenir l'hypertrophie cardiaque, la fibrose et l'apoptose. La fraction d'éjection a été préservée chez ces rats expérimentaux¹⁹³. De plus de nombreuses études ont démontré un intérêt à l'utilisation de la désensibilisation des neurones nociceptifs aux agonistes de TRPV1 comme approche pharmacologique alternative pour bloquer la douleur à la périphérie où elle est produite. L'activation de TRPV1 par l'application épicaudique de l'agoniste RTX chez des rats a entraîné une désensibilisation du récepteur localement au niveau de l'épicarde suivie d'une destruction progressive des fibres sensorielles exprimant le TRPV1 au niveau épicaudique et montré une inhibition de l'hyperactivité sympathique tout en améliorant les fonctions cardiaques^{230,231}. Ceci prouverait que l'hyperactivation du SNA induite lors d'IC est médiée par les fibres sensorielles exprimant TRPV1 au niveau cardiaque. Le TRPV1 exerce des effets cardioprotecteur associés à son activation, et est un élément clé dans notre projet afin de comprendre comment est transmise l'information au cerveau lors d'un d'IM et/ou dans le développement de l'IC.

6. Introduction sur *Caenorhabditis elegans*

De nos jours *Caenorhabditis Elegans* (*C. elegans*) est un excellent organisme modèle pour comprendre les circuits et les comportements neuronaux. Avec les nouvelles avancées technologiques nous pouvons contrôler et avoir de meilleures précisions sur le fonctionnement des circuits neuronaux interconnecté entre eux au niveau moléculaires et cellulaires allant jusqu'au comportement physiologique de l'animal. *C. elegans* est un nématode qui fut longtemps étudié dans les neurosciences vues que son génome est entièrement séquencé depuis 1998 donc nous pouvons explorer génétiquement des modifications et affectations du comportement.

6.1. Neuroanatomie et neurophysiologie de *C. elegans*

C. elegans est un nématode de petite taille environ 1mm de long à l'âge adulte qui est transparent et qui a un cycle de vie très rapide, vivant dans la terre à l'état naturel^{232,233}. Il est non parasitaire et sa culture reste assez facile à pratiquer en laboratoire, il se nourrit essentiellement de bactérie *E. coli*. Toutes ces caractéristiques physiologiques font en sorte qu'il soit un organisme particulièrement adapté pour les études de neurobiologie. *C. elegans* a une anatomie simple avec un petit nombre de tissus et d'organes internes. La tête contient l'anneau nerveux et le pharynx. Le corps est essentiellement composé de son intestin. Il se présente sous deux formes de sexe hermaphrodites ou mâles. Concernant son système nerveux qui est simple, petit et bien défini permet de faire de *C. elegans* un modèle important pour les études de questions neurobiologiques. De nombreuses études ont pu mettre en évidence les gènes et les mécanismes nécessaires à la communication neuronale, à la formation des synapses mais aussi à différents comportements comme la chimiotaxie, thermotaxie etc. Le système nerveux adulte compte 302 neurones, la répartition des corps cellulaires montre que la majorité des corps cellulaires neuronaux sont localisé dans les ganglions de la tête du cordon ventral et de la queue²³⁴(Figure 26). La structure des neurones est assez simple avec un ou deux neurites et peu de neurones peuvent présenter des ramifications. Des études de microscopies électroniques menées par J. White ont permis de comprendre la connectivité du réseau neuronal chez *C. elegans*²³⁴. Ce réseau est assez conservé entre les individus. Son système nerveux contient environ 7000 synapses chimiques avec 2000 jonctions neuromusculaires et 600 jonctions de communications. Un des avantages de *C. elegans* c'est que chaque neurone peut

être identifié en microscopie optique vu que l'animal est transparent. De plus, ce qui est très intéressant chez *C. elegans* c'est qu'il y a un fort degré de conservation de gènes impliqués dans le système nerveux assez similaires avec ceux des vertébrés²³⁵. Au niveau de la tête (Figure 26), on retrouve principalement des neurones sensoriels et des interneurons qui peuvent être impliqués dans des mécanismes de nociception ou de thermosensation notamment avec les neurones ASH, AFD et AWC²³⁶. De nombreux autres mécanismes sont similaires comme le fait que la communication synaptique soit réalisée par les canaux ioniques et des récepteurs qui sont retrouvés dans le génome de *C. elegans*. La neurotransmission GABA est elle-même présente chez *C. elegans* avec *unc-25* qui code pour la glutamate acide décarboxylase²³⁷, et il a été également mis en évidence que la présence de récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine²³⁸ qui sont très important dans la neuro-communication chez les mammifères.

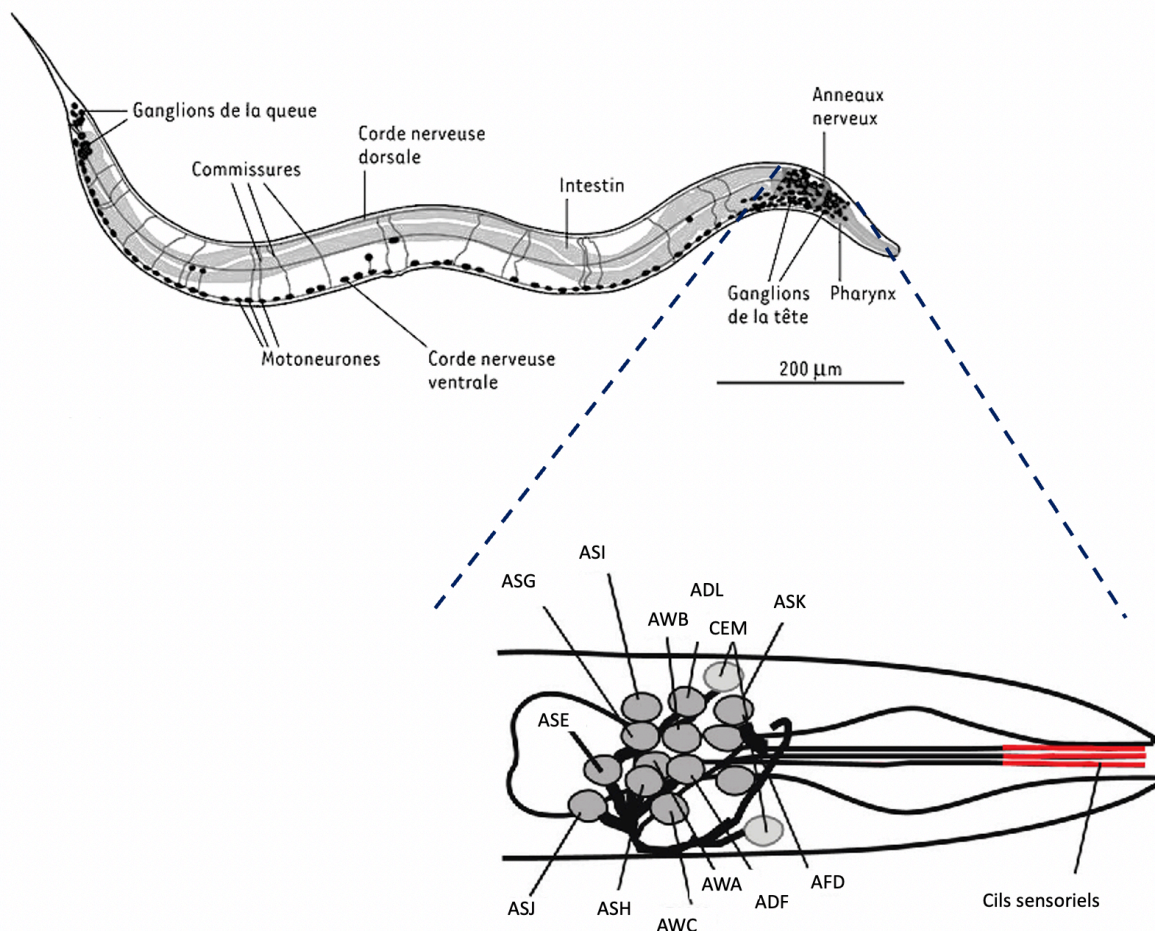


Figure 26 : Schéma explicatif du système nerveux de *C. elegans*. Le système nerveux de *C. elegans* est défini comme simple et constitue généralement par un anneau nerveux et des ganglions au niveau de la tête, le long du corps une corde nerveuse ventrale et dorsale et au niveau de la queue des ganglions. La majorité des neurones sensoriels sont localisés au niveau de la tête notamment ceux impliqués dans les mécanismes de nociception et de thermosensation nocive : ASH, AFD et AWC.

6.2. Nocicepteurs chez *C. elegans*

La conservation de gènes impliqués dans le système nerveux chez *C. elegans* est assez importante ce qui démontre qu'il doit y avoir une homologie dans les mécanismes d'action de certains nocicepteurs. Si on s'intéresse à l'homologie des gènes humains et de *C. elegans* soient 40% des gènes sont homologues dans le génome de *C. elegans*. Il se trouve que *C. elegans* présente de nombreux nocicepteurs homologues à ceux retrouvés chez les mammifères. Comme cité plus haut dans la section des TRP au niveau de l'arbre phylogénétique on retrouve *C. elegans* qui a des récepteurs avec des liens de parenté avec ceux de la classe des TRP en général^{125,239}. De plus il a été démontré que de nombreux nocicepteurs de *C. elegans* possèdent des mécanismes d'activation et de régulation identique à ceux observés chez les mammifères. Si nous nous focalisons sur la famille des récepteurs TRP comme nocicepteurs chez *C. elegans* environ 17 membres des nocicepteurs sont identifiés comme homologues aux TRP des mammifères. Ils recouvrent toutes les sous familles de TRP retrouvés chez les mammifères. On peut donc dire que *C. elegans* présente des récepteurs apparentés au sous-groupe des TRPV1 des mammifères. Si on prend en compte les études phylogénétiques les membres les plus similaires génétiquement au récepteurs TRPV1 sont les récepteurs OSM-9 et OCR-2²³⁹.

6.2.1. OSM-9 et OCR-2

C. elegans est doté de mécanismes impliqués dans la nociception. Les nématodes sont capables de reconnaître des substances toxiques et nocives dans l'environnement par un comportement d'évitement ou de survie. Les stimuli peuvent être de différente nature, mécanique, olfactif, osmotique, chimique ou encore thermique²⁴⁰. Comme chez les mammifères, les canaux TRP chez *C. elegans* fonctionnent comme détecteurs sensoriels polymodaux aux différents types de stimuli. Les canaux TRP sont largement impliqués dans la mécano- et osmo-sensation chez *C. elegans*. Le canal OSM-9 est le premier canal TRP caractérisé chez *C. elegans*. Il a été cloné à partir de souches mutantes ayant des phénotypes comportementaux en mécano-sensation (réponse au toucher au niveau de la tête), osmo-sensation et chimio-sensation^{241,242}. OSM-9 est principalement exprimé dans les neurones sensoriels tels que AWA, ASH, ADL, AFD, AWC, OLQ, PHA, PHB, qui sont soit localisés au niveau de la tête ou de la queue²⁴¹. Une analyse d'homologie a identifié quatre autres gènes liés au récepteur OSM-9, OCR-1 à 4²⁴³. Les canaux OCR sont généralement co-exprimés avec OSM-9, mais pas l'inverse^{243,244}. Ces récepteurs au

niveaux structurale présente une similarité avec une structure avec 6 segments transmembranaires et peuvent s'associer pour former des canaux hétéromériques²³⁹.

6.2.2. Fonction de OSM-9 et OCR-2 chez *C. elegans*

Chez les nématodes de type sauvage, les neurones chimiosensoriels AWA et AWC assurent la chimiotaxie attractive, tandis que le neurone polymodal ASH est important dans la réponse d'évitement répulsif, au stress osmotique élevé et au toucher²⁴⁵. Les comportements sensoriels médiés par AWA et ASH sont gravement altérés chez les nématodes mutants *osm-9* et *ocr-2*, révélant un rôle essentiel pour ces deux canaux TRPV dans la chimio-sensation, l'osmo-sensation et la mécano-sensation^{241,243}. En ce qui est connu de leur fonction pour ces deux canaux OSM-9 et OCR-2, ils sont impliqués dans la thermo-sensation, la chimio-sensation et la nociception (comportement d'évitement) dans les neurones AWC et ASH. Dans les neurones ASH et ADL, OSM-9 et OCR-2 sont nécessaires pour détecter un manque alimentaire et l'augmentation de la densité de population²⁴⁶. Dans les environnements difficiles, OSM-9 et OCR-2 sont censés détecter directement ou indirectement les produits chimiques nocifs dans les neurones ASH et ADL où ils régulent le comportement alimentaire social²⁴⁶. Dans les neurones sérotoninergiques ADF, OSM-9 et OCR-2 sont impliqués dans la régulation de la biosynthèse de la sérotonine, chez des mutants *osm-9* ou *ocr-2* une baisse de l'expression du gène codant pour l'enzyme de synthèse 5HT tryptophane hydroxylase (*tph-1*)²⁴⁷ est observée. Nous savons que la sérotonine est une molécule de signalisation importante pour moduler les réponses comportementales, et cette étude a démontré l'importance des canaux OSM-9 et OCR-2 dans la voie de synthèse de la sérotonine essentielle que l'on retrouve également chez les mammifères. Les canaux OCR peuvent également fonctionner indépendamment d'OSM-9. Ce qui a été montré dans des cellules endocrines uv1 associées à l'utérus, que seul les canaux OCR-1, -2 et -4 favorisent la libération de tyramine et d'autres neurotransmetteurs afin de réprimer la ponte prématurée²⁴⁴. Dans les neurones sensoriels ADL, OCR-2 régule la libération de certains neuropeptides²⁴⁸. De plus, *C. elegans* peut tolérer des changements de température limitée (~12-27°C) n'affectant peu son cycle de vie, cependant il peut détecter avec précision les variations de température dans cet intervalle de température qui induisent un effet sur son comportement²⁴⁹. Mais il a été démontré comme pour les TRPV de mammifères qu'ils pouvaient être sensibles aux températures environnementales et internes allant de ~ 15 ° C à > 40 ° C. Ces canaux sont appelés thermo-TRP^{144,239} c'est le cas pour OSM-9 et OCR-2. C'est

sur les neurones sensoriels thermiques comme AFD, AWC et ASI que ces canaux sont exprimés²⁵⁰⁻²⁵³. *C. elegans* est capable de réagir à des températures extrêmes qualifiées de nocives. Des études ont montré qu'une exposition prolongée à 30°C entraînait une réponse au choc thermique par le fait que les nématodes arrêtaient de pondre²⁵⁴, mais cet effet est réversible si on ramène les individus à des températures plus basses, les vers reprennent la ponte²⁵⁵. Sur le plan comportemental, lorsqu'ils rencontrent une source de chaleur nocive, ils réagissent par un retrait caractérisé comme comportement d'évitement thermique²⁵⁶. Cette réponse thermique nociceptive est modulée par le glutamate, neurotransmission dépendante de EAT-4/GLUT²⁵⁷ et par les neuropeptides codés par le gène *flp-1*^{258,259}.

6.2.3. Régulation des canaux TRP chez *C. elegans*

Les canaux TRP sont conservés entre *C. elegans* et les mammifères, beaucoup d'entre eux partagent des mécanismes de régulation similaires. De plus, des cribles génétiques ont identifié de nouveaux régulateurs pour les canaux TRP de *C. elegans*. Des homologues de ces régulateurs peuvent potentiellement réguler les canaux TRP des mammifères. Chez les mammifères comme nous l'avons vu dans une section précédente sur TRPV1, ces canaux peuvent être activés par différents agonistes notamment la CAP. Cependant, la plupart des agonistes n'ont pas été testés sur les canaux TRPV de *C. elegans*. Un mécanisme de régulation des canaux TRPV chez le nématode est l'hétéromérisation des canaux. Des études génétiques et biologiques cellulaires montrent que des canaux TRPV distincts de *C. elegans* peuvent former des canaux hétéromères dans différents types de cellules. Par exemple, dans les neurones AWA et ASH, OSM-9 et OCR-2 sont co-localisés et dépendent l'un de l'autre pour leur localisation ciliaire²⁴³. Sur le plan fonctionnel, OSM-9 et OCR-2 sont tous deux nécessaires pour la chimiosensation, la mécanosensation et l'osmosensation dans ces neurones²⁴³. Comme de nombreuses cellules co-expriment plusieurs canaux TRPV, l'activité de ces canaux TRPV peut être régulée par la formation d'hétéromères distincts. Ce type de régulation a également été démontré pour de nombreux canaux TRP de mammifères et de drosophile²⁶⁰⁻²⁶². Un résidu acide conservé (Asp ou Glu) est présent dans la région putative des pores de tous les canaux TRPV de mammifères²⁶³. Il est important pour la sélectivité ionique et intervient également dans l'inhibition des canaux par les cations divalents extracellulaires. Ce résidu acide est conservé dans les canaux TRPV de *C. elegans* OSM-9 (Asp545) et OCR-1 (Glu684). Ainsi, les cations divalents extracellulaires, en particulier le Ca²⁺, peuvent réguler directement ces deux

TRPV de *C. elegans*. Étant donné que de nombreux canaux TRPV du nématode sont hautement enrichis dans les cils qui sont directement exposés à l'environnement extérieur riche en cations divalents, ces ions peuvent représenter un type distinct d'entrée sensorielle empiétant directement ou indirectement sur les canaux TRPV. En effet, une étude réalisée au sein de notre laboratoire a révélé que la capsaïcine peut entraver la réponse nocifensive de *C. elegans* à la chaleur nocive (c'est-à-dire 32 ° C à 35 ° C) après une exposition prolongée, et cet effet s'est inversé 6 h après l'exposition à la capsaïcine²⁶⁴. En outre, ces données suggèrent que la capsaïcine cible le canal ionique potentiel OCR-2 du récepteur transitoire de *C. elegans*. Des expériences supplémentaires ont indiqué que d'autres analogues de la capsaïcine ont des effets antinociceptifs, notamment l'olvanil, le gingérol, le shogaol et la curcumine, ainsi que d'autres vanilloïdes, notamment l'eugénol, la vanilline et la zingérone²⁶⁵. Ainsi, des ligands TRPV connus qui ciblent les récepteurs vanilloïdes de *C. elegans* produisent des effets antinociceptifs compatibles avec des études antérieures qui ont été réalisés à l'aide de modèles expérimentaux de douleur.

6.3. Neurotransmission chez *C. elegans*

Comme énoncé plus haut la structure neuronale et la connectivité du système nerveux de *C. elegans* s'avère être simple. Les neurones de façon générale sont très connectés localement et établissent des connexions synaptiques avec les neurones avoisinants. Une représentation détaillée du système nerveux a été effectuée par John White²⁶⁶. Ce qui a permis d'établir que les connexions se réalisent avec une synapse en général. La structure des neurones est faite de manière que seul un neurone se connecte à un autre neurone et la transmission du signal est réalisée en libérant des neurotransmetteurs. La communication entre les neurones se réalise à travers une synapse avec un neurone présynaptique émetteur du signal et un neurone post synaptique récepteur du message. Tous les neurones dit pré synaptiques peuvent donc être vu comme des neurones sensoriels. Alors que les neurones qui reçoivent de l'information grâce à leur position post synaptique soit souvent associés à une fonction motrice. Les neurones chez *C. elegans* sont classifiés en 3 grands groupes : sensoriel, moteur ou intermédiaire. Peu d'information est connue sur la fonction de chaque classe des neurones. En ce qui concerne les mécanismes moléculaires qui sont impliqués dans la transmission de l'influx nerveux chez *C. elegans* se fait par l'intermédiaire de synapses chimiques comme pour les mammifères²⁶⁷. L'influx nerveux est transmis du neurone pré synaptique par le biais de la libération de

messagers chimiques tel que les neurotransmetteurs vers le neurone post synaptique. Comme pour les mammifères, une entrée massive de calcium entraine la migration de vésicule synaptique et libèrent les neurotransmetteurs au niveau de l'espace intersynaptique²⁶⁸ (Figure 27). Les différents neurotransmetteurs vont donc pouvoir interagir avec leur récepteur post synaptique afin de provoquer une cascade de signalisation. Il a été démontré que chez *C elegans* la communication interneuronale est rapide et comprenait également l'implication de neurotransmetteurs classiques comme les monoamines, l'acétylcholine, le GABA²⁶⁹, le glutamate^{257,270} ou encore les neuropeptides qui sont des neurotransmetteurs bien connus chez les mammifères. Au sein de notre laboratoire des études ont confirmé que la communication entre les neurones pouvait s'effectuer de façon peptidergique par une libération importante de neuropeptides. Chez *C elegans* les neuropeptides sont répertoriés selon deux grandes familles les FLP et NLP. De nombreuses études ont montré que des mutants pour les genes *flp* présentaient des dysfonctionnements de reproduction et des problèmes de comportement comme des atteintes du déplacement. Certain neuropeptides tel que le FLP-21 est identifié comme un élément clé dans la nociception de *C elegans*²⁷¹. Des études travaillant sur le neuropeptide FLP-21 et son récepteur NPR-1 ont prouvé que ces deux éléments sont fortement impliqués dans l'établissement du seuil d'évitement thermique chez *C elegans*. Les auteurs ont observé le comportement d'évitement à la chaleur de plusieurs mutants dont un mutant *flp-21*. A une température de 33°C les nématodes de souche sauvage avaient un comportement d'évitement bien présent alors que les mutants *flp-21*, *npr-1* et le double mutant étaient insensible à la chaleur et n'avaient plus de comportement d'évitement, ce qui montre un seuil d'évitement accrue à la chaleur pour tous les mutants. Ces expériences permettent de mettre en évidence que la voie des FLP-21/NPR-1 est indispensable afin d'assurer un comportement d'évitement à un stimulus thermique. De plus notre équipe a démontré l'importance et l'implication des protéines EGL-3 et EGL-21 dans la maturation des neuropeptides actif chez *C. elegans*²⁵⁹. Cette étude a montré que le comportement d'évitement thermique des mutants *egl-3* et *egl-21* est significativement entravé par rapport à la souche sauvage. De plus les mutants *flp-18*, *flp-21* et *npr-1* présentent un phénotype comportemental similaire. Nos analyses par spectrométrie de masse sur les mutants *egl-3* et *egl-21* ont confirmé que le clivage des proprotéines FLP-18 et FLP-21 est affectée et entraine une baisse de l'expression de neuropeptides matures. Les neuropeptides comme FLP-18 et FLP-21 sont essentiels à la réponse comportementale d'évitement à la chaleur nocive et sont des ligands du récepteur NPR-1 montrant que la neurotransmission est de nature peptidergique tout comme les mammifères.

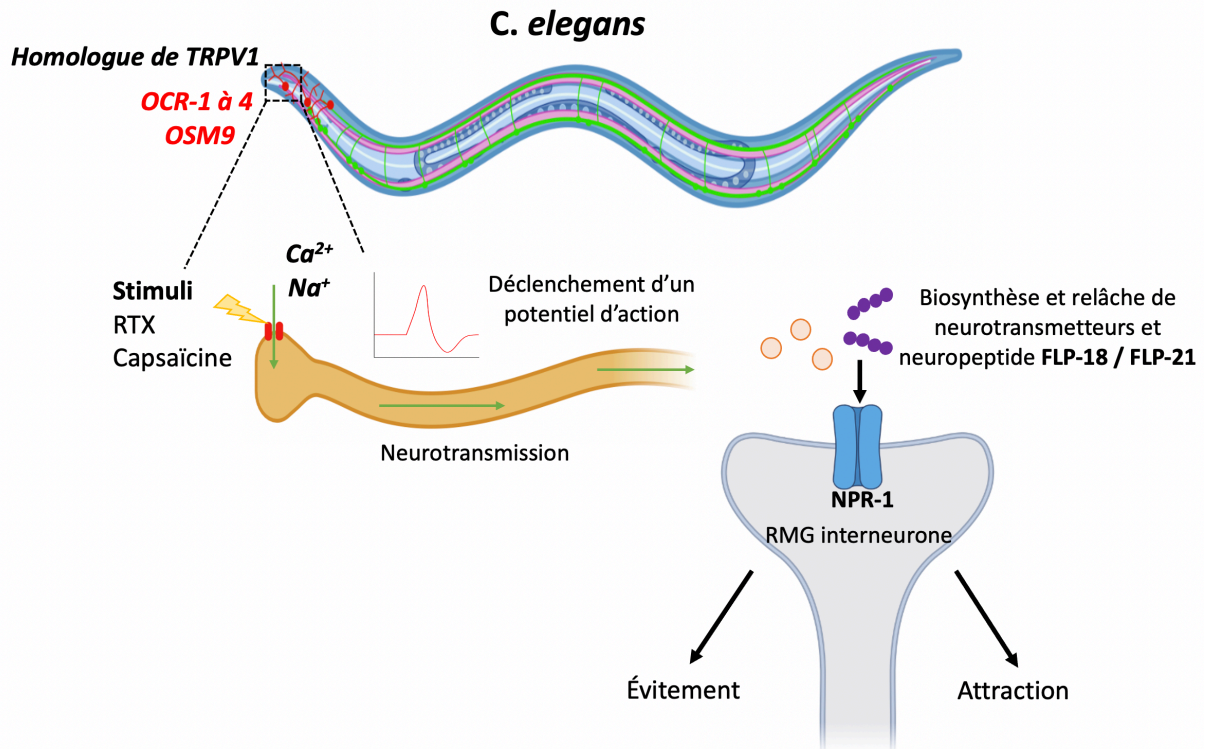


Figure 27 : Schéma explicatif des mécanismes mis en place suite à l'activation de récepteurs homologues de TRPV1 chez *C. elegans*. Des récepteurs homologues de TRPV1 sont présents chez *C. elegans* comme les OCR-1 à 4 et OSM-9. Suite à l'exposition à RTX ou à la capsaïcine, une entrée massive de calcium se produit et entraîne une dépolarisation membranaire et un changement de conformation du récepteur qui provoque la fermeture du canal. Une migration des vésicules entraînant le ralarage de neurotransmetteurs et de neuropeptides au niveau de la fente synaptique. Ces derniers pourront agir sur des récepteurs post synaptique afin de produire un message d'alerte pour l'organisme par exemple comme le comportement d'évitement suite à une stimulation à la chaleur nocive.

6.4. Biosynthèse des neuropeptides chez *C. elegans*

La production des neuropeptides actifs comporte généralement une maturation de proprotéine réalisée par plusieurs clivages protéolytiques. Chez les mammifères il a été montré que cela impliquait des protéines de type protéines convertases et des carboxypeptidases. Spécifiquement les protéines convertases (PC) sont capables de reconnaître des séquences d'acides aminés basiques comme la lysine (K) et l'arginine (R) et de cliver au niveau de leur C-terminal. De plus, les carboxypeptidases jouent un rôle après l'action des PC en éliminant les résidus basiques au niveau de la terminaison C-terminale. Comme pour les molécules précurseurs des neuropeptides des mammifères, les clivages initiaux chez *C. elegans* se produisent aux niveaux du C-terminal de résidus dibasiques dans la séquence peptidique cependant, il peut y avoir également des clivages au C-terminal de résidus mono- et tribasiques (Figure 28). Les enzymes responsables du clivage endoprotéolytique initial sont kex2/subtilisin-like proprotein convertases, qui doivent elles-mêmes être clivées pour devenir

actives. Quatre proprotéines convertases de *C. elegans* sont identifiées à ce jour : kpc-1, egl-3/kpc-2, aex-5/kpc-3 et bli-4/kpc-4²⁷². Le gène egl-3/kpc-2 code pour une convertase de type PC2 et est exprimée dans de nombreux neurones du système nerveux, mais pas dans tous. La similitude de séquence entre EGL-3 et PC2 des mammifères a été démontré et cette protéine clive les propeptides²⁷³. EGL-3/KPC-2 est la principale proprotéine convertase active dans les neurones²⁷⁴. Après clivage de la proprotéine ou du précurseur peptidique, les intermédiaires de transformation peptidiques résultants contiennent des acides aminés basiques au niveau de leur terminaison carboxyterminale, qui sont ensuite transformé par une carboxypeptidase spécifique. Le gène egl-21 a une similarité de séquence avec carboxypeptidase de mammifère et code pour une carboxypeptidase E neurale spécifique qui est exprimée dans environ 60 % des neurones^{275,276}.

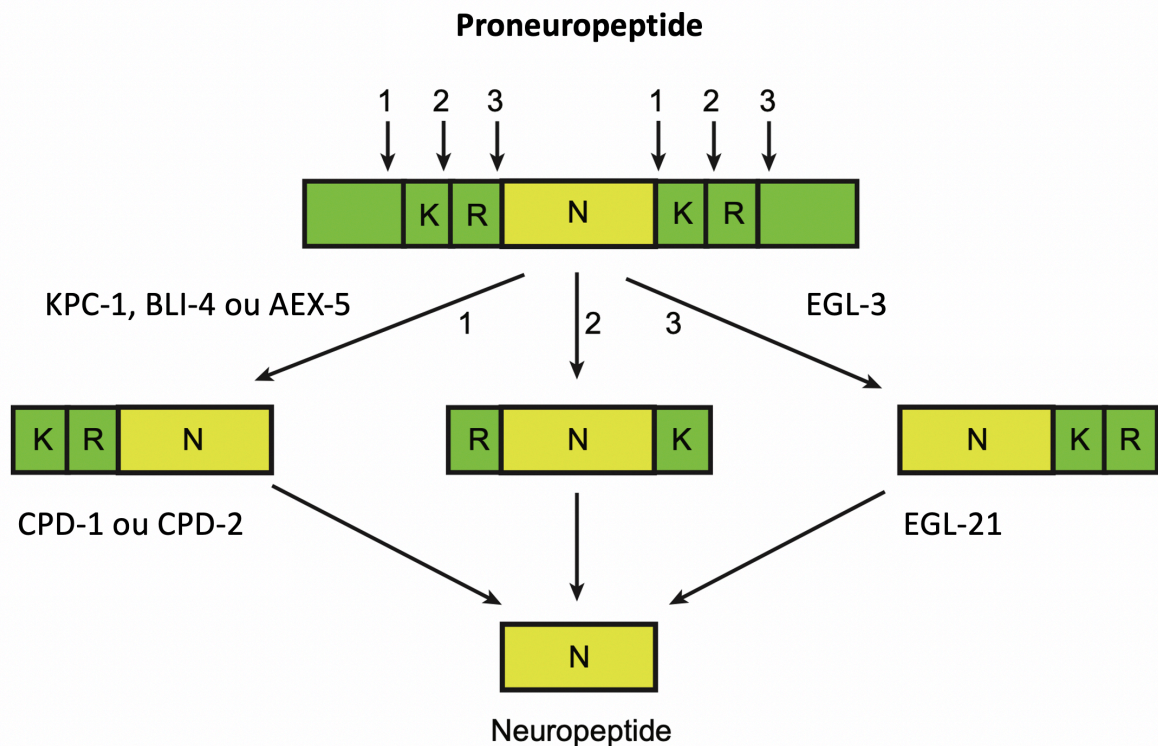


Figure 28 : Représentation schématique du processus protéolytique mis en place pour obtenir un neuropeptide actif à partir d'un proneuropeptide précurseur chez *C. elegans*. Il existe plusieurs voies afin d'obtenir un neuropeptide biologiquement actif. Les clivages protéolytiques sont tous réalisés au niveau de résidus basique soit dibasiques ou monobasique. La première voie met en évidence l'action de différentes enzymes comme KPC-1, BLI-4 ou AEX-5 qui ont une préférence pour cliver du côté N-terminal des sites dibasiques (numéro 1) qui donne des intermédiaires peptidiques avec résidus au niveau de la terminaison NH₂, qui sont ensuite éliminés par CPD-1 ou CPD-2. Alors que la seconde voie implique EGL-3 qui clive préférentiellement du côté C-terminal des sites dibasiques donnant des intermédiaires peptidiques avec des extensions de résidus basiques à leur extrémité COOH qui sont ensuite éliminés par EGL-21. Figure adaptée de la publication (Hook V. et al. 2008).

7. La spectrométrie de masse pour l'analyse protéomique

De nos jours la spectrométrie de masse (MS) est une méthode analytique courante dans de nombreux domaines. Généralement tous les spectromètres de masse disponibles sur le marché fonctionnent selon le même principe de base : la détection d'ions moléculaires en phase gazeuse.

7.1.Principe général

Afin d'étudier les profils protéiques exprimés dans différentes conditions physiologiques ou pathologiques, l'analyse par MS est couramment utilisée comme outil puissant sur les plateformes de protéomique. Cette technologie est appliquée pour la détermination de masses et peut être adaptée à l'identification des protéines. Tous les spectromètres de masse sont construits en 3 grandes parties : la source d'ions, l'analyseur de masse et le détecteur. Un spectromètre de masse sépare les protéines (ou autres analytes) en fonction de leur rapport de masse sur charge (m/z). Les molécules à analyser sont ionisées et les ions sont envoyés vers l'analyseur par un champ électrique qui sépare ces ions en fonction de leur rapport m/z . Chaque analyseur de masse fonctionne différemment en termes de plages de masses, de résolution, de précision ainsi que de compatibilité avec certaines configurations préparatoires des échantillons. Le détecteur envoie alors l'information vers l'ordinateur pour être analysé (Figure 29). Les méthodes d'ionisation fréquemment utilisées en biologie sont l'électrospray (ESI) et la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) car elles engendrent peu ou pas de fragmentation de la molécule durant le processus d'ionisation et/ou de désorption²⁷⁷.

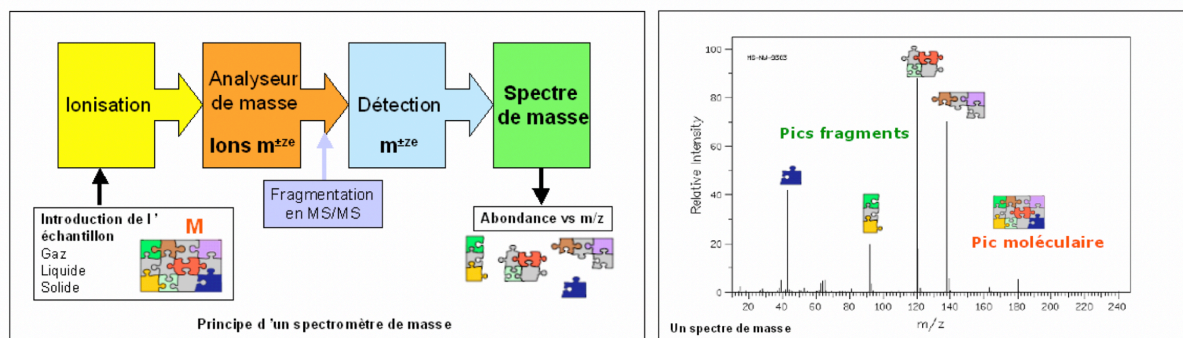


Figure 29 : Représentation simplifiée d'un spectromètre de masse. Il est constitué de différentes parties une source d'ionisation permettant l'ionisation de l'échantillon, un analyseur de masse qui sépare les ions produits en fonction de leur rapport m/z , un détecteur qui convertit le courant ionique en courant électrique, ensuite il y a le traitement du signal par l'ordinateur qui représente les données dans un spectre de masse qui est un graphe exprimant l'abondance en fonction de leur rapport m/z des ions. Il peut se produire une fragmentation de type MS/MS des ions parents donnant des ions fragments pour des spectres MS/MS. Figure issue du centre suisse de contrôle de qualité.

7.2. Les sources d'ionisation électrospray (ESI)

En 1980, J. Fenn décide de coupler la source d'ionisation électrospray avec un analyseur quadripolaire afin de montrer que les ions pouvaient être formés sans fragmentation à partir de molécules non volatiles²⁷⁷. Les sources d'ionisation ESI sont des ionisations douces mettant en œuvre un mécanisme assurant le passage d'ions présents en solution vers une phase gazeuse sous l'effet d'un champ électrique. Cette source implique la production d'ions gazeux grâce à l'application d'un potentiel électrique à un liquide en mouvement, ce qui induit la formation d'un spray de petites gouttelettes du solvant et des analytes (Figure 30)²⁷⁸. Le solvant est ensuite évaporé des gouttelettes par la chaleur ou en provenant d'une source d'énergie de la collision avec un gaz comme l'azote. La dimension des gouttes diminue de plus en plus jusqu'à devenir instable, ce qui provoque l'implosion en gouttelettes encore plus petites. Les répulsions électrostatiques deviennent fortes, ce qui engendre la désorption des ions analytes, qui sont ensuite envoyés vers le spectromètre de masse (Figure 30)²⁷⁸. Les ions en ESI portent généralement plusieurs charges et sont de types $(M+nH)^{n+}$. L'analyse d'échantillons protéiques est cependant complexe et nous donne généralement de multiples pics et plusieurs ions pour un seul composé ce qui ne fait qu'augmenter la complexité et l'interprétation des spectres de masse. C'est pourquoi il est souvent réalisé un préfractionnement notamment par chromatographie liquide (HPLC).

Le type de source ESI présente des avantages comme une haute reproductibilité, et une haute flexibilité du choix de spectromètre de masse, elle est compatible avec tout ce qui peut analyser des rapports m/z faibles vu que la source ESI génère des ions multichargés. En revanche l'ESI présente aussi quelques inconvénients dont les spectres de masse acquis sont complexes, ne peut pas être utilisé pour de l'imagerie et il est nécessaire d'avoir plusieurs échantillons dus à la quantité de volume utile pour former le spray. On utilise de plus en plus des sources nanospray pour éviter d'utiliser de gros volumes d'échantillons.

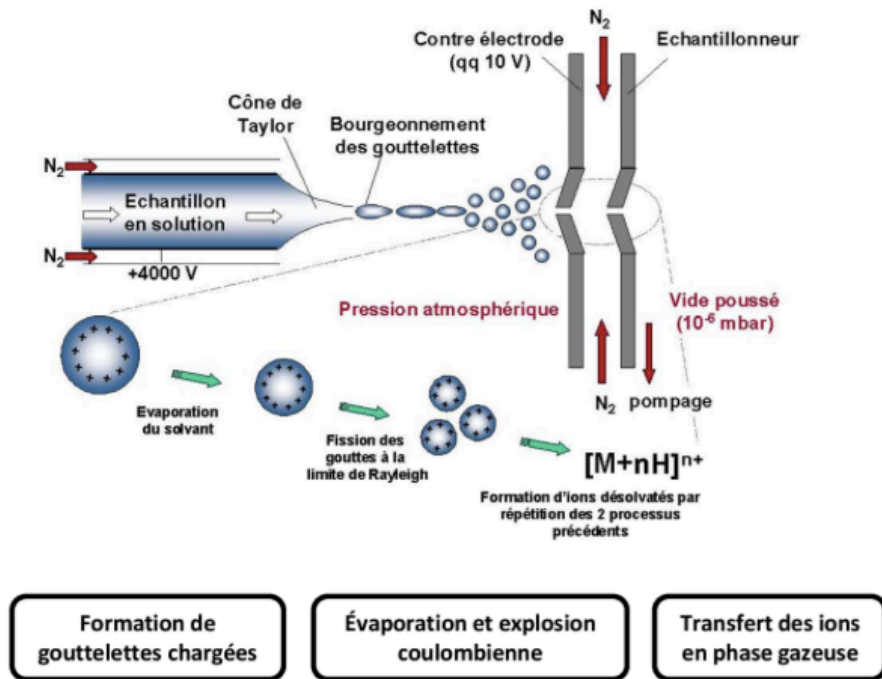


Figure 30 : Processus de l'électrospray, schéma représentant l'obtention d'ions en spectrométrie de masse dans la source d'ionisation de type ESI avec la formation de gouttelettes. Figure issue de la thèse de Ludovic Beuvier.

7.3. Analyseurs

Les ions produits sont séparés d'après leur masse et celles-ci est simultanément déterminée au moyen de l'analyseur. De nombreux analyseurs sont disponibles. En fonction du type d'analyse à réaliser et du type de source utilisée, le choix de l'analyseur va dépendre principalement :

- de sa gamme de masse,
- de sa précision dans la mesure de la masse,
- de sa résolution qui correspond à sa capacité à différencier des ions de rapport m/z voisins,
- de sa capacité à focaliser les ions même après collision.

Mais de nos jours il est plus intéressant d'utiliser des analyseurs dits hybrides qui combinent la spécificité de différents types d'analyseurs. Dans notre projet nous avons utilisé un instrument hybride de type Q-Orbitrap qui est la combinaison d'un quadropôle et d'un Orbitrap tel qu'un Q Exactive plus.

7.3.1. Quadrupôle

L'analyseur quadrupôle (Figure 31) utilise la stabilité de la trajectoire des ions dans un champ électrique oscillant pour les séparer en fonction de leur rapport m/z .

Ils sont constitués de 4 barres parallèles sur lesquelles est appliqué de façon alternative un potentiel positif ou négatif. Les 4 électrodes sont soumises deux à deux à un potentiel composé d'une tension continue U et d'une tension alternative V . Les ions peuvent donc cheminer suivant l'axe des Z et sont soumis à l'influence du champ alternatif quadripolaire superposé au champ constant créé par l'application sur les barres.

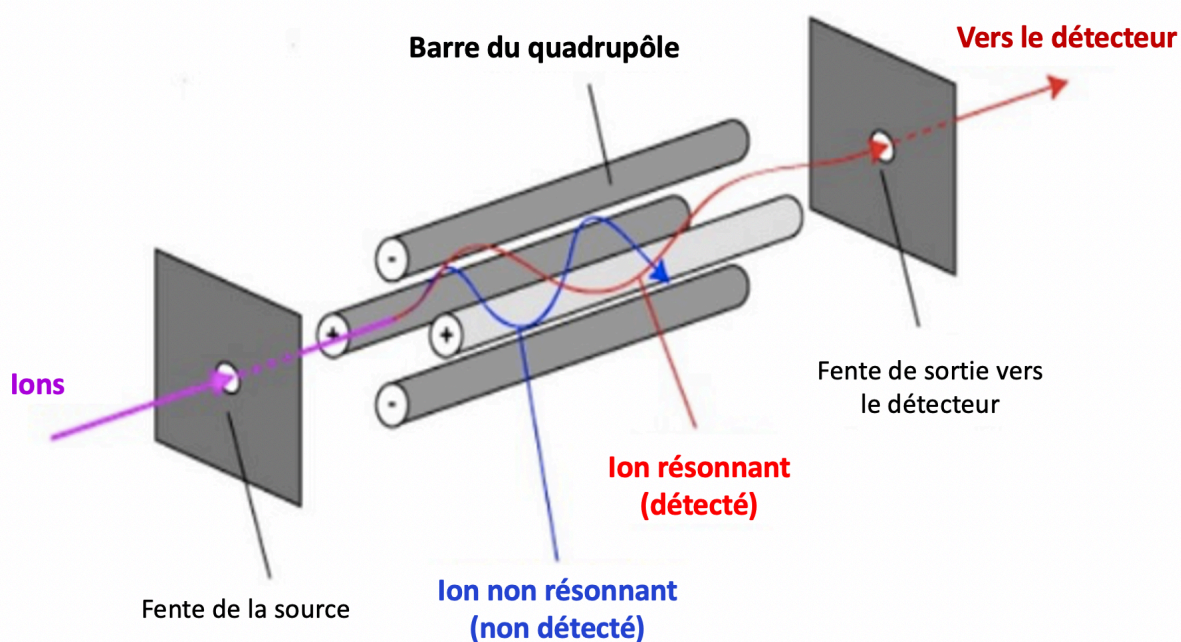


Figure 31 : Schéma du principe de l'analyseur de masse quadrupôle. L'ionisation se produit au niveau de la source. Les ions sont ensuite accélérés et focalisés par une lentille dans le quadrupôle. Les tiges opposées ont le même potentiel appliqué. Les tensions appliquées aux barres sont utilisées pour contrôler le parcours des ions lorsqu'ils se déplacent le long de la trajectoire des ions en vol au centre des quatre barres. La flèche rouge représente la trajectoire de vol d'un ion résonnant alors que la flèche bleue est la trajectoire de vol d'un ion non résonnant. Figure adaptée de l'Université : University of Bistol, NERC life sciences mass spectrometry facility.

7.3.2. Orbitrap

L'Orbitrap est un analyseur de masse de type trappe à ions composé de deux électrodes externes et d'une électrode centrale, ce qui lui permet d'agir à la fois comme analyseur et détecteur (Figure 32)²⁷⁹. L'Orbitrap utilise la transformation de Fourier pour obtenir des spectres de masse. L'analyseur de masse piège les ions ou fragments entrant dans un champ électrostatique dont la technique est décrite par Alexander Makarov. Les ions entrant dans l'Orbitrap sont

capturés par « compression électrodynamique », après quoi ils oscillent autour de l'électrode centrale et entre les deux électrodes externes. Différents ions oscillent à différentes fréquences, entraînant leur séparation. En mesurant les fréquences d'oscillation induites par les ions sur les électrodes externes, les spectres de masse des ions sont acquis en utilisant une détection de courant d'image. En raison de sa configuration, l'analyseur de masse Orbitrap est en fait un analyseur de masse à transformée de Fourier analogue de la technologie de résonance cyclotron FT-ion (ICR), mais avec une taille d'instrument plus petite et un fonctionnement plus facile de l'instrument. Le spectromètre de masse Orbitrap offre une résolution maximale totale possible (FWHM) de 1 000 000 à m/z 200 et une précision de masse inférieure à 1 ppm dans un seul instrument compact et facile à utiliser. Ce sont des systèmes de masse très précis à haute résolution qui détectent une large gamme de composés et de petites molécules lors d'analyses ciblées et non ciblées, sans perdre en sélectivité ou en sensibilité.

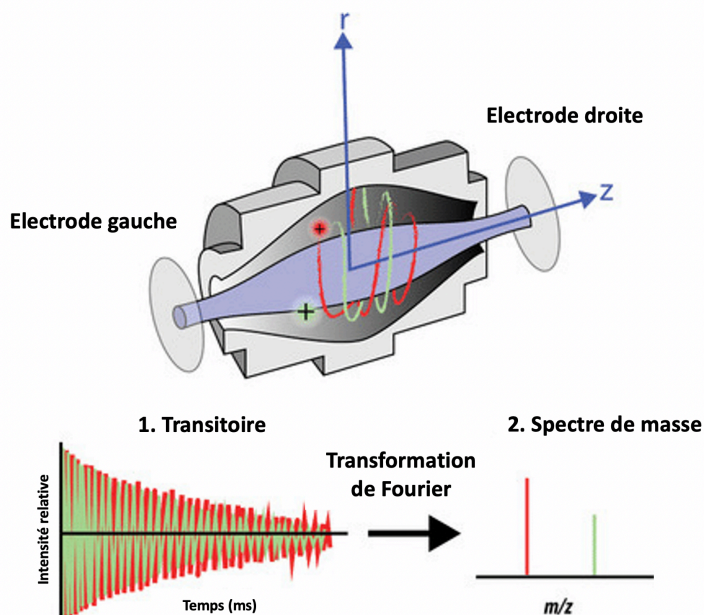


Figure 32 : Schéma représentatif d'un analyseur de masse Orbitrap. Dans l'Orbitrap les ions oscillent autour d'une électrode centrale en forme de broche tout en oscillant également dans la dimension axiale. L'oscillation axiale est détectée par des électrodes pour produire un transitoire, qui est transformé en spectre de masse résultant par la transformation de Fourier. Le transitoire est la fréquence d'oscillation des ions dans la dimension axiale et sera unique pour chaque m/z . Figure adaptée de la publication (Savaryn J.P. et al. 2016).

7.3.3. Q Exactive plus

Le Q Exactive plus est un instrument dit hybride MS/MS vu qu'il combine plusieurs types d'analyseurs tels qu'un quadropôle suivi d'un Orbitrap (Figure 33). Le quadropôle permet une sélection de masse beaucoup plus rapide et le fait de comprendre une cellule de dissociation

collisionnelle (HCD), lorsque que l'on est à haute énergie pour réaliser la fragmentation on a la détection et la fragmentation qui sont réalisées quasiment simultanément. Cependant il n'est pas possible de réaliser de la fragmentation MS^n avec le Q Exactive plus car les ions ne peuvent pas être piégés comme dans une trappe à ions. La configuration du spectromètre de masse permet au quadropôle et à l'Orbitrap de fonctionner seulement en combinaison. Cet instrument peut effectuer des modes de balayages multiplexés jusqu'à dix fois en MS et MS/MS. Autrement dit les ions précurseurs ou les ions fragments peuvent être sélectionnés, stockés et finalement analysés simultanément dans l'Orbitrap. Ceci est largement possible grâce à la capacité de stockage de la cellule HCD et à la vitesse de sélection du quadropôle.

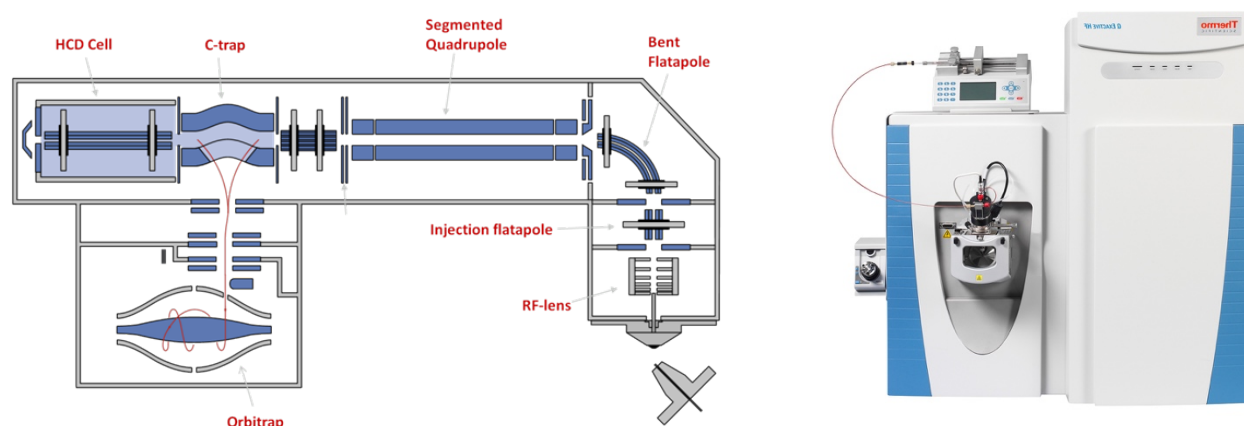


Figure 33 : Schéma illustrant un Q Exactive plus. Figure issue du site de ThermoFisher scientific.

Durant notre projet seul le Q Exactive plus est utilisé pour effectuer l'analyse protéomique de nos échantillons.

7.4. Analyse protéomique

La protéomique est une approche puissante permettant d'étudier à la fois des protéines simples et des échantillons de protéines complexes. La combinaison de techniques de séparation basées sur la chromatographie avec des approches d'analyse et de bioinformatique basées sur la spectrométrie de masse permet de traiter des questions de tous les domaines. En particulier, les processus et voies biologiques peuvent être examinés de manière plus détaillée.

Selon l'objectif et la portée de l'étude, deux stratégies principales sont utilisées : la quantification non ciblée (globale) de centaines ou de milliers de protéines pour la comparaison de profils protéiques et la quantification ciblée de seulement quelques composants, qui sont sélectivement isolés d'un échantillon et quantifiés. Selon le niveau de quantification, une approche centrée sur les protéines (descendante) ou centrée sur les peptides (ascendante) pourrait être appliquée. Selon la méthodologie sous-jacente, la quantification basée sur la MS peut être divisée en deux sous-groupes : la quantification basée sur les marqueurs utilisant des marqueurs d'isotopes stables incorporés dans les peptides/protéines et la quantification sans marquage dans laquelle l'échantillon conserve sa composition isotopique native. La technologie basée sur le marquage comprend le marquage artificiel de peptides ou de protéines, qui introduit une différence de masse prévisible dans différentes conditions expérimentales. Il existe différents modes de marquage; les marquages chimiques, métaboliques et enzymatiques.

7.4.1. Approche globale et ciblée

Pour les expériences de protéomique non ciblées, l'acquisition dépendante des données (DDA) ou l'acquisition indépendante des données (DIA) peut être utilisés. Actuellement, la plupart des approches de spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide s'appuient sur le DDA, qui comprend une sélection des ions précurseurs Top N les plus courants à partir d'une analyse d'ensemble des spectres MS1 pour une fragmentation et une acquisition supplémentaires des spectres MS2 respectifs²⁸⁰. Les données dérivées de chaque analyse MS2 peuvent être analysées avec un algorithme de recherche de base de données²⁸¹. Le DDA produit généralement des milliers d'identifications de protéines. Cependant, la sélection des précurseurs peptidiques est aléatoire, si trop d'espèces de peptides co-éluent et apparaissent dans un seul balayage MS1, alors le DDA échantillonne uniquement les peptides les plus abondants, manquant ceux qui sont peu abondants. Par conséquent, différents sous-groupes de peptides pourraient être sélectionnés pour la fragmentation entre différents échantillons, entraînant de fortes variations entre-les répliqua telles que le manque d'identification de peptides peu abondants et donc un nombre réduit de protéines quantifiables. De plus, la quantification basée sur le DDA dépend de l'analyse de la surface du pic chromatographique MS1, qui est particulièrement sensible aux interférences, en particulier dans les échantillons complexes²⁸². Malgré ses inconvénients, la flexibilité, la portée de la détection et la simplicité relative de la configuration et de l'analyse font du DDA, la méthode préférée pour les analyses protéomiques. Dans le DIA, un ensemble de fenêtres d'isolation de masse séquentielles prédéterminées est utilisé pour envoyer tous les ions précurseurs de la même fenêtre de masse pour une

fragmentation et une analyse simultanée. Cette approche permet une identification et une quantification des protéines plus reproductibles et précises, par rapport au DDA²⁸³. Comme la fragmentation et l'analyse de tous les peptides ionisés se produisent dans une fenêtre d'isolement de masse définie, théoriquement l'identification et la quantification de tous les peptides précurseurs sont possibles. La quantification basée sur le DIA est effectuée au niveau MS2 par extraction de chromatogrammes d'ions fragmentés, qui sont moins sensibles aux interférences que les chromatogrammes d'ions extraits basés sur MS1²⁸³. Cependant, un grand nombre d'ions fragments, issus de différents peptides issus d'une même fenêtre de sélection, interdit l'analyse dans une stratégie de recherche de base de données classique. Différents logiciels sont alors utilisés comme Spectronaut, OpenSWATH, Skyline, PeakView²⁸⁴. Alors que la protéomique globale est une stratégie de choix pour la découverte de nouveaux biomarqueurs, leur validation nécessite des méthodes ciblées pour une quantification sensible, précise et spécifique des protéines²⁸⁵. Les approches MS ciblées, c'est-à-dire le suivi de réactions sélectionnées (SRM), également connu sous le nom de suivi de réactions multiples (MRM), et le suivi de réactions parallèles (PRM), sont hautement reproductibles et relativement rapide. La SRM est généralement réalisée avec des instruments triple quadripôle : Q1 sélectionne un ion peptidique, Q2 fragmente le peptide et Q3 sélectionne un ion fragment spécifique pour la détection et la quantification au niveau MS2²⁸⁶. Ainsi, en raison du filtrage de masse à deux niveaux, la plupart des peptides co-élus sont effectivement exclus, faisant du SRM une technique très sensible. Cependant, en raison du faible pouvoir de résolution du quadripôle, la séparation des ions quasi-isobares interférents qui co-éluent avec les peptides cibles est limitée. En plus du m/z des peptides, SRM nécessite l'information préalable concernant les ions fragments à cibler. Les limites du SRM ont été surmontées avec la mise en œuvre de l'approche PRM, qui utilise Orbitrap haute résolution comme analyseur MS2. PRM utilise la MS en tandem ciblée pour surveiller simultanément les ions produits d'un peptide ciblé avec une résolution élevée et une précision de masse²⁸⁷. Le PRM offre la même sélectivité et la même précision, mais une plage dynamique et une sélectivité plus large que le SRM. Ainsi, le PRM a un temps de cycle plus long. Cette approche a été utilisée avec succès pour la quantification précise de peptides/protéines spécifiques peu abondants dans des échantillons biologiques complexes.

7.4.2. Principe de la protéomique ascendante dite « bottom-up »

La base de la protéomique de type bottom-up vise à l'identification d'une protéine en analysant des peptides protéolytiques issus d'une digestion enzymatique de la protéine²⁸⁸. Les protéines de l'échantillon sont digérées en peptides ayant le plus souvent des tailles comprises entre 500 et 3000Da. Quand l'échantillon est complexe, on qualifie l'approche bottom-up de « Shotgun proteomics ». Dans ce cas il y a souvent le couplage d'une étape de séparation par chromatographie liquide et une séparation par spectrométrie de masse. Les peptides issus de la digestion des protéines sont ainsi fractionnés par chromatographie liquide avant d'être détectés par spectrométrie de masse tout d'abord en mode MS et puis en mode MS² pour obtenir leur spectre de fragmentation. L'identification des peptides se fait ensuite par la comparaison du spectre MS² issu de la fragmentation des peptides au spectre MS² théoriques de peptides issu de la digestion in silico d'une base de données de protéines. La digestion est l'étape la plus essentielle de la stratégie bottom-up. Elle est le plus souvent de nature enzymatique, la plus couramment utilisée est une digestion trypsique. En ce qui concerne les étapes du protocole type d'une analyse bottom-up débute par l'extraction de protéine de l'échantillon biologique. Cette étape permet d'extraire les protéines en détruisant les membranes cellulaires et en rompant les interactions physico-chimiques entre protéines ou d'autres molécules. Dans notre projet cette étape se réalise dans de l'urée, ce qui permet de solubiliser les protéines. Afin de pouvoir réaliser la digestion sur les protéines extraites, une réduction de ponts disulfures est effectuée par un agent réducteur comme le dithiothréitol. Un agent alkylant comme l'iodoacétamine est utilisé afin de bloquer les cystéines pour empêcher la reformation de ponts disulfures. Enfin pour effectuer la digestion protéique une endoprotéase est ajoutée ayant des sites de coupures spécifiques. La trypsine est l'enzyme la plus utilisée, c'est une enzyme très spécifique qui coupe les liaisons peptidiques du côté C-terminal des résidus arginine et lysine. L'utilisation de cette enzyme s'explique essentiellement par le fait de l'abondance de la lysine et de l'arginine dans les séquences des protéines. De plus généré des peptides tryptiques, fait que les peptides portent au moins 2 charges positives, ce qui facilite leur ionisation et leur fragmentation. La digestion augmente le nombre de molécules présent dans l'échantillon en diminuant la complexité de l'échantillon. Les peptides générés présentent une homogénéité physico-chimique ce qui rend l'échantillon moins complexe. La séparation en chromatographie liquide d'un mélange de peptides est dotant plus reproductible et résolue que celle d'un échantillon de protéines intactes. Un des avantages de cette approche est que l'obtention de plusieurs peptides provenant d'une même protéine permet d'avoir une probabilité

d'identification de la protéine à partir de ces peptides plus importants. Ce qui fait que cette technique permet aussi d'identifier un plus grand nombre de protéines par rapport à la technique de l'analyse de protéine intacte dite top down. Cependant l'approche bottom-up présente des inconvénients comme les étapes de la préparation des échantillons digérés entraînent une perte de l'échantillon, la digestion simplifie l'échantillon mais amène à une perte des positions des modifications post traductionnelles.

7.4.3. Quantification sans marquage ou « Label free »

La quantification sans marquage repose sur la comparaison de peptides et de protéines à l'état naturel dans des expériences consécutives. Elle nécessite des protocoles de manipulation et d'analyse des échantillons hautement reproductibles²⁸². Étant donné que tous les échantillons d'une étude sans étiquette sont analysés séparément par LC-MS/MS, même l'exécution de tous les échantillons dans une seule séquence dans le même instrument peut entraîner des variations même pour la réplique technique du même échantillon. Afin de prendre en compte le biais des données et de rendre les données plus comparables, une normalisation est nécessaire. La quantification sans étiquette permet l'analyse d'un nombre pratiquement illimité d'échantillons sans introduction d'étiquettes, ce qui réduit les coûts et minimise les étapes de préparation des échantillons. Cette approche est hautement préférable pour la recherche de biomarqueurs. D'autre part, une mauvaise reproductibilité peut nécessiter l'analyse de nombreuses répétitions techniques et peut conduire à une faible précision des mesures quantitatives. Ainsi, il a été démontré que l'approche sans étiquette offre la plus grande plage dynamique et la couverture protéomique la plus élevée pour l'identification, mais une précision et une reproductibilité de quantification plus faibles par rapport aux stratégies basées sur l'étiquetage [68]. Les approches sans marquage ou « label-free », consistent à analyser en spectrométrie de masse les peptides issus de la digestion des protéines. Une quantification peut ensuite être obtenue à partir des courants d'ions générés par les peptides ou leurs fragments ou à partir des spectres MS² générés par peptide. Cette méthode est plus simple et rapide à mettre en place que les méthodes de marquage, et ne requière pas d'analyse préalable. Lors de la réalisation de l'approche sans marquage, les différents échantillons à comparer sont analysés séparément, les uns après les autres, aucun mélange n'est réalisé. Cette méthode peut s'effectuer selon deux stratégies : en comptant les spectres et des peptides, ou en extrayant des courants d'ion (XIC). Pour la dernière stratégie, il existe deux modes en DDA et DIA qui seront développés dans une sous partie de

la thèse. En ce qui concerne la méthode de comptage de spectres, elle se base sur la théorie que plus un peptide est abondant, plus il sera sélectionné pour la fragmentation et donc il générera plus de spectres MS/MS. Le principe de cette stratégie est donc de compter le nombre de spectres MS/MS acquis par protéine. Alors que la méthode de comptage des peptides consiste à compter le nombre de peptides identifiés par protéine. Tout en se basant sur le fait que plus une protéine est abondante, plus de peptides seront détectés. Cette technique a pour intérêt de pouvoir comparer différentes protéines. La méthode d'extraction des courants d'ions (ou XIC pour eXtracted Ion Current) se base sur le fait que plus un peptide est abondant, plus son signal sera important. L'information quantitative est obtenue pour chaque peptide par extraction des courants d'ions, au rapport m/z et au temps de rétention du peptide, suivi de l'intégration de l'aire sous la courbe des ions P, P+1 et P+2.

7.4.4. Analyse bioinformatique

7.4.4.1. *Identification des termes GO et analyse d'enrichissement*

L'analyse protéomique permet de générer une longue liste de protéines identifiées qui peuvent avoir des scores de probabilité différents et leur associer une valeur de quantification qui leur est propre. La première étape d'une analyse fonctionnelle de la liste de protéines obtenues est de faire la correspondance entre un nom de protéine et un identifiant unique. Cela peut varier en fonction des différentes bases de données pour les protéines (Uniprot, Ensembl)^{289,290}. Une fois l'identifiant de la protéine déterminée nous pouvons lui associer des termes Gene ontology (GO)²⁹¹. L'identification des termes GO permet de connaître la fonction associée à la protéine et ceci peut être décrit par les processus biologiques, la fonction moléculaire ou les composants cellulaires²⁹². Ensuite un enrichissement des termes GO est nécessaire afin de comparer l'abondance de termes GO spécifiques dans l'ensemble des données avec l'abondance naturelle dans l'organisme par exemple²⁹³. Pour extraire les fonctions qui sont considérablement enrichies dans un échantillon sur un autre ensemble de données, une valeur de p est calculée sur la base qui montre une surreprésentation d'un terme GO spécifique, il est donc nécessaire de regrouper les termes GO liés.

7.4.4.2. *Analyse des voies de signalisation*

Une voie de signalisation décrit une série de réactions chimiques au sein de la cellule conduisant à un effet biologique. Certaines protéines sont soit impliquées dans la réaction chimique ou

peuvent avoir une action régulatrice de ces dernières et sont regroupées dans des bases de données des voies de signalisation. Comme pour l'analyse d'enrichissement des termes GO, la liste des protéines identifiées peut être utilisée afin de comparer l'abondance à une voie de signalisation connue. De nombreuses bases de données complètes sur les voies de signalisation sont disponibles telles que KEGG, Reactome^{294,295}. Elles incluent un grand nombre de données d'interaction qui pourraient résulter de réactions intracellulaires comme le métabolisme ou des interactions génétiques, ou des études sur le développement de médicament. Afin d'identifier des voies affectées on peut utiliser différents logiciels comme Ingenuity Pathway Analysis ou encore STRING et Metascape²⁹⁶. Certains logiciels ont beaucoup plus de fonctionnalités comme l'annotation de la famille de protéines, la localisation ce qui permet de pouvoir mieux regrouper l'ensemble des protéines des voies.

7.4.4.3. *Analyse des interactions protéine-protéine*

La majorité des protéines n'agissent pas de façon indépendante, elles forment des complexes entre elles qui peuvent réguler l'activité de protéines. Une protéine peut être impliquée dans divers complexes et pour bien comprendre un système biologique il est nécessaire d'analyser les complexes protéiques abondants et ainsi les conditions qui permettent leur formation et dissociation. Plusieurs banques de données regroupent les informations sur les interactions protéiques en associant le processus biologique. Les interactions protéiques sont souvent affichées sous la forme de grands réseaux d'interaction illustrant le haut degré de connectivité et la présence de protéines. Une ressource largement utilisée pour les données d'interaction est STRING²⁹⁷, ce logiciel est capable de dessiner des réseaux de protéines simples basés sur une liste de gènes fournie et les interactions disponibles dans la base de données. Cytoscape, ce logiciel lui permet de dessiner des réseaux d'interaction de grande complexité et pour l'incorporation et la comparaison d'ensemble de données provenant de différentes procédures expérimentales^{298,299}. Cytoscape peut s'interconnecter à d'autres bases de données comme KEGG, Gene ontology, Reactome pour obtenir des informations sur les protéines.

Hypothèses et Objectifs de la thèse

Le récepteur TRPV1 est un élément clé qui pourrait expliquer certains changements observés lors de problèmes cardiaques. L'IC est caractérisée par une modification de l'activité du SNA avec une hyperactivité du SNS qui contribue largement à la progression de la maladie et à une augmentation de la morbidité. Le mécanisme impliqué dans cette hyperactivité du SNS n'est que partiellement connu. C'est pourquoi notre projet s'intéresse fortement au dysfonctionnement induit lors de l'IM sur le système sympathique. Comme nous l'avons décrit en introduction, le cœur, en particulier l'épicarde possède des milliers de neurones intrinsèques dont une grande partie exprime le TRPV1 sensible à l'ischémie myocardique. Mais, il y a très peu de connaissances sur le rôle de TRPV1 dans l'épicarde sauf que l'application de RTX, agoniste spécifique du TRPV1, au moment de l'IM, réduit la fibrose cardiaque, prévient l'hyperactivation du SNS et améliore la fonction cardiaque. Cependant les fibres sensorielles du cœur exprimant le TRPV1 restent mal caractérisées au niveau des mécanismes moléculaire et fonctionnel favorisant ou limitant les propriétés dépendantes du cœur ou du SNA. C'est pourquoi mon projet de thèse vise à mettre en évidence la caractérisation des neurones sensoriels intrinsèques du cœur qui semble être une étape essentielle pour élucider le contrôle neuronal dans l'IC. Mais l'utilisation d'un modèle moins complexe comme *C. elegans* semble être un bon support pour comprendre la communication neuronale suite à l'activation du TRPV1 afin d'identifier des voies de communications similaires à celles observés chez notre modèle murin.

L'hypothèse de notre étude est que l'hyperactivité du SNS au sein de l'IC est due à un dysfonctionnement de l'activité du réseau neuronal intrinsèque du cœur impliquant les fibres afférentes exprimant le TRPV1. Ainsi que la désensibilisation du TRPV1 avec l'agoniste RTX régulerait les voies cardio-protectrices de signalisation locale et distale. Ceci démontrerait qu'il y a des effets propres au niveau cardiaque mais aussi sur le phénotype cérébral. De plus de nombreuses études ont montré que l'IC était associé à plusieurs comorbidités telles que les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et les maladies mentales comme l'anxiété et la dépression. L'hypothèse de travail pour la partie comparative avec les voies de signalisation retrouvées chez *C. elegans*, est que l'activation de TRPV1 par l'agoniste RTX induirait des mécanismes identiques à ceux observés dans l'activation de RTX dans le modèle murin.

Afin de répondre à notre problématique et nos hypothèses posés nous avons mis en place différents objectifs. L'objectif général du projet est d'évaluer, à l'aide d'approches pharmacologiques et protéomiques, la fonction des fibres sensorielles épicrodiques exprimant le TRPV1 dans un modèle d'IC murin afin de faire progresser le traitement de l'IM et ses comorbidités. La thèse est subdivisée en 5 sous objectifs spécifiques : 2 pour la partie avec *C. elegans* et 3 pour la partie du modèle d'IC murin.

Dans le modèle de *C. elegans* :

- Évaluer les effecteurs importants dans la communication synaptique chez *C. elegans*.
- Comprendre l'effet de l'activation des récepteurs orthologues au TRPV1 par RTX.

Dans le modèle d'IC murin :

- Identifier les effets de la désensibilisation de ces afférences sur l'architecture du tissu cardiaque dans le modèle d'IC et les effets distaux au niveau cérébral.
- Identifier les mécanismes par lesquels la neurotransmission cœur cerveau dépendante des fibres nerveuses exprimant le TRPV1 est établie lors d'IC.
- Comprendre le rôle de l'activation du TRPV1 au niveau épicrodique dans un modèle expérimental d'IC tout en contrôlant la libération spatiotemporelle de RTX.

Chapitre 2 : Les articles

Article 1 : Deciphering the Role of EGL-3 for Neuropeptides Processing in *Caenorhabditis elegans* using High-Resolution Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry

Neurochemical Research, Novembre 2018, doi: 10.1007/s11064-018-2636-2.

Jennifer Ben Salem^{1,2}, Bruno Nkambeu¹, Dina N Arvanitis² and Francis Beaudry^{1*}

1- Groupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

2- Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM UMR1048, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne 31062 Toulouse Cedex 9, France

*Corresponding author:

Francis Beaudry, Ph.D.
Associate Professor in Analytical Pharmacology
Département de Biomédecine Vétérinaire
Faculté de Médecine Vétérinaire
Université de Montréal
3200 Sicotte
Saint-Hyacinthe, QC
Canada J2S 2M2

Email: francis.beaudry@umontreal.ca

Keywords: Neuropeptides, Proprotein convertases, Proteolysis, *Caenorhabditis elegans*, Nociception, Mass spectrometry

Abstract

Neuropeptides are derived from large and inactive proteins which require endoproteolytic processing for the biosynthesis of the bioactive peptides. The maturation of pro-neuropeptide to neuropeptide is believed to be performed by ortholog pro-protein convertase EGL-3 in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Furthermore, ortholog of Cathepsin L, CPL-1 are found in *C. elegans* and can potentially cleave paired basic amino acids at the N-terminal suggesting the presence of both pathways. The objective of this study was to decipher the role of EGL-3 in the proteolysis of FMRFamide-related peptides (FLPs) or neuropeptide-like proteins (NLPs) using synthetic surrogate peptides based on a universal enzymatic cleavage pattern published by Schechter and Berger and used widely in enzymology. The results show evidence that proteolysis controls FLP-21 and NLP-8 related neuropeptide levels in *C. elegans*. Surrogate peptides were degraded rapidly when exposed to *C. elegans* S9 fractions leading to the formation of specific peptide fragments related to EGL-3 and CPL-1 pathway. The results suggest that CPL-1 pathway does not compensate for the loss of the EGL-3 pathway. Proteolysis of Pro-neuropeptides associated to FLP-21 and NLP-8 in *elg-3* mutants are severely hampered leading to a lack of mature bioactive neuropeptides.

1. Introduction

Neuropeptides and many endogenous peptides are derived from large and inactive proteins which require endoproteolytic processing for the biosynthesis of the bioactive peptides. Protein convertases (PCs) are a family of enzymes catalyzing protein cleavage at paired basic residues including RR, KR, RK and KK [1,2]. Seven PCs were identified in mammalian tissues including PC1, PC2, PC4, PC5, PACE4, PC7 and furin; and, are officially recognized as proprotein convertase subtilisin/kexin type 1, 2, 4, 5, 6, 7 and furin respectively [3]. PCs and other secreted proproteins are packed in secretory vesicles as they leave the endoplasmic

reticulum (ER). During the vesicle transport, active PCs can process proproteins within the vesicles [4]. Since PCs have overlapping functions, substrate specificity is determined by tissue and cellular distribution [5]. The rich expression of PC1 and PC2 in neuroendocrine cells confers a key role of these enzymes in the processing of several pro-neuropeptides and prohormones [6]. Bioactive neuropeptides usually result from the removal of N- or C-terminal residues, being commonly flanked by dibasic residues within the pro-neuropeptide sequence. PCs cleave at the C-terminal side and Cathepsin L at the N-terminal [6,7]. The removal of basic residues from the intermediates differs between C- and N-terminal processing. Carboxypeptidase, specifically carboxypeptidase E (CPE), removes basic residues from the C-terminal [8,9]. On the other hand, aminopeptidase is required for the removal of basic residues from the N-terminus depicted in Figure 1A and [6,10]. Even if the contribution of both pathways is controversial, it is suggested that the biosynthesis of most neuropeptides occurs by endoproteolytic cleavage on the C-terminal side [11,12]. As we have previously demonstrated, PC1 and PC2 are required for the processing of tachykinin precursor 1 (TAC1) leading to the formation of substance P [13] and neurokinin A [14]. We further showed that PC1 and PC2 are required for the biosynthesis and regulation of dynorphin A, one of the major proteolytic fragments of prodynorphin (PDYN) and leu-enkephalin resulting in two major opioid neuropeptides [16].

Given the complexity of neuropeptide processing in mammals, *C. elegans* has proven to be an advantageous model for deciphering the intricacies of several molecular pathways [17,18, 32,33]. For example, *C.elegans* neuronal communication at the molecular level was recently explored and exploratory immunochemical analyses exposed the presence of numerous neuropeptides in *C.elegans* [16]. Additionally, a comprehensive analysis of the genome revealed several pro-neuropeptide genes, encoding a series of bioactive neuropeptides [17,18] and specific neuropeptide receptors [19] playing a fundamental role in synaptic transmission.

It is deduced that neuropeptides are involved in the modulation of essentially all behaviors including locomotion, mechanosensation, thermosensation and chemosensation [20]. The presence of a variety of neuropeptides implies an essential role of neuropeptidergic signaling in *C. elegans* but the molecular pathways and networks are poorly described in the literature. Interestingly, *C. elegans egl-3* gene encodes a protein (i.e. EGL-3) with 57% sequence homology compared to mammalian PC2 [21,22]. EGL-3 is a serine endoprotease which cleaves proproteins at paired basic amino acids as shown in Figure 1A. EGL-3 appears to be an important enzyme involved in the maturation of pro-neuropeptides leading to the biosynthesis of active neuropeptides in *C.elegans* [22,23]. Moreover, *C. elegans egl-21* gene encodes a protein (i.e. EGL-21) that is an ortholog of the human CPE. EGL-21 is largely expressed in several *C. elegans* neuronal types [24]. EGL-21 has a similar function to CPE, it removes basic residues from the C-terminal. Additionally, ortholog of Cathepsin L (i.e. CPL-1) cleaving paired basic amino acids at the N-terminal are found in *C. elegans* suggesting the presence of both pathways. *C. elegans* aminopeptidase PAM-1 can remove sequentially basic residues from the N-terminal.

The contribution of both pathways is still under investigation. The attractiveness of *C. elegans* as an interesting model to investigate, particularly for nociception, lies in the fact that it consists of 959 cells including 302 neurons[25]. To identify the molecular elements, the processing of nociceptive neuropeptides we used *egl-3* mutant animals. We hypothesized that *egl-3* mutant animals will lack mature neuropeptides since the biosynthesis of the majority of neuropeptides appears to occur by endoproteolytic cleavage on the C-terminal side in higher species. The objective of this study was to decipher the role of EGL-3 (i.e. PC2 ortholog) in the proteolysis of FLP or NLP neuropeptides. We used synthetic surrogate peptides to demonstrate specific cleavage sites shown in Figure 1B and 1C along with S9 fractions produce from *C. elegans*

homogenates. The strategy employed is based on a universal enzymatic cleavage pattern published by Schechter and Berger [26,27] and used widely in enzymology.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals and reagents

All chemicals and reagents were obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA) or MilliporeSigma (St-Louis, MO, USA). For mass spectrometry analysis, formic acid, water (HPLC-MS Optima grade), acetonitrile (HPLC-MS Optima grade), trifluoroacetic acid (TFA), were used and purchased from Fisher Scientific.

2.2 *C. elegans* strains

The N2 (Bristol) isolate of *C. elegans* was used as a reference strain. Mutant strains used in this work included: *egl-3* (MT1541); *egl-3* (VC461). N2 (Bristol) and other strains were obtained from the Caenorhabditis Genetics Center (CGC), University of Minnesota (Minneapolis, MN, USA). Strains were maintained and manipulated under standard conditions as described [Brenner, 1974; Margie et al., 2013]. Analyses were performed at temperature ranging from 22 to 25 °C unless otherwise noted.

2.3 *C. elegans* homogenization and S9 fraction

Strains were cultured in liquid media standard as described [28,29]. The liquid media was centrifuge at 1,000 g for 10 min and nematodes were collected and aliquot to a re-enforced 1.5 mL homogenizer tubes containing 500 µm glass beads. A solution of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 was added at a ratio of 1:5 (w:v) and a Disruptor Genie was used at 2,800 rpm for 15 minutes. The homogenates were centrifuge at 9,000 g for 20 min. The total amount of protein in each supernatant was determined using the standard Coomassie protein assay (e.g. Bradford). This procedure was necessary in order to assure the same amount of protein was used for each experiment. Supernatant aliquots, designated as S9 fractions, were kept at -80 °C until usage.

Each aliquot was submitted to only one cycle of freeze and thaw in order to assure maximum enzymatic activities.

2.4 Biodegradation study

Incubations were performed minimally in triplicate for each S9 fraction tested. The incubations were performed in a microcentrifuge tube containing 2 μ M (i.e. 2000 pmol/mL) of FLP-21₄₃₋₆₆ or NLP-8₉₂₋₁₃₇, 0.25 mg/mL of S9 fraction proteins diluted in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. S9 enzyme suspensions (total volume of 1 mL) were pre-incubated with 1mM CaCl₂ in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 22°C for 5 min prior fortification with targeted surrogate neuropeptides. Immediately after fortification of the full-length peptide into the S9 fraction suspension, the sampling point for t=0 was taken, and the reaction was quenched after 5 minutes. One hundred microliters of sample were then mixed with 100 μ L of an aqueous solution containing 1% TFA to stop the reaction. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min and 150 μ L of the supernatant was transferred into an injection vial.

2.5 *C. elegans* homogenization and peptides extraction

The N2 (Bristol) isolate of *C. elegans* was used as a reference strain. Mutant strains used for the *in vivo* neuropeptide analyses work included: *egl-3* (MT1541); *egl-3* (VC461). Strains were cultured in liquid media standard as described [28,29]. The liquid media was centrifuge at 1,000 g for 10 min and nematodes were collected and aliquoted to a re-enforced 1.5 mL homogenizer tubes containing 500 μ m glass beads. A solution of 0.1% TFA in water was added at a ratio of 1:5 (w:v; nematodes:0.1% TFA solution) and a Disruptor Genie was used at 2,800 rpm for 15 minutes. Nematodes were homogenized in a TFA solution to inhibit the enzymatic degradation of neuropeptides. The homogenates were centrifuge at 12,000 g for 10 min. The protein concentration for each homogenate was determined using a Bradford assay and all samples were normalized to avoid any bias. Two hundred microliters of sample were taken and mixed with 200 μ L of methanol containing 0.1% TFA to precipitate large and medium size proteins.

The supernatant was dried using an Eppendorf vacuum concentrator and resuspend in 50 μ L of 5% Acetonitrile (ACN) in water containing 0.1% formic acid and transferred into low volume HPLC vials.

2.6 Chromatographic conditions

The HPLC system was a Thermo Scientific Vanquish FLEX UHPLC system (San Jose, CA, USA). Chromatography was achieved using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C18 100 \times 1 mm, with a particle size of 5 μ m. The column temperature was maintained to 30°C. The initial mobile phase condition consisted of ACN and water (both fortified with 0.1% of formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 2 minute, the ratio was maintained at 5:95. From 2 to 22 minute, a linear gradient was applied up to a ratio of 50:50 and maintained for 3 minutes. The mobile phase composition ratio was reverted at the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 17 minutes for a total run time of 42 minutes. The first two minutes was diverted to waste and reverted to MS instrument for acquisition from 2 to 40 minutes. The flow rate was fixed at 50 μ L/min and 2 μ L of sample were injected.

2.7 Mass Spectrometry conditions

A Thermo Scientific Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA) was interfaced with a Thermo Scientific Vanquish FLEX UHPLC system using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. MS detection was performed in positive ion mode and operating in scan mode at high-resolution and accurate-mass (HRAM). Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases and they were set at 10 and 5 arbitrary units. Auxiliary gases was heated to 200°C. The heated ESI probe was set to 4000 V and the ion transfer tube temperature was set to 300°C. The scan range was set to m/z 400-2000. Data was acquired at a resolving power of 140,000 (FWHM using automatic gain control target of 3.0×10^6 and maximum ion injection time of 200 msec. Product ion spectra (MS^2) were acquired at a resolving power of 17,500

(FWHM), using automatic gain control target of 2.0×10^5 and maximum ion injection time of 50 msec. The normalized collision energy was set to 28 (HCD) and the isolation window was set to 2 Da. Targeted peptide quantification was performed at MS¹ level using specific precursor masses based on the monoisotopic masses. Peptide quantification was performed by extracting specific precursor ions using a 5 ppm mass window and a label free approach. The data were normalized based on the peak areas observed of the mean wildtype (N2) strain for relative quantification. Analyses were performed in triplicates. Instrument calibration was performed prior all analysis and mass accuracy was notably below 1 ppm using Thermo Pierce calibration solution and automated instrument protocol. Peptide sequence were verify based on typical a, b, c and x, y, z fragments observed at the MS² level [30].

2.8 Statistical analysis

Neuropeptides data were analyzed with a two-tailed Student-t test with significance set a priori to $p < 0.05$. Wildtype (N2) was compared to *egl-3* (MT1541) and wildtype (N2) was compared to *egl-3* (VC461). The statistical analyses were performed using PRISM (version 7.0d).

3. Results and discussion

3.1 Neuropeptide fragment characterization by high-resolution mass spectrometry analysis

FLP-21₄₃₋₆₆ and NLP-8₉₂₋₁₃₇ were used as surrogate peptides to foster a better understanding of the degradation of the pro-neuropeptides containing sequence of mature neuropeptides in *C. elegans*. The comprehensive analysis of complex biological samples is a significant challenge in peptidomic research. Therefore, the MS resolution and mass accuracy is an important factor to improve the accuracy of peptides identification and assignment. The analyses of S9 fraction generated from *C. elegans* homogenates were performed using a hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer operating in MS at a resolution of 140,000 (FWHM) and in MS/MS at a resolution of 17,500 (FWHM). Based on specific cleavage point identified in Figure 1, we

generated an *in silico* mass list and extract specific m/z (± 5 ppm) from the total ion current (TIC) chromatogram. Full-length peptides, FLP-21₄₃₋₆₆ and NLP-892-137 were incubated for 5 minutes in S9 fractions and following the reaction stoppage, supernatants were analyzed. The HRAM MS analysis reveals specifically the presence of several expected FLP-21₄₃₋₆₆ and NLP-892-137 fragments with mass accuracy within 2 ppm as shown in Table 1 and 2.

The total ion current (TIC) chromatogram following experiments with FLP-21₄₃₋₆₆ and specific extracted ion chromatogram (XIC) shown in Figure 2 reveal that many expected peptide fragments were observed. Moreover, as illustrated in Table 1, mass accuracy observed was between -0.58 to 1.7 ppm for all detected peptide fragments. Interestingly, data clearly demonstrate that the FLP-21 mature neuropeptide (i.e. FLP-21₅₇₋₆₅) was generated from full-length FLP-21₄₃₋₆₆ in S9 fraction generated from *C. elegans* homogenates. The amidated form of FLP-21₅₇₋₆₅ was also observed but the ion intensity was low. Copper is the only metal that supports peptide amidation by Peptidylglycine α -amidating monooxygenase (PAM) in mammals [31]. The reaction media was not supplemented with copper which may explain low level of the amidated form of FLP-21₅₇₋₆₅ resulting from the degradation of the synthetic surrogate peptide FLP-21₄₃₋₆₆. Comparisons of the relative abundances for each peptide fragment detected after 5-minute incubation are shown in Figure 3. The most abundant peptide based on ion abundance was FLP-21₄₃₋₅₄ followed by FLP-21₅₇₋₆₆, FLP-21₅₅₋₆₆, FLP-21₅₆₋₆₆ and lastly FLP-21₅₇₋₆₅ (e.g. mature FLP-21 neuropeptide). Interestingly, these findings demonstrate that the FLP-21₄₃₋₆₆ surrogate peptide is cleaved at the C-terminal (i.e. EGL-3) and N-terminal (i.e. CPL-1) of the basic amino acid doublet (KR) generating FLP-21₅₅₋₆₆ and FLP-21₅₆₋₆₆ respectively. These results confirm that *in vitro*, both proteolytic pathway contribute to the degradation of FLP-21₄₃₋₆₆.

Figure 4 shows specific extracted ion chromatogram (XIC) following the incubation of NLP-8₉₂₋₁₃₇ in S9 fraction produced from *C. elegans* homogenates. Again, many expected peptide fragments were observed, including fragments from cleavage at C-terminal (i.e. EGL-3) and N-terminal (i.e. CPL-1) of basic amino acid doublets. A list of the most abundant peptide fragments is presented in Table 2. The observed mass accuracy observed was between -0.67 – 1.4 ppm for all detected peptide fragments. Figure 5 the comparison of the relative abundances for each peptide fragment detected after 5-minute incubation. Interestingly, the two most abundant peptide based on ion abundance were NLP-8₉₂₋₉₉ and NLP₁₀₀₋₁₁₂. As shown in Figure 5B, these results may suggest that C-terminal by EGL-3 is favored. Other peptide fragment detected were in similar abundance. In mammals, it is well established that the subtilisin-like protease pathway implicates the proprotein convertases PC1 and PC2 cleaving at the C-terminal side of basic amino acid doublets resulted in peptide fragments with basic residue extensions located at the C-terminal that are removed by carboxypeptidase E [6,7]. Interestingly, EGL-3 proprotein convertase and EGL-21 carboxypeptidase orthologs appears to participate in a similar pathway for the biosynthesis of active neuropeptides. Moreover, the cysteine proteases cathepsin L (i.e. CPL-1) also functions as a processing enzyme for the production of neuropeptides. Cathepsin L cleave at the N-terminal of dibasic residue sites. In addition to cathepsin L, an aminopeptidase (i.e. pam-1) is required to remove N-terminal basic residues to generate bioactive neuropeptides. The results presented in this manuscript outline that both of these pathways play a role in the maturation of pro-neuropeptides to bioactive neuropeptides in *C. elegans* but the favored pathway is most likely structure dependent.

3.2 Relative quantification of mature neuropeptides in *egl-3* mutant strains

Endogenous neuropeptides were extracted from *C.elegans* and analyzed by MS. Specific XIC for FLP-21, NLP-8₁₀₀₋₁₁₂ and NLP-8₁₁₇₋₁₂₉ are presented in Figure 6a, 6b and 6c, respectively. XIC's were generated using the theoretical mass value with a ± 5 ppm extraction window. All

3 mature neuropeptides were detected in wildtype (N2), *egl-3* (MT1541) and *egl-3* (VC461) animals. When comparing XIC's for wildtype (N2) and *egl-3* mutants, we detect a significant decrease in the quantity of mature neuropeptides in *egl-3* mutants. The peptide identity was confirmed using high-resolution MS² spectra and known fragmentation scheme [30]. as shown in Figure 6d, 6e and 6f, typical a, b, c and x, y, z positive ion fragments were observed. The observed Higher-energy collisional dissociation (HCD) spectra were all compatible with the neuropeptide sequences.

The relative peptide quantification was based on a label free approach well described in the proteomic literature [34,35]. Peak areas based on MS¹ XIC's were compared between samples and relative peptide concentrations were determined based on the ratio of the mean area of the wildtype (N2) group. Technical triplicate precision assessment was performed, and all groups provided %CV < 10%. A significant difference in targeted neuropeptide concentration between wildtype (N2) and *elg-3* mutants was observed and presented in Figure 7. FLP-21₅₇₋₆₅, NLP-8₁₀₀₋₁₁₂ and NLP-8₁₁₇₋₁₂₉ peptide concentrations were significantly impaired in *elg-3* mutants. These results are coherent with the results generated with the synthetic surrogate FLP-21 and NLP-8 related peptides. We still can detect mature neuropeptides suggesting they are synthesized by the cysteine proteases cathepsin L (i.e. CPL-1) pathway. However, the results show this pathway does not compensate for the loss of EGL-3. Furthermore, the *in vivo* results may suggest the CPL-1 pathway is less important compared with the EGL-3 proprotein convertase pathway. The results with *elg-3* mutants also indicate these nematodes will have hampered synaptic chemical communication, particularly with specific interneurons (i.e. RMG) leading to a deficit in nocifensive response [19]. In *C. elegans*, modulation in nocifensive behavior is intimately associated to specific altered activity during synaptic communication. The pharmacological manipulation of EGL-3 could be investigated as a strategy to modulate nociceptive behavior for a better understanding of the underlying molecular mechanisms

governing nociceptive responses, and, can be used as a model to develop new pain therapeutic strategies.

4. Conclusion

We provide evidence that proteolysis controls FLP-21 and NLP-8 related neuropeptide levels in *C. elegans*. Surrogate peptides were degraded rapidly when exposed to *C. elegans* S9 fractions leading to the formation of specific peptide fragments related to EGL-3 and CPL-1 pathway. EGL-3 pro-protein convertase is an essential enzyme for the maturation of pro-neuropeptides to active neuropeptides in *C. elegans*. CPL-1 pathway does not compensate for the loss of the EGL-3 pathway. Proteolysis of Pro neuropeptides associated to FLP-21 and NLP-8 in *elg-3* mutants are severely hindered leading to a lack of mature bioactive neuropeptides. Pharmacological manipulations of pro-protein convertases could be an interesting strategy to alter sensitivity threshold in higher species.

5. Acknowledgements

This project was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry discovery grant no. RGPIN-2015-05071). The mass spectrometry analyses were performed using an infrastructure funded by the Canadian Foundation for Innovation (CFI) and the *Fonds de Recherche du Québec (FRQ)*, Government of Quebec (F.Beaudry CFI John R. Evans Leaders grant no. 36706). A PhD scholarship was awarded to J. Ben Salem with a grant obtained from *Fondation de France* (DN Arvanitis grant no. RAF18002BBA)

References

- 1- Hook, V., Brennand, K. J., Kim, Y., Toneff, T., Funkelstein, L., Lee, K. C., ... & Gage, F. H. (2014). Human iPSC neurons display activity-dependent neurotransmitter secretion: Aberrant catecholamine levels in schizophrenia neurons. *Stem cell reports*, 3(4), 531-538.
- 2- Rouillé, Y., Duguay, S. J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., ... & Steiner, D. F. (1995). Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Frontiers in neuroendocrinology*, 16(4), 322-361.
- 3- Seidah, N. G., Day, R., Marcinkiewicz, M., & Chretien, M. (1998). Precursor Convertases: An Evolutionary Ancient, Cell-Specific, Combinatorial Mechanism Yielding Diverse Bioactive Peptides and Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 839(1), 9-24.
- 4- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York. Garland Science.
- 5- Steiner, D.F., Smeekens, S.P., Ohagi, S. and Chan, S.J. (1992) The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J. Biol. Chem.*, 267, 23435–23438.
- 6- Hook, V., Funkelstein, L., Lu, D., Bark, S., Wegrzyn, J., & Hwang, S. R. (2008). Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 48, 393.
- 7- Hook, V. Y. (2006). Protease pathways in peptide neurotransmission and neurodegenerative diseases. *Cellular and molecular neurobiology*, 26(4-6), 447-467.
- 8- Seidah, N., & Prat, A. (2002). Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem*, 38, 79-94.
- 9- Scamuffa, N., Calvo, F., Chrétien, M., Seidah, N. G., & Khatib, A. M. (2006). Proprotein convertases: lessons from knockouts. *The FASEB Journal*, 20(12), 1954-1963.
- 10- Hwang, S. R., O'Neill, A., Bark, S., Foulon, T., & Hook, V. (2007). Secretory vesicle aminopeptidase B related to neuropeptide processing: molecular identification and subcellular localization to enkephalin- and NPY-containing chromaffin granules. *Journal of neurochemistry*, 100(5), 1340-1350.
- 11- Zhang, X., Pan, H., Peng, B., Steiner, D. F., Pintar, J. E., & Fricker, L. D. (2010). Neuropeptidomic analysis establishes a major role for prohormone convertase-2 in neuropeptide biosynthesis. *Journal of neurochemistry*, 112(5), 1168-1179
- 12- Minokadeh, A., Funkelstein, L., Toneff, T., Hwang, S. R., Beinfeld, M., Reinheckel, T., & Hook, V. (2010). Cathepsin L participates in dynorphin production in brain cortex, illustrated by protease gene knockout and expression. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 43(1), 98-107.

- 13- Saidi, M., Kamali, S., Ruiz, A. O., & Beaudry, F. (2015). Tachykinins Processing is Significantly Impaired in PC1 and PC2 Mutant Mouse Spinal Cord S9 Fractions. *Neurochemical research*, 40(11), 2304-2316.
- 14- Salem, JB, Nkambeu, B & Beaudry, F. (2018). Characterization of neuropeptide K processing in rat spinal cord S9 fractions using high-resolution quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 32(6):e4204.
- 15- Orduna Ruiz, A & Beaudry, F (2016), Characterization of Endoproteolytic Processing of Dynorphins by Proprotein Convertases using Mouse Spinal Cord S9 Fractions and Mass Spectrometry, *Neuropeptides*, 57:85-94
- 16- Mills, H., Wragg, R., Haplak, V., Castelletto, M., Zahratka, J., Harris, G., Summers, P., Korchnak, A., Law, W., Bamber, B., Komuniecki, R., 2012. Monoamines and neuropeptides interact to inhibit aversive behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 31(3), 667–678.
- 17- Li, C., (2005). The ever-expanding neuropeptide gene families in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology* 131, Suppl:S109–127.
- 18- Hu, Z., Pym E.C.G., Babu. K., Vashlishan-Murray A.B., and Kaplan J.M., (2011). A neuropeptide-mediated stretch response links muscle contraction to changes in neurotransmitter release. *Neuron* 71, 92–102.
- 19- Glauser, D.A., Chen, W.C., Agin, R., MacInnis, B., Hellman, A.B., Garrity, P.A., Man-WahTan, and Goodman, M.B., (2011). Heat avoidance is regulated by Transient Receptor Potential (TRP) channels and a neuropeptide signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics Society of America*, 188 : 91-103.
- 20- Komuniecki, R., Harris, G., Haplak, V., (2012). Monoamines activate neuropeptide signaling cascades to modulate nociception in *C. elegans*: a useful model for the modulation of chronic pain? *InvertebrateNeuroscience* 12, 53-61.
- 21- Kass, J., Jacob, T.C., Kim, P., Kaplan J.M., 2001. The EGL-3 pro-protein convertase regulates mechanosensory responses of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 21(23), 9265-9672.
- 22- Choi, S., Chatzigeorgiou, M., Taylor, K.P., Schafer, W.R., and Kaplan, J.M., (2013). Analysis of NPR-1 Reveals a Circuit Mechanism for Behavioral Quiescence in *C. elegans*. *Neuron* 78(5), 869–880.
- 23- Husson, SJ, Clynen, E, Baggerman, G, Janssen, T & Schoofs, L.(2006) Defective processing of neuropeptide precursors in *Caenorhabditis elegans* lacking proprotein convertase 2 (KPC-2/EGL-3): mutant analysis by mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry*. 98(6):1999-2012.
- 24- Husson, SJ, Janssen, T, Baggerman, G, Bogert, B, Kahn-Kirby, AH, Ashrafi, K & Schoofs L. (2007). Impaired processing of FLP and NLP peptides in carboxypeptidase E (EGL-21)-deficient *Caenorhabditis elegans* as analyzed by mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry*. 102(1):246-260.

- 25- Wittenburg, N., and Baumeister, R., (1999). Thermal avoidance in *Caenorhabditis elegans*: An approach to the study of nociception. PNAS 96(18), 10477-10482.
- 26- Schechter, I & Berger, A (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. Biochem Biophys Res Commun. 27(2):157-162.
- 27- Schechter, I & Berger, A (1968). On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. Biochem Biophys Res Commun. 32(5):898-902
- 28- Brenner, S., (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 77, 71–94.
- 29- Margie, O., Palmer, C., Chin-Sang, I., (2013). C. elegans Chemotaxis Assay. J. Vis. Exp. 74, 1-6.
- 30- Roepstorff, P., & Fohlman, J., (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomed Mass Spectrom 11(11), 601.
- 31- Bousquet-Moore, D, Mains, RE & Eipper, BA (2010). PAM and Copper – a Gene/Nutrient Interaction Critical to Nervous System Function. J Neurosci Res. 88(12): 2535–2545.
- 32- Metaxakis A, Petratos D & Tavernarakis N. (2018). Multimodal sensory processing in *Caenorhabditis elegans*. Open Biol. 8(6)
- 33- Ma L, Zhao Y, Chen Y, Cheng B, Peng A & Huang K. (2018). *Caenorhabditis elegans* as a model system for target identification and drug screening against neurodegenerative diseases. Eur J Pharmacol. 819:169-180
- 34- Blein-Nicolas, M., and Zivy, M., 2016. Thousand and one ways to quantify and compare protein abundances in label-free bottom-up proteomics. Biochim. Biophys. Acta. 1864(8), 883-895.
- 35- Neilson, K.A., Ali, N.A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Lee, A., Van Sluyter, S.C., Haynes, P.A., 2011. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. Proteomics 11, 535-553.

Table 1. Principal peptide fragments observed following the incubation of FLP-21₄₃₋₆₆ surrogate peptide in *C. elegans* S9 fractions.

Peptide	Sequence	Charge state z	Theoretical mass	Observed mass	Relative error (ppm)
FLP-21 ₄₃₋₆₆	VYYVAEDDHGSMKRGLGPRPLRFG	+5	544.8803	544.8812	1.65
FLP-21 ₄₃₋₅₄	VYYVAEDDHGSM	+2	693.2875	693.2871	-0.58
FLP-21 ₅₇₋₆₆	GLGPRPLRFG	+2	535.3169	535.3168	-0.19
FLP-21 ₅₇₋₆₅	GLGPRPLRF	+2	506.8062	506.8064	0.40
	GLGPRPLRF(NH ₂)	+2	506.3142	506.3145	0.59
FLP-21 ₅₅₋₆₆	KRGLGPRPLRFG	+2	677.4149	677.4148	-0.15
FLP-21 ₅₆₋₆₆	RGLGPRPLRFG	+2	613.3675	613.3673	-0.33

Table 2. Principal peptide fragments observed following the incubation of NLP-892-137 surrogate peptide in *C. elegans* S9 fractions.

Peptide	Sequence	Charge state z	Theoretical mass	Observed mass	Relative error (ppm)
NLP-892-137	FMSVPTKKAFDRMDNSDF	+9	591.9641	591.9649	1.35
	FGAKRKRFSFDRMGGTEFG	+8	665.8337	665.8338	0.15
	LMKRSAPESR	+7	760.8089	760.8086	-0.39
NLP-892-112	FMSVPTKKAFDRMDNSDF FGA	+4	603.5344	603.5342	-0.33
NLP-892-99	FMSVPTKK	+2	469.2624	469.2624	0.0
NLP-892-97	FMSVPT	+1	681.3276	681.3273	-0.44
NLP-898-112	KKAFDRMDNSDFFGA	+3	583.6069	583.6067	-0.34
NLP-8100-114	AFDRMDNSDFFGAKR	+3	592.9423	592.9420	-0.51
NLP-8100-112	AFDRMDNSDFFGA	+2	746.8117	746.8112	-0.67
NLP-8115-129	KRSFDRMGGTEFGLM	+3	577.9484	577.9482	-0.35
NLP-8117-131	SFDRMGGTEFGLMKR	+3	577.9484	577.9481	-0.52
NLP-8117-129	SFDRMGGTEFGLM	+2	724.3209	724.3206	-0.41

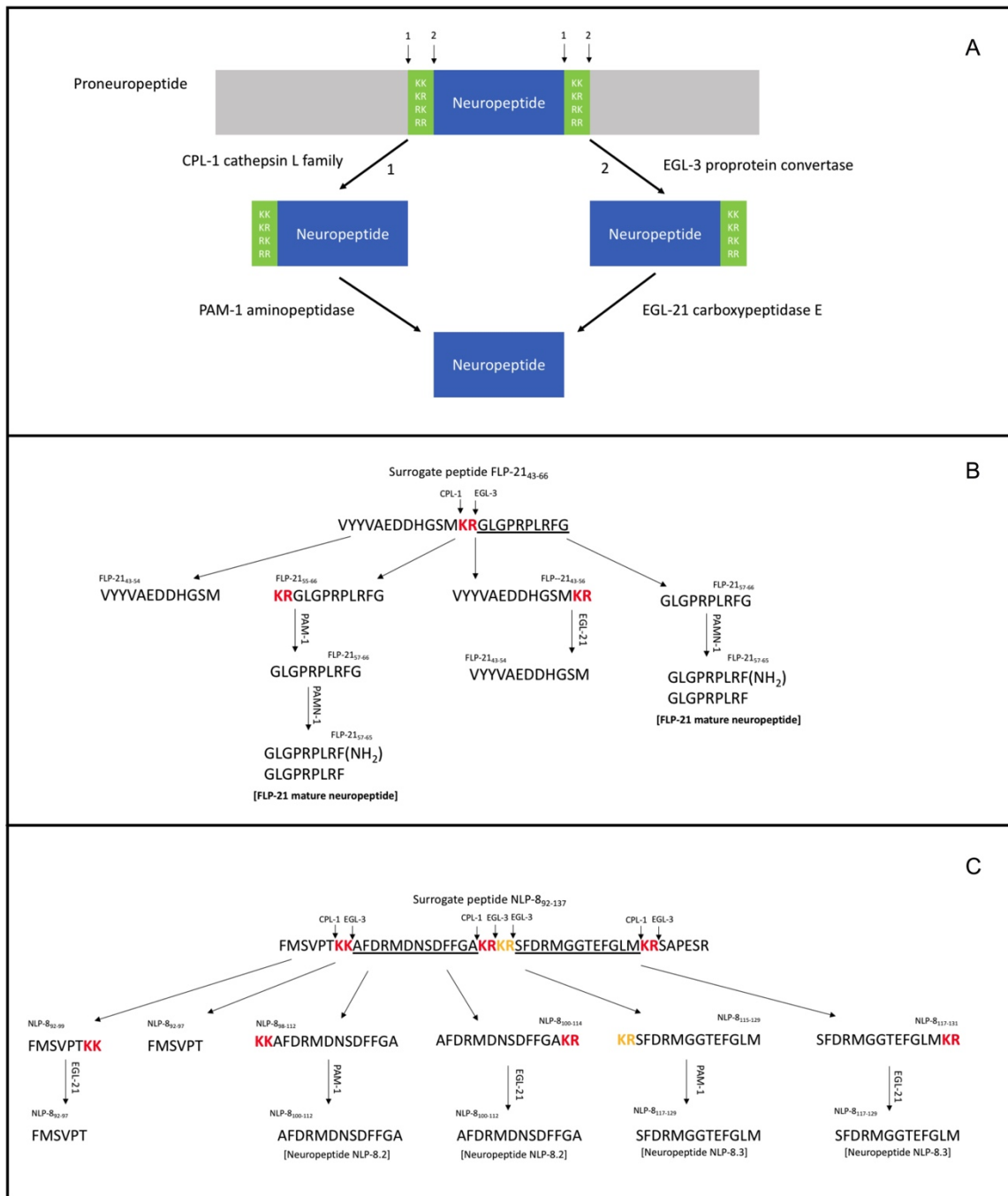


Figure 1. Neuropeptide processing by proprotein convertases (EGL-3) and carboxypeptidase E (EGL-21). Most proneuropeptides have several paired basic amino acid cleavage sites and based on the sequence, various processing intermediates can be derived leading to mature neuropeptide. A) Generalize protease pathways for proneuropeptide processing in *C. elegans* (adapted from Hook *et al.*, 2008). B) FLP-21 processing by proprotein convertases EGL-3 leading to active FLP-21 neuropeptide. C) NLP-8 processing by proprotein convertases EGL-3 and carboxypeptidase E EGL-21 leading to several actives neuropeptides. Identification of surrogate peptides used for further *in vitro* exploration was based on subsite nomenclature adopted from a scheme developed by Schechter and Berger [1967, 1968] and used to describe of enzyme specificities.

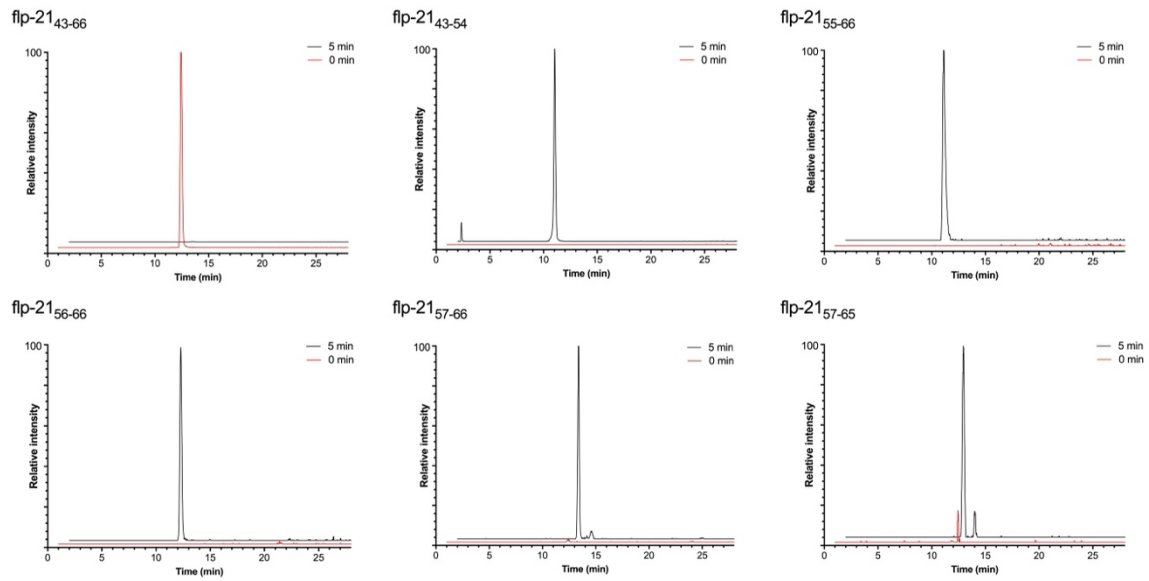


Figure 2. Specific extracted-ion chromatograms (XIC) for the most abundant fragment peptides following the incubation of FLP-21₄₃₋₆₆ in *C.elegans* S9 fractions. XIC's were generated using the theoretical mass value with a ± 5 ppm extraction window. Overlay XIC's of time 0 (red) and time 5 min (black) revealed the apparition of specific peptide fragments.

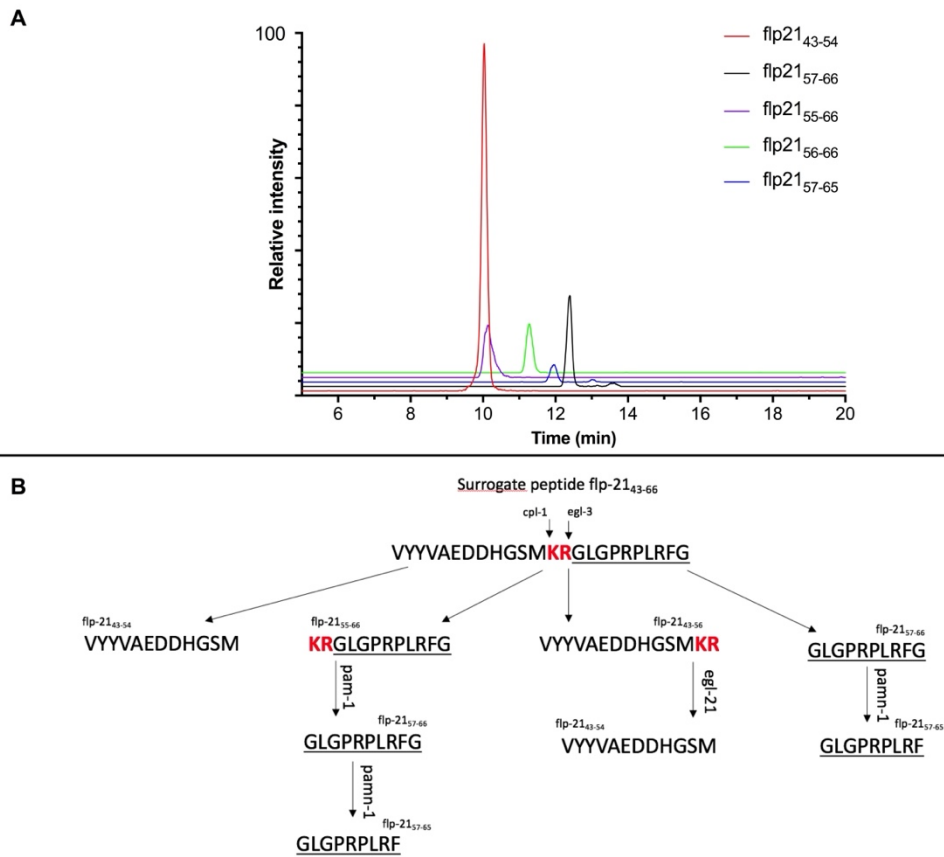


Figure 3. Relative abundance of FLP-21 related neuropeptides. A) Overlay MS¹ XIC's suggest protease activity from *egl-3* and *cpl-1* leading to the formation of FLP-21₅₅₋₆₆ and FLP-21₅₇₋₆₆. B) Both pathways were involved in the degradation of FLP-21₄₃₋₆₆

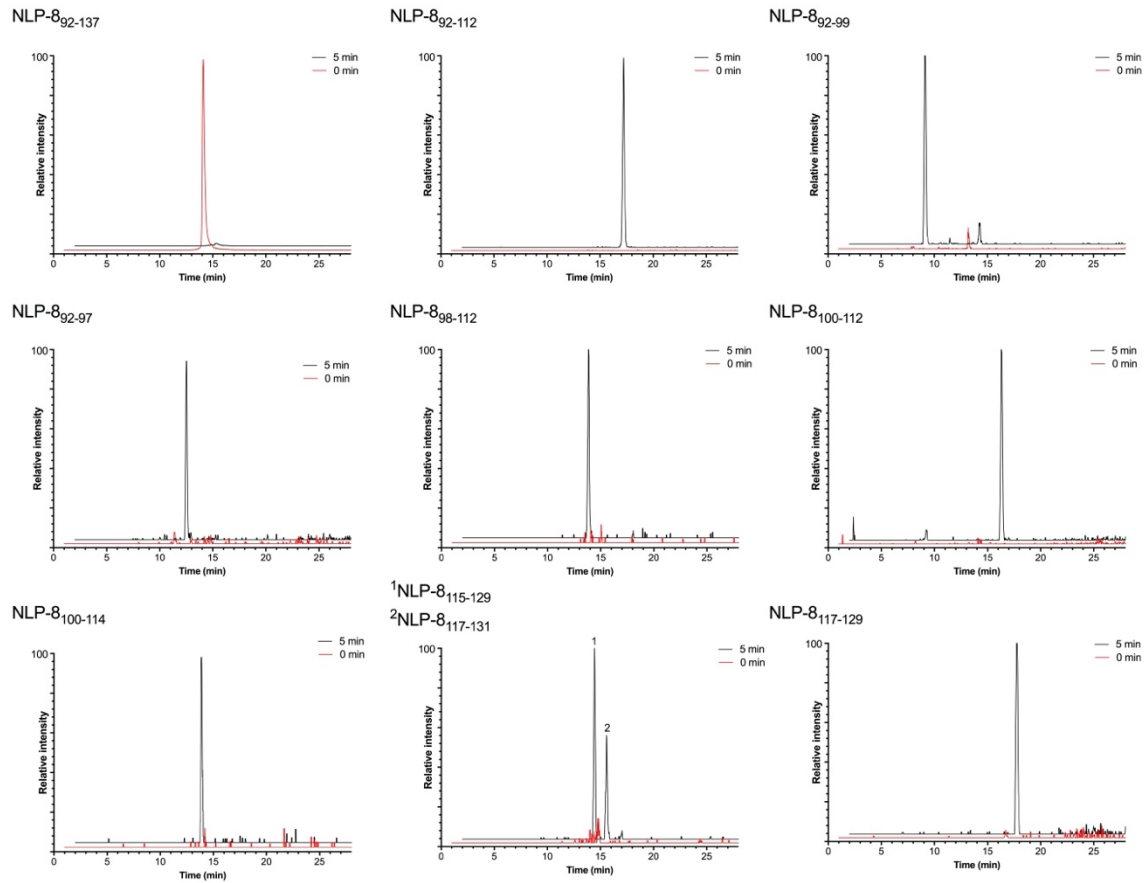


Figure 4. Specific extracted-ion chromatograms (XIC) for the most abundant fragment peptides following the incubation of NLP-8₉₂₋₁₃₇ in *C.elegans* S9 fractions. XIC's were generated using the theoretical mass value with a ± 5 ppm extraction window. Overlay XIC's of time 0 (red) and time 5 min (black) revealed the apparition of specific peptide fragments.

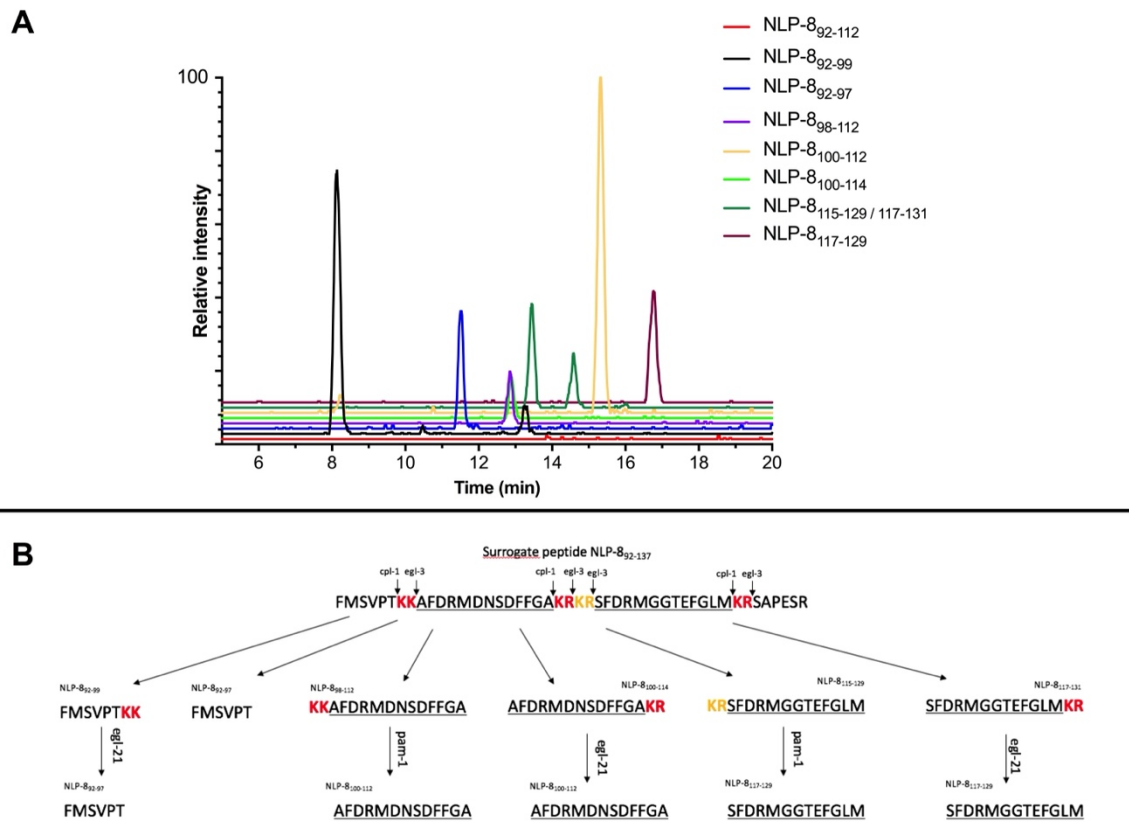


Figure 5. Relative abundance of NLP-8 related neuropeptides. A) Overlay MS¹ XIC's suggest protease activity from *egl-3* and *cpl-1* leading to the formation of NLP-8₉₈₋₁₁₂, NLP-8₁₁₅₋₁₂₉ and NLP-8₁₀₀₋₁₁₂, NLP-8₁₁₇₋₁₂₉. B) These results support that both pathways were involved in the degradation of NLP-8₉₂₋₁₃₇

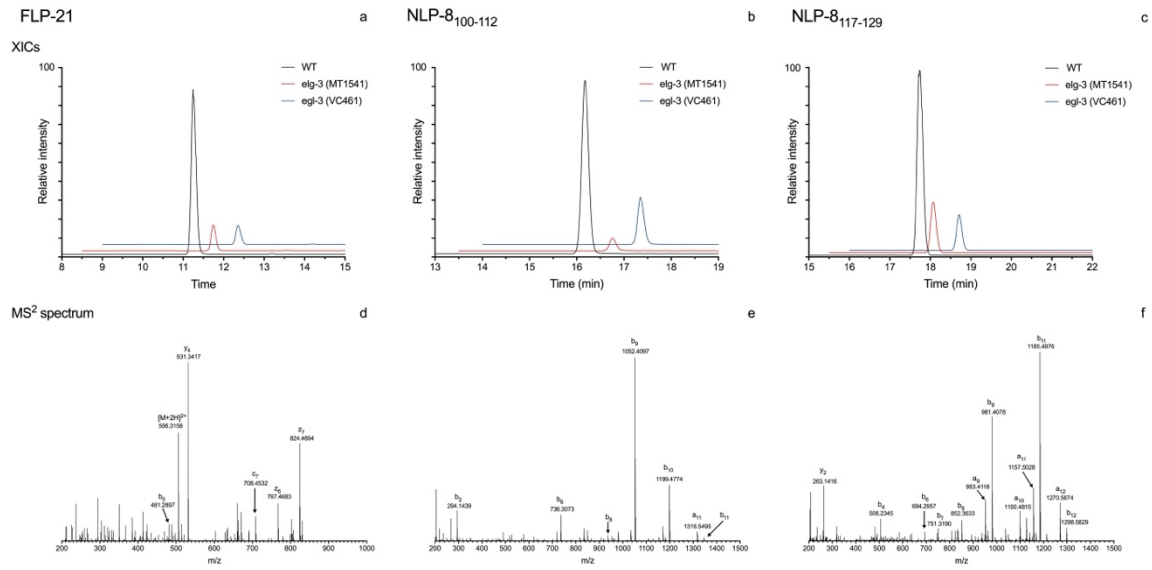
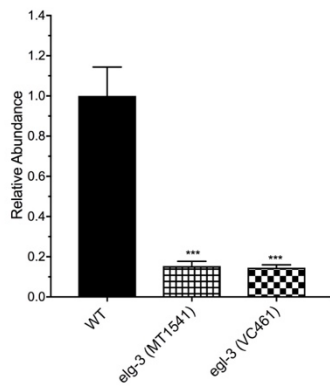
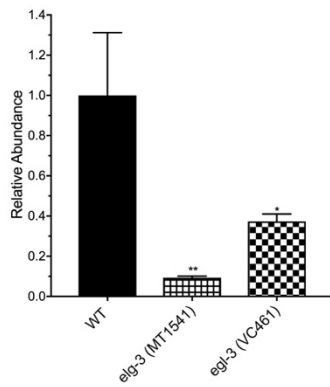


Figure 6. Specific extracted-ion chromatograms (XIC) for FLP-21, NLP-8₁₀₀₋₁₁₂ and NLP-8₁₁₇₋₁₂₉ obtained following the analysis of extracted peptide from *C. elegans* homogenates. XIC's were generated using the theoretical mass value with a ± 5 ppm extraction window. Overlay XIC's of wildtype (N2) (black) and *egl-3* (red and blue) revealed a significant decrease in mature neuropeptides. High-Resolution MS² Spectra were used to confirm peptide identity.

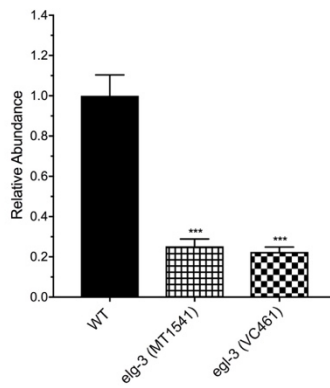
FLP-21



NLP-8₁₀₀₋₁₁₂



NLP-8₁₁₇₋₁₂₉



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Figure 7. Relative concentration of FLP-21, NLP-8₁₀₀₋₁₁₂ and NLP₁₁₇₋₁₂₉. Peak areas were compared based on MS1 XIC's. The concentration of mature neuropeptides is severely impeded in both *egl-3* mutants.

Article 2 : Resiniferatoxin hampers the nocifensive response of *Caenorhabditis elegans* to noxious heat, and pathway analysis revealed that the Wnt signaling pathway is involved

Neurochemical Research, Mars 2022, doi: 10.1007/s11064-021-03471-2.

Jennifer Ben Salem^{1,2,3}, Bruno Nkambeu^{1,2}, Dina N Arvanitis³ and Francis Beaudry^{*1,2}

¹ Groupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

² Centre de recherche sur le cerveau et l'apprentissage (CIRCA), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³ Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM UMR1297, Université de Toulouse, France

*Corresponding author:

Francis Beaudry, Ph.D.
Professor of Analytical Pharmacology
Département de Biomédecine Vétérinaire
Faculté de Médecine Vétérinaire
Université de Montréal
3200 Sicotte
Saint-Hyacinthe, QC
Canada J2S 2M2

Email: francis.beaudry@umontreal.ca

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, Transient receptor potential channels, Proteomics, Mass spectrometry, Resiniferatoxin, Nociception, Wnt signaling pathway

Abstract

Resiniferatoxin (RTX) is a metabolite extracted from *Euphorbia resinifera*. RTX is a potent capsaicin analog with specific biological activities resulting from its agonist activity with the transient receptor potential channel vanilloid subfamily member 1 (TRPV1). RTX has been examined as a pain reliever, and more recently, investigated for its ability to desensitize cardiac sensory fibers expressing TRPV1 to improve chronic heart failure (CHF) outcomes using validated animal models. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) expresses orthologs of vanilloid receptors activated by capsaicin, producing antinociceptive effects. Thus, we used *C. elegans* to characterize the antinociceptive properties and performed proteomic profiling to uncover specific signaling networks. After exposure to RTX, wild-type (N2) and mutant *C. elegans* were placed on petri dishes divided into quadrants for heat stimulation. The thermal avoidance index was used to phenotype each tested *C. elegans* experimental group. The data revealed for the first time that RTX can hamper the nocifensive response of *C. elegans* to noxious heat (32°C – 35°C). The effect was reversed 6 h after RTX exposure. Additionally, we identified the RTX target, the *C. elegans* transient receptor potential channel OCR-3. The proteomics and pathway enrichment analysis results suggest that Wnt signaling is triggered by the agonistic effects of RTX on *C. elegans* vanilloid receptors.

Introduction

Resiniferatoxin (RTX) is a capsaicin analog originating from a *Euphorbia* species (*Euphorbia resinifera*) that targets the transient receptor potential channel vanilloid subfamily member 1 (TRPV1) and is several-fold more pungent than capsaicin [1]. The TRPV1 is a multisensory receptor involved in injury signaling and can be activated by various mediators including vanilloids (e.g. capsaicin, eugenol), RTX, noxious heat (> 43°C), acids (H⁺), and various lipids. One major pain relief strategy that has been tested in recent years includes pharmacological

manipulation of TRPV1 [2-6]. However, TRPV1 activation by high doses of certain vanilloids can lead to necrosis and apoptosis [7]. RTX has been tested for chronic pain management [8] and cancer pain [9]. The activation of TRPV1 leading to an increase in the intracellular Ca^{2+} are key elements associated with the activation and sensitization of cardiac nociceptors. Thus, RTX was used to perform cardiac sympathetic afferent denervation, and the results showed that it reduces cardiac remodeling and improves cardiovascular function in a validated rat model of heart failure [10]. Chemical denervation results from the agonistic effects of RTX on TRPV1, producing an intense pungent effect and leading to cell death. Other cardiovascular benefits were observed, including a reduction in ventricular arrhythmias [11] and the lowering diastolic blood pressure [12]. Recently, we demonstrated that cardiac sensory afferent denervation by RTX during myocardial infarction could modulate long-term susceptibility to anxiodepressive behavior using a validated mouse model of chronic heart failure [13]. Treatment with RTX triggered the desensitization of cardiac afferents and hampered the anxiodepressive-like state in mice. Depression and anxiety are widely observed in patients suffering chronic heart failure [14]. Additionally, we found unique protein profiles and regulatory pathways in the frontal cortices that are associated with the response to stresses originating from the heart [13]. RTX treatment produces unique brain signaling patterns that require further characterization. To extend our knowledge, we intend to use a model organism for which a large proportion of its genes have functional counterparts in mammals, which therefore makes these models exceptionally useful to study biological processes and diseases in mammals, including humans [15].

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) is a very interesting model organism, particularly in the context of functional genomics relevant to mammalian and human biology and diseases [15-17]. *C. elegans* genome sequencing was completed in 1998 and is publicly available and well annotated. This is a significant benefit of proteomics, as it enables the interpretation of

functionally grouped gene ontology (GO) and pathway annotation networks [18]. There are roughly ~21,000 predicted protein-coding genes in *C. elegans*. Notably, many of these genes are shared with mammals, including humans [19, 20]. *C. elegans* adults consist of 959 cells, of which 302 are neurons, making this model a valuable model organism to study the nervous system [21]. Thus, *C. elegans* is particularly useful to study nociception, as the animal displays well-defined and reproducible nocifensive behavior involving a reversal and change in direction away from noxious stimuli. In mammals, important molecular transducers of noxious stimuli include ligand-gated (e.g., TRPV1, TRPA1) and voltage-gated (Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9) ion channels [22]. Following *C. elegans* genome sequencing, several genes encoding TRP ion channels with important sequence homologies to mammalian TRP channels, including TRPVs, were identified [23]. More specifically, five TRPV orthologs (e.g., OSM-9, OCR-1, OCR-2, OCR-3 and OCR-4) were discovered and studied [24]. Furthermore, several studies have shown that *C. elegans* TRPV orthologs are associated with behavioral and physiological processes, including sensory transduction [2, 3, 25, 26]. Additionally, it was determined that *C. elegans* TRPV channels share similar activation and regulatory mechanisms with higher species, including mammals. Interestingly, our recent paper revealed that capsaicin can impede the nocifensive response of *C. elegans* to noxious heat (i.e., 32°C – 35°C) following sustained exposure, and this effect was reversed 6 h after capsaicin exposure [2]. Furthermore, data suggest that capsaicin targets the *C. elegans* transient receptor potential ion channel OCR-2. Additional experiments indicated that other capsaicin analogs have antinociceptive effects, including olvanil, gingerol, shogaol and curcumin, as well as for other vanilloids, including eugenol, vanillin and zingerone [3]. Thus, known TRPV ligands that target *C. elegans* vanilloid receptors and produce antinociceptive effects compatible with previous studies were performed using animal models of pain.

Our hypothesis is that RTX will interact with TRPV ortholog channels in *C. elegans* in a manner similar to that of capsaicin, and sustained exposure to RTX will hamper the nocifensive response of *C. elegans* to noxious heat. The objective of this study was to 1) characterize the RTX exposure–response relationships using *C. elegans* and heat avoidance behavior analysis [27] and 2) perform proteomics to identify the proteins and pathways responsible for the induced phenotype.

Materials and methods

Chemicals and reagents

All chemicals and reagents were obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA) or Millipore Sigma (St. Louis, MO, USA). Capsaicin was purchased from Toronto Research Chemicals (North York, ON, CAN). RTX was obtained from Tocris Bioscience (Rennes, France).

***C. elegans* strains**

The N2 (Bristol) isolate of *C. elegans* was used as a reference strain. The mutant strains used in this study included *ocr-1* (ak46), *ocr-2* (yz5), *ocr-3* (ok1559), *ocr-4* (vs137) and *osm-9* (yz6). N2 (Bristol) and other strains were obtained from the Caenorhabditis Genetics Center (CGC), University of Minnesota (Minneapolis, MN, USA). Strains were maintained and manipulated under standard conditions as previously described [28, 29]. Nematodes were grown and kept on nematode growth medium (NGM) agar at 22°C in a Thermo Scientific Heratherm refrigerated incubator (Fair Lawn, NJ, USA). Analyses were executed at room temperature (~22°C) unless otherwise noted.

***C. elegans* pharmacological manipulations**

Capsaicin or RTX was dissolved in Type 1 Ultrapure Water at a concentration of 25 µM. The solutions were warmed for brief periods combined with vortexing and sonication for several minutes to completely dissolve the compounds. Further dilutions to concentrations of 5 µM, 1

μM and $0.1 \mu\text{M}$ in Type 1 Ultrapure Water were performed by serial dilution of the RTX stock solution. *C. elegans* was isolated and washed according to the protocol outlined by Margie *et al.* [29]. After 72 h of feeding and growing on 92×16 mm petri dishes with NGM, the nematodes were denied food and exposed to capsaicin or RTX solutions. An aliquot of 7 mL of a capsaicin or RTX solution was added to produce a 2-3 mm solution film (the solution was partly absorbed by NGM); consequently, the nematodes swam in solution. *C. elegans* was exposed to capsaicin or RTX for 60 min and isolated and washed thoroughly prior to the behavioral experiments. For the residual effect (i.e., 6 h latency) evaluation, after exposure to the RTX solutions, the nematodes were isolated, carefully washed and deposited on NGM free of RTX for 6 h prior to testing.

Thermal avoidance assays

The method we proposed in this manuscript for the evaluation of thermal avoidance was modified from the four quadrant strategy previously described [27] and used in previous successfully published work [2, 3]. Briefly, experiments were performed on 92×16 mm petri dishes divided into four quadrants. A middle circle delimited (i.e., 1 cm diameter) an area where *C. elegans* were not considered. Petri dishes were divided into quadrants: two stimulus areas (A and D) and two control areas (B and C). Sodium azide (0.5 M) was used in all quadrants to paralyze the nematodes. Noxious heat was created with an electronically heated metal tip (0.8 mm in diameter) producing a radial temperature gradient (e.g., $32\text{-}35^\circ\text{C}$ on NGM agar 2 mm from the tip measured with an infrared thermometer). Nematodes were isolated and washed according to a protocol outlined by Margie *et al.* [29]. The nematodes tested were denied food during all experimentations. The nematodes (typically 100 to 1,000 young adult nematodes) were placed at the center of a marked petri dish, and after 30 min, the plates were placed at 4°C for at least 1 h, and the number of nematodes per quadrant were counted. Nematodes that did not cross the inner circle were not considered. The thermal avoidance index (TI) was calculated

as shown in equation 1.

$$TI = \frac{[(A + D) - (B + C)]}{(A + B + C + D)}$$

Details are shown in supplementary Figure S1. Both the TI and the animal avoidance percentage were used to phenotype each tested *C. elegans* experimental group. The stimulus temperature used was based on previous experiments [30].

Proteomic analysis

Cultured nematodes (with or without RTX exposure) were collected in liquid media and centrifuged at 1,000 g for 10 min; the nematodes were then collected and thoroughly washed. Nematodes were resuspended in 8 M urea in 100 mM TRIS-HCl buffer (pH 8) containing cOmplete™ protease inhibitor cocktails (Roche Diagnostic Canada, Laval, QC, Canada) and aliquoted into reinforced 1.5 mL homogenizer tubes containing 500 µm glass bead homogenizer tubes with 25 mg of glass beads. The samples were homogenized using a Bead Mill Homogenizer (Fisher) with 3 bursts of 60 seconds at a speed of 5 m/s. The homogenates were centrifuged at 9,000 g for 10 min. The protein concentration for each homogenate was determined using a Bradford assay. Two hundred micrograms of protein was extracted using ice-cold acetone precipitation (1:5, v/v). The protein pellet was dissolved in 100 µL of 50 mM TRIS-HCl buffer (pH 8), and the solution was mixed with a Disruptor Genie at maximum speed (2,800 rpm) for 15 min and sonicated to improve the protein dissolution yield. The proteins were denatured by heating at 120°C for 10 min using a heated reaction block. The solution was allowed to cool 15 min. Proteins were reduced with 20 mM dithiothreitol (DTT), and the reaction was performed at 90°C for 15 min. Then, proteins were alkylated with 40 mM iodoacetamide (IAA protected from light at room temperature for 30 min. Then, 5 µg of proteomic-grade trypsin was added, and the reaction was performed at 37°C for 24 h. Protein digestion was quenched by adding 10 µL of a 1% trifluoroacetic acid (TFA) solution. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min, and 100 µL of the supernatant was transferred into

injection vials for analysis. The HPLC system was a Thermo Scientific Vanquish FLEX UHPLC system (San Jose, CA, USA). Chromatography was performed using gradient elution along with a Thermo Biobasic C18 microbore column (150 × 1 mm) with a particle size of 5 μm. The initial mobile phase conditions consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.1% formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 3 min, the ratio was maintained at 5:95. From 3 to 123 min, a linear gradient was applied up to a ratio of 40:60, which was maintained for 3 min. The mobile phase composition ratio was then reverted to the initial conditions, and the column was allowed to re-equilibrate for 30 min. The flow rate was fixed at 50 μL/min, and 5 μL of each sample was injected. A Thermo Scientific Q Exactive Plus Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA) was interfaced with the UHPLC system using a pneumatic-assisted heated electrospray ion source. Nitrogen was used as the sheath and auxiliary gases, which were set at 15 and 5 arbitrary units, respectively. The auxiliary gas was heated to 200°C. The heated ESI probe was set to 4000 V, and the ion transfer tube temperature was set to 300°C. Mass spectrometry (MS) detection was performed in positive ion mode operating in TOP-10 data dependent acquisition (DDA) mode. A DDA cycle entailed one MS¹ survey scan (m/z 400-1500) acquired at 70,000 resolution (FWHM) and precursor ions meeting the user-defined criteria for charge state (i.e., z = 2, 3 or 4), monoisotopic precursor intensity (dynamic acquisition of MS²-based TOP-10 most intense ions with a minimum 1×10⁴ intensity threshold). Precursor ions were isolated using the quadrupole (1.5 Da isolation width), activated by HCD (28 NCE) and fragment ions were detected in the ORBITRAP at a resolution of 17,500 (FWHM). Data were processed using Thermo Proteome Discoverer (version 2.4) in conjunction with SEQUEST using default settings unless otherwise specified. The identification of peptides and proteins with SEQUEST was performed based on the reference proteome extracted from UniProt (*C. elegans* taxon identifier 6239) as FASTA sequences. Parameters were set as follows: MS¹ tolerance of 10 ppm; MS² mass tolerance of 0.02 Da for

Orbitrap detection; enzyme specificity was set as trypsin with two missed cleavages allowed; carbamidomethylation of cysteine was set as a fixed modification; and oxidation of methionine was set as a variable modification. The minimum peptide length was set to six amino acids. Data sets were further analyzed with Percolator. Peptide-spectrum matches (PSMs) and protein identification were filtered at a 1% false discovery rate (FDR) threshold. For protein quantification and comparative analysis, we used the peak integration feature of Proteome Discoverer 2.4 software. For each identified protein, the average ion intensity of the unique peptides was used for protein abundance.

Bioinformatics

Abundance Ratio (\log_2): (experimental group)/(N2 control), Abundance Ratio P-Value: (experimental group)/(N2 control) and Accession columns were extracted from the datasets generated by Proteome Discoverer. Volcano plots were generated using all identified and quantified proteins with both a \log_2 ratio and p-value. Proteins without a p-value or with a p-value > 0.01 were not used for further functional analysis. Additionally, only proteins with an absolute \log_2 ratio ≥ 1.0 were used for bioinformatics analysis. Gene Ontology analysis of genes (i.e., GO terms) was performed using Metascape [31], where two sets of proteins (e.g., Ensembl gene codes) were used: proteins with a \log_2 ratio ≥ 1.0 (i.e., upregulated) and proteins with a \log_2 ratio ≤ -1.0 (downregulated). The results from the upregulated and downregulated protein analyses were used to create bar plots in PRISM using the Metascape reports with the $-\log_{10}$ p-value of GO process matches given by Metascape. Further pathway analysis was performed using ClueGO [32] and Cytoscape [33] using the KEGG and REACTOME pathway databases. Significant pathways for proteins with an absolute \log_2 ratio ≥ 1.0 were identified, comparing the ratio of target genes identified in each pathway to the total number of genes within the pathway. The statistical test used to determine the enrichment score for KEGG or REACTOME

pathways was based on a right-sided hypergeometric distribution with multiple testing correction (Benjamini & Hochberg (BH) method) [34].

Statistical analysis

Behavioral data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (e.g., WT (N2) was the control group) or ANOVA followed by a Tukey-Kramer multiple comparison test. Data presented in Figure 4C were analyzed using ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test for specific pairwise comparisons. Significance was set a priori to $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using PRISM (version 9.1.2).

Results and discussion

Recently, we demonstrated for the first time the antinociceptive effects of capsaicin in *C. elegans* following controlled and prolonged exposure [2]. Further analysis revealed that capsaicin targets OCR-2, one of the five vanilloid receptor orthologs (e.g., OSM-9, OCR-1, OCR-2, OCR-3 and OCR-4). Moreover, we have shown that other vanilloids, including eugenol, induce similar antinociceptive effects [3]. The thermal avoidance assay performed is described in supplementary Figure S1 and was specifically used to assess the antinociceptive effects of RTX. The first step was to verify whether there was bias in *C. elegans* behavior using the experimental setup. Thus, we performed an assessment of the mobility and bias of WT (N2) nematodes with and without exposure to RTX. As shown in Figure 1, no quadrant selection bias was observed for all *C. elegans* experimental groups tested with or without RTX exposure (e.g., 5, 1 and 0.1 μM). The data demonstrated that the nematodes did not select any specific quadrant and were uniformly distributed 30 min after the initial nematode deposition at the center of the petri dish. Sixty minutes of RTX exposure did not appear to affect nematode

mobility. In a previous study, we tested mutant nematodes *ocr-1*, *ocr-2*, *ocr-3*, *ocr-4* and *osm-9* [2, 3], and no bias was observed.

Prolonged stimulation with TRPV1 agonists elicits receptor desensitization, leading to the alleviation of pain (or antinociceptive effects in *C. elegans*) [4]. Consequently, we exposed *C. elegans* to RTX in solution for the complete control of time and exposure levels. As presented in Figure 2, the data revealed antinociceptive effects following a 1 h of exposure, which were, to a certain extent concentration-dependent. The antinociceptive effects of RTX were noted even at a very low concentration (0.1 μM), and RTX was found to be significantly more potent than capsaicin [2]. These observations are consistent with previously published *in vitro* and *in vivo* testing data [35, 36]. Following RTX exposure, the nematodes were carefully washed and transferred to NGM agar maintained at 22°C in an incubator for 6 h (i.e., residual effect/latency test). Then, the thermal avoidance response was retested. As shown in Figure 2, the results indicated that 6 h after exposure to RTX, the *C. elegans* thermal avoidance response returned to normal, confirming that no residual antinociceptive effects of RTX were observed after 6 h. These results were unexpected and are quite interesting since RTX is apoptotic [7, 8, 37] and the local application of RTX has been used for chemical denervation [13, 38]. The results suggest that RTX does not induce a long-lasting effect. Additionally, the results indicate that RTX does not induce significant damage to the sensory system at a concentration $\leq 5 \mu\text{M}$ and a 60-min exposure period.

The target of RTX needs to be identified to better understand the exposure–response relationship. Pharmacological effects can be measured when the tested molecule binds to a sufficient fraction of the target receptor, leading to a specific response (i.e., physiological or phenotypic changes). Accordingly, we conducted experiments using specific *C. elegans* mutants (*ocr-1*, *ocr-2*, *ocr-3*, *ocr-4* and *osm-9*) to potentially identify the RTX target receptors.

As revealed in Figure 3, all mutants appeared less sensitive to noxious heat than the WT (N2) group. However, they were still sensitive, which suggests redundancy in receptor function. These results are compatible with our previous findings [2, 3]. To identify targets, we used the concentration at which RTX maximum response was achieved, specifically 1 μ M as display in Figure 2. Thus, *C. elegans* mutants were exposed to RTX at a concentration of 1 μ M for 60 min prior to the behavioral experiments. Figure 3 shows that the RTX antinociceptive effects were quantifiable in the *ocr-1*, *ocr-2*, *ocr-4* and *osm-9* mutants. However, no significant RTX effects ($p > 0.05$) were observed with the *ocr-3* mutant, suggesting that RTX targets OCR-3, a mammalian vanilloid receptor-like channel. Some interactions between RTX and other vanilloid receptors may happen, most likely with lower specificity. These results were unexpected since our previous results clearly showed that capsaicin targets the OCR-2 receptor, not OCR-3 [2]. Additionally, we showed that other vanilloids target OCR-2 [3]. As shown by another study, heat avoidance is mediated by OSM-9 and OCR-2 in *C. elegans* [25]. The functions of OCR-3 are unknown, but it is coexpressed with OSM-9 [39]. There is no clear evidence that OCR-3 is activated by nociceptive heat, but it is predicted to enable ion channel activity and is classified as capsaicin receptor-related. Little is known about this vanilloid receptor, and further study is required to elucidate OCR-3 function in *C. elegans*.

Label-free proteomic investigations were performed on *C. elegans* exposed to 1 μ M RTX for 60 min. Figure 4 shows volcano plots illustrating the differential abundances of proteins, with the x-axis representing the \log_2 ratio and the y-axis plotting $-\log_{10}$ (P-value). The colored boxes represent a 2-fold change and p -value ≤ 0.05 . Several differentially expressed proteins (DEPs) were identified, including 157 upregulated and 305 downregulated proteins. Moreover, we extracted specific data related to vanilloid receptor proteins (i.e., OCR-1, OCR-2, OCR-3, OCR-4 and OSM-9) and the NPR-1 signaling pathway [25, 27]. Interestingly, OCR-1, OCR-2, OCR-3, OCR-4, OSM-9, FLP-18 and FLP-21 were significantly upregulated. Both FPL-18 and

FPL-21 are important neuropeptides that interact with NPR-1 and are involved in heat sensory processes [25, 27]. Vanilloid receptors are mainly heat thermosensors and calcium-selective channels. Upregulation of vanilloid receptors can increase neuron depolarization, leading to receptor desensitization and conformational changes. These are major mechanisms that lead to the alleviation of pain or antinociceptive effects in *C. elegans*.

Gene Ontology (GO) term enrichment analysis was performed using Metascape [31], and label-free proteomic results included all differentially expressed proteins (DEPs). The top enriched terms are shown in Figure 5A. GO annotation indicated that the differentially expressed proteins were mainly enriched in cellular energy processes, cellular component organization, biosynthesis of amino acids and peptide synthesis and metabolic processes. Moreover, cellular homeostasis is a process associated with ion homeostasis (Ca^{2+} , K^+ , Cl^- and others). This process is essential to maintain a steady state at the cellular level. RTX is a pungent TRPV1 ligand and activates inward currents due to calcium influx, resulting in cell depolarization. Calcium ion accumulation can provoke apoptosis, and this is the mechanism at the heart of chemical denervation using the agonistic effects of RTX on TRPV1 [10, 13]. Interestingly, apoptosis or cell death terms were not among the top enriched GO terms. This is certainly compatible with the behavior results showing that the nematodes completely recovered noxious heat sensitivity at 6 h after RTX exposure, as shown in Figure 2. Consequently, RTX did not provoke nociceptive neuronal death. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and REACTOME pathway analyses were performed using ClueGO including all DEPs [32]. The top pathway enrichments are revealed in Figure 5B. As expected, the results were compatible with the GO term enrichment results, with an important emphasis on cellular energy processes and metabolism. ClueGO identified all statistically enriched pathways, and cumulative hypergeometric p-values and enrichment factors were calculated and used for filtering. Selected significant pathways were clustered hierarchically into an interactome created based on Kappa-

statistical similarities among their genes (i.e., encoding protein) memberships. Subsequently, a kappa score of 0.8 was applied as the threshold to produce interactome and pathway clusters. The network analysis and interaction between the enriched KEGG and REACTOME pathways are shown in Figure 6. Interestingly, we observed an interaction between the cellular response to chemical stress, beta-catenin-independent Wnt signaling and ion homeostasis. This clearly suggests that these processes are associated with the pungent effects of RTX on the *C. elegans* vanilloid receptor, most likely OCR-3, as shown in Figure 3. The interaction with metabolic processes seems to suggest that they will trigger cellular energy processes involved in catabolism and anabolism reactions. Severe metabolic stress can lead to a state of cell survival, and notably, energy metabolism processes can rescue the cell from apoptosis. However, we were particularly interested in the beta-catenin-independent Wnt signaling pathway. Wnt signaling activates several different intracellular pathways essential to cell proliferation, differentiation, and polarity [40]. Moreover, in *C. elegans*, the Wnt signaling pathway regulates the subcellular positioning of presynaptic terminals and is therefore important for the assembly of synapses, a key component in the formation of neural circuits [41]. Dysfunction in key Wnt pathway components can lead to disorders including depression and anxiety [40, 42, 43]. This is consistent with our observation that RTX denervation of cardiac sensory afferents led to a significant reduction in depressive behavior in a mouse model of chronic heart failure [13]. During this study, we also demonstrated the importance of the Wnt signaling pathway. The noncanonical beta-catenin-independent Wnt pathway is linked with Ca²⁺ release from intracellular stores, and an increase in intracellular Ca²⁺ concentration can activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Subsequently, this pathway will negatively regulate the canonical Wnt pathway by inhibiting gene transcription mediated by the beta-catenin/TCF complex [42]. Interestingly, canonical Wnt pathway antagonists can effectively mediate depressive behavior [42, 43].

Conclusion

This study has shown for the first time the antinociceptive effects of RTX in *C. elegans* following controlled and prolonged exposure. Moreover, our results suggest that RTX targets the *C. elegans* vanilloid receptor ortholog OCR-3 and not OCR-2, which is the target of capsaicin. Proteomics and bioinformatics analyses revealed that the effects observed with RTX might be related to the noncanonical beta-catenin-independent Wnt pathway leading to negative regulation of the canonical Wnt pathway. This discovery is consistent with our previous study, where we showed that RTX denervation of cardiac sensory afferents yielded a significant reduction in depressive-like behavior in a mouse model of chronic heart failure [7].

Acknowledgments

This project was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry discovery grant nos. RGPIN-2015-05071 and RGPIN-2020-05228). Laboratory equipment was funded by the Canadian Foundation for Innovation (CFI) and the *Fonds de Recherche du Québec (FRQ)*, the Government of Quebec (F. Beaudry CFI John R. Evans Leaders grant no. 36706). Ph.D. scholarships were awarded to J. Ben Salem from the Fonds de Recherche du Québec - Santé and from the Université de Montréal.

Data availability

Data generated or analyzed during this study are included in the supplementary material.

Conflicts of interest

The authors declare they have no conflicts of interest.

References

- 1- Carnevale V, Rohacs T. TRPV1: A Target for Rational Drug Design. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016;9(3):52
- 2- Nkambeu B, Ben Salem J, Beaudry F. Capsaicin and Its Analogues Impede Nocifensive Response of *Caenorhabditis elegans* to Noxious Heat. *Neurochemical Research* 2020;45:1851-1859
- 3- Nkambeu B, Ben Salem J, Beaudry F. Eugenol and Other Vanilloids Hamper *Caenorhabditis elegans* Response to Noxious Heat. *Neurochem Res*. 2021 Feb;46(2):252-264
- 4- Jara-Oseguera A, Simon SA, Rosenbaum T. TRPV1: on the road to pain relief. *Curr Mol Pharmacol*. 2008;1(3):255-269.
- 5- Guénette SA, Ross A, Marier J-F, Beaudry F and Vachon P (2007). Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *European journal of pharmacology* 2007;562:60–67
- 6- Beaudry F, Ross A, Lema PP and Vachon P. Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. *Phytother Res*. 2010;24:525–530.
- 7- Ramírez-Barrantes R, Córdova C, Gatica S, Rodriguez B, Lozano C, Marchant I, Echeverria C, Simon F, Olivero P. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Expression Mediates Capsaicin-Induced Cell Death. *Front Physiol*. 2018;9:682
- 8- Brown DC. Resiniferatoxin: The Evolution of the "Molecular Scalpel" for Chronic Pain Relief. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016;9(3):47.
- 9- de Almeida AS, Bernardes LB, Trevisan G. TRP channels in cancer pain. *Eur J Pharmacol*. 2021;904:174185.
- 10- Wang HJ, Wang W, Cornish KG, Rozanski GJ, Zucker IH. Cardiac sympathetic afferent denervation attenuates cardiac remodeling and improves cardiovascular dysfunction in rats with heart failure. *Hypertension*. 2014;64(4):745-755
- 11- Wu Y, Hu Z, Wang D, Lv K, Hu N. Resiniferatoxin reduces ventricular arrhythmias in heart failure via selectively blunting cardiac sympathetic afferent projection into spinal cord in rats. *Eur J Pharmacol*. 2020 Jan 15;867:172836.
- 12- Wang HJ, Rozanski GJ, Zucker IH. Cardiac sympathetic afferent reflex control of cardiac function in normal and chronic heart failure states. *J Physiol*. 2017;595(8):2519-2534
- 13- Kermorgant M, Ben Salem J, Iacovoni JS, Calise D, Dahan L, Guiard BP, Lopez S, Lairez O, Lasbories A, Nasr N, Pavy Le-Traon A, Beaudry F, Senard JM, Arvanitis DN. Cardiac sensory afferents modulate susceptibility to anxio-depressive behaviour in a mouse model of chronic heart failure. *Acta Physiol (Oxf)*. 2021;231(4):e13601.

- 14- Bordoni B, Marelli F, Morabito B, Sacconi B. Depression and anxiety in patients with chronic heart failure. *Future Cardiol.* 2018;14(2):115-119
- 15- Apfeld J and Alper S. What Can We Learn About Human Disease from the Nematode *C. elegans*? *Methods Mol Biol.* 2018;1706:53–75.
- 16- Komuniecki R, *et al.* Monoamines activate neuropeptide signaling cascades to modulate nociception in *C. elegans*: a useful model for the modulation of chronic pain? *Invertebrate Neuroscience.* 2012; 12:53–61.
- 17- Avila D, *et al.*, The *Caenorhabditis elegans* model as a reliable tool in neurotoxicology. *Human and Experimental Toxicology.* 2012;31(3):236–243.
- 18- Cao R, *et al.* Quantitative Proteomic Analysis of Membrane Proteins Involved in Astroglial Differentiation of Neural Stem Cells by SILAC Labeling Coupled with LC–MS/MS. *Journal of Proteome Research.* 2012;11:829–838.
- 19- Kim Y, Park Y, Hwang J, Kwack K. Comparative genomic analysis of the human and nematode *Caenorhabditis elegans* uncovers potential reproductive genes and disease associations in humans. *Physiol Genomics.* 2018;50(11):1002-1014.
- 20- Kim W, Underwood RS, Greenwald I, Shaye DD. OrthoList 2: A New Comparative Genomic Analysis of Human and *Caenorhabditis elegans* Genes. *Genetics.* 2018;210(2):445-461.
- 21- Hobert O, Specification of the nervous system (June 18, 2021), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.7.1, <http://www.wormbook.org>.
- 22- Pinho-Ribeiro FA, Verri WA Jr, Chiu IM. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol.* 2017;38(1):5-19.
- 23- Kahn-Kirby AH, Bargmann CI. TRP channel in *C. elegans*. *Annual Review of Physiology* 2006;68:719 – 736
- 24- Xiao R, Xu XS. *C. elegans* TRP Channels. In: Islam M. (eds) *Transient Receptor Potential Channels. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2011; 704:323-339. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_18
- 25- Glauser DA, Chen WC, Agin R, MacInnis B, Hellman AB, Garrity PA, Man-WahTan, Goodman MB. Heat avoidance is regulated by Transient Receptor Potential (TRP) channels and a neuropeptide signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics Society of America* 2011;188:91-103
- 26-Venkatachalam K, Luo J, Montell C. Evolutionarily Conserved, Multitasking TRP Channels: Lessons from Worms and Flies. *Handb Exp Pharmacol* 2014;223:937 – 962

- 27- Nkambeu B, Ben Salem J, Leonelli S, Amin Marashi F, Beaudry F (2019). EGL-3 and EGL-21 are required to trigger nocifensive response of *Caenorhabditis elegans* to noxious heat. *Neuropeptides* 2019;73:41-48
28. Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71–94
29. Margie O, Palmer C, Chin-Sang I (2013) *C. elegans* chemotaxis assay. *J Vis Exp* 74:1–6
- 30- Wittenburg N, Baumeister R (1999) Thermal avoidance in *Caenorhabditis elegans*: an approach to the study of nociception. *Proc Natl Acad Sci* 96(18):10477–10482
- 31- Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, Benner C, Chanda SK. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun.* 2019;10:1523
- 32- Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman WH, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics.* 2009;25(8):1091-1093
- 33- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 2003;13(11):2498-2504
- 34- Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.* 1995;57:289–300.
- 35- Raisinghani M, Pabbidi R M and Premkumar L S. Activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by resiniferatoxin. *The Journal of physiology* 2005;567: 771–786.
- 36- Elokely K, Velisetty P, Delemotte L, Palovcak E, Klein ML, Rohacs T, Carnevale V. Understanding TRPV1 activation by ligands: Insights from the binding modes of capsaicin and resiniferatoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016;113: E137-145.
- 37- Kim SR, Kim SU, Oh U, Jin BK. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca²⁺-mediated mitochondrial damage and cytochrome c release. *J Immunol.* 2006 Oct 1;177(7):4322-4329
- 38- Kun J, Helyes Z, Perkecz A, Bán Á, Polgár B, Szolcsányi J, Pintér E. Effect of surgical and chemical sensory denervation on non-neural expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptors in the rat. *J Mol Neurosci.* 2012;48(3):795-803
- 39- Tobin D, Madsen D, Kahn-Kirby A, Peckol E, Moulder G, Barstead R, Maricq A, and Bargmann C. Combinatorial expression of TRPV channel proteins defines their sensory functions and subcellular localization in *C. elegans* neurons. *Neuron* 2002;35: 307–318
- 40- Okerlund ND and Cheyette BNR. Synaptic Wnt signaling—a contributor to major psychiatric disorders? *J Neurodev Disord.* 2011; 3(2): 162–174.
- 41- Klassen MP and Shen K. Wnt signaling positions neuromuscular connectivity by inhibiting synapse formation in *C. elegans*. *Cell.* 2007;24;130(4):704-716.

42- Sani G, Napoletano F, Forte AM, Kotzolidis GD, Panaccione I, Porfiri GM, Simonetti A, Caloro M, Girardi N, Telesforo CL, Serra G, Romano S, Manfredi G, Savoja V, Tamorri SM, Koukopoulos AE, Serata D, Rapinesi C, Del Casale A, Nicoletti F, Girardi P. The wnt pathway in mood disorders. *Curr Neuropharmacol.* 2010;10(3):239-253

43- Hussaini SM, Choi CI, Cho CH, Kim HJ, Jun H, Jang MH. Wnt signaling in neuropsychiatric disorders: ties with adult hippocampal neurogenesis and behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014;47:369-383

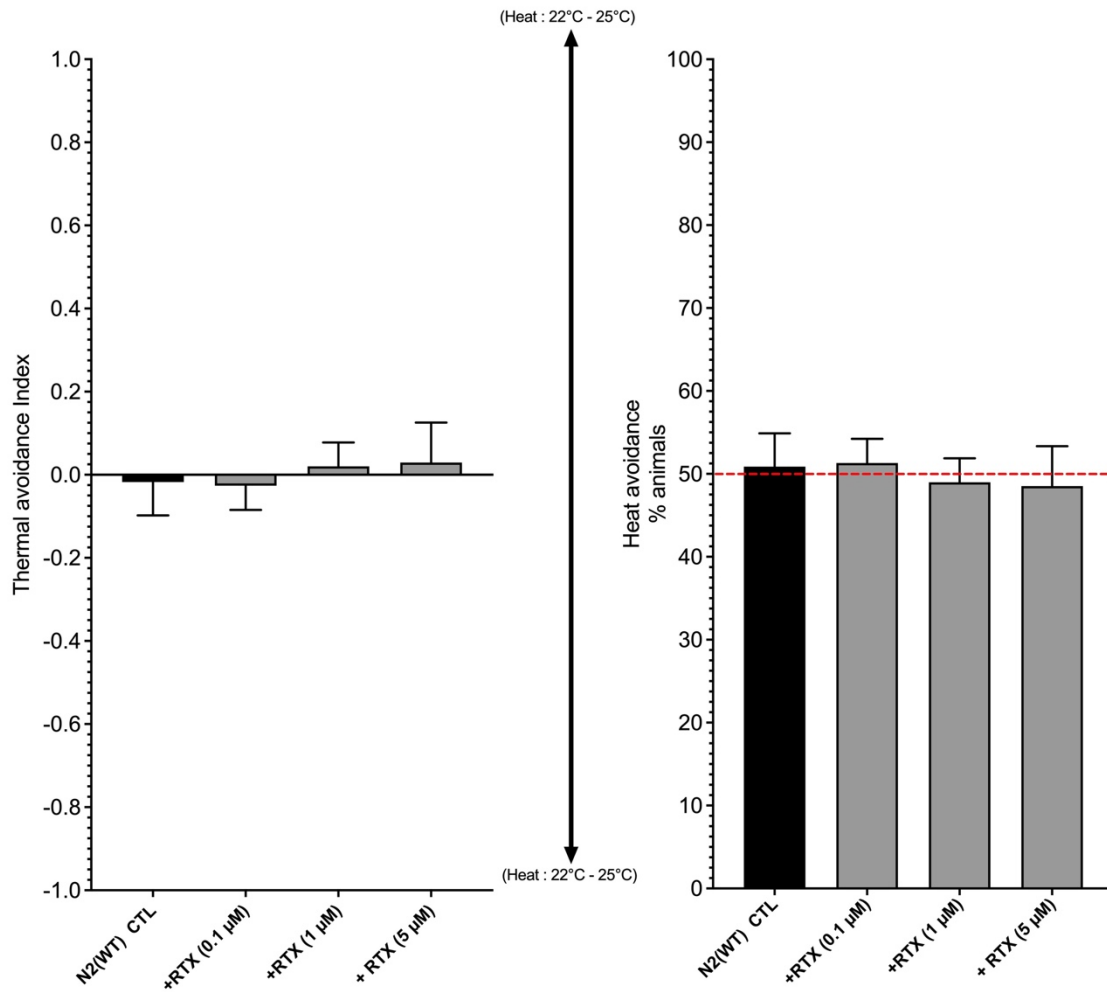


Figure 1. Comparison of the mobility and bias of WT (N2) nematodes in plates divided into quadrants conserved at a constant temperature (22°C) without the application of a stimulus (negative control). Display values (means \pm SD) were calculated from at least 6 independent experiments for each experimental group. No quadrant selection bias was observed for any *C. elegans* genotype tested in the absence or presence of RTX at 5 μ M, 1 μ M and 0.1 μ M.

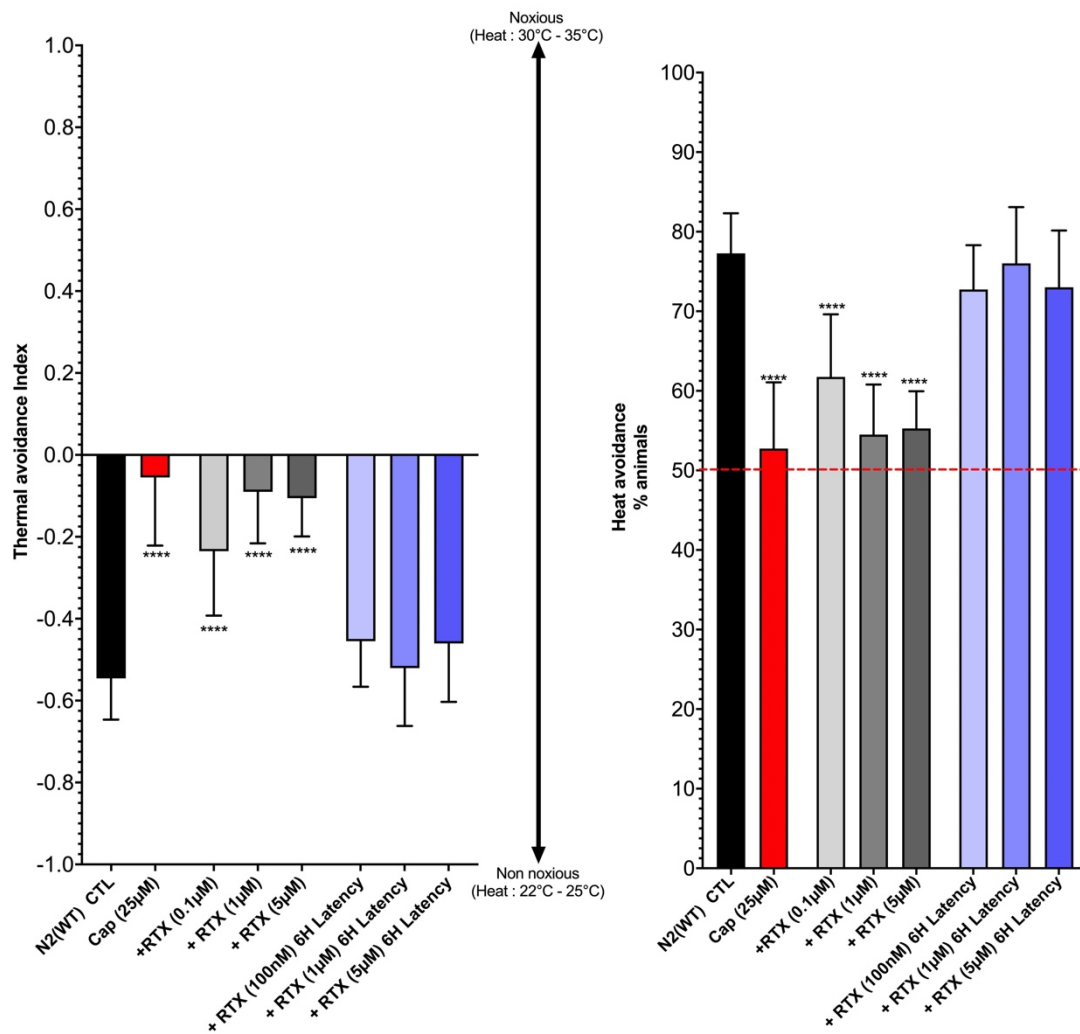


Figure 2. Assessment of the pharmacological effects of RTX on thermal avoidance in *C. elegans*. Nematodes were exposed to RTX or capsaicin (Cap) for 60 min prior to behavior experimentation. Display values (means \pm SD) were calculated from at least 12 independent experiments for each experimental group. The observed effects of RTX are dose-dependent and noticeably hamper thermal avoidance in *C. elegans*. **** $p < 0.0001$ (ANOVA - Tukey-Kramer multiple comparison test). The results suggest an effect similar to that of capsaicin but at a notably lower concentration. No residual antinociceptive effects were observed 6 h after exposure (ANOVA - Dunnett's multiple comparison versus CTL group). Additional Cap data can be found in Nkambeu *et al.* 2020 [2].

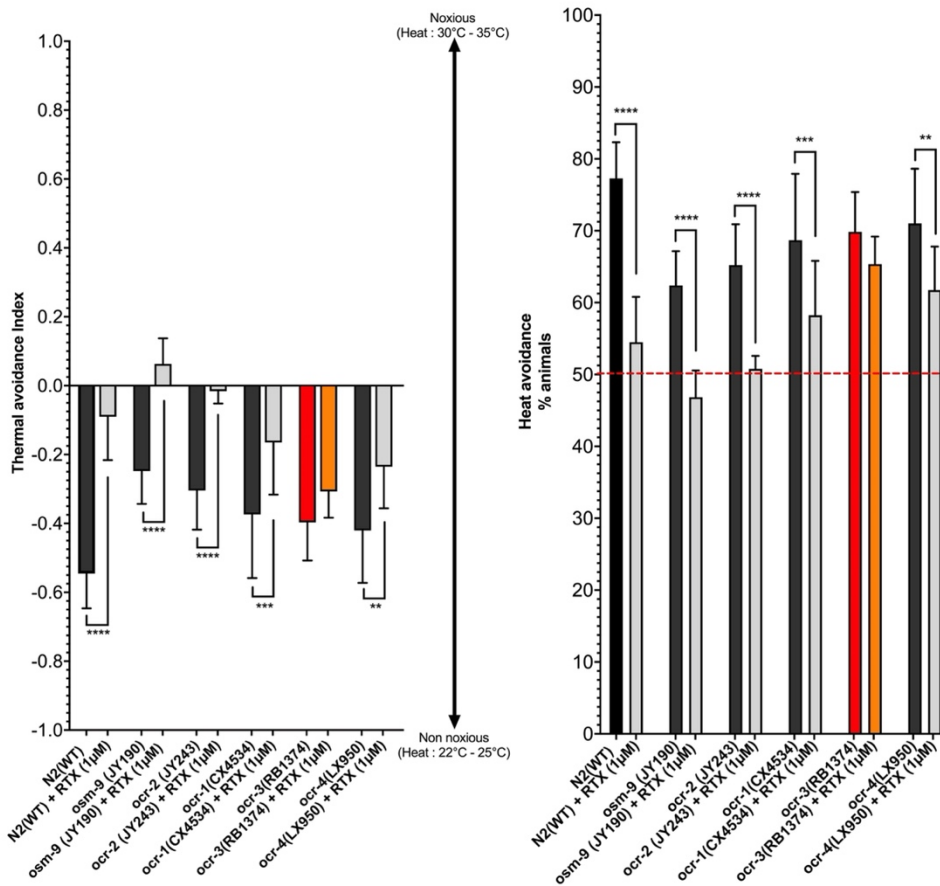


Figure 3. Identification of TRPV orthologs responsible for the RTX-induced antinociceptive effects. Display values (means \pm SD) were calculated from at least 12 independent experiments for each experimental group. The data strongly suggest that RTX exerts antinociceptive effects through the ORC-3 *C. elegans* TRPV ortholog. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ (ANOVA - Sidak's multiple comparisons test using specific comparison pairs).

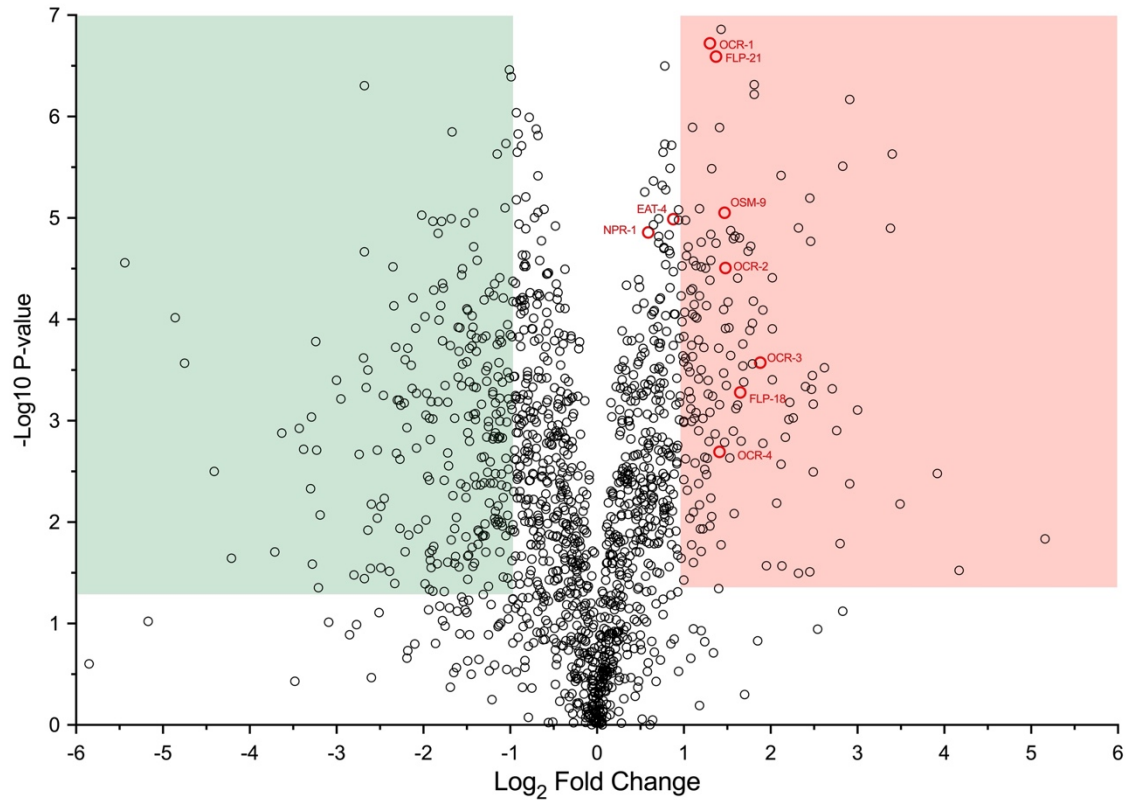
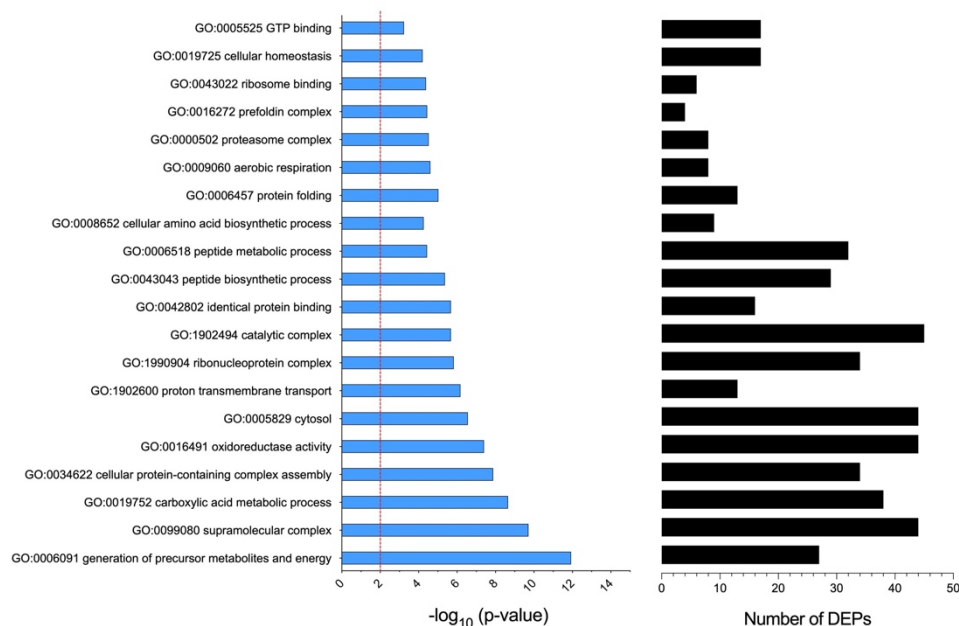


Figure 4. Volcano plot illustrating differential abundances of proteins with the x-axis showing the \log_2 ratio with respect to the control (N2) and the y-axis representing the $-\log_{10}$ of the p-value. Boxes illustrate a p-value of 0.05, and the positions of the 1.0 and -1.0 \log_2 ratios that correspond to twofold increases/decreases are colored green and red, respectively. A total of 157 upregulated and 305 downregulated proteins were observed. Interestingly, vanilloid receptor proteins (OCR1-4 and OSM-9) and specific proneuropeptides (FPL-21 and FPL-18) were significantly upregulated following 60 min of exposure to RTX.

Figure 5.

A



B

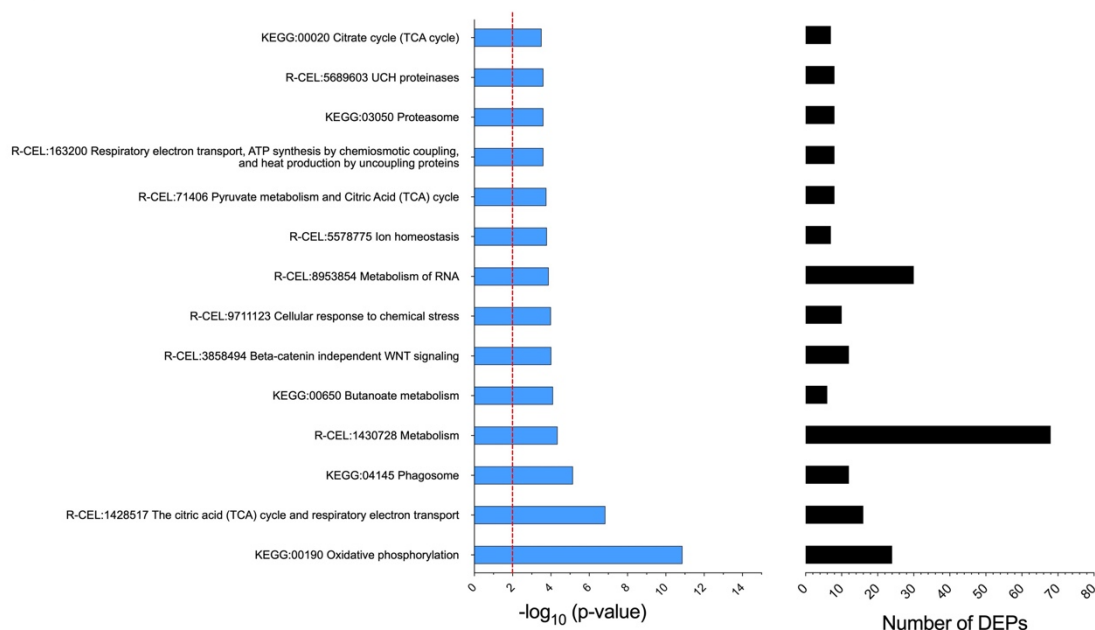
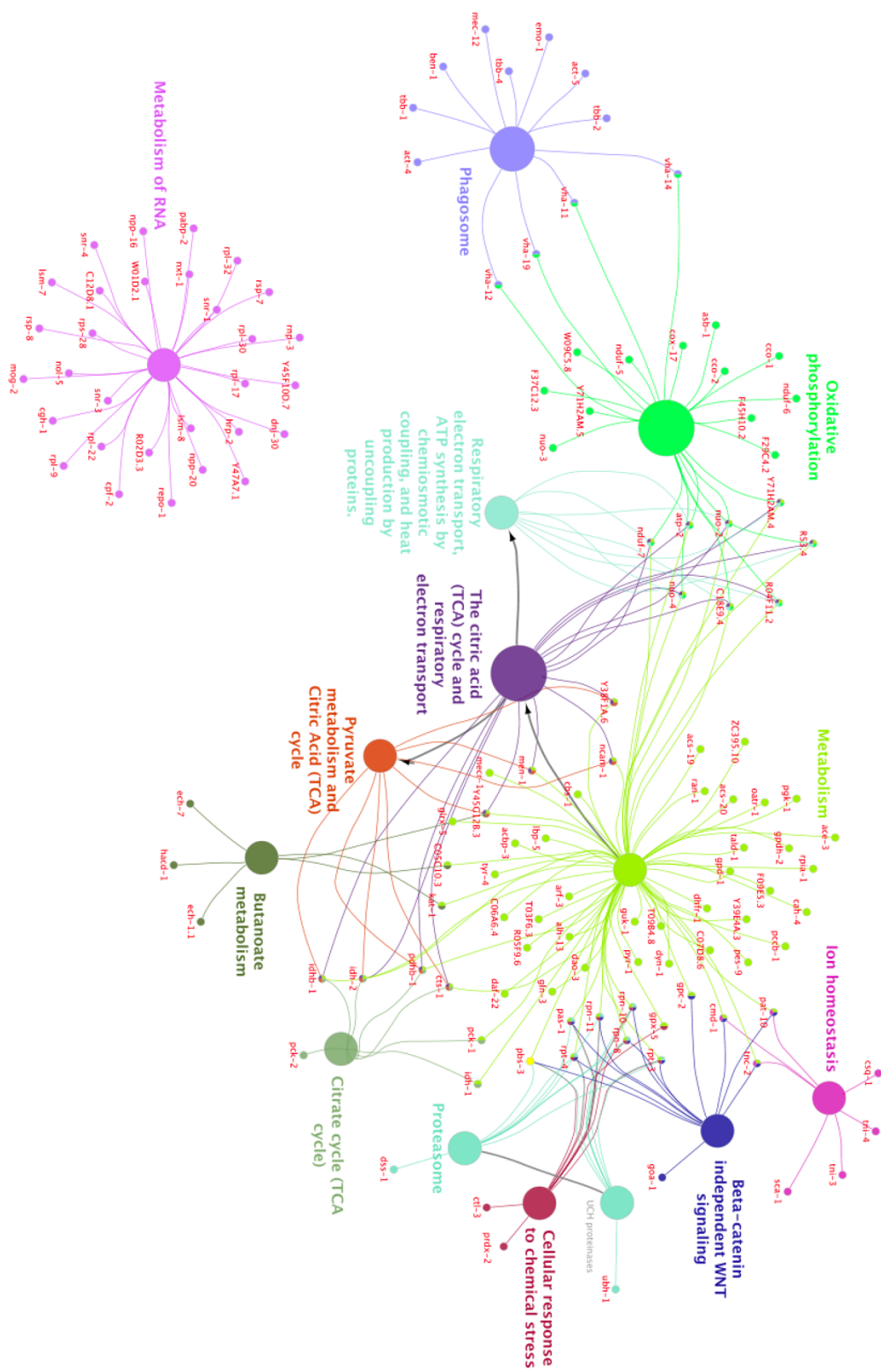


Figure 5. Gene ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and REACTOME enriched terms. Analysis was performed with all DEPs (upregulated and downregulated). A) Detailed information relating to changes in the biological processes (BPs), cellular components (CCs), and molecular functions (MFs) of the DEPs following RTX exposure through GO enrichment analyses. B) KEGG and REACTOME pathway enrichment analysis.



Article 3 : Cardiac sensory afferents modulate susceptibility to anxio-depressive behaviour in a mouse model of chronic heart failure

Acta physiologica, Avril 2021, doi: 10.1111/apha.13601.

Marc Kermorgant¹, Jennifer Ben Salem^{1,2}, Jason S Iacovoni¹, Denis Calise³, Lionel Dahan⁴, Bruno Guiard⁴, Sébastien Lopez⁴, Olivier Lairez^{1,5}, Antoine Lasbories¹, Nathalie Nasr^{1,6}, Anne Pavy Le-Traon^{1,6}, Francis Beaudry², Jean-Michel Senard^{1,6,7}, and Dina N Arvanitis¹

1 INSERM DR Midi-Pyrénées Limousin, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC) UMR1048, Université de Toulouse III, France

2 Groupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

3 INSERM DR Midi-Pyrénées Limousin, Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et Ressources Expérimentales Service Microchirurgie, (CREFRE- US06, Rangueil)

4 Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse; CNRS, Université de Toulouse III, France

5 Fédération des services de cardiologie, Hôpital Rangueil, Université de Toulouse III, France

6 Département de Neurologie et Institut des Neurosciences, Université de Toulouse III, France

7 Service de Pharmacologie Clinique, CHU de Toulouse, Université de Toulouse III, France

Running title: Cardiac afferents modulate depression in heart failure

Dina N. Arvanitis PhD

Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC) UMR INSERM 1048 -
Equipe 8

1 Avenue Jean Poulhès,

BP 84225

31432 Toulouse Cedex . tel : +33 (0)5224072

Abstract

Aim

Impairments in cerebral structure and cognitive performance in chronic heart failure (CHF) are critical components of its comorbidity spectrum. Autonomic afferents that arise from cardiac sensory fibres show enhanced activity with CHF. Desensitization of these fibers by local application of resiniferatoxin (RTX) during myocardial infarction (MI) is known to prevent cardiac hypertrophy, sympathetic hyperactivity and CHF. Whether these afferents mediate cerebral allostasis is unknown.

Methods

CHF was induced by myocardial infarction. To evaluate if cardiac afferents contribute to cerebral allostasis, RTX was acutely applied to the pericardial space in controls (RTX) and in MI treated animals (MI/RTX). Subjects were then evaluated in a series of behavioural tests recapitulating different symptoms of depressive disorders. Proteomics of the frontal cortices (FC) was performed to identify contributing proteins and pathways responsible for behavioural allostasis.

Results

Desensitization of cardiac afferents relieves hallmarks of an anxio/depressive-like state in mice. Unique protein signatures and regulatory pathways in FCs isolated from each treatment reveal the degree of complexity inherent in the FC response to stresses originating in the heart. While cortices from the combined treatment (MI/RTX) did not retain protein signatures from the individual treatment groups, all three groups suffer dysregulation in circadian entrainment.

Conclusion

CHF is comorbid with an anxio/depressive-like state and ablation of cardiac afferents relieves the despair phenotype. The strikingly different proteomic profiles observed in FCs suggest that MI and RTX lead to unique brain-signalling patterns and that the combined treatment, potentially through destructive interference mechanisms, most closely resembles controls.

Keywords : Chronic heart failure, depression, frontal cortex, mass spectrometry, proteomics, sensory afferents

Introduction

Chronic Heart Failure (CHF) is a global pandemic since it affects more than 26 million people worldwide. It can be defined as a complex clinical syndrome typified by inadequate cardiac output to meet systemic metabolic needs. The systemic pathophysiological consequences of CHF are particularly important and there has been a growing awareness on the heart's effects on the brain as a link for brain dysfunction [1], [2]. CHF patients present with impairments in cerebral structure and cognitive performance (reviewed in [3], [4]), with a particular emphasis on major depressive disorders [5]–[7]. Studies show a poorer outcome in CHF patients with associated depression [8]. Most of our understanding on the incidence of cognitive disorders are based mainly from case-control studies and meta-analyses [4], [9], [10]; where the basis of these cognitive disorders are often attributed to brain hypoperfusion, and as secondary effects due to drug treatments. Similar degrees of cognitive decline have been found in CHF patients with reduced ejection fraction as those with preserved ejection fraction [11]; suggesting that brain hypoperfusion is not the sole basis for cognitive allostasis. Learning and memory impairments have been shown in experimental CHF with emphasis on hippocampal structure and function [12], [13]. While the hippocampus is the most commonly studied brain region in CHF [12], [13], it was recently identified that hippocampal atrophy is an independent predictor of poor prognosis in patients with chronic CHF [14]. The frontal cortex (FC) has many functional areas that serve as central regions for the convergence of neural circuits regulating autonomic cardiovascular regulation [15], [16]. Dysfunction of the FC is a central feature in many psychiatric disorders including depression and anxiety [17]–[19]. Despite the existing evidence implicating CHF in depression [3], [4], [8], the relative involvement of the cardiac nervous system in the modulation of depression and anxiety often remains obscure.

Cardiac afferents enter the spinal cord and synapse onto ascending pathways that ultimately activate several cortical areas, including the lateral basal frontal cortex, mesiofrontal cortex, somatosensory cortex and insula [15], [16]. These afferents are part of the cardiac nervous system that are fundamental to cardiac control in health and disease [20], [21]. Cardiac afferent fibres exhibit positive feedback characteristics and appear to play an important role in regulating autonomic function [22], [23]; particularly in regards to CHF [23], [24]. The Transient Receptor Potential Vanilloid type 1 (TRPV1), is a non-selective cation channel found in cardiac afferents that are widely distributed on the epicardial surface of the left ventricle [25]. Cardiac sympathetic afferent endings transmit nociceptive information from the heart and their

activity is enhanced in myocardial infarction (MI) [24], [26]. Chemo-induced destruction of these epicardial sensory afferents by Resiniferatoxin (RTX), an ultra-potent analogue of capsaicin, is capable of inducing rapid and prolonged desensitization of TRPV1 receptors and degeneration of TRPV1 expressing primary sensory neurons [27]. Desensitization and degeneration of the TRPV1 expressing cardiac afferents have been shown to protect against ventricular arrhythmia during acute MI [28], to reduce cardiac hypertrophy and necrosis and ablate the MI induced sympathoexcitation in several animal models [25], [29]–[32].

In the present work, we aimed to assess the depressive-like behaviour, and underlying molecular mechanisms, if any, using an experimental CHF animal model. CHF was induced by MI (MI/S group) and, in order to identify if TRPV1 expressing cardiac afferents contribute to behaviour, RTX was acutely applied to the pericardial space in a subset of mice to monitor the antagonist effect in controls (RTX) and in MI treated animals (MI/RTX). Subjects were then evaluated in a series of behavioural tests recapitulating different symptoms of depression and anxiety-like disorders. We also employed a proteomic approach on the FCs to identify proteins and pathways that might be responsible for the behavioural allostasis.

Results

A simplified schematic work plan of the study is presented in **Figure 1A**. CHF after MI in the mouse was used to evaluate symptoms of depression and anxiety induced by CHF (MI/S group). To identify whether the autonomic sensory afferents contribute to depression in CHF, one group of MI animals concomitantly received restricted acute pericardial injection of RTX to denervate cardiac sensory afferents (MI/RTX). The model was confirmed through cardiac functional analyses, measured by echocardiography at 2 and 8 weeks post infarction to stratify CHF. Denervation of cardiac sensory fibres was further confirmed by assessing cardiac autonomic nervous system function. We then evaluated the behavioural profiles of the mice. Experimental endpoints consisted of weighing the animal, dissecting and weighing the brain and hearts as well as FC microdissection and processing for proteomic analyses.

Denervation of the TRPV1 expressing cardiac afferents was confirmed functionally by a lack of response in heart rate (HR: **Figure 1B**) and arterial blood pressure (ABP: **Figure 1C**) due to epicardial application of the TRPV1 agonist, capsaicin. MI resulted in significant death (**Figure 1D**), with 43 out of 89 mice (48%) of the MI/S group dying before the second week post-surgery, compared to 1 death out of 39 (2.6%) mice at the same time point from the Sham group. Pericardial injection of RTX just after MI significantly enhanced their survival rate

(**Figure 1D**), with only 13 deaths out of 74 (17.6%) in the MI/RTX group two weeks after surgery. RTX treatment alone had no influence on their survival rate with only 2 out of 50 (4%) mice dying within the RTX group. Survival curves from the MI/S and MI/RTX groups were significantly different from those of the Sham and RTX groups, which were not significantly different from each other (**Figure 1D**, log-rank test, $p < 0.001$). The LVEF was measured by echography 2 weeks post-surgery to establish the MI group (LVEF $< 40\%$) and at 8 weeks post-surgery to identify disease progression and drug effects. Three-way ANOVA shows a significant interaction between MI surgery, RTX treatment and time ($p = 0.002$). The LVEF (**Figure 1E**) was stable over time in Sham and RTX control groups, $72 \pm 4\%$ for Sham ($n = 27$) and 72 ± 5 for RTX ($n = 29$) at both time points. The MI/S group showed a severe and significant reduction in LVEF ($33 \pm 5\%$, $n = 30$; $p < 0.001$) at 2 weeks, which worsened at 8 weeks ($29 \pm 5\%$, $n = 30$). This impairment in the MI/RTX group remained significantly lower from the control groups ($45 \pm 6\%$, $n = 30$, at 2 weeks) and showed improvement over time ($50 \pm 7\%$, $n = 30$, at 8 weeks). Macroscopic examination of cardiac tissue necrosis at 12-13 weeks post-surgery (**Figure 1F**) showed reduced tissue necrosis in MI/RTX ($23 \pm 12\%$, $n = 8$) as compared to MI ($39 \pm 9\%$, $n = 8$), which were highly significant (Fig. 1C, 2-way ANOVA: $p < 0.001$ for surgery, $p = 0.14$ for treatment, $p = 0.0025$ for the interaction; Tukey post-hoc test: $p < 0.0001$ for MI/S vs Sham; $p = 0.0005$ for RTX/MI vs Sham; $p = 0.0063$ for MI/S vs MI/RTX).

Next, we evaluated the autonomic control of cardiac activity by HRV analyses (**Table 1**). We found that all groups showed preservation of parasympathetic function as determined by RMSSD, HF (nu) and SD1 parameters. Consequently in the MI/S group, changes observed in HRV parameters (SDNN, LF (nu) and SD2) could not be attributed to modifications in parasympathetic activity but rather due to an increase in sympathetic activity. Moreover, RTX alone had no effect on the measured sympathovagal balance. ANOVA analysis followed by Tukey's post hoc test depicted significant differences for LF (nu) when comparing Sham versus MI/S ($p = 0.005$) and MI/S versus MI/RTX ($p < 0.001$), for LF/HF in Sham versus MI/S ($p = 0.040$) and MI/S versus MI/RTX ($p = 0.006$) and for the QTc interval in MI/S versus MI/RTX ($p = 0.044$) (**Table 1**).

Further, compared to Sham animals, MI/S mice displayed cardiac hypertrophy, as evidenced by a significant increase in heart weight to tibia length. RTX treatment alone had no discernible effect, whereas cardiac hypertrophy was partially recovered by RTX treatment in MI. Further, RTX, in conjunction with MI, rescued cardiac tissue necrosis as compared to MI/S mice (**Table 2**). Altogether, these results are in accordance with literature showing that selective ablation of

cardiac TRPV1-expressing sensory afferents just after the induction of MI, tapered cardiac hypertrophy and abridged the exaggerated systemic sympathetic response[29], [32], [33].

To evaluate whether CHF elicits behavioural anomalies related to mood disorders, we conducted a series of behavioural assays for depression and anxiety-like disorders in our test subjects. The tail suspension test (TST) (**Figure 2A**) showed that the immobility time was higher for MI/S mice (200 \pm 52 sec.; n=11) than Sham mice (113 \pm 62 sec.; n=11), indicating depressive-like behaviour. The immobility times observed in RTX (113 \pm 44 sec.; n=9) and MI/RTX (133 \pm 36 sec.; n=9) mice were similar to Sham values. 2-way ANOVA showed a significant effect of the RTX treatment (p=0.044), the surgery (p=0.002) and their interaction (p=0.045). Tukey's post-hoc test showed significant differences between the immobility time of the MI/S group and those of the 3 other groups (p=0.003 vs Sham, p=0.003 vs RTX and p=0.030 vs MI/RTX) and absolutely no significant difference between Sham, RTX and MI/RTX groups (p=0.830). Thus, RTX significantly reduces the depressive-like phenotype induced by MI.

To confirm these results, we next employed the forced swim test (FST), commonly used to measure despair in rodents (**Figure 2B**). Here again, the immobility time was higher for MI/S mice (165 \pm 20 sec.; n=7) than for Sham mice (77 \pm 16 sec.; n=9). The immobility times for RTX (80 \pm 14 sec.; n=8) and MI/RTX (77 \pm 15 sec.; n=9) mice were similar to values observed in Sham mice. 2-way ANOVA showed a significant effect of the RTX treatment (p<0.0001), the surgery (p<0.0001) and their interaction (p<0.0001). Highly significant differences (Tukey's post-hoc, p<0.001) were found between the immobility time of the MI/S group and those of each of the three other groups, which showed no significant differences between each other (Tukey's post-hoc, p=0.880). Therefore, the FST confirms the results of the TST showing that RTX significantly reduces the depressive-like phenotype induced by MI.

In order to rule out the possibility that these effects resulted from a non-specific sedative or psychostimulant effect or from an alteration of muscular strength, a subset of mice underwent a locomotion test in an open field and a grip strength test. Neither MI nor RTX treatment had any impact on locomotor activity (Sham group: 4.6 \pm 1.7 m/min, n=5; MI/S group: 4. \pm 1.9 m/min, n=5; RTX: 4.2 \pm 0.7, n=6; MI/RTX: 3.9 \pm 0.9, n=4; 2-way ANOVA: p>0.05 for all factors) or muscular strength (Sham group: 2.1 \pm 0.7 N/g, n=5; MI/S group: 2.7 \pm 0.1 N/g, n=5; RTX group: 2.7 \pm 0.4, n=6; RTX/MI group: 2.4 \pm 0.7, n=4; 2-way ANOVA: p>0.05 for all factors). Thus, we did not observe any major effect of MI or RTX treatment on grip strength

and locomotion that could bias the interpretation of the effect of MI and RTX on immobility scores obtained with the TST and the FST.

We then used the novelty suppression feeding (NSF) test in order to evaluate anxiety, another core symptom of depression in our groups (**Figure 2C**). In our samples, the latency to eat was higher in the MI/S group (439 \pm 168sec; n=13) than in the Sham group (322 \pm 134sec; n=12). Latencies observed in the RTX (438 \pm 148sec; n=10) and MI/RTX (480 \pm 105sec; n=11) groups were similar to those observed in the MI/S group, suggesting an effect of either MI or RTX with no cumulative effect. However, these differences do not reach statistical significance (2-way ANOVA, $p=0.070$ for treatment and surgery; $p=0.380$ for their interaction, $p>0.05$ for Tukey's post-hoc test). Importantly, weight loss induced by fasting before the test was higher in the MI/S group (5.7 \pm 5.6 g, n=13) than in the three other groups (Sham group: 3.6 \pm 1.8 g, n=12; RTX group: 3.9 \pm 0.7 g, n=10; MI/RTX group: 4.0 \pm 0.7 g, n=11). These observations suggest that mice from the MI/S group were more sensitive to starvation, even though these differences do not reach statistical significance (2-way ANOVA, $p>0.05$). In accordance with these findings, food consumption in the home cage (**Figure 2D**) also tended to increase in the MI/S group (5.9 \pm 4.1 mg of food /g of mice, n=13) as compared to the 3 other groups (Sham group: 3.2 \pm 1.9 mg/g, n=12; RTX group: 4.1 \pm 3.2 mg/g, n=10; MI/RTX group: 2.7 \pm 2.6 mg/g, n=11). However, these differences do not reach statistical significance (Kruskal-Wallis test, $p=0.110$). Altogether, our findings show that CHF led to long-term dysregulation of allostasis leading to depressive-like symptoms and that RTX treatment exerted an antidepressant-like response in the MI/RTX group.

Cardiac sympathetic afferents enter the spinal cord and synapse onto ascending pathways that ultimately activate several cortical areas, including the lateral basal FC, mesiofrontal cortex, somatosensory cortex and insula[15]. Given the strong association between cortical atrophy and CHF [34], combined with the prevalence of depression in CHF patients [8], we investigated changes in the cortical proteome with our models by employing a previously established, label-free quantitative proteomic approach. Volcano plots (**Figure 3**) illustrate differential abundances of proteins with the x-axis representing the log₂ ratio and the y-axis plotting $-1 * \log_{10}$ (p-value). A horizontal line shows the position for a p-value of 0.01 and the two vertical lines show the position of 1.0 and -1.0 log₂ ratios (corresponding to 2-fold increase/decrease, coloured in red/green respectively). For each contrast, the coloured points, which pass these filters, are considered to be differentially expressed proteins (DEPs). In the FC of MI/S

compared to Sham, 162 proteins were significantly increased and 152 were decreased (**Figure 3A**). RTX compared to Sham found 355 total proteins, 180 enriched in RTX and 175 enriched in Sham (**Figure 3B**). Our final contrast, MI/RTX versus Sham, only revealed 151 significant proteins with these same criteria; 97 upregulated in MI/RTX and 54 downregulated (**Figure 3C**). Both Gene Ontology (GO) and Pathway enrichment analyses were performed using GeneAnalytics software with each set of DEPs. The full GO reports from GeneCards are provided in Supplemental Files. Summary bar plots for select GO categories from analyses using upregulated and downregulated DEPs from MI/S (**Figure 4A, 4B**), RTX (**Figure 4C, 4D**) and MI/RTX (**Figure 4E, 4F**), are shown for GO categories with a maximum of 1000 total genes in the category and a minimum of at least 3 matched genes from the set of DEPs. GO categories selected by DEPs upregulated in MI/S included: the negative regulation of transcription, protein ubiquitination, cold-induced thermogenesis, nucleotide-excision repair, as well as mitochondrial matrix and respiration (**Figure 4A**). GO categories selected by DEPs downregulated in MI/S included neuron migration, synaptic regulation, and cellular junctions (**Figure 4B**). In contrast, DEPs upregulated in RTX selected GO categories such as axon guidance, neuron projection and calcium channel activity, in addition to mitochondrial electron transport chain and respiration related processes (**Figure 4C**). DEPs downregulated by RTX treatment selected GO categories such as brain development, postsynaptic density and axoneme/cilium as well as Glucose Homeostasis and Cellular Response to Hypoxia (**Figure 4D**). Analyses of FCs isolated from the MI/RTX group, which had less DEPs overall, also selected fewer GO categories. However, DEPs upregulated in MI/RTX did select various classic neuronal categories such as Ion Transmembrane Transport, Cell Projection, presynaptic membrane, Axon and Metallopeptidase Activity (**Figure 4E**). Interestingly, DEPs downregulated in MI/RTX also selected the Axon category, as well as Mitochondrial Outer Membrane and Nuclear Receptor Transcription Coactivator Activity (**Figure 4F**).

The pathways section of the GeneAnalytics reports proved to be the most informative in terms of elucidating cellular functions dysregulated in the FCs due to our various treatments. The complete reports can be found in Supplementary Table S2. We selected various pathways based on biological relevance as summarized for MI/S (**Table 3**), RTX (**Table 4**) and MI/RTX (**Table 5**). **Figure 5** shows pathways from MI/S with nodes coloured based on abundance (compared to Sham; proteins enriched/reduced in MI/S are respectively shaded in red/green). A selected set of pathways, shown in **Figure 5A**, show the inter-relations between extracellular signal-regulated kinases (ERK) and the pathways relevant to neurobiology. The ERK pathway had the

largest number of DEPs and shares nodes with both the PI3K and cAMP pathways (**Figure 5B**). Interestingly, all proteins from the cAMP pathway are enriched in MI/S and all proteins from the PI3K pathway are reduced. In **Figure 5C**, we show that even with the ERK pathway removed, there remains an interrelated network of pathways including dopamine, serotonin (5-HT), androgen, beta-adrenergic signaling, EphB-EphrinB, Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog (ERBB), Corticotropin-Releasing Hormone and axon guidance, which are collectively perturbed in MI/S. Pathway enrichment analysis for FCs isolated from RTX treatment revealed a large number of DEPs associated with G protein-coupled receptors (GPCRs) and Rho GTPases (**Figure 6**). DEPs from these pathways also link to pathways in common with MI/S, such as Circadian Entrainment, Beta-Adrenergic and Respiration. However, there is not very much overlap in terms of the individual DEPs within these shared pathways. In addition, RTX selected specific pathways such as GABAergic Synapse and CREB, which were not selected with DEPs from MI/S. Despite the fact that the MI/RTX contrast was less effective at pathway selection due to the reduced total number of DEPs retained after filtering, we did find some pathways in common with MI/S and/or RTX as well as unique pathways such as Glycosaminoglycan, Glucose Metabolism, HIF1, BDNF/TrkB and extracellular matrix degradation (**Figure 7**).

While not many DEPs were shared between treatments, each set of DEPs included enough members of the circadian pathways for it to be selected. In addition, MI/S and RTX both selected Beta-Adrenergic and Respiratory Electron Transport, MI/S and MI/RTX both selected the Wnt pathway and RTX and MI/RTX both selected Rho GTPases (**Figure 8A**). To visualize how little overlap exists at the protein level, a heatmap (**Figure 8B**) was created with the proteins from the pathways shown in Fig 8A. While the log₂ ratio is used to colour proteins that pass the significance filter, proteins that did not pass are shown in grey in the heatmap, demonstrating that the vast majority of proteins involved in these common pathways are uniquely identified as DEPs in a single treatment group.

Discussion

Using two behavioural paradigms particularly adapted to assess despair in rodents, the TST and the FST, we found that MI/S mice present a significant increase in despair behaviour, as compared to controls. These findings strongly support that CHF induced depressive-like behaviour is consistent with CHF human studies [5]–[7] and a murine model of MI induced

anhedonia [35]. Pharmacologic denervation of the cardiac sympathetic afferent reflex, used as previously described [25], [29], [30], [36], increased survival, ablated sympathoexcitation and reduced cardiac tissue necrosis. Parallel behavioural assessment of the MI/RTX group showed immobility intervals consistent with Sham, indicating that RTX reduced the despair observed in the MI/S group.

We show that cardiac afferent over-activity in MI, or ablation via RTX resulted in anxiety-like behaviour. Indeed, anxiogenic effects induced by systemic injection with TRPV1 agonists have been previously demonstrated [37]; suggesting that TRPV1 expressing fibres underlie neural circuits responsible for anxiogenic behaviour. Our findings show an involvement of cardiac TRPV1 expressing afferents in anxiety-related behaviour, suggesting a role for an integral circuit of peripheral TRPV1 expressing sensory fibres in mediating central processing toward anxiogenic behaviour. Cardiac afferents synapse onto ascending pathways that ultimately activate multiple cortical areas, including the lateral basal FC, mesiofrontal cortex, somatosensory cortex and insula[15]. In fact, sympathetic efferent and afferent junctions arise primarily from areas of the FC controlling cardiovascular function[15], [38]–[41]. Dysfunction of the FC is a central feature in many psychiatric disorders including depression and anxiety[17], [18],[19]. Importantly, cortical atrophy is significant in CHF patients [42] and reduced frontal brain activity, together with high anxiety and low cognitive function, has been recently shown to occur in patients with CHF[41]. We found that CHF is comorbid with an anxio-depressive-like state, and that an acute targeted ablation of cardiac afferents concomitant with MI prevents despair ensuing from anxiety. The TST and FST are depression-related behavioural tests that have been utilized to identify a diverse collection of genes and associated functional pathways potentially involved in depression, as well as despair-related behaviour [43], [44]. The despair observed in our MI/S group through the TST and FST tests may be driven by dysregulated corticolimbic circuitry[45] with an emphasis on medial prefrontal cortex circuitry [46]. In addition, numerous FC regions are important for cognitive modulation by nociception and pain [15], [47]. On the other hand, the NSF test primarily evaluates anxiety, implicating the amygdala and hippocampus [48]. Taken together, our data suggests that MI affects cortical and hippocampal neural circuitry, while cardiac afferent ablation appears to primarily influence the cortical neural circuit. Based on these findings we offer a model whereby cardiac afferents differentially modulate depression-like phenotypes via bottom-up communication to the brain. We chose to apply proteomics in order to identify differentially expressed proteins and their associated functional pathways in the FC underlying CHF-induced, RTX- resilient depression and anxiety related phenotypes.

Our findings with FCs isolated from MI/S mice showed that a large number of the differential proteins were in kinase signalling pathways such as ERK, PI3K and cAMP/PKA; which are known to be important in depression [49] and control the circadian rhythm [50]. Pathways selected by differential proteins, show a great deal of overlap implicating plasticity-related structural changes (SRF[51]) and the stability of the neuronal cytoskeleton (Ppp2r1b, Nck [52], [53]). Moreover, pathway enrichment revealed modulation in some well-established, diverse and adaptive neurohormonal mechanisms that are known to compensate for cardiac dysfunction [54]. Several enriched pathways that exacerbate cardiac dysfunction and lead to sympathetic overdrive were also found, such as beta-adrenergic signalling [55] and corticotropin-releasing hormone signalling [56]. Groups of signal cascade transducers were also able to select multiple pathways widely implicated in mood disorders, including 5-HT, Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1 (NR3C1) and Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein, (DARPP32, also known as PPP1R1B), as well as classic neuronal pathways such as Axon guidance and EphB-EphrinB[57], [58]. Several of our observations in FCs are in agreement with previous findings with molecular changes observed in cortices upon CHF [35]. Interestingly, proteins differentially expressed in MI/S cortices selected the androgen receptor-signalling pathway. Androgens have emerged as potential modulators of cardiovascular disease [59] and play a role in triggering anxiolytic-like behaviour via the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in mice [60]. Taken together, these findings indicate that the sustained pathophysiological stress of CHF promotes underlying molecular adaptations in the FC, which correlate with both sympathetic hyperactivity as well as anxio/depressive-like symptoms. Indeed, the sympathetic nervous system tends to be hyperactive in major depression and sympathetic over-activity is further increased when depression is comorbid with an anxiety disorder [61]. Intriguingly, these findings further substantiate previous data indicating corticocardiac coupling [62], [63] and the existence of common bilateral molecular responses between the brain and the heart [35], [64]; supporting the concept that organ function is not limited to self-contained responses but involves biological feedbacks with similar molecular signatures that likely drive pathophysiological processes.

Importantly, the majority of enriched pathways identified in the MI/S FC proteome were absent from the MI/RTX FC proteome. The absence of these pathways could be, at least partially, due to the absence of chronic sympathetic activity. Deciphering the molecular basis of depression and anxiety however is more complicated. For example, HT5R3A is downregulated in MI/S,

yet MI/RTX did not restore its expression, suggesting that the MI/S specific targets, such as the downstream members of ERK signalling [49], are more important for the MI/S associated neural modifications. Even so, pathway enrichment analyses of the MI/RTX group showed fewer molecular changes in the FC as compared to the FCs from the MI/S group. We identified a concentrated network of pathways related to metabolism including heparin sulfate biosynthesis, as well as glucose- and glycosaminoglycan- metabolism. This finding suggests there are important metabolic adaptations in the MI/RTX FCs. Convergent molecules of interest from our pathway analyses were key glycolytic enzymes including phosphofructokinase and hexokinase1; both of which are shown to associate with abnormal bioenergetic functions in the dorsolateral FC of schizophrenia patients [65]. The enrichment pathway profiles of MI/RTX FCs indicate an adaptation in both the bioenergetics of the brain related to neural transmission [66] as well as the deposition and stability of the neuronal extracellular matrix[67]. Given that the LVEF was reduced in these animals, these results may be indicative of FC adaptations downstream of brain hypoperfusion and independent from sympathetic overactivity.

One of the shared biological pathways between the MI/S and MI/RTX group included Wnt-signalling, which encompasses multidimensional signalling cascades in neurodevelopment and plasticity including neuronal migration and synaptogenesis, which are implicated in various psychiatric pathologies [68]. Very recent evidence has emerged indicating decreased Wnt/B-catenin signalling in the hippocampi in a rat model of CHF with preserved ejection fraction [69]. Indeed, cognitive decline in CHF patients is not significantly different between patients with inadequate cerebral perfusion versus those patients where perfusion is preserved [11]. While our data corroborates the implication of decreased Wnt-signalling, we found diversity in the underlying molecular participants.

Circadian entrainment, which encompasses the synchronization of the internal rhythm of the biological clock to external cues such as the natural dark-light cycle [70], was the only pathway shared by all three treatment groups. The circadian rhythm has been studied extensively in cardiovascular physiology, its disruption leads to cardiovascular disease, including CHF, MI and arrhythmias, and the time of day of the occurrence of MI is also a predictor of the post-MI outcome [71]. Additionally, changes in circadian entrainment have been linked to anxiety and depression [72], even specifically in CHF patients [71]. Several of the proteins identified in the circadian node overlap with anxiety. For instance we found that Fkbp5, which is induced by the dynamic EphB2-NR1 interaction upon enhancement of the NMDA receptor current, was highly overexpressed and is a known signature of anxiety [73]. The group I/II metabotropic glutamate receptors were found to be differentially regulated in RTX and MI/RTX FCs. These

receptors are important contributors for functional connectivity in sociability and anxiety, depression and circadian rhythms [74], [75]. These subtle differences among family members from such molecular functional categories within the circadian pathway suggest an important role in the underlying neural circuitry, possibly giving rise to unique cell subtypes that participate in these types of signalling. However, it is unknown at present how the differences in expression of these different members of the same protein families can lead to specific alterations in their neuropsychiatry.

Conclusion

Our findings are consistent with previous reports that show that desensitization of cardiac afferents not only reduces cardiac infarction size and sympathetic tone downstream of MI[29], [33]. We further demonstrate that this desensitization relieves the despair phenotype. Our findings of differentially abundant proteins at the network module level show the complexity of the response in the FC, instigated by sustained pathophysiological stress originating from the heart. It is important to note that the acute treatment of RTX, which is reported to not have deleterious effects on the heart, had an effect on the underlying adaptations in the FC in the absence of MI. Moreover, the strikingly different proteomic profiles observed in FCs suggest that MI and RTX lead to unique brain-signalling patterns. Indeed, we show that MI and RTX ablation of cardiac afferents leads to adaptations in the FCs, yet the combined treatment most closely resembles controls. These observations are in agreement with findings that the spinal cord acts as a processor of information and not just a conduit for information transfer to and from the brain [76]. The combined treatment suggests the occurrence of changes in the neural pulse frequencies and that the brain is partially spared from the effects of the independent treatment.

The TRPV1 expressing cardiac afferents may impinge on FC via several different routes. Direct neurotransmission of cardiac afferents from the spinal cord onto ascending pathways that connect the lateral basal frontal cortex and project primarily to the insula have been traced [15], [16]. These findings overlap with the anatomical tracing studies showing that cardiac activity-regulating circuitry includes, among several brain regions, the anterior cingulate cortex and frontal cortex with possible implications on behavioural output [77], [78]. Given the complexity of the neural communication between the heart and brain, rigorous experimentation applying Cre-lox neurogenetics coupled with optogenetic approaches may reveal finer pathways. In addition to neuronal circuitry, we cannot exclude the impact of the neurohormonal activation

in CHF, in particular the increased activity the in renin-angiotensin system (RAS). RAS not only acts on the heart but also can directly influence neurotransmitter release and blood pressure in the brain [56], [79]; which are candidates responsible for behavioural allostasis [54], [55]. Concurrent to the role of the neurohormonal mechanisms, a growing body of evidence suggests that neuroinflammation may exacerbate peripheral and central neuronal dysfunction [80]. Some studies have shown that inhibiting central inflammation markedly improved autonomic control, peripheral inflammation and cardiac function in CHF animal models [81]. While neuroinflammation is strongly linked to both CHF and to behavioural allostasis such as depression [82], how these two converge in HF remains largely unknown.

Considering the potential limitations of the present study in terms of design, technique and analytical strategy, additional investigations with direct spatio-temporal control of RTX application to the epicardial surface during CHF are required to identify its therapeutic window. Indeed RTX ablation of cardiac afferents concurrent with MI, as performed here, is the established protocol that has shown improvement in cardiac function and reduction in sympathetic activity, even if the therapeutic window appears to be species dependant [29], [33]. An added uncertainty lies in whether there is gender variability following RTX treatment for CHF. Future studies are needed to determine the most effective therapeutic window as well as determine aspects of gender bias observed during pharmacological treatment [83], [84]. Direct evaluation of corticocardiac coupling and the effects of neurogenic inflammation are also needed to better understand brain adaptations to CHF and the overall impact of locally administered RTX. In all, we provide evidence for the susceptibility versus resilience to depression with a large range of multiple phenotypic and molecular evidence for cortical allostasis to cardiac dysfunction and add to the important growing body of evidence for systemic, integrative pathophysiological responses regulated by cardiac sensory fibres in CHF.

Materials and Methods

Animal Husbandry. Male C57BL/6J mice aged 10 weeks were purchased from a commercial supplier (Envigo, Gannat, France) and were allowed to habituate to the animal facility for 12-16 days prior to the experiments. Males were chosen to reduce sex-based variability observed in heart [83], [84] and brain, particularly in mood disorders [85]. Mice were housed in groups of 5 on a 12-h light/dark cycle and an ambient temperature of 22 ± 3 °C, with food and water available *ad libitum*. Animal procedures were approved by the national Animal Care and Ethics Committee (CE2A122 protocol number 2016101916279704) following Directive2010/63/EU.

Myocardial Infarction and RTX application. CHF was induced by MI. Subjects received a chemical induction of ketamine / xylazine (125/5 mg / kg) by intraperitoneal injection followed by a gas induction by 2% of isoflurane inhalant mixed with 1 L/min 100% O₂. Tracheal intubation was performed under a binocular. RTX (Tocris Bioscience, Rennes, France) was prepared as previously described[32] and 10 µL of 0.25 µg/ mL saline solution was used for pericardial injections. Vehicle injections included solutions prepared identically without RTX as previously described[86]. The animal was ventilated with the mini-wind (Harvard Apparatus, Les Ulis, France). Surgical procedures were performed under the operating microscope Zeiss OPM1 FC (Zeiss, Paris, France). An incision of the 4th intercostal space was performed to provide adequate exposure of the thoracic cavity. The left atrioventricular block was exposed, a 8/0 Prolene thread (Ethicon) was placed at the edge of the left atrial appendage and just prior to ligature, a catheter was used to inject 10 µL of saline or RTX saline solution within the intrapericardium. Evans Blue was used as a tracking dye to ensure lack of spillage. MI was performed by ligature (8/0 Prolene thread, Ethicon) of the edge of the left atrial appendage. Immediately following infarction, 10 µL of saline or RTX was injected. The intercostal space was sutured followed by closing the skin surface using an Ethilon 6/0 thread (Ethnicon). Animals received Buprecare (Buprenorphine) subcutaneously (100 µg/kg) as mandated by the National Ethics Board. Animals recovered overnight, then placed in their home cages and observed vigilantly by trained personnel. Appropriate treatment controls included the Saline group (Sham) for surgical control and the RTX group for drug treatment control. All surgical procedures were performed between 7h-13h.

RTX depletion efficiency. Desensitization of epicardial TRPV1 was assessed 11-weeks post-surgery for 3 Sham and 8 RTX subjects. RTX concentrations used in our study were based on previous studies[29], [32], [33]. Briefly, the animals received Buprecare (Buprenorphine: 100 µg/kg) along with gas induction by 4% of isoflurane inhalant mixed with 0,2 L/min O₂. Tracheal intubation was performed under a binocular and the animals were ventilated with the mini-wind (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) by 1.5-2% of isoflurane inhalant mixed with 0.2 L/min O₂. ECG signal was obtained with three limb leads. The ECG signals were digitized at 4 kHz, processed and monitored (Labchart v7, AD Instruments). PE-10 tipped polyethylene cannulae, filled with heparin diluted in saline solution, were inserted into the left carotids. ABP was recorded by connecting the cannula to a pressure transducer. The ABP signal was digitized at 4 kHz and processed (Labchart v7, AD Instruments). A laparotomy was performed below the xiphoid process. A tracer was placed on the xiphoid appendix in order to expose the

diaphragm. The suspensory ligament of the liver was incised. When hemodynamic parameters obtained a steady state, capsaicin (10 µg/mL) was applied directly on the left ventricle using soaked 3x5mm filter paper. Recordings for HR and ABP were performed for a minimum of 20-min.

Transthoracic Echocardiography. Mice were mildly anesthetized by 2% of isoflurane inhalant mixed with 1 L/min 100% O₂ to maintain light sedation throughout the procedure. Mice were immobilized ventral side up on a heating platform to maintain the body temperature. Mice chests were shaved and warmed ultrasound gel was applied to the area of interest. Transthoracic echocardiography was performed by a trained user using a Vivid 7 ultrasound machine and a 13 MHz linear transducer (General Electric Medical System, Horten, Norway). Images were captured on cine loops. Cardiac ventricular dimensions were measured in M-mode and B-mode images 3 times for each animal. Left ventricle ejection fraction (LVEF) was calculated using Simpson's method from the offline EchoPAC software version 101 (GE Vingmed Ultrasound AS, Horten, Norway). An examiner blinded to the treatment of the animals obtained measurements. All measurements were performed excluding the respiration peaks and obtained in triplicate; mean values were used for data analyses.

Autonomic Nervous System Phenotyping. Mice were anesthetized by inhalation of isoflurane at concentrations of 3% during the induction phase. Anesthesia was maintained at 1.5% during surgical procedure for all animals and care was taken to maintain reproducibility given that isoflurane may affect cardiac autonomic control in mice[87]. ECG signal was obtained with three limb leads. The ECG signals were digitalized at 4 kHz, processed and monitored (Labchart v7, AD Instruments). The R-R interval was acquired from the ECG signal over a 30-min recording. Data collected from 5-min ECG recordings were analyzed during stationary condition, free of noise and artifacts. HRV was assessed in time, frequency and non-linear domains. Analyses shown were those performed in one batch of 26 mice (8 Sham, 6 MI/S, 6 RTX and 6 MI/RTX).

Heart rate variability (HRV). Time domain: The following metrics were used: the standard deviations of normal-to-normal intervals (SDNN) and the root mean square of successive differences between normal heartbeats (RMSSD). The SDNN corresponded to the overall variability, i.e. both sympathetic and parasympathetic activities. RMSSD provided information about high frequency variations arising from parasympathetic tone (Task Force, 1996[88]). Frequency domain: The Lomb-Scargle periodogram was used for HRV analysis. Unlike fast

Fourier transform, Lomb-Scargle offers the advantage that it is not required to have resampling or stationarity [89]–[91]. Frequency domain analysis was analyzed in two separate spectral components: low frequency (LF: 0.10-1.00 Hz) and high frequency (HF: 1.00-4.00 Hz) bandwidths. Very low frequency (VLF: < 0.10 Hz) was excluded from the analysis. These spectral components were expressed in normalized units (nu). The LF (nu) $[(100 * \text{LF power} / (\text{total power} - \text{VLF power}))]$ have been considered as an index of both cardiac sympathetic and parasympathetic tones while HF (nu) $[(100 * \text{HF power} / (\text{total power} - \text{VLF power}))]$ reflected solely cardiac parasympathetic tone. The ratio of LF to HF power (LF/HF) emphasized the sympathovagal balance (Task Force, 1996).

Non-linear domain: Poincaré plot is non-linear method is a quantitative visual technique where R-R_n interval is plotted against R-R_{n+1} interval. We considered two indices from this method: the standard deviation of the short-term R-R interval variability (SD1) reflecting parasympathetic tone and the standard deviation of the short- and long-term R-R interval variability (SD2) reflecting both sympathetic and parasympathetic modulations.

QTc interval: QRS complex, representing ventricular depolarization, was assessed from the beginning of the Q wave until to the isoelectric line during S wave peak[92]. QT interval, a measure of ventricular depolarization and repolarization, is the duration between the beginning of the QRS complex and the end of the T wave (i.e. a return to the isoelectric line)[93]. QT interval was corrected for R-R interval (QTc) by a specific formula and based on Fredericia's formula: $QTc = \text{mean QT} / \sqrt{(R-R/100)}$ (QT and R-R interval units in ms)[94].

Behaviour Phenotyping. Behavioural testing was performed during the light cycle between 8h-13h. In all experiments, mice were habituated at least for one week to the experimental room. During this time, handling of animals was done by the same experimenter who performed the tests. Independent cohorts of naïve animals were used. A subset of animals was used for forelimb grip strength test and locomotor assessment. One batch of animals was used for the tail suspension test (TST), one batch was used for the forced swim test (FST) and, another batch of animals was tested in the novelty-suppressed feeding test (NSF). Locomotor activity (or total ambulatory distance) was also monitored in order to determine the putative sedative or psychostimulant effects of the experimental procedures.

Grip strength test: A grip strength meter (Ugo Basile, Varese, Italy) was used to assess forelimbs strength by sensing the peak amount of force an animal applies in grasping a horizontal grid connected to a force transducer. To measure grip strength, the experimenter held the animal by the base of the tail, allowing the mice to grasp the grid with its forepaws. While

grasping the grid, mice were then slowly and steadily drawn along a straight line leading away from the sensor. At the time of release of the grid, the peak force, measured in grams-force, was automatically recorded by the apparatus. Trials in which only one forepaw or hindlimbs were used, or in which the mouse left the bar without resistance were excluded. For each mouse, three consecutive trials were performed at one-minute intervals. Since the weight influences the force of an animal, the net grip strength was calculated by dividing the mean grip strength by the weight of the animal.

Locomotor assessment: Locomotor activity was measured in a circular arena (height, 30 cm; diameter, 40 cm) located in a room containing no conspicuous features (cues) and illuminated by a homogenous 30 lux white light. The total ambulatory distance was measured over a 4-min session using a video tracking software (Ethovision®XT, Noldus, Netherlands).

Tail suspension test (TST): Mice were suspended by the tail using an adhesive tape to a platform. The duration of immobility over a 6 min period was continually manually measured. An animal was considered as immobile when there was no movement of the head, extremities or the torso. For the TST mouse behaviour was video recorded (Logitech HD Webcam (c270), set up on an hp PC) for subsequent offline analyses experimenters blinded to the treatment.

Forced swim test (FST): Mice were individually placed in a plastic beaker (18.8 cm diameter, 22 cm high) filled with water (23–24 °C) to a height of 16 cm, and the time spent floating on the water (immobility time, sec) was measured. The final 4 min of the 6 min testing period was manually observed as previously described [95]. Immobility was measured as the time when the animal floated motionless in water, with movements necessary to keep its head above water while mobility was a measure of vigorous movements of forepaws and hindpaws breaking the surface of the water.

Novelty-suppressed feeding: The test was performed with 24-hour food deprivation followed by placing the mice into the testing area for 60min. Mice were placed into a new brightly illuminated test environment (39cmx26cm) where a single food pellet was centrally placed on a white circular filter paper and illuminated to 60 lux. The time was measured to the first feeding event, and the animal was returned to their home cage where they were allowed to eat pre-weighed food over a period of 5 min. Latency to the first eating episode was used as an index of induced anxiety-like behaviour in a 10min testing period. The total volume of the food pellet consumed in the home cage provided a measure of appetite.

Tissue dissection and preparation. Mice were anesthetized with isoflurane, weighed and sacrificed by decapitation at 12-13 weeks post-surgery. For a subset of animals that had not

undergone any behaviour analyses animals were sacrificed by isoflurane inhalation and cervical dislocation. The brain was immediately removed rinsed in dissection buffer; in ice-cold PBS supplemented with Protease and Phosphatase Inhibitor (Merck, France) and 10nM of Phenylmethanesulfonyl fluoride (Merck, France), microdissected in ice-cold dissection buffer. FCs were further dissected using bregma coordinates 3.20 mm to 1.32 mm[96] and stored at -80°C until use. For all animals, hearts and tibia were dissected, measured weighed, and stored for further analyses.

Triphenyltetrazolium (TTC). Dissected hearts were quickly rinsed in cold PBS cross sections were obtained using a Zivic Mouse Heart Matrix (Zivic) and 200 μm slices were incubated in 1% TTC at 37°C incubator for 10 min. Slices were gently removed from TTC and placed in 4% paraformaldehyde (Sigma) at 4°C for 24 h. The sections were rinsed gently in saline, placed within clear plastic sheets and images of TTC stained sections were captured using a digital scanner and measured as previously described[97].

Mass Spectroscopy. **Sample Preparation**. Mouse tissues were weighed accurately (60 to 120 mg) and homogenized using a Bead Mill Homogenizer (Fisherbrand) following the addition of a solution of 8M urea in 100mM TRIS-HCL buffer (pH 8) containing completeTM protease inhibitor cocktail Roche at a ratio of 1:5 (w:v) in re-enforced 1.5 mL homogenizer tubes containing 50mg glass beads. The samples were homogenized with 3 bursts of 60 seconds at speed of 5 m/s. The homogenates were centrifuged at 9,000 g for 10 min. The protein concentration for each homogenate was determined using a Bradford assay. Two hundred μg of protein were extracted using ice-cold acetone precipitation (1:5, v/v). The protein pellet was dissolved in 100 μL of 50 mM TRIS-HCl buffer (pH 8) and the solution was mixed with a Disruptor Genie used at maximum speed (2,800 rpm) for 15 minutes and sonicated to improve protein dissolution yield. The proteins were denatured by heating at 120°C for 10 min using a heated reaction block. The solution was allowed to cool down 15 minutes. Proteins were reduced with 20mM DTT and the reaction was performed at 90°C for 15 minutes. Then proteins were alkylated with 40 mM IAA and the reaction was performed at room temperature for 30 min. 5 μg of proteomic-grade trypsin was added and the reaction was performed at 37°C for 24h. The protein digestion was quenched by adding 10 μL of a 1% TFA solution. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min and 100 μL of the supernatant was transferred into injection vials for analysis.

Proteomic analysis. The HPLC system was a Thermo Scientific Vanquish FLEX UHPLC system (San Jose, CA, USA). The chromatography was performed using gradient elution along with a microbore column Thermo Biobasic C18 100 × 1 mm, with a particle size of 5 μm. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.1% of formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 2 min, the ratio was maintained at 5:95. From 2 to 92 min, a linear gradient was applied up to a ratio of 40:60 and maintained for 3 min. The mobile phase composition ratio was reverted at the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 20 min. The flow rate was fixed at 50 μL/min and 5 μL of sample were injected. A Thermo Scientific Q Exactive Plus Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA) was interfaced the UHPLC system using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases and they were set at 10 and 5 arbitrary units. Auxiliary gas was heated to 200°C. The heated ESI probe was set to 4000 V and the ion transfer tube temperature was set to 300°C. MS detection was performed in positive ion mode and operating in TOP-10 Data Dependent Acquisition (DDA). A DDA cycle entailed one MS1 survey scan (m/z 400-1500) acquired at 70,000 resolution (FWHM) and precursors ions meeting user defined criteria for charge state (i.e. $z = 2,3$ or 4), monoisotopic precursor intensity (dynamic acquisition of MS2 based TOP-10 most intense ions with a minimum 1×10^5 intensity threshold). Precursor ions were isolated using the quadrupole (1.5 Da isolation width) and activated by HCD (28 NCE) and fragment ions were detected in the Orbitrap at 17,500 resolution (FWHM). Data were processed using Thermo Proteome Discoverer (version 2.3) in conjunction with SEQUEST using default settings unless otherwise specified. SEQUEST used a curated database consisting of FASTA sequences extracted from UniProt. Parameters were set as follows: MS1 tolerance of 10 ppm; MS2 mass tolerance of 0.02 Da for Orbitrap detection; enzyme specificity was set as trypsin with two missed cleavages allowed; carbamidomethylation of cysteine was set as a fixed modification; and oxidation of methionine was set as a variable modification. The minimum peptide length was set to six amino acids, and proteins identified by only one peptide were removed. Peptide-spectrum-matches (PSMs) and protein identifications were filtered at 1% false discovery rate (FDR) threshold. For protein quantification and comparative analysis, we used the peak integration feature of the Proteome Discoverer 2.3 software. For each identified protein, the average ion intensity of the unique peptides was used for protein abundance.

Protein Functional Analyses. Excel files from proteomics were read into R and the Abundance Ratio (\log_2): (Sample) / (Control), Abundance Ratio P-Value: (Sample) / (Control) and

Accession columns were retained. Accessions were converted to mouse gene symbols using the biomaRt package. Mouse gene symbols were converted to their equivalent human gene symbols using a combination of Homologene and biomaRt. Volcano plots were created for all peptides that possessed both a log ratio and p-value. Peptides missing a p-value or with a p-value > 0.01 were removed and final sets of peptides for downstream analyses were selected by requiring an absolute log₂ ratio ≥ 1.0 . Humanized gene lists were used with both Ingenuity's Pathway Analysis (IPA, Qiagen) and GeneAnalytics (GeneCardsSuite)[98]. For GeneAnalytics, three sets of gene symbols were used: genes with a log ratio ≥ 1.0 (increased abundance), genes with a log ratio ≤ -1.0 (decreased abundance) and the combined set (all). Results from the increased abundance and decreased abundance analyses were used to create barplots in R using the Gene Ontology reports with the number of genes matched (bars) and the scores (lines) given by GeneAnalytics. The Pathways section of each result was read into R in order to construct tables and networks. Networks were exported to Cytoscape^{v3.6} to create final images. Proteins that belong to functional categories selected by at least 2 out of the 3 contrasts were represented as a heatmap with the ComplexHeatmap package.

Statistical Analyses. For all experiments we estimated the statistical power and the required sample sizes with the use of the Minitab program. Data are expressed as mean \pm SD and analysed using a two-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons. The two factors used in the ANOVA are named Surgery (Sham or MI) and Treatment (Saline or RTX). When the residues of the ANOVA did not follow a normal distribution, the Kruskal-Wallis non-parametric test was applied. Unpaired-t test (normal distribution) and Mann-Whitney (non-normal distribution) were used to determine the effects of epicardial application of capsaicin. All statistical analyses were performed with GraphPrism 8.3.0. Correlations were analysed using Pearson's test. For all tests, significance level was set at $p < 0.05$.

Citations

- [1] H. Muqtadar, F. D. Testai, and P. B. Gorelick, “The Dementia of Cardiac Disease,” *Curr Cardiol Rep*, vol. 14, no. 6, pp. 732–740, Dec. 2012, doi: 10.1007/s11886-012-0304-8.
- [2] A. T. Amare, K. O. Schubert, M. Klingler-Hoffmann, S. Cohen-Woods, and B. T. Baune, “The genetic overlap between mood disorders and cardiometabolic diseases: a systematic review of genome wide and candidate gene studies,” *Transl Psychiatry*, vol. 7, no. 1, p. e1007, Jan. 2017, doi: 10.1038/tp.2016.261.
- [3] L. Leto and M. Feola, “Cognitive impairment in heart failure patients,” *J Geriatr Cardiol*, vol. 11, no. 4, pp. 316–328, Dec. 2014, doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2014.04.007.
- [4] W. Doehner *et al.*, “Heart and brain interaction in patients with heart failure: overview and proposal for a taxonomy. A position paper from the Study Group on Heart and Brain Interaction of the Heart Failure Association,” *Eur. J. Heart Fail.*, vol. 20, no. 2, pp. 199–215, 2018, doi: 10.1002/ejhf.1100.
- [5] J. K. Rustad, T. A. Stern, K. A. Hebert, and D. L. Musselman, “Diagnosis and Treatment of Depression in Patients With Congestive Heart Failure: A Review of the Literature,” *Prim Care Companion CNS Disord*, vol. 15, no. 4, 2013, doi: 10.4088/PCC.13r01511.
- [6] T. Munyombwe *et al.*, “Quality of life trajectories in survivors of acute myocardial infarction: a national longitudinal study,” *Heart*, Nov. 2019, doi: 10.1136/heartjnl-2019-315510.
- [7] C. M. Celano, A. C. Villegas, A. M. Albanese, H. K. Gaggin, and J. C. Huffman, “Depression and Anxiety in Heart Failure: a Review,” *Harv Rev Psychiatry*, vol. 26, no. 4, pp. 175–184, 2018, doi: 10.1097/HRP.0000000000000162.
- [8] A. Mbakwem, F. Aina, and C. Amadi, “Expert Opinion-Depression in Patients with Heart Failure: Is Enough Being Done?,” *Card Fail Rev*, vol. 2, no. 2, pp. 110–112, Nov. 2016, doi: 10.15420/cfr.2016:21:1.
- [9] P. C. Woltz, D. W. Chapa, E. Friedmann, H. Son, B. Akintade, and S. A. Thomas, “Effects of interventions on depression in heart failure: A systematic review,” *Heart & Lung*, vol. 41, no. 5, pp. 469–483, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.hrtlng.2012.06.002.
- [10] C. M. Park *et al.*, “Associations Between Left Ventricular Dysfunction and Brain Structure and Function: Findings From the SABRE (Southall and Brent Revisited) Study,” *JAHA*, vol. 6, no. 4, Apr. 2017, doi: 10.1161/JAHA.116.004898.
- [11] C. A. Hammond *et al.*, “Long-Term Cognitive Decline After Newly Diagnosed Heart Failure: Longitudinal Analysis in the Cardiovascular Health Study,” *Circ Heart Fail*, vol. 11, no. 3, p. e004476, Mar. 2018, doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004476.
- [12] H. Suzuki *et al.*, “Structural abnormality of the hippocampus associated with depressive symptoms in heart failure rats,” *NeuroImage*, vol. 105, pp. 84–92, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.10.040.
- [13] M. A. Woo *et al.*, “Regional Hippocampal Damage in Heart Failure,” *Eur J Heart Fail*, vol. 17, no. 5, pp. 494–500, May 2015, doi: 10.1002/ejhf.241.
- [14] T. Niizeki, T. Iwayama, E. Ikeno, and M. Watanabe, “Prognostic Importance of Hippocampal Atrophy in Patients With Chronic Heart Failure,” *The American Journal of Cardiology*, vol. 123, no. 7, pp. 1109–1113, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.amjcard.2018.12.035.
- [15] R. D. Foreman, “Mechanisms of Cardiac Pain,” *Annual Review of Physiology*, vol. 61, no. 1, pp. 143–167, 1999, doi: 10.1146/annurev.physiol.61.1.143.
- [16] D. F. Cechetto, “Cortical control of the autonomic nervous system,” *Experimental Physiology*, vol. 99, no. 2, pp. 326–331, 2014, doi: 10.1113/expphysiol.2013.075192.
- [17] M. Pandya, M. Altinay, D. A. Malone, and A. Anand, “Where in the Brain Is Depression?,” *Curr Psychiatry Rep*, vol. 14, no. 6, pp. 634–642, Dec. 2012, doi: 10.1007/s11920-012-0322-7.
- [18] W. Liu *et al.*, “The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex,” *Neural Plast*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/6871089.
- [19] M. S. George, T. A. Ketter, and R. M. Post, “Prefrontal cortex dysfunction in clinical depression,” *Depression*, vol. 2, no. 2, pp. 59–72, 1994, doi: 10.1002/depr.3050020202.
- [20] J. L. Ardell *et al.*, “Translational neurocardiology: preclinical models and cardioneural integrative aspects,” *J Physiol*, vol. 594, no. 14, pp. 3877–3909, Jul. 2016, doi: 10.1113/JP271869.
- [21] K. Shivkumar *et al.*, “Clinical neurocardiology defining the value of neuroscience-based cardiovascular therapeutics,” *J Physiol*, vol. 594, no. 14, pp. 3911–3954, Jul. 2016, doi: 10.1113/JP271870.
- [22] P. Lindgren, A. Rosén, P. Strandberg, and B. Uvnäs, “The sympathetic vasodilator outflow — A cortico-spinal autonomic pathway,” *Journal of Comparative Neurology*, vol. 105, no. 1, pp. 95–109, 1956, doi: 10.1002/cne.901050105.
- [23] J. H. Coote and R. A. Chauhan, “The sympathetic innervation of the heart: Important new insights,” *Autonomic Neuroscience*, vol. 199, pp. 17–23, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.autneu.2016.08.014.
- [24] W.-W. Chen, X.-Q. Xiong, Q. Chen, Y.-H. Li, Y.-M. Kang, and G.-Q. Zhu, “Cardiac sympathetic afferent reflex and its implications for sympathetic activation in chronic heart failure and hypertension,” *Acta Physiologica*, vol. 213, no. 4, pp. 778–794, 2015, doi: 10.1111/apha.12447.

- [25] M. R. Zahner, D.-P. Li, S.-R. Chen, and H.-L. Pan, "Cardiac vanilloid receptor 1-expressing afferent nerves and their role in the cardiogenic sympathetic reflex in rats," *The Journal of Physiology*, vol. 551, no. 2, pp. 515–523, 2003, doi: 10.1113/jphysiol.2003.048207.
- [26] W. Wang, H. D. Schultz, and R. Ma, "Cardiac sympathetic afferent sensitivity is enhanced in heart failure," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 277, no. 2, pp. H812–H817, Aug. 1999, doi: 10.1152/ajpheart.1999.277.2.H812.
- [27] D. C. Brown, "Resiniferatoxin: The Evolution of the 'Molecular Scalpel' for Chronic Pain Relief," *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 9, no. 3, Aug. 2016, doi: 10.3390/ph9030047.
- [28] M. Zhou *et al.*, "Cardiac Sympathetic Afferent Denervation Protects Against Ventricular Arrhythmias by Modulating Cardiac Sympathetic Nerve Activity During Acute Myocardial Infarction," *Med Sci Monit*, vol. 25, pp. 1984–1993, Mar. 2019, doi: 10.12659/MSM.914105.
- [29] H.-J. Wang, W. Wang, K. G. Cornish, G. J. Rozanski, and I. H. Zucker, "Cardiac Sympathetic Afferent Denervation Attenuates Cardiac Remodeling and Improves Cardiovascular Dysfunction in Rats with Heart Failure," *Hypertension*, vol. 64, no. 4, pp. 745–755, Oct. 2014, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03699.
- [30] D. Senador *et al.*, "Pharmacological cardiac sympathetic afferent denervation in pacing-induced heart failure," *The FASEB Journal*, vol. 31, no. 1_supplement, p. 844.2-844.2, Apr. 2017, doi: 10.1096/fasebj.31.1_supplement.844.2.
- [31] K. Yoshie *et al.*, "Cardiac TRPV1 afferent signaling promotes arrhythmogenic ventricular remodeling after myocardial infarction," Feb. 13, 2020. <https://insight.jci.org/articles/view/124477/pdf> (accessed Feb. 13, 2020).
- [32] H. Wang, G. J. Rozanski, and I. H. Zucker, "Cardiac sympathetic afferent reflex control of cardiac function in normal and chronic heart failure states," *J Physiol*, vol. 595, no. 8, pp. 2519–2534, Apr. 2017, doi: 10.1113/JP273764.
- [33] K. Yoshie *et al.*, "Cardiovascular Neurohormonal Regulation: Cardiac vanilloid receptor-1 afferent depletion enhances stellate ganglion neuronal activity and efferent sympathetic response to cardiac stress," *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, vol. 314, no. 5, p. H954, May 2018, doi: 10.1152/ajpheart.00593.2017.
- [34] R. Kumar *et al.*, "Reduced regional brain cortical thickness in patients with heart failure," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 5, p. e0126595, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0126595.
- [35] A. Frey *et al.*, "Experimental heart failure causes depression-like behavior together with differential regulation of inflammatory and structural genes in the brain," *Front. Behav. Neurosci.*, vol. 8, 2014, doi: 10.3389/fnbeh.2014.00376.
- [36] K. A. Ziegler, A. Ahles, T. Wille, J. Kerler, D. Ramanujam, and S. Engelhardt, "Local sympathetic denervation attenuates myocardial inflammation and improves cardiac function after myocardial infarction in mice," *Cardiovasc Res*, vol. 114, no. 2, pp. 291–299, Feb. 2018, doi: 10.1093/cvr/cvx227.
- [37] D. C. Mascarenhas, K. S. Gomes, and R. L. Nunes-de-Souza, "Anxiogenic-like effect induced by TRPV1 receptor activation within the dorsal periaqueductal gray matter in mice," *Behavioural Brain Research*, vol. 250, pp. 308–315, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.bbr.2013.05.023.
- [38] J. F. Thayer and R. D. Lane, "Claude Bernard and the heart–brain connection: Further elaboration of a model of neurovisceral integration," *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 33, no. 2, pp. 81–88, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.08.004.
- [39] J. A. Armour, "The Role of Peripheral Autonomic Neurons With P1- and/or P2-Purinoreceptors in Cardiac Regulation," in *Cardiovascular Biology of Purines*, G. Burnstock, J. G. Dobson, B. T. Liang, and J. Linden, Eds. Boston, MA: Springer US, 1998, pp. 326–341.
- [40] Tahsili-Fahadan Pouya and Geocadin Romergryko G., "Heart–Brain Axis," *Circulation Research*, vol. 120, no. 3, pp. 559–572, Feb. 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308446.
- [41] Ichijo Yasuhiro *et al.*, "Impaired Frontal Brain Activity in Patients With Heart Failure Assessed by Near-Infrared Spectroscopy," *Journal of the American Heart Association*, vol. 9, no. 3, p. e014564, Feb. 2020, doi: 10.1161/JAHA.119.014564.
- [42] M. A. Woo, P. M. Macey, G. C. Fonarow, M. A. Hamilton, and R. M. Harper, "Regional brain gray matter loss in heart failure," *J. Appl. Physiol.*, vol. 95, no. 2, pp. 677–684, Aug. 2003, doi: 10.1152/jappphysiol.00101.2003.
- [43] V. Krishnan and E. J. Nestler, "Animal Models of Depression: Molecular Perspectives," *Curr Top Behav Neurosci*, vol. 7, pp. 121–147, 2011, doi: 10.1007/7854_2010_108.
- [44] J. F. Cryan, C. Mombereau, and A. Vassout, "The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice," *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 29, no. 4, pp. 571–625, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.009.
- [45] D. Carlson *et al.*, "Dynamically Timed Stimulation of Corticolimbic Circuitry Activates a Stress-Compensatory Pathway," *Biological Psychiatry*, vol. 82, no. 12, pp. 904–913, Dec. 2017, doi:

- 10.1016/j.biopsycho.2017.06.008.
- [46] M. R. Warden *et al.*, “A prefrontal cortex–brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge,” *Nature*, vol. 492, no. 7429, pp. 428–432, Dec. 2012, doi: 10.1038/nature11617.
- [47] E. Navratilova and F. Porreca, “Reward and motivation in pain and pain relief,” *Nature Neuroscience*, vol. 17, no. 10, Art. no. 10, Oct. 2014, doi: 10.1038/nn.3811.
- [48] L. M. Shin and I. Liberzon, “The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders,” *Neuropsychopharmacology*, vol. 35, no. 1, pp. 169–191, Jan. 2010, doi: 10.1038/npp.2009.83.
- [49] J. Q. Wang and L. Mao, “The ERK Pathway: Molecular Mechanisms and Treatment of Depression,” *Mol. Neurobiol.*, vol. 56, no. 9, pp. 6197–6205, Sep. 2019, doi: 10.1007/s12035-019-1524-3.
- [50] C. S. Goldsmith and D. Bell-Pedersen, “Diverse Roles for MAPK Signaling in Circadian Clocks,” *Adv Genet*, vol. 84, pp. 1–39, 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-407703-4.00001-3.
- [51] K. Kalita, B. Kuzniewska, and L. Kaczmarek, “MKLs: co-factors of serum response factor (SRF) in neuronal responses,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 44, no. 9, pp. 1444–1447, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.biocel.2012.05.008.
- [52] V. Janssens and J. Goris, “Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling,” *Biochem J*, vol. 353, no. Pt 3, pp. 417–439, Feb. 2001.
- [53] J. P. Fawcett *et al.*, “Nck adaptor proteins control the organization of neuronal circuits important for walking,” *PNAS*, vol. 104, no. 52, pp. 20973–20978, Dec. 2007, doi: 10.1073/pnas.0710316105.
- [54] D. Hilfiker-Kleiner, U. Landmesser, and H. Drexler, “Molecular Mechanisms in Heart Failure: Focus on Cardiac Hypertrophy, Inflammation, Angiogenesis, and Apoptosis,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 48, no. 9 Supplement, pp. A56–A66, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.jacc.2006.07.007.
- [55] J. J. Saucerman and A. D. McCulloch, “Cardiac-Adrenergic Signaling From Subcellular Microdomains to Heart Failure,” 2006.
- [56] T. Tsuda *et al.*, “Corticotropin releasing hormone receptor 2 exacerbates chronic cardiac dysfunction,” *J Exp Med*, vol. 214, no. 7, pp. 1877–1888, Jul. 2017, doi: 10.1084/jem.20161924.
- [57] D. Arvanitis and A. Davy, “Eph/ephrin signaling: networks,” *Genes Dev.*, vol. 22, no. 4, pp. 416–429, Feb. 2008, doi: 10.1101/gad.1630408.
- [58] H.-M. Jin, S. Shrestha Muna, T. R. Bagalkot, Y. Cui, B. K. Yadav, and Y.-C. Chung, “The effects of social defeat on behavior and dopaminergic markers in mice,” *Neuroscience*, vol. 288, pp. 167–177, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.12.043.
- [59] C.-K. Huang, S. O. Lee, E. Chang, H. Pang, and C. Chang, “Androgen receptor (AR) in cardiovascular diseases,” *Journal of Endocrinology*, vol. 229, no. 1, pp. R1–R16, Apr. 2016, doi: 10.1530/JOE-15-0518.
- [60] C. V. Chen, J. L. Brummet, J. S. Lonstein, Cynthia. L. Jordan, and S. Marc. Breedlove, “New knockout model confirms a role for androgen receptors in regulating anxiety-like behaviors and HPA response in mice,” *Horm Behav*, vol. 65, no. 3, pp. 211–218, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.yhbeh.2014.01.001.
- [61] K. E. Joynt, D. J. Whellan, and C. M. O’Connor, “Depression and cardiovascular disease: mechanisms of interaction,” *Biological Psychiatry*, vol. 54, no. 3, pp. 248–261, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0006-3223(03)00568-7.
- [62] A. B. Segarra *et al.*, “The Brain-Heart Connection: Frontal Cortex and Left Ventricle Angiotensinase Activities in Control and Captopril-Treated Hypertensive Rats—A Bilateral Study,” *Int J Hypertens*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/156179.
- [63] D. Li *et al.*, “Asphyxia-activated corticocardiac signaling accelerates onset of cardiac arrest,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 112, no. 16, pp. E2073–E2082, Apr. 2015, doi: 10.1073/pnas.1423936112.
- [64] F. Tian *et al.*, “Adrenergic Blockade Bi-directionally and Asymmetrically Alters Functional Brain-Heart Communication and Prolongs Electrical Activities of the Brain and Heart during Asphyxic Cardiac Arrest,” *Front. Physiol.*, vol. 9, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.00099.
- [65] C. R. Sullivan, R. H. Koene, K. Hasselfeld, S. O’Donovan, A. Ramsey, and R. E. McCullumsmith, “Neuron-specific deficits of bioenergetic processes in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia,” *Mol Psychiatry*, vol. 24, no. 9, pp. 1319–1328, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41380-018-0035-3.
- [66] P. Mergenthaler, U. Lindauer, G. A. Dienel, and A. Meisel, “Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function,” *Trends Neurosci*, vol. 36, no. 10, pp. 587–597, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.tins.2013.07.001.
- [67] N. B. Schwartz and M. S. Domowicz, “Proteoglycans in brain development and pathogenesis,” *FEBS Lett.*, vol. 592, no. 23, pp. 3791–3805, 2018, doi: 10.1002/1873-3468.13026.
- [68] K. A. Mulligan and B. N. R. Cheyette, “Neurodevelopmental Perspectives on Wnt Signaling in Psychiatry,” *Mol Neuropsychiatry*, vol. 2, no. 4, pp. 219–246, Feb. 2017, doi: 10.1159/000453266.
- [69] C. Toledo *et al.*, “Cognitive impairment in heart failure is associated with altered Wnt signaling in the hippocampus,” *Aging (Albany NY)*, vol. 11, no. 16, pp. 5924–5942, Aug. 2019, doi: 10.18632/aging.102150.
- [70] D. A. Golombek and R. E. Rosenstein, “Physiology of Circadian Entrainment,” *Physiological Reviews*, vol.

- 90, no. 3, pp. 1063–1102, Jul. 2010, doi: 10.1152/physrev.00009.2009.
- [71] S. Crnko, B. C. Du Pré, J. P. G. Sluijter, and L. W. Van Laake, “Circadian rhythms and the molecular clock in cardiovascular biology and disease,” *Nat Rev Cardiol*, vol. 16, no. 7, pp. 437–447, 2019, doi: 10.1038/s41569-019-0167-4.
- [72] A. Germain and D. J. Kupfer, “CIRCADIAN RHYTHM DISTURBANCES IN DEPRESSION,” *Hum Psychopharmacol*, vol. 23, no. 7, pp. 571–585, Oct. 2008, doi: 10.1002/hup.964.
- [73] B. K. Attwood *et al.*, “Neurotrophin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety,” *Nature*, vol. 473, no. 7347, pp. 372–375, May 2011, doi: 10.1038/nature09938.
- [74] A. Ramos-Prats, J. Kölldorfer, E. Paolo, M. Zeidler, G. Schmid, and F. Ferraguti, “An Appraisal of the Influence of the Metabotropic Glutamate 5 (mGlu5) Receptor on Sociability and Anxiety,” *Front Mol Neurosci*, vol. 12, p. 30, 2019, doi: 10.3389/fnmol.2019.00030.
- [75] R. L. Gannon and M. J. Millan, “Positive and negative modulation of circadian activity rhythms by mGluR5 and mGluR2/3 metabotropic glutamate receptors,” *Neuropharmacology*, vol. 60, no. 2, pp. 209–215, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.08.022.
- [76] R. D’Mello and A. H. Dickenson, “Spinal cord mechanisms of pain,” *British Journal of Anaesthesia*, vol. 101, no. 1, pp. 8–16, Jul. 2008, doi: 10.1093/bja/aen088.
- [77] G. J. Ter Horst, R. W. Hautvast, M. J. De Jongste, and J. Korff, “Neuroanatomy of cardiac activity-regulating circuitry: a transneuronal retrograde viral labelling study in the rat,” *Eur J Neurosci*, vol. 8, no. 10, pp. 2029–2041, Oct. 1996, doi: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb00723.x.
- [78] C. G. Van Eden and R. M. Buijs, “Functional neuroanatomy of the prefrontal cortex: autonomic interactions,” in *Progress in Brain Research*, vol. 126, Elsevier, 2000, pp. 49–62.
- [79] A. B. Segarra *et al.*, “Asymmetrical effect of captopril on the angiotensinase activity in frontal cortex and plasma of the spontaneously hypertensive rats: expanding the model of neuroendocrine integration,” *Behav. Brain Res.*, vol. 230, no. 2, pp. 423–427, May 2012, doi: 10.1016/j.bbr.2012.02.039.
- [80] H. S. Díaz, C. Toledo, D. C. Andrade, N. J. Marcus, and R. D. Rio, “Neuroinflammation in heart failure: new insights for an old disease,” *The Journal of Physiology*, vol. 598, no. 1, pp. 33–59, 2020, doi: <https://doi.org/10.1113/JP278864>.
- [81] A. Guggilam, K. P. Patel, M. Haque, P. J. Ebenezer, D. R. Kapusta, and J. Francis, “Cytokine blockade attenuates sympathoexcitation in heart failure: Cross-talk between nNOS, AT-1R and cytokines in the hypothalamic paraventricular nucleus,” *European Journal of Heart Failure*, vol. 10, no. 7, pp. 625–634, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2008.05.004>.
- [82] R. Dantzer, J. C. O’Connor, G. G. Freund, R. W. Johnson, and K. W. Kelley, “From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain,” *Nat Rev Neurosci*, vol. 9, no. 1, pp. 46–56, Jan. 2008, doi: 10.1038/nrn2297.
- [83] A. B. Pullen, V. Kain, C. N. Serhan, and G. V. Halade, “Molecular and Cellular Differences in Cardiac Repair of Male and Female Mice,” *J Am Heart Assoc*, vol. 9, no. 8, Apr. 2020, doi: 10.1161/JAHA.119.015672.
- [84] T. K. Brar, “Effect of Different Phases of Menstrual Cycle on Heart Rate Variability (HRV),” *JCDR*, 2015, doi: 10.7860/JCDR/2015/13795.6592.
- [85] F. Mena and L. Benoit, “Molecular programs underlying differences in the expression of mood disorders in males and females,” *Brain Research*, vol. 1719, pp. 89–103, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.brainres.2019.05.016.
- [86] M. Kermorgant *et al.*, “Evaluation of upconverting nanoparticles towards heart theranostics,” *PLOS ONE*, vol. 14, no. 12, p. e0225729, Dec. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0225729.
- [87] M. Merentie *et al.*, “Mouse ECG findings in aging, with conduction system affecting drugs and in cardiac pathologies: Development and validation of ECG analysis algorithm in mice,” *Physiol Rep*, vol. 3, no. 12, Dec. 2015, doi: 10.14814/phy2.12639.
- [88] “Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology,” *Eur. Heart J.*, vol. 17, no. 3, pp. 354–381, Mar. 1996.
- [89] N. R. Lomb, “Least-squares frequency analysis of unequally spaced data,” *Astrophys Space Sci*, vol. 39, no. 2, pp. 447–462, Feb. 1976, doi: 10.1007/BF00648343.
- [90] G. D. Clifford and L. Tarassenko, “Quantifying errors in spectral estimates of HRV due to beat replacement and resampling,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 52, no. 4, pp. 630–638, Apr. 2005, doi: 10.1109/TBME.2005.844028.
- [91] H. F. Jelinek, M. T. P. Adam, R. Kroner, and D. J. Cornforth, “Diagnostic accuracy of random ECG in primary care for early, asymptomatic cardiac autonomic neuropathy,” *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 11, no. 6, pp. 1165–1173, Nov. 2017, doi: 10.1177/1932296817703670.
- [92] G. Liu, J. B. Iden, K. Kovithavongs, R. Gulamhusein, H. J. Duff, and K. M. Kavanagh, “In vivo temporal and spatial distribution of depolarization and repolarization and the illusive murine T wave,” *The Journal of Physiology*, vol. 555, no. 1, pp. 267–279, 2004, doi: 10.1113/jphysiol.2003.054064.

- [93] M. Merentie *et al.*, “Mouse ECG findings in aging, with conduction system affecting drugs and in cardiac pathologies: Development and validation of ECG analysis algorithm in mice,” *Physiological Reports*, vol. 3, no. 12, p. e12639, 2015, doi: 10.14814/phy2.12639.
- [94] G. F. Mitchell, A. Jeron, and G. Koren, “Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse,” *Am. J. Physiol.*, vol. 274, no. 3, pp. H747-751, 1998, doi: 10.1152/ajpheart.1998.274.3.H747.
- [95] A. AU - Can, D. T. AU - Dao, M. AU - Arad, C. E. AU - Terrillion, S. C. AU - Piantadosi, and T. D. AU - Gould, “The Mouse Forced Swim Test,” *JoVE*, no. 59, p. e3638, Jan. 2012, doi: 10.3791/3638.
- [96] “Paxinos and Franklin’s the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates,” *Librairie Lavoisier*. https://www.lavoisier.fr/livre/medecine/paxinos-and-franklin-s-the-mouse-brain-in-stereotaxic-coordinates/descriptif_3787856 (accessed Feb. 07, 2020).
- [97] M. Kermorgant *et al.*, “Evaluation of upconverting nanoparticles towards heart theranostics,” *PLOS ONE*, vol. 14, no. 12, p. e0225729, Dec. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0225729.
- [98] S. Ben-Ari Fuchs *et al.*, “GeneAnalytics: An Integrative Gene Set Analysis Tool for Next Generation Sequencing, RNAseq and Microarray Data,” *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, vol. 20, no. 3, pp. 139–151, Mar. 2016, doi: 10.1089/omi.2015.0168.

Acknowledgements

We acknowledge core support from Animal facility ANEXPLO, CREFRE US006 Rangueil, and in particular Xavier Sudre for his expertise. We would like to thank Camille Deshayes, Du Nguyen and Marie-Helene Seguelas for their technical advice and assistance. We would like to thank Pascal Rouillet for his insight throughout the project. This work was funded by the Initiatives d’Excellence program (IDEX) at the Université Paul Sabatier, Toulouse III, and the Fondation de France grant number RAF18002BBA awarded to Dina N Arvanitis. Jennifer Ben Salem was supported by the Fondation de France Grant number RAF18002BBA awarded to Dina N Arvanitis. The proteomics section of this project was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry discovery grant no. RGPIN-2015-05071) and, the proteomic laboratory instruments were funded by the Canadian Foundation for Innovation (CFI) and the *Fonds de Recherche du Québec (FRQ)*, the Government of Quebec (F.Beaudry CFI John R. Evans Leaders grant no. 36706). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data availability

The data that support the findings from this study are available from the corresponding author upon reasonable request. All proteomic data can be found online at Mendeley Data, V1, doi: 10.17632/2kdzsz6s3h.1

Table 1. Resting heart rate variability, QT and QTc intervals.

	Sham (n = 8)	MI/S (n = 6)	RTX (n = 6)	MI/RTX (n = 6)
SDNN (ms)	1.52 ± 0.73 (0.91 - 2.13)	2.00 ± 1.03 (0.92 - 3.08)	2.02 ± 0.76 (1.22 - 2.82)	2.67 ± 1.55 (1.04 - 4.30)
RMSSD (ms)	1.06 ± 0.60 (0.56 - 1.56)	0.75 ± 0.38 (0.35 - 1.15)	1.21 ± 1.04 (0.12 - 2.30)	1.18 ± 0.53 (0.62 - 1.73)
LF (nu)	23.86 ± 8.47 (16.78 - 30.94)	44.98 ± 9.42** (35.09 - 54.87)	19.52 ± 11.79 (7.15 - 31.90)	17.62 ± 11.75††† (5.29 - 29.94)
HF (nu)	43.05 ± 17.51 (28.42 - 57.69)	41.03 ± 11.16 (29.32 - 52.74)	58.62 ± 18.89 (38.80 - 78.44)	51.03 ± 19.13 (30.95 - 71.11)
LF/HF	0.63 ± 0.28 (0.40 - 0.86)	1.23 ± 0.62* (0.58 - 1.88)	0.40 ± 0.31 (0.08 - 0.72)	0.40 ± 0.27†† (0.12 - 0.69)
SD1 (ms)	0.75 ± 0.43 (0.39 - 1.11)	0.53 ± 0.27 (0.25 - 0.81)	0.85 ± 0.74 (0.08 - 1.62)	0.83 ± 0.37 (0.44 - 1.22)
SD2 (ms)	1.98 ± 1.02 (1.13 - 2.84)	2.74 ± 1.51 (1.15 - 4.33)	2.62 ± 1.13 (1.44 - 3.80)	3.63 ± 2.28 (1.23 - 6.02)
QT (ms)	50.46 ± 6.76 (44.81 - 56.11)	58.57 ± 7.51 (50.68 - 66.45)	48.15 ± 13.62 (33.86 - 62.44)	44.93 ± 9.78 (34.67 - 55.19)
QTc (ms)	42.46 ± 4.06 (39.07 - 45.85)	50.15 ± 6.87 (42.94 - 57.36)	42.22 ± 9.83 (31.90 - 52.53)	38.32 ± 7.95† (29.98 - 46.66)

*HF (nu): high frequency in normalized units, LF (nu): low frequency in normalized units, LF/HF: sympathovagal balance, RMSSD: root mean square of successive differences between normal heartbeats, SDNN: standard deviations of normal-to-normal intervals, SD1: standard deviation of the short-term R-R interval variability, SD2: standard deviation of the short- and long-term R-R interval variability. *: p<0.05 between Sham vs MI/S, **: p<0.01 between Sham vs MI/S †: p<0.05 between MI/S vs MI/RTX, ††: p<0.01 between MI/S vs MI/RTX †††: p<0.001 between MI/S vs MI/RTX. Values in parentheses represent 95% CI of the mean.*

Table 2. Morphological data for mice at 12-weeks post surgery.

	Sham (n = 5)	MI/S (n = 10)	RTX (n = 9)	MI/RTX (n = 13)
HW:TL	0.141 ± 0.014 (0.123 - 0.158)	0.188 ± 0.031* (0.166 - 0.209)	0.138 ± 0.011 (0.129 - 0.147)	0.147 ± 0.011 (0.140 - 0.154)
BW:TL	0.319 ± 0.022 (0.291 - 0.346)	0.325 ± 0.017 (0.313 - 0.337)	0.317 ± 0.020 (0.301 - 0.332)	0.323 ± 0.028 (0.306 - 0.340)
Weight F:I	1.221 ± 0.054 (1.154 - 1.287)	1.286 ± 0.084 (1.225 - 1.346)	1.237 ± 0.058 (1.192 - 1.281)	1.275 ± 0.094 (1.218 - 1.332)

*BW: brain weight, HT: heart weight, TL: tibia length. *: p<0.05 between Sham vs MI/S Values in parentheses represent 95% CI of the mean.*

Table 3. Selected pathways for MI/S.

Pathway	Upregulated	Downregulated
Mesodermal Commitment Pathway	<i>Ahdcl, Cul4b, Map2k3, Arid5b, Foxo1</i>	<i>Apc, Tbx6, Lrpprc, Elk4, Nkx2-1, Srf</i>
Circadian Entrainment	<i>Cacna1h, Adcy7, Per2, Atf6b, Kcnq2</i>	<i>Slc1a7, Mmp2, Cacna1a, Calml3, Ppp2r1b, Kcnq4, Rela, Gnal, Gnas</i>
AIF Pathway	<i>Parp1</i>	<i>Aifm1</i>
Respiratory Electron Transport, ATP Synthesis By Chemiosmotic Coupling, and Heat Production By Uncoupling Proteins	<i>Adam17, Arid1a, Vdac3, Ndufa6, Cox7a2, Calml3, Ndufs2, Adcy7, Rela, Sco1, Uqcr2, Kdm1a, Atp5pb, Gnas</i>	<i>Ndufb9, Ndufab1, Lrpprc, Map2k3, Idh3g, Gnal</i>
Collagen Chain Trimerization	<i>Klk1b1, Loxl3, Pcolce, Kng1, Col19a1</i>	<i>F8, Col9a2, Loxl4, Col15a1</i>
Androgen Receptor Signaling Pathway	<i>Rela, Runx2, Kdm1a</i>	<i>Klk1b1, Ptk2, Foxo1</i>
Calcium Signaling Pathway	<i>Cacna1h, Adcy7, Trdn, Gnal, Gnas</i>	<i>Cacna1a, Vdac3, Calml3, Lhcgr</i>
Histidine Degradation	<i>Amdhd1</i>	<i>Fted</i>
ERK Signaling	<i>Adam17, Cbl, Elk4, Ppp2r1b, Dsp, Nrp2, Brf1, Sema5a, Ephb1, Gnal, Fgf12, Foxo1, Gnas</i>	<i>Il9r, Cacna1a, Apc, Nck2, Col9a2, Cacna1h, Map2k3, Adcy7, Ptk2, Col15a1, Cdh17, Gdf10, Nrg2, Map3k10, Srf, Col19a1, Ppp1r13b</i>
Corticotropin-releasing Hormone Signaling Pathway	<i>Tfap2a, Ptk2, Rela, Parp1</i>	<i>Cacna1h, Gnas</i>
Apoptotic Pathways in Synovial Fibroblasts	<i>Vdac3, Map2k3, Ppp2r1b, Parp1, Gdf10, Nrg2, Sema5a, Foxo1, Gnas, Tert</i>	<i>Mmp2, Cacna1a, Aifm1, Cbl, Cacna1h, Elk4, Ptk2, Nrp2, Gnal, Fgf12, Ppp1r13b</i>
Serotonin Receptor 4/6/7 and NR3C Signaling		<i>El4k, Srf, Gnas</i>
CTLA4 Signaling	<i>Ap1g2, Ppp2r1b, H2-Aa</i>	<i>Ap1m1, Gnal</i>
Human T-cell Leukemia Virus 1 Infection	<i>Adcy7, Atf6b, Cdc16, Tert</i>	<i>Vdac3, Elk4, Rela, H2-Aa, Srf</i>
Axon Guidance	<i>Nck2, Ptk2, Lrrc4, Sema5a, Sema6d, Sema3e</i>	<i>Boc, Ephb1</i>
EphB-EphrinB Signaling	<i>Cbl, Ptk2, Gnal, Gnas</i>	<i>Nck2, Ephb1, Tubb6</i>
Regulation of Lipid Metabolism Insulin Signaling-generic Cascades	<i>Adam17, Map2k3, Ptk2, Inpp1, Nrg2</i>	<i>Slc2a4, Cbl, Calml3, Elk4, Foxo1</i>
Beta-Adrenergic Signaling	<i>Nck2, Elk4</i>	<i>Klk1b1, Cacna1a, Slc2a4, Cbl, Map2k3, Ppp2r1b, Gnal, Gnas, Ppp1r13b</i>
Regulation of Wnt-mediated Beta Catenin Signaling and Target Gene Transcription		<i>Mmp2, Apc, Adcy7, Bcl9, Tert</i>
Development ERBB-family Signaling	<i>Nck2, Rela, Nrg2, Map3k10</i>	<i>Mmp2, Cbl, Ptk2</i>

Table 4. Selected pathways for RTX.

Pathway	Upregulated	Downregulated
Respiratory Electron Transport, ATP Synthesis By Chemiosmotic Coupling, and Heat Production By Uncoupling Proteins	<i>Gpr37,Ldha,Adcy1,Atf6,Grin2b,Ndufb10,Pdk2,Cpt1b,Psen1,Pdk3,Sco1,Npr1,Kdm1a</i>	<i>Arid1a,Vdac3,Ndufa6,Bdnf,Ndufs3,Ndufa10,Tnfrsf1a,Etfa,Grm5,Acsl3</i>
Arf6 Trafficking Events	<i>Exoc3,Arf6</i>	<i>Klc1,Slc2a4,Asap2</i>
FMLP Pathway	<i>Adcy1,Vegfa,Grin2b,Hdac7,Psmd7,Hdac5,Slc8a3,Phka1,Map3k2,Grm5</i>	<i>Arhgef4,Psmd3,Gnao1,Psmb1</i>
Glucagon Signaling Pathway	<i>Ppp4c,Ldha,Acacb,Cpt1b</i>	<i>Pfjfp,Pfkl,Phka1</i>
Cori Cycle	<i>Ldha,Slc2a4</i>	<i>Pfjfp</i>
Sertoli-Sertoli Cell Junction Dynamics	<i>Atf6,Ppp2r5e,Exoc3,Ppp2r1b,Tnfrsf1a,Map3k2,Npr1,Gucy2f</i>	<i>Cldn19,Myh11,Cstf2t,Nectin1,Rab28,Itga2b,Rab33a</i>
Cyclins and Cell Cycle Regulation	<i>Ppp2r5e,Ppp2r1b,Rbl1,Hdac5</i>	<i>Hdac7,Atr</i>
Mitotic Metaphase and Anaphase	<i>Ppp2r1b,Psmd7,Nup107,Cenpu,Rcc2,Psmb1</i>	<i>Itgb3bp,Ppp2r5e,Psmd3</i>
HIF-1-alpha Transcription Factor Network	<i>Ldha,Pfkl,Tert</i>	<i>Vegfa,Hdac7</i>
Adipocytokine Signaling Pathway	<i>Acacb</i>	<i>Slc2a4,Cpt1b,Tnfrsf1a,Acsl3</i>
Beta-Adrenergic Signaling	<i>Slc2a4,Bdnf,Ppp2r1b,Psmd7,Gnao1,Itga2b,Ryr1</i>	<i>Adcy1,Ppp2r5e,Psmd3,Eif4g1,Psmb1</i>
Signaling By Rho GTPases	<i>Depdc7,Arhgef4,Ppp2r5e,Obscn,Nckipsd,Fam13a,Nup107,Cenpu,Rcc2,Cyfip1,Kdm1a</i>	<i>Klc1,Itgb3bp,Myh11,Ppp2r1b</i>
GABAergic Synapse	<i>Adcy1,Ndufa6,Ndufb10,Ndufs3,Ndufa10,Faah,Gnao1,Grm5,Gabbr1</i>	
Signaling By GPCR	<i>Sox4,Itgb3bp,Depdc7,Myh11,Taar6,Vegfa,Grin2b,Obscn,Nckipsd,Dgkb,Pdk2,Stk4,Cpt1b,Hdac7,Ppp2r1b,Psmd3,Lrp6,Tnfrsf1a,Nr3c1,Hdac5,Arhgef25,Eif4g1,Nup107,Ii2rg,Cenpu,Rcc2,Tnfaip3,Flrt2,Pdk3,Gucy2f,Disp2,Grm5,Itga2b,Kdm1a,Plppr3</i>	<i>Gpr37,Plb1,Klc1,Tle1,Adcy1,Arhgef4,Klhl12,Ppp2r5e,Myd88,Stat6,Cdk9,Psmd7,Rbl1,Kng1,Fam13a,Pip4k2a,Gnao1,Plppr2,Ift140,Cyfip1,Gfra3,Psmb1,Tert,Arf6,Nmt2</i>
Photodynamic Therapy-induced NF-kB Survival Signaling	<i>Tnfrsf1a,Nr3c1</i>	<i>Vegfa,Egln2</i>
Nanog in Mammalian ESC Pluripotency	<i>Ppp2r5e,Pdk2,Ppp2r1b,Psmd3,Psmd7,Insrr,Tnfrsf1a,Pdk3,Gnao1,Npr1</i>	<i>Tle1,Adcy1,Vegfa,Bdnf,Cdh17,Gucy2f,Psmb1</i>
SUMOylation	<i>Tfap2a,Nup107,Senp5</i>	<i>Pias2,Hdac7,Nsmce1</i>
Chromatin Regulation / Acetylation	<i>Arid1a,Riox1,Brd7,Nr3c1,Hdac5,Eloa,Supt16h</i>	<i>Ctr9,Hdac7,Kdm1a</i>
Circadian Entrainment	<i>Adcy1,Ache,Folh1,Gnao1,Shank1,Ryr1</i>	<i>Vegfa,Ppp2r5e,Grin2b,Ppp2r1b,Fkbp5,Grm5,Kcnq2</i>
Apoptosis and Autophagy	<i>Stk4</i>	<i>Ndr4,Aifm1,Tfap2a,Dap,Tnfrsf1a,Tnfaip3,Ptrh2</i>

Table 5. Selected pathways for MI/RTX.

Pathway	Upregulated	Downregulated
Cori Cycle	<i>Pfjfp,Hk1</i>	<i>Ldha,Slc2a4</i>
Glucose Metabolism	<i>Pfjfp,Hk1,Phka1</i>	<i>Ldha,Slc2a4,Pdhx</i>
BDNF-TrkB Signaling	<i>Trpc3</i>	<i>Pik3cg,Plcg1</i>
AMP-activated Protein Kinase Signaling	<i>Pik3cg,Slc2a4,PPP2r5e</i>	<i>Pfjfp,Ulk1</i>
Glycosaminoglycan Metabolism	<i>Slc2a4,Hk1,Phka1,Nup107</i>	<i>Pfjfp,Ext2,Hs6st3</i>
Hexose Transport	<i>Nup107</i>	<i>Slc2a4,Hk1</i>
HIF-1 Signaling Pathway	<i>Pfjfp,Hk1</i>	<i>Ldha,Plcg1</i>
Type II Diabetes Mellitus	<i>Hk1</i>	<i>Pik3cg,Slc2a4</i>
Central Carbon Metabolism in Cancer	<i>Pfjfp,Hk1</i>	<i>Ldha</i>
N-glycan Antennae Elongation in The Medial/trans-Golgi	<i>St8sia6</i>	<i>Mgat4b</i>
Adipogenesis	<i>Lifr,Rb1</i>	<i>Slc2a4,Bmp1</i>
Heparan Sulfate Biosynthesis	<i>Ext2,Hs6st3</i>	
Regulation of Wnt-mediated Beta Catenin Signaling and Target Gene Transcription		<i>Krt1,Zcchc12,Med12</i>
Circadian Entrainment	<i>Kcnq5,Pik3cg,PPP2r5e,Grm2,Ache,Scn1a</i>	<i>Krt12</i>
PI3K-AKT-mTOR Signaling Pathway and Therapeutic Opportunities	<i>Pik3cg</i>	<i>Ulk1</i>
Pentose Phosphate Pathway	<i>Pfjfp</i>	<i>Rgn</i>
Carbon Metabolism	<i>Rgn,Sdsl</i>	<i>Pfjfp,Hk1</i>
Recognition and Association of DNA Glycosylase With Site Containing An Affected Purine	<i>Mutyh</i>	
Cytoskeleton Remodeling Neurofilaments	<i>Dst,Actr1a</i>	<i>Krt1</i>
Peroxisome	<i>Hmgcll1,Nudt7</i>	<i>Pex6</i>

List of figure

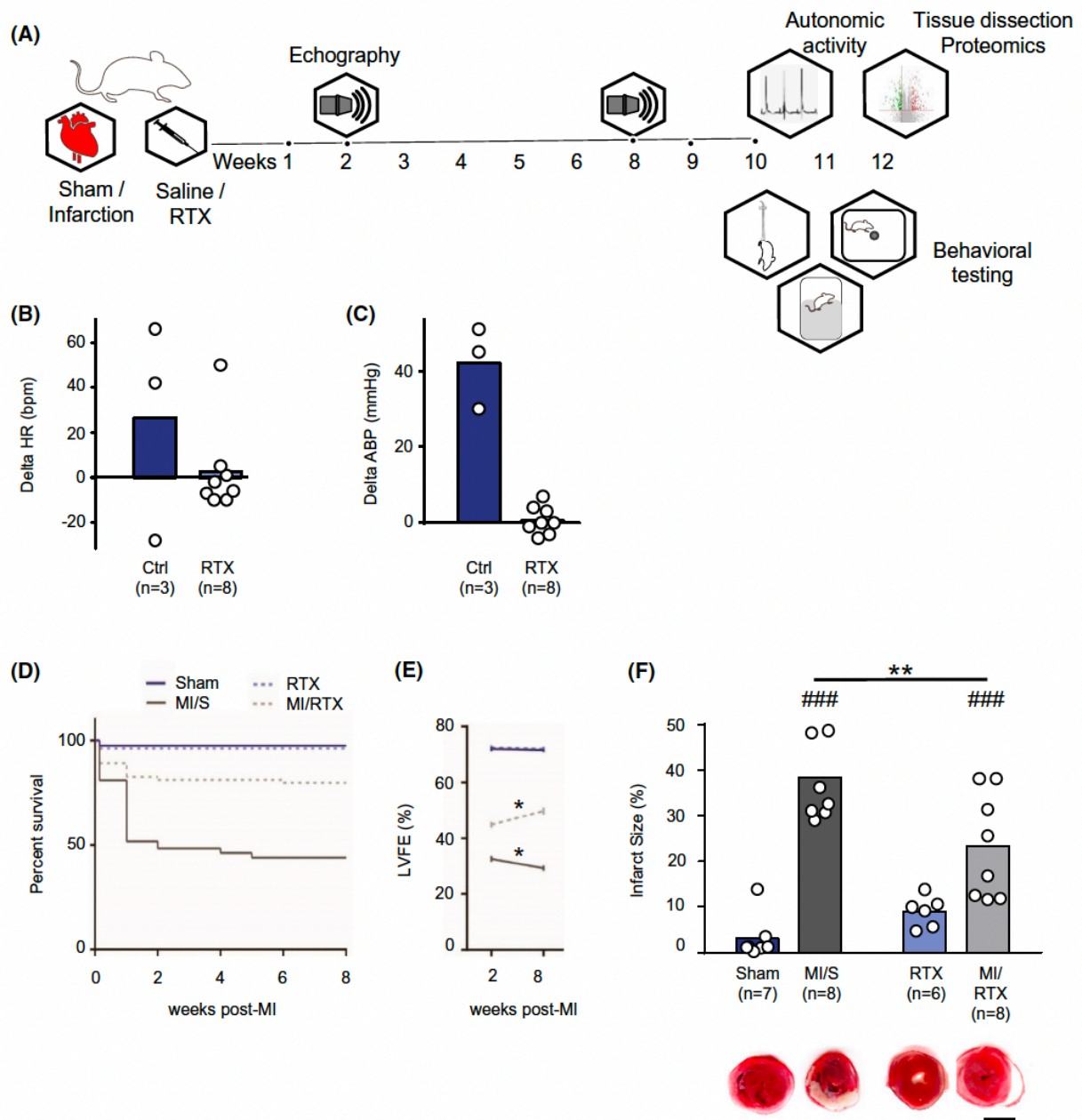


Figure 1. RTX treatment of cardiac afferents results in increased survival rate, long-term improvement of cardiac function and a reduction in infarct size.

A. Illustrated workflow of the experimental protocol used in the study. Adult male C57BL6 males were subject to acute irreversible myocardial infarction in the presence of pericardial targeted injections of RTX or saline. Subjects were examined for cardiac function (2 and 8 weeks post infarction) and subjected to behavioural phenotyping, cardiac autonomic nervous system assessment and harvesting of the frontal cortex for proteomic analyses. Long-lasting epicardial depletion of TRPV1 afferents is shown functionally by a lack of response in HR (B) and ABP (C) following epicardial application of capsaicin. D. Kaplan-Meier curves indicate that the survival rates significantly differ between groups (log-rank test, $p < 0.001$). Pairwise comparisons show that MI significantly reduces survival rate (log-rank test for Sham vs MI: $p < 0.001$) and that RTX reduces this effect (log-rank test for MI vs MI/RTX: $p < 0.001$) to a death rate that is still higher than the control group (log-rank test for MI/RTX vs Sham: $p = 0.012$). RTX alone had no effect on the survival of the animals. E. Echocardiographic assessment of left ventricular ejection fraction (LVEF) at 2 weeks and 8 weeks post-MI. Three-way ANOVA shows

significant effects for MI surgery, RTX treatment and time ($p=0.002$ for interaction between the 3 factors). The MI/S group showed a severe and significant reduction in LVEF at 2 weeks (Tukey's post-hoc for MI vs Sham: $p<0.001$), which worsened at 8 weeks. This impairment was significantly reduced in the MI/RTX group ($p<0.001$ compared to MI at 2 weeks) but remained significantly lower from the control groups ($p<0.001$ vs Sham or RTX at 2 weeks) and showed an improvement over time. $*p<0.001$ between 2 and 8 weeks according to Tukey's post-hoc test for paired values. F. Representative images and quantification of infarct zones by TTC analyses. MI/RTX hearts show less scar tissue (white) compared to MI treatment. Scale bar: 5 mm. ### $p<0.001$ vs Sham group, ** $p<0.01$, Tukey's post-hoc test.

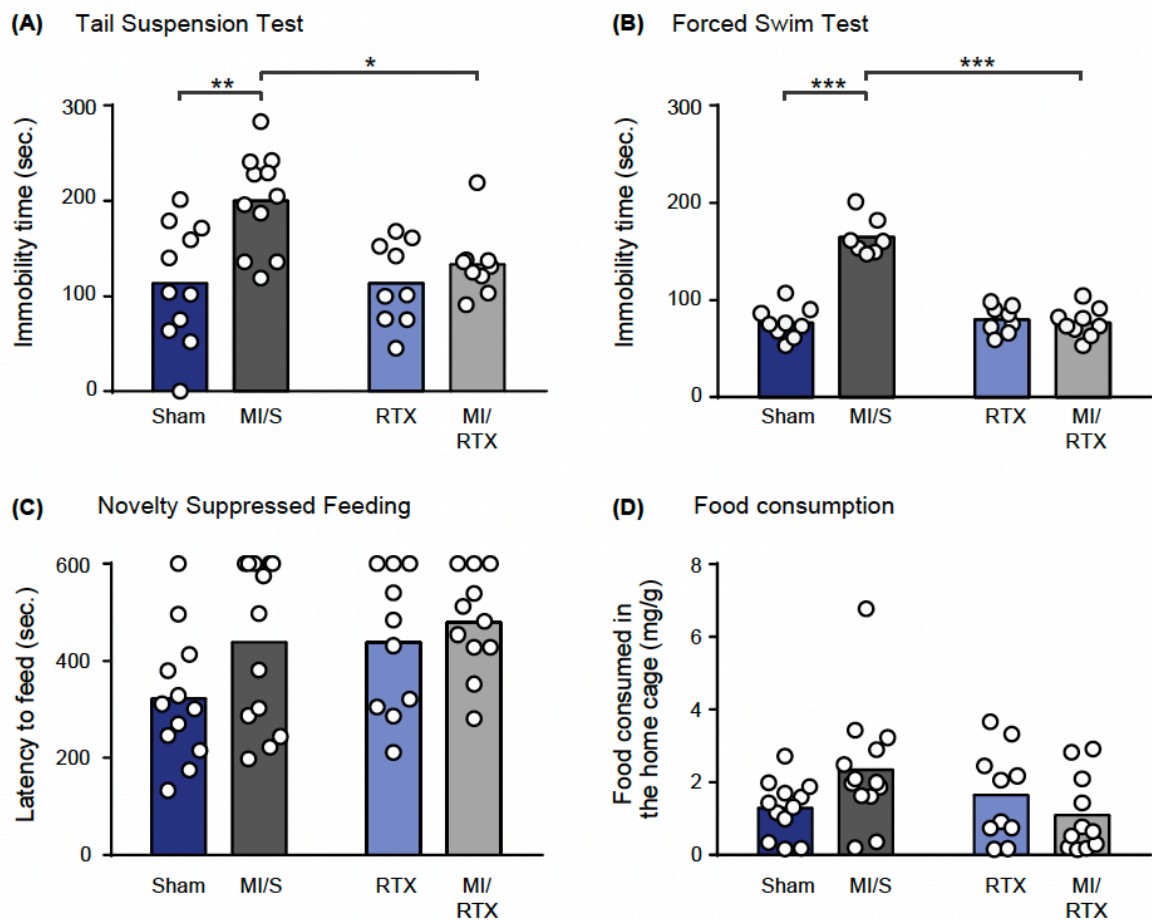


Figure 2. Behavioural Phenotyping.

A. Immobility time measured in the tail suspension test (TST). Two-way ANOVA shows significant effects for both RTX treatment ($p=0.044$) and MI surgery ($p=0.002$), as well as a significant interaction between the two factors ($p=0.045$). Thus RTX significantly reduces the depressive-like phenotype induced by MI in this test. B. Immobility time was measured in the forced swim test (FST). Two-way ANOVA shows significant effects for RTX treatment ($p=0.0001$), MI surgery ($p<0.0001$) and the interaction between factors ($p=0.0001$). Thus, RTX significantly reduces the depressive-like phenotype induced by MI in this test as well. C. Latencies to eat in the Novelty Suppressed Feeding (NSF) Test. Mice showed a higher latency to eat in the MI/S group versus the Sham group. Latencies observed in the RTX and MI/RTX groups were similar to those observed in the MI/S group, suggesting an anxiodepressive-like effect of MI and RTX individually but without any cumulative effect. However, these differences did not reach statistical significance (2-way ANOVA, effect of treatment and effect of MI: $p=0.070$; interaction: $p=0.380$). D. Food consumption in the home cage showed a trend toward an increase in the MI/S group when compared to each of the 3 other groups, suggesting that MI/S mice

consumed more food in their home cage. Again, these differences do not reach statistical significance (Kruskal-Wallis test, $p=0.110$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ for Tukey's post-hoc test. Numbers within the bars indicate sample size.

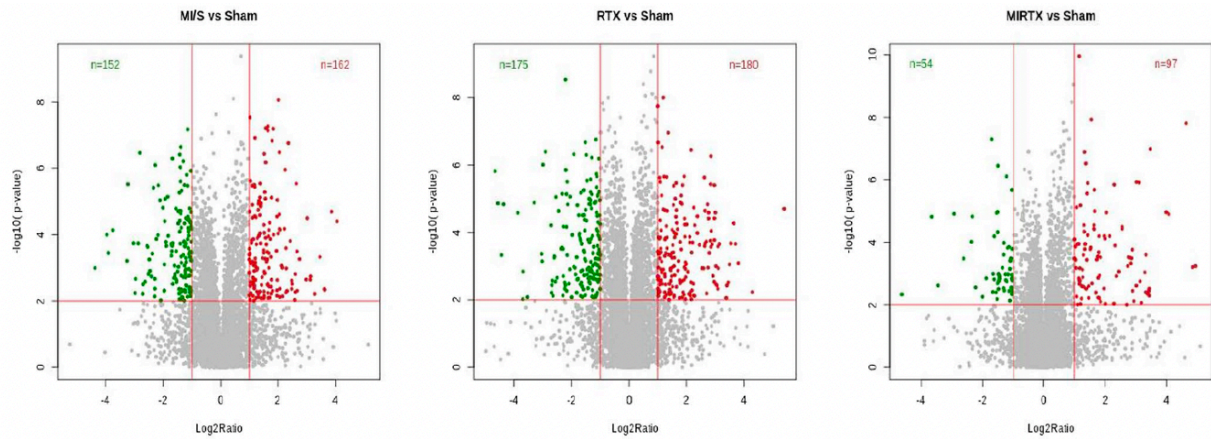


Figure 3. Volcano plots

Volcano plots illustrate differential abundances of proteins with the x-axis showing the log₂ ratio, with respect to Sham, and the y-axis representing $-1 * \log_{10}$ of the p-value. A horizontal line shows the position of p-value 0.01 and two vertical lines show the position of 1.0 and -1.0 log₂ ratios (corresponding to 2-fold increase/decrease, coloured in red/green respectively). A. MI/S: 314 significant proteins with 162 enriched and 152 diminished. B. RTX: 355 significant proteins with 180 enriched 175 diminished. C. MI/RTX: 151 significant proteins with 97 enriched and 54 diminished.

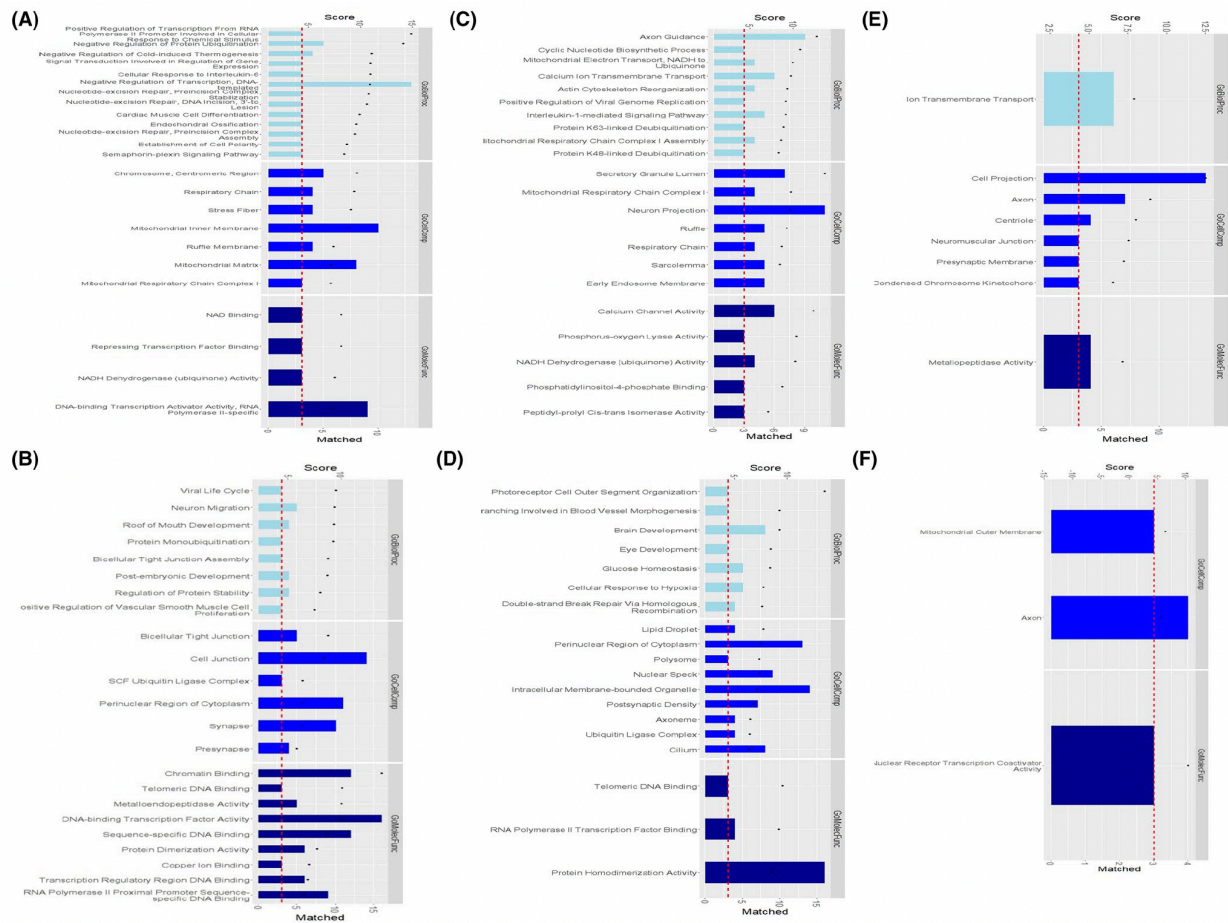


Figure 4. GO category enrichment by MI, RTX and MI/RTX DEPs

Summary bar plots for GO category selection using enriched and diminished DEPs are shown for categories with less than 1000 total members and with at least 3 members matching the DEP set. The bars represent the number of proteins matched and the dotted lines show the score given by GeneAnalytics ($-1 * \log_2(p\text{-value})$). The red dashed line shows the relevant position of a score for p-value 0.05. GO categories are divided by biological process (GoBiolProc), cellular component (GoCellComp) and molecular function (GoMolecFunc). GO categories found using DEPs enriched in MI/S (A) versus GO categories found using DEPs diminished in MI/S (B). Likewise for RTX (C and D) as well as MI/RTX (E and F).

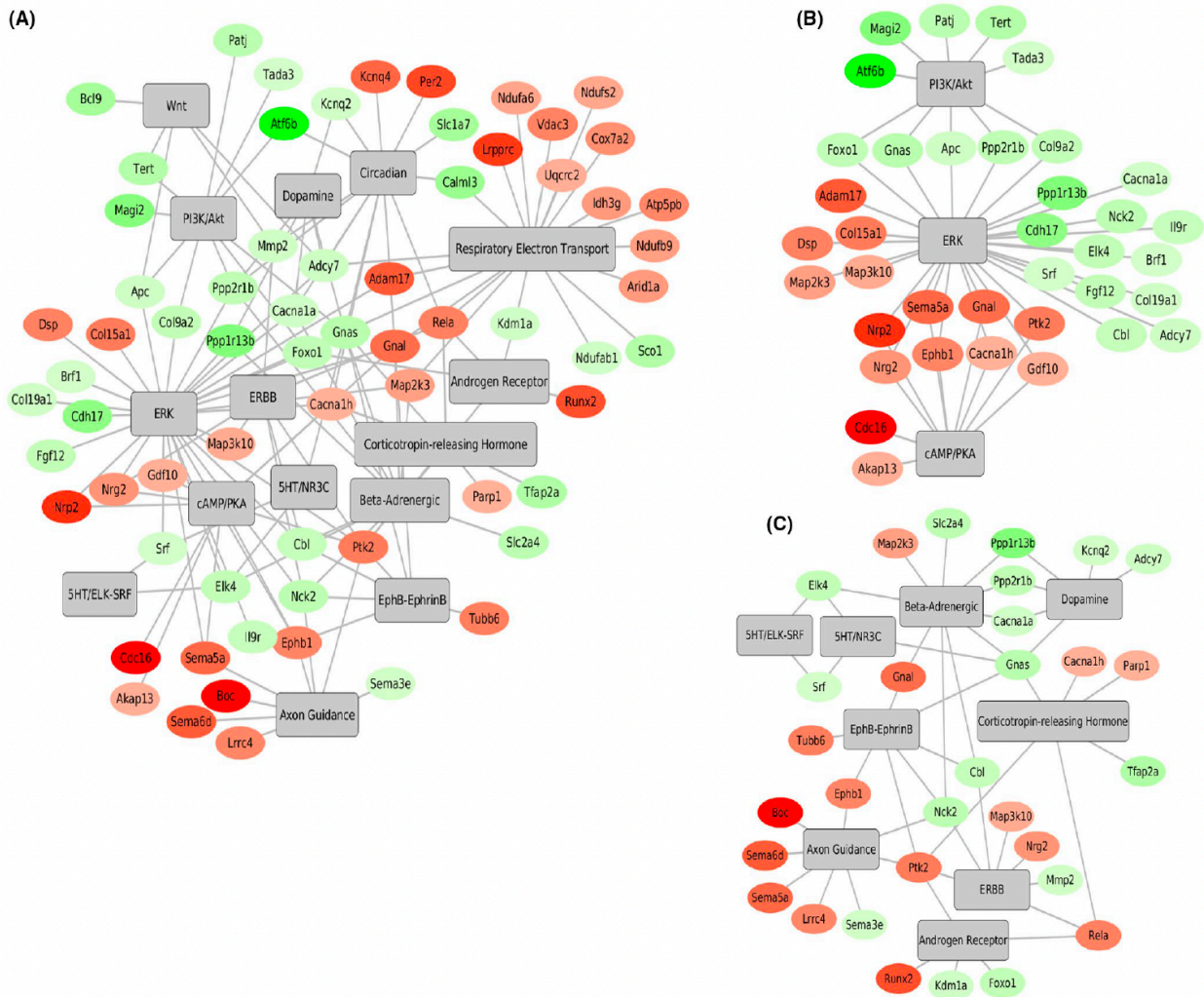


Figure 5. GeneAnalytics Pathway enrichment results for MI/S

GeneAnalytics Pathway enrichment results for MI/S shown as a network with nodes coloured based on relative abundance (compared to Sham; proteins enriched/diminished in MI/S are respectively shaded in red/green). A. Network representation of selected pathways to visualize the inter-relationships between extracellular signal-regulated kinases (ERK) and pathways relevant to neurobiology. B. The ERK pathway, which had the largest number of DEPs, shares nodes with both the PI3K (in which all DEPs are reduced) and cAMP (in which all DEPs are enriched) pathways. C. The inter-related pathways relevant to neurobiology and enriched by MI/S DEPs including dopamine, serotonin (5-HT), androgen, beta-adrenergic signaling, EphB-EphrinB, ERBB, Corticotropin-releasing Hormone and axon guidance.

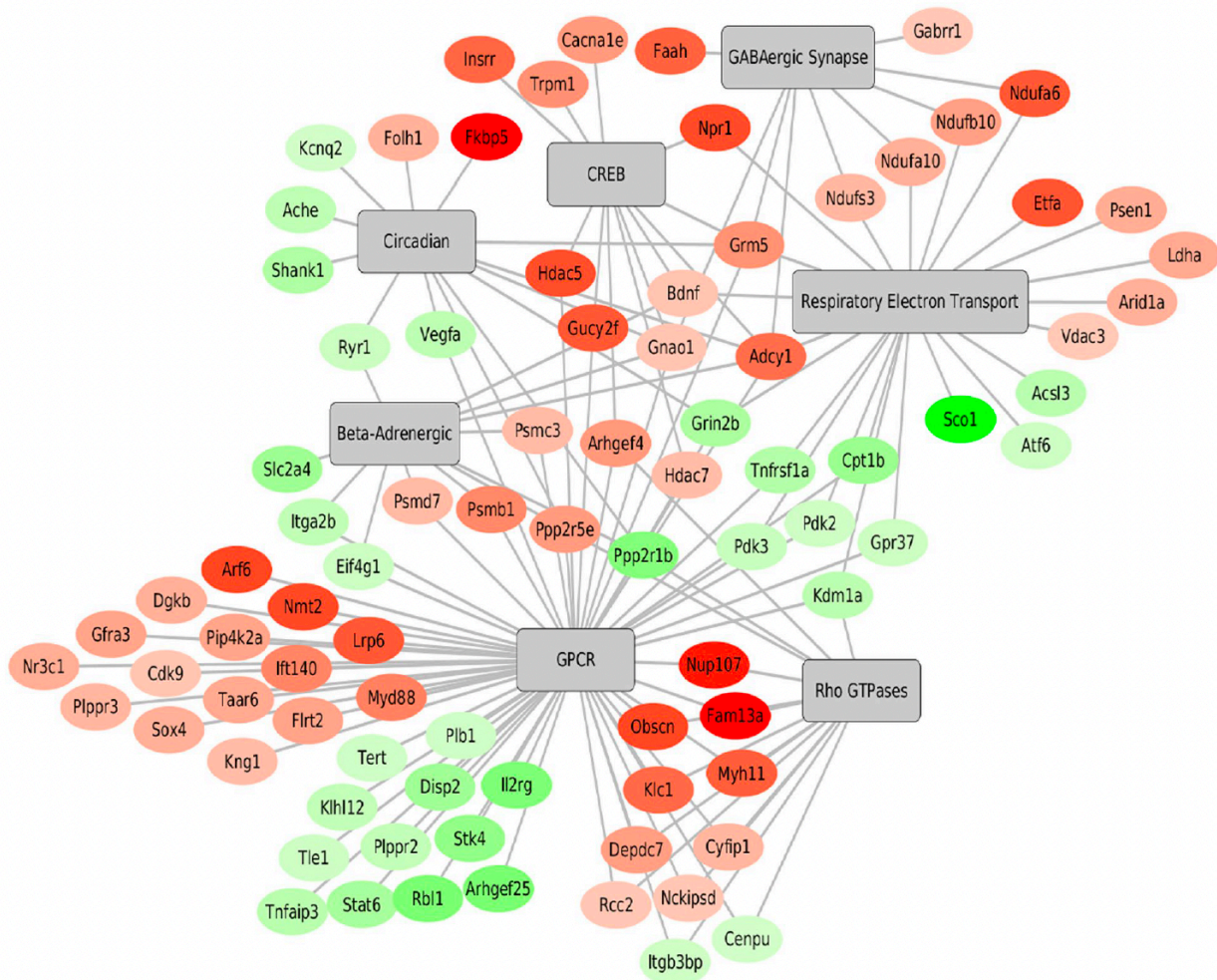


Figure 6. GeneAnalytics Pathway enrichment results for RTX

Pathway enrichment, shown as a network as in Figure 5, using DEPs from RTX treatment. In addition to the large number of DEPs associated with G protein-coupled receptors (GPCRs) and Rho GTPases, a selection of inter-connected pathways are shown.

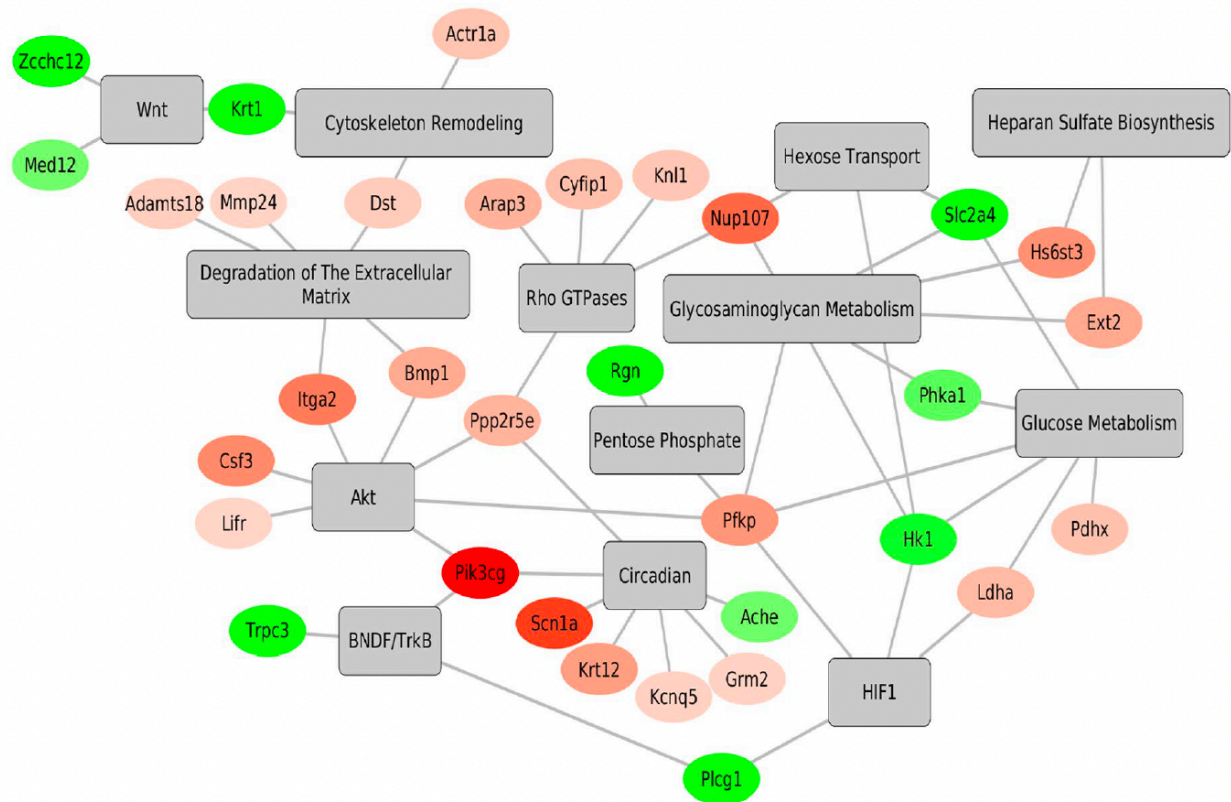


Figure 7. GeneAnalytics Pathway enrichment results for MI/RTX

Enriched pathways, shown as a network, using DEPs from MI/RTX. Despite the lower number of DEPs found to be significant with the combined treatment, we detected an enrichment for pathways with biological interest such as Glycosaminoglycan and Glucose Metabolism in addition to HIF1, BDNF/TrkB and extracellular matrix degradation.

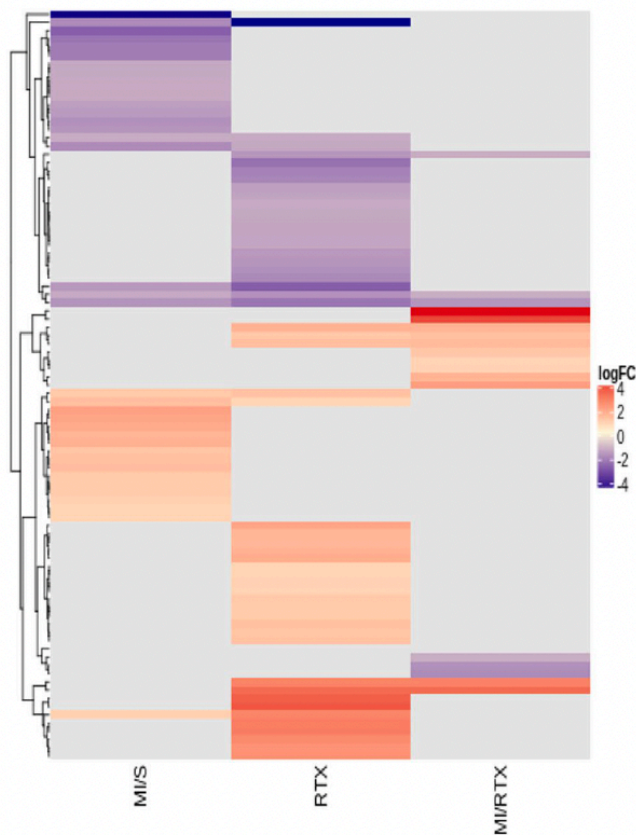
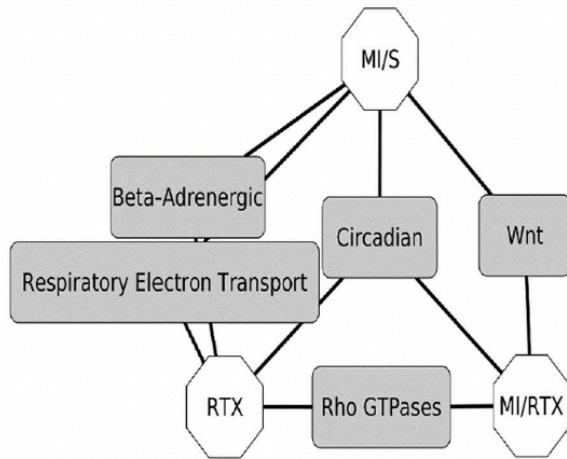


Figure 8. Unique and differential Pathways

A. An illustrative representation of the pathways enriched by at least two out of three treatments. B. Heatmap created with the log₂ ratio versus sham for proteins from the co-occurring pathways shown in A. While the log₂ ratio is used to colour proteins that pass the significance filter, proteins that did not pass the filter are shown in grey in the heatmap, to demonstrate that the vast majority of proteins involved in these common pathways are unique and differential in only one of the three treatments.

Article 4 : Proteomics reveals long-term alterations in signaling and metabolic pathways following both myocardial infarction and chemically induced denervation

Neurochemical research, Mai 2022, doi : 10.1007/s11064-022-03636-7

Jennifer Ben Salem^{1,2,3,a}, Jason S Iacovoni^{1,a}, Denis Calise⁴, Dina N Arvanitis^{1*}, Francis Beaudry^{2,3*}

1-INSERM DR Midi-Pyrénées Limousin, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC) UMR1297, Université de Toulouse III, France

2- Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

3-Centre de recherche sur le cerveau et l'apprentissage (CIRCA), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

4-INSERM DR Midi-Pyrénées Limousin, Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et Ressources Expérimentales Service Microchirurgie, (CREFRE- US06, Ranguel)

^a co-first author. These authors contributed equally to this work.

* co-corresponding authors

Francis Beaudry, Ph.D.

Professor of Analytical Pharmacology

Canada Research Chair in metrology of bioactive molecule and target discovery

Département de Biomédecine Vétérinaire

Faculté de Médecine Vétérinaire

Université de Montréal

3200 Sicotte

Saint-Hyacinthe, QC

Canada J2S 2M2

Email: francis.beaudry@umontreal.ca

Dina N. Arvanitis, Ph.D.

Research Scientist CNRS

Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC) UMR INSERM 1297 -

Équipe 10

1 Avenue Jean Poulhès,

BP 84225

31432 Toulouse Cedex . tel : +33 (0)5224072

Email: constandina.arvanitis@univ-tlse3.fr

Keywords: myocardial infarction, heart failure, resiniferatoxin (RTX), Transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) (TRPV1), proteomics, mass spectrometry, bioinformatics, integrative biology, autonomic nervous system.

Abstract

Myocardial infarction (MI) is the principal risk factor for the onset of heart failure (HF). Investigations regarding the pathophysiology of MI progression to HF have revealed the concerted engagement of other tissues, such as the autonomic nervous system and the medulla oblongata (MO), giving rise to systemic effects, important in the regulation of heart function. Cardiac sympathetic afferent denervation following application of resiniferatoxin (RTX) attenuates cardiac remodelling and restores cardiac function following MI. While the physiological responses are well documented in numerous species, the underlying molecular responses during the initiation and progression from MI to HF remains unclear. We obtained multi-tissue time course proteomics with a murine model of HF induced by MI in conjunction with RTX application. We isolated tissue sections from the left ventricle (LV), MO, cervical spinal cord and cervical vagal nerves at four time points over a 12-week study. Bioinformatic analyses consistently revealed a high statistical enrichment for metabolic pathways in all tissues and treatments, implicating a central role of mitochondria in the tissue-cellular response to both MI and RTX. In fact, the additional functional pathways found to be enriched in these tissues, involving the cytoskeleton, vesicles and signal transduction, could be downstream of responses initiated by mitochondria due to changes in neuronal pulse frequency after a shock such as MI or the modification of such frequency communication from the heart to the brain after RTX application. Development of future experiments, based on our proteomic results, should enable the dissection of more precise mechanisms whereby metabolic changes in neuronal and cardiac tissues can effectively ameliorate the negative physiological effects of MI via RTX application.

Introduction

Heart failure (HF) is a global health burden due to the increased life expectancy of individuals that survive acute myocardial infarction (MI) [1]. MI to HF progression is a complex clinical syndrome believed to be caused by inadequate cardiac output, which is unable to meet systemic metabolic requirements [2–4]. The systemic pathophysiological consequences of HF are particularly important and there has been a growing awareness concerning the link between the heart and brain dysfunction [5, 6]. Over the past few decades, we have started to reveal the basic pathophysiology underlying the heart–brain axis [7, 8]. While evidence suggested principally the role of adverse drug reactions, cranial hemodynamic changes in MI have gained considerable interest [3, 9, 10]. A recent systematic review suggested cardiac dysfunction hindered cerebral blood flow and may predisposes one to cognitive decline [11], but others suggest it may not be a predominant factor in HF-associated nervous system dysfunction [7, 12].

An important hallmark of HF is the modification in activity of the autonomic nervous system (ANS), with sympathetic nervous system (SNS) hyperactivity largely contributing to disease progression and negative outcome [13–15]. The predominant notion in the field is that HF leads to the hyperactivation of SNS efferent brain-to-heart fibers, thereby amplifying the damage to cardiac muscle [15]. The mechanism of this SNS hyperactivity is only partially known. Proposed mechanisms accounting for increased SNS activity include deactivation of baroreflex feedback and hemodynamic modifications in HF or hyperactivity of chemoreflexes related to anemia, renal failure or cardio-renal syndrome [16–18]. The initial trigger of the SNS as a physiological consequence of HF has also been studied extensively in the clinic [15, 19, 20]. More recently, we and others have shown that SNS hyperactivity is regulated by the denervation of a subset of cardiac afferent fibers expressing the Transient receptor potential vanilloid

subtype 1 (TRPV1), a non-selective cation channel [21]. The desensitization of cardiac afferents by Resiniferatoxin (RTX), an ultrapotent analogue of capsaicin and an agonist of TRPV1, reduces both the sympathetic tone downstream of MI and cardiac infarct size [22–26]. Furthermore, we recently demonstrated that this desensitization relieves the despair phenotype induced by HF in a murine model [27]. These cardiac afferents form a portion of the sympathetic cardiac network initiating in the spinal cord onto ascending pathways into the medulla oblongata (MO) and are traced to the lateral basal frontal cortex [28, 29]. The activity of these spinal afferents is further exemplified by Wu and colleagues [30] who show that central chemo-ablation of the TRPV1+ afferents in the spinal cord prevent ventricular arrhythmias in heart failure via selectively blunting cardiac sympathetic afferent projection into the spinal cord.

HF neural imbalances are not limited to the SNS, traveling via spinal ganglia to the heart, but also to the parasympathetic nervous system (PNS), implicating the thoracic ganglia as well as the right and left vagal trunks [22, 31, 32]. Withdrawal of vagal activity in HF, or reduction in parasympathetic innervation of the heart, occurs at early stages of left ventricular dysfunction and this reduction is associated with worse outcomes in patients following MI with HF [33]. Studies thus far have shown that ameliorating vagal activity improves cardiac function and HF patient outcome [34, 35], however vagal stimulation therapy remains controversial [36]. Neural communication between the heart and brain is highly complex; and apart from neurophysiological assessments following stimulation or suppression, very little is known about the molecular components eliciting the responses. Here we sought to identify the immediate and longer-term molecular components in this neural circuit. The protein communities elicited downstream of MI, and the early dynamics of these responses during the progression to HF were studied by using mass spectrometry-based proteomics. For these analyses, we used an experimental MI and HF animal model (MI group) as previously described

[27]. To identify the contribution of TRPV1 expressing cardiac afferents, RTX was acutely applied to the pericardial space in a subset of mice to monitor its effect in both control (RTX) and in MI treated animals (MI/RTX). Tissues were isolated immediately following MI at 5 min and 20 min. In addition, animals were permitted to awaken, and tissues were collected at 24H and 12-week time points. Samples from the four tissues at these four time points were then processed for mass spectrometry followed by proteomic analyses. Hierarchical clustering and subsequent tree cutting were used to partition proteins based on their expression profile, with respect to sham controls, over time. Clustered proteins were further analysed by functional enrichment analysis using EnrichR [37–39]. We show that despite the large amount of overlap in terms of proteins and functional pathways, each tissue and treatment resulted in distinct change over the time course investigated.

Materials and Methods

Animal Husbandry

Ten-week-old male C57BL/6J mice were purchased from a commercial supplier (Envigo, Gannat, France) and were allowed to habituate to the animal facility for 12-16 days prior to the experiments. Males were chosen to reduce sex-based variability observed in the heart [40, 41] and brain, particularly in mood disorders [42]. Mice were housed in groups of 5 on a 12-h light/dark cycle and an ambient temperature of 22 ± 3 °C, with food and water available ad libitum. Animal procedures were approved by the national Animal Care and Ethics Committee (CE2A122 protocol number 2016101916279704) following Directive 2010/63/EU.

Myocardial Infarction and RTX application

MI was performed as previously described [27]. Briefly, animals received a chemical induction of ketamine / xylazine (125/5 mg/kg) by intraperitoneal injection followed by a gas induction

by 2% of isoflurane inhalant mixed with 1 L/min 100% O₂. Tracheal intubation was performed under a binocular microscope. RTX (Tocris Bioscience, Rennes, France) was prepared as previously described [43] and 10 µL of 0.25 µg/mL saline solution was used for pericardial injections. Animals were respirated with mini-wind ventilators (Harvard Apparatus, Les Ulis, France). Surgical procedures were performed under a Zeiss OPM1 FC operating microscope (Zeiss, Paris, France). An incision of the 4th intercostal space was performed to provide adequate exposure of the thoracic cavity. The left atrioventricular block was exposed, an 8/0 Prolene thread (Ethicon) was placed at the edge of the left atrial appendage and a catheter was used to inject 10 µL of saline or RTX saline solution within the intrapericardium just prior to ligation. Evans Blue was used as a tracking dye to ensure lack of spillage. Immediately following infarction, 10 µL of saline (i.e., Sham group) or RTX (i.e., MI/RTX and RTX group) at 0.25 µg/mL was injected. The intercostal space was sutured followed by closing the skin surface using an Ethilon 6/0 thread (Ethicon). For acute MI animals were kept on anaesthesia and respiration for 5 min before tissues were dissected. All other animals received Buprecare (Buprenorphine) subcutaneously (100 µg/kg) as mandated by the National Ethics Board. RTX concentrations (i.e., 0.25 µg/mL) used in our study were based on previous studies [26, 27, 43, 44]. All surgical procedures were performed between 7h-13h.

Tissue dissection and preparation

For the T1 (5 min) and T2 (20 min) time points, the subjects were maintained on isoflurane and artificial respiration for the desired time and then animals were sacrificed, and tissues (left ventricle, medulla oblongata, spinal cord (i.e., C1-C4) and cervical vagal nerves) were isolated. For the T3 (24h) and T4 (12-weeks) time points, mice were anaesthetized with isoflurane, weighed and sacrificed by cutting the spine at the skull base. Tissues were immediately removed and rinsed in dissection buffer; ice-cold PBS supplemented with Protease and Phosphatase

Inhibitors (Merck, France) and 10 nM of Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, Merck, France). Microdissection was also performed in ice-cold dissection buffer.

Sample preparation for proteomics

Mouse tissues were weighed and then homogenized using a Bead Mill Homogenizer (Fisherbrand) following the addition of a solution of 8 M urea in 100 mM TRIS-HCL buffer (pH 8) containing a cocktail of protease inhibitors (cOmplete, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) at a ratio of 1:5 (w:v) in re-enforced 1.5 mL homogenizer tubes containing 50 mg glass beads. The samples were homogenized with 3 bursts of 60 seconds at a speed of 5 m/s. The homogenates were centrifuged at 9,000 g for 10 min. The protein concentration for each homogenate was determined using a Bradford assay. Two hundred µg of protein were extracted using ice-cold acetone precipitation (1/5; v/v). The protein pellet was dissolved in 100 µL of 50 mM TRIS-HCl buffer (pH 8) and the solution was mixed with a Disruptor Genie at maximum speed (2,800 rpm) for 15 minutes and sonicated to improve protein dissolution yield. The proteins were denatured by heating at 120°C for 10 min using a heated reaction block. The solution was then allowed to cool down for 15 minutes. Proteins were reduced with 20 mM dithiothreitol (DTT) at 90°C for 15 minutes. Then proteins were alkylated with 40 mM 2-Iodoacetamide (IAA) at room temperature for 30 min. Five µg of proteomic-grade trypsin was added at 37°C for 24h. Protein digestion was quenched by adding 10 µL of a 1% TFA solution. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min and 100 µL of the supernatant was transferred into injection vials for analysis.

Proteomic analysis

High-performance liquid chromatography was performed using a Thermo Scientific Vanquish FLEX UHPLC system (San Jose, CA, USA) using gradient elution along with a microbore

column (Thermo Biobasic C18 100 × 1 mm, with a particle size of 5 μm). The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.1% formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 2 min, the ratio was maintained at 5:95. From 2 to 92 min, a linear gradient was applied up to a ratio of 40:60 and maintained for 3 min. The mobile phase composition ratio was reverted at the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 15 min. The flow rate was fixed at 50 μL/min and 5 μL of sample was injected. A Thermo Scientific Q Exactive Plus Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA) was interfaced with the UHPLC system using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases, and they were set at 10 and 5 arbitrary units. Auxiliary gas was heated to 200°C. The heated ESI probe was set to 4,000 V and the ion transfer tube temperature was set to 300°C. MS detection was performed in positive ion mode and operating in TOP-10 Data Dependent Acquisition (DDA). A DDA cycle entailed one MS¹ survey scan (m/z 400-1500) acquired at 70,000 resolution (FWHM) and precursor ions meeting user defined criteria for charge state (i.e. z = 2, 3 or 4), monoisotopic precursor intensity (dynamic acquisition of MS² based TOP-10 most intense ions with a minimum 2x10⁴ intensity threshold) were selected for MS² acquisition. Precursor ions were isolated using the quadrupole (1.5 Da isolation width) and activated by HCD (28 NCE) and fragment ions were detected in the Orbitrap at 17,500 resolution (FWHM). Data were processed using Thermo Proteome Discoverer (version 2.4) in conjunction with SEQUEST using default settings unless otherwise specified. SEQUEST used a curated database consisting of FASTA sequences extracted from UniProt (i.e., *Mus musculus* TAXON ID 10090). The following Proteome Discoverer parameters were set: MS¹ tolerance of 10 ppm; MS² mass tolerance of 0.02 Da for Orbitrap detection; enzyme specificity was set as trypsin with two missed cleavages allowed; carbamidomethylation of cysteine was set as a fixed modification; and oxidation of methionine was set as a variable modification. The minimum peptide length was set to six amino acids, and

proteins identified by only one peptide were removed. Data sets were further analysed with Percolator [45]. Peptide-spectrum-matches (PSMs) and protein identification were filtered at 1% false discovery rate (FDR) threshold. For protein quantification and comparative analysis, we used the peak integration feature of the Proteome Discoverer 2.4 software [46]. For each identified protein, the average ion intensity of the unique peptides was used for protein abundance.

Data preparation

Microsoft Excel files, one per tissue were generated using Proteome Discoverer. The abundance ratios were generated from (MI)/(sham), (MI-RTX)/(sham) and (RTX)/(sham group). Proteins with UniProt accessions that mapped to a mouse and then a human symbol using the MGI human phenotype database [47] were retained provided they possessed valid expression levels across sets of biological replicates. In cases of multiple accessions mapping to the same human gene symbol, the accession with the best replicate data was retained. Since the number of replicates was at the lower limit of limma analysis with p-value estimation, we chose to just take the mean of replicates. In cases with a mixture of NA (not-available) values, they were only allowed when the other non-NA values were on the low end of the distribution for that group of samples. Data was next converted to delta-means, meant to represent the log fold change (LFC) of the difference between a mean of the values from one treatment group versus its Sham control group. These LFCs were assembled as a time series for all delta-Sham contrasts from all tissues and were hierarchically clustered with base R dist (euclidean) and hclust (ward.D) and cutree (k=24) [48]. Proteins from k-clusters with less than 100 genes in one tissue/treatment group were discarded and gene sets were assembled from the remaining genes for each treatment/sham contrast in each tissue.

Venn Diagrams

Venn diagrams were generated using the `ggVennDiagram` package [49] within the `ggplot2` framework [50]. Input were string sets consisting of the gene symbols from each tissue as in Figure 1B or from each treatment after filtering for metabolism pathway genes that were also differentially expressed with ≥ 1.0 LFC for the 12 week and at least one of the 5 min or 24 hour time points as in Figure 5D.

Expression profile plots

The time course expression profile of each sample group after clustering and partitioning were presented using a custom `ggplot2` script in R for the complete data set (Figure 2) or just genes involved in metabolism (Figure 4). When an LFC was NA for a time point, but the rest of the series had valid LFCs, the NA was replaced with 0 for clustering and plotting. Colors are arbitrary for each k-cluster. 21 of the 24 k-clusters are shown across the 4 tissues and only the 3 purple profiles are shared between the vagus and the spine. The other colors are in reds for the left ventricle, blues for the spine and greens for the medulla.

Enrichment and Heatmaps

An R interface to the API of the `enrichR` program was implemented in order to perform batch gene function database enrichment analyses for the large number of tissue/treatment groups we wanted to analyse against the Reactome [51] and Gene Ontology [52, 53] databases. All heatmaps were generated with the `pheatmap` package [54]. Returned result sets were filtered based on adjusted p-value ≤ 0.05 for the heatmaps in Figure 3 and Sup Figure 1 and by p-value ≤ 0.01 for Figure 5 A-C. Filtered data will show as grey cells in the heatmap. Colored cells are based on $\log_2(2 + \text{CombinedScore})$, where the `enrichR` `CombinedScore` is defined as the log of the Fisher exact test p-value multiplied by the z-score computed by assessing the deviation

from the expected rank [37]. Samples are clustered based on these scores, depicted in the top dendrogram of each heatmap. Each enrichR result, even after p-value filtering, was too large to show in a heatmap, however many pathways in each result tended to overlap in terms of protein sub-set with similar functional descriptions. We therefore pooled each treatment's set of genes that were found in a particular pathway and formed a distance measure of overlap for hierarchical clustering (ward.D) and cutree: h = 500 for Reactome Figure 3A; h = 100 for GO cellular component; h = 75 for GO molecular function (Fig Sup 1A); h = 250 for GP biological process (Fig Sup 1B). Within each subtree, after cutree, the pathway with the best overall CombinedScores was chosen for display within the heatmap. This distance tree was also used in the clustering of the pathways, depicted in the left dendrogram of each heatmap.

Results

Detection of differentially regulated proteins

This study made use of a murine model for MI with and without RTX treatment to obtain proteomic data from four tissues over a four-point time course, as described in Figure 1A. MI and sham controls as well as RTX and saline treatments were performed at T0 and mouse tissues were isolated at 5 min (T1), 20 min (T2), 24 hr (T3) and 12-week (T4) time points. From each mouse we isolated the LV (red), the spine (blue), the MO (green) and vagus (purple). To identify the effects of the autonomic sensory afferents in response to MI, one group of MI animals concomitantly received restricted acute pericardial injection of RTX to obtain cardiac sensory afferent denervation (MI/RTX). We have previously shown detailed characteristics (e.g. survival rates, echocardiographic assessments, quantification of infarct zones, resting heart rate variability, QT and QTc intervals and morphological data) related with the model for HF used and long-term effects on heart and brain function [27]. We investigated changes in the proteome with our models by employing a previously established, label-free quantitative proteomic

approach. The activation of TRPV1 by an agonist will lead to an influx of cations tightly associated with TAC1 expression and the release of tachykinin peptides (e.g. Substance P). As shown in the supplementary Figure S1, the application of RTX triggered the expression and release of TAC1 proteins in the spinal cord (C1-C4) 20 min after treatment. The results are consistent with the agonist effects of RTX on TRPV1, producing an intense pungent effect. However, the MI/RTX group showed a different phenotype suggesting that the RTX pungent effect might be mitigated by molecular processes associated with the induction of MI. The four-way Venn diagram in Figure 1B shows the overlap and uniqueness in terms of protein content per tissue, looking at proteins that were detectable in at least 2/4 time points for at least 2/4 treatment groups, resulting in 1,499 proteins from spine samples, 1,197 from LV, 1,772 from MO and 514 from vagus. Each zone is coloured to indicate the areas with highest (light blue) to lowest number proteins (dark blue). In addition to the 301 unique proteins from the left ventricle and the 373 from the medulla, the largest shared groups include spine-medulla (532), spine-medulla-left ventricle (358) and the central zone, shared between all tissues (323). While one might expect the three neural tissues to have a large degree of proteomic overlap, it is surprising how many proteins were shared with the cardiac tissue supporting research suggesting an electrical nature of the heart and its connection with the nervous system.

Cluster analysis to identify co-regulated proteins

With the eventual goal of looking at tissue and treatment specific modulations in gene-functional pathways over the time course of the study, we assembled our expression data to resemble log₂ratios with respect to sham at the four time points for each protein, retaining the tissue and treatment information for each time-course. Hierarchical clustering enabled us to refine a partitioning strategy in two steps. First, we manually adjusted the cutree k parameter, resulting in a k of 24, to obtain visually appealing clustered profiles when depicted as shown in

Figure 2. Second, we used a threshold of 100 waves per k-cluster per tissue/treatment group in order to remove outlier expression profiles that did not fit into any of the clusters that possessed the majority of the expression profiles, resulting in the retention of the 21 k-clusters shown in Figure 2. The spine retained 9 k-clusters, the MO and LV each had 6 and the vagus only 3, all of which were also retained by profiles from the spine (k2, k5 and k10). The complete data set, for all 24 clusters, is provided as a spreadsheet in Supplementary Data File 1 (encompassing 2375 proteins labelled with their relevant tissue and treatment groups).

Enrichment analysis of Gene Ontology and Reactome pathways

For each tissue/treatment group, all of the proteins from the clusters shown in Figure 2 were pooled and used to search the Gene Ontology (GO) and Reactome pathway databases with the enrichR program. Results were filtered on adjusted p-value ≤ 0.05 and then we used the $\log_2(2 + \text{CombinedScore})$ to color the cells of the heatmaps shown in Figure 3. For tissue/treatment groups that did not statistically enrich a pathway, the cells are colored in grey. The samples are clustered based on this enrichR Combined Score and show that the effect in each Reactome pathway (Figure 3A) is more similar between the RTX and MI/RTX treatments than MI within each tissue, except for the vagus. In addition, the response of the spine and MO are more similar to each other than the LV or vagus, however it should be noted that the vagus scores suffered due to the lower overall number of proteins found in that tissue. The rows are clustered based on the degree of overlap between the enriched protein sets in each pathway. For the Reactome pathway database, we processed 12 enrichR results, one for each tissue/treatment group, each containing 131 to 342 different pathways with adjusted p-values ≤ 0.05 . When merged together, 1,255 unique pathways were retained (Supplementary File 2). In order to condense these results for visualization by heatmap, we again used hierarchical clustering and cutree utilizing a distance measure based on overlapping protein content. This enables the heatmap to summarize

pathways that were functionally similar when they have largely overlapping protein sets. As shown in Figure 3A, there is a large degree of enrichment within Metabolism (Reactome identifier R-HSA-1430728, hereafter referred to as Metabolism) and Pyruvate metabolism and TCA cycle pathways in all groups. In addition, Apoptosis, Hemostasis, Vesicle-mediated transport and Signalling by NGF were significant in all groups and Adaptive Immune System was found everywhere except in the vagus. Due to the shared disturbance in metabolism pathways, we next looked at GO cell component (GO:CC) in the same manner and can hypothesize that a large part of the response we found through these proteomic experiments is due to changes in the mitochondria of the cells. As shown in Figure 3B, we found GO:CC categories that correspond to the vesicle-related Reactome pathways such as vesicle, neuron projection, membrane raft and cell-cell junction to name a few. Combined with the high scores from cytoskeletal pathways, it is clear that these treatment groups all underwent massive changes in cellular signalling networks. The GO molecular function (GO:MF) and biological process (GO:BP) databases were also queried (Supplementary Figures S2A and S2B, respectively) and revealed additionally that many of the proteins under examination are involved in RNA binding and protein folding/stability (GO:MF) and further support the role of metabolism and immunity (GO:BP pyruvate metabolic process and neutrophil mediated immunity). Complete tables of all enrichR results are also available as Supplementary File 2.

Cluster analysis to identify association between pathways in regulatory networks

To further investigate the findings regarding Metabolism at the protein level. We extracted the profiles shown in Figure 2 for each protein that was found in the Reactome Metabolism pathway (Figure 4). In this way, it is clear that while each of the treatments modulates metabolism via a large number of common proteins, the profile over the time course is different based on each treatment. Essentially, in all 3 treatments the proteins from metabolism are increased immediately in T1 as compared to Sham. In RTX, the protein levels gradually resume to sham

levels at 24 h in all tissues. In the LV (Figure 4A) k9 and k13 appear to be MI specific profiles. MI/RTX responses concentrate almost uniquely in k24 while the RTX response is most evident in k6 and k18. These data show that while Metabolism includes a very large group of proteins, further dissecting the responses show how the LV had a treatment specific response. Figure 4B represents the waveforms of the metabolic proteins in the spine in all three treatments. Certain profiles such as k3 and k10 may reflect an MI response whereas k4, k19, k20 and k21 show a tendency to be elicited by RTX. The vagus showed that the k5 cluster was most evident in MI while MI/RTX showed an increased tendency in k10. RTX treatment had little effect on the metabolic profiles of the vagus. The MO also showed that k16 and k22 may be MI specific, while k23 is an intriguing profile solicited strongly by RTX, absent from MI/RTX, but a small subset of proteins share a similar profile in MI.

Treatment specific enrichment analysis of Reactome pathways

Finally, we wanted to focus on any treatment specific effects that persist across all tissues and involve proteins with the largest degree of fold change versus the Sham controls. First, we selected proteins with absolute \log_2 fold change ≥ 1 at 12 weeks and at least one of the following timepoints: 5 min or 24 h. We repeated the enrichR analysis of the Reactome database looking at each treatment group separately, shown in Figure 5 (A: MI, B: MI/RTX, C: RTX). Heatmaps were prepared as in Figure 3, however due to smaller number of proteins per group, we relied on a non-adjusted p-value ≤ 0.01 for these analyses. With the filtering of proteins that did not have long term changes with respect to sham, we found that MI retained selection of Metabolism over all tissues but that TCA cycle pathways were only retained in the LV (Figure 5A). MI/RTX and RTX treatment likewise have long term changes in Metabolism in all tissues however the TCA cycle is not significant in the MO with MI/RTX (Fig 5B) and RTX (Fig 5C). Finally, all proteins from the Metabolism pathway selected as described for the Figure 5

heatmaps were placed into a Venn diagram (Figure 5D) in order to show that while there are a lot of shared proteins, 98 from all three treatments and 133 shared between MI and MI/RTX, there are also more unique RTX proteins (57) and unique MI/RTX proteins (40) than there are shared only between RTX and MI/RTX (26).

Discussion

In order to better understand the complexity behind the interactions between the heart and the nervous system in HF, we undertook a large proteomic analysis of four tissues over a 12-week time course using combinations of MI and RTX treatments. By 12 weeks, the adverse effects of MI have been compensated for by RTX treatment and by including earlier time points in our analysis, we were able to monitor how these various treatments affected these tissues at 5 min, 20 min, 24 h as well as after 12 weeks. We were particularly interested in the early timepoints as to date RTX application to the heart in order to rescue HF progression following infarction is often concurrent with the induction of MI [22–27]. Application of RTX elicits an immediate excitation of TRPV1 expressing sensory neurons followed by a blocking effect whereby neurons can no longer sense the stimuli, which then ultimately leads to neurodegeneration of the sensory fibers [56, 57]. While we can observe a rapid and important response in the spine following RTX treatment, we further confirmed that the excitation response was prompted in the spine at 20 min by an up-regulation of TAC1 (Figure S1) leading to the release of pronociceptive neuropeptides (i.e. SP and NKA). Further, we know from our previous studies that RTX abolished the cardiac sensory fibers at 12 weeks post infarction [27]. In order to analyse this large dataset, we consolidated all the time points into waveforms that could be partitioned into clusters of genes with similar expression profiles over the time course by hierarchical clustering. One interesting observation in our data was that RTX induced a response in the LV even though it is commonly referred to as being benign in the heart [26, 30,

43]. Our data here is consistent with novel findings from the development and use of heterozygous TRPV1^{-Cre+/-,tdTomato flox/flox+/-} mice [58], which demonstrated that while TRPV1 channels are mostly expressed in cardiac nerve endings they are also found in the vessels of the mouse heart [58]. As such, we need to keep in mind that RTX may elicit its effects through blood vessels in addition to the cardiac afferent nerves. Nonetheless, our findings with RTX alone show a stimulation in all tissues that essentially return to baseline levels over time and concur with physiological findings [22–27]. Moreover, we see that application of RTX to the heart also elicited long-term adaptations in the MO and in the vagus nerve. These findings, while surprising, are consistent with RTX induction of long-lasting sensory neuron desensitization to achieve permanent analgesia [56, 57], which may represent the underlying adaptive processes supporting analgesia.

The waveform profiles presented in Figure 2 obtained for the combined MI/RTX treatment were paradoxical and tissue dependent. For example, we found that the MI/RTX response closely resembled that of MI for the LV, but in the spine the response was similar to that observed in RTX. This is consistent with the notion that RTX prompts a response in cardiac afferent nerves that transmit information through the spinal cord [21, 26]. Profiles of proteomic responses in spines isolated from mice in the MI/RTX treatment group showed a similar response curve to RTX animals, but with lower response amplitude. These findings may indicate a dampening of the RTX response in the spine in conjunction with MI; but further study will be required to understand this observation given that spine isolated from MI treated animals showed relatively low responses throughout all time points. The responses observed in the vagus nerve samples per treatment were surprising. The effect of MI on the vagus has not been extensively studied, however left vagal nerve stimulation following MI has been shown to ameliorate cardiac function in a canine model [59]. The waveform in MI was similar to that observed for MI/RTX but the response was more pronounced at early time points. These

findings suggest that the vagus is solicited early after MI and that concurrently blocking the sympathoexcitatory TRPV1+ cardiac neurons result in a reduced engagement of the vagus following MI.

Once all the time points were consolidated into waveforms and partitioned into clusters of genes with similar profiles over the time course by hierarchical clustering, we sought to functionally characterize the gene sets within each Tissue/Treatment group by enrichment analysis with the Reactome database. Surprisingly, the top pathway found in all tissues and treatments was Metabolism (e.g. R-HSA-1430728). It encompasses a complex network of chemical reactions and represents the largest and best characterized biomolecular network whereby the function of the underlying genes and proteins are well known. To study the proteomic changes associated with MI and RTX in the neuronal tissues connecting the heart to the brain, we thought to push genes specifically associated to Metabolism to the side and try to pick apart many of the other aspects of the results that had more precise functional descriptions. However, upon routinely finding metabolism associated genes at the statistical top of every analysis, we wanted to further explore the implications. Maladaptive energetics of cardiac tissue contribute to the pathophysiology of the failing heart [2, 5, 7]. More and more, we are learning of the complex metabolic processes associated with myocardial metabolic failure and systemic metabolic regulation has been found to contribute both to major symptoms and to disease progression [40, 60]. As such, HF is now defined as a systemic, multi-organ syndrome associated with metabolic failure [61]. One of the associations made between altered metabolism and HF include the activation of the neurohumoral system; which is the chronic activation of the sympathetic nervous system and the *Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS)* [62]. Moreover, in the last decade, the notion of cross-talk between the infarcted heart and peripheral tissues is of considerable interest within the research community [2, 4, 55, 63–66]. Metabolic dysregulation in the liver, skeletal muscle and adipose tissues following myocardial infarction has been shown

[2], and genome-wide transcriptomic analysis on tissue samples obtained 6- and 24-h post-MI demonstrated that tissue-specific biological networks showed a dysregulation in multiple biological processes (including immune system, mitochondrial dysfunction, fatty-acid beta-oxidation as well as RNA and protein processing) across multiple tissues, in particular in the liver.

We then made use of the three Gene Ontology databases to further confirm the functional changes in the cells of these tissues exposed to these various treatments. While the cellular component database from Gene Ontology suggests that proteomic changes in metabolism are localized within the mitochondria, previously reported in cardiomyocytes and HF [67], certain metabolic pathways have recently been found to be functional in the cytoplasm, distinct from the larger mitochondrial structures [68]. In either case, our discoveries that the protein components of mitochondria are being modified both by MI and RTX in the LV, spine, MO and vagus, could be explained based on merely the energetic needs of the tissues that propagate neural electrical- and chemical- *signals* back and forth within the tissues that connect the heart and the brain. It is quite clear that there is a large up-regulated peak at 20 minutes everywhere in this dataset as revealed in Figure 2. Interestingly, in the LV, the majority of the proteins are detected at higher levels in Sham versus all three treatment groups. The same can be said for the spine and the vagus. However, the MO shows the exact opposite and at 5 minutes, most proteins are up in the treatment groups with respect to their Sham counterparts. Looking at long term changes, over 12 weeks, these same proteins are down again for the most part in the left ventricle, however most of them move upwards by 12 weeks in spine and vagus. The MO continues to trend downwards at 12 weeks, despite their initial up-regulation at 5 minutes.

In addition to metabolism and related pathways such as TCA cycle, we found Reactome pathways such as vesicles, apoptosis, hemostasis and signaling by nerve growth factor (NGF)

(Figure 3A). While it is expected to find such functional pathways in the neural tissues, it was less expected for the LV. The fact that these pathways were also found in the heart may further suggest shared regulatory mechanisms for adaptation to MI and RTX in all tissues via neuronal pulse communications [69, 70]. We can also reveal that cadherin binding is consistently enriched everywhere (Figure S2A), in addition to RNA binding and protein degradation pathways, in agreement with previously published works [2]. The expected enrichment in muscle contraction was also seen in most all other samples and neutrophil mediated immunity was found in all tissues and treatments (Figure S2B), suggesting an additional layer of complexity to the response to MI and RTX. There were also pathways related to supramolecular fiber organization and actin/tubulin binding as well as many hits to cytoskeletal and actin-related categories with the cellular component database (Figure 3B). Taken together, we see that there is both short- and long-term disturbances in pathways not only related to mitochondria, but also the cytoskeleton, vesicles and various signaling pathways.

Performing an additional analysis by partitioning the overall proteome as shown in Figure 2 with only the profiles of genes from the Reactome Metabolism pathway, we noted that a principal proteomic signature, depicted as k-clusters, are proportionately represented within the proteins from the metabolism subset (Figure 4). When we further refined the proteome under study by selecting only proteins with a 1.0 log fold change at 12 weeks and an additional time point of either 5 minutes or 24 hours, we still found metabolism to be the only consistent pathway for all treatments (Figure 5A, B, C). This subset of proteins involved in metabolism also showed a balanced mixture of shared and distinct proteins across the MI, RTX and MI/RTX treatment groups (Figure 5D).

One can imagine that the cyclical transport of ions across membranes to generate neural signals is an energy intensive process. The spine, MO and vagus are all considered to be largely post-

mitotic cellular networks that function to transmit signals by the ATP intensive process of pushing ions across the membrane against the gradient. It is plausible that this network of post-mitotic cells makes use of mitochondria as adaptive and receptive component to fine tune neuronal behaviour in times of need. The triggering of MI results in a large change in the signaling between the heart and the brain [71]. The response at the interface of the heart is more similar to the connected neuronal network that we anticipated. On the other hand, the MO appears to make use of a large number of similar proteins with these neuro-connective tissues in terms of its adaptive response to signals such as MI and RTX. The precise injection of RTX in the pericardium to interact with epicardial sensory neurons ablates signaling from the heart to the brain [22, 26, 27]. There is an immense proteomic impact with RTX treatment alone on all tissues and there is a large overlap in terms of functional pathways and individual proteins shared with the MI treatment groups. While this is an important and surprising finding, we cannot discern at a proteomic level exactly how RTX treatment alleviates the symptoms associated with MI. However, our findings suggest that mitochondria plays an important role. Not only can one suppose that the difference in signaling associated with MI and RTX require different energy stores, one can also imagine the mitochondria as low-level signaling sensors for the intracellular health of the cells participating in the neuronal connection. The mitochondria, as they adapt, can trigger response adaptation in the cytoskeletal network as well as all manner of signaling apparatus that manage vesicle traffic and interpretation of extracellular stimuli [72, 73]. One can even envision that the electromagnetic pulses of the tissue are sensed by the H^+ gradients inside the mitochondria and that the first level of cellular detection to changes in neuronal pulse frequency are the mitochondria due to the proton gradients that grow adapted to whatever frequency is present.

It is important to recognize certain limitations associated with these experiments. For example,

we did not measure infarct size at the early time points and prior to the collection of tissues at the immediate time point, animals were under isoflurane inhalant and ventilated; both of which have effects on cardiac and nervous system function [74, 75] . Additionally, only proteomic data was analysed in this research, hence the sensitivity might be limited especially for the 5 min time points. Since we focussed our research on dissected portions of each tissue, observed changes may reflect only a portion of the systemically changing events. Our bioinformatic analyses revealed a high degree of overlap between all tissues and treatments heavily implicating metabolism and mitochondrial function. Despite the overlap in terms of proteins identified and their respective functional pathways, there are clearly very different expression profiles over time in the tissues studied based on the treatment imposed.

Conclusion

We provide central pathways for systemic metabolic allostasis to cardiac dysfunction and add to the important growing body of evidence for systemic, integrative pathophysiological responses regulated by cardiac sensory fibres in HF. These results should aid in establishing future experiments to dissect how metabolic changes in neuronal tissues can effectively ameliorate the negative physiological effects of MI via RTX application. Efforts towards developing effective treatments for HF have shown limited efficacy at best, with no efficient cure to this day. Our work helps to uncover certain differential metabolic constituents involved in the link between cardiac metabolism and the peripheral and central nervous systems that are potential targets for future therapies. Therapeutics combining neuroprotective aspects in addition to modulation of metabolic activities may offer better outcomes for HF patients.

Acknowledgments

We acknowledge core support from Animal facility ANEXPLO, CREFRE US006 Ranguel,

and in particular Xavier Sudre for his expertise. This work was funded by the Foundation de France grant number RAF18002BBA awarded to Dina N Arvanitis. The proteomic investigations were funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry discovery grant no. RGPIN-2020-05228). Laboratory equipment was funded by the Canadian Foundation for Innovation (CFI) and the Fonds de Recherche du Québec (FRQ), the Government of Quebec (F. Beaudry CFI John R. Evans Leaders grant no. 36706). F. Beaudry is the holder of the Canada Research Chair in metrology of bioactive molecule and target discovery (grant no. CRC-2021-00160). This research was undertaken, partly, thanks to funding from the Canada Research Chairs Program. Ph.D. scholarships were awarded to J. Ben Salem from the Fonds de Recherche du Québec - Santé (scholarship no. 302490) and from the Université de Montréal.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data availability

The data that support the findings from this study are available from the corresponding author upon reasonable request

References

1. Savarese G, Division of Cardiology, Department of Medicine, Karolinska Insitutet, Stockholm, Sweden, Department of Cardiology, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden, et al (2017) Global Public Health Burden of Heart Failure. *Cardiac Failure Review* 03:7. <https://doi.org/10.15420/cfr.2016:25:2>
2. Arif M, Klevstig M, Benfeitas R, et al (2021) Integrative transcriptomic analysis of tissue-specific metabolic crosstalk after myocardial infarction. *eLife* 10:e66921. <https://doi.org/10.7554/eLife.66921>
3. Doran S, Arif M, Lam S, et al (2021) Multi-omics approaches for revealing the complexity of cardiovascular disease. *Briefings in Bioinformatics* 22:bbab061. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab061>
4. Katz SD (2018) Pathophysiology of Chronic Systolic Heart Failure. A View from the Periphery. *Annals ATS* 15:S38–S41. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201710-789KV>
5. Muqtadar H, Testai FD, Gorelick PB (2012) The Dementia of Cardiac Disease. *Curr Cardiol Rep* 14:732–740. <https://doi.org/10.1007/s11886-012-0304-8>
6. Amare AT, Schubert KO, Klingler-Hoffmann M, et al (2017) The genetic overlap between mood disorders and cardiometabolic diseases: a systematic review of genome wide and candidate gene studies. *Transl Psychiatry* 7:e1007–e1007. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.261>
7. Doehner W, Ural D, Haeusler KG, et al (2018) Heart and brain interaction in patients with heart failure: overview and proposal for a taxonomy. A position paper from the Study Group on Heart and Brain Interaction of the Heart Failure Association: Heart and brain interaction in heart failure. *Eur J Heart Fail* 20:199–215. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1100>

8. Tahsili-Fahadan P, Geocadin RG (2017) Heart–Brain Axis: Effects of Neurologic Injury on Cardiovascular Function. *Circ Res* 120:559–572.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308446>
9. Park CM, Williams ED, Chaturvedi N, et al (2017) Associations Between Left Ventricular Dysfunction and Brain Structure and Function: Findings From the SABRE (Southall and Brent Revisited) Study. *JAHA* 6:. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004898>
10. Suzuki H, Sumiyoshi A, Matsumoto Y, et al (2015) Structural abnormality of the hippocampus associated with depressive symptoms in heart failure rats. *NeuroImage* 105:84–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.10.040>
11. Ovsenik A, Podbregar M, Fabjan A (2021) Cerebral blood flow impairment and cognitive decline in heart failure. *Brain Behav* 11:. <https://doi.org/10.1002/brb3.2176>
12. Tromp J, Westenbrink BD, Ouwerkerk W, et al (2018) Identifying Pathophysiological Mechanisms in Heart Failure With Reduced Versus Preserved Ejection Fraction. *Journal of the American College of Cardiology* 72:1081–1090.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.06.050>
13. Elam M, Sverrisdottir YB, Rundqvist B, et al (2003) Pathological sympathoexcitation: how is it achieved? *Acta Physiologica Scandinavica* 177:405–411.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2003.01080.x>
14. May CN, Frithiof R, Hood SG, et al (2010) Specific control of sympathetic nerve activity to the mammalian heart and kidney: Control of cardiac and renal sympathetic nerve activity. *Experimental Physiology* 95:34–40.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.046342>
15. Zhang DY, Anderson AS (2014) The Sympathetic Nervous System and Heart Failure. *Cardiology Clinics* 32:33–45. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2013.09.010>

16. Despas F, Detis N, Dumonteil N, et al (2009) Excessive sympathetic activation in heart failure with chronic renal failure: role of chemoreflex activation: *Journal of Hypertension* 27:1849–1854. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32832e8d0f>
17. Despas F, Lambert E, Vaccaro A, et al (2012) Peripheral chemoreflex activation contributes to sympathetic baroreflex impairment in chronic heart failure: *Journal of Hypertension* 30:753–760. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328350136c>
18. Franchitto N, Despas F, Labrunee M, et al (2013) Cardiorenal anemia syndrome in chronic heart failure contributes to increased sympathetic nerve activity. *International Journal of Cardiology* 168:2352–2357. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.023>
19. Kishi T (2016) Deep and future insights into neuromodulation therapies for heart failure. *Journal of Cardiology* 68:368–372. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2016.05.010>
20. Kingma JG, Simard D, Rouleau JR (2017) Influence of cardiac nerve status on cardiovascular regulation and cardioprotection. *WJC* 9:508. <https://doi.org/10.4330/wjc.v9.i6.508>
21. Zahner MR, Li D-P, Chen S-R, Pan H-L (2003) Cardiac vanilloid receptor 1-expressing afferent nerves and their role in the cardiogenic sympathetic reflex in rats. *The Journal of Physiology* 551:515–523. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.048207>
22. Coote JH, Chauhan RA (2016) The sympathetic innervation of the heart: Important new insights. *Autonomic Neuroscience* 199:17–23. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2016.08.014>
23. Chen W-W, Xiong X-Q, Chen Q, et al (2015) Cardiac sympathetic afferent reflex and its implications for sympathetic activation in chronic heart failure and hypertension. *Acta Physiol* 213:778–794. <https://doi.org/10.1111/apha.12447>

24. Yoshie K, Rajendran PS, Massoud L, et al (2020) Cardiac TRPV1 afferent signaling promotes arrhythmogenic ventricular remodeling after myocardial infarction. *JCI Insight* 5:e124477. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.124477>
25. Senador Danielle, Kaur Jasdeep, Sala-Mercardo Javier A., et al (2017) Pharmacological cardiac sympathetic afferent denervation in pacing-induced heart failure. *The FASEB Journal* 31:p.884.2-844.2. https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.844.2
26. Wang H-J, Wang W, Cornish KG, et al (2014) Cardiac Sympathetic Afferent Denervation Attenuates Cardiac Remodeling and Improves Cardiovascular Dysfunction in Rats With Heart Failure. *Hypertension* 64:745–755. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03699>
27. Kermorgant M, Ben Salem J, Iacovoni JS, et al (2021) Cardiac sensory afferents modulate susceptibility to anxio-depressive behaviour in a mouse model of chronic heart failure. *Acta Physiol* 231:. <https://doi.org/10.1111/apha.13601>
28. Foreman RD (1999) MECHANISMS OF CARDIAC PAIN. *Annu Rev Physiol* 61:143–167. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.143>
29. Cechetto DF (2014) Cortical control of the autonomic nervous system: Cortical autonomic control. *Experimental Physiology* 99:326–331. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.075192>
30. Wu Y, Hu Z, Wang D, et al (2020) Resiniferatoxin reduces ventricular arrhythmias in heart failure via selectively blunting cardiac sympathetic afferent projection into spinal cord in rats. *European Journal of Pharmacology* 867:172836. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172836>

31. Capilupi MJ, Kerath SM, Becker LB (2020) Vagus Nerve Stimulation and the Cardiovascular System. *Cold Spring Harb Perspect Med* 10:a034173.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034173>
32. Dusi V, De Ferrari GM, Mann DL (2020) Cardiac Sympathetic-Parasympathetic Interaction. *JACC: Basic to Translational Science* 5:811–814.
<https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.07.004>
33. Bibeovski S, Dunlap ME (2011) Evidence for impaired vagus nerve activity in heart failure. *Heart Fail Rev* 16:129–135. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9190-6>
34. Li M, Zheng C, Kawada T, et al (2019) Chronic vagal nerve stimulation exerts additional beneficial effects on the beta-blocker-treated failing heart. *J Physiol Sci* 69:295–303. <https://doi.org/10.1007/s12576-018-0646-0>
35. Liu J-J, Huang N, Lu Y, et al (2015) Improving vagal activity ameliorates cardiac fibrosis induced by angiotensin II: in vivo and in vitro. *Sci Rep* 5:17108.
<https://doi.org/10.1038/srep17108>
36. Zannad F, De Ferrari GM, Tuinenburg AE, et al (2015) Chronic vagal stimulation for the treatment of low ejection fraction heart failure: results of the NEural Cardiac TherApy foR Heart Failure (NECTAR-HF) randomized controlled trial. *European Heart Journal* 36:425–433. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu345>
37. Chen EY, Tan CM, Kou Y, et al (2013) Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14:128.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-128>
38. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, et al (2016) Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 44:W90–W97.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw377>

39. Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV, et al (2021) Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Current Protocols* 1:. <https://doi.org/10.1002/cpz1.90>
40. Pullen AB, Kain V, Serhan CN, Halade GV (2020) Molecular and Cellular Differences in Cardiac Repair of Male and Female Mice. *JAHA* 9:. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.015672>
41. Brar TK (2015) Effect of Different Phases of Menstrual Cycle on Heart Rate Variability (HRV). *JCDR*. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13795.6592>
42. Mena F, Benoit L (2019) Molecular programs underlying differences in the expression of mood disorders in males and females. *Brain Research* 1719:89–103. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.05.016>
43. Wang H-J, Rozanski GJ, Zucker IH (2017) Cardiac sympathetic afferent reflex control of cardiac function in normal and chronic heart failure states: Cardiac sympathetic afferent reflex control. *The Journal of Physiology* 595:2519–2534. <https://doi.org/10.1113/JP273764>
44. Yoshie K, Rajendran PS, Massoud L, et al (2018) Cardiac vanilloid receptor-1 afferent depletion enhances stellate ganglion neuronal activity and efferent sympathetic response to cardiac stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 314:H954–H966. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00593.2017>
45. The M, MacCoss MJ, Noble WS, Käll L (2016) Fast and Accurate Protein False Discovery Rates on Large-Scale Proteomics Data Sets with Percolator 3.0. *J Am Soc Mass Spectrom* 27:1719–1727. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1460-7>
46. Orsburn BC (2021) Proteome Discoverer—A Community Enhanced Data Processing Suite for Protein Informatics. *Proteomes* 9:15. <https://doi.org/10.3390/proteomes9010015>

47. Smith CL, Eppig JT (2009) The mammalian phenotype ontology: enabling robust annotation and comparative analysis. *WIREs Syst Biol Med* 1:390–399.
<https://doi.org/10.1002/wsbm.44>
48. R Foundation for Statistical Computing R Core Team (2014). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria
49. Gao C-H, Yu G, Cai P (2021) ggVennDiagram: An Intuitive, Easy-to-Use, and Highly Customizable R Package to Generate Venn Diagram. *Front Genet* 12:706907.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2021.706907>
50. Wickham H (2009) *ggplot2*. Springer New York, New York, NY
51. Jassal B, Matthews L, Viteri G, et al (2019) The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Research* gkz1031. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031>
52. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25:25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
53. The Gene Ontology Consortium, Carbon S, Douglass E, et al (2021) The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine. *Nucleic Acids Research* 49:D325–D334.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1113>
54. Raivo Kolde (2019) *pheatmap: Pretty Heatmaps*
55. Li D, Mabrouk OS, Liu T, et al (2015) Asphyxia-activated corticocardiac signaling accelerates onset of cardiac arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:E2073–E2082.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1423936112>
56. Sapio MR, Neubert JK, LaPaglia DM, et al (2018) Pain control through selective chemo-axotomy of centrally projecting TRPV1+ sensory neurons. *Journal of Clinical Investigation* 128:1657–1670. <https://doi.org/10.1172/JCI94331>

57. Jeffry JA, Yu S-Q, Sikand P, et al (2009) Selective Targeting of TRPV1 Expressing Sensory Nerve Terminals in the Spinal Cord for Long Lasting Analgesia. *PLoS ONE* 4:e7021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007021>
58. Hong J, Lisco AM, Rudebush TL, et al (2020) Identification of Cardiac Expression Pattern of Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) Receptor using a Transgenic Reporter Mouse Model. *Neuroscience Letters* 737:135320. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135320>
59. Zhao S, Dai Y, Ning X, et al (2021) Vagus Nerve Stimulation in Early Stage of Acute Myocardial Infarction Prevent Ventricular Arrhythmias and Cardiac Remodeling. *Front Cardiovasc Med* 8:648910. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.648910>
60. Doehner W, Frenneaux M, Anker SD (2014) Metabolic Impairment in Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology* 64:1388–1400. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.04.083>
61. Rosano GM, Department of Medical Sciences, IRCCS San Raffaele Pisana, Rome, Italy, Vitale C, Department of Medical Sciences, IRCCS San Raffaele Pisana, Rome, Italy (2018) Metabolic Modulation of Cardiac Metabolism in Heart Failure. *Cardiac Failure Review* 4:99. <https://doi.org/10.15420/cfr.2018.18.2>
62. Zucker IH, Xiao L, Haack KKV (2014) The central renin–angiotensin system and sympathetic nerve activity in chronic heart failure. *Clinical Science* 126:695–706. <https://doi.org/10.1042/CS20130294>
63. Philippou A, Xanthis D, Chryssanthopoulos C, et al (2020) Heart Failure–Induced Skeletal Muscle Wasting. *Curr Heart Fail Rep* 17:299–308. <https://doi.org/10.1007/s11897-020-00468-w>
64. Jahng JWS, Song E, Sweeney G (2016) Crosstalk between the heart and peripheral organs in heart failure. *Exp Mol Med* 48:e217–e217. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.20>

65. Van Linthout S, Tschöpe C (2017) Inflammation – Cause or Consequence of Heart Failure or Both? *Curr Heart Fail Rep* 14:251–265. <https://doi.org/10.1007/s11897-017-0337-9>
66. Kemp CD, Conte JV (2012) The pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular Pathology* 21:365–371. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2011.11.007>
67. Nakamura M, Sadoshima J (2018) Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol* 15:387–407. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0007-y>
68. Fuller GG, Kim JK (2021) Compartmentalization and metabolic regulation of glycolysis. *Journal of Cell Science* 134:jcs258469. <https://doi.org/10.1242/jcs.258469>
69. Franzoso M, Zaglia T, Mongillo M (2016) Putting together the clues of the everlasting neuro-cardiac liaison. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863:1904–1915. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.009>
70. Pius-Sadowska E, Machaliński B (2021) Pleiotropic activity of nerve growth factor in regulating cardiac functions and counteracting pathogenesis. *ESC Heart Failure* 8:974–987. <https://doi.org/10.1002/ehf2.13138>
71. Méloux A, Béjot Y, Rochette L, et al (2020) Brain-Heart Interactions During Ischemic Processes: Clinical and Experimental Evidences. *Stroke* 51:679–686. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.027732>
72. Miller MA, Zachary JF (2017) Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Elsevier, pp 2-43.e19
73. Moore AS, Holzbaur EL (2018) Mitochondrial-cytoskeletal interactions: dynamic associations that facilitate network function and remodeling. *Current Opinion in Physiology* 3:94–100. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.03.003>

74. Constantinides C, Mean R, Janssen BJ (2011) Effects of isoflurane anesthesia on the cardiovascular function of the C57BL/6 mouse. *ILAR J* 52:e21-31
75. Janssen BJA, De Celle T, Debets JJM, et al (2004) Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 287:H1618–H1624. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01192.2003>

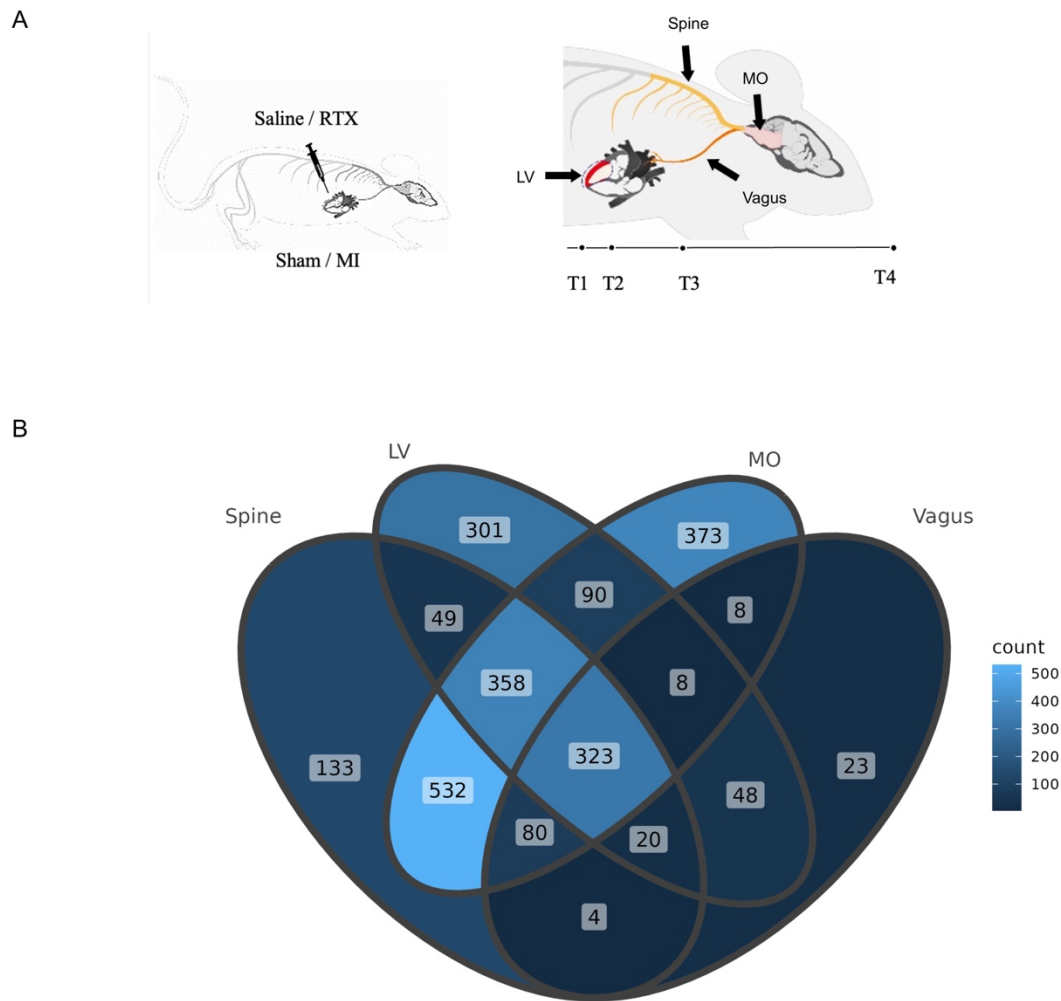


Figure 1. A) Illustrated workflow of the experimental protocol used in the study. Adult male C57BL6 males were subject to acute irreversible myocardial infarction in the presence of pericardial targeted injections of RTX or saline. The following time points T1 (5 min), T2 (20 min), T3 (24h) and T4 (12-weeks) from the left ventricle (LV), spine, vagus and medulla oblongata (MO) were isolated and processed for mass spectrometry. B) Degree of proteomic overlap between the four tissues under investigation. Tryptic peptides with a valid signal retained after initial filtering in at least 2 of 4 time-points and 2 of 4 treatments in at least 2/4 time points resulting in 1,499 proteins from spine samples, 1,197 from LV, 1,772 from MO and 514 from vagus. Area colour brightness is used to indicate areas with the highest number of overlapping proteins as the lightest shade of blue. In addition to the 301 unique proteins from the left ventricle and the 373 from the medulla, the largest shared groups include spine-medulla (532), spine-medulla-left ventricle (358) and the central zone, shared between all tissues (323).

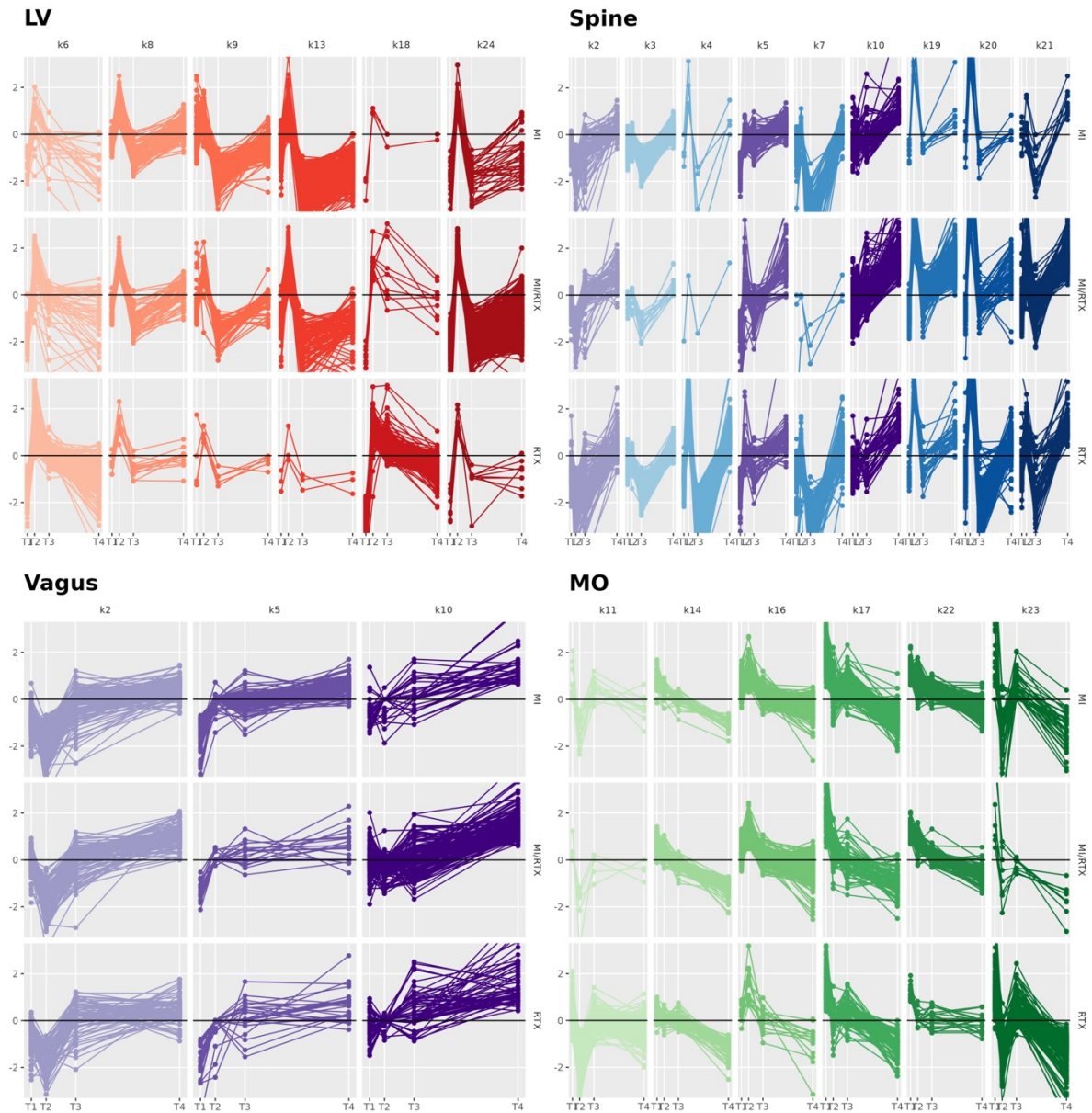


Figure 2. All protein expression time series, expressed as delta-means with respect to Sham controls, were partitioned by hierarchical clustering (kmeans, $k = 24$). Each k-cluster is arbitrarily assigned a specific colour, with LV in reds, Spine in blues, MO in greens and the 3 clusters shared between Spine and Vagus in purples. K-clusters with less than 100 proteins from any treatment group were not retained, leading to 21 out of 24 k-clusters being shown. Profiles are displayed with time on the x-axis and the delta-mean with respect to sham on the y-axis. A) LV 6 k-clusters, B) Spine 9 k-clusters, C) Vagus 3 k-clusters, D) MO 6 k-clusters.

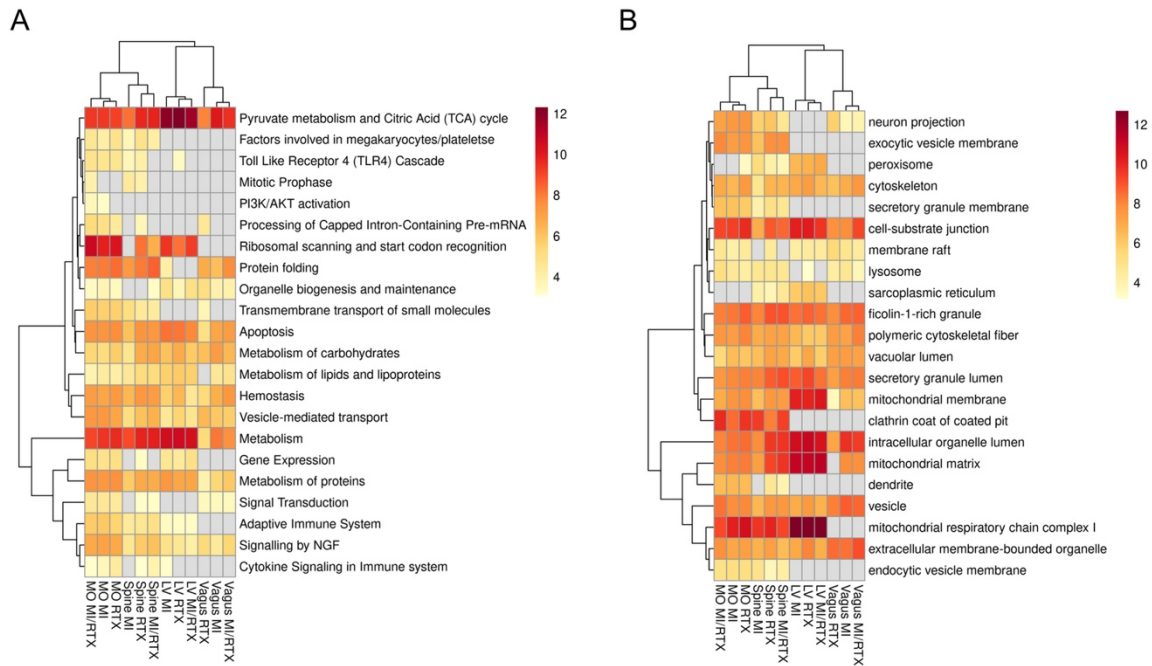


Figure 3. Functional characterization of the sets of proteins found for each tissue/treatment group were assessed using EnrichR and the Reactome (A) and Gene Ontology cellular component (B) database. Only pathways with adjusted p-value ≤ 0.05 were retained for downstream analysis. Within the heatmap, the cells are colored based on $\log_2(2 + \text{enrichR-CombinedScore})$ and the sample groups are clustered based on these values. The rows are clustered based on the degree of overlap of the proteins within each set that led to enrichment of each pathway. Clustering and cutree were used to group similar pathways ($h=500$ for Reactome and $h=100$ for GO:CC) and the pathway with the best CombinedScores within each cluster were selected for visualization in the heatmap.

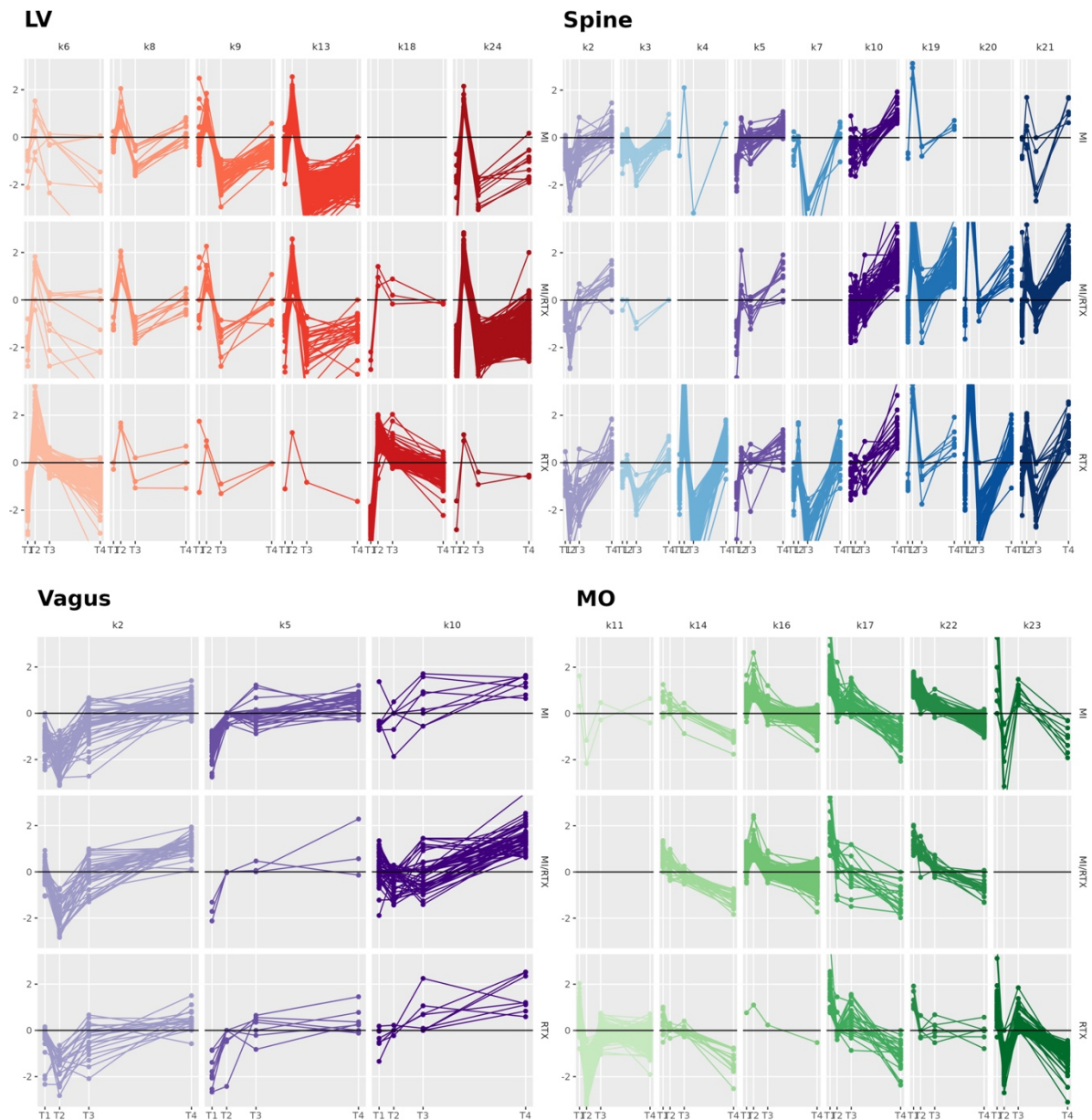


Figure 4. Wave profiles representing only the proteins identified in the Metabolism Reactome pathway for the LV, Spine, vagus and MO extracted from the profiles shown in Figure 2. A. Differing profiles are observed in the LV for MI and MI/RTX. k9 and k13 appear to be MI specific profiles while MI/RTX protein response profiles concentrated in k24 and RTX response is most evident in k6 and k18. B. In the spine MI response is observed in k3 and k10 and RTX appears responsible for protein responses observed in k4, k19 k20 and k21. C. Proteomic responses in the vagus showed that the k5 cluster is MI dependent and MI/RTX showed an increased tendency in k10. RTX treatment had little effect on the metabolic profiles of the vagus. D. The MO also showed that k16 and k22 may be MI specific, while k23 is an intriguing profile solicited strongly by RTX, absent from MI/RTX, but a small subset of proteins share a similar profile in MI.



Figure 5. Treatment focused pathway enrichment heatmaps for proteins with long term expression changes. To focus on pathways that contained proteins with large fluctuations in expression over time, we selected proteins that had absolute delta-means ≥ 1.0 at 12-weeks and either/both of the 5 min and 24 h time points for each tissue/treatment group and again applied an enrichR analysis with the Reactome database. Pathways where the p-value > 0.01 are in grey and the heatmap is colored by $\log_2(2 + \text{enrichR-CombinedScore})$. Metabolism is a dominant pathway with differential protein expression in all treatments A) MI, B) MI/RTX, C) RTX. A Venn diagram including the three treatments was used to demonstrate the degree of overlap within these sets of Metabolism proteins (D).

Article 5 : Evaluation of Upconverting nanoparticles towards heart theranostics

PLoS One, Décembre 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0225729.

Marc Kermorgant^{1,a}, Jennifer Ben Salem^{1,2,a}, Julien Santelli³, Denis Calise⁴, Anne-Cécile Oster¹, Olivier Lairez⁵, Christophe Coudret⁶, Marc Verelst⁷, Céline Gales¹, Jean-Michel Sénard^{1,8}, Francis Beaudry², Anne Pavy-Le Traon⁹, Clément Roux^{6*}, Robert Mauricot³, and Dina N Arvanitis^{1*}

¹ *Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM UMR1048, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne Toulouse Cedex 9, France*

² *Groupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada*

³ *CEMES-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, 29 rue Jeanne Marvig Toulouse cedex 4, France*

⁴ *Service Microchirurgie. Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et Ressources Expérimentales (CREFRE- US06, Rangueil)*

⁵ *Fédération des services de cardiologie, hôpital Rangueil, 1 avenue Jean Poulhès, TSA 50032, Toulouse cedex 9*

⁶ *Laboratoire des IMRCP, Université de Toulouse, CNRS UMR 5623, Université Toulouse III - Paul Sabatier*

⁷ *CHROMALYS SAS, 29 rue Jeanne Marvig BP 94347 Toulouse cedex 4, France*

⁸ *Service de Pharmacologie Clinique, CHU de Toulouse, Université de Toulouse, France*

⁹ *Département de Neurologie et Institut des Neurosciences, Université de Toulouse, Place du Dr Baylac Toulouse Cedex 9, France*

^a These authors contributed equally to this work.

* *Corresponding authors : Clément Roux : c.roux@chimie.ups-tlse.fr; Dina Arvanitis : constandina.arvanitis@univ-tlse3.fr*

Abstract

Restricted and controlled drug delivery to the heart remains a challenge giving frequent off-target effects as well as limited retention of drugs in the heart. There is a need to develop and optimize tools to allow for improved design of drug candidates for treatment of heart diseases. Over the last decade, novel drug platforms and nanomaterials were designed to confine bioactive materials to the heart. Yet, the research remains in its infancy, not only in the development of tools but also in the understanding of effects of these materials on cardiac function and tissue integrity. Upconverting nanoparticles are nanomaterials that recently accelerated interest in theranostic nanomedicine technologies. Their unique photophysical properties allow for sensitive *in vivo* imaging that can be combined with spatio-temporal control for targeted release of encapsulated drugs.

Here we synthesized upconverting NaYF₄:Yb,Tm nanoparticles and show for the first time their innocuity in the heart, when injected in the myocardium or in the pericardial space in mice. Nanoparticle retention and upconversion in the cardiac region did not alter heart rate variability, nor cardiac function as determined over a 15-day time course ensuing the sole injection. Altogether, our nanoparticles show innocuity primarily in the pericardial region and can be safely used for controlled spatiotemporal drug delivery.

Our results support the use of upconverting nanoparticles as potential theranostics tools overcoming some of the key limitations associated with conventional experimental cardiology.

Introduction

Cardiovascular diseases (CVD), an umbrella term for a number of different pathologies including arteriosclerosis, coronary artery disease, arrhythmia, hypertension and heart failure, are the leading cause of morbidity and mortality in the world[1]. Heart failure is a major cause of late morbidity and mortality after myocardial infarction (reviewed in [2]). Therapeutic interventions to prevent heart failure are of considerable active research. For example, treatment of the infarcted heart through experimental strategies has involved the delivery of growth factors, cytokines, and drugs to the infarcted cardiac tissues (reviewed in [3–5]).

Principal drug delivery methods indirectly target the heart. However, despite the efficiency of the usual routes of administration, they often result in off-target effects as well as limited concentrations and low retention of the factors in the desired area. To circumvent the low cardiac bioavailability and systemic effects observed by peripheral administration routes, targeted drug delivery approaches are currently considered. For instance, direct injections into the cardiac muscle, the myocardium, have been used to localize drugs or stem cells to infarcted regions[6]. Drug vectorization to the heart can also be achieved by injection into the pericardial space which has a large potential for localized drug delivery [7]. Both approaches for injection, whether in

the intramyocardial (intraMY) and intrapericardial (intraPE) space, are used in experimental and clinical settings and are highly adaptable to the study design and expected endpoints. To date, despite significant advances in the development of effective cardiac therapeutic agents and in drug delivery technologies, enduring drug availability in the heart remains a complex and pervasive conundrum in research and clinical settings. As such, there is a need to develop drug-delivery and repeat-release approaches to deliver and maintain therapeutic materials to cardiac tissue with minimal adverse effects.

The need for spatiotemporal control for targeted release of various drugs that can be coupled with the capacity for imaging has accelerated interest in theranostic technologies. Theranostics is the integration of imaging (diagnostics) and drug delivery (therapy) for application in personalized medicine[8]. In recent years, lanthanide-doped upconverting nanoparticles (UCNPs) have emerged as suitable tools for use in theranostics because of multiple features associated to the lanthanide ions. In particular, their unique optical properties originating from their electron configuration of the 4f shell[9]. Indeed, the various lanthanide ions typically present a great number of energy levels and their excited states are usually long lived[10]. Due to these spectroscopic features, these rare earth ions are in contrast to other chromophores whereby they accept energy in the near-infrared range (NIR; 980 nm, when doped with Ytterbium as the sensitizer) and emit at lower wavelengths than the excitation. When the nanocrystals are doped with Thulium as the activator, the main emission is observed in the biologically favourable 800 nm range[10]. The illumination in the NIR, and anti-Stokes luminescence[11] is used to reduce the auto-fluorescent background allowing for improved signal-to-noise ratio. The narrow emission bandwidth of UCNPs allows ease of multiplexed imaging, and very limited to inexistent photobleaching making them relevant for long-term and repetitive imaging[12]. In addition, UCNPs permit deep tissue penetration, for instance reported to be between 1.6 cm and 3.2 cm with minimal signal-to-noise background[13,14] because of the excitation in the NIR that is within the optical transparency window[15,16].

Given their advantageous photophysical properties, UCNPs have been exploited in a variety of *ex vivo*[17] as well as in *in vivo* situations, ranging from luminescence-based imaging[18]; to anti-cancer drug delivery[19]; and, to mouse behavior control via optogenetics[20]. In the context of targeted drug delivery, in order to minimize the drawbacks of conventional drug delivery with more specific and efficient target delivery, UCNPs as nanocarriers are promising tools[21,22]. Few recent examples of heart-specific studies employing various nanomaterials are revealing a promising role for nanoparticle use to unravel the complexity and help treat CVDs[23–25]. While still in its infancy, there is an imperative need to optimize the use of nanoparticles on the heart; with particular attention to the long-term conservancy of cardiac

tissue and cardiac function *in vivo*.

The aim of the present study was to determine the innocuity of UCNPs to the heart and then explore their potential for time and space-controlled drug delivery. NaYF₄:Yb,Tm NIR-emitting UCNPs were synthesized and used to measure the differential accumulation and distribution of the nanoparticles over a 15-day course following either intraperitoneal, intraMY or intraPE injections. Indeed, the pericardium, which is a thin layer that separates the heart from the thoracic cavity and provides structural support while also having a substantial hemodynamic impact on the heart, was a focal point of this study. Notably, we examined heart rate (HR), as determined by real-time electrocardiogram (ECG) monitoring, during the excitation upconversion phase that was repeated throughout the entire time course, to identify whether the UCNPs and or the laser beam localized to the chest area, have an impact on cardiac rhythm.

Materials and methods

Materials

Hydrated rare earth chlorides (99.9%), octadecene and oleic acid were from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). NH₄F, and NaOH were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). PEO₆₀₀₀-PAA₆₅₀₀ was from Polymer Source (Montreal, Canada). All Other solvents were from Sigma Aldrich and of HPLC grade.

Preparation of NaYF₄:Yb,Tm Upconverting Nanocrystals

Upconversion nanocrystals were synthesized by a well-established high temperature liquid-phase protocol[26]. YCl₃.6H₂O (315 mg, 1.03 mmol), YbCl₃.6H₂O (174 mg, 0.45 mmol), TmCl₃.6H₂O (3 mg, 7.8 μmol), dissolved in 500 μL of water were added to 24.5 mL of octadecene and 4.5 mL of oleic acid. The suspension was heated to 160°C under argon using a heating mantle, maintained at 160°C for 1 h, which yielded a clear light-yellow solution. After cooling to room temperature, 10 mL of a MeOH solution containing NH₄F (222 mg), and NaOH (150 mg) were added dropwise while stirring. The suspension was heated and maintained at 50°C under a continuous argon flow for 30 min. The temperature was increased and maintained for 1 h at 100°C to allow for the evaporation of the methanol. The flask was then stoppered and 3 vacuum/argon cycles were applied using a high-vacuum pump. The heating mantle was then gradually increased to 310°C (the temperature reached 300°C after 15 min, 310°C in 30 min) for a total of 90 min. After cooling to room temperature, the crude reaction mixture was poured into 8 mL of ethanol. The particles were centrifuged at 9000 g and rinsed twice with ethanol. The solvent was then removed in a vacuum oven at 80°C, yielding 324 mg of a white powder.

Preparation of Polyethylene oxide- polyacrylic acid (PEO-PAA)-coated UCNPs

5 mg of the above described particles were dispersed in 3 mL of toluene together with 5 mg of PEO₆₀₀₀-PAA₆₅₀₀. 3 drops of 1 M NaOH were added to help with polymer dissolution. This solution was transferred to a sealed vial and heated to 100°C for 1 h using a monomode microwave oven (monowave 300 Anton Paar, Les Ulis, France). Deionized water (1 mL) was then added and the aqueous phase was collected. Purification was achieved by three centrifugation steps at 9000 g. Following the last centrifugation, the particles were suspended in 2 mL of deionized water.

Characterization of NaYF₄:Yb,Tm Upconverting Nanocrystals

The particles were characterized by TEM microscopy (HT 7700 Hitachi), operating at 80 kV and 12 μ A on standard formvar coated TEM grids (Electron Microscopy Sciences). Luminescence spectra numr980 nm CW laser (MDL-H-980, CNI lasers).

Animals

Wild-type, 9-11 week old males C57BL/6J (Envigo) were used. Animals were housed with food and water available ad libitum under standard 12h light/dark cycles. Animal procedures were approved by the national Animal Care and Ethics Committee (CE2A122 protocol number 2017092913349468) following Directive 2010/63/EU.

Injections

For intraperitoneal injections, animals were briefly anaesthetized by a gas induction by 2% of isoflurane inhalant mixed with 1 L.min⁻¹ 100% O₂ and injected with 5 μ L of a 1 μ g. μ L⁻¹ solution of nanoparticles, and allowed to regain consciousness in their respective cages. For cardiac injections, anesthesia was induced using ketamine / xylazine (125/5 mg.kg⁻¹) by intraperitoneal injection and maintained with 2% of isoflurane inhalant mixed with 1 L.min⁻¹ 100% O₂. The analgesic, buprenorphine (100 μ g.kg⁻¹), was administered subcutaneously. Using an operating microscope Zeiss OPM1 FC, tracheal intubation was performed for ventilation with the mini-wind (Harvard Apparatus). An incision of the 4th intercostal space was performed to provide adequate exposure of the thoracic cavity. The left atrioventricular block was exposed and for intraMY injections a catheter was used to inject 5 μ L of the nanoparticle solution into the myocardial wall of the apex of the left ventricle. For intraPE injections, a catheter was gently introduced within the pericardium and 5 μ L of nanoparticle solution was injected. Evans Blue was used as a tracking dye to ensure lack of spillage. Controls consisted of phosphate buffer saline (PBS) injections into the respective areas. The intercostal space and skin surface were successively sutured using an Ethilon 6/0 thread (Ethnicon).

BioImaging and Image processing

The setup consisted of a dark chamber supplied with an arrival for a precisely blended mixture of oxygen and isoflurane anesthetics. The compartment was also equipped with the Small Animal Physiological Monitoring system (Harvard Apparatus), which permitted rectal temperature control of the animal and continuous ECG readings. For upconversion and imaging, the chamber was fitted with a CCD camera (iKon-M 934, Andor) that was paired with an optical fiber and a beam expander (BE05M-B, Thorlabs) allowing for a 2.8 cm circular illumination area for excitation centered at 980 nm. All imaging sessions were performed with an excitation laser beam power density of 290 mW.cm^{-2} (controlled with a gentec power detector (PM130D, Thorlabs)) with 5 or 10 sec exposure times and were collected in control room temperature at 21°C . Hearts, including the pericardium, were microdissected, rinsed quickly in PBS and imaged with an excitation laser beam power density of 290 mW.cm^{-2} .

A multicolor LUT was applied to the upconversion luminescence images, using a constant display range across all images. This upconversion image was then overlaid with an image recorded with white light illumination.

Transthoracic Echocardiography

Mice were anesthetized by 2% of isoflurane inhalant mixed with 1 L/min 100% O_2 to maintain light sedation throughout the procedure. They were immobilized ventral side up on a heating platform to maintain the body temperature at $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Mice chests were shaved and warmed ultrasound gel was applied to the area of interest. Transthoracic echocardiography was performed using a Vevo 2100 system (VisualSonics) with a 40-MHz transducer by a trained user. Images were captured on cine loops at the time of the study and afterward measurements were done off-line. Cardiac ventricular dimensions were measured in M-mode and B-mode images 4 times for each animal. Left ventricle ejection fraction (LVEF) was calculated using parameters automatically computed by the Vevo 2100 standard measurement package. Measurements were obtained by an examiner blinded to the treatment of the animals. All measurements were performed excluding the respiration peaks and obtained in triplicate; mean values were used for data analyses.

Heart rate variability (HRV) and power spectral analysis

For the acquisition of ECG, mice were anesthetized by inhalation of isoflurane at concentrations of 3% during the induction phase. Anesthesia was maintained at 1.5% and continuous recordings were obtained consisting of a minimum 10 min basal state, followed by laser usage (5 sec) and 10 min recordings using the Small Animal Physiological Monitoring system (Harvard Apparatus). ECG signal was obtained with three limb leads. The ECG signals were digitalized at 4 kHz, processed and monitored (Labchart v7, AD Instruments). The R-R interval was

acquired from the ECG signal. Sections of stable HR (5 min before and after laser induction), free of noise and artifacts, were analyzed. HRV was assessed both in time and frequency domains.

Time domain measurements included the following metrics: the standard deviations of the R-R intervals (SDNN) and the root-mean square differences of successive R-R intervals (RMSSD). The SDNN corresponds to all the cyclic components responsible for the overall variability. RMSSD provides information about high frequency variations in HR. Overall, all these metrics reflect the autonomic status (27).

Frequency domain analysis was performed using fast Fourier transform with 1,024 spectral points' series using Welch's periodogram with 50% overlapping window. Frequency domain analysis was analyzed in two separate spectral components: low frequency (LF: 0.15-1.50 Hz) and high frequency (HF: 1.50-5.00 Hz) bandwidths. Very low frequency (VLF: < 0.15 Hz) was excluded from the analysis. These spectral components were expressed in absolute values of power (ms^2) and in normalized units (n.u.). The LF spectrum and the LF (n.u.) $[(100 * \text{LF power} / (\text{total power} - \text{VLF power}))]$ have been considered as an index of cardiac sympathetic tone whereas HF spectrum and HF (n.u.) $[(100 * \text{HF power} / (\text{total power} - \text{VLF power}))]$ reflected cardiac parasympathetic tone. The LF/HF value was obtained from ratio LF (ms^2) / HF (ms^2) and emphasized the sympathovagal balance[27].

Analysis of cardiac tissue necrosis

After 15 days, mice were euthanized by cervical dislocation following isoflurane exposure and hearts were dissected. Hearts were quickly rinsed in cold PBS, and imaged by photo-upconversion to locate nanoparticles. To assess necrosis, cross sections were obtained using a Zivic Mouse Heart Matrix (Zivic) and 200 μm slices were incubated in 1% triphenyltetrazolium (TTC) at 37°C incubator for 10 min. Slices were gently removed from TTC and placed in 4% paraformaldehyde (Sigma) at 4°C for 24 h. The sections were rinsed gently in saline, placed within clear plastic sheets and images of TTC stained sections were captured using a digital scanner. Both sides were scanned and the digital photomicrographs were analyzed for white (damaged/necrotic) versus red (live) tissue using ImageJ, quantified and expressed as a percentage of the sum of necrotic areas from all sections by the sum of all areas from all sections multiplied by 100[28].

Statistical analysis

To compare results between the injection groups, 2-way ANOVA was used. Paired t-test was used for within group comparison. Pearson's correlation was used. A p-value < 0.05 was considered significant.

Results

Synthesis of the upconverting nanoparticles

Upconverting nanoparticles were synthesized using a well-established high-temperature wet chemical synthesis[26]. Figure 1 shows the characterization of their main features. TEM (Fig. 1(a)) was used to establish that the synthesized particles are highly homogeneous in size and have slightly elongated oval shape, with dimensions of 34 nm in minor axis, 38 nm in major axis (Fig. 1(b)). Further insight of the crystal phase was obtained by powder X-ray diffraction and an exact match with hexagonal β -phase NaYF₄ reference data was observed (Fig. 1(c)). The upconversion spectrum was recorded following 980 nm excitation (Fig. 1(d)). Beside a minor emission in the blue range (475 nm, $^1G_4 \rightarrow ^3H_6$ transition), and two in the red range (647 nm, $^1G_4 \rightarrow ^3F_4$; 695 nm, $^3F_3 \rightarrow ^3H_6$) the emission spectrum is dominated by a very strong emission centered at 800 nm ($^3H_4 \rightarrow ^3H_6$ transition) which is typical of particles doped with thulium as emitter.

The particles initially covered in oleic acid ligands were rendered hydrophilic and biocompatible using a hydrophilic polymer coating, by the direct interaction of the OA-capped UCNPs with the macromolecules at 100°C (Polyethylene oxide-b-polyacrylic acid, PEO-PAA)[29].

Experimental set-up

In this study, we investigated the fate of hydrophilic upconverting nanoparticles, following injection in three sites in mice: the peritoneum, the myocardium and the pericardium. The study is conceptually described in Fig. 2. In order to track nanoparticles, we assembled a bioimager that comprised a 980 nm laser source for excitation, which was passed through a beam expander in order to achieve an irradiated area of approximately 2.8 cm in diameter. The animal was anaesthetized using isoflurane and positioned according to the region of the body being examined. A physiological monitoring apparatus was implemented in the imager, which allowed for ECG to be recorded simultaneously to laser irradiation, and a rectal probe allowed for temperature control. The upconverted light was collected with a highly sensitive CCD camera, with peak quantum efficiency centered on 800 nm.

Persistence of nanoparticles in the heart

Evans blue dye and bioimaging by upconversion immediately following the injection of the PEO-PAA coated nanoparticles were used to control for targeted placement and for any residual spillage of the injected solutions from the injection site. No non-specific leaks were detected in our experimental groups receiving intraMY or intraPE injections immediately following surgery.

Time-course emission intensity was performed in the heart to determine the persistence of the nanoparticles within this region. Clearance of the nanoparticles was determined based on emission intensity at two regions: the kidney and liver. Following the injection by intraperitoneal route, which was included as control, we were unable to detect the presence of the nanoparticles in the heart at any of the time points measured. By 7-days post-injection there was no trace of nanoparticles in the subjects (Fig. 3(a)). Injection in the myocardium permitted the retention of the nanoparticles within the heart for 15 days, however, reduction of the upconversion luminescent emission at the heart was observed in the first 7 days post injection. While nanoparticles were retained in the heart muscle in all animals receiving intraMY injections, the dispersal of the UCNPs in these subjects were heterogeneously localized over time. Figure 3(b) is a representative animal, showing that nanoparticles persist in the intraMY space for 7 days, but are cleared from the heart within 15 days. IntraPE injections demonstrated retention in the heart region for 2 weeks with a slow clearance (Fig. 3(c)). Altogether, these data demonstrate that long-term nanoparticle retention in the heart is possible after intraMY and intraPE administration, but is optimally conserved in the cardiac region when localized to the pericardial space.

Effects on body weight, Cardiac Function and Morphometry

Body weight was monitored throughout the experiment. As shown in Fig. 4(a), the mouse body weight of the control and experimental groups were similar showing a good macroscopic tolerance for the UCNPs. To further evaluate the *in vivo* effects of cardiac targeted nanoparticles on cardiac functions we implemented the Small Animal Physiological Monitoring System (Harvard Apparatus) along with the imaging setup. Real-time ECG monitoring during laser induced upconversion showed no effect on the heart rate in all subjects (Fig. 4(b)) even in the presence of UCNPs in the myocardium or pericardium (as confirmed in Fig. 3). No discernable variation was observed over the course of the 2 weeks post-injection following repeated upconversion on the same subjects (Fig. 4(c)). Therefore, we noted that presence of the UCNPs in addition to a brief (5 seconds) exposure of the laser beam power density of 290 mW.cm^{-2} to the chest region did not alter the ECG profile in UCNP-treated animals or controls.

Concerning *in vivo* endpoints, transthoracic echocardiography showed no effect of the interventions on the LVEF, a measure of LV muscle function, between the groups (Fig. 4(d)). ECG analyses showed no significant difference between experimental groups and controls in HR (Fig. 4(e)) or in any time domain measurements of HRV, either for SDNN (Fig. 4(f)) or RMSSD (Fig. 4(g)). Moreover, no significant change was noted in frequency domain measurements of HRV, including total power, LF (Fig. 4(h)), LF (n.u.) (Fig. 4(i)), HF (Fig. 4(j)), and HF (n.u.)

(Fig. 4(k)), therefore, the sympathovagal balance (LF/HF ratio) was unmodified in the presence of nanoparticles (Fig. 4(l)). In an attempt to sublocalise the UCNPs within the heart following intraMY and intraPE injections, relevant hearts were dissected and the pericardia were reclined as shown in figure 4(m). It was observed that intraMY led to a localization of the UCNPs in the heart (Fig. 4(m), left), while UCNPs injected intraPE remained within the pericardium and did not bind to the heart itself (Fig. 4(m), right). Macroscopic examination of necrosis of cardiac tissues at 15 days post injection of the nanoparticles and quantification of percent-tissue death are respectively shown in Fig. 4(n) and 4(o) and evidence the absence of necrosis of cardiac tissue following pericardial sac injections, even if some tissue damage is perceivable in animals receiving intraMY.

Discussion

We have synthesized NaYF₄:Yb,Tm upconverting nanocrystals with an average size of 38 nm that exhibit spectrally sharp, large anti Stokes-shifted emission. For the persistence study, the particles, which are initially covered in oleic acid ligands, were rendered hydrophilic by coating with a layer of PEO-PAA copolymer. This double hydrophilic copolymer was anchored to the nanoparticles by multiple chelation from the polyacrylate segment. The second block, composed of PEO, ensured aqueous dispensability, and biocompatibility[30].

In an effort to identify the potential application of these UCNPs for heart specific photodynamic imaging, we decided to target the nanoparticles to the myocardium and/or the pericardial space. First, we assessed the potential of the nanoparticles to be maintained within the cardiac region. UCNPs injected in the myocardium exhibited release from the heart, yet there was no detectable accumulation in the liver or kidney. While intraMY injections permit highly localized delivery for clinical and research applications, incomplete retention, and even immediate leakage, from the heart have been reported for intraMY administration[31–33]. This phenotype is attributed to the vascularization and dynamic environment of the myocardium. Improved, consistent and longer-term retention was observed for nanoparticles injected in the pericardial space. We found that nanoparticles injected into the pericardial sac result in highest retention. Pericardial sac injections are considered as a minimally invasive method to optimally localize therapeutics to the heart[7,34]. UCNPs were retained in the pericardial region, and evaded lymphatic clearance even though they measured ~ 38 nm (Fig. 2), which is smaller than the depicted circular fenestrations of the parietal pericardium (diameter up to 50 μm [35]) therefore rendering their potential for several new and exciting applications. Our findings are in agreement with a recent study that showed BODIPY-containing PLGA nanoparticles administered intrapericardially were retained for a half-life of roughly 7-days and showed no microscopic detrimental

consequence to the heart[36]. Moreover, in terms of nanoparticle clearance, our findings correspond to other studies which show that the biodistribution and clearance of most nanoparticles *in vivo* result in their accumulation in the liver or kidney[37–39]. Nevertheless, studies are needed to identify if acute exposure of the UCNPs to the heart elicits detrimental consequences in the long-term in the heart. In addition, future studies will need to center on the development of UCNPs favoring their excretion properties for potential clinical application.

Despite favorable localization of the nanoparticles to the heart via intraMY or pericardial space injections, their influence on cardiac rhythm *in vivo* and over time, is unknown. Here we performed simultaneous and continuous ECG recordings with time-space controlled repetitive upconversion to the cardiac region and showed no adverse effects on HR. The frequency of the cardiac cycle is reflected as HR and is one of the most important physiological parameters that gives correct assessment of heart function[40]. Overall, nanoparticles in the myocardium or pericardial space did not alter the cardiac rhythm as detected by ECG analyses. End point experiments included echography, to visualize and assess cardiac function via the calculation of the LVEF[41], HRV analysis to identify cardiac rhythm abnormalities, and, autonomic nervous system assessment[42]. No difference between UCNP-injected and control subjects was noticed. Though a slight decrease in the LVEF was observed in mice receiving direct intraMY injections of UCNPs as compared to pericardial space injections, neither of the administration routes resulted in cardiac muscle necrosis. Altogether, these data show that UCNPs can be localized and maintained in the heart for 15 days and can be subject to repeated excitation and upconversion with no effects on cardiac functioning or tissue integrity. Future work now aims to use the UCNPs for drug delivery, for which several strategies have already been proposed that include photo-uncaging of the drug itself or release of drug from loaded mesoporous carriers [43], to the heart in models of hypertension and heart failure. This spatio-temporal delivery to the myocardium will allow to us to resolve on-target effects including pharmacodynamic dose responses.

Conclusions

Altogether, we provide the first evidence for multifunctional UCNPs that showed strong upconversion luminescence under 980 nm excitation, retention in the cardiac regions over the course of 15 days, biocompatibility, and high signal-to-noise ratio *in vivo*. The lengthy exposure of the UCNPs in the heart, and repeated excitation had no discernable effect on cardiac function. Future works are now aimed at applying our UCNPs to improve and multiplex with other imaging techniques, such as cardiac MRI. Our strategy has the potential to optimize targeted delivery of materials to the heart for biomarker identification in order to stratify heart failure and

help enhance therapeutic strategies.

Acknowledgments

We acknowledge core support from Animal facility ANEXPLO, CREFRE US06 Ranguel. This work was funded by the CNRS (Défi IMAG'IN -AAP 2017). Jennifer Ben Salem was supported by the Fondation de France. Grant number RAF18002BBA awarded to Dina N Arvanitis. Julien Santelli was supported by grants from CHROMALYS, INSERM and the “Région Midi-Pyrénées”. ANR is acknowledged for funding project “BLINK”: ANR-15-CE09-0020.

We thank Claire Pibourret and Baptiste Amouroux for their technical assistance in nanoparticle synthesis.

References

1. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, et al. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70: 1–25.
2. Cahill TJ, Kharbanda RK. Heart failure after myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention: Mechanisms, incidence and identification of patients at risk. *World J Cardiol.* 2017;9: 407.
3. Rider P, Carmi Y, Cohen I. Biologics for Targeting Inflammatory Cytokines, Clinical Uses, and Limitations. *Int J Cell Biol.* 2016;2016: 9259646. doi:10.1155/2016/9259646
4. Rebouças J de S, Santos-Magalhães NS, Formiga FR. Cardiac Regeneration using Growth Factors: Advances and Challenges. *Arq Bras Cardiol.* 2016;107: 271–275. doi:10.5935/abc.20160097
5. Hastings CL, Roche ET, Ruiz-Hernandez E, Schenke-Layland K, Walsh CJ, Duffy GP. Drug and cell delivery for cardiac regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;84: 85–106.
6. Venugopal JR, Prabhakaran MP, Mukherjee S, Ravichandran R, Dan K, Ramakrishna S. Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. *J R Soc Interface.* 2012;9: 1–19. doi:10.1098/rsif.2011.0301
7. Han S, Hwang C. Pericardial approach for cardiac therapies: old practice with new ideas. *Korean Circ J.* 2010;40: 479–488.
8. Chen X, Gambhir SS, Cheon J. Theranostic nanomedicine. *Acc Chem Res.* 2011;44: 841–841.
9. Dong H, Du S-R, Zheng X-Y, Lyu G-M, Sun L-D, Li L-D, et al. Lanthanide nanoparticles: from design toward bioimaging and therapy. *Chem Rev.* 2015;115: 10725–10815.
10. Dong H, Sun L-D, Yan C-H. Energy transfer in lanthanide upconversion studies for extended optical applications. *Chem Soc Rev.* 2015;44: 1608–1634.
11. Ximendes EC, Santos WQ, Rocha U, Kagola UK, Sanz-Rodríguez F, Fernández N, et al. Unveiling in vivo subcutaneous thermal dynamics by infrared luminescent nanothermometers. *Nano Lett.* 2016;16: 1695–1703.
12. Park YI, Lee KT, Suh YD, Hyeon T. Upconverting nanoparticles: a versatile platform for wide-field two-photon microscopy and multi-modal in vivo imaging. *Chem Soc Rev.* 2015;44: 1302–1317.
13. Liu Q, Sun Y, Yang T, Feng W, Li C, Li F. Sub-10 nm hexagonal lanthanide-doped NaLuF₄ upconversion nanocrystals for sensitive bioimaging in vivo. *J Am Chem Soc.* 2011;133: 17122–17125.
14. Chen G, Shen J, Ohulchanskyy TY, Patel NJ, Kutikov A, Li Z, et al. (α -NaYbF₄: Tm³⁺)/CaF₂ core/shell nanoparticles with efficient near-infrared to near-infrared upconversion for high-contrast deep tissue bioimaging. *ACS Nano.* 2012;6: 8280–8287.
15. Hilderbrand SA, Weissleder R. Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Curr Opin Chem Biol.* 2010;14: 71–79.

16. Naczynski DJ, Tan MC, Zevon M, Wall B, Kohl J, Kulesa A, et al. Rare-earth-doped biological composites as in vivo shortwave infrared reporters. *Nat Commun.* 2013;4: 2199.
17. Sedlmeier A, Gorris HH. Surface modification and characterization of photon-upconverting nanoparticles for bioanalytical applications. *Chem Soc Rev.* 2015;44: 1526–1560. doi:10.1039/C4CS00186A
18. Chen G, Qiu H, Prasad PN, Chen X. Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics. *Chem Rev.* 2014;114: 5161–5214.
19. Tian G, Zheng X, Zhang X, Yin W, Yu J, Wang D, et al. TPGS-stabilized NaYbF₄: Er upconversion nanoparticles for dual-modal fluorescent/CT imaging and anticancer drug delivery to overcome multi-drug resistance. *Biomaterials.* 2015;40: 107–116.
20. Chen S, Weitemier AZ, Zeng X, He L, Wang X, Tao Y, et al. Near-infrared deep brain stimulation via upconversion nanoparticle-mediated optogenetics. *Science.* 2018;359: 679–684. doi:10.1126/science.aag1144
21. Mudshinge SR, Deore AB, Patil S, Bhargat CM. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharm J.* 2011;19: 129–141. doi:10.1016/j.jsps.2011.04.001
22. Rizvi SAA, Saleh AM. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm J.* 2018;26: 64–70. doi:10.1016/j.jsps.2017.10.012
23. Dvir T, Bauer M, Schroeder A, Tsui JH, Anderson DG, Langer R, et al. Nanoparticles targeting the infarcted heart. *Nano Lett.* 2011;11: 4411–4414.
24. Cheraghi M, Negahdari B, Daraee H, Eatemadi A. Heart targeted nanoliposomal/nanoparticles drug delivery: An updated review. *Biomed Pharmacother.* 2017;86: 316–323.
25. Passaro F, Testa G, Ambrosone L, Costagliola C, Tocchetti CG, Di Nezza F, et al. Nanotechnology-Based Cardiac Targeting and Direct Cardiac Reprogramming: The Betrothed. *Stem Cells Int.* 2017;2017.
26. Li Z, Zhang Y. An efficient and user-friendly method for the synthesis of hexagonal-phase NaYF₄: Yb, Er/Tm nanocrystals with controllable shape and upconversion fluorescence. *Nanotechnology.* 2008;19: 345606.
27. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation.* 1996;93: 1043–1065.
28. Li F, Silva MD, Sotak CH, Fisher M. Temporal evolution of ischemic injury evaluated with diffusion-, perfusion-, and T2-weighted MRI. *Neurology.* 2000;54: 689–689.
29. Xiong L, Yang T, Yang Y, Xu C, Li F. Long-term in vivo biodistribution imaging and toxicity of polyacrylic acid-coated upconversion nanophosphors. *Biomaterials.* 2010;31: 7078–7085.
30. Owens III DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* 2006;307: 93–102.
31. Grossman PM, Han Z, Palasis M, Barry JJ, Lederman RJ. Incomplete retention after direct myocardial injection. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2002;55: 392–397.
32. Stansfield WE, Rojas M, Corn D, Willis M, Patterson C, Smyth SS, et al. Characterization of a model to independently study regression of ventricular hypertrophy. *J Surg Res.* 2007;142: 387–393.
33. Bonios M, Terrovitis J, Chang CY, Engles JM, Higuchi T, Lautamäki R, et al. Myocardial substrate and route of administration determine acute cardiac retention and lung bio-distribution of cardiosphere-derived cells. *J Nucl Cardiol.* 2011;18: 443.
34. Jahangirian H, Lemraski EG, Webster TJ, Rafiee-Moghaddam R, Abdollahi Y. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. *Int J Nanomedicine.* 2017;12: 2957.
35. Nakatani T, Shinohara H, Fukuo Y, Morisawa S, Matsuda T. Pericardium of rodents: pores connect the pericardial and pleural cavities. *Anat Rec.* 1988;220: 132–137. doi:10.1002/ar.1092200204
36. Segura-Ibarra V, Cara FE, Wu S, Iruegas-Nunez DA, Wang S, Ferrari M, et al. Nanoparticles administered intrapericardially enhance payload myocardial distribution and retention. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2017;262: 18–27. doi:10.1016/j.jconrel.2017.07.012
37. Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomed.* 2008;3: 703–717. doi:10.2217/17435889.3.5.703

38. Arami H, Khandhar A, Liggitt D, Krishnan KM. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2015;44: 8576–8607.
39. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol.* 2015;33: 941.
40. Bansal D, Khan M, Salhan AK. A review of measurement and analysis of heart rate variability. *Computer and Automation Engineering, 2009 ICCAE'09 International Conference on. IEEE; 2009.* pp. 243–246.
41. Véra P, Gardin I, Bok B. Comparative study of three automatic programs of left ventricular ejection fraction evaluation. *Nucl Med Commun.* 1995;16: 667–674.
42. ChuDuc H, NguyenPhan K, NguyenViet D. A Review of Heart Rate Variability and its Applications. *APCBEE Procedia.* 2013;7: 80–85. doi:10.1016/j.apcbee.2013.08.016
43. Lee G, Park YI. Lanthanide-Doped Upconversion Nanocarriers for Drug and Gene Delivery. *Nanomaterials.* 2018;8: 511. doi:10.3390/nano8070511

Figures :

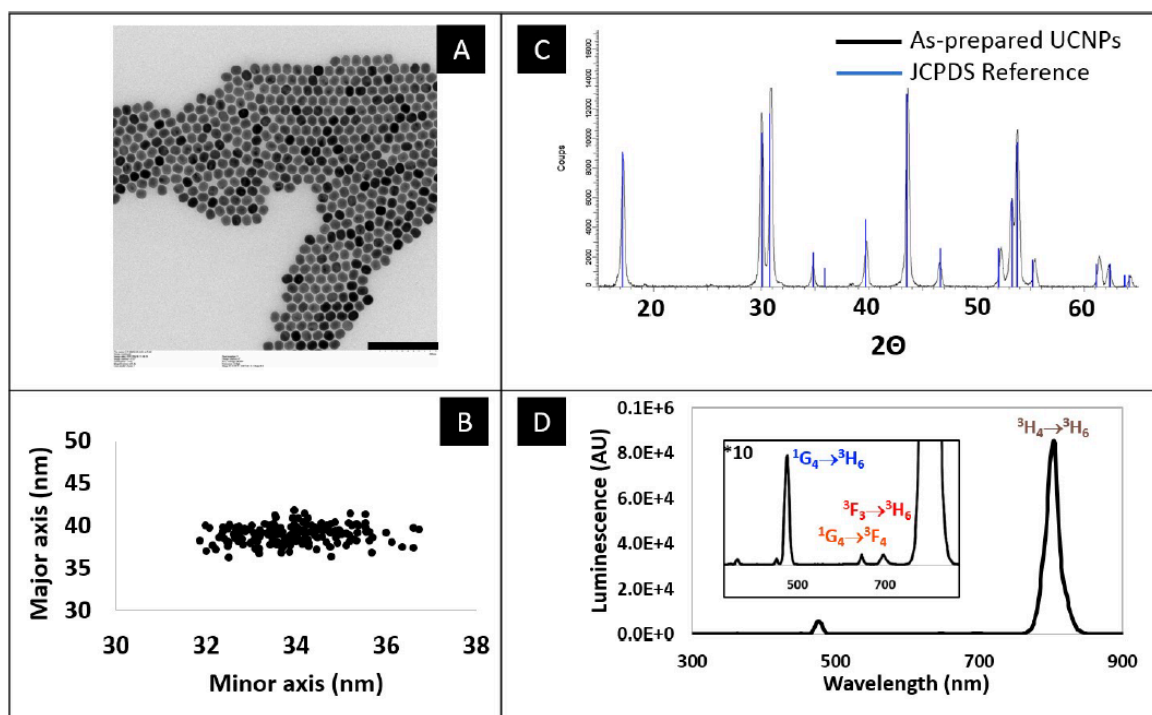


Figure 1 Characterization of the upconverting nanoparticles used in this study. A: Transmission electron micrograph. Scale bar = 200 nm. B: Individual sizes of the nanoparticles, along the minor and major axes. C: Powder X-ray diffractogram, and corresponding JCPDS reference (JCPDS No. 28–1192) data for NaYF₄. D: Upconversion fluorescence spectrum of the particles, when excited by a 980 nm CW laser.

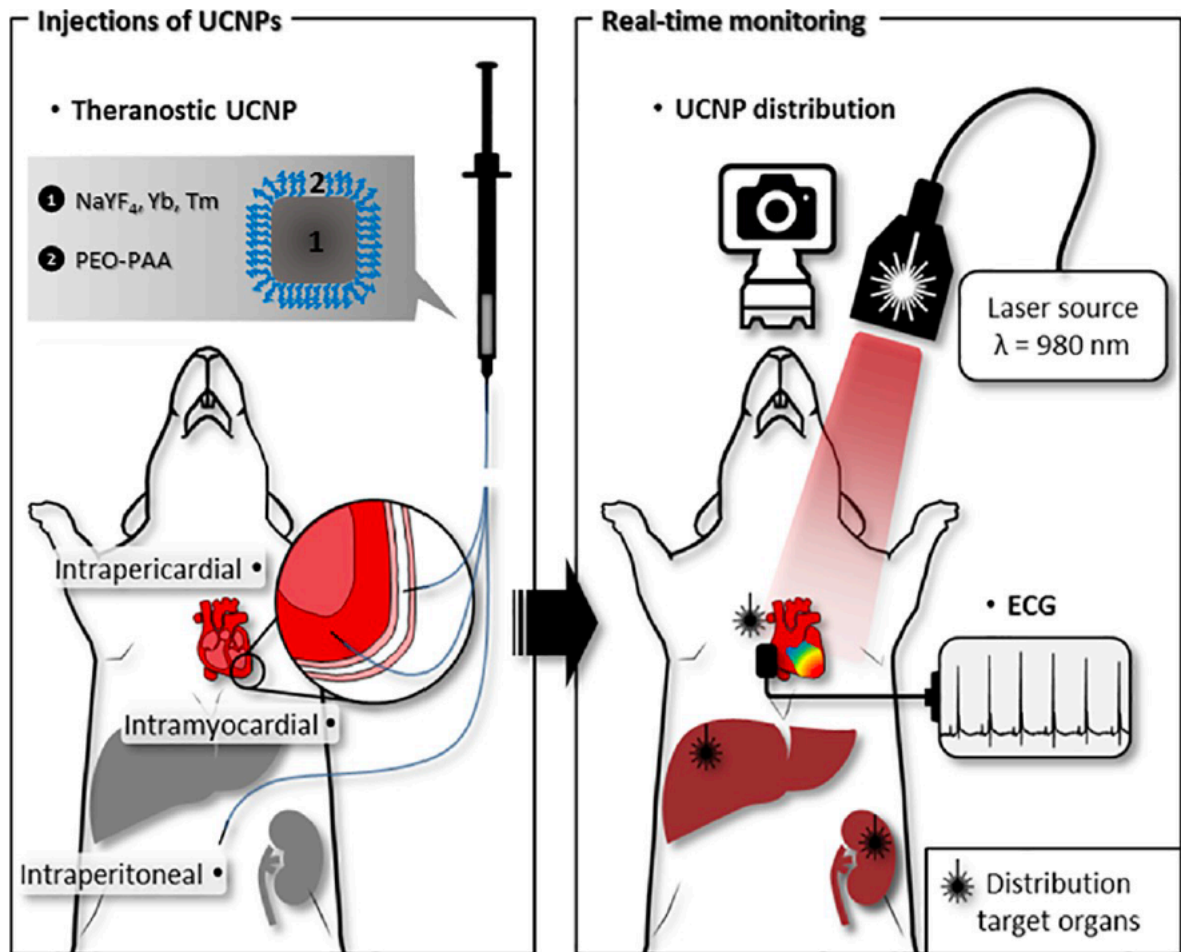


Figure 2 Schematic representation of the study design. UCNPs were injected in the myocardium, pericardium or peritoneum. Upconversion-based imaging was performed to image the UCNPs in the cardiac regions over a 15-day period. Retention and distribution of the UCNPs was tracked by upconversion in the heart, liver and kidneys. Continuous ECG monitoring was performed to determine the influence of the laser induced thermal effect on HR.

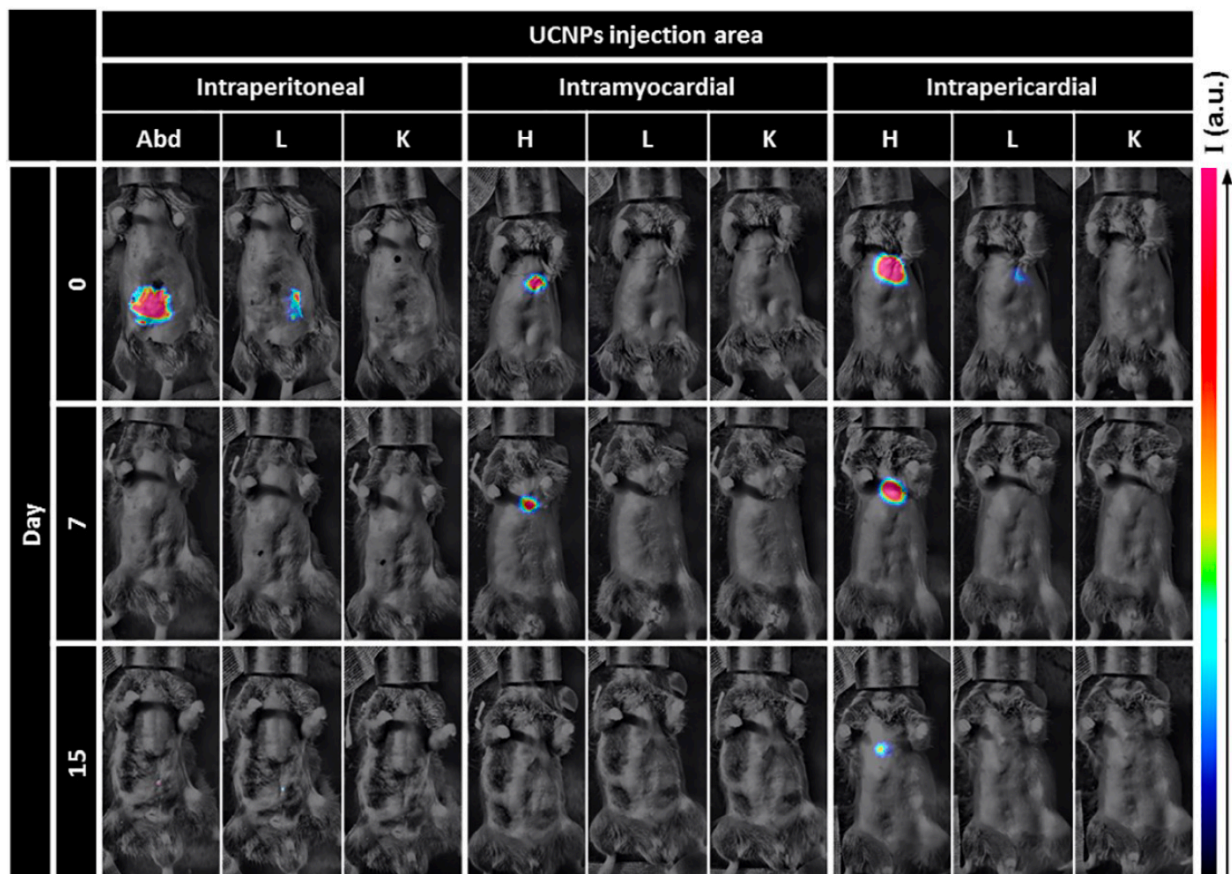


Figure 3 Spatio-temporal evolution of upconversion intensity. Representative images of the retention of UCNPs in the cardiac region and their biodistribution on day 0, day 7, day 15.

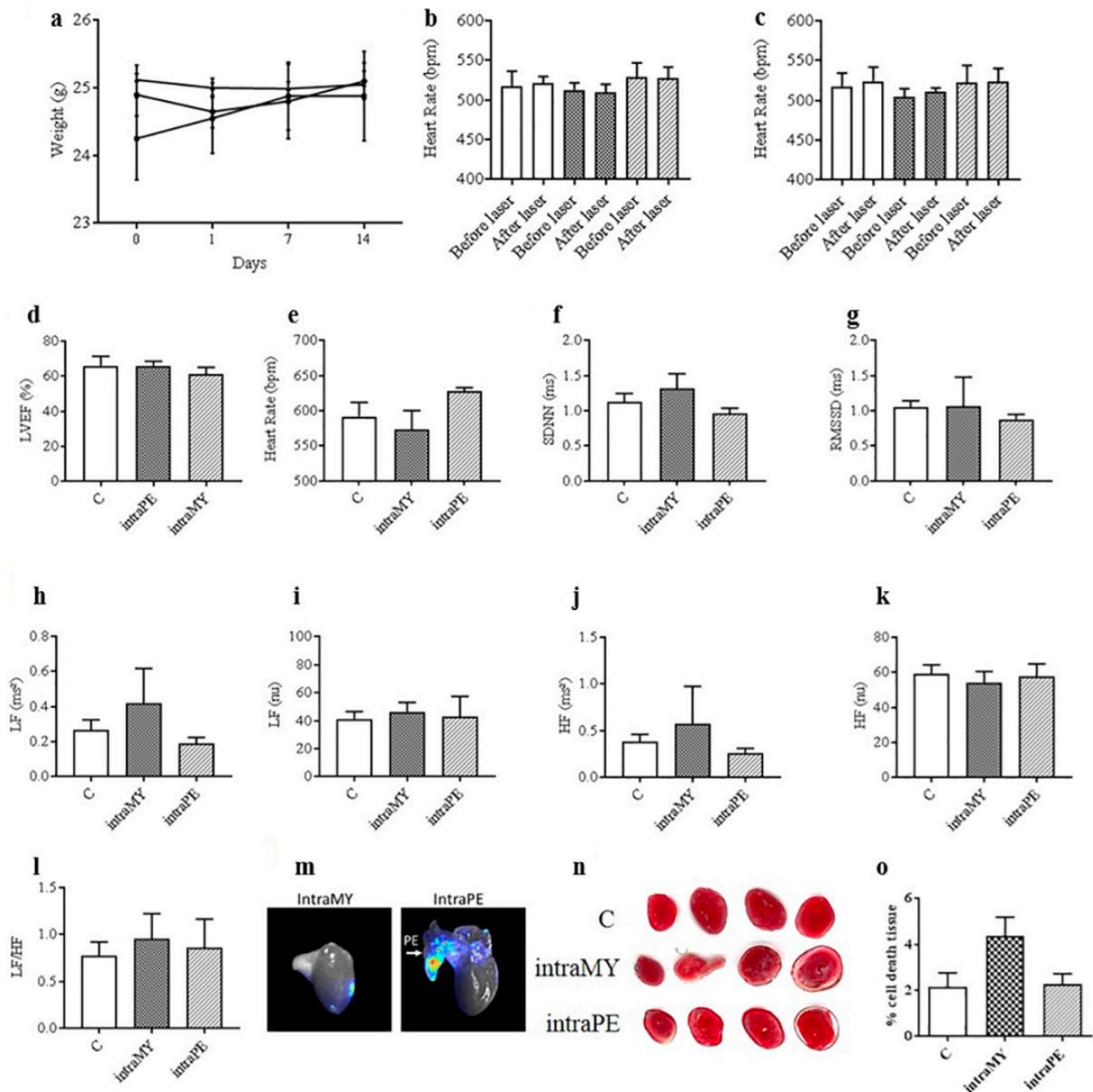


Figure 3 Cardiac cardiosympathovagal related parameters in nanoparticle treated animals. A Body-weight changes in mice over a 14-day course, each point represents the mean \pm SEM. B HR measurements during laser induced upconversion on day 15 in C, and UCNPs targeted to the intraMY or IntraPE space. C HR measurements during laser induced upconversion on day 1 in C, and UCNPs targeted to the intraMY or IntraPE space. D Percent left ventricle ejection fraction (LVEF) measured by echocardiography of control (C), intramyocardial (intraMY) and intrapericardial (intraPE) injected UCNPs. E End point HR measurements in C, and UCNPs targeted to the intraMY or IntraPE space. F, G SDNN and RMSSD analyses at day 15 post injection in C, intraMY and intraPE groups. H, I, J, K Low frequency spectrum, low frequency normalized units, high frequency spectrum and high frequency normalized units at day 15 post injection in C, intraMY and intraPE groups. L LF/HF ratio for all experimental groups. Misolated hearts showing that nanoparticles were localized to the myocardial injection site for intraMY administration, while the nanoparticles remained diffuse and associated with the pericardium and did not bind to the heart tissue when administered in the pericardial sac. N Macroscopic examination of cardiac tissue necrosis at 15 days post injection of the

nanoparticles in C and experimental groups are shown. O Quantification of percent-tissue death.

Chapitre 3 – Discussion générale

C. elegans est un nématode et un organisme modèle qui a fait l'objet de très nombreuses études afin de mieux comprendre le rôle et la fonction de gènes d'espèces supérieures. Des études récentes ont démontré que *C. elegans* possède environ 7,000 gènes en commun avec le génome humain. *C. elegans* a un système nerveux simple formé de 302 neurones et d'environ 7,000 synapses²³². L'un des objectifs de cette thèse était d'étudier les stimulations nociceptives (ex. la chaleur nocive), la modulation de récepteurs vanilloïdes orthologues par RTX, le comportement d'évitement, le connectome et la dynamique du protéome afin de mettre en évidence les mécanismes moléculaires associés aux effets induits par l'exposition à RTX. Cette première phase de mon projet de thèse était nécessaire et a permis de mieux connaître la physiologie de la nociception, la fonction de gènes et protéines qui à terme pourrait permettre de développer de meilleurs outils de diagnostic et de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nos travaux de recherche utilisant *C. elegans* comme organisme modèle ont été particulièrement utiles pour mettre en évidence que la maturation des neuropeptides est essentielle pour la communication synaptique et mieux comprendre les effets de RTX. Le TRPV1 est un récepteur multisensoriel qui a acquis une grande importance dans la pratique clinique. De nombreuses données sont axées sur la compréhension de la signalisation biologique et des cascades transcriptionnelles en aval de son activation. Dans cette thèse, nous nous sommes surtout intéressés à l'identification des cascades protéomiques de signalisation en aval de l'application de l'agoniste RTX. Nous voulions déterminer si les voies activées étaient conservées au cours de l'évolution, ce qui pourrait identifier des cibles primordiales pour de futures thérapies. Nos investigations impliquaient l'étude de la nociception en utilisant *C. elegans* et l'utilisation d'un modèle murin pour étudier l'insuffisance cardiaque. Nous avons bien conscience que les conséquences de l'IC physiopathologiques sont particulièrement importantes, car non seulement cela affecte le cœur proprement parlé, mais cela a aussi des effets au niveau du système nerveux et peut entraîner un dysfonctionnement cérébral. Cependant, concernant la progression de l'IM vers l'IC, des études ont révélé l'engagement concerté de plusieurs tissus et systèmes tels que le SNA et des régions cérébrales comme la médulla, donnant lieu à des effets systémiques, importants dans la régulation de la fonction cardiaque³⁰⁰. Il a été également démontré que les troubles cognitifs et les changements atrophiques du cortex frontal chez des patients atteints d'IC sont des éléments importants associés à des comorbidités de l'IC^{301,302}. De plus, il semblerait que les fibres sensorielles cardiaques exprimant TRPV1 jouent un rôle important dans la transmission d'information lors du développement de l'IC. Ces fibres pénètrent dans la moelle épinière et ont des synapses au niveau du cortex frontal ainsi que dans la médulla¹¹⁵. Cependant, le cortex frontal est une région cérébrale régulatrice de la fonction

cardiaque, et son dysfonctionnement est une des caractéristiques de nombreux problèmes de santé mentale comme la dépression ou l'anxiété^{303,304}. Les terminaisons des fibres afférentes sympathiques cardiaques exprimant TRPV1 transmettent des informations nociceptives du cœur vers le système nerveux central. Ces activités sont d'autant plus intenses lors qu'un IM se produit. Notre étude utilisant la dénervation sélective des fibres cardiaques exprimant TRPV1 par l'application épiscopordique de RTX a montré de réels effets localisés au niveau du tissu cardiaque, mais aussi des effets distaux sur le phénotype cérébral. Cette technique entraîne une désensibilisation rapide et prolongée de TRPV1 suivi d'une dégénérescence des fibres sensorielles primaires exprimant TRPV1. Cette étude suggère que l'activité des afférences du SNA cardiaque exprimant TRPV1 influence la fonction des tissus cérébraux, mais qu'aussi l'évolution de la pathologie est médiée par l'activité de ces fibres sur les différents tissus cardiaque et nerveux.

1. Les résultats obtenus

1.1. Mécanismes de biosynthèse de neuropeptides chez *C. elegans* similaires à celui des mammifères

Les neuropeptides sont des éléments clés lors de la communication synaptique suite à l'activation de nocicepteurs¹⁰⁹ tel que le TRPV1 c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à savoir si l'information transmise par les synapses, dépendait d'une maturation peptidique afin d'obtenir des neuropeptides bioactifs. Nos résultats ont montré que les mécanismes impliqués dans la synthèse des neuropeptides tels que FLP-21 et NLP-8, neuropeptides importants dans la transmission du message nociceptif et de la réponse à la chaleur nocive³⁰⁵, nécessitent un système de protéolyse similaire à ceux retrouvés chez les mammifères. Nous avons démontré que *C. elegans* est capable de dégrader des polypeptides entraînant la formation de fragments peptidiques spécifiques liés aux voies EGL-3 et CPL-1 qui sont des enzymes orthologues à celles retrouvées chez les mammifères telles que les protéines convertases et la cathepsine L essentielles pour la maturation des pro-neuropeptides. L'utilisation d'un mutant *egl-3* a démontré une diminution de la production des deux neuropeptides ciblés, mettant en évidence que le système de protéolyse des neuropeptides est affecté et entraîne un déficit de neuropeptides matures. Cette étude permet de confirmer que les mécanismes impliqués dans la communication neuronale chez *C. elegans* sont analogues à ceux observés chez les mammifères

et de nature peptidergique. Plusieurs études qui ont été réalisées dans notre laboratoire ont démontré l'implication des neuropeptides dans la communication synaptique chez *C. elegans*. Notamment, une étude sur des mutants *egl-3* ou *egl-21* de *C. elegans* ont montré une diminution significative de neuropeptides matures (tels que FLP-18 et FLP-21) alors qu'ils présentaient un comportement d'évitement thermique significativement altéré²⁵⁹. La pro-protéine convertase EGL-3 et la carboxypeptidase E EGL-21 sont des enzymes essentielles pour la maturation des pro-neuropeptides en neuropeptides biologiquement actifs chez *C. elegans* comme celles les pro-protéines convertases PC1/2 retrouvées chez les mammifères. Nos études ont spécifiquement démontré que les nématodes mutants produisaient significativement moins de neuropeptides et étaient moins sensibles à la chaleur nocive. Ces résultats sont cohérents avec les observations réalisées avec des modèles de souris KO pour des neuropeptides essentielles à la transduction du signal nociceptif³⁰⁶⁻³⁰⁸.

1.2.Activation des récepteurs vanilloïdes chez *C. elegans*

Après avoir spécifiquement prouvé que la transduction du signal nociceptif est analogue avec les mammifères, nous avons utilisé *C. elegans* pour étudier les effets de la manipulation pharmacologique des récepteurs vanilloïdes avec RTX. Nos travaux ont montré que RTX entrave la réponse de *C. elegans* à la chaleur nocive (32°C – 35°C). L'effet est inversé 6h après l'exposition à RTX démontrant qu'il n'y pas d'effet rémanent. L'étude de mutants spécifiques a permis de mettre en évidence la cible de RTX, le récepteur vanilloïde OCR-3. Les résultats de l'analyse protéomique et de l'enrichissement des voies de signalisation et métaboliques suggèrent que la signalisation Wnt indépendante de la β -catenine est relié à l'action de RTX sur les récepteurs vanilloïdes de *C. elegans*. Fait à noter, cette observation est comparable à ce que nous avons observé avec notre modèle murin cardiaque qui a fait apparaître que la voie Wnt pourrait jouer un rôle dans la modification du phénotype cérébral dans le groupe IM/RTX. La voie des Wnt est très associé à la dépression, l'anxiété et les troubles de l'humeur et essentiel au développement synaptique et la plasticité³⁰⁹.

1.3.Activation cardiaque de TRPV1 améliore les paramètres hémodynamiques du cœur

Notre étude a permis de confirmer ce qui est généralement observé lors de la dénervation pharmacologique des fibres afférentes sympathiques cardiaques. Comme les précédentes études, notre modèle murin d'IC établie et la dénervation des neurones cardiaques exprimant TRPV1, a montré une amélioration de la fonction cardiaque, une atténuation du remodelage cardiaque en réduisant le taux de nécrose du tissu cardiaque et tout en inhibant l'hyperactivité du système nerveux sympathique^{230,231,310}. Ceci a permis d'augmenter la survie des animaux atteints d'IM. De plus, l'analyse protéomique suivi de l'enrichissement des voies a montré l'implication de mécanismes neuro-hormonaux qui sont connus pour compenser le dysfonctionnement cardiaque. Les voies β -adrénergique et de la libération de la corticotropine sont retrouvées et exacerbent le dysfonctionnement cardiaque et conduit au développement de l'hyperactivité sympathique retrouvé lors de la pathologie d'IC.

1.4.Activation cardiaque de TRPV1 module le phénotype cérébral en ayant une action sur le comportement dépressif

Nos études comportementales ont démontré une augmentation du comportement dépressif chez les animaux atteints d'IM par rapport aux souris témoins. Ces résultats suggèrent fortement que le comportement dépressif observé induit par l'IC chronique est parfaitement cohérent avec des études menées chez les humains^{311,312}. De plus, le fait d'observer chez nos animaux IM/RTX dans le test de suspension caudale, une immobilité identique au groupe SHAM, montre que la RTX réduit considérablement le comportement dépressif que l'on a visualisé chez les animaux atteint d'IM (groupe IM/S). D'autre part, le traitement par RTX seul a été considéré comme inoffensif dans toutes les études précédentes¹⁹³. Nous avons constaté que la suractivité des afférences cardiaques dans l'IM, ou l'ablation par le RTX, n'entraînait pas un comportement anxieux de base. En outre, l'étude protéomique a permis d'identifier les protéines différenciellement exprimées et les voies fonctionnelles associées au cortex frontal dans l'IC chronique. Les analyses réalisées sur les cortex frontaux de souris atteintes d'IM ont montré l'expression d'un grand nombre de protéines de type kinases et impliquées dans les voies de signalisation telles que ERK, PI3K et cAMP/PKA. Toutes ces voies nommées sont importantes dans la dépression et le contrôle du rythme circadien. De nombreuses voies impliquées dans les changements structuraux liés à la plasticité neuronale (SRF51) et la stabilité du cytosquelette (PPP2r1b, Nck52,53) sont retrouvées dans nos résultats.

1.5. Activation cardiaque de TRPV1 module la signalisation et les voies métaboliques

L'IM et l'IC qui s'ensuit sont considérés comme une maladie systémique. Ce n'est que récemment que nous avons commencé à accorder plus d'attention au fonctionnement des autres organes principaux dans l'IM³⁰⁰, même si le fonctionnement du cerveau et la dépression qui s'ensuit sont documentés depuis longtemps. Nous avons cherché à mieux comprendre le système nerveux à différents moments de l'infarctus. Des analyses bio-informatiques multi-tissus ont été réalisées à partir de données protéomiques recueillies dans plusieurs tissus, le ventricule gauche, la moelle épinière, la région de la moelle épinière cervicale et le nerf vague, prélevés à quatre moments précis après le traitement, afin de pouvoir identifier le moment et le lieu de la dérégulation de la fonction du système nerveux et de savoir si cette dérégulation était indépendante de la perte d'oxygène, car les animaux n'étaient pas intubés aux premiers moments. Globalement, nos résultats ont montré un enrichissement significatif des voies métaboliques dans tous les tissus et traitements, ce qui implique un rôle central des mitochondries dans les réponses cellulaires pour les groupes IM et RTX. Les voies fonctionnelles enrichies dans ces tissus, y compris le cytosquelette, les vésicules et la transduction du signal, pourraient être en aval des réponses initiées par les mitochondries en raison des changements de la fréquence des impulsions neuronales après l'IM ou de l'altération des communications cœur-cerveau après l'application du RTX. Notre étude révèle des voies centrales dans l'allostase métabolique et le dysfonctionnement cardiaque, mais aussi que la réponse physiopathologique pendant le début de l'IM est régulée par l'activité des fibres sensorielles cardiaques exprimant TRPV1.

1.6. Rôle de TRPV1 au niveau cardiaque tout en contrôlant la libération spatiotemporelle de RTX

Pour répondre à cette partie du projet, nous avons juste eu le temps de valider l'innocuité de nanoparticules en les administrant au niveau de l'épicarde. Nos travaux ont utilisé des nanoparticules dites « upconverting » (UCNP) capable de générer une luminescence après une excitation avec un laser à 980 nm. Après 15 jours, nous sommes capables de localiser les

nanoparticules et les retenir au niveau de la région cardiaque *in vivo*. L'exposition prolongée ainsi que l'excitation répétée des nanoparticules « upconverting » n'ont aucun effet sur les paramètres cardiaques. Ceci démontre qu'il serait possible d'utiliser ce type de nanoparticules afin de pouvoir administrer un médicament pouvant cibler des récepteurs au niveau cardiaque sans impacter les conditions physiologiques de l'animal tout en ayant un suivi spatiotemporel.

2. Discussion sur l'implication des résultats

L'un des principaux résultats de cette thèse montre que l'activation des orthologues de TRPV1 par RTX induit des processus moléculaires, similaires, observés et conservés entre *C. elegans* et notre modèle d'étude murin. RTX provoque des changements métaboliques et énergétiques à la fois lorsqu'il est appliqué localement et à distance. Nous avons également trouvé la voie de signalisation de Wnt qui est associée aux voies de réponse cellulaire au stress chimique chez *C. elegans* comme observé dans le groupe de souris RTX. Cette partie de notre projet montre que l'activation des récepteurs vanilloïdes dans un modèle comme *C. elegans* provoque la régulation de mécanismes identiques à ceux retrouvés chez les mammifères et que RTX entraîne aussi une désensibilisation du récepteur rendant les nématodes moins sensibles à la chaleur nocive. En fait, l'exposition des nématodes à RTX induit des effets anti-nociceptifs plus importants que la capsaïcine²⁶⁴. La réponse à la stimulation thermique est intimement liée aux mécanismes moléculaires des synapses dépendants de la synthèse de neuropeptides matures²⁵⁹. Le projet de recherche avec notre modèle d'IC démontre l'implication des fibres afférentes cardiaques exprimant TRPV1 dans la progression de l'IC. Nos résultats soulignent que l'hyperactivité du SNS observée chez des patients atteints d'IC est due à une perturbation et un dysfonctionnement des fibres sensorielles cardiaques exprimant TRPV1 en partie et qu'elles jouent un rôle essentiel dans la transmission d'informations au niveau cérébral. L'utilisation de la dénervation afférente cardiaque avec RTX permet de mettre en évidence la désensibilisation et la destruction des fibres exprimant TRPV1 au niveau du cœur, ce qui entraîne l'activation de mécanismes cardioprotecteurs vu que l'on observe un remodelage cardiaque et une diminution de la taille de l'infarctus. On peut donc supposer que des voies peptidergiques tel que CGRP et SP peuvent être activées et induire une protection au niveau du tissu cardiaque localement. De nombreuses études prouvent le rôle de ces deux molécules au niveau des fibres sensorielles cardiaques lors d'une pathologie comme l'IC^{167,223,313-315}. Cette étude démontre que leur rôle n'est pas seulement localisé au cœur, mais entraîne aussi des répercussions sur d'autres tissus

plus distaux tels que le système nerveux central. Si on s'intéresse à la libération de neuropeptides, il faut prendre en considération qu'ils sont synthétisés au niveau de la corne dorsale de la ME et sont ensuite relargués au niveau d'une synapse postsynaptique des fibres afférentes cardiaques. La ME est un tissu important dans la compréhension des voies de neuro-communication du cœur vers le cerveau lors d'IC. L'activation de TRPV1 au niveau cardiaque démontre la production de neuropeptides telle que la SP au niveau de la ME³¹⁶, ce qui confirme que la communication des fibres afférentes cardiaques exprimant TRPV1 est médiée par l'intermédiaire de la ME. Si on regarde ce qui se produit au niveau cérébral, plus précisément dans le cortex frontal, notre étude montre que le traitement de RTX et l'IM conduit à des adaptations de cette région avec des voies de signalisation uniques, mais que la combinaison des deux restaure le phénotype cérébral et semble être similaire au témoin. L'analyse comportementale avec les tests d'anxiété et de dépression renforce ce qui a été observé par les voies de signalisation avec un état dépressif pour le groupe ayant l'IM et la combinaison RTX et IM induit une amélioration de cet état. RTX permettrait de réduire les effets associés à l'IC sur d'autres tissus et diminuerait les comorbidités de l'IC tel que la dépression. De plus, l'investigation de la neuro-communication à différent temps et multitissulaire nous a permis de mettre en évidence que l'IM ou l'IC demandait l'implication des voies métaboliques et énergétiques, notamment la biosynthèse de peptides.

3. Perspectives envisagées

Cette étude est une potentielle cible afin de faire comprendre l'hyperactivité du SNS lors d'IC et cible le SNS comme future stratégie de traitement de l'IC. Grâce au développement de la stratégie de dénervation des fibres afférentes cardiaques exprimant TRPV1 nous avons mis en évidence une solution de traitement de l'IC ainsi que des affections de types neurologiques associées à l'IC telles que la dépression et l'anxiété chez des animaux atteints d'IC. En ciblant le récepteur TRPV1 au niveau cardiaque qui semble être un élément clé de l'hyperactivité sympathique de l'IC, nous sommes capables d'atténuer les risques de survenue d'IC lorsqu'un IM se produit en améliorant les atteintes cardiaques. De futures études sont nécessaires pour déterminer la fenêtre thérapeutique la plus efficace d'administration de RTX afin de d'obtenir les meilleurs effets du traitement pharmacologique. Ces travaux auraient pu être développés par l'élaboration des nanoparticules pouvant libérer RTX spatiotemporellement. De plus, en ce qui

concerne les améliorations des affections neurologiques associées à l'IC, RTX n'avait jamais été utilisée comme potentielle cible de traitement. Alors que nos travaux de recherche ont permis d'offrir une meilleure compréhension sur les mécanismes impliqués dans les troubles neurologiques d'origine cardiaque. Plusieurs études antérieures ont déjà établi que l'injection systémique d'agonistes de TRPV1 induisait des effets anxiogènes et suggérant que les fibres exprimant TRPV1 sont impliquées dans les circuits neuronaux responsables d'un comportement anxieux³¹⁷. Cependant, aucune étude avait mis en évidence que les fibres afférentes cardiaques exprimant TRPV1 pourraient être une cible pour comprendre la communication cœur cerveau et pouvait avoir un rôle autant au niveau cardiaque qu'au niveau cérébral. Nous avons mis en évidence que TRPV1 exprimé au niveau des fibres afférentes cardiaques joue un rôle dans les circuits neuronaux de la périphérie cardiaque vers le SNC tout en induisant un comportement anxiogène. Il est important de savoir que des études ont montré une atrophie corticale, une activité cérébrale frontale réduite, le tout accompagné d'une forte anxiété et d'une faible fonction cognitive chez des patients atteints IC chronique^{301,302}. Cette étude démontre que l'une des comorbidités associées à l'IC chronique est le développement d'un état anxio-dépressif, et que l'ablation des fibres afférentes cardiaques en concomitance avec l'IM empêche le développement d'un comportement dépressif résultant de l'anxiété. On peut donc se demander si cette stratégie de traitement utilisant RTX pourrait être élargi à plus long terme sur des modèles de vieillissement développant des maladies d'ordre neurologique. Il faut savoir que de plus en plus le vieillissement est fortement associé à un dysfonctionnement de type cardiaque mais aussi à une perte cognitive donc au développement de maladies neurologiques telles que la maladie d'Alzheimer, Parkinson, dépression et stress³¹⁸⁻³²⁰. À ce jour, de nombreuses études démontrent que l'IC peut contribuer au risque de la maladie d'Alzheimer via des changements structurels étendus du cerveau, y compris plusieurs régions pouvant être affectées elle-même par la maladie d'Alzheimer^{321,322}. Ceci est compréhensible par le fait que l'IC induit de fortes réductions du débit sanguin au niveau cérébral. Il serait d'autant plus intéressant de combiner un modèle d'étude ayant déjà développé une pathologie cardiaque comme l'IC et une maladie neurologique simultanément et de regarder quel serait l'effet de RTX dans ce modèle. Ce type d'étude permettrait de caractériser de façon concomitante l'apparition de l'IC sur la détérioration cognitive au cours du vieillissement par exemple. À ce jour, des études ont développé des modèles de souris pour étudier l'effet des facteurs de risque cardiovasculaire sur la structure cérébrale et la cognition²⁵ ou le développement de maladie neurologique³²³, nous pourrions nous appuyer sur ces études afin

d'approfondir la stratégie de traitement avec RTX lors d'IC. De plus, notre étude s'est intéressée seulement à 12 semaines après traitement des animaux avec RTX, ce qui ne reflète pas un état d'avancée dans le vieillissement, donc il aurait été pertinent de consacrer un volet d'étude sur des animaux souffrant d'IC et âgés afin de savoir si les effets observés de RTX perdurent dans le temps.

Nos résultats confirment qu'il y a bien des répercussions de l'activation cardiaque de TRPV1, entraînant des modifications au niveau du phénotype cérébral, notamment dans la zone du cortex frontal qui est la région essentiellement impliquée dans les troubles de dépression et d'autres maladies neurologiques. Les différentes régions du cortex frontal sont aussi importantes dans la modulation cognitive, la nociception et la douleur^{115,324}. L'ensemble de nos données suggèrent que l'IM induit chez les souris affecte les circuits neuronaux corticaux et de l'hippocampe, car l'IM induit de l'anxiété chez nos individus et que l'hippocampe est la principale région cérébrale impliquée dans les systèmes d'anxiété³²⁵. Tandis que la dénervation des fibres cardiaques semble influencer seulement le circuit neuronal cortical. Nous suggérons un modèle dans lequel les afférences cardiaques modulent de manière différentielle les phénotypes de type dépression par le biais d'une communication avec le cerveau. Les afférences cardiaques exprimant TRPV1 peuvent avoir des actions sur le cortex frontal via plusieurs voies différentes. La neurotransmission directe des afférences cardiaques de la moelle épinière vers les voies ascendantes qui relie le cortex frontal basal latéral et se projettent principalement vers l'insula a été tracée^{115,326}. Ces résultats recourent les études de tracés anatomiques montrant que les circuits de régulation de l'activité cardiaque incluent, parmi plusieurs régions cérébrales, le cortex cingulaire antérieur et le cortex frontal avec des implications possibles sur le comportement^{327,328}. Compte tenu de la complexité de la communication neuronale entre le cœur et le cerveau, une expérimentation rigoureuse appliquant la neurogénétique Cre-lox couplée à des approches optogénétiques peut révéler des voies plus fines. En plus des circuits neuronaux, nous ne pouvons pas exclure l'impact de l'activation neurohormonale dans l'IC chronique, en particulier l'activité accrue du système rénine-angiotensine (RAS). Le RAS agit non seulement sur le cœur, mais peut également influencer directement la libération de neurotransmetteurs et la pression artérielle dans le cerveau^{329,330} qui sont des candidats responsables d'allostases comportementales^{331,332}. Parallèlement au rôle des mécanismes neurohormonaux, un nombre important de preuves suggèrent que la neuroinflammation peut exacerber le dysfonctionnement neuronal périphérique et central³³³. Certaines études ont montré que l'inhibition de l'inflammation

centrale améliorerait nettement le contrôle autonome, l'inflammation périphérique et la fonction cardiaque dans des modèles animaux d'IC chronique³³⁴. Alors que la neuroinflammation est fortement liée à la fois à l'IC chronique et à l'allostase comportementale telle que la dépression³³⁵, la façon dont ces deux processus convergent dans l'IC reste largement inconnue. Une chose pertinente de cette étude, c'est que nous avons mis en évidence l'implication de voies de signalisation comme ERK et Wnt dans le modèle d'IC mais nous sommes capables de retrouver ces mêmes voies dans le modèle d'étude de *C. elegans* après activation des récepteurs vanilloïdes avec RTX. La voie de Wnt/ β -caténine régule plusieurs processus biologiques et cellulaires dans un tissu en homéostasie comme la prolifération, l'apoptose ou la différenciation des cellules³³⁶. Ceci suggère que cette voie est fortement associée à la réponse à un stress telle que l'activation de TRPV1 avec RTX. Dans le cas de *C. elegans*, nous avons observé une interaction entre la réponse cellulaire au stress chimique, la signalisation Wnt indépendante de la β -caténine et l'homéostasie ionique. Cela laisse supposer que ces processus sont associés aux effets pungent de RTX sur les récepteurs vanilloïdes de *C. elegans*, très probablement OCR-3. De plus, chez *C. elegans*, la voie de signalisation Wnt régule le positionnement subcellulaire des terminaisons présynaptiques et est donc importante pour l'assemblage des synapses, un élément clé dans la formation des circuits neuronaux³³⁷. Le dysfonctionnement des composants clés de la voie Wnt peut entraîner des troubles tels que la dépression et l'anxiété^{336,338,339}. Lors de la progression l'IC, des études prouvent qu'il y a une forte activation de la voie de signalisation Wnt au niveau du cœur et des vaisseaux sanguins alors qu'en condition saine, peu d'activité de la signalisation Wnt est présente³⁴⁰. Ceci est cohérent avec notre observation selon laquelle les individus souffrant d'IC sont dépressifs et présentent l'activation de la voie de Wnt et que la dénervation RTX des afférences sensorielles cardiaques a conduit à une réduction significative du comportement dépressif dans un modèle murin d'IC chronique et n'a pas mis en évidence cette même voie. La voie Wnt indépendante de la β -caténine non canonique est liée à la libération de Ca^{2+} par les réserves intracellulaires et une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} peut activer la voie de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) telle que la voie de signalisation des ERK. Par la suite, cette voie régule négativement la voie canonique Wnt en inhibant la transcription génique médiée par le complexe β -caténine/TCF³³⁸. Cependant des antagonistes de la voie canonique Wnt peuvent efficacement médier un comportement dépressif^{338,339}. Connaître les partenaires qui sont impliqués dans la voie des Wnt dans notre modèle d'étude de l'IC permettrait aussi de cibler des protéines importantes afin de pouvoir faire avancer les stratégies thérapeutiques de l'IC.

De plus, l'application de RTX provoque une excitation immédiate des neurones sensoriels exprimant TRPV1 suivi d'un blocage de stimuli produisant la destruction des fibres^{341,342}, et une libération de neuropeptides est induite au niveau de la moelle épinière à 20 min. Notre étude caractérisant l'effet de RTX sur l'ensemble des tissus a révélé une stimulation de tous les tissus ce qui est cohérent avec le fait que le TRPV1 est aussi retrouvé au niveau des vaisseaux²¹⁵ donc il se peut d'avoir des effets de RTX par les voies systémiques. Nos résultats démontrent que l'application de RTX a induit des adaptations au niveau de la médulla et du nerf vague à plus long terme. Ces processus observés sont en accord avec le fait que la RTX désensibilise les neurones sensoriels sur une longue durée afin d'obtenir une analgésie permanente. Peu de travaux ont été réalisés sur l'effet de l'IM sur le nerf vague, notre étude montre des résultats similaires pour le groupe IM et IM/RTX mais l'intensité est bien plus importante pour des temps précoces. Ceci laisse penser que le nerf vague a une action immédiate lors d'un IM et que le blocage des fibres cardiaques sympathoexcitatrices exprimant TRPV1 entraîne une activité réduite de la part du nerf vague après un IM. Lorsque le cœur souffre d'IM, il est en demande de besoin énergétique et métabolique, ce qui est cohérent avec nos résultats où les voies énergétiques et du métabolisme sont retrouvées. L'infarctus aigu du myocarde est considéré comme un traumatisme grave provoquant une réponse métabolique généralisée. Depuis de nombreuses années, des études ont démontré qu'il y a une augmentation aiguë du métabolisme des glucides, suivie de réactions de synthèse des protéines conduisant à la formation de cicatrices au niveau du cœur³⁴³⁻³⁴⁵. Pour induire les mécanismes de réparation tissulaire lors d'un remodelage cardiaque produit localement au niveau du cœur lui-même, cela implique de produire de l'énergie par le biais des voies mitochondriales³⁴⁶. Le cœur en IC donc par conséquent défaillant, fait face à un déficit énergétique, principalement en raison d'une diminution de la capacité oxydative mitochondriale. Ceci est en partie compensé par une augmentation de la production d'ATP à partir de la glycolyse, nos résultats de notre étude le montre. La contribution relative des différents carburants à la production d'ATP mitochondriale change également, notamment une diminution de l'oxydation du glucose et des acides aminés et une augmentation de l'oxydation des cétones³⁴⁵. La biogenèse mitochondriale est compromise dans l'insuffisance cardiaque, ce qui peut contribuer à l'altération de la fonction mitochondriale. Un important régulateur transcriptionnel de la biogenèse mitochondriale est le coactivateur-1 α (PGC1- α) du PPAR γ (récepteur activateur des proliférateurs de peroxysomes γ). PGC1 α active l'expression transcriptionnelle de NRF-1 (facteur respiratoire nucléaire-1) et NRF2 (facteur respiratoire nucléaire-2), dont les gènes cibles codent pour des protéines qui

médient la réplication mitochondriale, la maintenance et pour générer les composants de la chaîne de transport des électrons. Dans l'insuffisance cardiaque, PGC1 α est réprimé, ce qui est corrélé à une diminution de la biogenèse mitochondriale³⁴⁷. Nous avons démontré que la dénervation par RTX des fibres cardiaques exprimant TRPV1 pouvait avoir des répercussions plus distales sur différents tissus, c'est à se demander si c'est la meilleure stratégie de traiter l'IC chez l'humain, car peu de personnes pourrait accepter qu'on leur détruise leurs fibres nerveuses et qu'on ne peut pas anticiper le temps que l'on a besoin pour prévenir la repousse des fibres au niveau du cœur. Cependant, RTX reste aujourd'hui une molécule superpuissante et souvent utilisée dans les douleurs arthrosiques alors on peut avoir un espoir afin qu'elle puisse être testée dans des cas cliniques chez l'humain pour d'autres pathologies³⁴⁸.

Une évaluation directe du couplage corticocardiaque et des effets de l'inflammation neurogène est également nécessaire pour mieux comprendre les adaptations cérébrales à l'IC chronique et l'impact global de RTX administré localement. Dans l'ensemble, nous fournissons des données sur la susceptibilité par rapport à la résilience à la dépression avec un large éventail de preuves phénotypiques et moléculaires multiples pour l'allostase corticale au dysfonctionnement cardiaque et ajoutons à l'important corpus croissant de preuves pour les réponses physiopathologiques systémiques et intégratives régulées par les fibres sensorielles cardiaques dans l'IC chronique. Ces résultats devraient aider à établir de futures expériences pour disséquer comment les changements métaboliques dans les tissus neuronaux peuvent améliorer efficacement les effets physiologiques négatifs de l'IM via l'application RTX. Les efforts visant à développer des traitements efficaces pour l'IC ont au mieux montré une efficacité limitée, sans remède efficace à ce jour. Nos travaux permettent de découvrir certains constituants métaboliques différentiels impliqués dans le lien entre le métabolisme cardiaque et les systèmes nerveux périphérique et central qui sont des cibles potentielles pour de futures thérapies. Les thérapies combinant des aspects neuroprotecteurs en plus de la modulation des activités métaboliques peuvent offrir de meilleurs résultats pour les patients atteints d'IC. Il faut aussi prendre en considération que les troubles neurologiques ont souvent montré l'implication excessive des voies métaboliques mitochondriales. Par ce fait, cela peut expliquer la suractivation des voies mitochondriales chez des individus IC et dépressifs^{349,350}. Les travaux futurs visent maintenant à appliquer nos UCNP pour les améliorer et les multiplexer avec d'autres techniques d'imagerie, comme l'IRM cardiaque. Notre stratégie a le potentiel d'optimiser la livraison ciblée de matériaux au cœur pour l'identification de biomarqueurs afin de stratifier l'insuffisance cardiaque et d'aider à améliorer les stratégies thérapeutiques. Le fait

d'avoir utilisé *C. elegans* cela a permis de mettre en évidence que RTX a un effet antinociceptif et cette espèce animale pourrait servir d'avance pour le criblage moléculaire afin de connaître au mieux les mécanismes d'action par lesquels cette molécule agit. Mais avant d'effectuer des tests chez les animaux, *C. elegans* est un potentiel organisme afin de réaliser des études pharmacologiques de différentes cibles thérapeutiques, car il partage de nombreuses voies de signalisation aux mammifères. De plus, les mécanismes de communication synaptique sont au cœur du connectome et de la physiologie de la nociception. Il faut noter que l'utilisation de *C. elegans* pour découvrir des médicaments et comprendre les effets de ces derniers, en tant que test biologique peu coûteux de premier niveau, est une solution intéressante pour dépister des molécules avec un des effets antinociceptifs ou potentiellement analgésique chez des espèces supérieures.

4. Limites de l'étude

Cette thèse visait à comprendre les cascades de signalisation en aval de l'application de l'agoniste RTX au TRPV1 dans des systèmes *in vivo*. Nous avons utilisé divers modèles afin d'identifier les voies moléculaires comportementales communes qui pourraient être induites en aval de TRPV1. En utilisant *C. elegans*, nous sommes bien conscients des limites en termes de sa simplicité physiologique par rapport à une espèce mammifère par exemple, donc il y a moins d'interaction entre tissus. Les tests comportementaux réalisés avec *C. elegans* pourraient être élaborés pour inclure différents mutants mais aussi d'autres stimuli que thermique. L'administration de RTX devra peut-être être améliorée et des études pour tester sa stabilité et son activité pourraient être réalisées à l'avenir. En ce qui concerne les études sur la souris, outre les limites potentielles de la présente étude en termes de conception, de technique et de stratégie analytique, d'autres investigations avec un contrôle spatio-temporel direct de l'application de RTX à la surface épicaudique pendant l'IC chronique sont nécessaires pour identifier la fenêtre thérapeutique. En effet, l'ablation des afférences cardiaques avec RTX en même temps que l'IM, telle qu'elle est effectuée ici, est le protocole établi qui a montré que la fonction cardiaque est améliorée et que l'activité sympathique est réduite, même si la fenêtre thérapeutique semble dépendre de l'espèce. Afin de résoudre le problème de la fenêtre thérapeutique du traitement

avec RTX, le recours à une administration ciblée spatio-temporelle serait judicieux, c'est pourquoi l'utilisation de nanoparticules capables de libérer la RTX aurait été une bonne stratégie pour évaluer ces paramètres de l'étude. Cependant, en ce qui concerne le développement des nanoparticules nous étions limités par les propriétés physico-chimiques de RTX qui ont retardé le projet, de nouvelles stratégies de greffage de RTX sont envisagées. Les nanoparticules doivent être préparées dans des solvants compatibles pour l'administration intrapéricardique. Une incertitude supplémentaire est de savoir s'il existe une variabilité entre les sexes après le traitement RTX pour l'IC chronique. Nous savons qu'il existe une différence entre sexe face au développement d'IC³⁵¹, il aurait été intéressant de pouvoir avoir des groupes femelles dans notre étude. Beaucoup d'études discutent des effets protecteurs des œstrogènes sur le développement de maladies cardiovasculaires chez les femelles³⁵² mais il y a aussi des controverses de ces études, donc réaliser notre étude sur un groupe de souris ovariectomisées aurait aussi été pertinent pour voir les différences observées. En ce qui concerne les études protéomiques, le phosphoprotéome pourrait être utilisé à l'avenir pour voir l'activation des voies et regarder leur niveau d'activation. De plus, il faut aussi prendre en considération que nos analyses protéomiques ont été effectuées avec des échantillons groupés donc nous avons de la variabilité intragroupe. Même avec ces limitations au sein de nos études, nos travaux s'ajoutent au nombre croissant de preuves montrant, l'importance des fibres exprimant TRPV1 dans la progression vers l'IC après l'IM, et que plusieurs cascades de signalisation en aval sont hautement conservées parmi les espèces notamment la voie des Wnt.

Conclusion

Notre projet de recherche a permis de conclure que l'application de RTX au niveau du tissu cardiaque par une injection épiscopardique joue un rôle important sur les fibres afférentes exprimant TRPV1 en améliorant le phénotype cardiaque. Ces fibres sont essentielles dans l'implication du système nerveux autonome avec une action d'inhibition du SNS. La dénervation des fibres afférentes cardiaques avec la RTX permet d'améliorer l'état dépressif des animaux atteints d'IM ce qui traduit un effet sur le cerveau et que RTX peut réduire les atteintes cognitives. De plus les analyses protéomiques sur les différents tissus montrent une forte implication des voies de signalisation énergétiques et métaboliques et celle réalisée sur les cortex frontaux isolés montrent les voies bien connues dans la dépression telle que la signalisation ERK pour des individus atteints d'IM. La partie du projet effectuée sur *C. elegans* permet de constater que des voies similaires sont activées après une exposition à RTX chez *C. elegans* à celles observées dans un modèle de douleur cardiaque comme la voie des Wnt. Cette étude sur *C. elegans* a pu démontrer pour la première fois un effet antinociceptif de RTX à la réponse à une stimulation à la chaleur nocive chez *C. elegans*. De plus, ce projet a permis de faire avancer les connaissances sur l'axe cœur-cerveau. Il est un élément important afin de faire progresser la compréhension de l'hyperactivité du SNS lors de survenue d'IC. Le fait que nous avons mis en évidence une amélioration des fonctions cardiaque et une amélioration de l'état anxiodépressif en traitant avec RTX les individus souffrants d'IM, nous pouvons supposer que cette stratégie de traitement est une avancée pour comprendre de nombreuses maladies du au vieillissement. Il faut reconnaître que l'une des caractéristiques importantes du vieillissement, c'est que les patients peuvent être atteints simultanément de dysfonctionnement cardiaque et de perte cognitive. Le modèle de *C. elegans* dans notre projet doit être vu comme un futur modèle alternatif permettant de tester des molécules pharmacologiquement actives pouvant être éventuellement développées pour traiter des animaux ou des humains. La continuité de ce projet offrirait la chance de développer une nouvelle stratégie de traiter l'IC et obtenir un suivi post-IM en utilisant des ligands photo-activable ciblant les fibres afférentes nociceptives exprimant TRPV1.

Références bibliographiques

1. Louis, J. D. Congenital Defects of the Human Heart: Nomenclature and Anatomy. in *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices* (ed. Iaizzo, P. A.) 137–144 (Humana Press, 2009). doi:10.1007/978-1-60327-372-5_9.
2. Brutsaert, D. L. The indispensable role of cardiac endothelium in the structure and function of the heart. *Verh. - K. Acad. Voor Geneesk. Van Belg.* **65**, 75–116 (2003).
3. Rodriguez, E. R. & Tan, C. D. Structure and Anatomy of the Human Pericardium. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **59**, 327–340 (2017).
4. *Autonomic Failure*. vol. 1 (Oxford University Press, 2013).
5. Serratrice, J., Verschueren, A. & Serratrice, G. Système nerveux autonome. *EMC - Neurol.* **10**, 1–18 (2013).
6. Kobayashi, M., Massiello, A., Karimov, J. H., Van Wagoner, D. R. & Fukamachi, K. Cardiac Autonomic Nerve Stimulation in the Treatment of Heart Failure. *Ann. Thorac. Surg.* **96**, 339–345 (2013).
7. Shen, M. J. & Zipes, D. P. Role of the Autonomic Nervous System in Modulating Cardiac Arrhythmias. *Circ. Res.* **114**, 1004–1021 (2014).
8. Smith, R. P., Turek, P., Benagiano, G., Gentile, V. & Gaudio, E. *Atlante di Anatomia Fisiopatologia e Clinica*. (Elsevier Health Sciences Italy, 2012).
9. Nutter, T. J. Monovalent and divalent cation permeability and block of neuronal nicotinic receptor channels in rat parasympathetic ganglia. *J. Gen. Physiol.* **105**, 701–723 (1995).
10. Tsien, R. W. Effects of Epinephrine on the Pacemaker Potassium Current of Cardiac Purkinje Fibers. *J. Gen. Physiol.* **64**, 293–319 (1974).
11. Tsien, R. W. & Carpenter, D. O. Ionic mechanisms of pacemaker activity in cardiac Purkinje fibers. *Fed. Proc.* **37**, 2127–2131 (1978).
12. Kollai, M. & Koizumi, K. Reciprocal and non-reciprocal action of the vagal and sympathetic nerves innervating the heart. *J. Auton. Nerv. Syst.* **1**, 33–52 (1979).
13. Mccraty, R. Science of the Heart, Volume 2 Exploring the Role of the Heart in Human Performance An Overview of Research Conducted by the HeartMath Institute. (2016) doi:10.13140/RG.2.1.3873.5128.
14. Pardini, B. J., Patel, K. P., Schmid, P. G. & Lund, D. D. Location, distribution and projections of intracardiac ganglion cells in the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* **20**, 91–101 (1987).
15. Roberts, L. A. The sinoatrial ring bundle: A cardiac neural communication system? *Am. J. Anat.* **191**, 250–260 (1991).
16. Roberts, L. A., Slocum, G. R. & Riley, D. A. Morphological study of the innervation pattern of the rabbit sinoatrial node. *Am. J. Anat.* **185**, 74–88 (1989).
17. Xi, X., Randall, W. C. & Wurster, R. D. Morphology of intracellularly labeled canine intracardiac ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* **314**, 396–402 (1991).
18. Hanna, P. *et al.* Calming the Nervous Heart: Autonomic Therapies in Heart Failure. *Card. Fail. Rev.* **4**, 92 (2018).
19. Thygesen, K., Alpert, J. S. & White, H. D. Universal Definition of Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 2173–2195 (2007).
20. van der Wal, H. H., van Deursen, V. M., van der Meer, P. & Voors, A. A. Comorbidities in Heart Failure. in *Heart Failure* (eds. Bauersachs, J., Butler, J. & Sandner, P.) vol. 243 35–66 (Springer International Publishing, 2017).
21. Triposkiadis, F. *et al.* Reframing the association and significance of co-morbidities in

- heart failure: Co-morbidities in heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **18**, 744–758 (2016).
22. Savarese, G. & Lund, L. H. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card. Fail. Rev.* **3**, 7–11 (2017).
 23. Roth, G. A. *et al.* Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019. *J. Am. Coll. Cardiol.* **76**, 2982–3021 (2020).
 24. Sbolli, M., Fiuzat, M., Cani, D. & O'Connor, C. M. Depression and heart failure: the lonely comorbidity. *Eur. J. Heart Fail.* **22**, 2007–2017 (2020).
 25. Bink, D. I., Ritz, K., Aronica, E., van der Weerd, L. & Daemen, M. J. A. P. Mouse models to study the effect of cardiovascular risk factors on brain structure and cognition. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **33**, 1666–1684 (2013).
 26. Ventura-Clapier, R., Garnier, A. & Veksler, V. Energy metabolism in heart failure: Energy metabolism in heart failure. *J. Physiol.* **555**, 1–13 (2004).
 27. Patten, R. D. & Hall-Porter, M. R. Small Animal Models of Heart Failure: Development of Novel Therapies, Past and Present. *Circ. Heart Fail.* **2**, 138–144 (2009).
 28. De Villiers, C. & Riley, P. R. Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion. *Dis. Model. Mech.* **13**, dmm046565 (2020).
 29. Mulder, PhD, P. *et al.* Increased Survival After Long-Term Treatment With Mibefradil, a Selective T-Channel Calcium Antagonist, in Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **29**, 416–421 (1997).
 30. Salimova, E. *et al.* Variable outcomes of human heart attack recapitulated in genetically diverse mice. *Npj Regen. Med.* **4**, 5 (2019).
 31. Pfeffer, M. A., Pfeffer, J. M., Steinberg, C. & Finn, P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* **72**, 406–412 (1985).
 32. Pfeffer, M. A. *et al.* Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ. Res.* **44**, 503–512 (1979).
 33. Fletcher, P. J., Pfeffer, J. M., Pfeffer, M. A. & Braunwald, E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. *Circ. Res.* **49**, 618–626 (1981).
 34. Pfeffer, J. M., Pfeffer, M. A. & Braunwald, E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ. Res.* **57**, 84–95 (1985).
 35. Sakai, S. *et al.* Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* **384**, 353–355 (1996).
 36. Pleger, S. T. *et al.* Stable Myocardial-Specific AAV6-S100A1 Gene Therapy Results in Chronic Functional Heart Failure Rescue. *Circulation* **115**, 2506–2515 (2007).
 37. Weinberg, E. O. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* **90**, 1410–1422 (1994).
 38. Schunkert, H. *et al.* Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J. Clin. Invest.* **86**, 1913–1920 (1990).
 39. Litwin, S. E. *et al.* Serial Echocardiographic-Doppler Assessment of Left Ventricular Geometry and Function in Rats With Pressure-Overload Hypertrophy: Chronic Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Attenuates the Transition to Heart Failure. *Circulation* **91**, 2642–2654 (1995).
 40. Miyamoto, M. I. *et al.* Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 793–798 (2000).
 41. del Monte, F. *et al.* Improvement in Survival and Cardiac Metabolism After Gene

Transfer of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in a Rat Model of Heart Failure. *Circulation* **104**, 1424–1429 (2001).

42. Inoko, M., Kihara, Y., Morii, I., Fujiwara, H. & Sasayama, S. Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **267**, H2471–H2482 (1994).

43. Heyen, J. R. R. *et al.* Structural, functional, and molecular characterization of the SHHF model of heart failure. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **283**, H1775–H1784 (2002).

44. Michael, L. H. *et al.* Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **269**, H2147–H2154 (1995).

45. Patten, R. D. *et al.* Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **274**, H1812–H1820 (1998).

46. Bialik, S. *et al.* Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J. Clin. Invest.* **100**, 1363–1372 (1997).

47. Zhang, R. *et al.* Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat. Med.* **11**, 409–417 (2005).

48. Rockman, H. A. *et al.* Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 8277–8281 (1991).

49. Rockman, H. A., Wachhorst, S. P., Mao, L. & Ross, J. ANG II receptor blockade prevents ventricular hypertrophy and ANF gene expression with pressure overload in mice. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **266**, H2468–H2475 (1994).

50. Patten, R. D. *et al.* 17 Beta-Estradiol Differentially Affects Left Ventricular and Cardiomyocyte Hypertrophy Following Myocardial Infarction and Pressure Overload. *J. Card. Fail.* **14**, 245–253 (2008).

51. Takimoto, E. *et al.* Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* **11**, 214–222 (2005).

52. Ross, J. Dilated cardiomyopathy: concepts derived from gene deficient and transgenic animal models. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* **66**, 219–224 (2002).

53. Arber, S. *et al.* MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* **88**, 393–403 (1997).

54. Kubota, T. *et al.* Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Circ. Res.* **81**, 627–635 (1997).

55. Kubota, T. *et al.* Soluble tumor necrosis factor receptor abrogates myocardial inflammation but not hypertrophy in cytokine-induced cardiomyopathy. *Circulation* **101**, 2518–2525 (2000).

56. Li, Y. Y. *et al.* Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor α can be modulated by anti-tumor necrosis factor α therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 12746–12751 (2000).

57. Esler, M., Kaye, D., Lambert, G., Esler, D. & Jennings, G. Adrenergic Nervous System in Heart Failure. *Am. J. Cardiol.* **80**, 7L–14L (1997).

58. Nian, M., Lee, P., Khaper, N. & Liu, P. Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circ. Res.* **94**, 1543–1553 (2004).

59. Francis, G. S. Neurohumoral mechanisms involved in congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* **55**, A15–A21 (1985).

60. Hartupee, J. & Mann, D. L. Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat. Rev. Cardiol.* **14**, 30–38 (2017).

61. Elam, M. *et al.* Pathological sympathoexcitation: how is it achieved? *Acta Physiol. Scand.* **177**, 405–411 (2003).

62. May, C. N. *et al.* Specific control of sympathetic nerve activity to the mammalian heart and kidney: Control of cardiac and renal sympathetic nerve activity. *Exp. Physiol.* **95**, 34–40 (2010).
63. Hasking, G. J. *et al.* Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation* **73**, 615–621 (1986).
64. Brunner-La Rocca, H. Effect of cardiac sympathetic nervous activity on mode of death in congestive heart failure. *Eur. Heart J.* **22**, 1136–1143 (2001).
65. Liang, C. *et al.* Alterations by Norepinephrine of Cardiac Sympathetic Nerve Terminal Function and Myocardial β -Adrenergic Receptor Sensitivity in the Ferret: Normalization by Antioxidant Vitamins. *Circulation* **102**, 96–103 (2000).
66. Briest, W. Cardiac remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. *Cardiovasc. Res.* **52**, 265–273 (2001).
67. Kaye, D. M. *et al.* Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* **26**, 1257–1263 (1995).
68. Grassi, G. *et al.* Sympathetic Activation and Loss of Reflex Sympathetic Control in Mild Congestive Heart Failure. *Circulation* **92**, 3206–3211 (1995).
69. Schultz, H. D., Marcus, N. J. & Del Rio, R. Mechanisms of carotid body chemoreflex dysfunction during heart failure: Carotid body dysfunction in heart failure. *Exp. Physiol.* **100**, 124–129 (2015).
70. Zucker, I. H. Novel Mechanisms of Sympathetic Regulation in Chronic Heart Failure. *Hypertension* **48**, 1005–1011 (2006).
71. Fiore, G., Suppress, P., Triggiani, V., Resta, F. & Sabba, C. Neuroimmune activation in chronic heart failure. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **13**, 68–75 (2013).
72. Borovac, J. A., D’Amario, D., Bozic, J. & Glavas, D. Sympathetic nervous system activation and heart failure: Current state of evidence and the pathophysiology in the light of novel biomarkers. *World J. Cardiol.* **12**, 373–408 (2020).
73. Grosman-Rimon, L. *et al.* Neurohormones, inflammatory mediators, and cardiovascular injury in the setting of heart failure. *Heart Fail. Rev.* **25**, 685–701 (2020).
74. Watson, A., Hood, S. & May, C. MECHANISMS OF SYMPATHETIC ACTIVATION IN HEART FAILURE. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **33**, 1269–1274 (2006).
75. Dampney, R. a. L. *et al.* Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **29**, 261–268 (2002).
76. Zucker, I. H. *et al.* The origin of sympathetic outflow in heart failure: the roles of angiotensin II and nitric oxide. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **84**, 217–232 (2004).
77. Grassi, G. *et al.* Effects of Chronic ACE Inhibition on Sympathetic Nerve Traffic and Baroreflex Control of Circulation in Heart Failure. *Circulation* **96**, 1173–1179 (1997).
78. *Goodman & Gilman’s pharmacological basis of therapeutics.* (McGraw-Hill, 2011).
79. Hökfelt, T., Elfvin, L.-G., Schultzberg, M., Goldstein, M. & Nilsson, G. On the occurrence of substance P-containing fibers in sympathetic ganglia: Immunohistochemical evidence. *Brain Res.* **132**, 29–41 (1977).
80. Steele, P. A. & Choate, J. K. Innervation of the pacemaker in guinea-pig sinoatrial node. *J. Auton. Nerv. Syst.* **47**, 177–187 (1994).
81. Steele, P. A., Gibbins, I. L. & Morris, J. L. Projections of intrinsic cardiac neurons to different targets in the guinea-pig heart. *J. Auton. Nerv. Syst.* **56**, 191–200 (1996).
82. Habecker, B. A. *et al.* Molecular and cellular neurocardiology: development, and cellular and molecular adaptations to heart disease: Molecular and cellular neurocardiology. *J. Physiol.* **594**, 3853–3875 (2016).
83. Widiapradja, A., Chunduri, P. & Levick, S. P. The role of neuropeptides in adverse

- myocardial remodeling and heart failure. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 2019–2038 (2017).
84. Raja, S. N. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* **161**, 1976–1982 (2020).
 85. Woolf, C. J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain: *Pain* **152**, S2–S15 (2011).
 86. Gold, M. S. & Gebhart, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat. Med.* **16**, 1248–1257 (2010).
 87. Devor, M. Response of nerves to injury in relation to neuropathic pain. in *Wall and Melzack's Textbook of Pain* 905–927 (Elsevier, 2006). doi:10.1016/B0-443-07287-6/50063-1.
 88. Ossipov, M. H. & Porreca, F. Challenges in the development of novel treatment strategies for neuropathic pain. *NeuroRX* **2**, 650–661 (2005).
 89. Schaible, H. G. Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handb. Exp. Pharmacol.* 3–28 (2007).
 90. Woolf, C. J. Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain. *Science* **288**, 1765–1768 (2000).
 91. Woolf, C. J. & Mannion, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *The Lancet* **353**, 1959–1964 (1999).
 92. Matthes, H. W. D. *et al.* Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the μ -opioid-receptor gene. *Nature* **383**, 819–823 (1996).
 93. Mogil, J. S., Grisel, J. E., Zhangs, G., Belknap, J. K. & Grandy, D. K. Functional antagonism of μ -, δ - and κ -opioid antinociception by orphanin FQ. *Neurosci. Lett.* **214**, 131–134 (1996).
 94. Kidd, B. L. & Urban, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. *Br. J. Anaesth.* **87**, 3–11 (2001).
 95. Julius, D. & Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203–210 (2001).
 96. Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. & Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* **139**, 267–284 (2009).
 97. Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. & Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* **139**, 267–284 (2009).
 98. West, S. J., Bannister, K., Dickenson, A. H. & Bennett, D. L. Circuitry and plasticity of the dorsal horn – Toward a better understanding of neuropathic pain. *Neuroscience* **300**, 254–275 (2015).
 99. Adriaensen, H. & Coppejans, H. Neurophysiology of acute and chronic pain. *Baillière's Clin. Anaesthesiol.* **7**, 517–534 (1993).
 100. Bouhassira, D. & Attal, N. All in one: Is it possible to assess all dimensions of any pain with a simple questionnaire? *Pain* **144**, 7–8 (2009).
 101. Comitato, A. & Bardoni, R. Presynaptic Inhibition of Pain and Touch in the Spinal Cord: From Receptors to Circuits. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 414 (2021).
 102. Takayama, Y., Uta, D., Furue, H. & Tominaga, M. Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 5213–5218 (2015).
 103. Catterall, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 521–555 (2000).
 104. Catterall, W. A. & Few, A. P. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* **59**, 882–901 (2008).
 105. Flavell, S. W. & Greenberg, M. E. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 563–590 (2008).
 106. Scholz, J. & Woolf, C. J. Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.* **5 Suppl**, 1062–1067

(2002).

107. Chiu, I. M., von Hehn, C. A. & Woolf, C. J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nat. Neurosci.* **15**, 1063–1067 (2012).
108. López-Muñoz, F., Boya, J. & Alamo, C. Neuron theory, the cornerstone of neuroscience, on the centenary of the Nobel Prize award to Santiago Ramón y Cajal. *Brain Res. Bull.* **70**, 391–405 (2006).
109. van den Pol, A. N. Neuropeptide Transmission in Brain Circuits. *Neuron* **76**, 98–115 (2012).
110. Margeta, M. A. & Shen, K. Molecular mechanisms of synaptic specificity. *Mol. Cell. Neurosci.* **43**, 261–267 (2010).
111. Südhof, T. C. THE SYNAPTIC VESICLE CYCLE. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 509–547 (2004).
112. Brady, S. T., Siegel, G. J., Albers, R. W., Price, D. L. & Benjamins, J. *Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular and medical neurobiology.* (2012).
113. *Principles of Cardiovascular Neural Regulation in Health and Disease.* (2000).
114. Camici, P. G. & Pagani, M. Cardiac Nociception. *Circulation* **114**, 2309–2312 (2006).
115. Foreman, R. D., Garrett, K. M. & Blair, R. W. Mechanisms of Cardiac Pain. in *Comprehensive Physiology* (ed. Terjung, R.) 929–960 (John Wiley & Sons, Inc., 2015). doi:10.1002/cphy.c140032.
116. Pan, H.-L. & Chen, S.-R. Sensing Tissue Ischemia: Another New Function for Capsaicin Receptors? *Circulation* **110**, 1826–1831 (2004).
117. Schultz, H. D. The spice of life is at the root of cardiac pain. *J. Physiol.* **551**, 400–400 (2003).
118. Cosens, D. J. & Manning, A. Abnormal Electroretinogram from a Drosophila Mutant. *Nature* **224**, 285–287 (1969).
119. Minke, B., Wu, C.-F. & Pak, W. L. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in Drosophila mutant. *Nature* **258**, 84–87 (1975).
120. Montell, C. & Rubin, G. M. Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**, 1313–1323 (1989).
121. Hardie, R. C. & Minke, B. Calcium-dependent inactivation of light-sensitive channels in Drosophila photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* **103**, 409–427 (1994).
122. Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816–824 (1997).
123. Clapham, D. E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517–524 (2003).
124. Moran, M. M., Xu, H. & Clapham, D. E. TRP ion channels in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 362–369 (2004).
125. Christensen, A. P. & Corey, D. P. TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 510–521 (2007).
126. Li, M., Yu, Y. & Yang, J. Structural Biology of TRP Channels. in *Transient Receptor Potential Channels* (ed. Islam, Md. S.) vol. 704 1–23 (Springer Netherlands, 2011).
127. Ramsey, I. S., Delling, M. & Clapham, D. E. AN INTRODUCTION TO TRP CHANNELS. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 619–647 (2006).
128. Montell, C. The TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci. Signal.* **2005**, re3–re3 (2005).
129. Saidi Mouna. Étude de la régulation des tachykinines et son impact sur l’expression des peptides opioïdes à l’aide de la chromatographie liquide à haute performance et de la spectrométrie de masse.
130. Rohács, T., Lopes, C. M. B., Michailidis, I. & Logothetis, D. E. PI(4,5)P2 regulates the

activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* **8**, 626–634 (2005).

131. Liu, D. & Liman, E. R. Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 15160–15165 (2003).

132. Chuang, H. *et al.* Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* **411**, 957–962 (2001).

133. Runnels, L. W., Yue, L. & Clapham, D. E. The TRPM7 channel is inactivated by PIP₂ hydrolysis. *Nat. Cell Biol.* **4**, 329–336 (2002).

134. Saimi, Y. & Kung, C. Calmodulin as an Ion Channel Subunit. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 289–311 (2002).

135. Holzer, P. Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. *Pharmacol. Ther.* **131**, 142–170 (2011).

136. Storozhuk, M. V., Moroz, O. F. & Zholos, A. V. Multifunctional TRPV1 Ion Channels in Physiology and Pathology with Focus on the Brain, Vasculature, and Some Visceral Systems. *BioMed Res. Int.* **2019**, 1–12 (2019).

137. Baylie, R. L. & Brayden, J. E. TRPV channels and vascular function: Vascular TRPV channels. *Acta Physiol.* **203**, 99–116 (2011).

138. Miller, M., Koch, S. E., Veteto, A., Domeier, T. & Rubinstein, J. Role of Known Transient Receptor Potential Vanilloid Channels in Modulating Cardiac Mechanobiology. *Front. Physiol.* **12**, 734113 (2021).

139. Gorbunov, A. S. *et al.* Physiological and Pathological Role of TRPV1, TRPV2 and TRPV4 Channels in Heart. *Curr. Cardiol. Rev.* **15**, 244–251 (2019).

140. Hof, T. *et al.* Transient receptor potential channels in cardiac health and disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **16**, 344–360 (2019).

141. Caterina, M. J. & Julius, D. The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 487–517 (2001).

142. Jordt, S.-E., Tominaga, M. & Julius, D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 8134–8139 (2000).

143. Leonelli, M., Graciano, M. F. R. & Britto, L. R. G. TRP channels, omega-3 fatty acids, and oxidative stress in neurodegeneration: from the cell membrane to intracellular cross-links. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **44**, 1088–1096 (2011).

144. Latorre, R., Brauchi, S., Orta, G., Zaelzer, C. & Vargas, G. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* **42**, 427–438 (2007).

145. Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M. & Gordon, S. E. Ca²⁺/Calmodulin Modulates TRPV1 Activation by Capsaicin. *J. Gen. Physiol.* **123**, 53–62 (2004).

146. Garcia-Sanz, N. *et al.* A Role of the Transient Receptor Potential Domain of Vanilloid Receptor I in Channel Gating. *J. Neurosci.* **27**, 11641–11650 (2007).

147. Jordt, S.-E. & Julius, D. Molecular Basis for Species-Specific Sensitivity to “Hot” Chili Peppers. *Cell* **108**, 421–430 (2002).

148. Marín-Burgin, A., Reppenhagen, S., Klusch, A., Wendland, J. R. & Petersen, M. Low-threshold heat response antagonized by capsazepine in chick sensory neurons, which are capsaicin-insensitive: Heat response antagonized by capsazepine in chick sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 3560–3566 (2000).

149. Veldhuis, N. A. *et al.* N-Glycosylation Determines Ionic Permeability and Desensitization of the TRPV1 Capsaicin Receptor. *J. Biol. Chem.* **287**, 21765–21772 (2012).

150. Bollimuntha, S., Selvaraj, S. & Singh, B. B. Emerging Roles of Canonical TRP Channels in Neuronal Function. in *Transient Receptor Potential Channels* (ed. Islam, Md. S.) vol. 704 573–593 (Springer Netherlands, 2011).

151. Shuba, Y. M. Beyond Neuronal Heat Sensing: Diversity of TRPV1 Heat-Capsaicin

- Receptor-Channel Functions. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, 612480 (2021).
152. Xiang, H. *et al.* Primary sensory neuron-specific interference of TRPV1 signaling by adeno-associated virus-encoded TRPV1 peptide aptamer attenuates neuropathic pain. *Mol. Pain* **13**, 174480691771704 (2017).
153. Tominaga, M. & Julius, D. Capsaicin Receptor in the Pain Pathway. *Jpn. J. Pharmacol.* **83**, 20–24 (2000).
154. Yue, Z. *et al.* Role of TRP channels in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **308**, H157–H182 (2015).
155. Du, Q. *et al.* The Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Common Diseases of the Digestive Tract and the Cardiovascular and Respiratory System. *Front. Physiol.* **10**, 1064 (2019).
156. Szabados, T. *et al.* Capsaicin-Sensitive Sensory Nerves and the TRPV1 Ion Channel in Cardiac Physiology and Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4472 (2020).
157. Steinhoff, M. S., von Mentzer, B., Geppetti, P., Pothoulakis, C. & Bunnett, N. W. Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. *Physiol. Rev.* **94**, 265–301 (2014).
158. Maggi, C. A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog. Neurobiol.* **45**, 1–98 (1995).
159. Holzer, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* **24**, 739–768 (1988).
160. Malmberg, A. B. & Yaksh, T. L. Capsaicin-evoked prostaglandin E2 release in spinal cord slices: relative effect of cyclooxygenase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* **271**, 293–299 (1994).
161. Barthó, L. *et al.* Effects of capsaicin on visceral smooth muscle: a valuable tool for sensory neurotransmitter identification. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 143–157 (2004).
162. Yiangou, Y. *et al.* Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *The Lancet* **357**, 1338–1339 (2001).
163. Pennefather, J. N. *et al.* Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci.* **74**, 1445–1463 (2004).
164. Russell, F. A., King, R., Smillie, S.-J., Kodji, X. & Brain, S. D. Calcitonin Gene-Related Peptide: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **94**, 1099–1142 (2014).
165. Rosenfeld, M. G., Amara, S. G. & Evans, R. M. Alternative RNA Processing: Determining Neuronal Phenotype. *Science* **225**, 1315–1320 (1984).
166. Fisher, L. A. *et al.* Stimulation of noradrenergic sympathetic outflow by calcitonin gene-related peptide. *Nature* **305**, 534–536 (1983).
167. Kee, Z., Kodji, X. & Brain, S. D. The Role of Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) in Neurogenic Vasodilation and Its Cardioprotective Effects. *Front. Physiol.* **9**, 1249 (2018).
168. Schou, W. S., Ashina, S., Amin, F. M., Goadsby, P. J. & Ashina, M. Calcitonin gene-related peptide and pain: a systematic review. *J. Headache Pain* **18**, 34 (2017).
169. Hua, X. Y. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide in relation to peripheral functions of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **551**, 1–45 (1986).
170. Benemei, S., Nicoletti, P., Capone, J. G. & Geppetti, P. CGRP receptors in the control of pain and inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 9–14 (2009).
171. Hook, V. *et al.* Proteases for Processing Proneuropeptides into Peptide Neurotransmitters and Hormones. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **48**, 393–423 (2008).
172. Chen, Y., Geis, C. & Sommer, C. Activation of TRPV1 Contributes to Morphine Tolerance: Involvement of the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *J.*

Neurosci. **28**, 5836–5845 (2008).

173. Garami, A. *et al.* Contributions of different modes of TRPV1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 1435–1440 (2010).

174. Benítez-Angeles, M., Morales-Lázaro, S. L., Juárez-González, E. & Rosenbaum, T. TRPV1: Structure, Endogenous Agonists, and Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3421 (2020).

175. Jardín, I. *et al.* TRPs in Pain Sensation. *Front. Physiol.* **8**, 392 (2017).

176. Brito, R., Sheth, S., Mukherjea, D., Rybak, L. & Ramkumar, V. TRPV1: A Potential Drug Target for Treating Various Diseases. *Cells* **3**, 517–545 (2014).

177. Lee, J. H. *et al.* Structural insights into transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) from homology modeling, flexible docking, and mutational studies. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **25**, 317–327 (2011).

178. Fattori, V., Hohmann, M., Rossaneis, A., Pinho-Ribeiro, F. & Verri, W. Capsaicin: Current Understanding of Its Mechanisms and Therapy of Pain and Other Pre-Clinical and Clinical Uses. *Molecules* **21**, 844 (2016).

179. Wood, J. *et al.* Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J. Neurosci.* **8**, 3208–3220 (1988).

180. Oh, U., Hwang, S. & Kim, D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* **16**, 1659–1667 (1996).

181. Harada, N. & Okajima, K. Effects of Capsaicin and Isoflavone on Blood Pressure and Serum Levels of Insulin-Like Growth Factor-I in Normotensive and Hypertensive Volunteers with Alopecia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1456–1459 (2009).

182. Li, J. & Wang, D. H. Function and regulation of the vanilloid receptor in rats fed a high salt diet: *J. Hypertens.* **21**, 1525–1530 (2003).

183. Peng, J. & Li, Y.-J. The vanilloid receptor TRPV1: Role in cardiovascular and gastrointestinal protection. *Eur. J. Pharmacol.* **627**, 1–7 (2010).

184. Zvara, Á. *et al.* Capsaicin-sensitive sensory neurons regulate myocardial function and gene expression pattern of rat hearts: a DNA microarray study. *FASEB J.* **20**, 160–162 (2006).

185. Deng, P.-Y. & Li, Y.-J. Calcitonin gene-related peptide and hypertension. *Peptides* **26**, 1676–1685 (2005).

186. Ma, L. *et al.* Activation of TRPV1 reduces vascular lipid accumulation and attenuates atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **92**, 504–513 (2011).

187. Szallasi, A. & Blumberg, P. M. Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res.* **524**, 106–111 (1990).

188. de Vries, D. J. & Blumberg, P. M. Thermoregulatory effects of resiniferatoxin in the mouse: Comparison with capsaicin. *Life Sci.* **44**, 711–715 (1989).

189. Maggi, C. A. *et al.* Similarities and differences in the action of resiniferatoxin and capsaicin on central and peripheral endings of primary sensory neurons. *Neuroscience* **37**, 531–539 (1990).

190. Kárai, L. J., Russell, J. T., Iadarola, M. J. & Oláh, Z. Vanilloid Receptor 1 Regulates Multiple Calcium Compartments and Contributes to Ca²⁺-induced Ca²⁺ Release in Sensory Neurons. *J. Biol. Chem.* **279**, 16377–16387 (2004).

191. Wu, Y., Hu, Z., Wang, D., Lv, K. & Hu, N. Resiniferatoxin reduces ventricular arrhythmias in heart failure via selectively blunting cardiac sympathetic afferent projection into spinal cord in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **867**, 172836 (2020).

192. Senador Danielle *et al.* Pharmacological cardiac sympathetic afferent denervation in pacing-induced heart failure. *FASEB J.* **31**, p.884.2-844.2 (2017).

193. Wang, D. *et al.* Focal selective chemo-ablation of spinal cardiac afferent nerve by resiniferatoxin protects the heart from pressure overload-induced hypertrophy. *Biomed. Pharmacother.* **109**, 377–385 (2019).

194. Heiss, J. *et al.* (364) A Phase I study of the intrathecal administration of resiniferatoxin for treating severe refractory pain associated with advanced cancer. *J. Pain* **15**, S67 (2014).
195. Hockman, T. M. *et al.* Target engagement and histopathology of neuraxial resiniferatoxin in dog. *Vet. Anaesth. Analg.* **45**, 212–226 (2018).
196. Unger, M. D. *et al.* Unilateral Epidural Targeting of Resiniferatoxin Induces Bilateral Neurolysis of Spinal Nociceptive Afferents. *Pain Med.* **20**, 897–906 (2019).
197. Pan, H.-L., Khan, G. M., Alloway, K. D. & Chen, S.-R. Resiniferatoxin Induces Paradoxical Changes in Thermal and Mechanical Sensitivities in Rats: Mechanism of Action. *J. Neurosci.* **23**, 2911–2919 (2003).
198. Lee, M. K. The Effect of Epidural Resiniferatoxin in the Neuropathic Pain Rat Model. *Pain Physician* **4**;15, 287–296 (2012).
199. Karai, L. *et al.* Deletion of vanilloid receptor 1 expressing primary afferent neurons for pain control. *J. Clin. Invest.* **113**, 1344–1352 (2004).
200. Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J. & Julius, D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**, 436–441 (1999).
201. Wiley, R. G. & Lappi, D. A. Targeted Toxins. *Curr. Protoc. Neurosci.* **14**, (2001).
202. Caudle, R. M. *et al.* Resiniferatoxin-Induced Loss of Plasma Membrane in Vanilloid Receptor Expressing Cells. *NeuroToxicology* **24**, 895–908 (2003).
203. Szallasi, A. & Blumberg, P. M. Complex Regulation of TRPV1 by Vanilloids. in *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades* (eds. Liedtke, W. B. & Heller, S.) (CRC Press/Taylor & Francis, 2007).
204. Dogan, M. D. *et al.* Lipopolysaccharide fever is initiated via a capsaicin-sensitive mechanism independent of the subtype-1 vanilloid receptor: The TRPV-1 and LPS fever. *Br. J. Pharmacol.* **143**, 1023–1032 (2004).
205. Shimizu, I., Iida, T., Horiuchi, N. & Caterina, M. J. 5-Iodoresiniferatoxin Evokes Hypothermia in Mice and Is a Partial Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Agonist in Vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 1378–1385 (2005).
206. Walker, K. M. *et al.* The VR1 Antagonist Capsazepine Reverses Mechanical Hyperalgesia in Models of Inflammatory and Neuropathic Pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**, 56–62 (2003).
207. Dinis, P., Charrua, A., Avelino, A. & Cruz, F. Intravesical resiniferatoxin decreases spinal c-fos expression and increases bladder volume to reflex micturition in rats with chronic inflamed urinary bladders. *BJU Int.* **94**, 153–157 (2004).
208. Hutter, M. M. *et al.* Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV-1) Promotes Neurogenic Inflammation in the Pancreas Via Activation of the Neurokinin-1 Receptor (NK-1R): *Pancreas* **30**, 260–265 (2005).
209. Bevan, S. Capsaicin and pain mechanisms. in *Pain and Neurogenic Inflammation* (eds. Brain, S. D. & Moore, P. K.) 61–80 (Birkhäuser Basel, 1999). doi:10.1007/978-3-0348-8753-3_4.
210. Caterina, M. J. Vanilloid receptors take a TRP beyond the sensory afferent☆: *Pain* **105**, 5–9 (2003).
211. Levine, J. D. & Alessandri-Haber, N. TRP channels: Targets for the relief of pain. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1772**, 989–1003 (2007).
212. Ma, W. & Quirion, R. Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. *Expert Opin. Ther. Targets* **11**, 307–320 (2007).
213. Endres-Becker, J. *et al.* μ -Opioid Receptor Activation Modulates Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Currents in Sensory Neurons in A Model of Inflammatory Pain. *Mol. Pharmacol.* **71**, 12–18 (2007).

214. Zahner, M. R., Li, D.-P., Chen, S.-R. & Pan, H.-L. Cardiac vanilloid receptor 1-expressing afferent nerves and their role in the cardiogenic sympathetic reflex in rats. *J. Physiol.* **551**, 515–523 (2003).
215. Hong, J. *et al.* Identification of Cardiac Expression Pattern of Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) Receptor using a Transgenic Reporter Mouse Model. *Neurosci. Lett.* **737**, 135320 (2020).
216. Gao, F. *et al.* TRPV1 Activation Attenuates High-Salt Diet-Induced Cardiac Hypertrophy and Fibrosis through PPAR- δ Upregulation. *PPAR Res.* **2014**, 1–12 (2014).
217. Bolli, R. & Abdel-Latif, A. No Pain, No Gain: The Useful Function of Angina. *Circulation* **112**, 3541–3543 (2005).
218. Wang, L. & Wang, D. H. TRPV1 Gene Knockout Impairs Postischemic Recovery in Isolated Perfused Heart in Mice. *Circulation* **112**, 3617–3623 (2005).
219. Frangogiannis, N. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **53**, 31–47 (2002).
220. Huang, W., Rubinstein, J., Prieto, A. R., Thang, L. V. & Wang, D. H. Transient Receptor Potential Vanilloid Gene Deletion Exacerbates Inflammation and Atypical Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction. *Hypertension* **53**, 243–250 (2009).
221. Lei, J. *et al.* Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 Inhibits Inflammation and Apoptosis via the Release of Calcitonin Gene-Related Peptide in the Heart after Myocardial Infarction. *Cardiology* **134**, 436–443 (2016).
222. Zhong, B. & Wang, D. H. TRPV1 gene knockout impairs preconditioning protection against myocardial injury in isolated perfused hearts in mice. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **293**, H1791–H1798 (2007).
223. Randhawa, P. K. & Jaggi, A. S. Exploring the putative role of TRPV₁-dependent CGRP release in remote hind preconditioning-induced cardioprotection. *Cardiovasc. Ther.* **35**, e12276 (2017).
224. Hurt, C. M. *et al.* Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Regulates Mitochondrial Membrane Potential and Myocardial Reperfusion Injury. *J. Am. Heart Assoc.* **5**, (2016).
225. Wu, Y., Heymann, H. M. & Gross, E. R. Non-opioid analgesic use and concerns for impaired organ protection. *Br. J. Anaesth.* **120**, 403–405 (2018).
226. Franco-Cereceda, A., Lundberg, J. M., Saria, A., Schreiber, W. & Tritthart, H. A. Calcitonin gene-related peptide: release by capsaicin and prolongation of the action potential in the guinea-pig heart. *Acta Physiol. Scand.* **132**, 181–190 (1988).
227. Chen, M. *et al.* Mitogen-Activated Protein Kinase and Intracellular Polyamine Signaling Is Involved in TRPV1 Activation-Induced Cardiac Hypertrophy. *J. Am. Heart Assoc.* **5**, (2016).
228. Horton, J. S., Buckley, C. L. & Stokes, A. J. Successful TRPV1 antagonist treatment for cardiac hypertrophy and heart failure in mice. *Channels* **7**, 17–22 (2013).
229. Sanz-Salvador, L., Andrés-Borderia, A., Ferrer-Montiel, A. & Planells-Cases, R. Agonist- and Ca²⁺-dependent Desensitization of TRPV1 Channel Targets the Receptor to Lysosomes for Degradation. *J. Biol. Chem.* **287**, 19462–19471 (2012).
230. Wang, H.-J., Wang, W., Cornish, K. G., Rozanski, G. J. & Zucker, I. H. Cardiac Sympathetic Afferent Denervation Attenuates Cardiac Remodeling and Improves Cardiovascular Dysfunction in Rats With Heart Failure. *Hypertension* **64**, 745–755 (2014).
231. Wang, H.-J., Rozanski, G. J. & Zucker, I. H. Cardiac sympathetic afferent reflex control of cardiac function in normal and chronic heart failure states: Cardiac sympathetic afferent reflex control. *J. Physiol.* **595**, 2519–2534 (2017).
232. Aamodt, E. *The Neurobiology of C. elegans.* (2006).
233. Rothman, J. H. & Singson, A. *Caenorhabditis elegans: molecular genetics and*

development. (Elsevier/Academic, 2011).

234. The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **275**, 327–348 (1976).
235. Bargmann, C. I. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* Genome. *Science* **282**, 2028–2033 (1998).
236. Hall, D. H., Lints, R. & Altun, Z. Nematode Neurons: Anatomy and Anatomical Methods in *Caenorhabditis elegans*. in *International Review of Neurobiology* vol. 69 1–35 (Elsevier, 2005).
237. Jin, Y., Jorgensen, E., Hartweg, E. & Horvitz, H. R. The *Caenorhabditis elegans* Gene *unc-25* Encodes Glutamic Acid Decarboxylase and Is Required for Synaptic Transmission But Not Synaptic Development. *J. Neurosci.* **19**, 539–548 (1999).
238. Polli, J. R. *et al.* Drug-dependent behaviors and nicotinic acetylcholine receptor expressions in *Caenorhabditis elegans* following chronic nicotine exposure. *NeuroToxicology* **47**, 27–36 (2015).
239. Xiao, R. & Xu, X. Z. S. C. elegans TRP Channels. in *Transient Receptor Potential Channels* (ed. Islam, Md. S.) vol. 704 323–339 (Springer Netherlands, 2011).
240. Tobin, D. M. & Bargmann, C. I. Invertebrate nociception: Behaviors, neurons and molecules. *J. Neurobiol.* **61**, 161–174 (2004).
241. Colbert, H. A., Smith, T. L. & Bargmann, C. I. OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 8259–8269 (1997).
242. Colbert, H. A. & Bargmann, C. I. Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* **14**, 803–812 (1995).
243. Tobin, D. M. *et al.* Combinatorial Expression of TRPV Channel Proteins Defines Their Sensory Functions and Subcellular Localization in *C. elegans* Neurons. *Neuron* **35**, 307–318 (2002).
244. Jose, A. M., Bany, I. A., Chase, D. L. & Koelle, M. R. A Specific Subset of Transient Receptor Potential Vanilloid-Type Channel Subunits in *Caenorhabditis elegans* Endocrine Cells Function as Mixed Heteromers to Promote Neurotransmitter Release. *Genetics* **175**, 93–105 (2007).
245. Bargmann, C. Chemosensation in *C. elegans*. *WormBook* (2006) doi:10.1895/wormbook.1.123.1.
246. de Bono, M., Tobin, D. M., Davis, M. W., Avery, L. & Bargmann, C. I. Social feeding in *Caenorhabditis elegans* is induced by neurons that detect aversive stimuli. *Nature* **419**, 899–903 (2002).
247. Zhang, S., Sokolchik, I., Blanco, G. & Sze, J. Y. *Caenorhabditis elegans* TRPV ion channel regulates 5HT biosynthesis in chemosensory neurons. *Development* **131**, 1629–1638 (2004).
248. Lee, B. H. & Ashrafi, K. A TRPV Channel Modulates *C. elegans* Neurosecretion, Larval Starvation Survival, and Adult Lifespan. *PLoS Genet.* **4**, e1000213 (2008).
249. Hedgecock, E. M. & Russell, R. L. Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 4061–4065 (1975).
250. Mori, I. & Ohshima, Y. Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **376**, 344–348 (1995).
251. Kuhara, A. *et al.* Temperature Sensing by an Olfactory Neuron in a Circuit Controlling Behavior of *C. elegans*. *Science* **320**, 803–807 (2008).
252. Ohnishi, N., Kuhara, A., Nakamura, F., Okochi, Y. & Mori, I. Bidirectional regulation of thermotaxis by glutamate transmissions in *Caenorhabditis elegans*: Bidirectional regulation by glutamate signals. *EMBO J.* **30**, 1376–1388 (2011).

253. Beverly, M., Anbil, S. & Sengupta, P. Degeneracy and Neuromodulation among Thermosensory Neurons Contribute to Robust Thermosensory Behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **31**, 11718–11727 (2011).
254. Lithgow, G. J., White, T. M., Melov, S. & Johnson, T. E. Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 7540–7544 (1995).
255. Aprison, E. Z. & Ruvinsky, I. Balanced Trade-Offs between Alternative Strategies Shape the Response of *C. elegans* Reproduction to Chronic Heat Stress. *PLoS ONE* **9**, e105513 (2014).
256. Liu, S., Schulze, E. & Baumeister, R. Temperature- and Touch-Sensitive Neurons Couple CNG and TRPV Channel Activities to Control Heat Avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* **7**, e32360 (2012).
257. Leonelli, S., Nkambeu, B. & Beaudry, F. Impaired EAT-4 Vesicular Glutamate Transporter Leads to Defective Nocifensive Response of *Caenorhabditis elegans* to Noxious Heat. *Neurochem. Res.* **45**, 882–890 (2020).
258. Mellem, J. E., Brockie, P. J., Zheng, Y., Madsen, D. M. & Maricq, A. V. Decoding of Polymodal Sensory Stimuli by Postsynaptic Glutamate Receptors in *C. elegans*. *Neuron* **36**, 933–944 (2002).
259. Nkambeu, B., Salem, J. B., Leonelli, S., Marashi, F. A. & Beaudry, F. EGL-3 and EGL-21 are required to trigger nocifensive response of *Caenorhabditis elegans* to noxious heat. *Neuropeptides* **73**, 41–48 (2019).
260. Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D. E. TRPC1 and TRPC5 Form a Novel Cation Channel in Mammalian Brain. *Neuron* **29**, 645–655 (2001).
261. Hoenderop, J. G. J. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J.* **22**, 776–785 (2003).
262. Zhang, P. *et al.* The multimeric structure of polycystin-2 (TRPP2): structural-functional correlates of homo- and hetero-multimers with TRPC1. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1238–1251 (2009).
263. García-Martínez, C., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Merino, J. M. & Ferrer-Montiel, A. Identification of an Aspartic Residue in the P-loop of the Vanilloid Receptor That Modulates Pore Properties. *J. Biol. Chem.* **275**, 32552–32558 (2000).
264. Nkambeu, B., Salem, J. B. & Beaudry, F. Capsaicin and Its Analogues Impede Nocifensive Response of *Caenorhabditis elegans* to Noxious Heat. *Neurochem. Res.* **45**, 1851–1859 (2020).
265. Nkambeu, B., Ben Salem, J. & Beaudry, F. Eugenol and Other Vanilloids Hamper *Caenorhabditis elegans* Response to Noxious Heat. *Neurochem. Res.* **46**, 252–264 (2021).
266. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **314**, 1–340 (1986).
267. Mulcahy, B. *et al.* A Pipeline for Volume Electron Microscopy of the *Caenorhabditis elegans* Nervous System. *Front. Neural Circuits* **12**, 94 (2018).
268. Calahorra, F. & Izquierdo, P. G. The presynaptic machinery at the synapse of *C. elegans*. *Invert. Neurosci.* **18**, 4 (2018).
269. Gendrel, M., Atlas, E. G. & Hobert, O. A cellular and regulatory map of the GABAergic nervous system of *C. elegans*. *eLife* **5**, e17686 (2016).
270. Sato, H., Kunitomo, H., Fei, X., Hashimoto, K. & Iino, Y. Glutamate signaling from a single sensory neuron mediates experience-dependent bidirectional behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Rep.* **35**, 109177 (2021).
271. Glauser, D. A. *et al.* Heat Avoidance Is Regulated by Transient Receptor Potential (TRP) Channels and a Neuropeptide Signaling Pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*

188, 91–103 (2011).

272. Thacker, C. & Rose, A. M. A look at the *Caenorhabditis elegans* Kex2/Subtilisin-like proprotein convertase family. *BioEssays* **22**, 545–553 (2000).

273. Husson, S. J., Clynen, E., Baggerman, G., Janssen, T. & Schoofs, L. Defective processing of neuropeptide precursors in *Caenorhabditis elegans* lacking proprotein convertase 2 (KPC-2/EGL-3): mutant analysis by mass spectrometry: PC2/EGL-3 mutant analysis by MS. *J. Neurochem.* **98**, 1999–2012 (2006).

274. Kass, J., Jacob, T. C., Kim, P. & Kaplan, J. M. The EGL-3 Proprotein Convertase Regulates Mechanosensory Responses of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **21**, 9265–9272 (2001).

275. Jacob, T. C. & Kaplan, J. M. . The EGL-21 Carboxypeptidase E Facilitates Acetylcholine Release at *Caenorhabditis elegans* Neuromuscular Junctions. *J. Neurosci.* **23**, 2122–2130 (2003).

276. Husson, S. J., Mertens, I., Janssen, T., Lindemans, M. & Schoofs, L. Neuropeptidergic signaling in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Prog. Neurobiol.* **82**, 33–55 (2007).

277. El-Aneed, A., Cohen, A. & Banoub, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl. Spectrosc. Rev.* **44**, 210–230 (2009).

278. Ludovic Beuvier. Développement d'une méthode de séparation chromatographique couplée aux spectrométries de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et à source plasma à couplage inductif (ICP-MS) : application à l'analyse de spéciation des lanthanides. (Université Pierre et Marie Curie, 2015).

279. Savaryn, J. P., Toby, T. K. & Kelleher, N. L. A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics. *PROTEOMICS* **16**, 2435–2443 (2016).

280. Sajic, T., Liu, Y. & Aebersold, R. Using data-independent, high-resolution mass spectrometry in protein biomarker research: Perspectives and clinical applications. *PROTEOMICS - Clin. Appl.* **9**, 307–321 (2015).

281. Bateman, N. W. *et al.* Maximizing Peptide Identification Events in Proteomic Workflows Using Data-Dependent Acquisition (DDA). *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 329–338 (2014).

282. Zhu, W., Smith, J. W. & Huang, C.-M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 840518 (2010).

283. Gillet, L. C. *et al.* Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, O111.016717 (2012).

284. Bruderer, R. *et al.* New targeted approaches for the quantification of data-independent acquisition mass spectrometry. *PROTEOMICS* **17**, 1700021 (2017).

285. Smith, R. D. Mass Spectrometry in Biomarker Applications: From Untargeted Discovery to Targeted Verification, and Implications for Platform Convergence and Clinical Application. *Clin. Chem.* **58**, 528–530 (2012).

286. Lange, V., Picotti, P., Domon, B. & Aebersold, R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **4**, 222 (2008).

287. Peterson, A. C., Russell, J. D., Bailey, D. J., Westphall, M. S. & Coon, J. J. Parallel Reaction Monitoring for High Resolution and High Mass Accuracy Quantitative, Targeted Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, 1475–1488 (2012).

288. Gregorich, Z. R., Chang, Y.-H. & Ge, Y. Proteomics in heart failure: top-down or bottom-up? *Pflug. Arch. - Eur. J. Physiol.* **466**, 1199–1209 (2014).

289. The UniProt Consortium. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **40**, D71–D75 (2012).

290. Flicek, P. *et al.* Ensembl 2012. *Nucleic Acids Res.* **40**, D84–D90 (2012).
291. Ashburner, M. *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* **25**, 25–29 (2000).
292. Yon Rhee, S., Wood, V., Dolinski, K. & Draghici, S. Use and misuse of the gene ontology annotations. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 509–515 (2008).
293. Malik, R., Dulla, K., Nigg, E. A. & Körner, R. From proteome lists to biological impact-tools and strategies for the analysis of large MS data sets. *PROTEOMICS* **10**, 1270–1283 (2010).
294. Croft, D. *et al.* Reactome: a database of reactions, pathways and biological processes. *Nucleic Acids Res.* **39**, D691–D697 (2011).
295. Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M. & Tanabe, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* **40**, D109–D114 (2012).
296. Zhou, Y. *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat. Commun.* **10**, 1523 (2019).
297. Franceschini, A. *et al.* STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* **41**, D808–D815 (2012).
298. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504 (2003).
299. Mousavian, Z., Khodabandeh, M., Sharifi-Zarchi, A., Nadafian, A. & Mahmoudi, A. StrongestPath: a Cytoscape application for protein–protein interaction analysis. *BMC Bioinformatics* **22**, 352 (2021).
300. Arif, M. *et al.* Integrative transcriptomic analysis of tissue-specific metabolic crosstalk after myocardial infarction. *eLife* **10**, e66921 (2021).
301. Ichijo, Y. *et al.* Impaired Frontal Brain Activity in Patients With Heart Failure Assessed by Near-Infrared Spectroscopy. *J. Am. Heart Assoc.* **9**, e014564 (2020).
302. Woo, M. A., Macey, P. M., Fonarow, G. C., Hamilton, M. A. & Harper, R. M. Regional brain gray matter loss in heart failure. *J. Appl. Physiol.* **95**, 677–684 (2003).
303. Pandya, M., Altinay, M., Malone, D. A. & Anand, A. Where in the Brain Is Depression? *Curr. Psychiatry Rep.* **14**, 634–642 (2012).
304. Liu, W. *et al.* The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plast.* **2017**, 1–11 (2017).
305. Peymen, K., Watteyne, J., Frooninckx, L., Schoofs, L. & Beets, I. The FMRFamide-Like Peptide Family in Nematodes. *Front. Endocrinol.* **5**, (2014).
306. Lutfy, K. *et al.* Prohormone convertase 2 (PC2) null mice have increased mu opioid receptor levels accompanied by altered morphine-induced antinociception, tolerance and dependence. *Neuroscience* **329**, 318–325 (2016).
307. Cao, Y. Q. *et al.* Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* **392**, 390–394 (1998).
308. Berman, Y., Mzhavia, N., Polonskaia, A. & Devi, L. A. Impaired Prohormone Convertases in Cpe fat/Cpe fat Mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 1466–1473 (2001).
309. Budnik, V. & Salinas, P. C. Wnt signaling during synaptic development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **21**, 151–159 (2011).
310. Yoshie, K. *et al.* Cardiac vanilloid receptor-1 afferent depletion enhances stellate ganglion neuronal activity and efferent sympathetic response to cardiac stress. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **314**, H954–H966 (2018).
311. Rustad, J. K., Stern, T. A., Hebert, K. A. & Musselman, D. L. Diagnosis and Treatment of Depression in Patients With Congestive Heart Failure: A Review of the Literature. *Prim. Care Companion CNS Disord.* (2013) doi:10.4088/PCC.13r01511.
312. Celano, C. M., Villegas, A. C., Albanese, A. M., Gaggin, H. K. & Huffman, J. C.

- Depression and Anxiety in Heart Failure: A Review. *Harv. Rev. Psychiatry* **26**, 175–184 (2018).
313. Kingma, J. G., Simard, D. & Rouleau, J. R. Influence of cardiac nerve status on cardiovascular regulation and cardioprotection. *World J. Cardiol.* **9**, 508 (2017).
314. Jubair, S. *et al.* Substance P induces cardioprotection in ischemia-reperfusion via activation of AKT. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **309**, H676–H684 (2015).
315. Sim, D. S. *et al.* Cardioprotective effect of substance P in a porcine model of acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* **271**, 228–232 (2018).
316. Duggan, A. W. Chapter 12 Release of neuropeptides in the spinal cord. in *Progress in Brain Research* vol. 104 197–223 (Elsevier, 1995).
317. Mascarenhas, D. C., Gomes, K. S. & Nunes-de-Souza, R. L. Anxiogenic-like effect induced by TRPV1 receptor activation within the dorsal periaqueductal gray matter in mice. *Behav. Brain Res.* **250**, 308–315 (2013).
318. North, B. J. & Sinclair, D. A. The Intersection Between Aging and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **110**, 1097–1108 (2012).
319. Moore, E. E. & Jefferson, A. L. Impact of Cardiovascular Hemodynamics on Cognitive Aging. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **41**, 1255–1264 (2021).
320. Izzo, C. *et al.* The Impact of Aging on Cardio and Cerebrovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 481 (2018).
321. Cermakova, P. *et al.* Heart failure and Alzheimer's disease. *J. Intern. Med.* **277**, 406–425 (2015).
322. Alosco, M. L. & Hayes, S. M. Structural brain alterations in heart failure: a review of the literature and implications for risk of Alzheimer's disease. *Heart Fail. Rev.* **20**, 561–571 (2015).
323. Mielcarek, M. *et al.* Dysfunction of the CNS-Heart Axis in Mouse Models of Huntington's Disease. *PLoS Genet.* **10**, e1004550 (2014).
324. Navratilova, E. & Porreca, F. Reward and motivation in pain and pain relief. *Nat. Neurosci.* **17**, 1304–1312 (2014).
325. Shin, L. M. & Liberzon, I. The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. *Neuropsychopharmacology* **35**, 169–191 (2010).
326. Cechetto, D. F. Cortical control of the autonomic nervous system: Cortical autonomic control. *Exp. Physiol.* **99**, 326–331 (2014).
327. Ter Horst, G. J., Hautvast, R. W. M., Jongste, M. J. L. & Korf, J. Neuroanatomy of Cardiac Activity-regulating Circuitry: A Transneuronal Retrograde Viral Labelling Study in the Rat. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 2029–2041 (1996).
328. Van Eden, C. G. & Buijs, R. M. Functional neuroanatomy of the prefrontal cortex: autonomic interactions. in *Progress in Brain Research* vol. 126 49–62 (Elsevier, 2000).
329. Segarra, A. B. *et al.* Asymmetrical effect of captopril on the angiotensinase activity in frontal cortex and plasma of the spontaneously hypertensive rats: Expanding the model of neuroendocrine integration. *Behav. Brain Res.* **230**, 423–427 (2012).
330. Tsuda, T. *et al.* Corticotropin releasing hormone receptor 2 exacerbates chronic cardiac dysfunction. *J. Exp. Med.* **214**, 1877–1888 (2017).
331. Hilfiker-Kleiner, D., Landmesser, U. & Drexler, H. Molecular Mechanisms in Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **48**, A56–A66 (2006).
332. Saucerman, J. J. & McCULLOCH, A. D. Cardiac beta-Adrenergic Signaling: From Subcellular Microdomains to Heart Failure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1080**, 348–361 (2006).
333. Díaz, H. S., Toledo, C., Andrade, D. C., Marcus, N. J. & Del Rio, R. Neuroinflammation in heart failure: new insights for an old disease. *J. Physiol.* **598**, 33–59 (2020).
334. Guggilam, A. *et al.* Cytokine blockade attenuates sympathoexcitation in heart failure: Cross-talk between nNOS, AT-1R and cytokines in the hypothalamic paraventricular nucleus.

Eur. J. Heart Fail. **10**, 625–634 (2008).

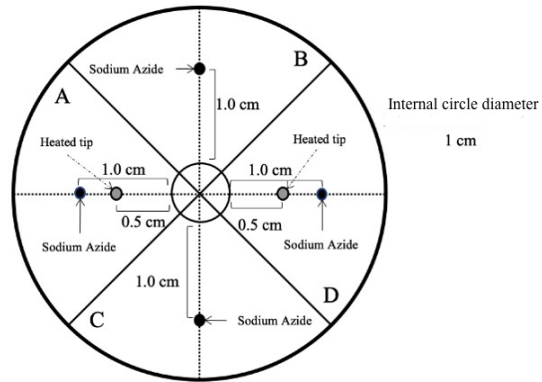
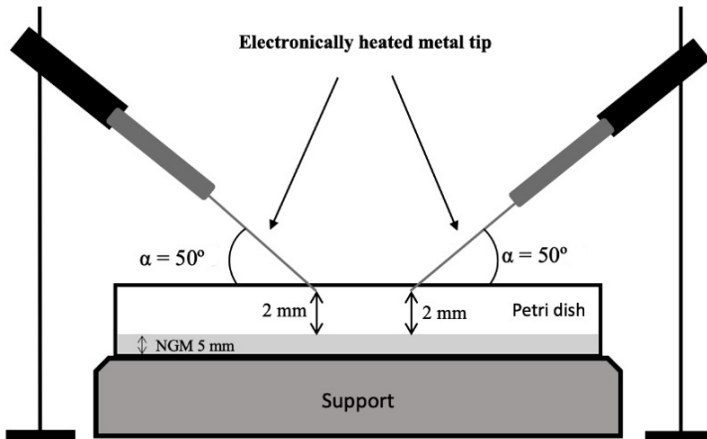
335. Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W. & Kelley, K. W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 46–56 (2008).
336. Okerlund, N. D. & Cheyette, B. N. R. Synaptic Wnt signaling—a contributor to major psychiatric disorders? *J. Neurodev. Disord.* **3**, 162–174 (2011).
337. Klassen, M. P. & Shen, K. Wnt Signaling Positions Neuromuscular Connectivity by Inhibiting Synapse Formation in *C. elegans*. *Cell* **130**, 704–716 (2007).
338. Sani, G. *et al.* The Wnt Pathway in Mood Disorders. *Curr. Neuropharmacol.* **10**, 239–253 (2012).
339. Hussaini, S. M. Q. *et al.* Wnt signaling in neuropsychiatric disorders: Ties with adult hippocampal neurogenesis and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **47**, 369–383 (2014).
340. Foulquier, S. *et al.* WNT Signaling in Cardiac and Vascular Disease. *Pharmacol. Rev.* **70**, 68–141 (2018).
341. Sapio, M. R. *et al.* Pain control through selective chemo-axotomy of centrally projecting TRPV1+ sensory neurons. *J. Clin. Invest.* **128**, 1657–1670 (2018).
342. Jeffry, J. A. *et al.* Selective Targeting of TRPV1 Expressing Sensory Nerve Terminals in the Spinal Cord for Long Lasting Analgesia. *PLoS ONE* **4**, e7021 (2009).
343. Rosano, G. M., Department of Medical Sciences, IRCCS San Raffaele Pisana, Rome, Italy, Vitale, C., & Department of Medical Sciences, IRCCS San Raffaele Pisana, Rome, Italy. Metabolic Modulation of Cardiac Metabolism in Heart Failure. *Card. Fail. Rev.* **4**, 99 (2018).
344. Zuurbier, C. J. *et al.* Cardiac metabolism as a driver and therapeutic target of myocardial infarction. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 5937–5954 (2020).
345. Lopaschuk, G. D., Karwi, Q. G., Tian, R., Wende, A. R. & Abel, E. D. Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure. *Circ. Res.* **128**, 1487–1513 (2021).
346. Moore, A. S. & Holzbaur, E. L. Mitochondrial-cytoskeletal interactions: dynamic associations that facilitate network function and remodeling. *Curr. Opin. Physiol.* **3**, 94–100 (2018).
347. Finck, B. N. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J. Clin. Invest.* **116**, 615–622 (2006).
348. Brown, D. Resiniferatoxin: The Evolution of the “Molecular Scalpel” for Chronic Pain Relief. *Pharmaceuticals* **9**, 47 (2016).
349. Mocking, R. J. T. *et al.* Metabolic features of recurrent major depressive disorder in remission, and the risk of future recurrence. *Transl. Psychiatry* **11**, 37 (2021).
350. Steffens, D. C. *et al.* Metabolomic Differences in Heart Failure Patients With and Without Major Depression. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **23**, 138–146 (2010).
351. Lam, C. S. P. *et al.* Sex differences in heart failure. *Eur. Heart J.* **40**, 3859–3868c (2019).
352. Ueda, K. *et al.* Sex Differences and Regulatory Actions of Estrogen in Cardiovascular System. *Front. Physiol.* **12**, 738218 (2021).

Annexes

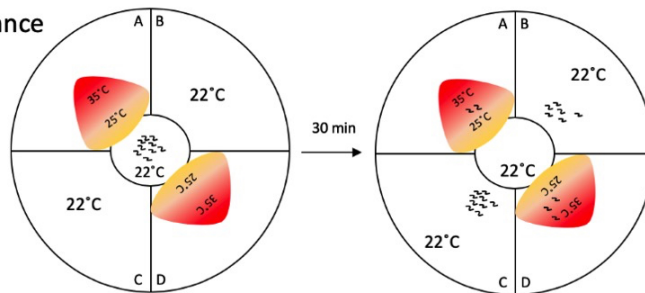
Article 2 : Resiniferatoxin hampers the nocifensive response of *Caenorhabditis elegans* to noxious heat, and pathway analysis revealed that the Wnt signaling pathway is involved

Supplementary Data

Figure S1. A schematic of the four quadrants assay adapted from Margie *et al.* (2013). For head avoidance assay, plates were divided into quadrants two test (A and D) and two controls (B and C). Sodium azide was added to all four quadrants to paralyze nematodes. *C. elegans* were added at the center of the plate (typically, n = 100 to 1,000) and after 30 minutes, animals were counted on each quadrant. Only animals outside the inner circle were scored. The calculation of thermal avoidance index was performed as described.



Thermal avoidance



$$\text{Thermal avoidance index} = \frac{(A+D) - (B+C)}{(A+B+C+D)}$$

$$\% \text{ Avoidance} = \frac{(B+C)}{(A+B+C+D)} * 100$$

Table S1: Data of tested strains and experimental groups described in Figure 1.

Experimental group	Number of petri dishes	Total number of nematodes counted	Mean %	SD
N2(WT)	12	1,241	50.87	4.02
+ RTX 0.1 μ M	6	994	51.31	2.92
+ RTX 1 μ M	8	1,795	48.99	2.87
+ RTX 5 μ M	8	1,438	48.54	4.82

Table S2: Data of tested strains and experimental groups described in Figure 2.

Experimental group	Number of petri dishes	Total number of nematodes counted	Mean %	SD
N2(WT)	12	4,566	77.29	5.03
+ Cap 25 μ M	12	2,982	52.75	8.32
+ RTX 0.1 μ M	12	6,326	61.75	7.87
+ RTX 1 μ M	12	3,772	54.50	6.30
+ RTX 5 μ M	12	2,980	55.28	4.67
+ RTX 0.1 μ M- 6h latency	12	9,602	72.74	5.56
+ RTX 1 μ M- 6h latency	12	5,879	76.02	7.07
+ RTX 5 μ M- 6h latency	12	4,112	73.01	7.14

Table S3: Data of tested strains and experimental groups described in Figure 3

Experimental group	Number of petri dishes	Total number of nematodes counted	Mean % avoidance	SD
N2(WT)	12	4,566	77.29	5.03
N2(WT) + RTX (1 μ M)	12	3,772	54.50	6.30
<i>osm-9(yz6)</i>	12	8,211	62.38	4.78
<i>osm-9(yz6)</i> + RTX (1 μ M)	12	9,256	46.85	3.72
<i>ocr-2(yz5)</i>	12	8,723	65.21	5.69
<i>ocr-2(yz5)</i> + RTX (1 μ M)	12	11,291	50.80	1.78
<i>ocr-1(ak46)</i>	12	4,587	68.68	9.24
<i>ocr-1(ak46)</i> + RTX (1 μ M)	12	3,657	58.25	7.57
<i>ocr-3(ok1559)</i>	12	3,984	69.85	5.54
<i>ocr-3(1559)</i> + RTX (1 μ M)	12	4,392	65.36	3.82
<i>ocr-4(vs137)</i>	12	5,862	71.00	7.62
<i>ocr-4(vs137)</i> + RTX (1 μ M)	12	5,219	61.76	6.04

Table S5. Pathway enrichment analysis: List of significantly enriched pathways

Pathway	p-value*	Coverage (%)	Associated Proteins
Citrate cycle (TCA cycle)	3.04E-04	21.21	cts-1, idh-1, idh-2, idhb-1, pck-1, pck-2, pdhb-1
Oxidative phosphorylation	1.36E-11	21.24	C18E9.4, F29C4.2, F37C12.3, F45H10.2, R04F11.2, R53.4, W09C5.8, Y71H2AM.4, Y71H2AM.5, asb-1, atp-2, cco-1, cco-2, cox-17, nduf-5, nduf-6, nduf-7, nuo-2, nuo-3, nuo-4, vha-11, vha-12, vha-14, vha-19
Respiratory electron transport ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.	2.48E-04	19.05	C18E9.4, R04F11.2, R53.4, Y71H2AM.4, atp-2, nduf-7, nuo-2, nuo-4
Beta-catenin independent WNT signaling	9.70E-05	14.81	cmd-1, goa-1, gpc-2, pas-1, pat-10, pbs-3, rpn-10, rpn-11, rpn-8, rpt-3, rpt-4, tnc-2
Ion homeostasis	1.61E-04	23.33	cmd-1, csq-1, pat-10, sca-1, tnc-2, tni-3, tni-4
Pyruvate metabolism and Citric Acid (TCA) cycle	1.74E-04	20.00	Y38F1A.6, Y45G12B.3, cts-1, idh-2, idhb-1, men-1, ncam-1, pdhb-1
Metabolism of RNA	1.31E-04	8.47	C12D8.1, R02D3.3, W01D2.1, Y45F10D.7, Y47A7.1, cgh-1, cpf-2, dnj-30, hrp-2, lsm-7, lsm-8, mog-2, nol-5, npp-16, npp-20, nxt-1, pabp-2, repo-1, rnp-3, rpl-17, rpl-22, rpl-30, rpl-32, rpl-9, rps-28, rsp-7, rsp-8, snr-1, snr-3, snr-4
Cellular response to chemical stress	1.02E-04	17.24	ctl-3, gpx-5, pas-1, pbs-3, prdx-2, rpn-10, rpn-11, rpn-8, rpt-3, rpt-4
Butanoate metabolism	7.68E-05	31.58	C05C10.3, Y45G12B.3, ech-1.1, ech-7, hacd-1, kat-1
Phagosome	7.05E-06	19.05	act-4, act-5, ben-1, emo-1, mec-12, tbb-1, tbb-2, tbb-4, vha-11, vha-12, vha-14, vha-19
The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport	1.42E-07	19.51	C18E9.4, R04F11.2, R53.4, Y38F1A.6, Y45G12B.3, Y71H2AM.4, atp-2, cts-1, idh-2, idhb-1, men-1, ncam-1, nduf-7, nuo-2, nuo-4, pdhb-1
Metabolism	4.54E-05	6.49	C05C10.3, C06A6.4, C07D8.6, C18E9.4, F09E5.3, R04F11.2, R05F9.6, R53.4, T03F6.3, T09B4.8, Y38F1A.6, Y39E4A.3, Y45G12B.3, Y71H2AM.4, ZC395.10, acbp-3, ace-3, acs-19, acs-20, alh-13, arf-3, atp-2, cah-4, cbs-1, cmd-1, cts-1, daf-22, dao-3, dhfr-1, dyn-1, gln-3, glrx-5, gpc-2, gpd-1, gpdh-2, gpx-5, guk-1, idh-1, idh-2,

			idhb-1, kat-1, lbp-5, mec-1, men-1, ncam-1, nduf-7, nuo-2, nuo-4, oatr-1, pas-1, pat-10, pbs-3, pccb-1, pck-1, pdhb-1, pes-9, pgk-1, pyr-1, ran-1, rpia-1, rpn-10, rpn-11, rpn-8, rpt-3, rpt-4, tal-1, tnc-2, tyr-4
Proteasome	2.48E-04	19.05	dss-1, pas-1, pbs-3, rpn-10, rpn-11, rpn-8, rpt-3, rpt-4
UCH proteinases	2.48E-04	19.05	pas-1, pbs-3, rpn-10, rpn-11, rpn-8, rpt-3, rpt-4, ubh-1

* p-value was calculated using a right-sided hypergeometric distribution with multiple testing correction (Benjamini & Hochberg (BH) method).

Table S6 All differentially expressed proteins (DEPs) with p-value ≤ 0.01 and used for GO and pathway analyses.

Ensembl Gene ID Gene encoding protein	log ₂ ratio
WBGene00000037	5.16
WBGene00013602	4.17
WBGene00001248	3.92
WBGene00001411	3.49
WBGene00019641	3.45
WBGene00022745	3.4
WBGene00006733	3.38
WBGene00001537	3
WBGene00044737	2.91
WBGene00014016	2.91
WBGene00001732	2.83
WBGene00009041	2.83
WBGene00012165	2.8
WBGene00008424	2.76
WBGene00021322	2.71
WBGene00006776	2.62
WBGene00015509	2.54
WBGene00009218	2.49
WBGene00000474	2.49
WBGene00019601	2.48
WBGene00007624	2.47
WBGene00043057	2.46
WBGene00020245	2.45
WBGene00019558	2.45
WBGene00018385	2.4
WBGene00008683	2.37
WBGene00000236	2.32
WBGene00009854	2.32
WBGene00021883	2.26
WBGene00022127	2.22
WBGene00001214	2.21
WBGene00002249	2.2
WBGene00020651	2.17
WBGene00013869	2.13
WBGene00016977	2.12
WBGene00012004	2.12
WBGene00004259	2.07

WBGene00022276	2.02
WBGene00009542	2.02
WBGene00007633	2.02
WBGene00020832	1.97
WBGene00015510	1.95
WBGene00021922	1.91
WBGene00007010	1.91
WBGene00006937	1.85
WBGene00018975	1.81
WBGene00003802	1.81
WBGene00001744	1.8
WBGene00007784	1.79
WBGene00006047	1.79
WBGene00012701	1.77
WBGene00004704	1.76
WBGene00017484	1.74
WBGene00011096	1.7
WBGene00001548	1.69
WBGene00009778	1.68
WBGene00045483	1.68
WBGene00023498	1.66
WBGene00000371	1.64
WBGene00001329	1.62
WBGene00019450	1.62
WBGene00014178	1.6
WBGene00016419	1.59
WBGene00011571	1.58
WBGene00011977	1.57
WBGene00011487	1.57
WBGene00011936	1.54
WBGene00002060	1.54
WBGene00003523	1.53
WBGene00001061	1.52
WBGene00006997	1.51
WBGene00004771	1.49
WBGene00013308	1.48
WBGene00012179	1.47
WBGene00007458	1.46
WBGene00006725	1.46
WBGene00016900	1.43
WBGene00019572	1.43

WBGene00022492	1.41
WBGene00013866	1.41
WBGene00009031	1.4
WBGene00008603	1.4
WBGene00001048	1.37
WBGene00019821	1.36
WBGene00000376	1.34
WBGene00012326	1.33
WBGene00022615	1.32
WBGene00011308	1.32
WBGene00018240	1.31
WBGene00000931	1.31
WBGene00020894	1.31
WBGene00001538	1.3
WBGene00001113	1.3
WBGene00004444	1.3
WBGene00020732	1.29
WBGene00000402	1.28
WBGene00001682	1.28
WBGene00000370	1.27
WBGene00011880	1.26
WBGene00020242	1.26
WBGene00004386	1.25
WBGene00008210	1.24
WBGene00010664	1.24
WBGene00004499	1.24
WBGene00011156	1.23
WBGene00001150	1.22
WBGene00007154	1.22
WBGene00017374	1.2
WBGene00020097	1.2
WBGene00017482	1.2
WBGene00004466	1.2
WBGene00013127	1.2
WBGene00011730	1.19
WBGene00009189	1.18
WBGene00013077	1.18
WBGene00010879	1.18
WBGene00013393	1.18
WBGene00017609	1.17
WBGene00004217	1.17

WBGene00008975	1.17
WBGene00019042	1.17
WBGene00002001	1.15
WBGene00006994	1.14
WBGene00019719	1.14
WBGene00007627	1.13
WBGene00014262	1.13
WBGene00018237	1.12
WBGene00018346	1.12
WBGene00018742	1.11
WBGene00000465	1.11
WBGene00004889	1.11
WBGene00020379	1.11
WBGene00004138	1.1
WBGene00012557	1.1
WBGene00020915	1.1
WBGene00219313	1.1
WBGene00014252	1.09
WBGene00010357	1.09
WBGene00021751	1.09
WBGene00021024	1.09
WBGene00013063	1.08
WBGene00013064	1.08
WBGene00004701	1.08
WBGene00011536	1.08
WBGene00013867	1.08
WBGene00010631	1.07
WBGene00018159	1.07
WBGene00022170	1.06
WBGene00006038	1.05
WBGene00006040	1.05
WBGene00004497	1.04
WBGene00004446	1.03
WBGene00016658	1.02
WBGene00000928	1.02
WBGene00019261	1.02
WBGene00007534	1.01
WBGene00001604	1
WBGene00013683	1
WBGene00003390	-1
WBGene00003806	-1

WBGene00018460	-1.01
WBGene00018461	-1.01
WBGene00018151	-1.02
WBGene00010768	-1.02
WBGene00003082	-1.02
WBGene00006826	-1.03
WBGene00000534	-1.03
WBGene00003916	-1.03
WBGene00020185	-1.03
WBGene00004434	-1.03
WBGene00019890	-1.03
WBGene00011292	-1.04
WBGene00007071	-1.04
WBGene00016050	-1.04
WBGene00000206	-1.05
WBGene00001000	-1.05
WBGene00006730	-1.05
WBGene00003762	-1.05
WBGene00008452	-1.06
WBGene00000067	-1.08
WBGene00017719	-1.08
WBGene00000710	-1.08
WBGene00002183	-1.08
WBGene00007110	-1.09
WBGene00017926	-1.09
WBGene00016316	-1.09
WBGene00004503	-1.1
WBGene00006586	-1.1
WBGene00011938	-1.1
WBGene00007420	-1.1
WBGene00012999	-1.1
WBGene00019962	-1.1
WBGene00011637	-1.11
WBGene00018610	-1.11
WBGene00009394	-1.12
WBGene00008591	-1.12
WBGene00021952	-1.12
WBGene00018701	-1.12
WBGene00018145	-1.12
WBGene00015514	-1.12
WBGene00009818	-1.12

WBGene00006921	-1.13
WBGene00022182	-1.13
WBGene00005000	-1.13
WBGene00004736	-1.13
WBGene00012713	-1.13
WBGene00004491	-1.14
WBGene00004302	-1.14
WBGene00020369	-1.14
WBGene00016333	-1.14
WBGene00017657	-1.14
WBGene00009092	-1.14
WBGene00021839	-1.15
WBGene00011018	-1.15
WBGene00004467	-1.15
WBGene00003234	-1.16
WBGene00021613	-1.16
WBGene00018271	-1.17
WBGene00004420	-1.17
WBGene00010130	-1.17
WBGene00009514	-1.17
WBGene00020781	-1.17
WBGene00003989	-1.18
WBGene00000292	-1.18
WBGene00010094	-1.18
WBGene00022173	-1.19
WBGene00000552	-1.19
WBGene00002254	-1.19
WBGene00000833	-1.2
WBGene00004410	-1.2
WBGene00020931	-1.2
WBGene00012887	-1.21
WBGene00011273	-1.22
WBGene00000973	-1.23
WBGene00007942	-1.23
WBGene00001088	-1.24
WBGene00016524	-1.24
WBGene00009739	-1.24
WBGene00004705	-1.25
WBGene00003994	-1.25
WBGene00013220	-1.25
WBGene00008422	-1.25

WBGene00010303	-1.26
WBGene00005007	-1.26
WBGene00202498	-1.27
WBGene00000215	-1.27
WBGene00022497	-1.27
WBGene00021826	-1.28
WBGene00002272	-1.28
WBGene00018811	-1.28
WBGene00008505	-1.29
WBGene00000786	-1.29
WBGene00002008	-1.3
WBGene00009362	-1.3
WBGene00000479	-1.3
WBGene00008335	-1.31
WBGene00015192	-1.31
WBGene00020391	-1.32
WBGene00000229	-1.32
WBGene00006920	-1.33
WBGene00011232	-1.33
WBGene00010673	-1.34
WBGene00017283	-1.36
WBGene00000293	-1.36
WBGene00007684	-1.37
WBGene00022230	-1.37
WBGene00000991	-1.38
WBGene00001748	-1.39
WBGene00006486	-1.39
WBGene00006434	-1.39
WBGene00021636	-1.39
WBGene00015565	-1.4
WBGene00021043	-1.4
WBGene00001694	-1.41
WBGene00012185	-1.41
WBGene00019205	-1.42
WBGene00004464	-1.42
WBGene00009367	-1.42
WBGene00012376	-1.42
WBGene00004917	-1.43
WBGene00003836	-1.43
WBGene00010605	-1.44
WBGene00008183	-1.44

WBGene00012375	-1.44
WBGene00011155	-1.45
WBGene00011399	-1.45
WBGene00000929	-1.47
WBGene00003081	-1.47
WBGene00017075	-1.47
WBGene00019178	-1.47
WBGene00015752	-1.48
WBGene00010117	-1.48
WBGene00000780	-1.48
WBGene00010041	-1.49
WBGene00001303	-1.49
WBGene00001030	-1.49
WBGene00012344	-1.49
WBGene00002257	-1.49
WBGene00018024	-1.5
WBGene00000248	-1.5
WBGene00021647	-1.5
WBGene00021934	-1.51
WBGene00003143	-1.51
WBGene00002273	-1.51
WBGene00002978	-1.52
WBGene00004504	-1.52
WBGene00010317	-1.54
WBGene00004429	-1.55
WBGene00015185	-1.55
WBGene00016435	-1.56
WBGene00000469	-1.56
WBGene00020833	-1.56
WBGene00010266	-1.56
WBGene00001784	-1.57
WBGene00000214	-1.58
WBGene00006824	-1.58
WBGene00004439	-1.59
WBGene00012608	-1.59
WBGene00017184	-1.6
WBGene00001500	-1.6
WBGene00000183	-1.61
WBGene00001498	-1.62
WBGene00009051	-1.62
WBGene00009454	-1.63

WBGene00009625	-1.64
WBGene00008378	-1.64
WBGene00009583	-1.64
WBGene00007993	-1.65
WBGene00001648	-1.66
WBGene00001501	-1.67
WBGene00008053	-1.68
WBGene00002000	-1.68
WBGene00007974	-1.69
WBGene00019783	-1.69
WBGene00000182	-1.7
WBGene00003922	-1.71
WBGene00010556	-1.71
WBGene00010778	-1.72
WBGene00000170	-1.72
WBGene00006889	-1.72
WBGene00012354	-1.75
WBGene00009987	-1.75
WBGene00002269	-1.76
WBGene00006721	-1.76
WBGene00012983	-1.77
WBGene00022499	-1.77
WBGene00003903	-1.78
WBGene00021564	-1.78
WBGene00003982	-1.78
WBGene00002065	-1.79
WBGene00004111	-1.79
WBGene00007969	-1.8
WBGene00022169	-1.81
WBGene00018218	-1.81
WBGene00019727	-1.82
WBGene00012964	-1.83
WBGene00006706	-1.83
WBGene00001683	-1.84
WBGene00011330	-1.86
WBGene00021204	-1.88
WBGene00004201	-1.88
WBGene00003904	-1.89
WBGene00019978	-1.89
WBGene00002244	-1.89
WBGene00006538	-1.9

WBGene00020339	-1.91
WBGene00007646	-1.91
WBGene00006460	-1.92
WBGene00015814	-1.92
WBGene00007653	-1.93
WBGene00007258	-1.93
WBGene00012553	-1.93
WBGene00010845	-1.93
WBGene00020192	-1.94
WBGene00020417	-1.95
WBGene00003175	-1.96
WBGene00020382	-1.97
WBGene00019401	-1.97
WBGene00014030	-1.97
WBGene00003949	-1.98
WBGene00000282	-1.98
WBGene00006565	-2
WBGene00008218	-2.02
WBGene00008607	-2.06
WBGene00013284	-2.08
WBGene00008334	-2.08
WBGene00003370	-2.09
WBGene00013029	-2.1
WBGene00007927	-2.12
WBGene00001130	-2.13
WBGene00009188	-2.14
WBGene00000066	-2.17
WBGene00019220	-2.18
WBGene00003230	-2.18
WBGene00013227	-2.19
WBGene00020588	-2.19
WBGene00000822	-2.21
WBGene00023450	-2.21
WBGene00012932	-2.22
WBGene00004914	-2.26
WBGene00003934	-2.27
WBGene00019179	-2.27
WBGene00017023	-2.28
WBGene00006537	-2.28
WBGene00020335	-2.3
WBGene00007516	-2.31

WBGene00020190	-2.32
WBGene00001005	-2.32
WBGene00006583	-2.32
WBGene00003968	-2.32
WBGene00001776	-2.33
WBGene00006536	-2.34
WBGene00014108	-2.35
WBGene00019682	-2.39
WBGene00000774	-2.41
WBGene00001037	-2.45
WBGene00010759	-2.46
WBGene00006585	-2.46
WBGene00009004	-2.47
WBGene00000435	-2.49
WBGene00011736	-2.49
WBGene00003522	-2.51
WBGene00016953	-2.53
WBGene00016422	-2.53
WBGene00019324	-2.6
WBGene00001233	-2.6
WBGene00013924	-2.61
WBGene00021888	-2.64
WBGene00022435	-2.64
WBGene00004387	-2.66
WBGene00001156	-2.68
WBGene00022267	-2.68
WBGene00004916	-2.68
WBGene00013639	-2.69
WBGene00021657	-2.74
WBGene00022599	-2.77
WBGene00020717	-2.8
WBGene00015413	-2.85
WBGene00004145	-2.9
WBGene00002064	-2.95
WBGene00011275	-3
WBGene00015101	-3.09
WBGene00009995	-3.19
WBGene00021465	-3.21
WBGene00008339	-3.23
WBGene00021286	-3.24
WBGene00011015	-3.28

WBGene00016594	-3.29
WBGene00004172	-3.3
WBGene00010796	-3.38
WBGene00018393	-3.38
WBGene00021158	-3.43
WBGene00020112	-3.48
WBGene00001854	-3.63
WBGene00004986	-3.67
WBGene00007330	-3.71
WBGene00021930	-4.11
WBGene00002149	-4.21
WBGene00006508	-4.41

Article 4 : Proteomics reveals long-term alterations in signaling and metabolic pathways following both myocardial infarction and chemically induced denervation

Supplementary Figures and Tables

Figure S1. Relative quantification of Tachykinin Precursor 1 (TAC1) protein in the spinal cord. As expected, TAC1 was transitionally and significantly upregulated following pericardial targeted injections of RTX. Pharmacological activation of TRPV1 triggers TAC1 expression, vesicle transport, maturation and exocytosis in the synaptic cleft. These results show that RTX treatment did activate the TRPV1 as desired, but a different phenotype was observed for our MI/RTX group. Combined Fold change ≥ 2 and $p \leq 0.01$ (**) was required to be considered statistically significant.

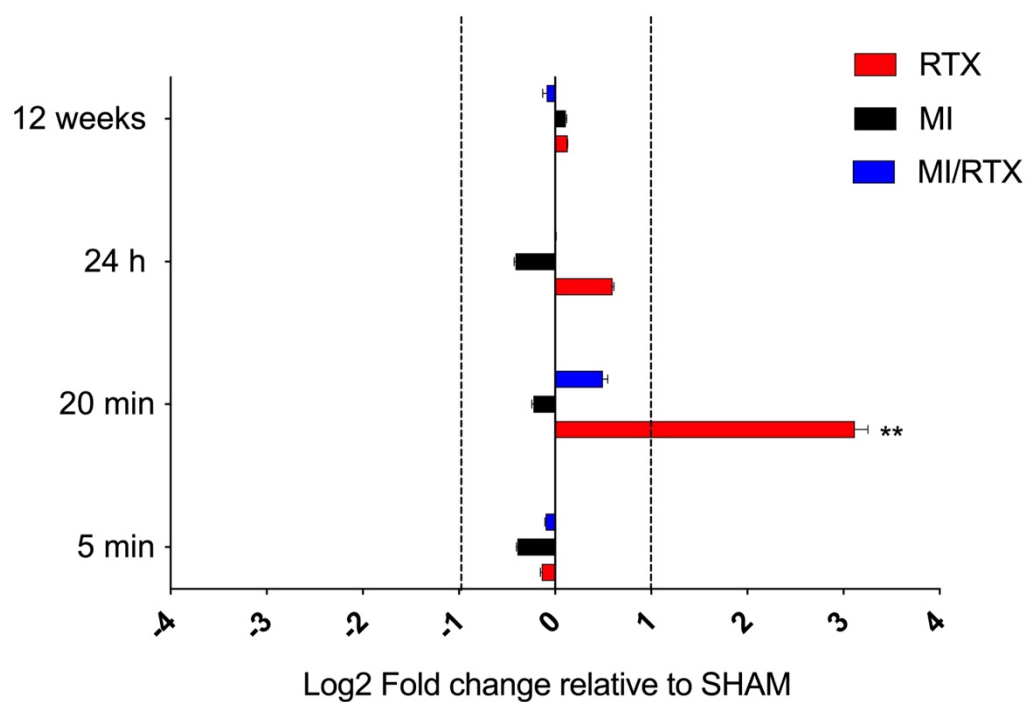


Figure S2. Gene ontology (GO) enriched terms. Analysis was performed with all DEPs (upregulated and downregulated). Detailed information relating to changes in the molecular functions (A) and biological processes (B).

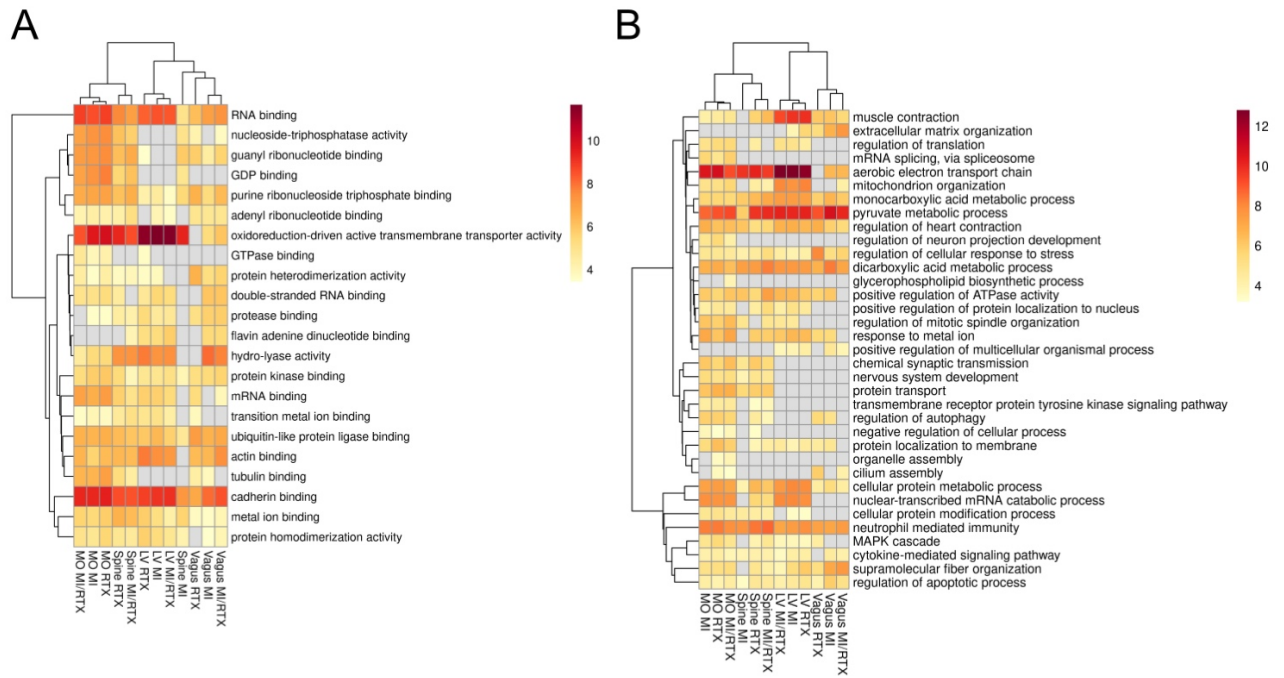


Table S1. k-cluster assignments in each treatment group for quantified proteins of the left ventricle (LV). Proteins identified in the Metabolism Reactome pathway (R-HSA-1430728) are highlighted in blue.

Gene names	Metabolism	MI	MI/RTX	RTX
ABCE1	N	k9	k13	
ABHD11	N	k9	k13	k8
ABLIM1	N	k9	k13	k6
ABTB1	N	k6	k24	k18
ACAA1	Y	k13	k24	k6
ACAA2	N	k13	k24	k6
ACAD10	Y	k13	k24	k6
ACAD8	Y	k13	k24	k6
ACAD9	Y	k13	k24	k18
ACADL	Y	k13	k24	k6
ACADM	Y	k13	k24	k6
ACADS	Y	k13	k24	k6
ACADSB	Y	k13	k24	k18
ACADVL	Y	k13	k24	k18
ACAT1	Y	k13	k24	k6
ACE	N	k9		k18
ACO1	N	k13	k24	k18
ACO2	Y	k13	k24	k6
ACOT13	Y	k13	k24	k18
ACOT2	Y	k13	k24	k6
ACOX1	Y	k13	k24	k6
ACPI	N		k6	k6
ACSL1	Y	k13	k24	k18
ACSS1	Y	k13	k24	k18
ACTA1	N	k13	k24	k6
ACTBL2	N	k13	k8	
ACTG1	N	k9	k24	k18
ACTG2	N	k13	k24	k6
ACTN1	N	k8		k6
ACTN2	N	k13	k24	k18
ACTN4	N	k8		k6
ACTR1A	N		k6	k6
ACTR3	N	k24		
ACYP1	N	k13	k24	k6

ACYP2	N	k9	k13	k6
ADD3	N	k13	k6	
ADH5	Y	k13	k24	k6
ADHFE1	Y	k13		k6
ADIPOQ	Y	k13	k24	k18
ADK	Y	k13	k24	k6
ADPRHL1	N	k13	k24	k18
ADRM1	N	k13	k9	k6
ADSL	Y	k13	k24	k6
ADSS1	N	k13	k13	k18
AFG3L2	N	k13	k13	k18
AFM	N	k8		
AHCY	Y	k13	k24	k18
AHSG	N	k8		
AIMP1	Y		k9	k9
AK1	Y	k9	k13	k6
AK2	Y	k13	k24	k6
AK3	N	k13	k24	k18
AK4	Y	k13	k24	k6
AKAP12	N	k9	k18	k18
AKR1B1	Y	k13	k24	k18
AKR1B15	Y		k24	k18
AKR7L	Y			k6
ALAD	Y	k13		k6
ALB	Y	k8	k6	k6
ALDH1A1	Y			k18
ALDH2	Y	k13	k24	k6
ALDH4A1	Y	k13	k24	k6
ALDH5A1	N	k13	k24	k6
ALDH6A1	Y	k13	k24	k6
ALDOA	Y	k13	k24	k6
ALDOB	Y	k13	k9	k6
ALYREF	N	k9	k9	k6
AMBP	N	k8	k6	k6
ANK2	N		k18	
ANK3	N	k13	k24	k6
ANKRD1	Y	k9	k8	k8
ANP32D	N	k9	k24	k6
ANXA1	N	k8	k8	k6
ANXA2P2	N	k9		k18
ANXA3	N	k8		k6
ANXA5	N	k9	k24	k18

ANXA6	N	k13	k24	k6
ANXA7	N	k9		k6
AP1B1	N	k13	k13	k6
APIP	Y			k6
APOA1	Y	k6		k6
APOA4	Y	k6	k6	k18
APOBEC2	N	k9	k24	k6
APOC1	N		k18	k18
APOE	Y			k6
APOH	N	k8	k6	k6
APOO	N	k13	k24	k6
APOOL	N	k13	k24	k6
ARF3	Y	k9	k24	k18
ARHGDI1	N	k9	k24	k18
ARL8B	N			k6
ARPC3	N	k13	k24	k18
ARPP19	N	k9	k9	k6
ART3	N		k6	k18
ASPH	N	k13	k24	k18
ASPN	N			k6
ASRGL1	Y	k8	k9	k6
ASXL3	N	k13	k24	k6
ATAD1	N	k13	k13	k6
ATAD3C	N	k9	k24	k6
ATOX1	N	k8		k6
ATP1A1	N	k13	k24	k6
ATP1A2	N	k13	k24	k6
ATP1B1	N	k13	k24	k6
ATP2A2	N	k13	k24	k18
ATP2A3	N	k13		k6
ATP5F1A	N	k13	k24	k6
ATP5F1B	N	k13	k24	k6
ATP5F1C	N	k13	k24	k6
ATP5F1D	N	k9	k13	k6
ATP5F1EP2	N			k6
ATP5IF1	N	k9	k13	k6
ATP5MC1	N	k13	k13	k18
ATP5ME	N	k13	k13	k6
ATP5MF	N	k13	k24	k6
ATP5MGL	N	k13	k24	k6
ATP5PD	N	k13	k24	k6
ATP5PF	N	k9	k9	k6

ATP5PO	N	k13	k24	k6
ATPAF1	N	k13	k24	k18
ATR	N		k13	
AUH	Y	k6	k6	k18
B2M	N	k8		k9
BAG3	N	k9	k13	k6
BANF1	N	k9	k8	
BCAM	N		k24	k18
BCAP31	N			k6
BCAT2	Y	k13	k24	k18
BCKDHA	Y	k13		k6
BCKDHB	Y	k13	k24	k6
BCKDK	Y	k13	k24	k6
BCL2L13	N	k13	k24	k6
BDH1	Y	k13	k24	k6
BGN	Y			k6
BLVRB	Y		k18	k18
BOLA1	N	k9	k13	k6
BOLA3	N		k13	
BPGM	Y	k8	k6	k6
BSG	Y	k13		k6
BTF3	N	k9	k24	k6
C12orf57	N	k8	k8	k6
C1QBP	N	k24	k24	k6
C3	N	k8	k6	k18
C4B	N	k6		
C5orf63	N	k24	k24	k18
C8orf82	N	k13	k13	k6
CA1	Y		k18	k18
CA2	Y	k8	k6	k6
CALM3	N	k13	k24	k18
CALR	N	k8		k18
CALU	N			k18
CAMK2D	N	k13	k24	k18
CAND2	N	k13		k6
CANX	N	k13	k24	k6
CAP1	N			k6
CAP2	N	k13	k24	k6
CAPG	N	k13	k24	k18
CAPN2	N	k9	k24	k6
CAPNS1	N		k6	k18
CAPRIN1	N	k9	k24	k18

CAPZA2	N	k13	k24	k18
CAPZB	N	k13	k24	k6
CARHSP1	N			k18
CASQ2	N	k13	k24	k18
CAST	N			k6
CAT	Y	k9	k24	k6
CAV1	Y	k13	k24	k6
CAV3	N	k13	k13	k6
CBR1	Y	k13	k24	k18
CBR4	N	k24	k24	k18
CCT2	N	k8		
CCT3	N	k13	k24	k6
CCT4	N	k6		
CCT7	N	k13	k24	k18
CCT8	N	k13	k8	k6
CD36	Y	k13	k24	k18
CD47	N			k8
CD81	N	k13	k24	k6
CDC37	N	k9	k24	k6
CDH13	N	k13	k24	k6
CDH2	N	k13	k24	k6
CDH4	N	k13	k13	k6
CDV3	N		k9	
CENPV	N	k13	k13	
CES1	Y	k13	k24	k18
CFB	N	k8		
CFD	N			k8
CFHR4	N	k8	k6	k6
CFI	N	k8		k6
CFL1	N	k8		k6
CFL2	N	k13	k24	k6
CHCHD2	N	k9	k13	k6
CHCHD3	N	k13	k24	k6
CHCHD4	N	k13	k13	k6
CHCHD7	N	k13		k6
CHMP2B	N	k9	k9	k6
CHMP4B	N	k9	k24	k18
CISD1	N	k13	k13	k6
CISD3	N	k13	k13	k6
CKAP5	N	k13	k24	k6
CKB	Y	k9		k6
CKM	Y	k13	k24	k6

CKMT2	Y	k13	k24	k6
CLIC4	N	k8		k6
CLIP1	N	k9		
CLPP	N	k13	k24	k6
CLTA	N	k8		k6
CLTB	N	k9	k8	k6
CLTC	N	k9	k24	k18
CLU	N			k18
CLYBL	N	k13	k24	k6
CMPK1	Y	k9	k24	k6
CMYA5	N	k9	k24	k6
CNBP	N	k8	k9	
CNN2	N	k6	k18	k18
CNRIP1	N	k13	k13	
COA3	N	k9	k24	k8
COL3A1	N	k24	k24	k18
COL4A2	N	k13	k13	k6
COL6A2	N	k13	k13	k24
COQ3	Y	k13	k24	k6
COQ5	Y		k13	k6
COQ6	Y	k13		k6
COQ7	Y	k13	k24	k6
COQ9	N	k13	k24	k18
CORO6	N	k13		k6
COX17	N	k9	k13	k6
COX20	Y	k13	k13	k6
COX4I1	Y	k13	k13	k6
COX5A	Y	k13	k13	k6
COX5B	Y	k13	k24	k6
COX6A2	N	k13		
COX6B1	Y	k9	k13	k6
COX6C	Y	k13	k24	k6
COX7A1	N	k13	k24	k18
COX7A2P2	N	k13	k24	k18
COX7B	Y	k13	k13	k18
COX7C	Y	k13	k13	k6
CP	N	k8	k6	k18
CPPED1	N		k6	k6
CPT1B	Y	k13	k24	k18
CPT2	Y	k13	k24	k18
CRAT	Y	k13	k24	k6
CREB3L4	N	k8	k8	

CRIP1	N			k6
CRIP2	N	k9	k13	k6
CROCC	N	k13	k24	k6
CRYAB	N	k9	k24	k6
CS	Y	k13	k24	k18
CSRP1	N			k18
CSRP3	N	k9	k9	k6
CST5	N		k6	k6
CSTB	N	k8	k8	k6
CTNNA1	N	k13	k24	k6
CTNNB1	N	k13	k24	k6
CTSB	N	k9	k24	k6
CTSD	N	k13	k24	k6
CTSV	N		k6	
CTSZ	N			k18
CTTN	N	k9	k24	k6
CUTA	N	k8	k9	
CYB5B	N	k13	k24	k18
CYC1	Y	k13	k24	k18
CYCS	Y	k13	k24	k6
DAG1	N	k13	k13	k6
DARS1	N	k6	k6	
DBI	N	k9	k9	k6
DBNL	N		k13	
DBT	Y	k13	k24	k6
DCN	Y			k6
DCTN2	N	k9	k24	k6
DDAH2	Y			k18
DDTL	N	k13	k24	k18
DDX1	N		k24	k18
DDX17	N	k9	k24	k18
DDX3X	N		k9	
DDX5	N			k6
DECR1	Y	k13	k24	k18
DENR	N	k9		k6
DES	N	k9	k24	k18
DHDH	N	k8	k8	k6
DHRS4L2	N	k13	k24	k18
DIABLO	N	k9	k8	
DLAT	Y	k13	k24	k6
DLD	Y	k13	k24	k6
DLST	Y	k9	k24	k18

DMD	N	k13	k24	k18
DNAH17	N	k9		
DNAJA2	N	k13		k6
DNAJA3	N		k9	k9
DNAJA4	N	k9	k24	
DNAJB2	N		k8	k8
DNAJB4	N		k6	
DNM1	N	k9	k9	k9
DNM1L	N	k13	k24	k18
DNPEP	N		k24	
DPYSL2	N	k9	k24	k6
DSG2	N	k13	k24	k6
DSP	N	k13	k24	k6
DSTN	N	k9	k24	k18
DTNA	N	k9	k24	k6
DUSP3	N	k6		k6
DYNC1H1	N	k13	k24	k18
DYNC1H2	N	k9	k13	k6
DYNC1L1	N	k9	k24	k6
DYNLL2	N	k9		
DYNLRB1	N	k8	k9	k6
ECH1	N	k13	k24	k18
ECHDC3	N	k13	k24	k18
ECHS1	Y	k13	k24	k18
ECI1	Y	k13	k24	k6
ECI2	Y	k13	k24	k6
EEF1A1	N	k8		k6
EEF1A2	N	k13	k24	k6
EEF1B2	N	k9	k24	k18
EEF1D	N	k8	k24	k6
EEF1G	N	k9	k24	k6
EEF2	N	k13	k24	k6
EFEMP1	N	k8	k6	k18
EFHD2	N			k18
EHD1	N	k13	k24	k18
EHD2	N	k13	k24	k6
EHD4	N	k13	k24	k18
EIF2S1	N	k9	k9	
EIF2S2	N		k8	k8
EIF3B	N	k9	k8	
EIF3G	N	k8		
EIF3J	N	k8	k24	k6

EIF4A1	N	k13	k24	k6
EIF4B	N	k9	k13	k6
EIF4E	N	k13	k13	
EIF4H	N	k8	k9	
EIF5	N	k8	k8	
EIF5AL1	N	k13	k24	k18
EMILIN2	N	k9	k13	k6
EML1	N	k13	k13	k6
ENDOG	N	k13	k24	k6
ENO1	Y	k13	k24	k18
ENO3	Y	k13	k24	k6
EPHX2	Y	k13	k24	k18
EPRS1	N	k13	k24	k6
ESD	Y	k13	k24	k6
ETFA	Y	k13	k24	k6
ETFB	Y	k13	k24	k6
ETFDH	Y	k13	k24	k6
ETHE1	Y	k13	k24	k6
EXOSC7	N	k6	k6	
EZR	N		k9	
2.00 F	N	k6	k18	k18
FABP3	Y	k9	k24	k6
FABP4	Y	k9	k24	k18
FABP5	Y	k8	k24	k6
FADD	N	k24		k6
FAH	Y	k13	k24	k6
FAHD1	N	k13	k24	k6
FAHD2B	N	k13	k24	k6
FAM136A	N	k9	k9	k6
FAM162A	N	k13	k24	k6
FAM53A	N	k9	k24	k6
FBLIM1	N	k9	k9	k6
FBLN1	N	k13		k6
FBLN5	N			k6
FBN1	N			k6
FBP2	Y	k8		
FDX1	Y	k9	k9	k6
FERMT2	N	k13	k24	k18
FETUB	N			k6
FGA	N	k8	k6	k6
FGB	N	k8	k6	k18
FGG	N	k8		k18

FH	Y	k13	k24	k6
FHL2	Y	k13	k8	k6
FHOD3	N	k13	k13	k6
FIS1	N	k13	k24	k18
FKBP1C	N	k8	k24	
FKBP3	N	k13	k24	k6
FKBP4	N		k13	k13
FLNA	N			k6
FLNB	N	k9	k8	k6
FLNC	N	k9	k24	k6
FMOD	Y		k24	k18
FN1	N			k6
FTH1	N	k13	k24	k6
FTL	N		k24	k18
FUNDC2	N	k13	k24	k18
FUS	N		k13	k6
FXN	Y	k6	k6	
FXYD1	N	k13	k24	k6
G3BP1	N	k9	k24	k6
GADD45GIP1	N	k13	k13	k6
GAPDH	Y	k13	k24	k6
GARS1	N	k13	k24	k6
GART	Y	k13	k24	k18
GATC	N		k13	
GC	Y	k8		k6
GCDH	Y	k13	k13	k18
GCSH	Y	k13		
GDI1	N	k24		
GDI2	N	k13	k24	k18
GFAP	N	k18		
GFM1	N	k6	k6	
GFM2	N		k13	k8
GJA6P	N	k13	k13	k6
GLO1	Y	k13	k24	k18
GLOD4	N	k13	k24	k6
GLRX	Y	k13	k24	k18
GLRX2	N	k9	k13	k6
GLRX3	N	k9	k24	k18
GLRX5	N	k13	k24	k6
GLUD2	Y	k13	k24	k6
GLUL	Y			k6
GMPR	Y	k24	k24	k18

GNB1	Y	k9	k24	k6
GNB2	Y	k13	k24	k18
GOT1	Y	k13	k24	k18
GOT2	Y	k13	k24	k6
GPC1	Y	k13	k24	k6
GPD1	Y	k9		k6
GPD1L	Y	k13	k24	k18
GPI	Y	k13	k24	k18
GPT	Y	k24	k24	k6
GPX1	Y			k6
GPX3	N	k8		k6
GRHPR	Y	k13	k24	k6
GRN	N		k8	
GRPEL1	N	k9	k24	k6
GRSF1	N	k9	k24	k6
GSN	N	k8		k6
GSTA5	Y	k13	k24	k18
GSTK1	Y	k6	k6	k18
GSTM5	Y	k13	k24	k18
GSTO1	Y	k9	k24	k6
GSTP1	Y	k13	k24	k18
GSTZ1	Y	k9		k6
GYG1	Y	k9	k24	k6
GYS1	Y	k9	k9	
H1-0	N	k13	k24	k6
H3-3A	N	k13	k24	k18
HADH	Y	k13	k24	k6
HADHA	Y	k13	k24	k6
HADHB	Y	k13	k24	k6
HAGH	Y	k24	k24	k6
HARS1	N	k9		
HBA2	N		k8	k6
HBD	N		k6	k6
HCCS	N	k13	k13	k6
HDGF	N	k8	k8	k6
HDHD2	N	k24		
HHATL	N	k13	k24	k18
HIBADH	Y	k13	k24	k6
HIBCH	Y	k13	k24	k6
HINT1	N	k9	k24	k6
HINT2	N	k13	k24	k6
HK1	Y	k13	k24	k18

HK2	Y	k13	k24	k18
HMBS	Y	k24	k24	k6
HMGB1	N	k9	k9	k6
HMGB2	N	k8		
HMGCL	Y	k24	k24	k6
HMOX2	Y	k13		k6
HNRNPA0	N			k6
HNRNPA1L2	N	k8		k18
HNRNPA2B1	N	k9	k24	k6
HNRNPA3	N	k8	k24	k6
HNRNPAB	N	k8	k8	k6
HNRNPH1	N	k24		k18
HNRNPK	N	k9	k24	k6
HNRNPM	N	k13		k6
HNRNPU	N	k13	k24	
HOPX	N	k9	k9	k6
HPR	N	k6		k6
HPS6	N	k9	k24	k6
HPX	N		k6	k6
HSD17B10	Y	k13	k24	k18
HSD17B4	Y	k13	k24	k18
HSD17B8	N	k13	k24	k6
HSDL2	N	k13	k24	k6
HSP90AA1	Y	k13	k24	k18
HSP90AB1	N	k13	k24	k18
HSP90B2P	N	k9	k24	k18
HSPA4	N	k9	k24	k6
HSPA5	N	k9	k24	k6
HSPA8	N	k9	k24	k6
HSPA9	N	k13	k24	k6
HSPB1	N	k9	k6	k6
HSPB2	N	k8	k8	k6
HSPB6	N	k13	k24	k18
HSPB7	N	k9	k24	k6
HSPB8	N	k9	k24	k6
HSPD1	N	k13	k24	k6
HSPE1	N	k9	k9	k6
HSPG2	Y	k13		k6
HUWE1	N		k13	k6
IARS2	N	k13	k24	k18
IBA57	N	k13	k24	k24
IDH1	Y	k13	k24	k6

IDH2	Y	k13	k24	k6
IDH3A	Y	k13	k24	k6
IDH3G	Y	k13	k24	k6
IGFBP5	N	k24	k24	k18
IGHG4	N	k9	k6	k18
IGKC	N	k8	k6	k6
ILK	N		k13	
IMMT	N	k13	k24	k6
ISCA2	N	k13		
ISOC1	N		k13	
ISOC2	N	k13	k24	k6
ITGB1	N	k9	k24	k6
ITIH3	N	k9	k6	k13
ITIH4	N	k6		k18
IVD	Y	k13	k24	k18
JPH2	N	k13	k13	k6
JUP	N	k13	k24	k6
KNDC1	N		k6	k18
KNG1	N	k8		k6
KPNB1	Y	k13	k24	k6
KRT1	N	k9		k6
KRT10	N	k9	k9	k6
KRT15	N		k8	k6
KRT16	N	k9	k9	k6
KRT5	N	k9		k6
KRT72	N	k13	k24	k6
KRT76	N	k9	k9	k6
KRT79	N	k9		
KTN1	N	k9	k9	
L2HGDH	Y	k13	k24	k18
LAMA2	N	k13	k24	k6
LAMA4	N	k13		
LAMA5	N	k24	k24	k18
LAMB1	N	k13	k24	k6
LAMB2	N	k13	k13	k6
LAMC1	N	k13	k13	k6
LAMP1	N	k13	k24	k18
LASP1	N	k8	k8	k6
LCP1	N			k6
LDB3	N	k9	k13	k6
LDHA	Y	k13	k24	k18
LDHB	Y	k13	k24	k18

LDHD	N	k13	k24	k6
LETM1	N	k13	k24	k6
LGALS1	N	k8		k6
LIMCH1	N	k13	k24	k6
LIMS1	N	k13	k24	k6
LMCD1	N	k8		k6
LMNA	N	k8		k6
LMNB1	N	k9	k24	k6
LMNB2	N	k9	k8	k6
LMOD1	N	k13	k24	k6
LMOD2	N	k9	k6	
LONP1	N	k13	k24	k18
LPL	Y	k13	k24	k6
LRP1	Y	k13	k24	k6
LRPAP1	N		k24	k6
LRPPRC	Y	k13	k24	k18
LRRC7	N		k9	
LTF	N			k18
LUM	Y			k6
LY6H	N		k13	
LYPLA1	Y	k9	k6	k18
LYRM7	N	k9	k9	k6
LYZ	N		k18	
MACROD1	N	k13	k24	k6
MANF	N	k8		k6
MAOB	Y	k13	k24	k18
MAP3K4	N	k13	k13	k6
MAP4	N	k9	k9	k6
MAPK14	N	k13	k24	k18
MAPRE1	N	k13	k8	
MAPRE2	N	k13	k24	k18
MAPT	N	k13	k13	k6
MARCKS	Y			k6
MAT2B	Y	k13	k24	k6
MATR3	N	k8		k6
MAVS	N		k9	k6
MB	N	k13	k24	k6
MCAT	N	k13	k24	k6
MCCC1	Y	k13	k24	k6
MCCC2	Y	k13	k24	k6
MCEE	Y	k9	k24	k6
MDH1	Y	k13	k24	k18

MDH2	Y	k13	k24	k6
MDP1	N	k24	k24	k6
ME1	Y		k24	
ME3	N	k13	k24	k18
MECR	N	k13	k13	
MEMO1	N	k13	k13	k6
MFAP5	N			k6
MFF	N	k6	k6	k6
MGLL	Y	k6	k13	k18
MIF	N	k8	k24	k6
MLIP	N	k9	k9	k6
MLYCD	Y	k13	k24	k18
MPC1	Y	k13	k24	k6
MPC2	Y	k13	k24	k18
MPI	N	k13	k24	k6
MPST	N	k13	k24	k6
MRPL10	N	k18		
MRPL12	N	k9	k13	k6
MRPL15	N		k13	
MRPL18	N		k6	
MRPL40	N	k24	k24	k6
MRPL46	N	k13	k8	
MRPL53	N	k8	k8	
MRPS28	N	k9	k13	k6
MRPS31	N		k8	
MRPS34	N	k13	k24	k6
MRPS35	N	k13	k24	k6
MRPS36	N	k13	k13	k6
MSN	N	k9	k24	k6
MSRA	N	k9	k13	k18
MSRB2	N	k9	k13	
MSRB3	N	k8	k9	k6
MT2A	Y	k8	k8	k9
MTAP	Y	k8		
MTCH2	N	k13	k24	k6
MTFP1	N	k13	k13	k18
MTPN	N			k18
MTX2	N	k13	k24	k18
MVP	N	k9	k24	k6
MYBPC3	N	k13	k24	k6
MYH1	N	k24	k24	k18
MYH10	N			k6

MYH11	N	k13	k24	k6
MYH14	N			k6
MYH3	N	k6	k6	k18
MYH4	N	k13	k24	k6
MYH6	N	k13	k24	k6
MYH7	N			k6
MYH7B	N	k18		k18
MYH8	N	k9		
MYH9	N	k8		k6
MYL1	N	k8		k6
MYL12B	N	k9	k24	k18
MYL2	N	k13	k24	k18
MYL3	N	k9	k13	k6
MYL6	N	k9	k24	k6
MYL7	N			k18
MYL9	N	k8	k8	
MYLK3	N	k13	k24	k6
MYO1C	N		k24	k18
MYOM1	N	k13	k24	k18
MYOT	N			k24
MYOZ2	N	k13	k24	k6
MYPN	N	k13	k13	k24
NACA	N	k13	k24	k6
NAMPT	Y	k13	k24	k18
NAP1L4	N	k13	k24	k18
NCEH1	Y	k13	k24	k18
NCL	N	k8	k24	k6
NDRG2	N	k13	k24	k6
NDUFA10	Y	k9	k24	k6
NDUFA11	Y	k13	k24	k18
NDUFA12	Y	k13	k13	k6
NDUFA2	Y	k9	k13	k6
NDUFA3	Y	k13	k24	k18
NDUFA4	Y	k13	k24	k18
NDUFA5	Y	k13	k24	k18
NDUFA6	Y	k13	k24	k6
NDUFA7	Y	k13	k13	k6
NDUFA8	Y	k13	k24	k6
NDUFA9	Y	k13	k24	k18
NDUFAB1	Y	k13	k24	k18
NDUFAF2	Y	k13	k24	k6
NDUFB10	Y	k13	k24	k6

NDUFB11	Y	k13	k13	k6
NDUFB2	Y	k13	k24	k6
NDUFB3	Y	k13	k13	k6
NDUFB5	Y	k13	k24	k6
NDUFB6	Y	k13	k24	k18
NDUFB7	Y	k13	k24	k6
NDUFB8	Y	k13	k24	k6
NDUFB9	Y	k13	k13	k6
NDUFC2-KCTD14	N	k13	k24	k6
NDUFS1	Y	k13	k24	k6
NDUFS2	Y	k13	k24	k18
NDUFS3	Y	k13	k24	k6
NDUFS4	Y	k9	k13	k6
NDUFS5	Y	k13	k24	k6
NDUFS6	Y	k9	k9	k6
NDUFS7	Y	k13	k24	k18
NDUFS8	Y	k13	k24	k6
NDUFV1	Y	k13	k24	k6
NDUFV2	Y	k13	k24	k6
NDUFV3	Y	k9	k13	k18
NEBL	N	k9	k24	k6
NEDD4	N	k13		k6
NEDD8	N	k8	k8	
NEXN	N	k9	k13	k6
NFS1	Y	k13	k24	k18
NFU1	N	k13	k24	k6
NID1	N	k13	k24	k6
NID2	N	k9	k13	
NIT1	N	k9	k24	k6
NIT2	N	k13	k24	k6
NME2	Y	k13	k24	k6
NMT1	N		k24	k6
NNT	Y			k18
NOL3	N	k9	k9	k6
NPEPPS	N	k13	k24	k18
NPM1	N	k8	k24	k6
NQO1	Y	k13	k24	k18
NQO2	N	k24	k24	k18
NRAP	N			k6
NSFL1C	N	k8	k24	k6
NUCB1	N		k6	
NUDC	N	k9		

NUDT8	N	k13	k24	k18
NUTF2	N	k13	k24	k18
OAT	Y	k13	k24	k18
OBSCN	N	k13	k24	k6
OCIAD1	N	k9	k13	k6
OGDH	Y	k13	k24	k6
OGN	Y			k6
OLA1	N	k13	k24	k18
OPA1	N	k13	k24	k18
ORM2	N	k8		k6
OSBP	Y	k13	k13	k6
OXCT1	Y	k13	k24	k6
OXR1	N	k13	k6	k18
P4HB	Y	k8		k18
PA2G4	N	k13	k24	k6
PABPC3	N	k8	k8	
PACSIN2	N	k9	k24	k6
PAICS	Y	k13	k24	k18
PALMD	N	k9	k13	k6
PAPLN	N	k9	k6	k6
PARG	N	k24	k24	k18
PARK7	N	k13	k24	k6
PARVB	N	k13	k13	k6
PC	Y			k6
PCBP1	N	k13	k24	k6
PCBP2	N	k13	k24	k6
PCCA	Y	k13	k24	k6
PCCB	Y	k13	k24	k18
PCMT1	N	k13	k24	k18
PCP4L1	N	k13	k24	k6
PDAP1	N	k8	k8	k6
PDCD6IP	N	k13	k13	k18
PDHA1	Y	k13	k24	k6
PDHB	Y	k13	k24	k18
PDHX	Y	k13	k24	k6
PDIA3	N	k8	k24	k6
PDIA4	N	k8		k6
PDIA6	N			k6
PDK2	Y	k13	k24	k6
PDK4	Y	k13	k13	k8
PDLIM1	N		k8	
PDLIM3	N			k8

PDLIM5	N	k9	k13	k6
PDP1	Y	k9	k24	k6
PDPR	Y	k13		k6
PDXX	Y	k9		
PEA15	N	k9	k24	k6
PEBP1	N	k9	k24	k6
PEX19	N	k9	k8	
PFKL	Y	k24	k8	k18
PFKM	Y	k13	k24	k18
PFN1	N	k24	k24	k6
PFN2	N	k8	k24	k18
PGAM2	Y	k9	k24	k6
PGAM4	N	k8	k24	k6
1.00 PGK	Y	k13	k24	k6
PGLS	Y	k9	k24	k6
PGM2	Y	k13	k24	k18
PGM5	N	k13		
PHB	N	k13	k24	k18
PHB2	N	k13	k24	k6
PHPT1	N	k13	k24	k6
PICALM	N	k24	k24	k6
PITRM1	N	k13	k24	k18
PKIA	N	k13	k13	k6
PKM	Y	k13	k24	k6
PLAA	N	k6	k13	k6
PLEC	N	k9	k24	k6
PLG	N			k6
PLIN3	Y	k13	k13	k6
PLIN4	N	k13	k13	k6
PLIN5	N	k13	k24	k6
PLN	N	k13	k13	k6
PMPCA	N	k13	k8	k6
PMPCB	N	k13	k24	k6
PNP	Y	k13	k13	k18
POLR2M	N	k13	k24	k18
POSTN	N			k6
PPA2	N	k13	k24	k6
PPIA	N	k8	k24	k6
PPIB	N	k9		k6
PPID	N	k13	k24	k18
PPIF	N	k9	k13	k6
PPP1CA	Y	k9	k24	k18

PPP1CB	Y	k13	k24	k18
PPP1R12B	N	k9	k24	k6
PPP1R14C	N	k13	k13	
PPP1R3A	N	k13	k13	k6
PPP1R7	N	k13	k24	k18
PPP2CA	Y	k9	k24	k6
PPP2R1A	Y	k13	k24	k18
PRDM16	N	k9	k24	k6
PRDX1	N	k13	k24	k18
PRDX2	N	k13	k24	k18
PRDX3	N	k13	k24	k18
PRDX5	N	k13	k24	k6
PRDX6	N	k13	k24	k18
PRELP	Y			k6
PRKACA	Y	k9		
PRKAR1A	Y	k9		
PRKAR2A	Y		k24	k18
PRKCSH	N	k8		k6
PSAP	Y	k9	k8	k18
PSMA1	Y	k13	k24	k18
PSMA2	Y	k13	k24	k6
PSMA3	Y	k13	k24	k18
PSMA5	Y	k13	k24	k18
PSMA7	Y	k9	k24	k6
PSMB1	Y	k13	k24	k18
PSMB6	Y	k13	k24	k18
PSMC2	Y	k13	k24	k6
PSMC3	Y	k24	k24	k6
PSMC4	Y	k8		
PSMC5	Y		k24	k6
PSMC6	Y	k13		k6
PSMD2	Y	k13	k24	k6
PSMD4	Y	k9	k24	k6
PSMD6	Y	k9	k24	k24
PSMD7	Y	k24	k24	k18
PSMD9	Y	k9	k9	k6
PSME1	Y	k9	k24	k6
PTGES2	N	k13		
PTGES3	Y	k9	k24	k6
PTGR2	N	k13	k13	
PTMA	N	k8		k6
PTMS	N			k6

PTPN11	N	k6	k24	k6
PTRH2	N	k13	k24	k18
PURA	N		k24	k18
PURB	N	k9	k24	k18
PYGB	Y	k13	k24	k18
PYGM	Y	k13	k24	k18
PZP	N	k8	k6	k6
QDPR	Y	k13	k24	k18
QKI	N	k13		
RAB10	N	k13	k13	k6
RAB1C	N	k13	k24	k18
RAB21	N	k24	k24	k6
RAC3	N			k8
RAD23A	N	k13	k6	k6
RAD23B	N	k6	k6	k18
RANBP1	N	k13	k24	k6
RAP1A	Y	k13	k24	k18
RBBP9	N	k13	k8	
RBMX2	N	k9	k9	
RBP1	Y	k8	k8	
RBPMS	N	k9	k24	
RDH14	N	k13	k6	k18
RDX	N	k13	k24	k6
REEP5	N	k13	k24	k6
RHOA	N	k13		k6
RLBP1	N	k6	k6	
RNF20	N	k6	k6	k6
RNH1	N	k13	k24	k18
RNPEP	N			k6
RPL10A	Y	k13	k24	k6
RPL11	Y	k13	k24	k18
RPL12	Y	k24	k24	k18
RPL13	Y	k13	k8	k6
RPL14	Y		k6	
RPL15	Y	k13	k24	k6
RPL17-C18orf32	N	k13	k24	k6
RPL18	Y	k13	k24	k6
RPL18A	Y	k9		
RPL22	Y	k9	k24	k6
RPL23	Y	k9	k13	k6
RPL23A	Y	k13	k24	k6
RPL27A	Y	k13	k24	k13

RPL3	Y	k13	k24	k6
RPL4	Y	k24	k24	k6
RPL5	Y	k13	k24	k6
RPL6	Y	k13	k24	k6
RPL7	Y	k13		k6
RPL7A	Y	k13	k24	k6
RPL8	Y	k13	k24	k6
RPLP0	Y	k9	k8	k8
RPLP1	Y	k8	k24	k6
RPLP2	Y	k13	k24	k18
RPS10P5	N	k9	k8	
RPS11	Y	k13	k24	k6
RPS12	Y	k9	k13	k6
RPS14	Y	k9	k13	k6
RPS17	Y	k9		
RPS18	Y	k13	k24	k18
RPS19	Y	k9	k24	k6
RPS2	Y	k13	k24	k6
RPS20	Y	k9	k24	k6
RPS21	Y	k8	k8	k6
RPS25	Y	k13	k24	k6
RPS27	Y	k9	k24	k6
RPS27L	N	k9	k24	k6
RPS28	Y			k6
RPS3	Y	k13	k24	k6
RPS4Y2	N	k13	k24	k6
RPS5	Y	k13	k24	k6
RPS7	Y	k9	k24	k6
RPS8	Y	k9	k13	k6
RPSA	Y	k13	k24	k18
RRBP1	N		k8	k6
RSU1	N	k9	k8	
RTN2	N	k13	k13	k6
RTN4	N	k9	k8	
RTN4IP1	N	k24	k24	k18
RYS2	N	k13	k24	k18
S100A1	N	k13	k24	k18
S100A10	N	k24		k18
S100A13	N	k8		k18
S100A4	N	k8		k18
S100A6	N	k8		k18
SAA1	N			k8

SAA3P	N		k18	k24
SAMM50	N	k24	k24	k18
SAR1B	Y		k24	k18
SCAMP1	N		k24	k6
SCOC	N		k9	k6
SCP2	Y	k13	k24	k18
SCRN2	N		k8	
SCRN3	N	k13	k24	k6
SDHA	Y	k13	k24	k6
SDHAF2	N	k24	k24	k6
SDHB	Y	k13	k24	k6
SDHC	Y	k6	k6	k18
SDHD	Y		k24	k18
SDR39U1	N	k13	k24	k6
SELENBP1	N	k13	k24	k18
SERBP1	N	k9	k13	k6
SERPINA1	N		k6	k6
SERPINA3	N	k8	k6	k18
SERPINB6	N	k13	k24	k18
SERPINC1	N	k8	k6	k6
SERPINF2	N			k18
SERPINH1	N			k6
SET	N	k9	k24	k6
SF1	N	k13	k24	k18
SFPQ	N	k9	k24	k6
SGCA	N	k13		k6
SGCB	N	k9		
SGCG	N	k13	k24	k18
SH3BGR	N	k8	k24	k6
SH3BGRL3	N			k8
SH3GLB1	N			k6
SIRT5	N	k13	k24	k6
SLC16A1	Y	k13	k24	k6
SLC25A11	Y	k13	k24	k18
SLC25A12	Y	k13	k24	k18
SLC25A13	Y	k13	k24	k18
SLC25A20	Y	k13	k24	k6
SLC25A3	N	k13	k24	k18
SLC25A4	Y	k13	k24	k18
SLC25A42	N	k13	k24	k18
SLC25A5	Y	k13	k24	k18
SLC2A4	Y	k13	k13	k6

SLC4A1	Y		k18	k18
SLC8A1	N	k13	k24	k18
SLC9A3R2	N		k9	k6
SLIRP	N	k9	k24	k6
SLMAP	N	k13	k24	k6
SMC4	N	k13	k6	k6
SMPX	N	k9	k9	k6
SMTN	N			k6
SMYD1	N	k13	k24	k18
SNTA1	N	k24	k24	k18
SOD1	N		k9	k6
SOD2	N	k13	k24	k18
SORBS1	N	k9	k24	k6
SORBS2	N			k6
SPEG	N	k13	k24	k6
SPR	Y	k13	k24	k18
SRL	N	k13	k24	k6
SRSF1	N			k6
SRSF2	N		k8	k6
SRSF3	N	k8	k24	
SRSF7	N			k6
ST13P5	N	k13	k24	k6
STIP1	N	k9	k24	k6
STOML2	N	k9	k24	k18
SUCLA2	Y	k13	k24	k18
SUCLG1	Y	k13	k24	k6
SUCLG2	Y	k13	k24	k6
SUOX	Y	k13	k24	k18
SYNCRIP	N	k9	k24	k6
SYNPO	N	k9		k24
SYNPO2	N	k9	k24	k6
TACC2	N	k9	k9	
TACO1	Y	k13	k24	k6
TAGLN	N			k18
TAGLN2	N	k8		k6
TALDO1	Y	k24		k6
TARS3	N		k8	
TCAP	N	k9	k9	k6
TCP1	N	k6		
TDRD6	N			k6
TF	N	k8	k6	k6
TFAM	N	k13	k13	k6

TGM2	N	k13	k24	k6
THRAP3	N		k8	
TIMM10	N	k9	k9	k6
TIMM13	N	k9	k24	k6
TIMM44	N	k13	k24	k6
TIMM50	N	k13	k24	k18
TIMM8A	N	k8	k9	k6
TIMM8B	N		k9	k6
TIMM9	N	k9	k24	k6
TJP1	N	k9		k6
TKT	Y			k6
TLN1	N	k8		k18
TLN2	N	k13	k24	k6
TMEM38A	N		k9	k6
TMOD1	N	k9	k24	k6
TMOD4	N	k13	k24	k6
TMPO	N		k8	
TMSB10	N			k6
TNNC1	N	k13	k24	k18
TNNI3	N	k9	k24	k6
TNNT2	N	k13	k24	k6
TOM1	N			k6
TOM1L2	N		k24	
TOMM40	N	k13	k13	k6
TPD52L2	N	k8	k8	
TP11	Y	k9	k24	k6
TPM1	N	k13	k24	k6
TPM2	N	k9	k9	k18
TPM3	N			k6
TPM4	N	k9	k8	k6
TPT1P8	N	k24	k24	k18
TRAP1	N	k13	k24	k18
TRIAP1	N	k8	k9	k6
TRIM63	N	k13	k24	k6
TRIM72	N	k13	k24	k6
TRIP10	N	k9	k9	k6
TSC22D1	N			k6
TSFM	N	k13	k24	k18
TSG101	N			k6
TST	Y	k13	k24	k18
TTN	N	k13	k24	k6
TTR	Y	k6	k6	k6

TUBA1B	N	k13	k24	k6
TUBA4A	N	k13	k24	k18
TUBB	N	k9		k6
TUBB2A	N			k6
TUBB4B	N	k13	k24	k6
TUFM	N	k13	k24	k6
TXLNB	N	k9	k13	k6
TXN	Y	k9	k24	k6
TXN2	N	k9	k6	k6
TXNDC12	N	k13	k24	k18
TXNDC17	N	k13	k24	k18
TXNDC5	N			k6
TXNRD1	Y		k13	
TXNRD2	N	k13	k24	k6
UBA1	N	k13	k24	k6
UBA52	Y	k9	k24	k18
UBAP2L	N	k9	k9	
UBE2K	N	k6	k6	k18
UBE2L3	N	k13	k24	k18
UBE2N	N	k13	k24	k18
UBE2V2	N	k13	k24	k18
UCHL1	N			k6
UCHL3	N	k9	k8	
UFC1	N	k9	k8	
UGP2	Y	k13	k24	k24
UQCR10	Y	k13	k24	k18
UQCRB	Y	k13	k13	k6
UQCRC1	Y	k13	k24	k6
UQCRC2	Y	k13	k24	k18
UQCRFS1P1	N	k13	k13	k6
UQCRHL	N	k13	k13	
UQCRQ	Y	k13	k24	k6
USO1	N	k9	k24	
USP5	N	k13	k24	k6
VAPA	Y	k13	k13	k6
VAPB	Y	k13		k6
VAT1	N	k8		k6
VBP1	N	k8	k8	
VCL	N	k13	k24	k18
VCP	N	k13	k24	k18
VDAC1	N	k13	k24	k18
VDAC2	N	k13	k24	k18

VDAC3	N	k13	k13	k18
VIM	N	k8		k18
VPS35	N	k13	k24	k18
VWA8	N	k13	k24	k6
WARS1	N		k24	k18
WDR1	N	k13	k24	k18
XDH	Y		k9	
XIRP1	N	k8	k24	k6
XIRP2	N			k24
YBX1	N	k9	k9	k6
YJFN3	N	k13	k24	k6
YWHAB	N	k9	k24	k18
YWHAE	N	k13	k24	k18
YWHAG	N		k24	k18
YWHAH	N	k9	k24	k18
YWHAQ	N	k9	k24	k6
YWHAZ	N	k9	k24	k18
ZADH2	N	k13	k24	k6
ZYX	N			k6

**Table S2. k-cluster assignments in each treatment group for
quantified proteins of the Spine.**

Proteins identified in the Metabolism Reactome pathway (R-HSA-1430728) are highlighted in blue.

Gene Names	Metabolism	MI	MIRTX	RTX
AAK1	N			k3
AARS1	N	k2	k21	k4
ABAT	N	k2	k21	k4
ABHD12	N	k3	k2	k3
ACAA1	Y		k19	k20
ACAA2	N		k21	k4
ACAD9	Y	k3	k19	k4
ACADL	Y		k19	k4
ACADM	Y	k5	k21	k4
ACADS	Y		k19	k19
ACADSB	Y	k5	k5	k5
ACADVL	Y		k10	
ACAN	Y	k3	k19	k4
ACAT1	Y		k21	k4
ACAT2	N		k21	k4
ACLY	Y		k21	k4
ACO1	N		k19	k4
ACO2	Y	k3	k19	k4
ACOT11	Y	k5	k5	k5
ACOT2	Y		k19	k20
ACOT7	Y	k5	k19	k20
ACOT9	Y		k10	
ACP1	N		k19	k20
ACP6	N	k3	k3	
ACSBG1	Y		k10	
ACSL1	Y	k10	k10	k5
ACSL6	Y	k21	k10	k5
ACSS2	Y		k2	
ACTA1	N		k19	k4
ACTB	N		k19	k19
ACTBL2	N			k3
ACTN1	N		k10	k7
ACTN4	N	k2	k20	k20
ACTR1A	N		k19	k4

ACTR1B	N	k3	k19	k19
ACTR2	N		k19	k20
ACTR3	N	k10	k21	k4
ACY1	Y		k19	k4
ACYP1	N		k19	k19
ACYP2	N		k21	k4
ADAM22	N			k7
ADAM23	N	k20	k19	k20
ADD1	N		k19	k4
ADD2	N			k4
ADD3	N	k2	k19	k20
ADH5	Y	k5	k21	
ADK	Y			k21
ADO	Y		k21	k21
ADSL	Y		k19	k4
ADSS1	N	k2	k21	
ADSS2	N	k5		k4
AFG3L2	N		k10	k7
AGFG1	N		k2	k2
AHCY	Y		k10	k7
AHCYL1	Y		k21	k4
AHCYL2	N			k20
AHSA1	N		k4	k21
AHSG	N		k21	k21
AIMP1	Y			k3
AK1	Y		k21	k4
AK4	Y		k3	k3
AKAP12	N		k19	k4
AKR1A1	Y	k10	k19	k4
AKR1B1	Y	k10	k19	k4
AKR1B15	Y	k5	k19	k20
ALAD	Y	k3	k21	k4
ALB	Y	k5	k21	k4
ALCAM	N	k3		
ALDH1A1	Y	k2	k21	k4
ALDH1B1	Y			k7
ALDH1L1	Y	k10	k19	k4
ALDH2	Y		k21	k4
ALDH4A1	Y			k2
ALDH5A1	N	k3	k21	k4
ALDH6A1	Y		k10	k3
ALDH7A1	Y		k10	k7

ALDH9A1	Y		k19	k4
ALDOA	Y		k21	k7
ALDOC	Y			k4
AMPD2	Y	k2		k4
ANK2	N	k2	k21	k4
ANK3	N		k10	k10
ANLN	N		k10	
ANP32B	N	k5		
ANP32D	N		k21	k20
ANP32E	N	k2	k19	
ANXA2P2	N	k5	k21	k4
ANXA3	N		k2	k2
ANXA5	N	k5	k19	k4
ANXA6	N	k5	k19	k4
ANXA7	N		k19	k19
AP1B1	N		k10	k2
AP2A1	N	k5	k10	k10
AP2A2	N	k3		k7
AP2B1	N	k5	k10	k5
AP2M1	N	k5	k21	
AP2S1	N	k5	k21	
AP3D1	N		k10	k5
APBA1	N		k21	k4
APEH	N		k21	k4
APLP1	N		k19	k19
APLP2	N			k5
APOA1	Y		k10	k2
APOA2	Y			k10
APOA4	Y	k5	k10	k10
APOC3	Y			k3
APOD	N	k2	k10	k2
APP	N	k20	k20	k20
AQP4	N	k2	k10	k3
ARF2P	N	k5		k5
ARF3	Y	k21	k21	k4
ARF5	N	k3	k10	k5
ARFGAP1	N			k2
ARHGDI	N	k3	k21	k4
ARL8B	N	k7	k21	k4
ARPC1A	N	k10	k19	k20
ARPC2	N		k20	k20
ARPC3	N	k3	k20	k20

ARPC4-TTLL3	N	k5	k19	k4
ARPC5L	N	k10	k21	k21
ARPP19	N			k21
ARSB	Y			k3
ASL	Y	k3		k7
ASPA	Y	k2	k19	k20
ASRGL1	Y		k21	k4
ASS1	Y	k5	k19	k20
ASXL3	N	k3	k21	k5
ATCAY	N			k3
ATG3	N		k5	
ATIC	Y	k3	k21	k4
ATOX1	N			k4
ATP1A1	N	k2	k10	k3
ATP1A2	N	k3		
ATP1A3	N	k3		k4
ATP1B1	N	k2	k21	k4
ATP1B2	N	k3		
ATP1B3	N		k10	k4
ATP2A1	N	k7	k2	k2
ATP2A2	N	k19	k21	k5
ATP2B1	N	k10		k10
ATP2B2	N		k2	
ATP2B4	N		k10	k10
ATP5F1A	N		k19	k4
ATP5F1B	N		k21	k4
ATP5F1C	N		k19	k4
ATP5F1D	N		k21	k4
ATP5F1EP2	N		k21	k4
ATP5IF1	N		k20	k20
ATP5ME	N			k10
ATP5MF	N	k3	k10	k2
ATP5MGL	N	k7	k2	k2
ATP5PD	N		k10	k3
ATP5PF	N		k19	k20
ATP5PO	N		k21	k4
ATP6V0A1	N	k5	k19	
ATP6V0D1	N	k7	k10	k3
ATP6V1A	N		k19	k4
ATP6V1B2	N		k21	k4
ATP6V1C1	N	k7	k10	k3
ATP6V1D	N		k21	k4

ATP6V1E1	N			k4
ATP6V1F	N		k19	k20
ATP6V1H	N	k7	k10	k5
ATP8A1	N	k2	k10	k10
AUH	Y		k21	k4
BAG3	N	k2	k5	k3
BCAN	Y		k20	k20
BCAP31	N	k3	k3	k7
BCAS1	N			k3
BCAT1	Y		k21	k4
BDH1	Y	k2	k10	k7
BHLHE22	N		k19	k20
BIN1	N		k10	k7
BLMH	N	k3	k19	k20
BLVRA	Y		k5	
BLVRB	Y		k10	k2
BOLA1	N			k20
BOLA2B	N		k2	k2
BOLA3	N		k10	k7
BPGM	Y	k3	k10	k7
BPNT1	Y	k7	k21	k21
BSG	Y	k2	k21	k4
BSN	N			k2
BTBD17	N	k7		k20
BTF3L4	N		k2	k2
C11orf54	N	k5		
C12orf57	N		k20	k19
C1orf198	N	k2		
C1QB	N	k7	k2	
C1QBP	N		k20	k20
C3	N	k3	k5	k7
CA1	Y	k10	k5	k7
CA14	Y			k19
CA2	Y	k2	k21	k4
CA3	Y		k21	k4
CACNA2D1	N	k10	k10	k2
CACYBP	N			k3
CADM2	N	k3		k4
CADM3	N	k2	k10	k2
CADM4	N	k3		k4
CADPS	N	k3	k2	k2
CALB1	N		k19	k4

CALB2	N		k19	k4
CALCA	N			k3
CALM3	N	k3	k21	k4
CALML3	N	k5		
CALR	N		k10	k4
CALU	N	k2	k19	k20
CAMK2A	N	k5		
CAMK2G	N	k3	k3	k21
CAMKK1	N		k10	k3
CAMKV	N	k3	k10	k3
CAND1	N	k5	k2	k2
CANX	N	k3	k10	k2
CAP1	N	k3	k21	k21
CAP2	N			k3
CAPN2	N		k5	k3
CAPNS1	N	k7	k21	k4
CAPZA1	N	k19	k19	k20
CAPZA2	N		k21	k4
CAPZB	N		k19	k20
CARHSP1	N		k5	
CARS1	N		k21	k21
CASKIN1	N	k3	k2	k2
CASQ1	N		k10	k7
CAT	Y	k2		k4
CBR1	Y		k19	k20
CBR3	N	k7		
CCDC91	N			k3
CCT2	N		k19	k4
CCT3	N	k2	k19	k4
CCT4	N		k2	k2
CCT5	N		k21	k4
CCT6A	N		k10	k7
CCT6B	N	k7	k10	
CCT7	N		k21	k10
CCT8	N	k3	k21	k21
CD44	Y		k2	k2
CD47	N	k3	k21	k4
CD81	N		k19	k19
CD82	N		k19	k20
CD9	N			k4
CDA	Y	k2	k5	k4
CDC42	N			k3

CDH13	N			k3
CDH2	N		k10	k5
CDK5	N	k7	k5	k5
CDS2	Y	k7	k10	k10
CENPV	N			k3
CES1	Y			k4
CETN2	N	k5	k21	
CFDP1	N	k3		
CFHR4	N		k3	k2
CFL1	N		k21	k4
CFL2	N		k21	k4
CHCHD2	N		k21	
CHCHD4	N		k10	k3
CHCHD6	N		k2	k2
CHMP2B	N		k10	
CHMP4B	N		k21	k4
CHMP5	N	k2		
CHORDC1	N		k2	k2
CIAPIN1	Y	k3		k4
CISD1	N	k7	k19	k4
CKB	Y	k2	k21	k4
CKM	Y		k21	k7
CKMT1B	N		k21	k4
CLDN11	N	k10	k10	k10
CLIC4	N		k19	k4
CLIP1	N		k2	k2
CLIP2	N		k21	k4
CLPP	N	k3	k2	k2
CLTA	N		k19	k20
CLTB	N		k19	k20
CLTC	N	k5		k4
CLU	N		k21	k21
CLYBL	N		k21	k4
CMBL	Y	k3	k5	
CMPK1	Y	k2	k19	k4
CMPK2	N		k19	k20
CNDP2	Y	k10	k19	k20
CNN3	N		k21	
CNP	N		k21	k4
CNPY2	N			k2
CNRIP1	N	k7		k7
CNTN1	N			k20

CNTN2	N			k4
CNTNAP1	N		k10	k4
COL1A2	N			k3
COL24A1	N	k3	k21	k7
COL4A1	N			k7
COMTD1	N		k5	k5
COPS2	N	k5	k5	k5
COPS4	N	k2	k2	k2
COPS5	N	k20	k19	k20
COPS8	N	k2	k10	k10
CORO1B	N	k20		
COX4I1	Y	k3	k21	k4
COX5A	Y	k3	k19	k20
COX5B	Y		k19	k20
COX6A1	Y	k3		k7
COX6B1	Y	k3		
COX6C	Y	k3	k21	k4
COX7A2P2	N	k2	k19	k19
CP	N		k10	k21
CPLX1	N		k19	k20
CPNE6	Y		k19	k4
CPPED1	N	k19	k19	k20
CR2	N		k21	
CRK	N		k19	k20
CRKL	N	k5	k21	
CRMP1	N		k19	k4
CROT	Y	k10	k21	
CRYAB	N		k19	k20
CRYM	Y	k2	k21	k20
CS	Y	k5	k19	k4
CSDC2	N	k5	k10	k7
CSDE1	N		k20	k20
CSNK2A1	N	k7		k21
CSNK2B	N	k5	k5	k5
CSRP1	N		k21	k4
CST5	N	k3	k19	k4
CSTB	N	k3	k19	k4
CSTF2	N		k2	k2
CTBP1	N	k7	k21	k4
CTNNA2	N	k7		k5
CTNNB1	N	k2	k2	k2
CTNND2	N	k7		k7

CTSD	N		k19	k4
CTSV	N	k10	k10	
CTSZ	N		k19	k20
CTTN	N			k20
CYB5B	N	k5	k10	k4
CYC1	Y	k19	k10	k21
CYCS	Y		k21	k4
CYFIP2	N	k2	k19	k4
DARS1	N		k2	k2
DAZAP1	N	k3	k20	
DBI	N	k3	k21	
DBN1	N			k4
DBNL	N		k21	
DBT	Y	k3	k3	
DCTN2	N		k10	k3
DCTN4	N	k7	k10	k7
DDAH1	Y	k3	k21	k4
DDAH2	Y		k21	k21
DDB1	N	k10		k4
DDI2	N	k3		k2
DDTL	N		k10	k7
DDX1	N		k10	
DDX17	N			k7
DDX39B	N		k21	
DDX3X	N	k7	k10	k7
DDX5	N	k7		k3
DECR1	Y		k19	k4
DENR	N		k2	k2
DFFA	N		k10	k7
DHDH	N	k10		k5
DHRS1	N	k7	k21	k7
DIP2B	N		k10	
DLAT	Y		k10	k3
DLD	Y		k19	k4
DLG1	N	k20	k10	
DLG2	N	k3	k10	k4
DLG4	N		k21	k7
DLST	Y		k21	k4
DMTN	N			k20
DNAH17	N		k20	k20
DNAJA1	N	k21	k21	k4
DNAJA2	N		k19	k20

DNAJB2	N	k3	k21	
DNAJC5	N	k3		
DNAJC6	N	k2	k2	k7
DNM1L	N	k19	k10	k5
DNPEP	N	k2	k19	k4
DPP3	N		k19	k20
DPP6	N			k10
DPYS	Y			k21
DPYSL2	N		k21	k4
DPYSL3	N	k3	k19	k4
DPYSL4	N	k2		k4
DPYSL5	N	k3	k19	k4
DSTN	N	k7	k2	k2
DUSP3	N	k2		k4
DYNC1H1	N	k5		
DYNC1H2	N		k10	
DYNC1L1	N			k2
DYNLL1	N	k2	k19	k20
DYNLL2	N	k3	k19	k20
DYNLRB1	N		k20	k20
DYNLT3	N	k7	k5	
ECH1	N	k10		
ECHS1	Y		k19	k4
ECI1	Y		k20	k20
EEA1	N			k4
EEF1A1	N	k5	k21	k4
EEF1A2	N			k4
EEF1B2	N	k3	k21	k4
EEF1D	N		k19	k20
EEF1G	N	k7	k10	k3
EEF2	N	k5	k19	k4
EFHD2	N			k7
EHD1	N	k7	k2	k2
EHD3	N	k10	k10	k10
EIF2S1	N			k3
EIF2S2	N			k3
EIF3B	N			k3
EIF3J	N		k10	k3
EIF4A2	N	k3	k21	k21
EIF4B	N			k20
EIF4H	N			k19
EIF5	N	k5		k19

EIF5A2	N	k5	k5	k5
EIF5AL1	N		k19	k20
EMD	N			k10
EML1	N	k20	k20	k20
ENDOD1	N	k5	k2	k2
ENO1	Y		k19	k4
ENO2	Y		k21	k4
ENO3	Y		k21	k7
ENPP6	Y	k2	k19	k20
ENSA	N	k2	k19	k20
EPDR1	N		k19	k4
EPN1	N		k21	k20
EPS15L1	N		k3	k7
ERMN	N	k3	k21	k4
ERP44	N		k10	k3
ESD	Y	k19	k21	k4
ESYT1	N	k5	k10	k5
ETFA	Y		k21	k4
ETFB	Y		k10	
ETFDH	Y		k10	k5
ETHE1	Y			k2
EWSR1	N	k3		k7
EZR	N			k7
FABP3	Y	k2	k10	k7
FABP4	Y			k2
FABP5	Y	k3	k19	k20
FABP7	Y	k7	k10	k7
FAH	Y	k3	k19	k4
FAHD1	N		k19	k20
FAHD2B	N	k7		
FAM114A2	N	k10	k2	k10
FAM120A	N	k3		k7
FAM136A	N	k3	k19	
FAM162A	N	k3	k5	k7
FARSB	N	k7	k21	k4
FASN	Y	k5	k10	k10
FAU	Y			k2
FBXO2	N	k10	k10	k2
FETUB	N		k21	k21
FGA	N		k21	k4
FGB	N		k20	k4
FGF1	N		k19	k20

FH	Y		k21	k4
FHIT	N	k5	k5	k5
FHL1	N		k5	k7
FIS1	N	k7		k7
FKBP1C	N		k19	k4
FKBP2	N		k21	
FKBP3	N		k10	k3
FKBP4	N		k21	k4
FKBP8	N		k5	k10
FLNA	N	k10	k10	k5
FLNB	N		k10	
FLOT1	N	k20	k10	k10
FLOT2	N		k10	
FN3KRP	N	k3	k19	k20
FNBP4	N			k21
FSCN1	N		k19	k4
FTH1	N	k2	k19	k20
FTL	N		k21	k20
FUBP1	N		k21	
FUS	N		k2	k2
FXVD1	N	k3		
G3BP2	N		k2	k2
GABARAPL2	N	k5	k21	k21
GAD1	N	k10	k19	k4
GANAB	N	k3	k21	k4
GAPDH	Y		k21	k4
GARS1	N		k21	k4
GART	Y	k3	k10	k10
GBE1	Y		k10	k3
GC	Y		k21	k21
GCAT	Y	k10		
GCLC	Y		k21	
GCLM	Y	k3	k10	
GDA	Y	k2	k21	k10
GDAP1L1	N	k5	k2	k2
GDI1	N	k2	k19	k4
GDI2	N	k5	k19	k4
GFAP	N	k3	k10	k7
GFER	N			k3
GJA6P	N	k3	k21	
GJC2	N		k5	k5
GLO1	Y	k3	k19	k20

GLOD4	N	k3	k10	k4
GLRX	Y	k5	k10	
GLRX3	N	k10	k10	k5
GLRX5	N		k2	k5
GLS	Y			k2
GLTP	Y	k2	k19	k20
GLUD2	Y		k19	k4
GLUL	Y			k4
GMFB	N	k10	k21	k4
GMPR	Y		k21	k4
GMPR2	Y	k3		
GMPS	Y	k5	k5	
GNA11	Y	k5	k10	k5
GNAI1	Y	k10	k19	k19
GNAI2	Y		k10	k10
GNAO1	N		k19	k4
GNAQ	Y	k5		
GNB1	Y	k5	k10	k4
GNB2	Y	k2	k19	k4
GNB4	Y	k5	k10	k5
GNG12	Y		k20	k20
GNPDA1	Y			k21
GNPDA2	Y	k5	k19	k20
GOT1	Y		k19	k4
GOT2	Y	k3	k21	k4
GPD1	Y	k10	k19	k4
GPD1L	Y	k3	k21	k5
GPD2	Y	k2	k10	k5
GPHN	Y			k2
GPI	Y		k21	k4
GPM6B	N	k2		k2
GPX1	Y		k20	k20
GPX4	Y		k10	k5
GRB2	N	k3		k4
GRHPR	Y		k21	k4
GRIPAP1	N		k10	k5
GRN	N	k3	k7	k21
GRPEL1	N	k3	k7	k7
GSN	N		k21	k4
GSPT1	N	k3	k10	k5
GSR	Y		k19	k4
GSS	Y	k2	k2	k2

GSTA5	Y	k10	k19	k4
GSTM2	Y	k10	k19	k4
GSTM3	Y			k21
GSTM5	Y	k2	k19	k4
GSTO1	Y	k5	k10	k4
GSTP1	Y		k19	k20
GSTZ1	Y	k3	k5	k10
GUK1	Y	k7	k5	k7
H3-3A	N		k10	k10
HADH	Y	k10	k10	k4
HADHA	Y		k19	k4
HADHB	Y	k3	k10	k2
HAGH	Y		k20	k20
HAPLN1	N		k19	k20
HAPLN2	N		k5	
HARS1	N		k10	k7
HBA2	N		k20	k20
HBD	N	k5	k5	k4
HCN2	N	k7		k7
HCN4	N			k10
HDHD2	N		k19	k4
HEBP1	N	k10	k10	k5
HEPACAM	N	k2		
HEXB	Y	k5	k10	k5
HIBADH	Y	k3	k19	k20
HIBCH	Y	k2	k19	k4
HINT2	N			k4
HINT3	N	k3	k19	
HIRA	N	k10	k10	
HK1	Y		k10	k3
HMCN2	N	k2	k20	k4
HMGA1	N		k2	k7
HMGB1	N			k4
HMGCS1	Y	k5		k20
HNRNPA1L2	N		k20	k20
HNRNPA2B1	N	k2		k4
HNRNPA3	N		k21	
HNRNPAB	N			k4
HNRNPCL3	N		k2	k2
HNRNPD	N		k19	k20
HNRNPDL	N			k3
HNRNPH1	N		k21	k4

HNRNPK	N	k3	k10	k2
HNRNPL	N	k10		k21
HNRNPM	N		k3	k2
HNRNPU	N		k3	k3
HNRNPUL1	N			k3
HOOK3	N			k3
HPCA	N	k10	k19	k20
HPCAL1	N			k4
HPR	N	k3	k20	k21
HPRT1	Y	k5	k20	k20
HPX	N		k19	k4
HSBP1	N	k7		k7
HSP90AA1	Y	k3	k19	k20
HSP90AB1	N	k3	k19	
HSP90B2P	N		k19	
HSPA12A	N	k5	k21	k4
HSPA1B	N		k19	k5
HSPA1L	N			k3
HSPA4	N		k21	k4
HSPA5	N	k3	k10	k7
HSPA8	N		k21	k4
HSPA9	N		k21	k4
HSPB1	N			k3
HSPD1	N		k2	k2
HSPE1	N	k2		k7
HSPH1	N	k3	k19	k4
HUWE1	N		k10	k2
HYOU1	N		k2	k2
IARS2	N		k2	k7
ICAM5	N	k5		k2
IDH1	Y	k4	k21	k20
IDH2	Y	k3	k19	k4
IDH3A	Y	k5	k19	k4
IDH3G	Y		k20	k20
IDI1	Y			k3
IGHG4	N	k21	k10	k19
IGKC	N	k10	k10	k21
IGSF8	N	k3		k3
ILF3	N			k4
IMMT	N		k2	k2
IMPA1	Y	k7	k10	k21
IMPDH2	Y	k10		

IQSEC1	N			k7
IQSEC3	N	k3	k20	k4
ISCA2	N	k7	k10	k3
ISCU	Y		k10	
ISOC1	N	k2		
ISYNA1	Y	k2	k21	k4
ITPR3	Y	k3	k10	k7
IVD	Y	k19	k19	k4
JAM3	N	k7	k10	k7
JUP	N	k5	k5	
KANK4	N		k10	k10
KBTD11	N		k20	
KCNA2	N		k10	k7
KCNAB2	N	k5	k21	k4
KCNC3	N	k3	k5	k5
KCNJ10	N		k19	k19
KHDRBS1	N	k21	k21	k21
KHSRP	N		k2	k2
KIF1B	N			k19
KIF21A	N		k2	k2
KIF2A	N		k19	k20
KIF5B	N	k5	k19	k19
KIF5C	N	k5	k2	
KLC1	N		k19	k4
KLC2	N	k5	k21	k5
KNG1	N	k5	k5	k7
KPNB1	Y		k10	k10
KRAS	N		k2	k2
KRT1	N	k3		k21
KRT10	N	k20	k20	k20
KRT15	N	k3		k20
KRT19	N	k21	k10	
KRT2	N	k7		k7
KRT79	N	k4	k21	k20
KRT87P	N		k3	k7
L1CAM	N	k7	k10	k3
LACTB2	N		k5	
LAMP1	N	k3	k2	k2
LAMP2	N	k7		k20
LANCL1	N	k10	k10	k7
LANCL2	N		k10	
LBH	N			k5

LDB3	N		k5	
LDHA	Y	k2	k19	k4
LDHB	Y	k2	k21	k4
LETM1	N	k3	k21	k5
LGALS1	N		k19	k20
LGI1	N	k5	k10	k7
LGI3	N	k2	k5	k10
LIN7A	N		k2	k2
LIN7B	N			k3
LLGL1	N	k5	k10	k7
LMNA	N	k3		k7
LMNB1	N	k7		k2
LRP1	Y		k10	k7
LRPAP1	N		k20	k20
LRRC59	N		k21	k5
LTA4H	Y	k5	k21	k4
LY6H	N	k3	k3	k2
LYPLA2	N			k2
LYRM7	N			k5
M6PR	N		k19	
MAN2C1	Y	k21	k5	k10
MANEAL	N	k5		k3
MAOA	Y		k5	
MAP1A	N			k3
MAP1B	N		k21	
MAP1LC3A	N		k10	k3
MAP1LC3B2	N	k5		k3
MAP2K1	N	k10	k10	k10
MAP2K4	N			k3
MAP6	N	k2		k3
MAP6D1	N	k7	k2	k2
MAP7D2	N	k3	k2	k3
MAPK1	N	k7	k21	k10
MAPK3	N	k3	k21	k4
MAPRE1	N	k21	k19	k21
MAPRE2	N	k7	k10	k7
MAPRE3	N	k3		
MARCKSL1	N			k7
MAT2A	Y		k20	k20
MAT2B	Y	k3	k10	k7
MATR3	N		k19	k20
MB	N		k3	k7

MCCC2	Y	k5	k20	k20
MDH1	Y		k19	k4
MDH2	Y	k2	k21	k4
ME1	Y	k5	k19	k4
ME3	N	k10	k19	k5
MECP2	N			k5
MECR	N		k10	k10
METAP2	N			k2
MIF	N		k19	k20
MOBP	N	k3	k2	k2
MOG	N	k2	k2	k2
MPC1	Y	k3		
MPC2	Y	k5	k19	k4
MPI	N	k5	k19	k19
MPP1	N	k3	k2	k2
MPP2	N		k10	k5
MPST	N	k7		k20
MPZ	N		k21	k20
MRPL12	N			k3
MRPS36	N		k19	k20
MSN	N		k21	k4
MSRA	N	k5	k5	k7
MSRB2	N			k2
MTAP	Y		k20	k20
MTCH1	N	k3		
MTCH2	N		k10	k5
MTHFD1	Y	k5	k2	k2
MTPN	N		k19	k20
MYBPC2	N		k10	k2
MYEF2	N	k21	k10	k21
MYH1	N		k7	k7
MYH14	N	k2	k21	k21
MYH4	N		k5	k7
MYH6	N		k20	k20
MYH9	N		k10	k4
MYL1	N		k5	
MYL12B	N	k21	k10	k4
MYL3	N		k3	
MYL6	N		k19	k4
MYL6B	N			k3
MYLPF	N		k5	k7
MYO18A	N	k7	k2	k2

MYO1D	N	k7	k21	
MYO5A	N	k5		
MYO6	N			k2
NACA	N		k10	k7
NADK2	N	k5	k10	k21
NAE1	N	k3	k20	k20
NAGA	N	k3		
NAGK	N	k10		k10
NAMPT	Y	k10	k10	k21
NAP1L1	N	k7	k21	
NAP1L4	N	k5	k10	k7
NAP1L5	N	k7	k5	k4
NAPA	N	k7	k21	k4
NAPB	N	k3	k21	k4
NAPG	N		k21	
NARS1	N	k2	k19	k20
NAV1	N		k10	k3
NBEA	N	k5		k5
NCALD	N	k5		
NCAM1	N	k3	k21	k4
NCAN	Y			k20
NCDN	N			k5
NCEH1	Y	k5		
NCKAP1	N		k2	k2
NCKIPSD	N	k7	k20	k20
NCL	N		k10	k2
NDEL1	N		k19	k20
NDRG1	N		k19	k20
NDRG2	N	k5	k21	k4
NDRG3	N	k3	k19	k20
NDRG4	N		k19	k19
NDUFA10	Y	k2	k21	k4
NDUFA12	Y			k7
NDUFA2	Y	k3		
NDUFA3	Y	k5	k10	k5
NDUFA4	Y	k2		k7
NDUFA5	Y	k7	k21	
NDUFA6	Y	k5	k10	k10
NDUFA7	Y	k3		k3
NDUFA8	Y	k3	k19	k4
NDUFA9	Y		k10	k7
NDUFAB1	Y		k19	k20

NDUFAF2	Y	k3	k2	k2
NDUFB10	Y			k5
NDUFB11	Y	k3	k2	k2
NDUFB5	Y			k10
NDUFB6	Y	k5	k21	k4
NDUFB8	Y		k21	k21
NDUFB9	Y		k5	k7
NDUFC2-KCTD14	N	k3	k10	k3
NDUFS1	Y	k3	k10	k5
NDUFS2	Y	k5	k21	k21
NDUFS3	Y	k3	k10	k5
NDUFS4	Y		k19	k20
NDUFS6	Y	k3		
NDUFS7	Y		k21	k7
NDUFS8	Y		k10	k3
NDUFV1	Y	k2	k21	k20
NDUFV2	Y	k3	k10	k7
NDUFV3	Y	k3	k2	k7
NEBL	N		k19	k20
NEDD8	N		k19	k20
NEFL	N		k5	
NEFM	N			k4
NEGR1	N	k20		k20
NFASC	N	k3	k19	k4
NFU1	N		k3	
NIF3L1	N		k19	k4
NIPSNAP1	N		k19	k4
NIT1	N		k19	k20
NIT2	N	k10		
NME1	Y	k10	k19	k20
NME2	Y	k2	k10	k7
NMRAL1	Y		k2	k2
NMT1	N		k19	k4
NMT2	N	k10		
NOL3	N		k21	k21
NONO	N		k10	k5
NOVA1	N		k19	k19
NPC2	N	k5	k10	k10
NPEPL1	N			k3
NPEPPS	N	k3	k21	k4
NPM1	N		k21	k3
NPTN	N	k3		

NPTX1	N			k2
NQO1	Y		k20	k20
NQO2	N		k2	
NRCAM	N	k3	k21	k4
NRGN	N		k21	k20
NRIP2	N		k10	k10
NSF	N	k3	k21	k4
NSFL1C	N			k20
NT5C	Y		k10	k7
NT5C2	Y		k10	k5
NT5M	Y	k21	k21	
NUCB1	N		k19	k4
NUDC	N		k2	k2
NUDT3	Y	k21	k21	k21
NUP188	Y		k2	k2
NUTF2	N		k20	k20
OAT	Y		k19	k20
OGDH	Y		k21	k4
OLA1	N	k10	k21	k21
OPA1	N			k5
ORM2	N		k21	k21
OSTF1	N		k19	k20
OTUB1	N	k3		
OXCT1	Y	k10	k21	k4
P4HB	Y	k10	k10	k21
PABPC3	N	k3	k10	k4
PACSIN1	N		k10	k3
PACSIN2	N		k21	k7
PADI2	N	k2	k19	k4
PAFAH1B1	N	k10	k21	k4
PAFAH1B2	N	k5	k10	k7
PAFAH1B3	N	k5	k10	k3
PAK2	N	k3	k10	k3
PALM	N	k3		k7
PARG	N		k19	k20
PARK7	N		k21	k4
PC	Y	k5	k21	
PCBD1	Y		k19	k19
PCBP1	N		k19	k20
PCBP2	N			k5
PCBP3	N	k3	k2	
PCCA	Y	k3	k19	k20

PCCB	Y	k10	k21	k21
PCK2	Y		k21	k21
PCLO	N	k7		k5
PCMT1	N	k3		
PCNP	N		k20	k20
PCP4	N		k19	k20
PCP4L1	N			k21
PCSK1N	N			k4
PDAP1	N			k2
PDCD6	N	k5	k5	k5
PDCD6IP	N	k5	k5	k5
PDHA1	Y		k10	k3
PDHB	Y		k19	k19
PDHX	Y		k19	k20
PDIA3	N		k21	k4
PDIA4	N			k20
PDIA6	N		k10	
PDPR	Y	k5		k5
PDXK	Y		k19	k4
PDXP	N		k5	k4
PEA15	N		k21	
PEBP1	N		k21	k4
PEPD	N			k4
PEX19	N	k7	k21	k7
PEX5L	N		k10	k5
PFDN1	N		k19	k20
PFDN2	N		k20	k20
PFDN5	N	k10	k21	k19
PFKL	Y	k5	k19	k20
PFKM	Y		k21	k4
PFKP	Y	k5	k19	k4
PFN1	N	k5	k20	k20
PFN2	N		k19	k4
PGAM2	Y		k5	k7
PGAM4	N	k2	k19	k20
PGD	Y		k21	k4
1.00 PGK	Y		k21	k4
PGLS	Y		k10	
PGM2	Y	k5	k19	k4
PGP	N	k10	k21	k4
PGRMC2	N		k2	
PHB2	N		k19	k19

PHPT1	N	k3	k19	k4
PHYHIPL	N		k2	k2
PIN1	N	k2	k10	k3
PIP4K2A	Y		k21	k4
PIP4K2B	Y		k10	k10
PIP5K1C	Y			k10
PIR	N			k21
PITHD1	N	k7	k10	k10
PITPNA	N	k3	k19	k19
PITRM1	N	k3	k20	k20
PKIA	N		k10	k7
PKM	Y		k19	k4
PLBD2	N	k5	k5	k5
PLCL1	N		k2	k2
PLD3	Y			k3
PLEC	N	k2		k2
PLEKHB1	N			k2
PLIN3	Y		k19	k20
PLP1	N	k10	k19	k4
PLS1	N	k7	k5	k7
PLS3	N	k7	k10	k2
PLXNA4	N	k5	k5	k5
PMM1	N	k7	k10	k21
PMPCA	N	k7		
PNPO	Y			k4
PPA1	N			k4
PPA2	N	k3	k19	k20
PPFIA3	N		k10	k3
PPIA	N		k21	k4
PPIB	N	k3	k10	k5
PPID	N	k3	k21	k4
PPIF	N		k5	k3
PPM1A	N		k20	k20
PPM1E	N		k10	k5
PPM1H	N			k7
PPME1	N		k20	k20
PPP1CA	Y		k19	k19
PPP1CB	Y	k5	k19	k19
PPP1R11	N		k20	k20
PPP1R14A	N		k5	k7
PPP1R1B	N			k4
PPP1R7	N	k10	k19	k4

PPP1R9B	N			k3
PPP2CA	Y		k21	k4
PPP2R1A	Y	k5	k21	k4
PPP2R1B	Y		k5	k5
PPP3CA	N	k5	k19	k4
PPP3CC	N			k3
PPP3R1	N	k2	k19	k4
PPP5C	N		k21	
PPT1	Y			k5
PRDM16	N		k10	k10
PRDX1	N	k5	k21	k4
PRDX2	N		k21	k4
PRDX3	N	k19	k20	k20
PRDX5	N	k5	k19	k4
PRDX6	N		k19	k20
PREP	N		k20	k20
PREPL	N	k5		
PRKACA	Y	k10	k2	k2
PRKAR1A	Y			k3
PRKAR1B	Y			k5
PRKAR2A	Y			k5
PRKAR2B	Y		k10	k10
PRKCA	Y	k7		k21
PRKCB	N	k3	k21	k4
PRKCG	N	k7	k21	k10
PRKCSH	N			k4
PRNP	N		k10	k2
PRPH	N	k10		
PRPS1	Y	k5		
PRPSAP1	N		k20	k20
PRPSAP2	N	k10		
PRRT2	N	k3		k7
PRX	N		k21	
PSAP	Y		k21	k4
PSAT1	Y		k19	k4
PSD3	N	k5		k19
PSIP1	N			k7
PSMA1	Y	k10	k19	k4
PSMA2	Y		k19	k4
PSMA3	Y	k10	k19	k4
PSMA4	Y	k5	k19	k4
PSMA5	Y	k10	k19	k20

PSMA7	Y		k21	k4
PSMB1	Y	k5	k21	k4
PSMB2	Y	k10	k21	k4
PSMB4	Y	k3	k19	k20
PSMB5	Y	k2	k19	k20
PSMB6	Y		k21	k21
PSMB7	Y	k5	k19	k20
PSMC2	Y		k10	k5
PSMD2	Y		k19	
PSMD4	Y		k19	
PSMD5	Y		k10	k10
PSMD9	Y			k2
PSMG2	N		k10	k5
PTGDS	Y			k4
PTGES3	Y	k3	k19	k20
PTGES3L-AARSD1	N	k20	k19	k20
PTMA	N	k10	k19	k4
PTPN11	N		k19	k20
PTPRZ1	N	k10	k19	k4
PTS	Y		k10	k7
PURA	N		k19	k20
PVALB	N		k21	k4
PYCR3	N			k21
PYGB	Y	k5	k19	k4
PYGL	Y	k10	k5	k10
PYGM	Y		k19	k4
PZP	N	k5	k21	k4
QDPR	Y	k3	k20	k20
QKI	N			k3
RAB10	N		k19	k4
RAB14	N		k10	k10
RAB1C	N		k21	k4
RAB21	N	k5	k10	k5
RAB27B	N		k10	k5
RAB2A	N	k3	k10	k7
RAB3A	N			k4
RAB3C	N	k10	k10	
RAB5A	N	k5	k19	k4
RAB5B	N		k5	
RAB5C	N	k21	k10	k21
RAB6A	N	k7	k10	k5
RAB6B	N	k7	k3	k3

RAB7A	N		k19	k4
RABGGTA	N		k10	k5
RAC1	N		k19	k20
RAD23A	N	k10	k5	k4
RAD23B	N		k19	k4
RALA	N	k2	k19	k4
RANBP1	N		k20	k20
RAP1A	Y		k21	
RAP1GAP	N			k19
RASA4B	N	k3	k10	k3
RBBP9	N	k7	k10	k7
RBM3	N		k10	k3
RBMX	N	k3		
RBP1	Y	k3	k20	k4
RBX1	N			k21
RCN2	N	k5	k19	k4
REEP2	N			k4
REEP5	N		k10	k2
RGS6	N	k10	k10	k21
RHOA	N		k19	k20
RHOB	N			k4
RHOG	N		k10	k2
RNF214	N		k21	
RNH1	N	k10	k21	k21
RNMT	N		k10	k10
RNPEP	N	k5	k21	k21
ROCK2	N		k2	
RPH3A	N		k2	k2
RPL10A	Y		k10	
RPL10L	N	k5	k5	
RPL12	Y		k19	k20
RPL13	Y		k10	
RPL15	Y			k2
RPL18	Y		k2	k3
RPL18A	Y		k10	k10
RPL26	Y	k5		k4
RPL27A	Y			k10
RPL39	Y			k3
RPL4	Y	k3		k2
RPL6	Y	k2		
RPL7A	Y	k2	k2	k5
RPLP1	Y	k2	k10	k4

RPLP2	Y		k19	k4
RPS12	Y		k2	k2
RPS14	Y	k7	k2	k2
RPS19	Y		k2	k2
RPS2	Y		k10	k2
RPS20	Y		k19	k19
RPS21	Y		k20	k20
RPS25	Y	k3	k10	
RPS27	Y		k21	k10
RPS27A	Y		k19	k4
RPS28	Y		k10	k7
RPS3	Y		k10	k5
RPS4Y2	N			k5
RPS7	Y			k10
RPS8	Y		k10	k2
RPSA	Y	k2	k19	k20
RRBP1	N		k3	k7
RTN1	N		k2	k2
RTN3	N		k10	k7
RTN4	N	k3	k21	k7
RUFY3	N	k5	k19	k4
S100A1	N	k5	k21	k4
S100A13	N		k19	k20
S100A6	N			k20
S100A8	N		k21	k5
S100A9	N		k5	
S100B	N		k21	k4
SACM1L	Y		k2	k10
SALL3	N	k2	k5	
SARNP	N		k2	k2
SARS1	N		k19	k4
SARS2	N		k5	k7
SAT2	N		k10	
SCCPDH	N	k3		k2
SCG2	N		k19	k4
SCG5	N		k19	k4
SCOC	N		k10	k5
SCP2	Y		k19	k20
SCRN1	N	k3	k19	k4
SCRN3	N	k2	k21	k4
SDHA	Y	k2	k21	k4
SDHAF2	N	k5	k21	

SDHB	Y		k19	k20
SELENBP1	N	k3	k19	k20
SERPINA1	N		k19	k20
SERPINA3	N	k21	k21	k4
SERPINB1	N	k5	k19	k4
SERPINB6	N		k19	k20
SERPINC1	N	k5	k5	k7
SET	N	k3	k19	
SETD7	N	k5		k5
SFPQ	N		k10	k3
SFXN3	N	k3		
SFXN5	N	k10	k10	
SGIP1	N		k2	k2
SGTA	N	k3	k20	k20
SH3BGRL	N		k10	
SH3BGRL2	N	k3	k5	k7
SH3BGRL3	N	k3	k21	k4
SH3GL1	N			k3
SH3GLB2	N		k2	k2
SIRT2	N		k2	k2
SLC12A2	N	k3	k21	k4
SLC12A5	N	k3	k10	k5
SLC17A6	N	k7		k4
SLC1A2	N	k2	k19	k4
SLC1A3	N	k2	k10	k2
SLC1A4	N	k20	k19	k20
SLC25A1	Y	k10	k10	k5
SLC25A11	Y	k5	k21	k21
SLC25A12	Y		k19	k4
SLC25A22	N		k10	k5
SLC25A3	N	k19	k19	k4
SLC25A4	Y		k19	k4
SLC25A46	N		k10	k10
SLC25A5	Y	k2	k19	k4
SLC2A1	Y		k10	
SLC32A1	N		k21	k4
SLC3A2	N	k3		
SLC44A1	Y	k2	k10	k2
SLC4A4	N	k3	k10	k7
SLC6A1	N	k3	k10	k7
SLC6A11	Y	k2		
SLC6A5	N	k3	k19	k4

SLC6A9	N		k10	k5
SLC7A5	N	k3	k2	k2
SMS	Y	k5	k10	k21
SNAP25	Y	k2	k19	k4
SNAP47	N	k5		k10
SNAP91	N		k19	k20
SNCA	N			k4
SNCB	N		k19	k20
SND1	N	k10	k10	k10
SNPH	N		k19	k19
SNRPB	N		k5	k7
SNX12	N		k10	k3
SOD1	N		k20	k20
SOD2	N		k19	k20
SORBS1	N	k7	k19	k20
SPARC	N			k4
SPARCL1	N		k19	k20
SPART	N		k10	
SPR	Y	k5	k10	k10
SPRR1B	N	k5	k5	
SRI	N		k21	
SRM	Y		k19	k4
SRSF1	N		k2	k2
SRSF4	N			k3
SRSF5	N			k7
SRSF7	N			k3
SSB	N			k20
ST13P5	N	k3	k19	k4
STARD10	N	k5	k19	k4
STIP1	N		k21	
STK39	N	k2	k2	k2
STMN1	N			k20
STRAP	N	k3	k2	k2
STX12	N		k19	k19
STX1A	Y	k7	k21	k3
STX1B	N		k19	k4
STX7	N	k3	k10	k7
STXBP1	Y	k3	k21	k4
SUB1	N	k10	k10	
SUCLA2	Y	k10	k10	k7
SUCLG1	Y		k10	k4
SUCLG2	Y		k21	k4

SUGT1	N	k10		
SUMO1	N			k7
SUMO4	N		k20	k20
SUOX	Y	k3	k10	k3
SV2A	N	k7	k19	k4
SV2B	N			k5
SVIP	N	k3		k7
SYN1	N	k3		
SYN2	N		k2	
SYNCRIP	N		k21	k4
SYNGAP1	N			k7
SYNGR1	N	k7	k10	k2
SYNGR3	N		k10	k5
SYNGR4	N		k5	k3
SYNJ1	Y	k3	k2	k2
SYNPO	N			k3
SYNRG	N	k3		
SYP	N	k5	k10	k3
SYPL1	N		k10	
SYT1	N	k3	k10	k5
SYT2	N	k5	k10	k21
SYT5	Y			k21
TAGLN2	N		k19	k20
TAGLN3	N		k19	k4
TALDO1	Y		k19	k20
TARDBP	N			k5
TBC1D10B	N		k10	k7
TBC1D8B	N		k5	
TBCA	N		k21	k4
TBCB	N		k10	k3
TCP1	N	k5	k10	k10
TF	N	k10	k19	k4
TGM2	N		k10	k7
THEM4	Y		k10	
THY1	N			k4
TIMM13	N	k3	k19	k20
TIMM44	N			k5
TIMM8A	N		k2	k2
TIMM9	N		k20	k20
TJP2	N		k10	k5
TKT	Y	k3	k21	k4
TLN1	N		k2	k5

TLN2	N		k2	
TMOD1	N		k10	
TMOD2	N	k3	k21	k4
TMPRSS13	N		k10	k7
TMSB10	N			k3
TMSB4Y	N			k3
TMX4	N		k10	
TNNC2	N	k5		k5
TNNI2	N		k5	k7
TNNT3	N		k5	
TNR	N		k21	k4
TOLLIP	N		k19	k20
TOM1	N	k2	k2	k2
TOM1L2	N		k5	k3
TOMM70	N		k10	k2
TPD52	N	k2	k2	k7
TPD52L2	N	k7		k2
TPI1	Y		k21	k4
TPM1	N		k5	
TPM2	N		k5	
TPM3	N			k4
TPM4	N	k5	k5	k4
TPP2	N		k20	k20
TPPP3	N			k20
TPR	Y		k10	
TPRG1L	N		k5	
TPT1P8	N	k5	k19	k20
TRIAP1	N	k10		k2
TRIM2	N		k10	k2
TSC22D1	N	k3	k20	k20
TSPAN2	N		k21	k4
TSR2	N		k10	
TST	Y		k20	k20
TTN	N	k10	k19	k19
TTR	Y	k3	k19	k20
TTYH1	N	k7	k2	k2
TUBA1A	N	k5	k19	k4
TUBA4A	N	k2	k19	k4
TUBB	N		k19	k4
TUBB2A	N	k5	k21	k4
TUBB2B	N		k10	k21
TUBB3	N	k5	k19	k4

TUBB4A	N	k5	k19	k4
TUBB4B	N	k5	k20	k20
TUBB6	N	k2	k19	
TUFM	N		k21	
TXN	Y	k2	k19	k20
TXNDC12	N			k21
TXNDC17	N		k20	k20
TXNDC5	N	k3	k10	k5
TXNL1	N	k10	k19	k4
TXNRD1	Y	k10	k19	k4
TXNRD2	N	k3	k10	k7
UBA1	N	k5	k19	k4
UBA5	N		k10	k10
UBAP2L	N	k5	k10	k5
UBE2D3	N	k3		k3
UBE2L3	N		k19	k20
UBE2N	N	k2	k19	k20
UBE2V1	N	k5		k3
UBE2V2	N	k10	k10	k7
UBQLN1	N			k7
UBQLN2	N	k2	k21	k4
UBQLN4	N		k10	k7
UBXN1	N	k10		k20
UHL1	N		k21	k4
UHL3	N	k4	k20	k20
UFM1	N	k5	k5	k5
UQCR10	Y	k5		
UQCRB	Y		k2	k2
UQCRC1	Y		k19	k20
UQCRC2	Y		k19	k4
UQCRFS1P1	N			k4
UQCRHL	N			k3
UQCRQ	Y		k10	k3
USP5	N		k10	k4
USP7	N	k5	k5	k5
VAMP1	N		k19	k20
VAMP2	Y	k3	k10	k7
VAPA	Y		k10	k5
VAPB	Y			k3
VARS1	N		k10	k3
VAT1	N		k19	
VAT1L	N	k5	k19	k19

VBPI	N		k20	k20
VCAN	Y			k4
VCL	N		k2	k2
VCP	N		k21	k4
VDAC1	N		k19	k4
VDAC2	N		k10	k21
VDAC3	N	k7		k2
VIM	N	k2	k10	k7
VPS26B	N			k19
VPS29	N	k5	k2	k2
VPS35	N	k5	k10	k7
VSNL1	N	k2	k19	k4
WARS1	N	k4		k2
WDR1	N		k19	k20
WNK2	N		k10	k7
XPNPEP1	N		k21	k4
XRCC1	N			k4
YARS1	N	k3	k21	k4
YKT6	N	k2	k2	k2
YWHAB	N		k19	k20
YWHAE	N		k10	k7
YWHAH	N		k19	k4
YWHAQ	N		k19	k20
ZADH2	N			k3
ZRANB2	N			k3
ZYX	N			k20

Table S3. k-cluster assignments in each treatment group for quantified proteins of the Vagus.

Proteins identified in the Metabolism Reactome pathway (R-HSA-1430728) are highlighted in blue.

Gene names	Metabolism	MI	MIRTX	RTX
ACADL	Y	k2	k2	
ACADM	Y	k2	k2	
ACADS	Y		k10	
ACADVL	Y	k5	k10	
ACAT1	Y	k5	k10	
ACAT2	N	k5	k10	
ACLY	Y	k5	k10	k2
ACO2	Y	k2	k2	
ACOT2	Y		k10	
ACPI	N	k10	k10	
ACTB	N		k2	
ACTN4	N	k5	k10	
ADD1	N		k10	
AHCY	Y	k5	k5	k5
AHSG	N	k2		
AK1	Y	k5	k10	
AK2	Y		k10	
AKAP12	N	k2	k2	k2
AKR1B1	Y		k2	k2
ALDH1A1	Y	k5		k5
ALDH6A1	Y		k2	
ALDOA	Y	k2	k10	k2
ALDOC	Y	k2	k2	
ANK3	N	k2		
ANP32D	N	k10	k10	
ANXA2P2	N	k2	k2	
ANXA5	N	k10	k10	
APOA4	Y	k2		
APOB	Y	k10		
ARF3	Y	k10	k10	k10
ARHGDI1	N	k2	k2	k2
ASAP2	N	k10	k10	k10
ASPA	Y	k2	k10	
ASS1	Y	k2	k10	k5

ATOX1	N			k2
ATP1A1	N	k2	k10	k2
ATP1A2	N	k2	k2	k2
ATP1A3	N	k2	k2	k2
ATP1B1	N	k5	k10	k10
ATP1B2	N			k5
ATP2A2	N	k5	k5	
ATP5F1A	N	k2	k10	
ATP5F1B	N	k2	k10	k2
ATP5F1C	N	k5		
ATP5F1D	N	k5		
ATP5ME	N		k5	
ATP5PD	N	k5	k5	k10
ATP5PF	N			k2
ATP5PO	N	k5	k10	k10
ATP6V1B2	N	k10	k10	
BAG3	N	k5	k10	k10
BASP1	N		k5	
BSG	Y	k5	k10	k5
C1QBP	N	k10	k10	
CA1	Y	k2		
CA2	Y		k2	
CA3	Y	k2	k2	
CALM3	N	k2	k5	k5
CALR	N		k10	k10
CALU	N	k5	k5	k5
CAP1	N		k5	k10
CAPG	N	k5	k10	
CAPN2	N		k10	k5
CAPNS1	N	k10	k10	k10
CAPZA1	N	k5	k10	
CAPZB	N		k2	
CAV1	Y	k5	k10	
CBR1	Y	k2	k2	
CCT3	N	k5	k10	
CD81	N		k2	k2
CD9	N		k10	
CES1	Y	k2	k10	k5
CFD	N	k5	k10	
CFL1	N	k2		
CFL2	N	k2		
CHCHD3	N		k2	

CHL1	N		k10	k2
CKB	Y	k2	k2	k2
CKMT1B	N		k10	k10
CLTA	N	k10	k10	k10
CLTB	N	k2		
CLTC	N	k5	k10	k5
CMPK2	N		k10	
CNDP2	Y	k5	k5	
CNP	N	k2		
COL15A1	N	k5	k10	
COL1A1	N	k2		
COL1A2	N		k2	
COL28A1	N		k5	
COL3A1	N	k2	k2	
COL5A1	N	k2		
COL5A2	N		k2	
COL6A1	N	k5	k10	k5
COQ9	N		k10	
CORO1A	N		k10	k10
COTL1	N		k2	
COX5A	Y		k2	
COX5B	Y		k10	
COX6B1	Y	k5		
CP	N			k2
CRIP1	N			k10
CRK	N		k10	
CRMP1	N	k10		
CS	Y	k2		
CSRP1	N		k2	
CTSB	N	k2		
CYB5B	N	k5	k10	k10
CYC1	Y	k5	k10	
DBI	N	k2		
DCN	Y	k2	k2	k2
DCTN2	N	k2	k10	k2
DDAH1	Y		k2	
DDAH2	Y	k2	k2	
DDTL	N	k5	k10	k10
DECR1	Y	k5	k10	k5
DLAT	Y	k5	k10	
DLD	Y	k2	k10	
DMD	N	k5		

DMTN	N	k10		
DNASE1L1	N		k10	k10
DNM1	N		k10	k10
DPEP1	Y	k10	k10	k10
DPT	N	k5	k10	k10
DPYSL2	N	k2	k10	k2
DPYSL3	N		k2	
DPYSL5	N	k2	k2	k2
DRP2	N	k2	k2	
DSP	N	k5	k10	
DSTN	N			k2
DYNLRB1	N	k5		
ECHS1	Y	k5	k10	
ECI1	Y	k5	k10	
EEF1A1	N	k2	k2	k2
EEF1A2	N	k10	k10	k5
EEF1B2	N		k10	k10
EEF1D	N	k5	k10	
EHD2	N			k5
EIF4B	N		k5	
EIF4H	N	k5		
EIF5AL1	N	k5	k10	k2
ENO1	Y	k2	k10	
ENO2	Y	k2	k10	
ENTPD2	N	k2	k2	
ETFA	Y	k2	k2	
ETFB	Y	k5	k10	
FABP3	Y		k10	
FABP4	Y	k2	k10	
FABP5	Y	k2	k2	
FASN	Y	k2		
FBLN5	N		k10	
FBXL22	N	k5		
FGF1	N	k10	k5	k10
FGG	N	k5	k10	
FHL1	N	k5		
FKBP1C	N	k2	k2	
FLNA	N	k5	k10	k10
FMOD	Y	k5	k10	k10
FTH1	N	k5	k10	k10
FTL	N	k5	k10	k5
GAPDH	Y	k2	k2	k2

GC	Y	k2		
GDI1	N			k2
GFAP	N	k10	k10	k10
GLO1	Y	k2	k10	
GLUD2	Y	k2		
GLUL	Y			k2
GMFB	N		k10	
GNAO1	N	k10	k10	k10
GNB1	Y		k2	
GNB2	Y	k2		
GNG2	Y	k2	k2	
GOT1	Y	k10	k10	
GOT2	Y	k2	k10	k2
GPD2	Y		k10	
GPI	Y	k2	k2	k2
GRB2	N	k10	k10	
GRPEL1	N	k5	k10	
GSN	N		k2	
GSTM5	Y	k2	k2	k2
GSTP1	Y	k5		
H3-3A	N		k2	
HADHA	Y	k5		
HADHB	Y	k2	k2	
HDGF	N	k2	k2	
HMGB1	N	k2		
HNRNPA2B1	N	k2	k2	k2
HNRNPA3	N	k2	k10	
HNRNPAB	N			k2
HNRNPK	N	k2		k2
HSP90AA1	Y	k5	k10	k10
HSP90AB1	N	k2	k2	k2
HSPA1B	N			k10
HSPA1L	N		k10	k10
HSPA4	N	k5		
HSPA5	N	k2	k2	
HSPA8	N	k2	k2	k2
HSPA9	N		k2	
HSPD1	N	k2	k2	
HSPE1	N	k5		
HSPG2	Y	k2	k2	
HSPH1	N	k10	k5	k10
IDH1	Y	k2	k2	k2

IDH3A	Y		k2	
INA	N	k2	k2	k2
ITGA6	N		k10	
ITGB4	N	k2	k10	k2
IVD	Y	k10		
KHSRP	N	k5		
KNG1	N	k2		
KRT15	N	k2		k10
KRT2	N	k10	k10	k10
KRT5	N		k2	
KRT79	N		k10	k10
KRT8	N	k10	k10	k10
L1CAM	N		k5	k2
LAMA2	N	k2		
LAMA4	N	k2	k2	
LAMB1	N	k2	k10	k2
LAMB2	N	k2	k2	
LAMC1	N	k2	k2	k2
LAP3	N	k5	k10	k10
LDHA	Y	k2	k2	k2
LDHB	Y	k2	k10	k5
LIN7C	N	k2		
LMNA	N	k2	k2	
LMNB1	N	k2	k2	
LMNB2	N	k10	k10	
LUM	Y	k5		
MAG	N			k5
MAP1A	N		k5	k2
MAP1B	N	k2	k10	k2
MAP6	N	k2		
MAPT	N	k5		k2
MCAM	N	k2	k10	k2
MDH1	Y	k2	k10	
MDH2	Y	k2	k10	k2
ME1	Y	k2		
MECP2	N	k5		
MFAP5	N	k5	k10	
MIF	N	k5		
MSN	N	k2	k10	
MT3	Y			k2
MTPN	N	k5		
MYH10	N		k5	

MYH9	N		k10	
MYL12B	N	k2	k2	k2
MYL3	N	k2		
MYL6	N	k5		k10
MYO1C	N	k5	k10	k5
NAP1L1	N	k10	k10	k5
NCAM1	N	k10	k10	k10
NCL	N	k5	k10	k2
NDRG1	N	k2	k10	
NDUFA2	Y	k5		
NDUFS1	Y		k10	
NDUFS4	Y		k10	
NDUFS5	Y	k2		
NDUFV2	Y	k10	k10	
NEDD8	N	k5	k10	k10
NEFH	N	k2	k2	
NEFL	N	k2	k2	k2
NEFM	N	k2	k10	k2
NID1	N	k2	k10	k5
NME2	Y	k2	k10	
NPM1	N	k5	k10	k5
NSFL1C	N	k10	k10	k2
NUDC	N	k2		
OGDH	Y	k10		
ORM2	N		k10	
PAFAH1B1	N	k2	k2	k10
PAFAH1B2	N	k5	k10	k5
PALM	N	k2	k10	
PARK7	N	k2	k10	k2
PCBP1	N		k2	
PCP4	N	k5		k10
PDHA1	Y	k5	k10	k10
PDHB	Y	k2	k10	k2
PDIA3	N		k10	
PDIA4	N	k2	k10	k2
PDIA6	N	k2	k10	k2
PEBP1	N	k2	k10	k2
PFN1	N	k5	k10	
PFN2	N	k5	k10	k10
PGAM4	N	k5		
PGD	Y	k5		k2
1.00 PGK	Y	k2	k10	

PHB	N	k5	k10	
PKM	Y	k5	k2	k2
PLEC	N		k2	
PMP2	N	k5		
PPA1	N	k5	k10	
PPIA	N	k2	k10	
PRDX1	N	k2	k2	k2
PRDX2	N	k2	k2	k2
PRDX3	N	k5		
PRDX5	N	k5	k10	
PRDX6	N	k10	k10	
PRELP	Y	k2	k2	
PRKCSH	N	k10	k10	
PRPH	N	k2	k2	
PRX	N	k2	k2	
PSAP	Y	k2	k5	k10
PSMA1	Y	k2	k2	
PSMA5	Y	k10	k10	
PSMB6	Y	k5	k10	
PSMB7	Y			k10
PTGES3	Y		k10	k10
PTMA	N	k10	k10	
PZP	N	k5		
RAC1	N		k2	
RAD23B	N	k5	k10	k10
RBP1	Y	k5		
RDX	N		k5	
RHOA	N	k2	k2	
RPL13	Y		k2	
RPLP2	Y			k5
RPS25	Y	k5	k10	
RPS8	Y	k5		
RSU1	N	k5		
RTN4	N	k2	k10	k2
S100A10	N	k5		
S100A11	N		k2	
S100A13	N		k2	
S100A4	N	k5		
S100A6	N	k2	k2	k2
S100B	N	k5		k10
SAA1	N	k10		
SCG2	N	k5		

SCGB1A1	N	k5		
SCRN1	N		k10	
SDHA	Y	k5	k10	
SDHB	Y	k2		
SELENBP1	N	k5	k10	
SERPINA1	N	k2	k2	
SERPINB6	N		k10	k10
SERPINH1	N		k10	
SLC25A4	Y	k2	k2	
SLC25A5	Y	k5	k10	
SLC9A3R1	N	k2	k2	
SNAP25	Y	k2		k2
SOD2	N	k5	k10	
SORBS1	N			k10
SORD	Y	k5		
SRI	N	k5	k10	k10
SRSF1	N	k5	k10	k5
SRSF3	N			k10
SRSF4	N	k5	k10	k5
ST13P5	N			k10
STIP1	N	k2	k2	
STXBP1	Y	k5		
SUCLG1	Y	k5	k10	
SUMO4	N	k2		k5
SYNM	N	k2	k10	k2
TAGLN	N	k5	k10	k10
TAGLN2	N	k2		
TAGLN3	N		k2	k2
TALDO1	Y	k5		
TAX1BP3	N		k10	
TBCA	N	k5	k10	
TF	N	k2	k2	
TGFBI	N	k2	k10	
THY1	N	k5	k10	k10
TKT	Y	k2	k2	
TLN1	N		k10	k10
TMPO	N	k2	k2	
TMPRSS13	N	k2		
TMSB10	N	k5		
TNNI3	N		k2	k5
TPM1	N	k2		
TPM3	N	k2	k2	

TPM4	N	k2	k2	
TPPP3	N	k2		
TPT1P8	N	k5	k10	k10
TUBA1A	N	k2	k10	k5
TUBA4A	N	k2	k10	k2
TUBB	N	k2	k10	k10
TUBB2A	N	k5	k10	k10
TUBB2B	N		k5	k2
TUBB3	N		k2	
TUBB4A	N		k10	k10
TUBB4B	N	k2	k2	k2
TUFM	N	k5	k10	
TXN	Y	k5		
TXNL1	N	k5	k10	k10
UBA1	N	k5	k10	k5
UBA52	Y	k2	k2	k2
UCHL1	N	k2		
UQCRC1	Y	k2	k10	k2
UQCRFS1P1	N		k10	
UQCRHL	N	k2		
USP5	N	k5	k10	
VAT1	N			k5
VAT1L	N		k10	
VCL	N	k2	k2	
VCP	N	k2	k2	
VDAC1	N	k5		
VIM	N	k2	k2	
VWA1	N	k5	k10	
WDR1	N		k2	
YWHAE	N	k2	k10	k2
YWHAG	N	k2	k10	k2
YWHAH	N	k2	k10	k2
YWHAQ	N	k2	k2	
YWHAZ	N	k2	k2	
ZYX	N		k10	

Table S4. k-cluster assignments in each treatment group for quantified proteins of the medulla oblangata (MO). Proteins identified in the Metabolism Reactome pathway (R-HSA-1430728) are highlighted in blue.

Gene Names	Metabolism	MI	MIRTX	RTX
AAK1	N		k16	k11
AARS1	N	k22	k16	k23
ABAT	N	k22	k16	k11
ABCE1	N	k22	k16	k23
ABHD12	N	k16	k16	k23
ABI1	N	k14	k16	k22
ABLIM1	N	k14	k16	k11
ABLIM2	N	k16	k16	k11
ACAA1	Y	k14	k22	k17
ACAA2	N	k16	k16	k11
ACAD9	Y	k16	k16	k11
ACADL	Y	k16	k16	k11
ACADM	Y	k16	k16	k11
ACADVL	Y	k16	k16	k11
ACAN	Y	k14		k11
ACAT1	Y	k16	k16	k11
ACAT2	N	k17	k16	k23
ACIN1	N	k17	k16	k11
ACLY	Y	k22	k16	k23
ACO2	Y	k16	k16	k11
ACOT11	Y	k22	k16	k23
ACOT2	Y	k16		k11
ACOT7	Y	k22		k23
ACOT9	Y	k16		k11
ACP1	N	k17	k14	k23
ACP2	N	k16	k16	
ACSBG1	Y	k22	k16	k11
ACSF2	Y	k17	k17	k17
ACSL6	Y	k22	k16	k23
ACTB	N	k22	k16	k11
ACTBL2	N	k11		
ACTC1	N	k17	k17	k23
ACTN1	N	k22		k23

ACTN4	N	k22	k16	k11
ACTR1A	N	k22	k16	k23
ACTR1B	N	k17	k22	k23
ACTR2	N	k22		k23
ACTR3	N	k22	k16	k23
ACYP1	N	k22	k22	k11
ACYP2	N	k22	k16	k23
ADAM22	N	k16	k16	k11
ADAM23	N	k16		k11
ADD1	N		k16	k11
ADD2	N	k16	k16	k11
ADD3	N	k16	k16	k11
ADH5	Y	k22	k16	k23
ADK	Y	k16	k16	k11
ADO	Y	k16	k16	k11
ADRM1	N	k16	k16	
ADSL	Y	k22		k22
ADSS1	N	k16	k14	k23
ADSS2	N	k22		k23
AFAP1	N			k11
AFG3L2	N	k16	k16	k22
AGAP3	N	k16	k16	k11
AGFG1	N	k22	k16	k11
AHCY	Y	k22	k16	k23
AHCYL1	Y	k22	k16	k11
AHCYL2	N	k22	k16	k11
AHI1	N	k16		
AHSA1	N	k17	k14	k23
AHSG	N	k11	k17	k22
AIMP1	Y	k16		k11
AIP	N	k16	k16	k11
AK1	Y	k22		k11
AK2	Y	k17		k23
AK3	N	k22	k16	k11
AK4	Y	k22		k23
AKAP12	N	k16	k16	k11
AKR1A1	Y	k22	k16	k23
AKR1B1	Y	k22	k16	k11
AKR1B15	Y	k16	k16	k11
AKR7L	Y	k23		k17
ALAD	Y	k17	k16	k17
ALB	Y	k17	k22	k11

ALCAM	N			k11
ALDH1A1	Y	k22	k16	k23
ALDH1L1	Y	k22		k23
ALDH2	Y	k16	k16	k11
ALDH3A2	Y		k16	
ALDH3B1	Y	k22		
ALDH4A1	Y	k16	k16	k11
ALDH5A1	N	k16	k16	k11
ALDH6A1	Y	k16	k16	k11
ALDH7A1	Y	k22	k16	k23
ALDH9A1	Y	k22	k16	k11
ALDOA	Y		k16	k11
ALDOC	Y	k16	k16	k11
ALG2	N	k17	k17	k17
AMPD2	Y	k16	k16	k11
AMPH	N	k16	k16	k11
ANK1	N	k22	k16	k11
ANK2	N	k22		k16
ANK3	N			k11
ANP32D	N	k17	k16	k23
ANXA2P2	N	k17	k17	k23
ANXA5	N	k17	k14	k23
ANXA6	N	k17	k16	k23
ANXA7	N	k17	k16	k23
AP1B1	N	k22	k16	k23
AP1S2	N	k16	k16	
AP2A1	N	k22	k16	k23
AP2A2	N	k22	k16	k11
AP2B1	N	k22	k16	k11
AP2M1	N	k22	k22	k23
AP2S1	N	k22	k16	k11
AP3B2	N	k22	k16	k11
AP3D1	N		k16	k11
AP3M2	N	k14		k17
AP3S1	N	k17	k16	k23
APLP1	N	k16		
APOA1	Y	k14	k22	k11
APOA2	Y	k16	k16	k11
APOD	N		k22	k11
APOE	Y	k16	k16	k11
APP	N	k16	k16	k11
APPL1	N	k22	k16	k22

AQP4	N	k22	k16	k23
ARAF	N		k16	
ARF2P	N	k17	k14	k23
ARF3	Y	k22	k16	k23
ARF4	N	k22	k22	k11
ARF5	N	k22	k16	k23
ARFGAP1	N	k22	k16	k23
ARHGAP26	N	k17	k16	k17
ARHGAP44	N	k17		k17
ARHGDIA	N	k16	k16	k11
ARHGEF33	N	k17	k16	
ARHGEF7	N	k17	k22	k23
3.00 ARL	N	k17	k16	k17
ARL6IP1	N	k22	k16	k23
ARL8A	N	k22	k14	k23
ARL8B	N	k22	k16	k11
ARMC1	N	k16	k16	k11
ARPC1A	N	k22	k16	k11
ARPC2	N	k14	k14	k17
ARPC3	N	k17	k16	k23
ARPC4-TTL3	N	k22	k16	k11
ARPC5L	N	k14	k14	k23
ARPP19	N	k16	k16	
ARVCF	N	k22	k16	k14
ASAP1	N	k16	k16	
ASAP2	N		k16	k23
ASH1L	N	k23	k14	
ASPA	Y	k22	k16	k23
ASPSCR1	N	k16	k16	
ASRGL1	Y	k22	k16	k11
ASS1	Y	k22	k16	k23
ATCAY	N	k16	k16	k11
ATG3	N	k17	k17	k23
ATG5	N	k17	k14	k17
ATIC	Y	k17	k16	k23
ATL1	N	k16	k16	k11
ATOX1	N	k16	k16	k11
ATP1A1	N	k17	k16	k11
ATP1A2	N	k16	k16	k11
ATP1A3	N	k16	k16	k11
ATP1B1	N	k22	k16	k11
ATP1B2	N	k22	k16	k11

ATP1B3	N	k22	k14	k23
ATP2A2	N	k22	k16	k23
ATP2A3	N	k16		
ATP2B1	N	k22	k16	k23
ATP2B2	N	k22	k16	k11
ATP2B4	N	k16	k16	k11
ATP5F1A	N	k16	k16	k11
ATP5F1B	N	k16	k16	k11
ATP5F1C	N	k22	k16	k11
ATP5F1D	N	k16	k16	k11
ATP5F1EP2	N	k16		k11
ATP5IF1	N	k16		k11
ATP5ME	N	k16		
ATP5MF	N	k16	k16	k11
ATP5MGL	N	k22	k16	k22
ATP5PD	N	k16		k11
ATP5PF	N	k16	k16	k11
ATP5PO	N	k22	k22	k23
ATP6V0A1	N	k22	k16	k23
ATP6V0D1	N	k22	k16	k11
ATP6V1A	N	k22	k16	k23
ATP6V1B2	N	k22	k16	k11
ATP6V1C1	N	k22	k16	k23
ATP6V1D	N	k22	k16	k11
ATP6V1E1	N		k16	k11
ATP6V1F	N	k16	k16	k11
ATP6V1G1	N		k16	k11
ATP6V1G2	N	k22		k11
ATP6V1H	N	k22	k22	k11
ATP8A1	N	k16	k16	
ATXN10	N	k22	k22	k23
ATXN2L	N			k16
AUH	Y			k11
BAG3	N	k16	k16	
BAG6	N	k16	k16	k11
BASP1	N	k16	k16	k11
BCAM	N	k16	k16	
BCAN	Y	k16	k16	k11
BCAP31	N	k16	k16	k11
BCAS1	N	k16		k11
BCAS3	N	k16	k17	k14
BCAT1	Y	k16	k16	k11

BCLAF1	N	k22	k16	
BDH1	Y	k17	k16	k11
BHLHE22	N	k11	k23	k23
BIN1	N	k22	k16	k11
BLMH	N	k17	k22	k23
BLVRA	Y	k22	k16	k11
BLVRB	Y	k17	k17	k17
BOLA1	N	k16	k16	
BOLA2B	N	k16	k16	
BPNT1	Y	k22	k16	k23
BRSK2	N	k16		k14
BSG	Y	k16	k16	k11
BSN	N	k22	k16	k11
BTBD17	N	k22	k14	k23
BTF3L4	N	k17	k14	k17
C12orf57	N	k17	k17	k23
C1orf198	N	k16		k11
C1QB	N	k16	k16	
C1QBP	N	k17	k17	k17
C2CD2L	N	k16		
C3	N	k22	k16	
CA14	Y	k16		
CA2	Y	k16	k16	k23
CA8	N	k23		
CACNA2D1	N	k16	k16	k11
CACNA2D2	Y	k17	k22	k23
CACYBP	N	k16	k16	k11
CADM1	N	k22	k16	k23
CADM2	N	k16	k16	k11
CADM3	N	k22	k16	k11
CADM4	N	k16	k16	k11
CADPS	N	k22	k22	k11
CADPS2	N		k16	k11
CALB1	N	k17	k22	k23
CALB2	N	k17	k14	k23
CALM3	N	k22	k16	k11
CALML3	N			k11
CALR	N	k22	k16	k11
CALU	N		k16	
CAMK2A	N	k22		k11
CAMK2B	N	k16	k16	k11
CAMK2D	N	k22	k16	k23

CAMK2G	N	k22		k23
CAMKK1	N	k16	k16	
CAMKV	N	k16	k16	k11
CAND1	N	k22		k11
CANX	N	k22	k16	k11
CAP1	N	k22		k11
CAP2	N	k22	k16	k11
CAPN1	N	k14		k11
CAPN2	N	k22	k16	k11
CAPNS1	N	k17	k17	k23
CAPRIN1	N	k22		
CAPZA1	N		k16	k11
CAPZA2	N	k22	k16	k23
CAPZB	N	k22	k16	k11
CARHSP1	N	k17	k17	k23
CASK	N	k22		k11
CASKIN1	N			k11
CAST	N	k23	k17	k17
CAT	Y			k11
CBR1	Y	k22	k16	k11
CBX3	N	k17		k17
CCDC126	N	k22		k11
CCT2	N	k22	k16	k23
CCT3	N	k22	k16	k11
CCT4	N	k16	k16	k11
CCT5	N	k16	k16	k11
CCT6A	N	k22	k16	k23
CCT7	N	k22	k16	k23
CCT8	N	k22	k16	k11
CD200	N	k16	k16	k11
CD47	N	k17	k17	k23
CD59	N	k16	k16	
CD81	N	k22	k14	k23
CD82	N	k16	k16	k11
CD9	N	k23	k14	k17
CDC37	N	k16	k16	k11
CDC42	N	k16	k16	k11
CDC42EP1	N	k16		
CDC42EP4	N	k22	k16	k11
CDH13	N	k16	k16	k11
CDH2	N	k22	k16	k17
CDK5	N	k17	k17	k23

CDKN1B	N	k22	k16	
CDS2	Y	k22	k16	k11
CDV3	N	k16	k16	k11
CEND1	N	k16		k11
CENPV	N	k22	k16	
CFL1	N	k22	k16	k11
CFL2	N	k22	k16	k11
CHCHD2	N	k22	k16	
CHCHD3	N	k16	k16	k11
CHCHD6	N	k16	k16	k11
CHERP	N	k16	k22	k22
CHGB	N			k11
CHMP2A	N		k11	
CHMP2B	N	k16	k16	
CHMP4B	N	k22	k16	k11
CHMP5	N	k22	k16	
CHORDC1	N	k22	k16	k11
CHRNG	N	k22	k16	
CIAPIN1	Y	k16	k16	
CIRBP	N		k16	k11
CISD1	N	k16	k16	k11
CISD2	N	k22	k16	k14
CISD3	N	k16		k11
CIT	N	k16	k16	
CKAP4	N	k17	k22	k17
CKAP5	N	k16	k16	k23
CKB	Y	k22	k16	k23
CKM	Y	k17	k14	k23
CKMT1B	N	k16	k16	k11
CKMT2	Y	k14	k14	
CLASP1	N	k22	k22	k22
CLASP2	N			k11
CLDN11	N	k22	k16	k11
CLEC2L	N	k16		k11
CLIC4	N	k16	k16	k11
CLINT1	N	k17		
CLIP1	N	k17	k22	k22
CLIP2	N	k16	k16	k11
CLPP	N	k16	k16	
CLPTM1	N	k22	k16	k17
CLTA	N	k22	k16	k11
CLTB	N	k16	k16	k11

CLTC	N	k22	k16	k23
CLU	N	k17	k17	k17
CLVS1	N	k22	k16	k14
CLYBL	N	k16		k16
CMAS	N	k22	k16	k14
CMPK1	Y	k22		k11
CMPK2	N	k22		k11
CNBP	N	k16	k16	k11
CNDP2	Y	k17	k14	k23
CNP	N	k22		k11
CNPY2	N	k17	k22	k22
CNRIP1	N	k22	k16	k23
CNTFR	N	k22		k11
CNTN1	N	k22	k16	k11
CNTN2	N		k16	k11
CNTNAP1	N	k22	k16	k23
COL2A1	N	k22	k22	k23
COMTD1	N	k17	k22	k17
COPS2	N	k22	k16	k11
COPS3	N	k16		k11
COPS4	N	k22	k16	k23
COPS5	N	k23	k17	k17
COPS8	N	k16	k16	k23
COQ9	N	k17	k17	k17
CORO1A	N	k16	k16	k11
CORO1B	N	k22	k16	k11
CORO1C	N		k16	k11
COTL1	N	k22		k11
COX4I1	Y	k16	k16	k11
COX5A	Y	k16		k11
COX5B	Y	k16	k16	k11
COX6A1	Y	k16		k11
COX6B1	Y	k16	k16	k11
COX6C	Y	k22	k16	k11
COX7A2P2	N	k16		k11
COX7C	Y	k16	k16	k11
CPE	N	k22	k16	k11
CPLX1	N	k16	k16	k23
CPLX2	N	k22	k16	k11
CPNE1	Y		k22	k17
CPNE6	Y	k22	k16	k23
CREB1	N	k16	k16	k14

CRELD1	N		k16	
CRIP2	N	k16	k16	k11
CRKL	N	k16	k16	k11
CRMP1	N	k22	k16	k11
CRYAB	N			k11
CRYZ	N	k22		k17
CS	Y	k22	k16	k11
CSDC2	N	k23	k23	k23
CSE1L	N	k17	k16	k23
CSNK2A1	N		k11	k11
CSNK2B	N	k22	k16	k14
CSPG5	Y		k16	k11
CSRP1	N	k22	k16	k11
CST5	N	k22	k16	k11
CSTB	N	k22	k14	k23
CTBP1	N	k17	k17	k23
CTNNA2	N			k11
CTNNB1	N	k22	k16	k11
CTNND2	N	k16	k16	k14
CTSB	N	k22	k16	k23
CTSD	N	k22	k16	k23
CTSV	N	k16	k16	
CTTN	N	k16	k16	k11
CUL3	N	k22	k16	k11
CUTA	N	k11	k23	
CYB5B	N	k22	k16	k11
CYB5R3	Y	k22	k16	k17
CYC1	Y	k22	k16	k11
CYCS	Y	k16	k16	k11
CYFIP1	N	k22	k16	k14
CYFIP2	N	k22	k16	k11
CYGB	Y	k17	k14	k17
DAG1	N	k16	k16	k11
DARS1	N	k22	k16	k11
DBI	N	k22		k11
DBN1	N	k16	k16	k11
DBNL	N	k17	k22	k23
DBT	Y	k11		
DCLK1	N	k16	k16	k11
DCLK2	N	k16	k16	k11
DCPS	N	k17	k16	k14
DCTN1	N	k22		k11

DCTN2	N	k16	k16	k11
DCTN4	N	k22	k16	
DCTN6	N	k16	k16	k11
DDAH1	Y	k22	k16	k11
DDAH2	Y	k17	k16	k23
DDB1	N	k22		k11
DDC	Y	k16	k16	k11
DDI2	N	k16	k16	k11
DDTL	N	k22	k16	k11
DDX1	N	k22	k16	k23
DDX17	N	k22	k16	k11
DDX39B	N	k17	k16	k23
DDX3X	N	k17	k17	k23
DDX5	N	k22	k16	k11
DECR1	Y	k22	k16	k17
DENR	N	k16		k11
DES	N	k14	k14	
DHRS1	N	k22	k16	k11
DHX15	N	k22	k16	k17
DHX9	N	k22	k16	k11
DIP2A	N	k22	k22	k17
DIRAS2	N	k16	k16	k11
DLAT	Y	k16	k16	k11
DLD	Y	k22	k16	k11
DLG1	N	k16		k11
DLG2	N			k11
DLG4	N	k22	k16	k11
DLST	Y	k16	k16	k11
DMTN	N	k16	k16	k11
DMXL2	N	k22	k16	k11
DNAJA1	N	k22	k16	k11
DNAJA2	N	k22	k16	k23
DNAJB2	N	k22	k16	k11
DNAJC5	N	k16	k16	k11
DNAJC6	N	k22	k16	k23
DNM1	N	k22	k16	k11
DNM1L	N	k22	k16	k11
DNM3	N	k22	k16	k23
DNPEP	N	k17	k22	k11
DPP10	N		k16	k22
DPP6	N	k16	k16	k11
DPY30	N		k16	k14

DPYSL2	N	k22	k16	k11
DPYSL3	N	k22	k16	k23
DPYSL4	N	k17	k16	k11
DPYSL5	N	k16	k16	k11
DSTN	N	k22	k16	k11
DTD1	N	k16	k16	
DUSP15	N	k16	k16	
DUSP3	N	k17		k23
DYNC1H1	N	k22	k16	k23
DYNC1H1	N	k16	k16	k11
DYNC1H2	N	k16	k16	
DYNC1LI1	N	k22	k16	k11
DYNC1LI2	N	k16		
DYNLL1	N	k14	k16	k23
DYNLL2	N	k22	k16	k23
DYNLRB1	N			k11
DYNLT3	N	k17	k22	k17
ECHS1	Y	k16	k16	k11
ECH1	Y	k22		k11
EEA1	N	k16	k16	k11
EEF1A1	N	k22	k16	k11
EEF1A2	N	k22		k11
EEF1B2	N	k22	k16	k23
EEF1D	N		k16	k11
EEF1G	N	k22	k16	k11
EEF2	N	k22	k16	k23
EFHD2	N	k16	k16	k11
EFNB3	N		k16	
EHD1	N		k11	k23
EHD3	N	k22	k22	k23
EIF1	N		k16	k11
EIF2S1	N	k16	k16	
EIF2S2	N		k16	k11
EIF2S3B	N	k22	k16	k23
EIF3A	N	k16	k16	k11
EIF3B	N	k16	k16	
EIF3CL	N	k22	k22	k17
EIF3D	N		k16	k11
EIF3F	N	k23	k17	k23
EIF3G	N	k22		k11
EIF3I	N	k22	k16	k11
EIF3J	N	k16	k16	k11

EIF3K	N	k22	k16	
EIF3L	N	k17	k16	k16
EIF4A2	N	k22	k16	k11
EIF4B	N	k22	k16	k11
EIF4E	N	k22	k16	k23
EIF4G1	N	k22	k16	k11
EIF4G3	N	k16		k11
EIF4H	N	k16	k16	k11
EIF5	N		k16	k11
EIF5AL1	N	k17	k22	k23
ELAVL1	N	k22	k16	k17
ELAVL3	N	k16	k16	k11
EMC1	N	k17	k17	k17
EMD	N	k22	k16	k11
EML1	N			k11
EML2	N	k17	k14	k17
ENAH	N	k16		k11
ENDOD1	N	k14	k16	k23
ENDOG	N	k23		k23
ENO1	Y	k22	k16	k11
ENO2	Y	k22	k16	k11
ENO3	Y			k11
ENPP6	Y	k17	k14	k23
ENSA	N	k22	k16	
ENTPD2	N	k17	k14	k23
EPDR1	N	k16	k16	k11
EPM2AIP1	N	k22	k16	k14
EPN1	N	k22	k16	
EPN2	N	k11		k22
EPRS1	N	k16	k16	k11
EPS15L1	N	k16	k16	k11
ERC2	N	k16	k16	k14
ERH	N		k16	k11
ERLIN2	N		k16	k14
ERMN	N	k22	k16	k23
ERMP1	N	k22	k16	k11
ERP29	N	k17	k14	k23
ERP44	N	k22		k11
ESD	Y	k22	k16	k23
ESYT1	N	k17	k17	k17
ETFA	Y	k22	k16	k23
ETFB	Y	k16	k16	k11

ETFDH	Y	k16	k16	k11
ETHE1	Y	k22		k11
EVL	N	k16	k16	
EWSR1	N	k17	k16	k11
EXOC3	N			k11
FABP3	Y	k22	k16	k23
FABP5	Y	k22		k23
FABP7	Y	k22	k16	k11
FAH	Y		k16	k11
FAHD1	N	k16		k11
FAHD2B	N	k17	k22	k17
FAIM2	N	k22	k16	k14
FAM107B	N		k16	k11
FAM114A2	N	k17	k22	k17
FAM126B	N	k17	k16	k11
FAM136A	N	k22	k16	k11
FAM162A	N	k16	k16	k11
FAM98B	N	k22	k16	k11
FARP1	N	k16	k16	
FARSA	N			k16
FARSB	N	k22	k16	k23
FASN	Y	k22	k16	k23
FAU	Y		k16	k11
FBLN5	N	k22		k11
FBXL17	N	k16	k16	
FBXO2	N	k22	k16	k23
FDPS	Y	k17	k14	k23
FECH	Y	k22	k16	k23
FEZ2	N	k11		k23
FGA	N	k14	k16	
FGB	N	k16	k16	k11
FGF1	N			k11
FH	Y	k22	k16	k11
FHL1	N	k22	k16	k11
FIS1	N	k22	k22	k11
FKBP1C	N	k17	k14	k23
FKBP2	N	k22	k16	k11
FKBP3	N	k16	k16	k11
FKBP4	N		k16	k11
FLNA	N	k16	k16	k11
FLOT1	N	k16		k14
FLOT2	N			k11

FMNL3	N	k17	k23	k17
FMR1	N			k23
FN3KRP	N	k16	k16	k11
FNBP1	N	k22	k16	
FOLH1B	Y	k16	k16	
FSCN1	N	k22		k23
FSD1	N	k17	k22	k17
FTH1	N	k22	k16	k23
FTL	N	k22	k16	k23
FUBP1	N	k22	k16	k11
FUS	N	k22	k16	k11
FXYD1	N	k22	k16	k11
FXYD6P3	N	k22	k16	k23
FXYD7	N	k16		k11
G3BP2	N	k22	k16	k11
G6PD	Y	k22		k11
GAA	Y	k17	k14	k14
GABARAPL2	N	k22	k16	
GABRA1	N	k22	k16	k11
GABRG2	N	k22	k16	k11
GAD1	N	k22	k16	k23
GAD2	N	k16	k16	k11
GAK	N			k16
GANAB	N	k16		k11
GAP43	N	k16	k16	k11
GAPDH	Y	k22	k16	k11
GAPDHS	Y		k16	
GARS1	N	k16	k16	k11
GART	Y	k22		k14
GBE1	Y	k22		k14
GC	Y	k16	k16	k11
GCLM	Y	k17	k22	k17
GCSH	Y		k17	k11
GDAPIL1	N	k22	k16	k23
GDI1	N	k22	k16	k23
GDI2	N	k22	k14	k23
GDPD1	Y	k22	k16	k23
GFAP	N	k14	k22	k23
GIT1	N	k16	k16	k11
GJA6P	N	k16	k16	k11
GJC2	N	k22	k16	k23
GLO1	Y	k22	k16	k23

GLOD4	N	k22	k16	k23
GLRX	Y	k22	k16	k17
GLRX3	N	k22	k16	k23
GLRX5	N	k16	k16	k11
GLS	Y	k22	k16	k11
GLTP	Y	k22	k16	k11
GLUD2	Y	k16	k16	k11
GLUL	Y	k16	k16	k11
GMFB	N	k17	k17	k23
GMPR	Y	k17	k22	k22
GMPS	Y	k17	k14	k23
GNA11	Y		k16	k11
GNA13	N	k17	k22	k23
GNAI1	Y	k22	k16	k11
GNAI2	Y	k16	k16	k11
GNAO1	N	k22	k16	k11
GNAQ	Y	k22	k16	k11
GNAS	Y	k22	k16	k23
GNAZ	N	k22	k22	k11
GNB1	Y	k22	k16	k23
GNB2	Y	k16	k16	k11
GNB4	Y	k17	k22	k23
GNB5	Y	k22	k16	k23
GNG12	Y	k16	k16	k11
GNG13	Y	k22		k11
GNG2	Y	k16		k11
GNG3	Y	k22		k11
GNG4	Y	k16	k16	
GNG7	Y	k16	k16	k11
GNL1	N			k11
GOT1	Y	k22	k16	k11
GOT2	Y	k16	k16	k11
GPD1	Y	k17	k14	k23
GPD1L	Y	k22	k16	k17
GPD2	Y	k22	k16	k11
GPHN	Y	k22	k16	k11
GPI	Y	k22	k16	k23
GPM6A	N	k22	k16	k11
GPM6B	N	k17	k17	k23
GPRC5B	N	k16		
GPRIN1	N	k17	k16	k17
GPS1	N	k17	k22	k23

GPSM1	N	k16	k16	
GPX1	Y	k22	k22	k11
GPX4	Y	k16	k16	k11
GRB2	N			k11
GRHPR	Y		k16	k23
GRIA2	N		k17	
GRIPAP1	N	k22	k16	k11
GRN	N	k16	k16	
GRPEL1	N	k14		k11
GRSF1	N	k14		k11
GSK3A	N	k17		k23
GSK3B	N	k16	k16	k11
GSN	N		k16	k11
GSPT1	N	k17		
GSR	Y	k22	k16	k11
GSTA5	Y	k22	k16	k11
GSTM3	Y	k22	k22	k23
GSTM5	Y	k22	k16	k23
GSTO1	Y	k23	k17	k23
GSTP1	Y	k22	k16	k23
GSTZ1	Y	k22	k16	k23
GUK1	Y	k16	k16	
H1-0	N	k16	k16	k11
HABP4	N	k16		k11
HADH	Y	k22	k16	k23
HADHA	Y	k22	k16	k11
HADHB	Y	k22	k16	k11
HAGH	Y	k22	k16	k11
HAPLN1	N	k16	k16	k11
HAPLN2	N	k16	k14	k14
HAPLN4	N	k17	k14	k23
HARS1	N		k16	k11
HBA2	N		k22	k11
HBD	N	k17	k22	k23
HCFC1	N	k17	k14	k23
HCN2	N	k16	k16	
HDGF	N	k17	k16	k11
HDHD2	N	k22	k16	k23
HDLBP	N	k17	k22	k17
HEBP1	N	k16	k16	k11
HEPACAM	N	k16	k16	k11
HGS	N	k22	k16	

HIBADH	Y	k22	k16	k11
HIBCH	Y	k11	k17	k17
HINT1	N	k16	k16	k11
HINT2	N	k22	k16	k11
HINT3	N	k16	k16	k11
HIP1R	N	k22	k16	k14
HK1	Y	k22	k16	k11
HMGA1	N	k16	k16	
HMGB1	N	k17	k16	k11
HMGCS1	Y	k16	k16	
HMGN2	N		k16	
HNRNPA0	N	k17	k14	k11
HNRNPA1L2	N	k22	k16	k11
HNRNPA2B1	N	k22	k16	k11
HNRNPA3	N	k22	k16	k23
HNRNPAB	N	k23		k23
HNRNPCL3	N	k17	k16	k23
HNRNPD	N	k22	k16	k11
HNRNPDL	N	k16	k16	
HNRNPH1	N	k17	k16	k23
HNRNPK	N	k17	k16	k23
HNRNPL	N	k22	k16	k11
HNRNPM	N	k16	k16	k11
HNRNPU	N	k17	k22	k23
HNRNPUL1	N	k16	k16	
HNRNPUL2	N	k22	k16	k23
HOMER3	N	k23		
HOOK3	N	k23	k22	k23
HOPX	N	k16	k16	k11
HPCAL1	N	k22		
HPR	N	k22		k14
HPRT1	Y	k22	k16	k23
HPS6	N	k17	k14	
HPX	N	k14	k16	k11
HSD17B10	Y	k17	k22	k17
HSD17B8	N	k16	k16	
HSP90AA1	Y	k22	k16	k23
HSP90AB1	N	k22	k16	k11
HSP90B2P	N	k16		k11
HSPA12A	N	k22	k16	k23
HSPA1B	N	k11		
HSPA1L	N	k16	k16	k14

HSPA2	N			k11
HSPA4	N	k22	k16	k11
HSPA4L	N	k16	k16	k11
HSPA5	N	k16	k16	k11
HSPA8	N	k22	k16	k11
HSPA9	N	k16	k16	k11
HSPB1	N	k16	k16	k11
HSPD1	N	k16	k16	k11
HSPE1	N	k16	k16	k11
HSPH1	N	k22	k16	k11
HUWE1	N	k22		k14
HYOU1	N	k22	k16	k23
IARS2	N	k16	k16	k11
IDH1	Y	k22	k16	k23
IDH2	Y	k22	k16	k11
IDH3A	Y	k16	k16	k11
IDH3G	Y	k16	k16	k11
IGDCC4	N	k22	k16	k23
IGKC	N	k22	k17	
IGLON5	N	k16	k16	k11
IGSF8	N	k16	k16	k11
ILF3	N	k22	k16	k11
IMMT	N	k16		k11
IMPA1	Y	k22	k16	k23
IMPACT	N	k16	k16	k11
INA	N			k11
INPP1	Y			k23
INPP4A	Y	k17	k22	k23
IPO4	N	k17	k16	k14
IPO9	N			k11
IQSEC1	N		k16	k11
IQSEC3	N	k16	k16	
IRGQ	N	k16	k16	
ISOC2	N	k17	k17	k23
ISYNA1	Y	k16	k16	k11
ITGAV	N			k11
ITGB1	N	k16	k16	k11
ITIH3	N		k22	k23
ITPR1	Y	k23		
ITPR3	Y	k22	k14	k23
ITSN1	N	k16	k16	
IVD	Y	k22	k22	k11

JAM3	N	k16	k16	k11
JPH4	N	k16	k16	k11
JUP	N	k17	k14	k23
KANK4	N	k14		k23
KBTD11	N	k17		k17
KCNA2	N	k22	k16	k11
KCNAB2	N	k16	k22	k11
KCNC1	N	k22	k16	k11
KCNC3	N	k22	k16	k11
KCNJ10	N	k16	k16	k11
KCTD8	N	k22		k14
KHDRBS1	N	k16	k16	k11
KHSRP	N	k22	k16	k11
KIAA0513	N	k22	k16	k11
KIF15	N	k16		
KIF1A	N	k14	k14	k14
KIF21A	N			k11
KIF2A	N	k22	k16	k11
KIF3B	N	k16	k16	k11
KIF5B	N	k22	k22	k11
KIF5C	N	k22	k16	k11
KLC1	N	k22	k22	k23
KLC2	N	k22	k16	k23
KMT2A	N	k22		k14
KNG1	N	k14	k17	k14
KPNA4	N	k23		k17
KPNB1	Y			k11
KRAS	N		k16	k11
KRT1	N			k23
KRT15	N		k16	k23
KRT2	N			k11
KRT5	N			k23
KRT79	N	k11	k11	k11
KTN1	N	k23		k22
L1CAM	N	k16	k16	k11
LAMP1	N	k22	k16	k11
LAMTOR1	N	k16	k22	k17
LAMTOR3	N	k17	k14	k17
LANCL1	N	k17	k16	k11
LANCL2	N	k22	k22	k17
LAP3	N	k22		k11
LASP1	N		k16	k11

LBH	N	k16	k16	
LCK	N	k16	k16	
LCP1	N		k17	k16
LDHA	Y	k22	k16	k23
LDHB	Y	k22	k16	k11
LETM1	N	k16		k11
LGALS1	N	k16		k11
LGI1	N	k17	k14	k23
LGI3	N	k22	k22	k23
LIN7A	N	k22	k16	k11
LIN7C	N	k22		
LLGL1	N	k17	k17	k17
LMNA	N	k22	k16	k11
LMNB1	N	k17	k16	k11
LMNB2	N	k22		k11
LRP1	Y	k22	k16	k11
LRPAP1	N	k16	k16	k11
LRPPRC	Y	k22		k17
LRRC47	N	k16	k16	k14
LRRC57	N	k22	k14	k23
LRRC59	N	k17	k17	k23
LSAMP	N	k16	k16	k11
4.00 LSM	N	k16	k16	
LTA4H	Y	k22	k16	k22
LUZP1	N	k16	k16	
LXN	N	k17	k16	k17
LY6H	N	k16	k16	k11
LYNX1-SLURP2	N	k16	k16	k11
LYPLA1	Y	k22	k16	k16
LYPLA2	N	k17	k16	k23
M6PR	N	k16	k16	k11
MACF1	N		k16	k11
MAG	N			k11
MAGI1	N	k16	k16	
MANF	N	k22	k16	k23
MAOA	Y	k22	k16	k11
MAOB	Y	k17		k22
MAP1A	N	k16	k16	k11
MAP1B	N	k16	k16	k11
MAP1LC3A	N	k22	k16	k11
MAP2	N	k16	k16	k11
MAP2K1	N	k16	k16	k11

MAP2K2	N		k16	
MAP2K4	N	k22		k11
MAP4	N		k16	k11
MAP6	N	k16	k16	k11
MAP6D1	N	k16	k16	
MAP7D1	N			k23
MAP7D2	N	k16		k11
MAPK1	N	k17	k14	k23
MAPK10	N	k14		
MAPK3	N	k22	k16	k11
MAPRE1	N	k22	k14	k23
MAPRE2	N	k22		k23
MAPRE3	N	k16	k16	k11
MAPT	N	k16	k16	k11
MARCKS	Y	k16	k16	k11
MAT2A	Y	k16		k11
MAT2B	Y			k11
MATR3	N	k22	k16	k11
MAVS	N			k11
MB	N	k17		
MBNL2	N	k16	k16	k11
MBP	N	k16	k16	k11
MCAM	N	k23	k17	k23
MDH1	Y	k22	k16	k11
MDH2	Y	k22	k16	k11
ME1	Y	k22	k22	k23
ME3	N			k16
MECP2	N	k16	k16	
METAP2	N	k16	k16	k11
MFF	N	k16	k16	k11
MIF	N	k22	k16	k11
MOBP	N	k16	k16	k11
MOG	N	k16	k16	k11
MPC1	Y	k16		k11
MPC2	Y	k22	k16	k11
MPI	N	k17	k17	k17
MPP1	N	k17	k14	k17
MPP2	N	k17	k16	k11
MPP3	N		k14	k23
MRPL12	N	k16		
MRPS36	N	k16		k11
MSN	N	k14	k16	

MT2A	Y	k16	k16	k11
MT3	Y	k16	k16	k11
MTAP	Y	k17	k14	k17
MTCH1	N	k22	k16	k22
MTCH2	N	k22	k16	k11
MTHFD1	Y	k16	k16	k14
MTPN	N	k22	k16	k11
MTX2	N		k14	
MYEF2	N	k22	k16	k11
MYH10	N	k22	k16	k11
MYH11	N	k17	k16	k17
MYH14	N		k16	k11
MYH6	N	k17	k16	k23
MYH9	N	k22		k23
MYL12B	N	k22	k16	k17
MYL6	N	k22	k16	k11
MYL9	N	k22		k11
MYO18A	N			k11
MYO1D	N	k22	k14	k23
MYO5A	N	k22	k16	k11
NACA	N	k22	k16	k23
NADK2	N	k22		k11
NAMPT	Y	k23	k14	
NAP1L1	N	k22	k17	k17
NAP1L4	N	k22	k22	k23
NAP1L5	N	k17	k22	k11
NAPA	N	k22	k16	k11
NAPB	N	k22	k16	k11
NAPG	N	k22	k16	k11
NARS1	N	k22	k22	k23
NBEA	N		k16	
NCALD	N	k17	k17	k23
NCAM1	N	k22	k16	k23
NCAM2	N	k16	k16	k11
NCAN	Y	k16	k16	k11
NCDN	N	k22	k16	k23
NCEH1	Y	k22		k17
NCKAP1	N	k22	k16	k11
NCKIPSD	N	k16	k16	k11
NCL	N	k17	k16	k23
NCOR2	Y	k22		k23
NCS1	N	k22	k16	k23

NDEL1	N	k17	k17	k23
NDRG1	N	k16	k16	k11
NDRG2	N	k22	k16	k11
NDRG3	N	k22	k16	k11
NDRG4	N	k22	k16	k23
NDUFA10	Y			k11
NDUFA12	Y		k16	k11
NDUFA2	Y	k16		k11
NDUFA3	Y	k17	k17	k17
NDUFA4	Y	k22	k16	k11
NDUFA5	Y	k22	k16	k22
NDUFA6	Y	k16	k16	k11
NDUFA7	Y	k16	k16	k11
NDUFA8	Y	k16	k16	k11
NDUFA9	Y	k22	k16	k11
NDUFAB1	Y	k17	k22	k23
NDUFAF2	Y	k16		k11
NDUFB10	Y	k22	k16	k11
NDUFB11	Y	k16		k11
NDUFB3	Y	k16		k11
NDUFB6	Y	k22	k16	k11
NDUFB7	Y	k16		k22
NDUFB8	Y	k16	k16	k11
NDUFB9	Y	k22	k16	k11
NDUFC2-KCTD14	N	k16	k16	k11
NDUFS1	Y	k16	k16	k11
NDUFS2	Y	k22	k16	k11
NDUFS3	Y	k22	k16	k11
NDUFS4	Y	k16	k16	k11
NDUFS5	Y	k16	k16	k11
NDUFS6	Y	k16	k16	k11
NDUFS7	Y	k16	k16	k11
NDUFS8	Y	k16	k16	k11
NDUFV1	Y	k16	k16	k11
NDUFV2	Y	k16		k11
NDUFV3	Y	k16		k11
NEBL	N	k22	k16	k11
NECAP1	N	k16	k16	k11
NEDD8	N		k16	k11
NEFH	N	k16		k11
NEFL	N	k16		k11
NEFM	N			k11

NEGR1	N	k16	k16	k11
NFASC	N	k22	k16	k11
NIPSNAP1	N	k22	k16	k11
NISCH	N		k14	k14
NIT1	N	k14	k16	k17
NLGN2	N	k23	k14	k14
NME1	Y	k22	k16	k23
NME2	Y	k22		k23
NMRAL1	Y			k23
NMT1	N	k22	k16	k11
NOL3	N			k11
NONO	N	k17	k17	k17
NOP56	N	k16	k16	k11
NOVA1	N	k16		k11
NPEPPS	N	k22	k16	k23
NPLOC4	N	k23	k17	k23
NPM1	N	k22	k16	k23
NPTN	N	k16	k16	k11
NPTX1	N	k22	k16	k11
NRCAM	N	k22	k16	k11
NRGN	N	k16	k16	
NRIP2	N	k16	k16	
NRXN3	N			k11
NSF	N	k22	k16	k23
NSFL1C	N		k16	k11
NT5C	Y	k22		k23
NT5C2	Y	k23	k14	k23
NTM	N	k16	k16	k11
NTRK2	N	k16		
NUCB1	N	k22	k16	k23
NUCKS1	N	k22	k16	k11
NUDC	N	k22	k16	k11
NUDCD3	N			k11
NUDT3	Y	k22	k16	k14
NUMA1	N	k17	k16	k17
OBSCN	N	k16	k16	k11
OGDH	Y	k16	k16	k11
OGT	N	k22	k16	k11
OLA1	N	k22	k16	k23
OMG	N	k16	k16	k11
OPA1	N	k16	k16	k11
OPALIN	N			k11

OTUB1	N	k22		k11
OTUD6B	N	k16	k16	k16
OXCT1	Y	k22	k16	k11
OXR1	N	k22	k16	k11
P4HB	Y	k22	k16	k11
PA2G4	N	k22	k17	k23
PABPC3	N		k16	k11
PACS1	N	k17	k16	k23
PACS2	N	k16	k16	k11
PACSIN1	N		k16	k11
PADI2	N	k22		k17
PAFAH1B1	N	k22	k16	k11
PAFAH1B2	N	k23		k23
PAFAH1B3	N	k16	k16	k11
PAICS	Y	k22	k16	k23
PAK1	N		k16	k11
PAK2	N	k22	k16	k23
PAK3	N	k22		k23
PALM	N	k16	k16	k11
PARG	N	k22	k16	k23
PARK7	N	k22	k16	k11
PC	Y	k16	k16	k11
PCBP1	N	k22	k16	k23
PCBP2	N	k17	k14	k23
PCBP3	N	k16	k16	
PCCA	Y	k22	k16	k11
PCK2	Y	k16	k16	k11
PCLO	N	k22	k16	k11
PCMT1	N	k22	k16	k23
PCP2	N	k23	k14	
PCP4	N	k22	k16	k11
PCP4L1	N	k16	k16	
PCSK1N	N	k16	k16	k11
PCYT2	Y		k16	k11
PDAP1	N	k16	k16	k11
PDCD6	N	k22	k14	k17
PDCD6IP	N		k16	k11
PDE1B	N	k16	k14	k23
PDHA1	Y	k16	k16	k11
PDHB	Y	k16	k16	k11
PDHX	Y	k22	k16	k11
PDIA3	N	k16	k16	k11

PDIA4	N	k16	k16	k11
PDIA6	N	k23		k23
PDXK	Y	k22	k16	k11
PDXP	N	k22	k16	k11
PEA15	N	k17	k14	k23
PEBP1	N	k22	k16	k23
PENK	N	k16	k16	k11
PEPD	N	k16	k16	
PEX19	N	k22		k23
PEX5L	N			k11
PFAS	Y	k17	k17	k17
PFDN2	N	k22	k16	k11
PFKL	Y	k17	k17	k23
PFKM	Y	k22	k16	k11
PFKP	Y	k16	k16	k11
PFN1	N	k17	k17	k23
PFN2	N	k22		k11
PGAM4	N	k22	k16	k11
PGD	Y	k22	k16	k23
1.00 PGK	Y	k22	k16	k23
PGLS	Y	k22	k14	k23
PGM2	Y	k22	k16	k23
PGP	N	k22	k16	k23
PGRMC1	N	k16	k16	k11
PGRMC2	N	k22	k16	k11
PHB	N	k22	k16	k11
PHB2	N	k17	k17	k11
PHF5A	N	k16	k16	k11
PHGDH	Y	k22	k16	k11
PHPT1	N	k22	k16	k23
PHYHIP	N	k17		k11
PHYHIPL	N	k22	k16	k11
PI4KA	Y	k23		
PICALM	N	k16	k16	k11
PIN1	N			k11
PIP4K2A	Y	k22	k16	k11
PIP4K2B	Y	k22	k16	
PIP5K1C	Y	k16	k16	
PITPNA	N	k22	k16	k23
PITPNB	Y	k16		k11
PITPNM1	N	k22	k16	
PKIA	N	k16	k16	k11

PKM	Y	k22	k16	k23
PKP4	N	k22	k16	k14
PLAA	N	k22	k14	
PLCB1	Y		k16	k23
PLCL1	N	k16	k16	k11
PLEC	N			k11
PLEKHB1	N	k16	k16	k11
PLIN3	Y			k11
PLIN4	N	k16	k16	
PLP1	N	k16	k16	k11
PLS1	N	k22	k22	k14
PLS3	N	k22	k16	k23
PLXNA4	N	k17		k14
PLXNB1	N		k22	k17
PMCHL2	N	k22	k16	k14
PMPCA	N			k11
PNPO	Y		k16	k11
POGLUT1	N	k16		
PPA1	N	k22	k16	k11
PPA2	N	k17	k22	k23
PPFIA3	N	k16	k16	
PPIA	N		k16	k11
PPIB	N	k22	k16	k11
PPID	N	k22	k16	k11
PPIL1	N	k17	k17	k23
PPM1A	N	k16	k16	k11
PPM1E	N	k22	k16	k23
PPM1F	N	k22	k16	k23
PPM1H	N			k11
PPME1	N	k22	k16	k23
PPP1CA	Y	k17	k22	k11
PPP1CB	Y	k17	k16	k23
PPP1CC	Y	k22	k16	k14
PPP1R11	N		k16	k11
PPP1R12C	N	k16	k16	
PPP1R14A	N	k22	k14	k23
PPP1R1A	N			k14
PPP1R1B	N	k22		k11
PPP1R7	N	k22	k16	k11
PPP1R9B	N	k22	k16	k11
PPP2CA	Y	k17	k17	k17
PPP2CB	Y	k22	k16	k23

PPP2R1A	Y	k22	k16	k23
PPP2R1B	Y		k16	
PPP2R5E	N	k17	k17	k23
PPP3CA	N	k22	k22	k23
PPP3CB	N	k17	k16	k23
PPP3R1	N	k22	k16	k23
PPP5C	N	k22	k16	k23
PPT1	Y	k22		k11
PRAF2	N	k16	k16	
PRDM16	N	k16		k11
PRDX1	N	k22	k16	k23
PRDX2	N	k22	k16	k23
PRDX3	N	k22	k16	k11
PRDX5	N	k22	k16	k23
PRDX6	N	k22		k23
PREPL	N	k16	k16	k23
PRKACA	Y	k22	k16	k11
PRKAR1A	Y	k16	k16	k11
PRKAR1B	Y	k17	k22	k17
PRKAR2A	Y		k16	k14
PRKAR2B	Y	k16	k16	k14
PRKCB	N		k16	k11
PRKCE	N		k16	
PRKCG	N	k17		
PRKCSH	N	k16	k16	k11
PRKRA	N		k14	k14
PRNP	N	k22	k22	k23
PRPF19	N	k22	k16	k11
PRPF4B	N	k17		
PRPH	N			k11
PRPS1	Y	k22	k16	k23
PRRT2	N	k22	k16	k11
PRUNE2	N	k22	k16	
PSAP	Y	k22	k16	k23
PSAT1	Y	k22		k11
PSD3	N		k16	
PSIP1	N	k22	k16	k11
PSMA1	Y	k22	k16	k11
PSMA2	Y	k22		k23
PSMA3	Y	k17	k17	k11
PSMA5	Y	k22		k23
PSMA6	Y	k17	k17	k17

PSMA7	Y	k22		k11
PSMB1	Y	k16	k16	k14
PSMB2	Y	k22	k16	k11
PSMB4	Y			k11
PSMB6	Y	k22		k11
PSMB7	Y	k22	k16	k23
PSMC1	Y	k23		k14
PSMC2	Y	k22	k16	k23
PSMC3	Y	k17	k17	k23
PSMC4	Y	k22	k16	
PSMD1	Y	k16		
PSMD12	Y	k23	k14	k23
PSMD2	Y	k22	k16	k11
PSMD3	Y		k16	
PSMD4	Y	k17	k14	k23
PSMD5	Y	k22	k16	k11
PSMD6	Y	k17	k17	k17
PSMD7	Y	k17	k17	k17
PSMD9	Y		k16	
PSPC1	N	k17	k16	k23
PTBP2	N	k11	k14	
PTGDS	Y	k17		k14
PTGES3	Y	k22	k16	k11
PTGR2	N	k17		
PTMA	N	k16	k16	k11
PTMS	N	k22	k16	k11
PTPN11	N	k17	k17	k23
PTPRD	N		k16	k14
PTPRZ1	N	k22	k16	k11
PTRH2	N	k17	k16	k17
PTRHD1	N	k17	k14	k14
PURA	N	k22	k16	k23
PURB	N	k22	k16	k11
PVALB	N	k17	k16	k23
PYCR3	N	k22	k16	
PYGB	Y	k22	k16	k23
PYGM	Y	k16	k16	k23
PZP	N	k16	k16	k14
QDPR	Y	k22	k16	k23
QKI	N	k14	k16	k11
RAB10	N	k22	k16	k11
RAB11B	N	k16	k16	k11

RAB11FIP5	N	k14	k14	k23
RAB14	N	k16	k16	k11
RAB18	N	k22	k22	k11
RAB1C	N	k22		k23
RAB21	N	k22	k16	k11
RAB27B	N	k17	k17	k17
RAB2A	N	k22	k16	k23
RAB31	N	k17	k17	k23
RAB35	N	k22	k16	k14
RAB3A	N	k22	k16	k11
RAB3C	N	k22	k16	k11
RAB3GAP1	N	k16	k16	k14
RAB3GAP2	N	k17	k17	k23
RAB5A	N	k22		k11
RAB5B	N	k16	k16	k11
RAB5C	N	k22	k16	k17
RAB6A	N	k22	k16	k23
RAB6B	N	k17	k14	k17
RAB7A	N	k17	k22	k23
RAB8A	N	k16	k16	k11
RAB8B	N			k11
RABGGTB	N	k16	k16	
RABL6	N	k16		k11
RAC1	N	k16	k16	k11
RAD23B	N	k17	k17	k17
RALA	N	k22		k11
RANBP1	N		k16	k11
RAP1A	Y	k22	k16	k11
RAP1B	N			k11
RAP1GAP	N	k16	k16	k11
RAP2C	N	k14		
RARS1	N	k22	k16	k11
RASA4B	N	k16	k16	k11
RASGRF1	N	k22	k16	k11
RBBP9	N	k17	k16	k23
RBFOX2	N	k22	k16	k11
RBM14-RBM4	N	k22	k16	k11
RBM3	N	k17	k22	k23
RBM39	N		k16	k14
RBMXL1	N		k16	k11
RCN2	N	k22	k16	k17
RDH14	N	k23	k17	k23

RDX	N	k16	k16	k11
REEP2	N			k11
REEP5	N	k16	k16	k11
RELL2	N	k16		k11
RFTN2	N	k16		k11
RGS6	N	k22		k11
RHEB	N	k22	k16	k23
RHOA	N	k22	k16	k11
RHOB	N	k16	k16	k11
RHOG	N	k16	k16	k11
RNF126	N	k22		k14
RNF214	N	k22		k23
RNH1	N	k22	k16	k23
RNMT	N		k16	k23
RNPEP	N	k22	k16	
RNPS1	N	k22	k16	
RPH3A	N	k22	k16	k11
RPL10A	Y	k16	k16	k11
RPL10L	N	k16	k16	k23
RPL11	Y		k16	k11
RPL12	Y	k22	k16	k23
RPL13	Y	k16	k16	k11
RPL13A	Y	k17	k17	k14
RPL14	Y	k16		
RPL15	Y	k22		k11
RPL17-C18orf32	N	k16	k16	k11
RPL18	Y	k22	k14	k23
RPL18A	Y	k22	k16	k11
RPL19	Y	k16		k11
RPL22	Y	k22	k16	k23
RPL22L1	N			k14
RPL23	Y	k16	k14	k23
RPL23A	Y	k16	k16	k23
RPL26	Y		k14	k11
RPL27	Y	k17	k14	k23
RPL27A	Y			k11
RPL3	Y	k16		k11
RPL36	Y	k16	k16	
RPL39	Y	k16	k16	k11
RPL4	Y	k14	k14	k11
RPL5	Y	k22	k16	k23
RPL6	Y	k14	k14	k11

RPL7	Y	k16	k16	k11
RPL7A	Y	k14	k14	k11
RPL8	Y	k16	k14	k11
RPLP0	Y	k17	k22	k23
RPLP1	Y	k17	k22	k23
RPLP2	Y	k22		k23
RPN1	N	k22	k16	k11
RPS11	Y	k16		
RPS12	Y	k16	k16	k11
RPS13	Y	k17	k17	k23
RPS14	Y	k16	k16	k11
RPS15	Y	k17	k17	k17
RPS15A	Y	k16	k16	k11
RPS17	Y	k22	k22	k11
RPS18	Y	k17	k17	k23
RPS19	Y	k16	k16	k11
RPS2	Y	k22	k14	k11
RPS20	Y	k16	k16	k11
RPS21	Y	k16	k16	k11
RPS25	Y			k11
RPS27	Y	k22	k16	k11
RPS27A	Y	k22	k16	k11
RPS28	Y	k22	k16	k11
RPS3	Y	k16	k16	k11
RPS4Y2	N		k16	k11
RPS5	Y	k16	k16	k11
RPS6	Y	k14	k14	k11
RPS7	Y		k14	k23
RPS8	Y	k14	k14	k11
RPSA	Y	k22	k14	k23
RRBP1	N	k16	k16	k11
RTN1	N	k22	k16	k11
RTN3	N	k16	k16	k11
RTN4	N	k22	k16	k11
RUFY3	N	k16	k16	k11
RUVBL1	N	k16		
S100A1	N	k17	k14	k17
S100A13	N			k11
S100A6	N	k14	k14	k11
S100A9	N	k17	k17	k17
S100B	N	k23	k23	k23
S1PR1	N	k22	k16	k22

SACM1L	Y	k22	k16	k11
SAE1	N	k22	k16	k23
SAFB	N	k22	k16	k14
SARNP	N	k16	k16	
SARS1	N	k22	k16	k11
SBF1	N		k16	
SCAI	N	k23	k23	k23
SCAMP1	N	k16	k16	k11
SCAMP3	N	k16	k16	k11
SCAMP5	N	k22	k16	k11
SCCPDH	N	k22	k16	k11
SCG2	N	k16	k16	k11
SCG5	N	k16	k16	k11
SCN4B	N	k22	k16	k23
SCOC	N	k23	k14	k23
SCP2	Y	k22		k11
SCRN1	N	k22		k11
SCRN2	N	k16		
SCRN3	N	k17	k17	k23
SDHA	Y	k22	k16	k11
SDHAF2	N	k17	k17	k17
SDHB	Y	k22	k16	k11
SDR39U1	N	k17	k14	k23
SEC22B	N	k16	k16	k11
SEC23A	Y	k17	k17	k17
SEC31A	N	k22	k16	
SELENBP1	N	k17	k17	k17
SERBP1	N	k16		k11
SERPINA1	N	k17	k17	k23
SERPINA3	N	k17	k17	k23
SERPINB1	N	k17	k17	k23
SET	N	k22	k16	k11
SETD3	N	k17	k17	k17
SETD7	N	k23	k16	
SEZ6L2	N	k17		k17
SF1	N	k16	k16	
SFMBT1	N	k23	k17	k23
SFPQ	N	k22	k16	k11
SFXN1	N	k22		
SFXN3	N	k16	k16	k11
SFXN5	N	k22	k16	k11
SGIP1	N		k16	k11

SGTA	N		k16	k11
SH3BGRL	N	k22	k16	
SH3BGRL3	N	k22		k11
SH3GL2	N	k22	k16	k11
SH3GLB1	N	k11	k16	k11
SH3GLB2	N	k16		k11
SHANK1	N		k16	
SIK3	N			k11
SIRPG	N	k22	k16	k11
SIRT2	N	k22	k16	k23
SLC12A2	N	k22	k16	k11
SLC12A5	N	k22	k16	k11
SLC12A6	N	k16	k16	
SLC16A1	Y	k16	k16	
SLC17A6	N	k16	k16	k11
SLC17A7	N		k14	k14
SLC1A2	N	k22	k16	k11
SLC1A3	N	k17	k16	k23
SLC1A4	N	k16	k16	
SLC25A11	Y	k22		k11
SLC25A12	Y	k22	k16	k11
SLC25A22	N	k16		k11
SLC25A25	N	k16		k16
SLC25A3	N	k22	k16	k11
SLC25A4	Y	k22	k16	k11
SLC25A46	N	k16		k11
SLC25A5	Y	k17	k16	k22
SLC27A4	N	k23	k23	k23
SLC2A1	Y	k16	k16	k11
SLC2A3	Y	k22	k16	k23
SLC32A1	N	k16	k16	k11
SLC3A2	N	k22	k16	k11
SLC44A1	Y	k22	k14	k23
SLC44A2	Y	k16	k16	k11
SLC4A1	Y	k14	k16	k14
SLC4A10	N	k17	k22	
SLC4A4	N	k22	k16	k23
SLC4A8	N	k17		k17
SLC6A1	N	k16	k16	k11
SLC6A11	Y	k16	k16	k11
SLC6A5	N	k16	k16	k11
SLC6A9	N	k22	k16	k14

SLC7A5	N	k16	k16	k11
SLC8A1	N	k17	k17	k17
SLC8A2	N	k17	k16	k11
SLC9A3R1	N		k16	k11
SLK	N	k22	k16	
SMAP2	N	k22	k16	k11
SMS	Y	k23	k14	k23
SNAP25	Y	k22	k16	k11
SNAP47	N	k22	k16	k23
SNAP91	N	k22	k16	k11
SNCA	N	k16	k16	
SNCB	N	k16	k16	k11
SNCG	N	k16	k16	k11
SND1	N	k22	k16	k11
SNPH	N	k16	k16	k11
SNRNP70	N	k16	k16	k11
SNRPB	N	k23	k23	k23
SNRPD1	N	k22	k14	k17
SNRPD2	N	k17	k17	k23
SNTA1	N	k16	k16	k11
SNX1	N	k22	k16	
SNX12	N	k22	k16	k11
SNX2	N	k22	k16	
SNX27	N	k16	k16	
SNX3	N	k17	k16	k14
SOD1	N	k16	k16	k11
SOD2	N	k22		k11
SORBS1	N	k16	k16	
SORBS2	N		k14	
SORD	Y			k11
SPARC	N	k16	k16	
SPARCL1	N	k16		k11
SPART	N	k16	k16	
SPECC1	N	k16		
SPEN	N	k22	k22	k22
SPR	Y	k22	k16	k23
SQSTM1	N	k17		k16
SRCIN1	N	k22		k11
SRGAP2	N	k22	k16	
SRGAP3	N	k16		
SRI	N	k22	k16	k23
SRPK2	N	k16	k16	

SRRT	N	k16		
SRSF1	N	k16	k16	k11
SRSF10	N	k16	k16	k11
SRSF2	N	k22	k16	k11
SRSF3	N	k22	k16	k23
SRSF4	N	k22	k16	k11
SRSF7	N		k16	k11
SSB	N	k22	k16	k11
SST	N	k16	k16	
ST13P5	N	k17	k16	k23
STAM	N	k22		k17
STIP1	N	k16	k16	k11
STK24	N	k17	k22	k17
STK39	N	k22		k23
STMN1	N	k16	k16	k11
STOML2	N	k16	k16	k11
STRAP	N		k16	k11
STUB1	N		k16	k11
STX12	N			k11
STX1A	Y			k23
STX1B	N	k22	k16	k11
STX7	N		k16	k11
STXBP1	Y	k22	k16	k23
STXBP5	N	k22	k16	k23
STXBP6	N	k16	k16	k11
SUCLA2	Y	k16	k16	k11
SUCLG1	Y	k16	k16	k11
SUCLG2	Y	k16	k16	k11
SUGT1	N	k22		k11
SULT4A1	Y	k22	k22	k17
SUMO2	N	k17	k16	k11
SV2A	N	k22	k16	k11
SV2C	N	k16	k16	k11
SVIP	N	k16	k16	k11
SYN1	N	k16	k16	k11
SYN2	N	k22	k16	k11
SYNCRIP	N		k16	
SYNGAP1	N	k17	k14	k17
SYNGR1	N	k22	k22	k23
SYNGR3	N	k17	k16	k23
SYNJ1	Y	k22	k16	k11
SYNJ2BP	N	k22	k16	k11

SYNRG	N	k16	k16	k11
SYP	N	k22	k22	k23
SYPL1	N		k14	
SYT1	N	k22	k16	k23
SYT2	N	k22	k22	k23
TAGLN	N	k22		k11
TAGLN2	N	k14	k16	k11
TAGLN3	N	k22	k16	k23
TALDO1	Y	k22	k16	k11
TARDBP	N	k17	k14	k23
TBC1D10B	N	k16	k16	k11
TBCA	N	k16		k11
TBCB	N	k17	k14	k23
TCEAL6	N	k16	k16	k11
TCP1	N	k22	k16	k23
TECR	Y	k16	k16	
TF	N	k22	k16	k11
TGM2	N	k16	k16	k16
THEM4	Y	k17	k22	k23
THOP1	N	k17	k14	k17
THRAP3	N	k22	k16	
THY1	N	k16	k16	k11
TIMM10	N	k16	k16	k11
TIMM13	N	k16	k16	k11
TIMM44	N			k11
TIMM8A	N	k16		k11
TIMM8B	N	k16	k16	k11
TIMM9	N	k16	k16	k11
TIPRL	N	k22	k16	k14
TJP1	N		k16	
TJP2	N	k16	k16	
TKT	Y	k22	k16	k11
TLN1	N	k22		k11
TLN2	N			k11
TMEM163	N	k17		k11
TMEM30A	N	k16	k16	k11
TMOD2	N	k22	k16	k11
TMPO	N	k17	k16	k11
TMPRSS13	N	k16		k11
TMSB10	N	k16	k16	
TMSB4Y	N	k16	k16	k11
TMX2	N	k16		k11

TMX3	N	k22	k16	k14
TMX4	N		k16	k11
TNNT2	N	k14	k14	
TNPO1	N	k17	k22	k17
TNR	N	k22	k16	k23
TOLLIP	N			k11
TOM1	N	k22	k16	k17
TOM1L2	N	k16	k16	k11
TOMM70	N	k16	k16	k11
TPD52	N		k22	k23
TPD52L2	N		k16	k11
TPI1	Y	k22	k16	k11
TPM1	N		k16	k11
TPM2	N	k23	k14	k11
TPM3	N		k16	k11
TPM4	N		k16	k11
TPP1	N	k22	k16	k11
TPP2	N	k22	k16	k11
TPPP	N	k16	k16	k11
TPPP3	N	k16		k11
TPR	Y			k11
TPRG1L	N	k17	k14	k11
TPT1P8	N	k17	k22	k23
TRAF3	N	k16	k16	k11
TRAPPC1	N	k16	k16	k14
TRIM2	N	k22	k16	k23
TRIM28	N	k14	k16	k11
TRIM3	N	k22	k22	k23
TRIO	N	k22		k23
TSC22D1	N			k11
TSC22D3	N	k16	k16	k11
TSPAN2	N	k22	k16	k11
TSPAN7	N	k22	k22	k17
TST	Y	k22	k16	k11
TTC1	N	k16	k16	
TTC7B	N	k16	k16	k11
TTN	N	k22		k11
TTR	Y	k22	k22	
TTYH1	N	k16	k16	k11
TUBA1A	N	k22	k16	k23
TUBA3D	N	k22	k14	
TUBA4A	N	k22		k23

TUBB	N	k22	k22	k23
TUBB1	N	k17	k14	k17
TUBB2A	N	k22	k14	k23
TUBB2B	N		k16	k11
TUBB3	N	k22	k14	k23
TUBB4A	N	k22	k16	k23
TUBB4B	N	k22	k16	k23
TUBB6	N		k16	k23
TUFM	N	k16	k16	k11
TXN	Y	k22	k16	k23
TXN2	N	k22	k16	k23
TXNDC12	N	k16	k16	
TXNDC17	N	k22	k16	k11
TXNDC5	N			k11
TXNL1	N	k22	k16	k23
TXNRD1	Y	k17	k14	k23
U2SURP	N	k16	k16	k11
UAP1L1	N		k16	k11
UBA1	N	k22	k16	k23
UBA5	N	k22		k11
UBAP2L	N	k17	k17	k23
UBASH3B	N	k17	k14	k23
UBE2D1	N		k16	k11
UBE2D3	N	k22	k16	k23
UBE2L3	N	k22	k16	k23
UBE2M	N	k16		k11
UBE2N	N	k22	k16	k11
UBE2O	N	k16	k16	k11
UBE2V1	N	k16	k16	k14
UBE2V2	N	k22	k22	k23
UBQLN1	N	k16	k16	k11
UBQLN2	N	k16	k16	k11
UBXN1	N			k11
UBXN6	N			k11
UCHL1	N	k16	k16	k11
UCHL3	N		k14	k23
UFC1	N	k22	k16	k11
UGP2	Y	k14	k16	k23
UNC13A	N	k22		k16
UPRT	N	k22		k11
UQCR10	Y	k22	k16	k11
UQCRB	Y	k16		k11

UQCRC1	Y	k16	k16	k11
UQCRC2	Y	k16	k16	k11
UQCRFS1P1	N	k16		k11
UQCRHL	N	k16		k11
UQCRQ	Y	k16		k11
USO1	N	k16	k16	k11
USP14	N	k22	k16	
USP5	N	k22		k23
USP7	N	k11	k14	k23
USP9X	N	k17	k16	k17
VAC14	Y	k22	k16	k14
VAMP1	N	k16	k16	k11
VAMP2	Y	k22	k16	k11
VAPA	Y	k22	k16	k23
VAPB	Y	k16	k16	k11
VARS1	N	k22	k16	k11
VAT1	N	k16		k11
VAT1L	N	k16	k16	k11
VBP1	N	k22	k22	k23
VCAN	Y	k16	k16	k11
VCL	N		k16	k11
VCP	N	k22	k16	k23
VDAC1	N	k22	k16	k11
VDAC2	N	k17	k16	k11
VDAC3	N	k22	k16	k11
VIM	N	k17		k11
VPS26B	N	k16	k16	k11
VPS29	N	k22	k16	k23
VPS35	N	k22	k16	k23
VPS45	N	k23	k11	k16
VPS4B	N	k17	k14	k14
VSNL1	N	k22	k16	k23
VTI1A	N	k22	k16	k23
VTI1B	N	k16	k16	k11
WARS1	N	k22		k11
WASF1	N	k16	k16	k11
WASF3	N		k16	
WASL	Y	k22		k14
WBP11	N	k23	k17	k23
WDR1	N	k22	k16	k23
WDR33	N	k16		
WDR37	N	k22	k16	k14

WDR47	N	k16	k16	k11
WDR7	N	k22	k16	k23
WNK1	N	k22		k11
WNK2	N	k16		
XPO1	N	k11		k11
YARS1	N	k16	k16	k11
YJEFN3	N	k17	k17	k17
YKT6	N	k22	k16	k11
YWHAB	N	k16	k16	k11
YWHAE	N	k22	k16	k11
YWHAG	N	k22	k16	k11
YWHAH	N	k22	k16	k23
YWHAQ	N	k16	k16	k11
YWHAZ	N	k22	k16	k11
ZNF428	N	k22	k16	
ZRANB2	N	k16	k16	