



l'intelligence du vivant
structure fédérative de recherche

Demande de bourse de thèse

Dossier de proposition de sujet de thèse 2017

**à transmettre pour le 20 décembre
à la SFR (Laurent Urban ou Nadia Bertin)**

- 1° Sont considérés comme éligibles uniquement les sujets entrant dans le cadre du projet scientifique de la SFR TERSYS ;
- 2° Priorité est donnée aux codirections impliquant deux laboratoires/unités membres de TERSYS ;
- 3° L'un des deux codirecteurs doit être impérativement rattaché à l'ED 536 Sciences et Agrosciences ;
- 4° L'un des deux codirecteurs au moins doit être un enseignant-chercheur de l'UAPV ;
- 5° Les deux codirecteurs doivent avoir l'Habilitation à Diriger les Recherches mais la possibilité d'associer des coencadrants est reconnue ;
- 6° L'appel à proposition est ouvert aux étudiants selon les règles de l'ED 536 Sciences et Agrosciences. Ils sont ouverts aux étudiants de toute nationalité ;
- 7° La qualité des candidats représente un critère majeur de sélection des dossiers.

Laboratoires de la SFR impliqués	EA4278, LaPEC / UMR INRA 1260-INSERM 1062 NORT
Titre de la thèse*	Fatigue cardiaque induite par un exercice épuisant : développement de stratégies naturelles de Cardioprotection.
Résumé (10 – 15 lignes)	
<p>Pratiquer une activité physique fait partie intégrante d'une vie saine. Néanmoins, des études récentes montrent qu'un exercice intense prolongé (type marathon ou triathlon) est à l'origine d'une atteinte de la fonction cardiovasculaire. La popularité des courses d'extrême endurance augmente mondialement, pourtant, cette pratique ne fait l'objet d'aucun suivi médical particulier. En 2005, on recensait environ 300 sportifs victimes de mort subite. En 2010, 800 sportifs de tout niveau, ont été victime de ce type d'accident cardiaque « immérité ». Récemment, nous avons pu mettre en avant le rôle du stress oxydant et de modifications redox post-traductionnelles dans l'apparition d'incohérences fonctionnelles myocardiques. Il semble dès lors qu'une supplémentation en antioxydants naturels avant la réalisation de ce type d'exercice puisse constituer une stratégie d'intérêt dans le traitement de ce type de désordre fonctionnel. Ainsi, dans le cadre d'un projet collaboratif entre la société Naturex, le LaPEC et le NORT, ce projet de thèse a pour objectif i) de développer de nouvelles stratégies de cardioprotection basées sur l'utilisation de substances naturelles antioxydantes, ii) d'en étudier les mécanismes cellulaires sous-jacents, et iii) d'identifier de nouveaux biomarqueurs de la souffrance myocardique au cours de l'exercice.</p>	
Axe(s) de la SFR TERSYS concerné(s)	
Axe 3 : Évaluation de la valeur-santé des produits frais et transformés en fonction de leur composition	
Enjeu structurant pour la SFR	
<p>Ce projet de thèse sera réalisé dans le cadre d'une collaboration entre les laboratoires de la SFR Tersys (Axe3) LaPEC (UAPV) et NORT (INSERM INRA AMU) et la société NATUREX, actuel leader mondial des ingrédients naturels d'origine végétale. Par ailleurs, un autre laboratoire sera impliqué dans ce projet, le laboratoire PhyMedExp (O. Cazorla, UMR INSERM-CNRS Montpellier) reconnu internationalement pour ses compétences dans l'étude de la machinerie contractile des cellules musculaires cardiaques.</p> <p>Ce projet devrait contribuer à renforcer l'intérêt des antioxydants naturels dans la protection du cœur au</p>	

cours d'une situation de stress. L'originalité de ce projet de thèse est de tenter de moduler les conséquences biologiques du stress oxydant sur le fonctionnement cardiaque au cours d'un exercice intense de longue durée. En effet, bien que les conséquences fonctionnelles de ce type de pratiques extrêmes soient aujourd'hui clairement identifiées, les mécanismes cellulaires sous-jacents demeurent méconnus. Dès lors, aucune prise en charge précise n'existe pour tenter de limiter ces atteintes cardiovasculaires et leurs conséquences à long terme. Notre équipe est pionnière sur le sujet et nous sommes les premiers à avoir mis en avant le rôle de modulations redox-cellulaires dans l'apparition de ce type de dysfonctions. L'utilisation de composés naturels antioxydants semble donc pouvoir être une stratégie d'intérêt afin de prévenir ce type d'altération.

*Le titre doit pouvoir être publié sur le site web de l'ED et de la SFR

Encadrement

Responsable(s) de la thèse Noms et labos d'appartenance	Cyril REBOUL (EA4278, LaPEC)	HDR ? (O/N)	O
Directeur(s) de la thèse (si différent du(des) responsable(s))		HDR ? (O/N)	
Nombre de doctorants dirigés par le(s) responsable(s) de la thèse	0	Nombre de post-docs ou CDD dirigés par le(s) responsable(s) de la thèse	0

Description du projet (4 pages maximum)

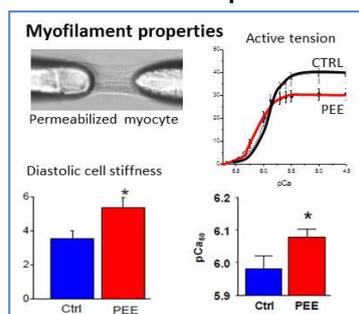
Enjeux socio-économiques et scientifiques pour la SFR TERSYS

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une collaboration inédite entre le LaPEC, le NORT et la société NATUREX. Cette société, leader mondial des ingrédients naturels d'origine végétale, a notamment comme objectif de développer des composés à des fins nutrition-santé (Dpt *Nutrition and Health* de Naturex). La signature récente d'un contrat entre la société Naturex et le LaPEC (porteur C. Reboul, Signature Novembre 2016 ; 95k€) avec comme objectif la mise en évidence des effets cardioprotecteurs de composés naturels au cours d'un exercice intense de longue durée, peut certainement déboucher sur une collaboration plus large entre les structures et le dépôt de projets communs (ANR, Fondation de France etc...).

Question de recherche proposée au candidat

L'activité physique régulière fait partie des recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Néanmoins, depuis une dizaine d'année, la pratique d'épreuves intenses de longue durée, tel que les trails, les marathons, a connu un essor important aussi bien chez les athlètes accomplis que chez les sportifs amateurs. Depuis la mort légendaire de Phidippides après avoir couru la distance entre Marathon et Athènes pour annoncer la victoire des Perses et plus récemment celle du triathlète Laurent Vidal (31 ans) d'arrêt cardiaque, les effets potentiellement dangereux pour la santé cardiovasculaire de ce type de **pratique physique extrême** sont débattus.

Des études récentes, notamment de notre groupe, ont montré que ce type d'exercice physique était à l'origine d'altération transitoire de la fonction cardiaque, connu aujourd'hui sous le terme d'**exercice-induced cardiac fatigue (EICF)** (Nottin et al., 2009). Jusqu'à récemment, la plupart des informations concernant ce phénomène étaient issu d'études réalisées chez l'homme. Ainsi, **nous possédions très peu d'éléments scientifiques** afin de comprendre ce phénomène d'EICF. Assez récemment, dans le cadre d'un



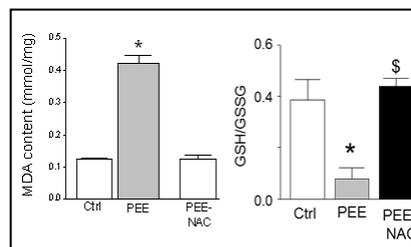
projet financé par la Société Française de Cardiologie (porteur **C. Reboul**, 2011-2013), nous avons pu développer un modèle animal d'EICF autorisant une évaluation plus en profondeur de la fonction cardiaque (Vitiello et al., 2011). Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'à l'échelle du cardiomyocyte, la fatigue cardiaque se traduit par une atteinte des protéines contractiles myofilaementaires (Figure 1) associée à des troubles de l'homéostasie calcique (Résultats en cours de publication).

Figure 1. Propriété de la machinerie contractile de cardiomyocytes après un EICF (PEE pour prolonged exhausting exercise).

La relation entre la tension active et le niveau de calcium est obtenue sur cardiomyocytes perméabilisés (image du haut). La sensibilité des myofilaments pour la Ca^{2+} (pCa_{50}) est augmentée. Les propriétés de relaxation des myofilaments sont altérées.

L'exercice physique, qu'il soit intense ou modéré, est caractérisé par un stress adrénérgerique et oxydant (Mason et al., 2016). Dans ce premier travail, Nous avons pu démontrer que contrairement à un exercice modéré, l'EICF est à l'origine d'un stress oxydant exacerbé, caractérisé par une augmentation des marqueurs de peroxydation lipidique (MDA) et un effondrement du ratio glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) (Figure 2).

Figure 2. Malondialdhyde (MDA) and ratio glutathion réduit/ glutathion oxydé (GSH/GSSG) mesuré dans des cœurs de rats après un EICF (PEE pour Prolonged exhausting exercise) avec ou sans traitement préalable avec du NAC (50mg/kg, ip). L'EICF augmente la quantité de MDA dans le cœur et réduit le ratio GSH/GSSG.



Ce stress oxydant est notamment à l'origine de modifications redox post-traductionnelles touchant certaines protéines clés dans la régulation de la contractilité cardiaque (s-glutathionylation de la Myosin Binding Protein-C). De manière intéressante, un traitement anti-oxydant basé sur une supplémentation en N-Acétylcystéine (NAC) a permis de reverser ces modifications redox (Figure 2) et ainsi de prévenir les dysfonctions cardiaques observées après un EICF.

Ainsi, avec l'augmentation du nombre de pratiquant d'exercice intense prolongé, chez le sportif amateur comme chez l'athlète, la répétition de ce type d'exercice peut devenir un problème important de santé publique (La Gerche et al., 2015). Il semble donc que développer de nouvelles stratégies permettant de prévenir ces dysfonctions puisse revêtir un intérêt sociétal non négligeable. Dans notre modèle, nous avons prévenu l'apparition de dommages cellulaires après un EICF en utilisant un antioxydant non spécifique, la N-Acétylcystéine (Reboul et al., 2013). Néanmoins, les doses utilisées dans notre étude ne sont pas compatibles avec une utilisation chez l'homme et plus particulièrement chez des sujets considérés comme asymptomatiques. Il semble dès lors important de développer de nouvelles stratégies anti-oxydantes facilement utilisables, permettant de protéger le cœur au cours de ce type d'épreuve.

Il est largement démontré qu'une alimentation riche en antioxydants naturels réduit le risque relatif de mortalité dans diverses pathologies et notamment dans les maladies cardiovasculaires (Bjørklund and Chirumbolo, 2017; Braud et al., 2016). On sait notamment que les polyphénols sont capables de stimuler de façon modérée la synthèse de monoxyde d'azote par les cellules endothéliales et de réduire le stress oxydant (Bjørklund and Chirumbolo, 2017). Dès lors, il semble que l'utilisation d'antioxydants naturels, tel que certains polyphénols (épicatéchine, sinapine etc...) avant et au cours d'un EICF, puisse constituer une stratégie de cardioprotection naturelle facilement transférable à l'Homme.

Hypothèses de travail

L'objectif de ce projet de thèse est d'évaluer comment une supplémentation en antioxydant naturel avant la réalisation d'un exercice extrême de longue durée peut permettre de prévenir l'apparition d'incohérences fonctionnelles cardiaques. Plus particulièrement, ce projet tentera d'élucider les mécanismes cellulaires à l'origine de cette cardioprotection. Ainsi, une attention toute particulière sera portée sur les modulations redox de protéines impliquées dans le couplage excitation/contraction cardiomyocytaire. Ce type de stratégies antioxydantes naturelles pourrait permettre de limiter les dommages cellulaires observés après un EICF et ainsi constituer une véritable piste nutraceutique pour les sportifs de l'extrême. Par ailleurs, à ce jour, aucun biomarqueur fiable n'a pu être mis en avant afin d'évaluer la sévérité et la dangerosité des lésions associées à ce type d'exercice. En effet, ceux utilisés en routine hospitalière, tel que les cTni (Troponin I cardiaque) ou le BNP (brain natriuretic peptide), présentent des niveaux sanguins après un marathon équivalent à ceux observés au cours d'un infarctus du myocarde (La Gerche et al., 2015). Pourtant, l'évaluation de la fonction et des lésions par imagerie cardiaque (échocardiographie ou Image par Résonance Magnétique) ne corrobore pas les données sanguines. Il semble donc que d'autres atteintes cellulaires, notamment au niveau des muscles squelettiques (rhabdomyolyse), puissent contribuer à fausser les résultats. Ainsi, un autre objectif de ce travail de thèse sera, à partir de prélèvements sanguins et tissulaires réalisés sur les animaux des différentes conditions expérimentales, de tenter d'identifier de nouveaux biomarqueurs de type miRNA de la souffrance myocardique au cours d'un exercice.

Matériel nécessaire (disponible et/ou à produire), et méthodes envisagées

Les extraits naturels seront produits par la société Naturex. La mesure de leur biodisponibilité dans différents compartiments (cœur, plasma, vaisseaux) sera réalisée par la société Naturex. L'évaluation de la fonction cardiovasculaire sera principalement réalisée au sein du Lapec à différents niveaux :

- In-vivo, grâce à une évaluation *in-vivo* par échocardiographie de haute résolution (plateforme de Physiologie Animale et Humaine, plateau d'imagerie du rongeur, VEVO3100)
- Ex-vivo sur cœur isolé perfusé, afin s'affranchir des différents facteurs circulants et d'évaluer les effets propres sur le muscle cardiaque (poste de cœur isolé perfusé de Langendorff, Radnoti)
- In-vitro sur cardiomyocytes isolés permettant de coupler l'analyse de l'homéostasie calcique et la contraction/relaxation des cellules (système ionoptix). Ces expérimentations auront lieu au sein de l'U1046 (INSERM/CNRS) en collaboration avec O. Cazorla. (O. cazorla et C. reboul collaborent étroitement depuis 6 ans, ils ont déjà co-encadré un étudiant en thèse ensemble et ont co-signé 11 articles ensemble, IF moyen : 5.8).
- Au niveau moléculaire par analyses des modifications redox des différentes protéines clé de régulation du couplage excitation/contraction (western blots réalisés dans différentes conditions, non dénaturante, non réductrice...).
- La quantification des miRNAs au niveau plasmatique et du muscle cardiaque sera effectuée par microarrays d'expression des miRNA, puis les résultats seront validés par qPCR (Karkeni et al., 2016). Ces mesures seront réalisées au NORT sous la responsabilité de JF Landrier.

Toutes ces compétences sont déjà maîtrisées au sein des différents partenaires du projet et les matériels disponibles.

Programme de recherches

L'objectif de ce projet de thèse sera donc, en se basant sur un modèle de dysfonction cardiaque originale, bien maîtrisé au sein du laboratoire LaPEC, de :

1/ développer en collaboration avec la société NATUREX des stratégies de protection basées sur l'utilisation des propriétés antioxydantes de composés naturels. Une première étape de screening est actuellement en cours. Nous tentons à travers celle-ci d'identifier des composés efficaces et d'évaluer leur mitochondrio-tropicité.

2/ mieux comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents aux effets délétères de l'EICF sur le myocarde et à la cardioprotection permise par les antioxydants naturels. Une attention toute particulière sera portée aux modifications de la signalisation redox intracellulaire (s-nitrosylation, s-gluthionylation, carbonylation, nitrotyrosination).

3/ en collaboration avec JF Landrier (NORT, INRA INSERM Marseille) et avec C. Riva (LaPEC), d'identifier de potentiels biomarqueurs corrélés avec la sévérité des lésions cardiaques, via le criblage de miRNAs. En effet, les marqueurs actuels de souffrance myocardique, tel que la mesure des concentrations plasmatiques en cTnl ou en LDH, ne semblent pas refléter de manière fiable l'ampleur de la souffrance myocardique au cours de ce type d'épreuve.

Calendrier

Trimestres	Année 1				Année 2				Année 3			
	3	6	9	12	3	6	9	12	3	6	9	12
Task 1 Mesures physiologiques												
Formation In-vivo et Niveau 1	■											
Mesures In-vivo		■										
Mesures Ex-vivo			■		■							
Mesures In-vitro					■							
Congélation tissus				■								
Task 2 signalisation/biomarqueurs												
Analyses Biochimiques					■		■		■			
Criblages biomarqueurs							■		■			
Results communication-Publications												■

Publications envisageables

Les travaux issus de ce doctorat devraient pouvoir donner lieu à au moins deux publications dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture (Peer review Journals) de bon niveau dans les domaines de la signalisation redox (Antiox Redox Signal, IF : 7.4 ; Free Rad res : IF : 5.5) de la nutrition (J Nutr Biochem : 4.7) ou de la biologie cardiovasculaire (Basic res Cardiol IF : 6.01 ; J Moll Cell Cardiol IF : 4.8).

Par ailleurs, l'étudiant en thèse sera amené à participer à un certain nombre de congrès nationaux (Journées Francophones de Nutrition ; Printemps de la cardiologie) et internationaux (European Society of Cardiology ; International Society for Heart Research).

Compétences cognitives et techniques acquises par le doctorant

Le doctorant aura à développer des compétences dans l'étude et la connaissance de la physiologie du système cardiovasculaire, la signalisation redox et la connaissance de propriétés biologiques des antioxydants naturels. Il devra acquérir des compétences dans :

- la conduite de protocoles expérimentaux sur animaux vivants (qui nécessiteront l'obtention du « Niveau 1 en expérimentation animal »)
- La technique de cœur isolé perfusé de Langendorff.
- La microscopie à fluorescence sur cellules isolées (isolement primaire de cardiomyocytes)
- La biochimie (Western Blot, quantification de miRNAs)

Enfin, l'étudiant devra bien entendu développer des compétences intellectuelles dans la compréhension, l'évaluation et la conduite d'une démarche expérimentale. Il devra se confronter à l'écriture d'articles scientifiques en anglais et la communication orale de résultats scientifiques en français et en anglais.

Partenariat scientifique et industriel dans lequel s'inscrit le travail

Ce projet sera réalisé dans le cadre d'un partenariat scientifique entre le LaPEC, le NORT et la société Naturex. Ce projet devrait ainsi pouvoir rapidement déboucher sur la conduite d'une étude clinique réalisée in-situ ou en laboratoire, afin d'évaluer le transfert possible des résultats obtenus sur un modèle animal chez l'homme réalisant une épreuve physique de longue durée.

Références bibliographiques (en gras les personnes impliquées dans le projet)

Reboul C., Andre, L., Fauconnier, J., Feillet-Coudray, C., Meschin, P., Farah, C., Fouret, G., Richard, S., Lacampagne, A., and **Cazorla, O.** (2013). Subendocardial increase in reactive oxygen species production affects regional contractile function in ischemic heart failure. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1009–1020.

Bjørklund, G., and Chirumbolo, S. (2017). Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 33, 311–321.

Braud, L., Battault, S., Meyer, G., Nascimento, A., Gaillard, S., de Sousa, G., Rahmani, R., **Riva, C.**, Armand, M., Maixent, J.-M., et **Reboul C** (2016). Antioxidant properties of tea blunt ROS-dependent lipogenesis: beneficial effect on hepatic steatosis in a high fat-high sucrose diet NAFLD obese rat model. *J. Nutr. Biochem.* 40, 95–104.

Karzeni, E., Astier, J., Tourniaire, F., El Abed, M., Romier, B., Gouranton, E., Wan, L., Borel, P., Salles, J., Walrand, S., et **Landrier JF** (2016). Obesity-associated Inflammation Induces microRNA-155 Expression in Adipocytes and Adipose Tissue: Outcome on Adipocyte Function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 1615–1626.

La Gerche, A., Claessen, G., Dymarkowski, S., Voigt, J.-U., De Buck, F., Vanhees, L., Droogne, W., Van Cleemput, J., Claus, P., and Heidbuchel, H. (2015). Exercise-induced right ventricular dysfunction is associated with ventricular arrhythmias in endurance athletes. *Eur. Heart J.* 36, 1998–2010.

Mason, S.A., Morrison, D., McConell, G.K., and Wadley, G.D. (2016). Muscle redox signalling pathways in exercise. Role of antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 98, 29–45.

Nottin, S., Doucende, G., Schuster, I., Tanguy, S., Dauzat, M., and Obert, P. (2009). Alteration in left ventricular strains and torsional mechanics after ultralong duration exercise in athletes. *Circ. Cardiovasc. Imaging* 2, 323–330.

Vitiello, D., Boissière, J., Doucende, G., Gayrard, S., Polge, A., Faure, P., Goux, A., Tanguy, S., Obert, P., **Reboul, C.**, et al. (2011). β -Adrenergic receptors desensitization is not involved in exercise-induced cardiac fatigue: NADPH oxidase-induced oxidative stress as a new trigger. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 111, 1242–1248.

Autres informations (1/2 page maximum)

Avis du directeur d'unité / laboratoire

Avis des directeurs de laboratoires

Ce projet de thèse permettra de renforcer une collaboration naissante avec Naturex et approfondir une thématique de recherche d'envergure sur un sujet d'actualité de prévention des morts subites à l'exercice qui intègre pleinement des mots-clés du LaPEC (exercice – nutrition – prévention - fonction cardiaque). Avis très favorable



Agnès VINET

Avis du directeur d'unité / laboratoire

Avis des directeurs de laboratoires

Ce projet de thèse permettra de renforcer une collaboration naissante avec Naturex et approfondir une thématique de recherche d'envergure sur un sujet d'actualité de prévention des morts subites à l'exercice qui intègre pleinement des mots-clés du LaPEC (exercice – nutrition – prévention - fonction cardiaque). Avis très favorable



Agnès VINET

*Avis très favorable
ilane, Christine ACCESSI*



UMR INSERM 1062 / INRA 1260 / AMU
N.O.R.T.

Nutrition, Obésité, Risque Thrombotique
Faculté de Médecine de la Timone
27, Bd Jean Moulin - 13385 Marseille cedex 05
Tél. 04 91 29 40 90 - 04 91 32 45 93
Fax : 04 91 78 21 01