amU
Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

# THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 18 décembre 2024 par

**Katell AUDOUIN**

# Etude de l'architecture génétique de la variation naturelle du vieillissement cardiaque chez *Drosophila melanogaster*

**Discipline**
Biologie Santé

**Spécialité**
Bioinformatique et Génomique

**École doctorale**
ED 62 – Sciences de la Vie et de la Santé

**Laboratoire**
INSERM U1090 – TAGC
Theories and Approaches of Genomic Complexity

**Composition du jury**

Véronique MONNIER Rapporteuse
Professeur d'Université– Université Paris Cité, BFA Paris

Ariane RAMAEKERS Rapporteuse
Maîtresse de Conférences – Sorbonne Université, Institut Curie, Paris

Krzysztof JAGLA Président du jury
Directeur de Recherche – Directeur de Laboratoire – iGReD Clermont-Ferrand

Laurent PERRIN Directeur de thèse
Directeur de Recherche – TAGC Marseille

Inserm

umr U 1090
TAGC
theories and approaches of genomic complexity

# Affidavit

Je soussigné, Katell Audouin, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Laurent Perrin, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 16 octobre 2024

Signature : 

Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

# Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :
    1. **Audouin K**, Saha S, Röder L, Krifa S, Arquier N, Perrin L. Natural variations of aging of cardiac performance in Drosophila identifies a central function for the PAR domain bZIP transcription factor Pdp1/dHLF in cardiac senescence. bioRxiv. 2024. doi: 10.1101/2024.09.30.615759

2) Participation aux conférences au cours de la période de thèse :
    1. Printemps de la Cardiologie (présentation orale) – Société Française de Cardiologie, Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire – Marseille – 24-26 mai 2023
    2. Colloque de l'ED62 (présentation poster) – Hippo'thèse, Marseille – 30-31 mai 2023

# Résumé

L'identification de facteurs génétiques qui influencent la sénescence cardiaque dans une population naturelle est centrale pour notre compréhension du vieillissement cardiaque et l'étiologie des maladies cardiovasculaires dans la population humaine. Cependant, déchiffrer les mécanismes génétiques responsables des traits complexes chez l'humain est pratiquement inatteignable, dû à l'impossibilité de contrôler l'environnement génétique et les interactions gène-environnement. Le vieillissement cardiaque chez la drosophile a des similarités frappantes avec l'humain, mettant en évidence la conservation du vieillissement cardiaque entre les organismes avec un cœur. A l'aide de la collection de lignées consanguines *Drosophila Genetic Reference Panel* (DGRP), ce manuscrit analyse la sénescence cardiaque dans une population naturelle de drosophiles. Cela a permis l'identification d'un nombre sans précédent de variants et gènes significativement associés à la variation naturelle sur vieillissement cardiaque. En particulier, le facteur de transcription Pdp1 possède plusieurs variants significativement associés au vieillissement de plusieurs traits cardiaques. Une méthode *in vivo* permettant de mesurer la fonction cardiaque a été utilisée afin de déterminer le rôle de Pdp1 sur le vieillissement cardiaque, et a permis de démontrer que Pdp1 joue un rôle cellule-autonome sur la sénescence cardiaque qui pourrait passer par la régulation de l'homéostasie mitochondriale. Globalement, ce travail apporte un regard sur les mécanismes génétiques impliqués sur la variation naturelle du vieillissement cardiaque.

Mots clés : Cœur, Sénescence, Contrôle génétique, Réseau d'interaction

# Abstract

The identification of genetic factors influencing cardiac senescence in natural populations is central to our understanding of cardiac aging and to identify the etiology of associated cardiac disorders in human populations. However, deciphering the genetic underpinning of complex traits in human is almost impossible, due to the infeasibility to control genetic background and gene-environment interactions. Drosophila has striking similarities in cardiac aging with humans, highlighting the conserved nature of cardiac aging for organisms with a heart. Leveraging on a large collection of inbred lines from the Drosophila Genetic Reference Panel (DGRP), this manuscript provides an accurate analysis of cardiac senescence in a natural population of flies. This permitted the discovery of an unprecedented number of variants and associated genes significantly associated to the natural variation of cardiac aging. Specifically, several variants in the transcription factor Pdp1 were found associated with natural variation of the aging of multiple cardiac functional traits. Using an *in vivo* method to measure cardiac function, we demonstrated that Pdp1 cell autonomously plays a central role in cardiac senescence and might do so by regulating mitochondrial homeostasis. Overall, this work provides a unique resource regarding the genetics of cardiac aging in a natural population.

Keywords : Heart, Senescence, Genetic control, Interactor network

# Remerciements

Je voudrais avant tout remercier les membres du jury, d'avoir accepté de lire et examiner mes travaux de thèse, et d'assister à la soutenance pour juger mes travaux. Je remercie le Dr. Krzysztof Jagla, pour avoir accepté de présider ce jury. Je remercie le Pr. Véronique Monnier, d'avoir accepté d'être rapporteuse de ce travail, et d'avoir suivi mon parcours dans mon comité de thèse. Je remercie également le Dr. Ariane Ramaekers d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de faire partie de mon jury.

Je remercie également mon directeur de thèse, le Dr. Laurent Perrin, de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Depuis le concours de l'école doctorale jusqu'à la rédaction de ce manuscrit, tu m'as guidée afin de faire grandir mon esprit scientifique, et as toujours été disponible pour parler des travaux.

Un grand merci à l'équipe Droso, pour m'avoir accueillie à bras ouverts dans le laboratoire. Merci à Nathalie Arquier qui m'a aidée, autant sur le plan scientifique que pour les discussions, et l'amusement de colorer la nourriture des mouches à la fin de la rédaction de ce manuscrit. Merci au Pr. Laurence Röder, pour toutes les discussions au bureau, mais également pour l'aide précieuse que tu m'as apportée avec les mouches à la fin de cette thèse.

Je veux également remercier Elsa Castellani et Daniel Sapede de la plateforme d'imagerie de l'IBDM, pour m'avoir formée et grandement aidée pour la réalisation de l'imagerie.

Merci également au Dr. Thomas Rival, d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse tout d'abord, mais également pour m'avoir aidé avec les premières expériences sur la mitochondrie. Votre expertise, votre temps et vos conseils ont été précieux pour ce projet.

Un grand merci à Frédéric Gallardo et Tahagan Titus d'avoir gérer la cuisine des drosos, et à tous les membres du TAGC de m'avoir accueillie pendant ces 3 années.

Une thèse c'est également rencontrer de nouvelles personnes, et en particulier, je souhaite remercier deux personnes importantes qui ont suivis l'intégralité de mon parcours de thèse, et m'ont soutenue tout ce temps.

D'abord à Juliette, nous avons passé trois années ensembles et même si au début c'était une blague lancée en l'air, il s'avère que nous passons toutes les deux notre thèse à 3 semaines d'écart. Merci pour tous ces moments passés avec toi, pour m'avoir écoutée, épaulée quand le moral faisait le yoyo, que ce soit au travail ou pendant les soirées, les weekends, les vacances.

A Mathieu également, un grand merci. Nous avons passé le concours en même temps, tu as participé à mon comité de thèse, tu m'as aidée de très nombreuses fois, en particulier pour les GWAS, et quand la clim a décidé qu'elle ne fonctionnera pas. Tu as été présent, disponible, et je ne compte plus les heures au travail comme en dehors où tu m'as soutenue, fait rire, appris à parler Marseillais aussi. Alors pour tout : merci.

Je n'oublie pas le reste des doctorants avec qui j'ai passé ces trois années : JC, Mathilde, Lou, Julie, Gaëlle, Loréna, Samantha, Pierre. Ainsi que Pauline et Hélléa qui m'ont aidée, entre autre à mettre en place certaines expériences sur la mitochondrie.

Un merci spécial également à ceux avec qui j'ai passé plus d'un an et demi, un dimanche sur deux assis autour d'une table à lancer des dés, à boire des litres de thé, et à manger des madeleines : Mégane, Martin, Julie, Ariane, et à nouveau Juliette et Mathieu.

Enfin, merci à ma famille, de m'avoir soutenue, et de m'avoir aidée. Quelle que soit la nouvelle ville dans laquelle j'ai souhaité établir ma ville, vous avez toujours été présents, même à 1000 km de distance.

# Table des matières


Affidavit 2

Liste de publications et participation aux conférences 4

Résumé 5

Abstract 6

Table des matières 7

Abréviations 11

Table des figures et tables 13

Préambule 16

Introduction 19

Chapitre 1. Les systèmes cardiaques 20

Système cardiaque humain 20

Morphologie et fonction cardiaque 20

Le cardiomyocyte, unité contractile cardiaque 24

Maladies cardiovasculaires et facteurs de risques 28

Modèles d'étude de la fonction cardiaque 30

Le tube cardiaque de la drosophile 34

Morphologie du tube cardiaque 34

Développement du tube cardiaque 40

Métamorphose du tube cardiaque 44

Contraction et fonction du tube cardiaque 46

Méthodes d'étude de la fonction cardiaque 48

Chapitre 2. Le vieillissement cardiaque 54

Effets physiologiques 54

Théories du vieillissement 58

Processus cellulaires du vieillissement cardiaque 60

Effet des ROS 60

Effet de la mitochondrie 66

Liens entre métabolisme et vieillissement 74

Interaction entre le rythme circadien et le vieillissement cardiaque 76

Vrille, régulateur de l'horloge circadienne, du développement et du vieillissement cardiaque 80

Pdp1, gène du rythme circadien avec des fonctions pléiotropiques 82

Chapitre 3. Etude des variations naturelles 88
Variations génétiques 88
Méthode GWAS 90
Drosophila Genetic Reference Panel (DGRP) 94
Etude des variations naturelles de la fonction cardiaque 98
Hypothèses et résumé des résultats 102
Résultats 104
Semi-intact preparations and SOHA analysis of DGRP strains 123
Heritability 123
GWAS analyses 124
Annotation of variants according to dm6 125
Statistical analysis of DGRP cardiac traits: 125
Human orthologs 125
Effet de Pdp1 sur la quantité d'ATP 146
Matériel et Méthodes 146
Lignées de drosophiles et croisements 146
Détermination d'ATP et de protéines 148
Rôle de Ubx sur le vieillissement cardiaque 150
Matériel et Méthodes 154
Lignées et Croisements 154
Détection de la fonction cardiaque (TDTK) 156
Discussion 162
Bibliographie 171

# Abréviations

Abd-A : Abdominal-A

Abd-B : Abdominal-B

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

AI : Index d'Arythmie

ALF : Ad-Libitum Feeding

AMP : Acide Mono Phosphate

AMPK : AMP-activated protein kinase

Antp : Antennapedia

APF : Après formation de la pupe

ARN : Acide ribonucléique

Atg5 : Autophagy-related gene 5

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BMAL1 : Brain and muscle ARNT-like protein 1

Bpm : Battements par minute

bZIP : basic leucine zipper

Clk : Clock

CncC : Cap-n-collar C

CO : *Cardiac Output* : Débit cardiaque

Cry : Cryptochrome

CVD : Maladies cardiovasculaires

Cyc : Cycle

DBP : D site of albumin promoter binding protein

DGRP : Drosophila Genetic Reference Panel

DI : Interval diastolique

DNM1L : Dynamin 1 like

Doc : Dorsocross

Dpp : Decapentaplegic

Drp1 : Dynamin-related protein 1

ECG : Electrocardiogramme

ECM : Matrice extracellulaire

EDD : *End Diastolic Diameter* : Diamètre diastolique maximal

ESD : *End Systolic Diameter* : Diamètre systolique maximal

ETC : Chaîne de transport d'électron

FS : *Fractional Shortening* : Fraction d'éjection

GWAS : Genome Wide Association Studies : Étude d'association pan-génomique

HDL : Lipoprotéine de haute densité

HLF : Hepatic Leukemia Factor

HP : Période cardiaque / Cycle cardiaque

MAO : Monoamine oxydase

MFN : Mitofusin

MHC : Chaîne lourde de la myosine

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphatase

Nox : NADPH oxydase

NRF : Nuclear Respiratory Factor

OCT : Optical coherence tomography

Opa1 : Optic atrophy 1

PAR : prolin and acidic amino acid rich

Pdp1 : PAR domain protein 1

Per : Period

PGC-1a : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha

PINK1 : PTEN-induced putative kinase 1

Pnr : Pannier

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

RNAi : ARN interférant

ROS : Espèce oxygénée réactive

RyR : Récepteur à la Ryanodine

SERCA : Sarco-endoplasmic reticulum calcium-ATPase

SI : Interval systolique

SNP : Polymorphisme d'un seul nucléotide

SOD1 : Superoxyde dismutase 1

SOHA : Semi-automated optical heartbeat analysis

SV : *Stroke Volume* : Volume d'éjection

Svp : Seven-up

TEF : Thyrotroph Embryonic Factor

TFAM : Mitochondrial transcription factor A

Tim : Timeless

Tin : Tinman

TOR : Target-of-Rapamycin

TORC1 : Complexe TOR 1

TRF : Time Restricted Feeding

Ubx : Ultrabithorax

UTR : Untranslated regions

Vri : Vrille

Wg : Wingless

# Table des figures et tables

Figure 1 - Schéma d'une coupe longitudinale du cœur humain. 19
Figure 2 - Schéma de l'organisation du système circulatoire humain. 19
Figure 3 - Schéma de coupe présentant les trois couches du cœur humain. 21
Figure 4 - Relation entre le cycle cardiaque et la détection par ECG. 21
Figure 5 – Diagramme de l'organisation interne des cardiomyocytes. 23
Figure 6 - Sarcomère. 23
Figure 7 - Schéma du mécanisme de contraction. 25
Figure 8 - Potentiel d'action du cardiomyocyte. 25
Figure 9 - Carte du taux de mortalité dû aux maladies cardiovasculaires en 2022. 27
Figure 10 - Estimations pour 100 000 habitants de la prévalence des maladies cardiovasculaires en fonction de l'âge. 27
Figure 11 - Evolution du cœur et représentation schématique du cœur de trois modèles de laboratoire. 29
Figure 12 - Cycle de vie de Drosophila melanogaster à 25°C. 33
Figure 13 - Le système circulatoire de la drosophile adulte. 33
Figure 14 - Composition cellulaire du cœur de la drosophile adulte. 35
Figure 15 - Structure musculaire du cœur de la drosophile adulte. 35
Figure 16 - Représentation schématique d'un cardiomyocyte contractile de la drosophile adulte. 37
Figure 17 - Coupe orthogonale par microscopie électronique de la valve du segment A3 d'un tube cardiaque adulte. 37
Figure 18 - Voies de signalisations impliquées dans la détermination du mésoderme cardiaque chez l'embryon. 39
Figure 19 - Représentation schématique illustrant la séquence d'événements de la formation de la lumière du tube cardiaque. 39
Figure 20 - Réseau de régulation contrôlant la spécification des cardioblastes au cours du développement cardiaque embryonnaire. 41
Figure 21 - Schéma de la localisation des profils d'expression des gènes homéotiques du complexe Bithorax dans le cœur embryonnaire et larvaire. 41
Figure 22 - Modèle des modifications morphologiques du tube cardiaque lors de la métamorphose. 43
Figure 23 - Schéma résumant la circulation antérograde et rétrograde du cœur adulte. 45
Figure 24 - Protocole de la méthode SOHA. 49
Figure 25 - Détection des battements cardiaques grâce au transgène tdtk. 51
Figure 26 - Détection automatique des paramètres cardiaques. 51
Figure 27 - Modifications de la structure du cœur humain au cours du vieillissement. 53
Figure 28 - Diminution de la réserve cardiaque avec l'âge en condition de stress. 53
Figure 29 - Schéma des gènes et mécanismes contribuant au vieillissement cardiaque chez la drosophile. 59
Figure 30 - Schéma de la production et dégradation des espèces oxygénées réactives. 59
Figure 31 - Modèle de l'effet des ROS dans les cellules péricardiaques et leur impact sur les cardiomyocytes. 63
Figure 32 - Modèle de communication entre les cardiomyocytes, les cellules péricardiaques et le corps gras. 63
Figure 33 - Modèle de la réponse hormétique. 65
Figure 34 - Schéma de la structure de la mitochondrie. 65
Figure 35 - Complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. 67
Figure 36 - PGC-1a régule transcriptionnellement les gènes de l'homéostasie mitochondriale. 67

Figure 37 - Voies de contrôle de la qualité des mitochondries. 69
Figure 38 - Les protéines de la boucle du rythme circadien dans les neurones. 75
Figure 39 - Vrille code pour plusieurs isoformes protéiques impliquées dans le développement et le rythme circadien. 79
Figure 40 - Structure de Pdp1. Le gène Pdp1 code pour 13 transcrits dont les principales formes décrites sont représentées ici. 81
Figure 41 - Vri et Pdp1 régulent Clk dans une deuxième boucle de régulation. 83
Figure 42 - Différents types de variants dans le génome. 87
Figure 43 - Impact sur le transcrit et la fonction du gène des variants en fonction de leur localisation. 89
Figure 44 - Relation entre la fréquence d'un allèle et son effet. 89
Figure 45 - Un tag-SNP séquencé dans un bloc de déséquilibre de liaison n'est pas nécessairement le variant causal du phénotype observé. 91
Figure 46 - Données générales sur la base de données DGRPool. 95
Figure 47 - Corrélation des phénotypes associés à la longévité. 99
Figure 48 - L'invalidation de Pdp1 dans les IFM semble diminuer la production d'ATP. 145
Figure 49 - Réseau d'interaction directe de la protéine Ubx avec des facteurs de transcription identifiés dans les GWAS sur le vieillissement cardiaque. 149
Figure 50 - L'inhibition de Ubx spécifiquement dans le cœur atténue le vieillissement cardiaque. 151
Figure 51 - L'inhibition de Ubx spécifiquement dans le cœur adulte aggrave le vieillissement cardiaque. 153
Figure 52 - L'inhibition de Ubx spécifiquement dans le cœur atténue le vieillissement cardiaque. 157
Figure 53 - L'inhibition de Ubx spécifiquement dans le cœur atténue le vieillissement cardiaque. 158
Figure 54 - L'inhibition de Ubx spécifiquement dans le cœur adulte aggrave le vieillissement cardiaque. 159
Figure 55 - L'inhibition de Ubx spécifiquement dans le cœur adulte aggrave le vieillissement cardiaque. 160
Tableau 1 - Tableau comparatif de la fonction cardiaque de trois modèles animaux utilisés en laboratoire. 28
Tableau 2 - Protéines impliquées dans la contraction cardiaque chez la souris et la drosophile. 43
Tableau 3 - Avantages et inconvénients de 3 méthodes d'imagerie cardiaque chez la drosophile. 44
Tableau 4 - Liste des gènes ayant au moins un variant associé à un phénotype de vieillissement. 92
Tableau 5 – Liste des variants associés à la variation naturelle du vieillissement cardiaque localisés dans le gène Ubx. 144

# Préambule

Le système cardiaque chez les mammifères est une machinerie complexe et régulée finement. La contraction du cardiomyocyte, unité contractile du cœur, est déclenchée par des influx électriques induits par les cellules pacemaker cardiaques. Ce mécanisme de contraction, à la base de la fonction du cardiomyocyte, nécessite une grande quantité d'énergie, produite en majorité par la mitochondrie, mais également le bon fonctionnement des protéines du sarcomère et des canaux ioniques, afin de réguler les flux ioniques. Cependant, cette machinerie est faillible et les maladies cardiovasculaires sont la cause majeure de décès dans le monde avec 17,9 millions de décès en 2019 (World Health Organization, 2021). De nombreux facteurs de risques de maladies cardiovasculaires existent, qu'ils soient génétiques ou environnementaux. L'identification des facteurs génétiques impliqués dans la fonction cardiaque chez l'humain est cependant complexe et longue, et plusieurs modèles d'études ont donc été utilisés afin de plus facilement et rapidement comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de la fonction cardiaque.

Parmi ces modèles, Drosophila melanogaster, ou drosophile, est l'organisme modèle le plus simple possédant un cœur. Il est composé de 84 cardiomyocytes organisés en monocouche afin de former un tube cardiaque. L'étude de son développement a notamment permis d'identifier de nombreux acteurs et voies de signalisation conservées entre le cardiomyocyte humain et le cardiomyocyte drosophile. De plus, l'avènement de nouvelles techniques de mesure de la fonction cardiaque in vivo permet de réaliser des études plus larges pour cribler les gènes impliqués dans la fonction cardiaque en utilisant les avantages de la drosophile, en particulier son cycle de vie court et le nombre important d'outils de manipulation génétique disponibles. Ces avantages sont particulièrement intéressants pour étudier des traits complexes influencés par de nombreux facteurs, comme le vieillissement cardiaque.

Avec l'âge, le rythme cardiaque et la force de contraction diminuent et les arythmies augmentent chez les mammifères et la drosophile. Deux groupes de théories sur le fonctionnement du vieillissement ont été établies, la première suggère que le vieillissement cellulaire serait programmé, alors que la deuxième suggère que le vieillissement cellulaire serait dû à une accumulation de dommages. En effet, au niveau cellulaire, plusieurs processus sont affectés qui provoquent des dommages, en particulier, l'accumulation de stress oxydatif et les dysfonctions mitochondriales sont largement étudiées et caractérisées dans les cardiomyocytes. De plus, le mode de vie, classiquement l'alimentation et l'activité physique, ont un effet bénéfique sur le vieillissement, et notamment sur la fonction des cardiomyocytes avec l'âge. Enfin, depuis quelques décennies, plusieurs études pointent l'importance du rythme

circadien sur le vieillissement cardiaque, et suggèrent que sa régulation, au niveau central mais également organe spécifique, permet de réguler le vieillissement cardiaque.

L'étude de traits complexes comme le vieillissement, dépendant de facteurs génétiques et environnementaux, peut être réalisée par des études d'association pan-génomique (Genome-Wide Association Studies - GWAS). Ces études permettent de détecter des variations génétiques communes dans une population, mais ayant un effet faible. Cependant, ces techniques nécessitent une population importante afin d'être suffisamment sensibles, et donc sa réalisation chez l'humain est coûteuse, difficile, et longue. Chez la drosophile, la collection de lignées Drosophila genetic Reference Panel (DGRP) permet la réalisation de GWAS. Cette collection regroupe 205 lignées issues d'une population naturelle croisée de façon consanguine pendant 20 générations afin de fixer les variations naturelles de façon homozygote dans chacune des lignées. Le séquençage de ces 205 lignées a permis de mettre en évidence près de 6 millions de variants naturels.

Afin de déterminer les bases génétiques de la fonction cardiaque, l'équipe du Dr. Laurent Perrin a utilisé la collection DGRP pour analyser l'architecture génétique de la variation naturelle de 7 paramètres de la fonction cardiaque chez des mouches jeunes. Elle a mis en évidence la conservation de l'architecture génétique de la fonction cardiaque entre humain et drosophile, mais également l'existence d'un large réseau de régulation de la fonction cardiaque, dont deux facteurs de transcription, jusqu'alors sans fonction connue dans les cardiomyocytes, qui régulent la fonction cardiaque chez la drosophile mais également chez l'humain. Ceci suggère donc l'importance de la régulation fine, notamment transcriptionnelle, de la fonction cardiaque.

En utilisant l'approche établie par l'équipe, mon projet a visé à déchiffrer les bases génétiques des variations naturelles du vieillissement cardiaque. Dans ce but, j'ai analysé plusieurs GWAS de la modification de la fonction cardiaque avec l'âge. La fonction cardiaque chez des mouches jeunes et âgées a été analysée sur 193 lignées consanguines du DGRP. Des GWAS sur 8 paramètres de la fonction cardiaque ont révélé l'association de 350 variants ($p \leq 3e\text{-}8$) à une variabilité du vieillissement cardiaque. L'annotation fonctionnelle de ces variants et de leurs gènes associés a révélé un nouveau réseau régulateur de gènes, que nous prédisons pour cibler l'expression de gènes impliqués dans la physiologie mitochondriale. Les régulateurs clés de ce réseau, Vri et Pdp1, sont deux facteurs de transcription antagonistes. Si Vri est un régulateur caractérisé du vieillissement cardiaque, l'implication de Pdp1 dans ces mécanismes était encore inconnue. Au cours de ma thèse j'ai analysé la fonction de Pdp1 dans le vieillissement cardiaque et son impact sur la physiologie mitochondriale.

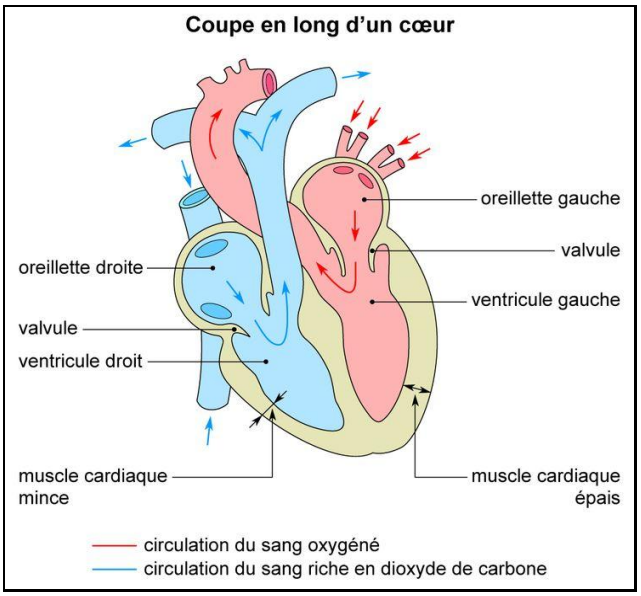



**Figure 1 - Schéma d'une coupe longitudinale du cœur humain.** Le cœur est composé de 4 chambres : oreillette droite, oreillette gauche, ventricule droit, ventricule gauche. Le sang désoxygéné circule de l'oreillette droite vers le ventricule droit en passant par une valve avant d'être envoyé dans les poumons. Le sang oxygéné circule de l'oreillette gauche vers le ventricule gauche par une valve avant d'être envoyé dans la circulation sanguine. Il existe une asymétrie de l'épaisseur du muscle cardiaque, le muscle du ventricule gauche est plus épais que celui du ventricule droit. *Source https://www.assistancescolaire.com, consulté le 14/10/2024.*

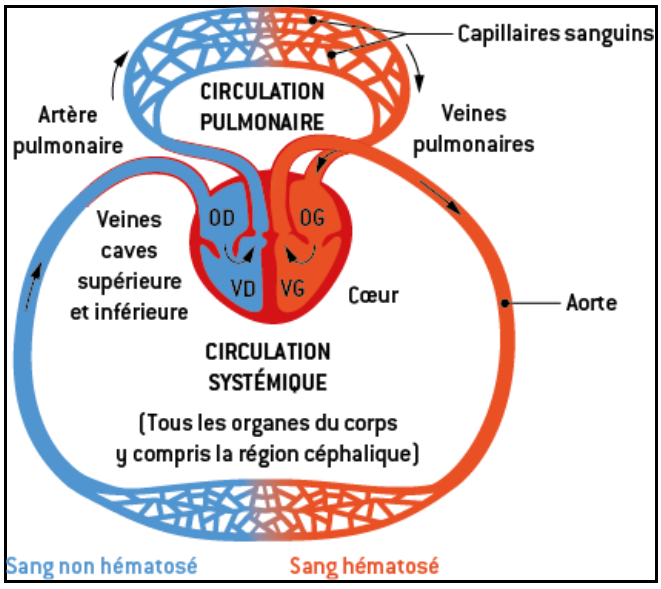



**Figure 2 - Schéma de l'organisation du système circulatoire humain.** Le sang désoxygéné (en bleu) part du cœur vers la circulation pulmonaire par les artères pulmonaires pour s'oxygéner dans les capillaires sanguins dans les poumons avant de revenir dans le cœur par les veines pulmonaires. Ce sang oxygéné (en rouge) partira ensuite du cœur par l'aorte vers la circulaire systémique vers tous les organes pour revenir désoxygéné dans le cœur par les veines caves. Abréviations : OD = Oreillette Droite, OG = Oreillette Gauche, VD = Ventricule Droit, VG = Ventricule Gauche. *Source https://www.annabac.com, consulté le 14/10/2024.*

# Chapitre 1. Les systèmes cardiaques

## Système cardiaque humain

### *Morphologie et fonction cardiaque*

Le cœur est un muscle dont la contraction augmente la pression dans ses cavités afin d'éjecter le sang dans le réseau vasculaire à travers le corps. Il est constitué de 4 chambres : les oreillettes droite et gauche et les ventricules droit et gauche (**Figure 1**). Les oreillettes, ou atrium, sont les réservoirs d'entrée du sang depuis le système veineux. Elles se contractent pour envoyer le sang dans les ventricules au travers des valves. Ces valves permettent également d'empêcher le reflux de sang des ventricules vers les oreillettes. Ce sont les ventricules, force contractile majeure du cœur, qui éjectent le sang dans le reste du corps par les artères, cependant l'épaisseur du muscle est asymétrique avec le muscle du ventricule gauche plus épais que celui du ventricule droit.

Le cœur droit (composé de l'oreillette droite et du ventricule droit) et le cœur gauche (composé de l'oreillette gauche et du ventricule gauche) communiquent uniquement par le système vasculaire. Le cœur droit reçoit le sang désoxygéné du corps pour l'envoyer dans les poumons par les artères pulmonaires. Là, le sang sera oxygéné et reviendra dans le cœur gauche. La contraction du cœur gauche envoie alors ce sang oxygéné par l'aorte dans le reste du corps vers tous les organes, puis ce sang désoxygéné passe par le cœur droit pour recommencer le circuit (**Figure 2**). En plus de sa fonction primaire de transport de l'oxygène vers les organes qui est décrite ici, le cœur permet également la circulation sanguine de nutriments, hormones et cellules immunitaires.

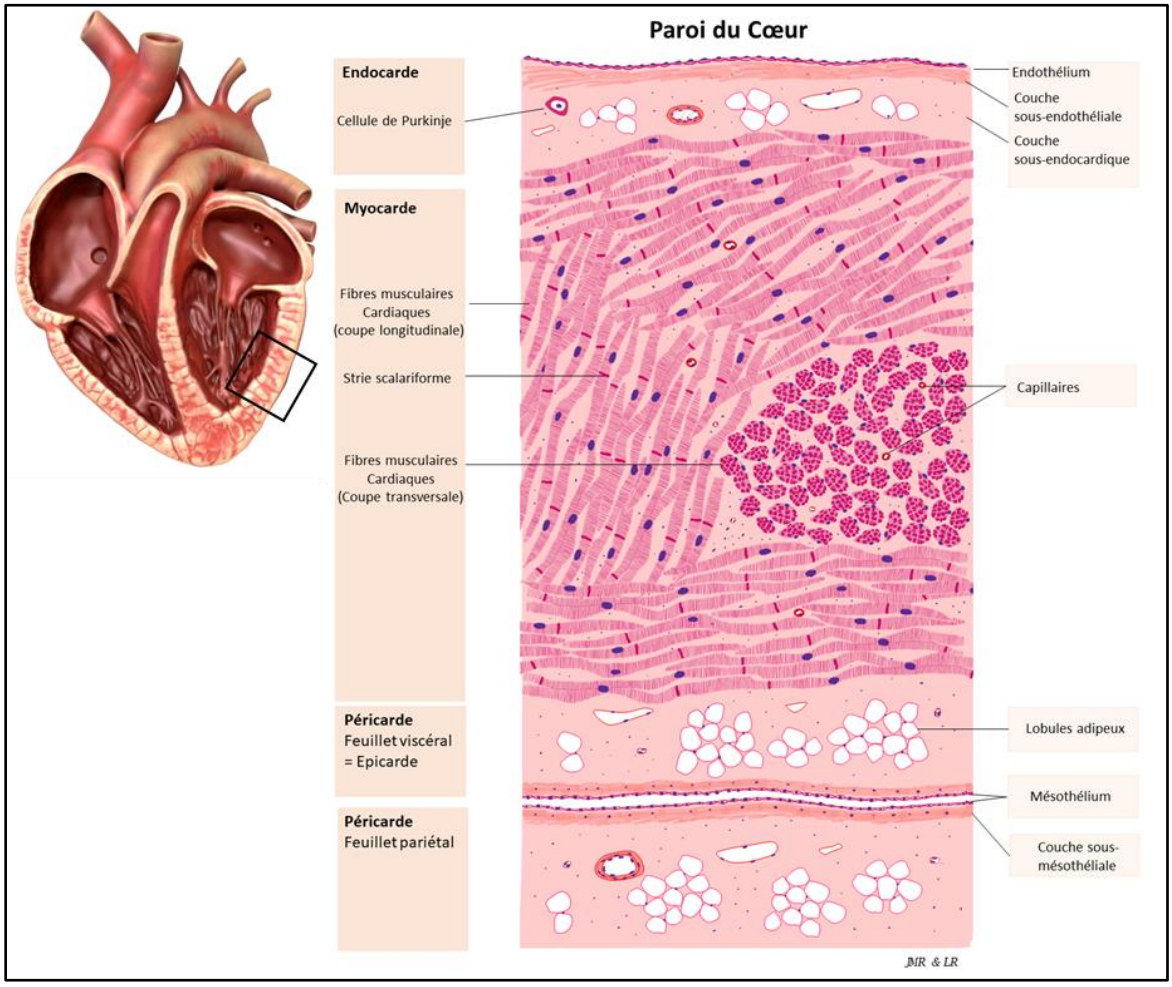



**Figure 3 - Schéma de coupe présentant les trois couches du cœur humain.** La paroi cardiaque est constituée de trois couches. L'endocarde est la couche la plus interne. Le myocarde est la couche de cellules la plus épaisse contenant les cardiomyocytes organisés en réseau connecté constituant les fibres musculaires. Enfin le péricarde est la couche la plus externe du cœur. *Source Université de Montpellier, https://histologielv.umontpellier.fr, consulté le 14/10/2024*.

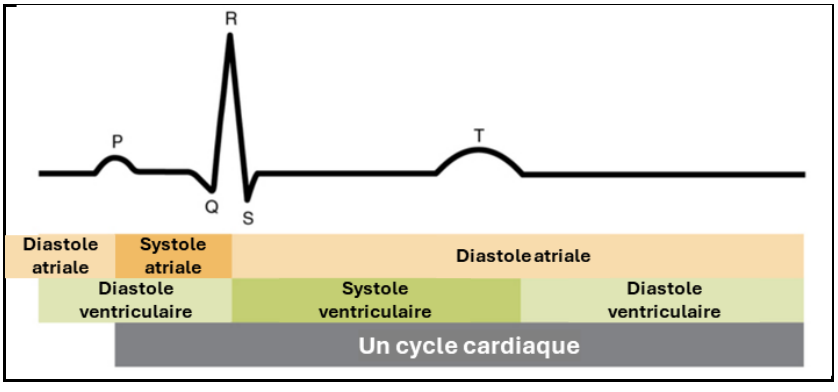



**Figure 4 - Relation entre le cycle cardiaque et la détection par ECG.** Les différentes phases de la contraction cardiaque peuvent être suivies avec un électrocardiogramme (ECG). L'onde P correspond au début de la contraction des oreillettes (systole atriale), le complexe QRS à la contraction des ventricules (systole ventriculaire) et relaxation des oreillettes (diastole atriale), et l'onde T à la relaxation des ventricules (diastole ventriculaire). *Modifié de Anatomy and Physiology 2e (OpenStax), Chapitre 19*

La paroi cardiaque est composée de 3 couches, de l'intérieur vers l'extérieur : endocarde, myocarde et épicarde (aussi appelé péricarde) (**Figure 3**). Le myocarde est la partie composée de cardiomyocytes contractiles constituant les fibres musculaires. La contraction cardiaque est d'origine myogénique, induite par les cellules pacemaker localisées au niveau de l'oreillette droite, mais elle est également régulée par les systèmes nerveux et endocrine.

Le cœur se contracte selon un cycle précis, aussi appelé cycle cardiaque ou période cardiaque (**Figure 4**). Le cycle cardiaque débute par la contraction, ou systole, des oreillettes qui envoie le sang dans les ventricules alors en relaxation, ou diastole. Ensuite, les ventricules se contractent pour envoyer le sang dans le système circulatoire tandis que les oreillettes en diastole se remplissent. Le déclenchement d'une nouvelle contraction des oreillettes marque le début d'un nouveau cycle. Le cycle cardiaque peut être suivi par deux techniques : l'électrocardiogramme et l'échographie cardiaque. L'électrocardiogramme (ECG) observe la conduction du signal électrique cardiaque émis par les cellules pacemaker pour calculer la fréquence cardiaque mais également les différentes phases de contraction (**Figure 4**). L'échographie utilise les ultrasons pour observer les mouvements cardiaques au travers du thorax.

La physiologie cardiaque est évaluée par plusieurs mesures :

- Le rythme cardiaque, aussi appelé fréquence cardiaque, est le nombre de cycles cardiaques par minute.
- La débit cardiaque (*cardiac output*), calculée à partir du volume d'éjection et du rythme cardiaque et correspond au volume de sang éjecté par chaque ventricule par minute.
- La fraction d'éjection, calculée à partir du volume d'éjection et évalue le pourcentage de sang éjecté par les ventricules à chaque contraction, comparé au sang total contenu dans le ventricule.
- Le volume d'éjection (*stroke volume*) correspond à la quantité de sang éjecté par chaque ventricule.

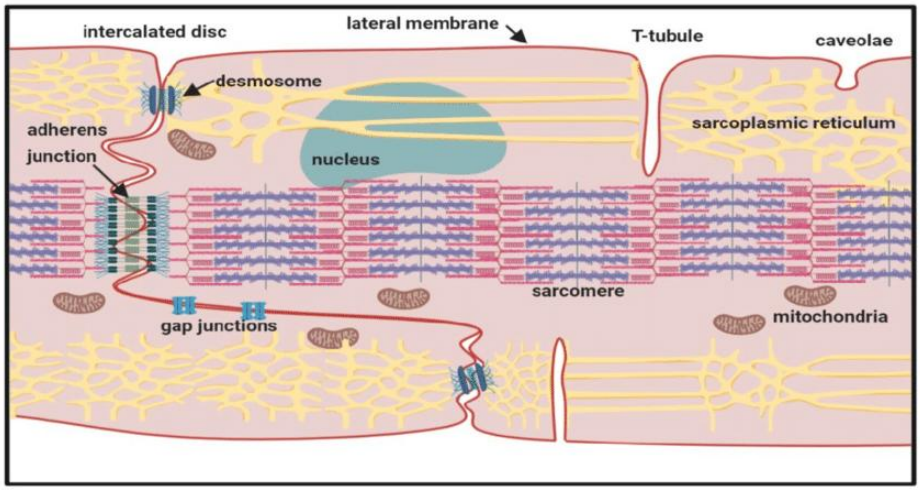



**Figure 5 – Diagramme de l'organisation interne des cardiomyocytes.** Chaque cardiomyocyte est constitué d'un alignement de sarcomères formant des fibres contractiles. Deux cardiomyocytes voisins sont reliés au niveau des disques intercalaires par des desmosomes et jonctions gap, et au niveau de ces disques, la continuité des fibres contractiles est assurée par des jonction adhérentes. Le cardiomyocyte est également constitué de nombreuses mitochondries, et d'un réseau de réticulum sarcoplasmique. La membrane plasmique s'invagine pour former des tubules T faisant ainsi le lien entre le milieu extra-cellulaire, le réticulum sarcoplasmique et les sarcomères. *Source (Salvage et al., 2020)*.

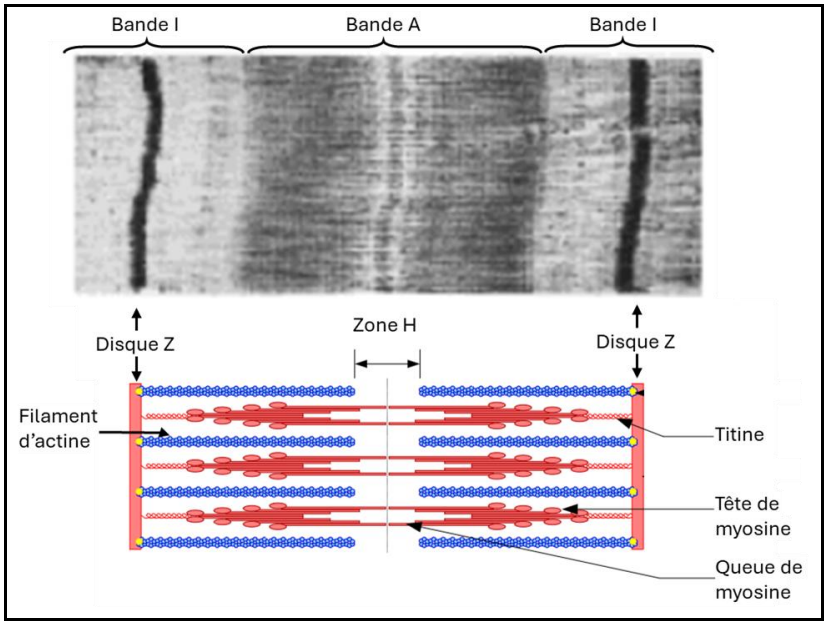



**Figure 6 - Sarcomère.** (haut) Coupe histologique d'un sarcomère du muscle squelettique humain vu au microscope électronique à transmission. La bande I, zone claire, est coupée par une bande très sombre correspondant au disque Z qui marque la limite d'un sarcomère. La bande A plus foncée présente une zone plus claire en son centre correspondant à la zone H. (bas) Schéma des composants majeurs du sarcomère. Les filaments d'actine sont reliés directement au disque Z et s'arrêtent au niveau de la zone H. Les filaments de myosines sont constitués de molécules avec une structure composée d'une tête et d'une queue qui sont localisés sur toute la bande A et sont reliés au disque Z par des molécules de titine. *Adapté de (Anatomy and Physiology (Boundless), Chapitre 17 ; Thèse de Laforêt, 2009)*.

### *Le cardiomyocyte, unité contractile cardiaque*

L'unité fonctionnelle contractile du cœur, constituant les fibres musculaires capables de se contracter, est le cardiomyocyte. Comme toute cellule musculaire, le cardiomyocyte est constitué, notamment, de fibres contractiles, d'un réseau de réticulum sarcoplasmique et de nombreuses mitochondries entre les fibres contractiles (**Figure 5**). Cependant, contrairement aux cellules musculaires squelettiques, les cardiomyocytes ne sont pas des cellules syncytiales, mais sont interconnectées au niveau des disques intercalaires. Ces disques permettent de maintenir la continuité des sarcomères, les fibres contractiles du cardiomyocyte, et d'assurer la contraction synchronisée des fibres musculaires (Salvage et al., 2020). Deux cardiomyocytes sont reliés par les desmosomes et jonctions gap au niveau des disques intercalaires.

Chaque fibre contractile est constituée d'un alignement de multiples sarcomères, unité fonctionnelle apparaissant sur les coupes histologiques comme une alternance de bandes sombres et claires (**Figure 6 haut**). Un sarcomère s'étend d'un disque Z au suivant et est constitué de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine. Plusieurs zones de coloration différentes sont observées sur les coupes histologiques et correspondent au chevauchement des filaments d'actine et de myosine. La bande I ne comprend que les filaments d'actine, la bande A correspond à un chevauchement d'actine et de myosine et enfin la zone H ne comprend que des filaments de myosine (**Figure 6 bas**). Le filament d'actine est couplé à deux autres protéines, la troponine et tropomyosine qui, de manière régulée par le calcium, empêche les têtes des filaments de myosine de se fixer au filament d'actine. C'est la fixation de ces têtes de myosine et leur changement de conformation dépendant de l'ATP, qui est à la base de la contraction du sarcomère.

Les tubules transverses, ou tubules T, sont des invaginations de la membrane plasmique positionnées de façon transverse à la myofibrille qui permettent de relier le réticulum sarcoplasmique et les myofibrilles au niveau du disque Z (**Figure 5**). Lors de la contraction, la propagation du potentiel d'action au niveau des tubules T entraîne la libération du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique et indispensable à la contraction des sarcomères.

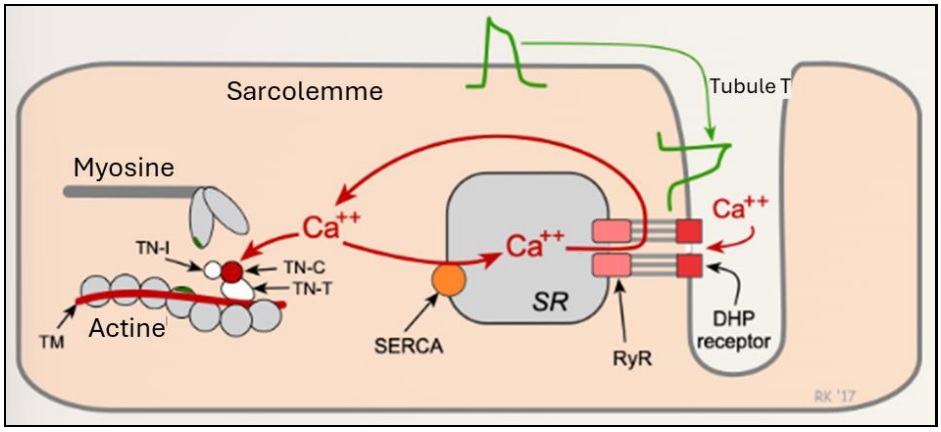



**Figure 7 - Schéma du mécanisme de contraction.** Le potentiel d'action (en vert) parcourt le sarcolemme du cardiomyocyte ce qui active l'entrée le calcium par le récepteur DHP (Dihydropyridine) dans les tubules T, et la sortie du calcium du réticulum sarcoplasmique par les canaux RyR (Récepteur à la Ryanodine). Le calcium se fixe à la troponine-C (Tn-C) qui change alors de conformation et permet à la tête de myosine de se fixer sur l'actine. Le calcium intracellulaire est à nouveau séquestré dans le réticulum sarcoplasmique (SR) grâce à la pompe SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase). Abréviations : TM =Tropomyosine. *Modifié de https://www.cvphysiology.com, consulté le 14/10/2024*.

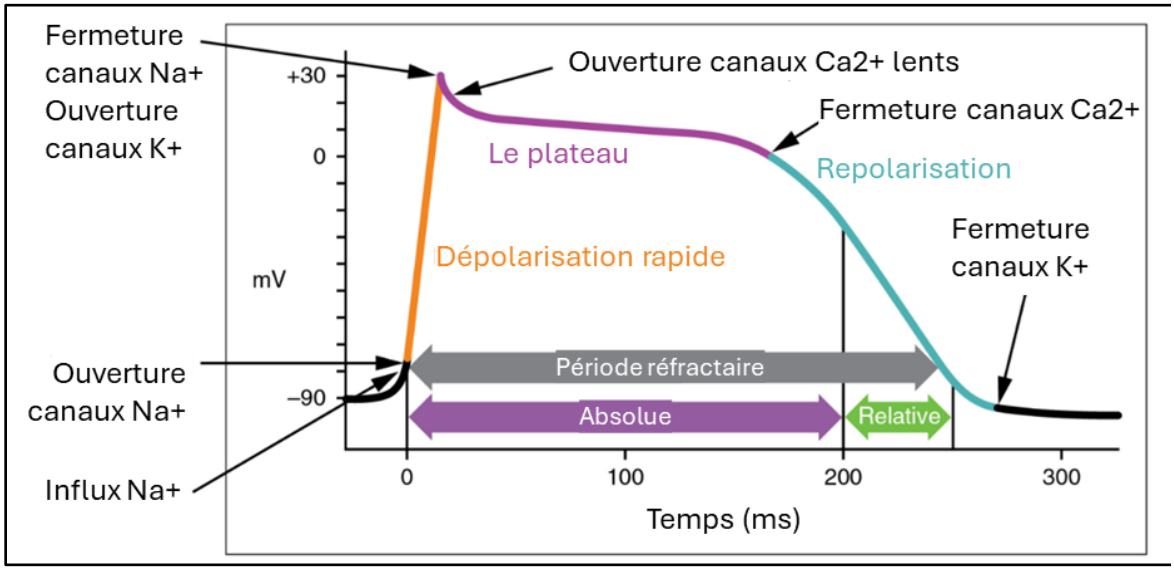



**Figure 8 - Potentiel d'action du cardiomyocyte.** La dépolarisation rapide (en orange) déclenchée par ouverture des canaux $Na^+$ permet un influx d'ions $Na^+$. A la fin de cette dépolarisation, les canaux $Na^+$ se ferment et les canaux $K^+$ et $Ca^{2+}$ lents s'ouvrent, pendant cette phase nommée plateau (en violet) les sarcomères se contractent. La phase de repolarisation (en bleu) est déclenchée au moment de la fermeture des canaux $Ca^{2+}$, et se termine par la fermeture des canaux $K^+$. Pendant ces trois phases, appelée période réfractaire, aucun nouveau potentiel d'action ne peut être déclenché. *Modifié de (Anatomy and Physiology 2e (OpenStax), Chapitre 19)*.

Le mécanisme de contraction se décompose en 4 étapes (**Figure 7**) :

- Le potentiel d'action induit par les cellules pacemaker atteint le cardiomyocyte, ce qui active les canaux calciques voltage-dépendant des tubules T. Un influx de calcium entre alors dans le cytosol depuis le réticulum sarcoplasmique par les canaux RyR (Récepteur à la ryanodine)
- Le calcium libre se fixe sur la troponine C, attachée aux filaments fins d'actine, ce qui change la conformation du complexe de troponine et libère les filaments d'actine.
- Les têtes de myosines se lient aux filaments d'actine et l'hydrolyse d'ATP modifie la conformation de la tête de myosine, ce qui tire les filaments d'actine vers le centre du sarcomère. L'ajout d'ATP à la tête de myosine va faire revenir à sa conformation initiale où l'ATP peut à nouveau être hydrolysé et raccourcir à nouveau le sarcomère.
- Ce cycle de contraction est arrêté par la séquestration du calcium intracellulaire dans le réticulum sarcoplasmique par la pompe ATP-dépendante SERCA (sarco-endoplasmic reticulum calcium-ATPase), diminuant ainsi la concentration en calcium de la cellule jusqu'au niveau initial. Ceci permet à la Troponine-C d'à nouveau se fixer aux filaments d'actine et donc de les faire revenir à leur position initiale relâchée.

La mesure du potentiel d'action permet d'observer plusieurs phases d'entrée et sortie d'ions $Ca^{2+}$, $Na^{+}$ et $K^{+}$, à l'origine de la contraction musculaire (**Figure 8**), et en particulier, dans les cardiomyocytes, le plateau, qui est la phase d'ouverture des ions $Ca^{2+}$, est plus longue dans les cardiomyocytes que dans les cellules des autres muscles squelettiques (Wei et al., 2023). La durée du plateau est liée à un type de canaux calciques voltage-dépendant, dits "lents", qui nécessitent un voltage plus faible pour se refermer. Cela permet une entrée plus longue de $Ca^{2+}$ dans la cellule. Cette propriété prolonge la période réfractaire des cardiomyocytes, pendant laquelle les sarcomères se contractent, et empêche un nouveau potentiel d'action de dépolariser à nouveau la cellule (Wei et al., 2023).

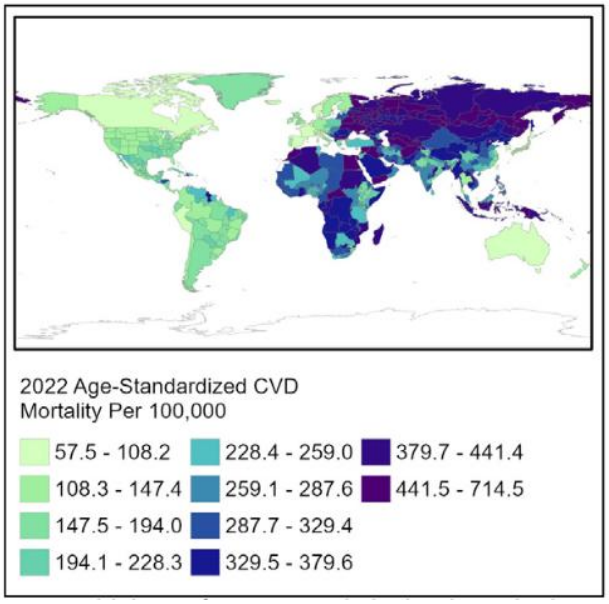



**Figure 9 - Carte du taux de mortalité dû aux maladies cardiovasculaires en 2022.** Le taux de mortalité a été calculé pour 100 000 habitants et ajusté pour l'âge. *Source (Mensah et al., 2023)*.

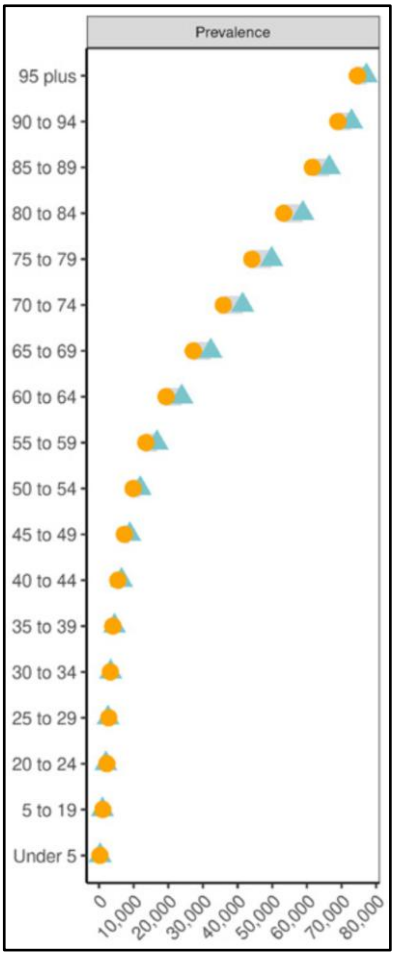



**Figure 10 - Estimations pour 100 000 habitants de la prévalence des maladies cardiovasculaires en fonction de l'âge.** Rond jaune : femmes, triangle bleu : hommes. *Source (Mensah et al., 2023)*.

## *Maladies cardiovasculaires et facteurs de risques*

Les maladies cardiovasculaires (CVD) sont la principale cause de mortalité dans le monde, avec 19,8 millions de décès en 2022 (Mensah et al., 2023). De façon notable, les pays ayant le taux de mortalité le plus élevé sont sur le continent africain et asiatique (**Figure 9**). De plus, les CVD ont un coût très élevé pour nos sociétés. Dans un article de 2023 publié par Luengo-Fernandez et al., il est estimé que le coût des CVD dans les 27 pays de l'Union Européenne à 155 milliards d'euros pour l'année 2021 aux systèmes de santé et de sécurité sociale (Luengo-Fernandez et al., 2023).

Les principaux risques de CVD peuvent être divisés en 3 catégories : les risques environnementaux, souvent impossibles à modifier à l'échelle individuelle, les risques métaboliques, liés aux maladies et reflétant la santé de l'organisme, et les risques comportementaux, souvent modifiables à l'échelle individuelle. Lors de l'analyse des facteurs impliqués dans les CVD (Mensah et al., 2023), les auteurs ont estimé le poids total associé à chaque facteur de risque pour toutes les CVD, et observé que les facteurs principaux sont la pollution ambiante, une pression artérielle élevée, un fort taux de cholestérol HDL (lipoprotéine de haute densité) et l'alimentation.

Certains facteurs génétiques augmentent également les risques de CVD comme le sexe biologique et l'historique familial. Par exemple, trois mutations dans le gène *KCNQ1* ont été détectées et sont responsables de formes rares de fibrillation atriales (Mahida et al., 2011). Le gène *KCNQ1* code pour une sous-unité d'un canal responsable du contrôle des courants de potassium dans le cardiomyocyte, et ces trois mutations (S140G, V141M, S209P) modifient un seul acide aminé de la séquence protéique, mais cela résulte en un gain ou une perte de fonction du canal, déclenchant alors la fibrillation atriale. Cet exemple montre l'importance des facteurs génétiques sur la fonction cardiaque, et donc l'importance de l'étudier afin de décrypter les mécanismes responsables des CVD.

Enfin, l'âge est un facteur de risque de CVD et un enjeu majeur pour nos sociétés contemporaines. En effet, dans l'analyse réalisée par Mensah et ses collaborateurs (Mensah et al., 2023), il est observé que la prévalence des maladies cardiovasculaires augmente à partir de 55 ans, indépendamment du sexe biologique (**Figure 10**). Or, depuis 1950, l'effectif total la population âgée de plus de 65 ans n'a cessé d'augmenter pour atteindre 761 millions en 2021. Les projections des Nations Unies estiment que, d'ici la fin des années 2070, cette population aura atteint 2,2 milliards (DESA/Population Division, 2023; United Nations, 2024). Pourtant, la compréhension des mécanismes du vieillissement cardiaque est encore incomplète.

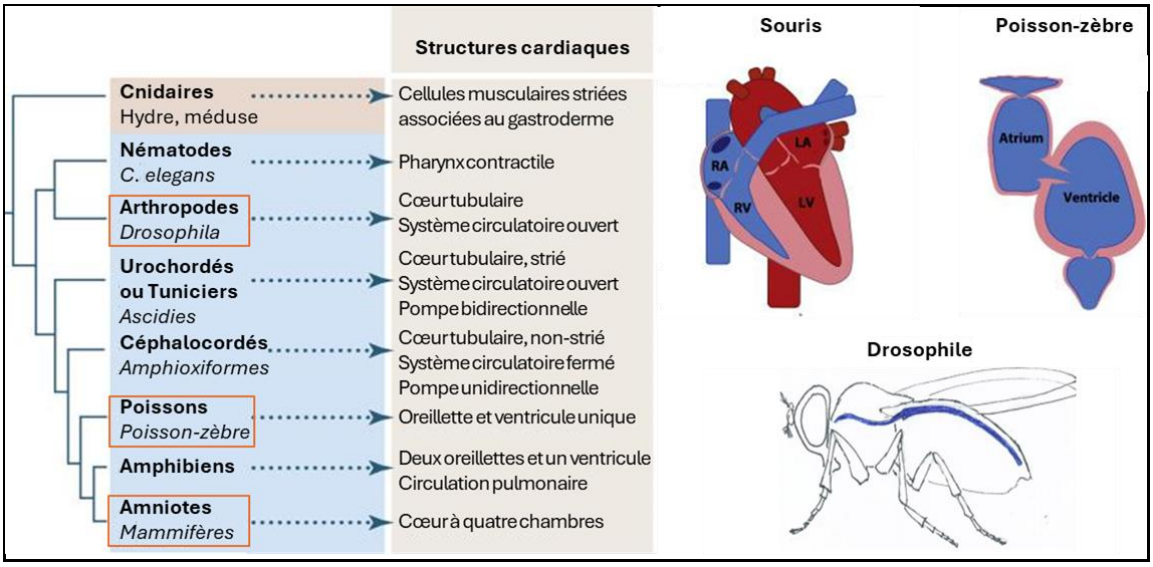



**Figure 11 - Evolution du cœur et représentation schématique du cœur de trois modèles de laboratoire.** (gauche) Évolution du cœur d'animaux représentatifs et leur relation évolutive. (droite) Représentations schématiques du cœur de trois modèles animaux : la souris, le poisson-zèbre et la drosophile. Abréviations : RA = Oreillette Droite, RV = Ventricule Droit, LA = Oreillette Gauche, LV = Ventricule Gauche. *Adapté de (Olson et al., 2006; van Opbergen et al., 2018 et un schéma créé dans le laboratoire)*.

## *Modèles d'étude de la fonction cardiaque*

L'enjeu de mon travail de thèse est d'approfondir la compréhension des mécanismes du vieillissement cardiaque. Cependant, les études humaines du vieillissement cardiaque sont très longues et difficiles à entreprendre. En effet, la fonction cardiaque est non seulement soumise à de nombreux facteurs environnementaux et comportementaux, mais la recherche se heurte également à la complexité des mécanismes moléculaires de la fonction cardiaque. En effet, les réseaux de régulations sont complexes, et de nombreux acteurs sont redondant, pouvant ainsi compenser les pertes de fonction. De plus, les outils génétiques disponibles sont limités aux études d'association pan-génomiques (GWAS, pour Genome Wide Association Studies) qui sont très coûteuses, autant économiquement que temporellement. L'utilisation de GWAS afin d'étudier des traits complexes, et notamment la fonction cardiaque et le vieillissement sera abordée dans le Chapitre 3 de cette introduction, mais il semble clair que l'utilisation de modèles *in vivo* animaux plus simples est nécessaire afin de décrypter les mécanismes de la fonction cardiaque.

Le premier organe ressemblant à un cœur serait apparu il y a plus de 500 millions d'années, et aurait ressemblé à un tube, sans définition de chambres ou de valves. Le cœur aurait ensuite évolué en une pompe avec deux chambres, une oreillette et un ventricule, puis il aurait été nécessaire de séparer le sang oxygéné et non oxygéné dans deux circuits distincts, faisant ainsi évoluer le cœur pour avoir 4 chambres (Olson, 2006). Ces trois types de cœur sont encore présents dans certaines espèces actuelles, dont les organismes modèles de laboratoire. Les rongeurs possèdent un cœur à quatre chambres, le poisson-zèbre possède un cœur avec deux chambres, et enfin la drosophile possède un cœur tubulaire (**Figure 11**) (Olson, 2006; van Opbergen et al., 2018). Le **Tableau 1** résume les 3 modèles animaux et leurs avantages pour l'étude de la fonction cardiaque.

**Tableau 1 - Tableau comparatif de la fonction cardiaque de trois modèles animaux utilisés en laboratoire.** Adapté de (González-Rosa, 2022; Huang, 2017; van Opbergen et al., 2018; Wolf and Rockman, 2008)

| | **Souris** | **Poisson-zèbre** | **Drosophile** |
|---|---|---|---|
| **Homologie avec l'humain** | 99% des gènes avec orthologue humain | 70% des gènes avec orthologue humain | 60% des gènes avec orthologue humain |
| **Redondance génétique** | Importante | Duplication du génome | Faible |
| **Pacemakers** | 1 pacemaker et un système de conduction (cellules de Purkinje) | 1 pacemaker et pas de système de conduction | 2 pacemakers et pas de système de conduction |
| **Conservation de l'électrophysiologie** | Similaire (mais différences existent) | Similaire (plus proche que souris) | |
| **Rythme cardiaque** | 600-1000 battements par minute | 60-100 battements par minute (proche de l'humain) | 280 battements par minute |
| **Oxygénation et Système circulatoire** | Système vasculaire avec système pulmonaire.<br>Système fermé (survie quelques heures au stade embryonnaire sans cœur) | Système vasculaire sans système pulmonaire.<br>Système fermé (survie quelques jours au stade embryonnaire sans cœur) | Indépendant.<br>Système ouvert (survie ne dépend pas directement de la fonction cardiaque) |
| **Outils génétiques disponibles** | Oui (screening difficiles) | Oui (cribles possibles)<br>Perte de fonction difficile, transgénèse possible mais aucune banque | Oui (cribles possibles)<br>Système UAS-GAL4 permet le contrôle d'expression temps et tissu spécifique par température, driver, de gain et perte de fonction (disponibles en banques) |
| **Durée de vie** | 2 ans | 3-4 ans | 9 semaines |
| **Outils observation fonction cardiaque** | IRM, Electrophysiologie | Complexe (configuration 3D) | Imagerie précise |
| **Coût maintenance** | Elevé | Faible | Faible (faible espace nécessaire pour stocker de nombreux individus) |

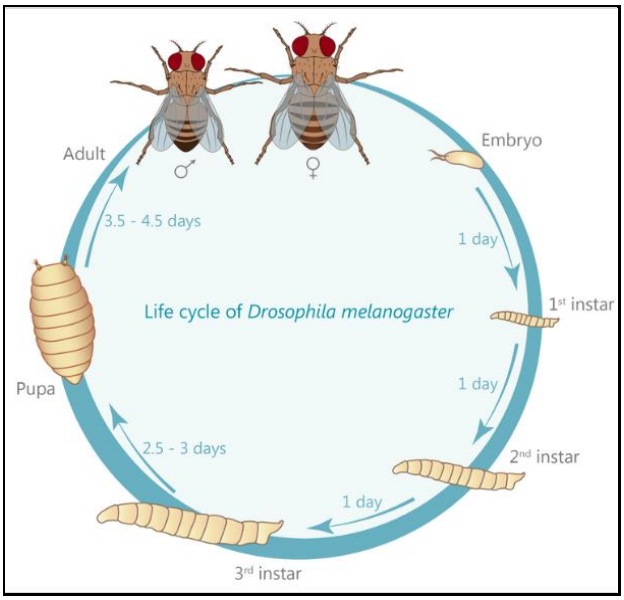



**Figure 12 - Cycle de vie de Drosophila melanogaster à 25°C.** L'embryon se développe pendant une journée avant d'éclore en une larve de stade 1. Les deux jours suivants, la larve passera au stade 2, puis 3. Au bout de 2 à 3 jours supplémentaires, la larve de stade 3 forme une pupe où l'individu entame sa métamorphose. Après environ 4 jours de métamorphose, un individu adulte éclot de la pupe et se reproduira avec un.e partenaire pour former de nouveaux embryons. *Source [https://www.walter-lab.com/methods](https://www.walter-lab.com/methods) , consulté le 14/10/24*.

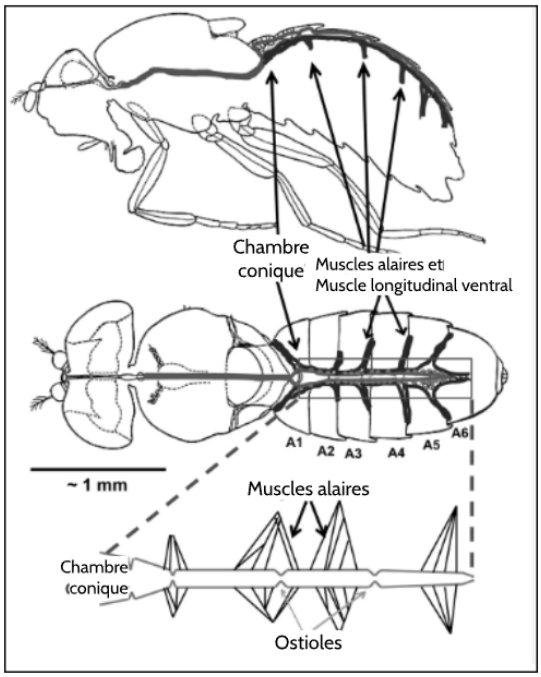



**Figure 13 - Le système circulatoire de la drosophile adulte.** Le système circulatoire de la drosophile est un système ouvert dont le cœur est situé sous la cuticule dorsale au niveau de segments A1 à A6 de l'abdomen. Il est maintenu par les muscles alaires et les muscles longitudinaux ventraux. *Adapté de (Wolf and Rockman, 2008)*.

Mon travail de thèse utilise les avantages du modèle du cœur de la drosophile afin d'étudier le vieillissement cardiaque. La drosophile est un petit organisme au cycle de vie court, avec un faible coût en maintenance et des voies cellulaires et moléculaires conservées avec l'humain. De façon notable, 77% des gènes humains impliqués dans des maladies ont un orthologue chez la drosophile (Souidi and Jagla, 2021). De plus, le développement de nombreux outils génétiques et moléculaires, notamment les systèmes d'expression de transgène conditionnel tel que UAS-GAL4, permettent d'étudier de façon temps et tissu-spécifique le gain et la perte de fonction des gènes, pour comprendre leur fonction dans la fonction cardiaque. Plusieurs banques de lignées mutantes et transgéniques, en particulier BDSC (Bloomington Drosophila Stock Center, aux USA) et VDRC (Vienna Drosophila Ressource Center, en Autriche) permettent d'obtenir rapidement ces lignées afin de faire des criblages rapides de nombreux gènes candidats.

Plusieurs techniques d'imagerie cardiaques ont été mises en place chez la drosophile, qui seront détaillées à la fin de ce chapitre, et ont permis de décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires des cardiomyocytes et d'identifier de nombreux orthologues avec l'humain, montrant ainsi la conservation entre ces deux organismes (Bier and Bodmer, 2004; Souidi and Jagla, 2021; Taghli-Lamallem et al., 2016).

# Le tube cardiaque de la drosophile

*Drosophila melanogaster*, aussi appelée mouche du vinaigre ou drosophile (nom que j'utiliserai pour la suite de ce manuscrit), est un arthropode au cycle de vie court, seulement 10 jours à 25°C (**Figure 12**). Une femelle drosophile pond un œuf fécondé à partir duquel un embryon se développe pendant 24h. Ensuite, une larve éclot et pendant les 5 jours suivants elle va croître, prendre du volume avant de se figer en hauteur en une pupe (chrysalide). Au cours de cette phase, la drosophile se métamorphose, modifiant considérablement sa morphologie pour former un individu adulte qui sortira de sa pupe au bout de 4 jours environ, et qui pourra se reproduire pour perpétuer ce cycle.

## *Morphologie du tube cardiaque*

Chez la drosophile adulte, le cœur, aussi appelé tube cardiaque, est localisé sous la cuticule dorsale de l'abdomen et se prolonge dans le thorax par une aorte (**Figure 13**). Tout comme chez les mammifères, le cœur est capable de se contracter de façon synchronisée pour faire circuler l'hémolymphe dans le reste du corps. L'hémolymphe transporte les nutriments, les hormones et les cellules immunitaires, mais il est important de noter que, contrairement aux mammifères notamment, elle ne transporte pas l'oxygène. Cette particularité permet à l'individu de continuer de vivre malgré l'arrêt des battements cardiaques.

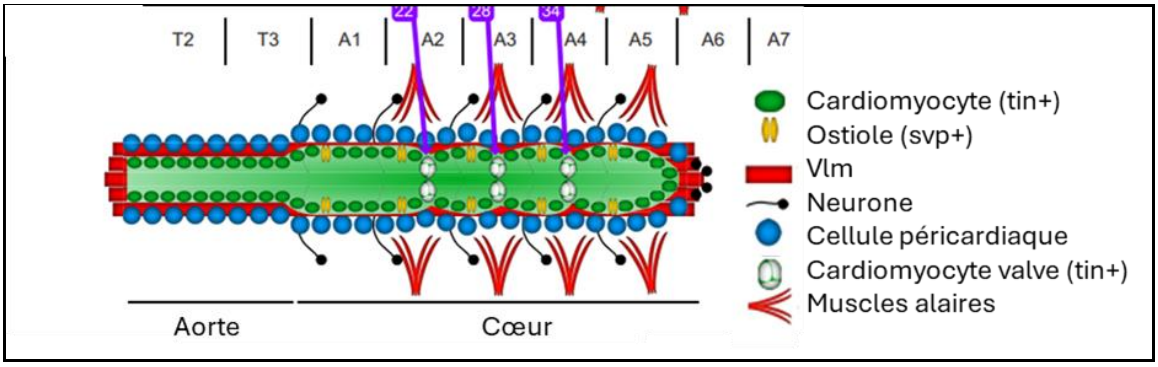



**Figure 14 - Composition cellulaire du cœur de la drosophile adulte.** Représentation schématique des cellules constituant le cœur de la drosophile adulte. Abréviations : VLM = Muscle Longitudinal Ventral. *Modifié de (Rotstein and Paululat, 2016)*.

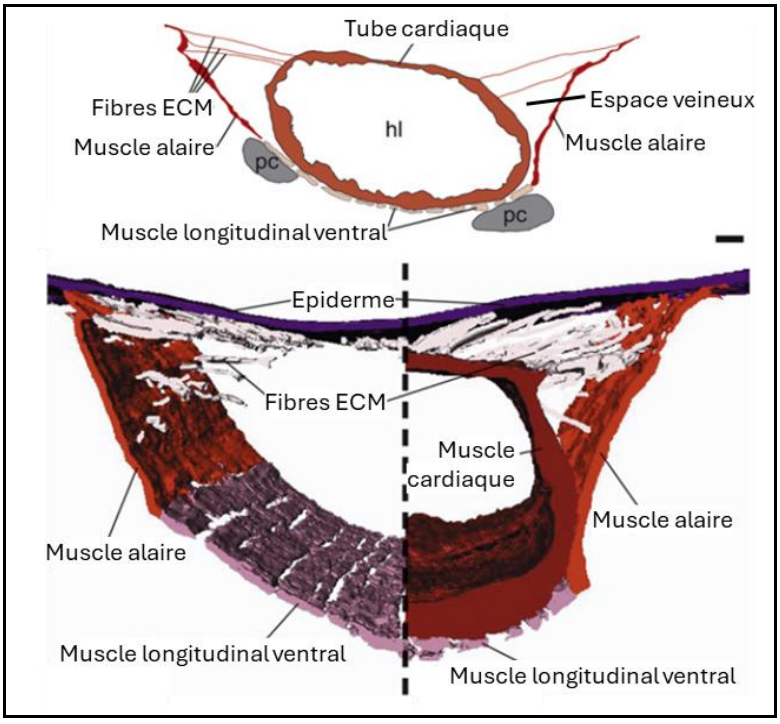



**Figure 15 - Structure musculaire du cœur de la drosophile adulte.** (haut) Diagramme schématique du cœur adulte en coupe orthogonale au niveau de la 3e paire de muscles alaires (segments abdominaux A4-A5). (bas) Reconstruction 3D de la morphologie cardiaque au niveau de la 3e paire de muscles alaires. Abréviations : ECM = matrice extracellulaire, hl = Lumière cardiaque, pc = Cellule péricardiaque. *Modifié de (Lehmacher et al., 2012)*.

Le tube cardiaque est organisé en une chambre unique composée de 3 types cellulaires. Une monocouche de cardiomyocytes forme le tube cardiaque, et ces cardiomyocytes sont entourés de cellules péricardiaques. Ce tube est maintenu attaché à la cuticule dorsale par les muscles alaires, les muscles longitudinaux ventraux et la matrice extracellulaire (**Figure 14**) (Rotstein and Paululat, 2016).

Les 8 muscles alaires, 4 de chaque côté du cœur, relient les muscles longitudinaux ventraux situés sous le cœur et la cuticule, formant ainsi une structure comme "suspendue". Des fibres allongées de matrice extracellulaire relient le tube cardiaque aux muscles alaires et la cuticule dorsale, cependant ces fibres ne se connectent pas transversalement entre elles (**Figure 15**) (Lehmacher et al., 2012). L'espace veineux, situé dans l'espace créé par la structure de muscles et de matrice extracellulaire, permet à l'hémolymphe de passer pour entrer dans les ostioles pendant la diastole (**Figure 14**) (Curtis et al., 1999; Lehmacher et al., 2012; Wasserthal, 2007).

Autour du tube cardiaque, se trouve 32 à 36 cellules péricardiaques (**Figure 14**), souvent qualifiés de néphrocytes en raison de leur fonction de filtration de l'hémolymphe (Denholm and Skaer, 2009; Sellin et al., 2006), à l'image des reins chez les mammifères. De plus, les cellules péricardiaques ont une activité paracrine, notamment médiée par les espèces oxygénées réactives (ROS – reactive oxygen species), sur les cardiomyocytes à proximité, ce qui modifie leur fonction (Lim et al., 2019, 2014). Le rôle des ROS et l'influence des cellules péricardiaques sur la fonction cardiaque sera détaillé dans le Chapitre 2 de cette introduction.

Le cœur proprement dit (par distinction au tube cardiaque) est formé de cardiomyocytes qui constituent l'unité contractile permettant la fonction cardiaque. Les 84 cardiomyocytes qui composent le cœur adulte sont divisés en 3 sous-types selon leur fonction spécialisée :

- 56 cardiomyocytes strictement contractiles
- 6 cardiomyocytes (3 paires) qui forment des valves limitant le reflux d'hémolymphe pendant la contraction
- 20 ostioles (10 paires) permettant l'entrée du flux d'hémolymphe
- 1 paire de cellules caudales localisées au bout du tube cardiaque et permettant la sortie de l'hémolymphe.

Le tube cardiaque est organisé en segments comportant chacun 2 paires d'ostioles, et 4 paires de cardiomyocytes. Les segments A2 à A4 possèdent 3 paires de cardiomyocytes contractiles et 1 paire de valves, et le segment A5 se termine par une paire de cellules caudales permettant la sortie d'hémolymphe (**Figure 14**) (Sellin et al., 2006; Wasserthal, 2007).

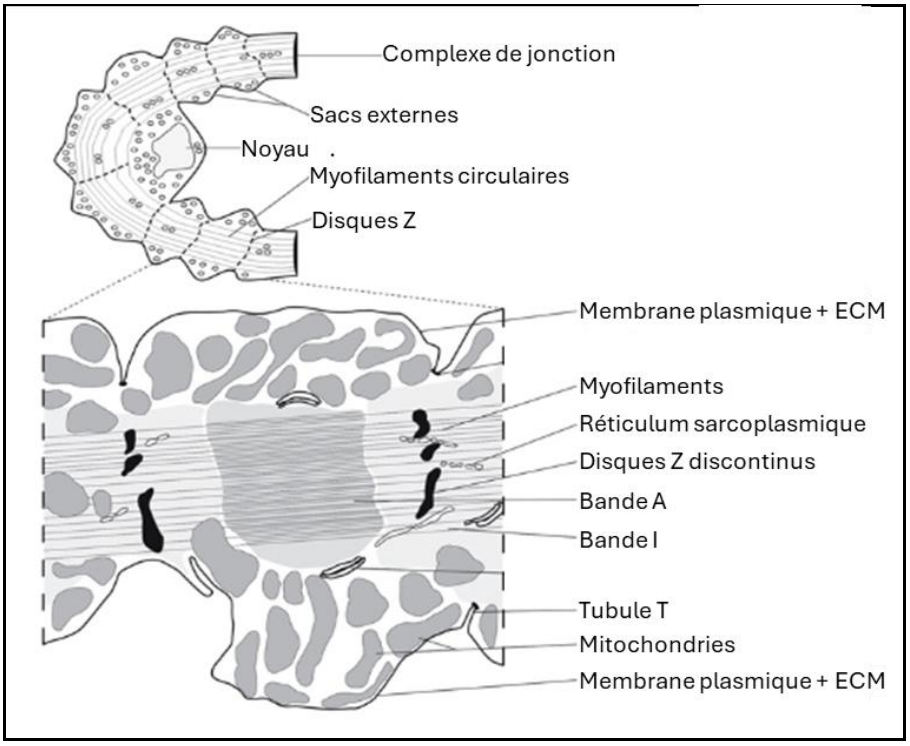



**Figure 16 - Représentation schématique d'un cardiomyocyte contractile de la drosophile adulte.** Le cardiomyocyte est composé de myofilaments circulaires entourés de mitochondries localisées de chaque côté. Les tubules T localisés au niveau des disques Z de part et d'autre délimitent des sacs contenant les mitochondries et le noyau. Abréviations : ECM = Matrice Extracellulaire. *Adapté de (Lehmacher et al., 2012)*.

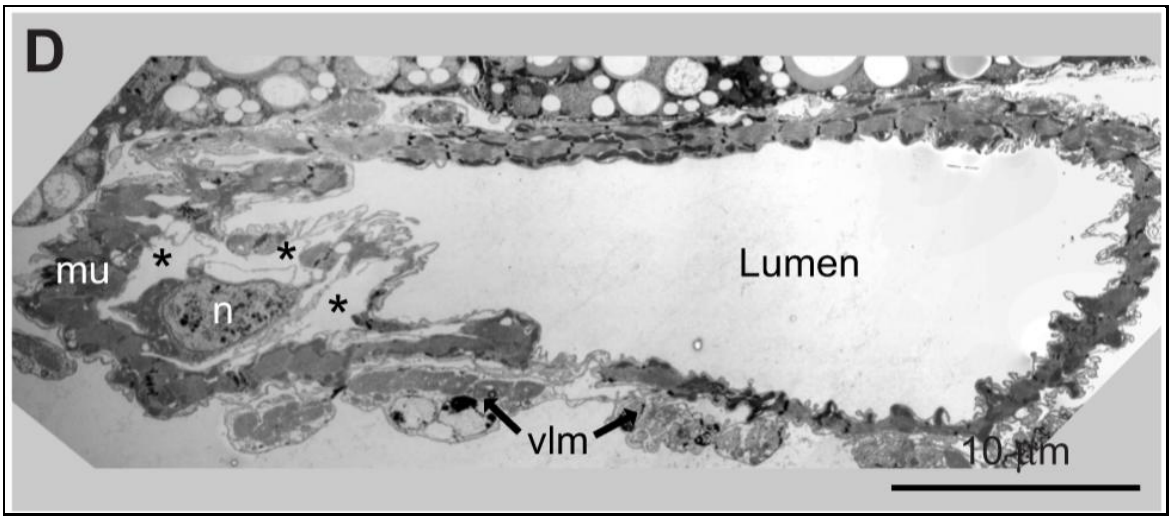



**Figure 17 - Coupe orthogonale par microscopie électronique de la valve du segment A3 d'un tube cardiaque adulte.** Abréviations : n = Noyau, * = valvosome, vlm = Muscle longitudinal ventral, mu = myofilaments. *Source (Meyer et al., 2023)*.

Les cardiomyocytes contractiles sont organisés par paire et sont étroitement liés entre eux par la matrice extracellulaire au niveau du complexe de jonction pour former la lumière du tube cardiaque. Les sarcomères sont alignés et forment des myofilaments parallèles les uns aux autres (**Figure 16**). Tout comme chez les mammifères, les cardiomyocytes de la drosophile ne forment pas de syncytium mais maintiennent une continuité des myofilaments au niveau des complexes de jonction. Les myofilaments sont groupés et orientés dans la circonférence du tube et, contrairement aux cardiomyocytes des mammifères, les disques Z apparaissent discontinus par microscopie électronique et les zones H ne sont pas visibles (Curtis et al., 1999; Lehmacher et al., 2012).

Au niveau des disques Z, les tubules T facilitent le couplage excitation-conduction tout comme chez les mammifères. Entre les tubules T, le sarcolemme s'évagine pour former des sacs de chaque côté des myofilaments, contenant un large nombre de mitochondries. Le noyau du cardiomyocyte est également localisé dans un de ces sac au niveau de la lumière du tube cardiaque (Curtis et al., 1999; Lehmacher et al., 2012).

Les 5 paires d'ostioles des segments A1 à A4 permettent l'entrée en sens unique de l'hémolymphe vers la lumière du tube, et deux cellules au niveau du segment A5 forment une ouverture permettant la sortie de l'hémolymphe. Bien que la nature de ces deux cellules caudales reste encore méconnue, il a été supposé que leurs précurseurs sont des cellules ostiales. Les deux ostioles d'une paire forment une ouverture vers la lumière du tube et sont indispensables au flux d'hémolymphe lors des contractions antérogrades et rétrogrades (Wasserthal, 2007).

Les 3 paires de valves permettent d'aider à diriger l'hémolymphe dans le sens de la contraction. Elles sont situées dans les segments abdominaux A2 à A4 et permettent de délimiter 4 "chambres" selon certains auteurs (**Figure 14**) (Lehmacher et al., 2012; Meyer et al., 2023). Les valves possèdent une cavité interne, nommée valvosome, qui augmente la surface cellulaire externe vers la lumière du tube et serait capable de bloquer le reflux d'hémolymphe (**Figure 17**) (Meyer et al., 2023). La forme particulière des valves est également marquée par une organisation des myofilaments en réseau, toujours orientée dans la circonférence du tube, une abondance de matrice extracellulaire et des mitochondries groupées (Lehmacher et al., 2012; Meyer et al., 2023).

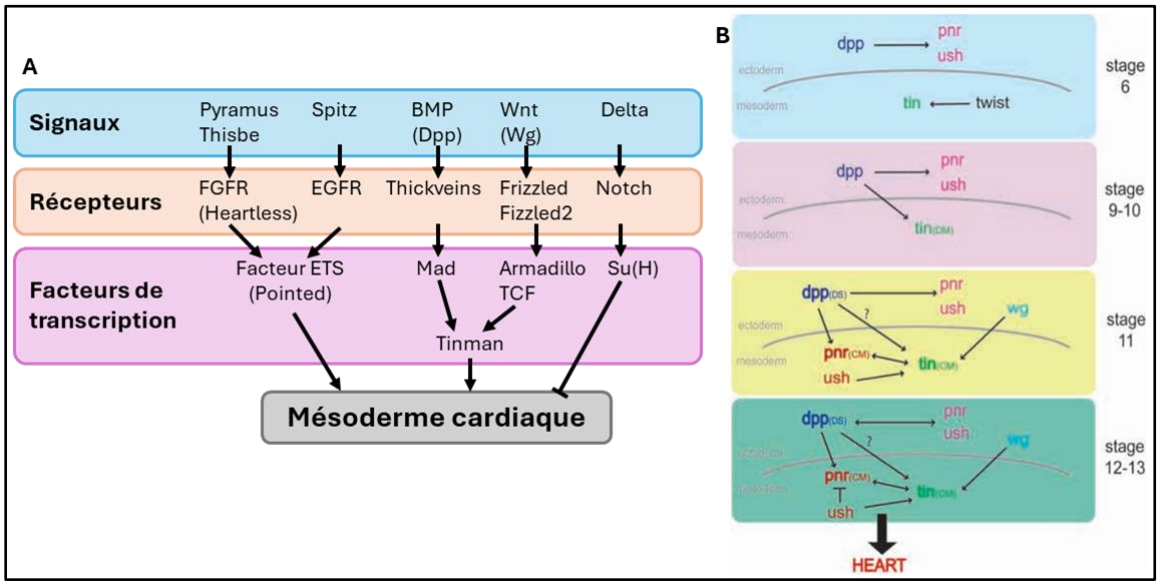



**Figure 18 - Voies de signalisations impliquées dans la détermination du mésoderme cardiaque chez l'embryon.** (A) Réseau de régulation impliqué dans la détermination du mésoderme cardiaque montrant les ligands, récepteurs et facteurs de transcription clés. (B) Réseaux de régulation et leur localisation dans l'ectoderme ou le mésoderme au cours des stades embryonnaires 6 à 13. Abréviations : Dpp = Decapentaplegic, Wg = Wingless, pnr = Pannier, tin = Tinman, ush = U-shaped. *Adapté de (Ahmad, 2017; Klinedinst and Bodmer, 2003)*.

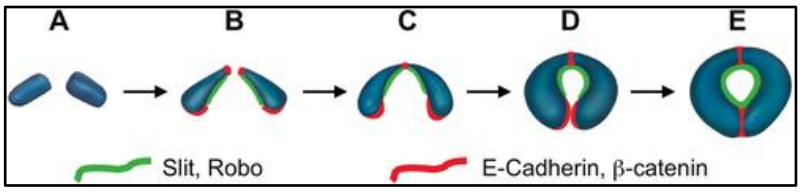



**Figure 19 - Représentation schématique illustrant la séquence d'événements de la formation de la lumière du tube cardiaque.** Deux cardioblastes face à face dans le vaisseau dorsal en formation s'allongent et migrent pour former la lumière du tube sous le contrôle de Slit, Robo, E-cadherin et B-catenin. *Source (Ahmad, 2017)*.

## *Développement du tube cardiaque*

Le tube cardiaque se développe dans l'embryon et est dérivé du mésoderme après la gastrulation. La spécification du mésoderme cardiaque débute au stade 10 grâce à deux facteurs de croissance : Decapentaplegic (Dpp, voie de signalisation BMP) et Wingless (Wg, voie de signalisation Wnt) qui sont sécrétés par l'ectoderme. L'intersection de ces deux facteurs permet de spécifier le mésoderme cardiaque, et de restreindre l'expression de *tinman* (*tin*), codant pour un facteur de transcription déterminant l'identité des précurseurs cardiaques (Ahmad, 2017; Lockwood and Bodmer, 2002). En effet, des embryons mutants *tin* n'ont pas de cellules cardiaques (Bodmer, 1993).

La détermination et le maintien du mésoderme cardiaque est également sous le contrôle de trois autres voies de signalisation (**Figure 18A**) (Ahmad, 2017). La mutation du récepteur (Heartless) de la voie FGFR diminue le nombre de cellules cardiaques dans le mésoderme. A l'inverse, l'inhibition de la voie Notch bloque la division asymétrique des précurseurs cardiaques, qui devraient produire des cardioblastes et des cellules péricardiaques, et seuls des cardioblastes sont créés, augmentant donc leur nombre. La voie EGFR est nécessaire au maintien du mésoderme cardiaque après sa spécification. Dans le mésoderme cardiaque, Dpp et Wg induisent également l'expression de *pannier* (*pnr*), un facteur de transcription de type GATA requis pour la spécification des précurseurs cardiaques. (**Figure 18B**) (Klinedinst and Bodmer, 2003).

Au cours des stades 12 à 15, les deux rangées de cardioblastes migrent en position dorsale afin de former le tube cardiaque, aussi nommé vaisseau dorsal dans la littérature. Les deux cardioblastes face à face changent de morphologie pour s'allonger et former un croissant dont les deux pointes se connectent. (**Figure 19**) Ce processus est réalisé par la voie Slit/Robo, exprimée par les cardiomyocytes en différenciation et les cellules péricardiaques qui leur sont associées. Slit, Robo1 et Robo2, trois acteurs de la voie, sont nécessaires à la migration correcte des cardiomyocytes, mais également à la formation de la lumière du tube en régulant la polarité et la forme de la cellule. Les protéines d'adhésion E-cadherin et B-catenin sont spécifiquement localisées aux points d'attache des deux cardiomyocytes où Slit/Robo ne sont pas accumulés (Ahmad, 2017). De plus, la protéine Cdc42 joue également un rôle dans la formation de la lumière du tube cardiaque en agissant sur le réseau d'actine-myosine et la localisation de la myosine II non-musculaire, codée par le gène *zipper* (Vogler et al., 2014).

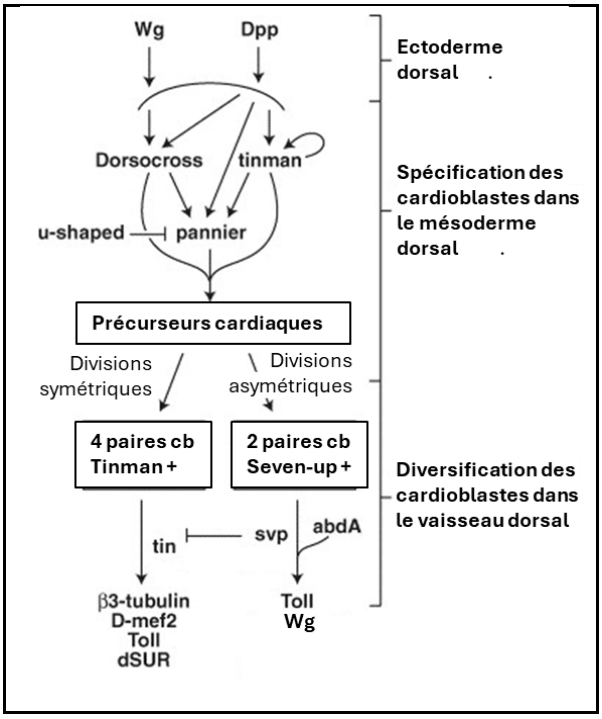



**Figure 20 - Réseau de régulation contrôlant la spécification des cardioblastes au cours du développement cardiaque embryonnaire.** Abréviations : cb = cardioblaste, tin = Tinman, svp = Seven-up, Wg = Wingless, Dpp = Decapentaplegic. *Adapté de (Tao and Schulz, 2007)*.

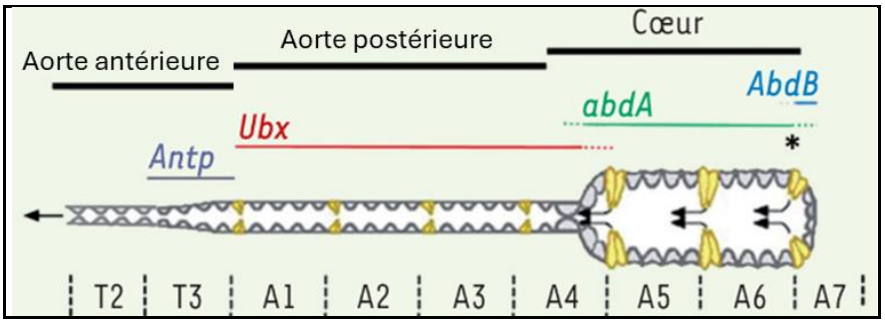



**Figure 21 - Schéma de la localisation des profils d'expression des gènes homéotiques du complexe Bithorax dans le cœur embryonnaire et larvaire.** Antp = Antennapedia, Ubx = Ultrabithorax, abdA = abdominal A, AbdB = Abdominal B. *Modifié de (Perrin et Röder, 2016)*.

Le réseau d'expression de gènes des cardioblastes, déterminé grâce à Wg et Dpp, permet la différenciation des précurseurs cardiaques en deux types cellulaires : les cardiomyocytes contractiles et les ostioles (**Figure 20**). Tinman active dans les cardioblastes l'expression de plusieurs gènes exprimés dans le cœur et qui sont conservés chez les mammifères. Tin/Nkx2.5 active l'expression de *mef2/mcf2C*, *pnr/gata4*, *dorsocross (doc)/tbx5* (Cripps and Olson, 2002; Tao and Schulz, 2007). Mef2 est un facteur de transcription qui contrôle l'expression de gènes musculaires dans les muscles striés cardiaques et non cardiaques, notamment les sous-unités de myosine (Junion and Jagla, 2022). Pannier est un facteur de transcription qui maintient l'expression de *tin* et permet également l'expression de *mef2* (Klinedinst and Bodmer, 2003). Enfin, les trois protéines Doc sont des facteurs de transcription régulés par Tin et Pnr, et Doc induit lui-même l'expression de *pnr* (Tao and Schulz, 2007).

Les cardioblastes expriment le marqueur *tinman*, alors que les précurseurs des ostioles expriment le marqueur *seven-up*. Le tube cardiaque est constitué de 9 segments (**Figure 21**) chez l'embryon, qui sont maintenus pendant toute la vie larvaire. Les segments thoraciques T2-T3 sont constitués de 4 paires de cardioblastes, et nommés aorte antérieure. Les segments abdominaux A1-A4 sont constitués de 4 paires de cardioblastes et 2 paires de précurseurs des ostioles formant l'aorte postérieure, non contractile. Enfin, les segments A5-A7 forment le cœur proprement dit, avec la même organisation que l'aorte postérieure, cependant les cardiomyocytes ont une fonction contractile (Perrin and Röder, 2016; Tao and Schulz, 2007).

Cette organisation du tube cardiaque en trois structures distinctes est déterminée par l'action des gènes homéotiques postérieurs. Il s'agit d'un complexe de gènes localisés sur le chromosome 3R, et dont l'expression permet la différenciation antéro-postérieure des segments T3 à A8 de l'organisme. Dans le tube cardiaque, *Antp* est exprimé dans l'aorte antérieure, *Ultrabithorax* (*Ubx*) dans l'aorte postérieure, *Abd-A* dans le cœur, et enfin *Abd-B* est exprimé dans le segment A7 qui est la chambre terminale du cœur (**Figure 21**) (Souidi and Jagla, 2021; Tao and Schulz, 2007).

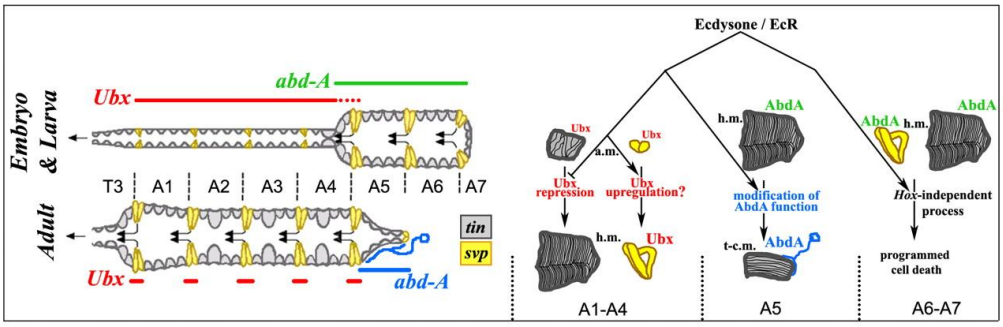



**Figure 22 - Modèle des modifications morphologiques du tube cardiaque lors de la métamorphose.** Le signal déclenché par l'ecdysone modifie l'expression et la fonction d'Ubx et Abd-A pendant la métamorphose. Abréviations : tin = tinman, svp = seven-up, EcR = Récepteur Ecdysone, Abd-A = Abdominal-A, Ubx = Ultrabithorax, a.m. = myocyte de l'aorte, h.m. = myocyte cardiaque, t-c.m. = myocyte de la chambre terminale. *Source (Monier et al., 2005)*.

### *Métamorphose du tube cardiaque*

Au cours de la métamorphose, le tube cardiaque subit de grandes modifications morphologiques et fonctionnelles (Curtis et al., 1999; Lehmacher et al., 2012; Sellin et al., 2006) induites par différentes voies moléculaires (**Figure 22**) (Zeitouni et al., 2007). Entre 27 et 30 heures après la formation de la pupe (APF), le cœur larvaire arrête de battre, et un pic d'ecdysone, impliquant des réarrangements dans tout l'organisme, provoque dans le tube cardiaque la modification de l'expression du gène *Ubx* et de la fonction de *Abd-A* dans les cardiomyocytes (Monier et al., 2005).

Dans l'aorte postérieure à partir de 30h APF, l'expression de *Ubx* se restreint aux précurseurs des ostioles, qui expriment *seven-up*, et qui se différencient en ostioles (**Figure 22**) (Monier et al., 2005). Bien que les mécanismes restent encore méconnus, des modifications de l'expression de la voie Wnt, et la modification de l'expression d'*Ubx* sont corrélés avec le remodelage des cardiomyocytes de l'aorte postérieure en cardiomyocytes du cœur, et permettent l'élargissement de la lumière du tube cardiaque dans les segments A1-A4. Le nombre de myofibrilles de ces cardiomyocytes augmente et les cardiomyocytes s'élargissent (Molina and Cripps, 2001).

Plusieurs types cellulaires du tube cardiaque se trans-différencient pendant la métamorphose, c'est-à-dire que des cellules différenciées changent de type cellulaire sans passer par une forme pluripotente. Dans les segments A1-A4, une paire de cardiomyocytes par segment deviennent les cardiomyocytes valves grâce à la voie PVF (PDGF-VEGF) (Meyer et al., 2023; Zeitouni et al., 2007). Le segment A5 devient la chambre terminale, et requiert le maintien de l'expression d'Abd-A afin d'organiser les myofibrilles de façon longitudinale et de former de nouvelles terminaisons nerveuses spécifiques à l'activité pacemaker de ces cellules (**Figure 22**) (Monier et al., 2005; Zeitouni et al., 2007).

L'identité des cellules du tube cardiaque est donc modifiée au cours de la métamorphose, tout comme leur morphologie. En effet, le tube cardiaque larvaire qui s'étendait du segment T2 à A7 se raccourcit à l'âge adulte avec l'élimination des segments A6 et A7 par apoptose (**Figure 22**) (Molina and Cripps, 2001; Monier et al., 2005; Sellin et al., 2006). Le segment A1 s'élargit pour former la chambre conique (Curtis et al., 1999), et le cœur se plaque à la face dorsale de la paroi abdominale grâce aux muscles alaires, et à la formation du muscle longitudinal ventral à partir d'un sous-type de muscles alaires (Curtis et al., 1999; Schaub et al., 2015; Zeitouni et al., 2007).

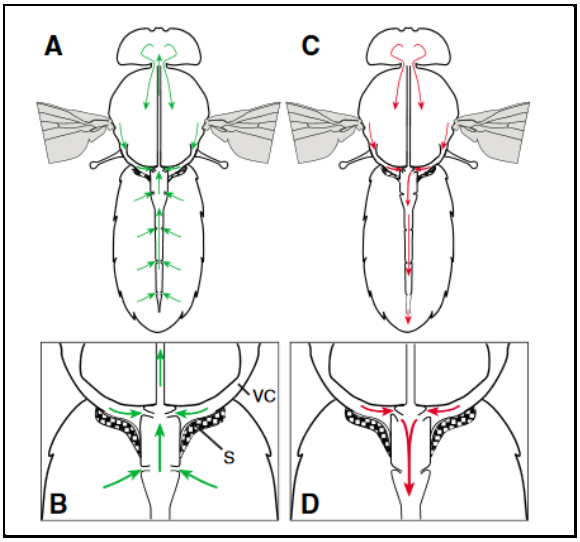



**Figure 23 - Schéma résumant la circulation antérograde et rétrograde du cœur adulte.** (A-B) Lors de la contraction antérograde, l'hémolymphe entre par les ostioles et est éjecté par l'aorte. (C-D) L'hémolymphe entre par les ostioles au niveau de la chambre conique et est éjectée au niveau de la chambre terminale. *Source (Wasserthal et al., 2007)*.

### *Contraction et fonction du tube cardiaque*

La contraction cardiaque est induite par deux pacemakers localisés dans la partie antérieure et postérieure du cœur, qui permettent de générer des contraction antérogrades et rétrogrades (Dulcis and Levine, 2005; Rizki and Rizki, 1978). La contraction du cœur, d'origine myogénique, est régulée par le système nerveux et est modifiée par des neurotransmetteurs (Dulcis and Levine, 2005; Johnson et al., 1998; Zornik et al., 1999). En effet, le cœur est innervé au niveau de la chambre conique (segment A1) et de la chambre terminale (segment A5) (Dulcis and Levine, 2005). Le rôle de ces contractions dans les deux sens est encore méconnu, mais Wasserthal avance dans son étude que, lors de la contraction antérograde, le cœur se remplit d'hémolymphe par les 5 paires d'ostioles, puis la contraction l'éjecte par l'aorte vers le cerveau. En revanche, lors de la pulsation rétrograde, le cœur se remplit par la paire d'ostioles de la chambre conique et la contraction l'éjecte par la chambre terminale (**Figure 23**) (Wasserthal, 2007).

Le mécanisme électrophysiologique de contraction du cardiomyocyte est comparable à la celui décrit chez les mammifères, et les protéines impliquées sont conservées entre les deux organismes (**Tableau 2**).

La contraction organisée des cardiomyocytes le long du tube et le maintien de leur cohésion entre eux et avec les cellules adjacentes est médiée par la matrice extracellulaire (ECM) qui est nécessaire à la fonction cardiaque (Sessions et al., 2016).

**Tableau 2 - Protéines impliquées dans la contraction cardiaque chez la souris et la drosophile.** *Adapté de (Kaushik et al., 2012; Taghli-Lamallem et al., 2016).*

| **Protéine** | **Gène souris** | **Gène drosophile** |
|---|---|---|
| Chaîne lourde myosine | *Myh1*<br>*Myh3*<br>*Myh4*<br>*Myh6*<br>*Myh7*<br>*Myh8* | *Mhc* |
| Chaîne légère myosine | *Myl1*<br>*Myl2*<br>*Myl3*<br>*Myl4*<br>*Myl9* | *Mlc-c*<br>*sqh* |
| Actine | *Acta1*<br>*Acta2*<br>*Actc1*<br>*Actg1* | *Act79B*<br>*Act5C* |
| Troponin-C | *Tnnc1*<br>*Tnnc2* | *TpnC* |
| Troponin-I | *Tnni1*<br>*Tnni2*<br>*Tnni3* | *wupA* |
| Troponin-T | *Tnnt1*<br>*Tnnt2*<br>*Tnnt3* | *up* |
| Tropomyosin | *Tpm1*<br>*Tpm2*<br>*Tpm3*<br>*Tpm4* | *Tm1* |
| Canaux calciques type L | *Cacna1c*<br>*Cacna1d*<br>*Cacna1s*<br>*Cacna1a*<br>*Cacna1b*<br>*Cacna1e* | *Ca-alp*<br>*cac* |
| Récepteur ryanodine | *Ryr1*<br>*Ryr2*<br>*Ryr3* | *Ryr-r4* |
| SERCA | *Atp2a2*<br>*Atp2a3* | *Ca-P60* |
| Canaux K+ | *[KCNQ1]*<br>*[KCNK]*<br>*[SUR2]*<br>*[KV2.1]* | *KCNQ*<br>*ORK1*<br>*dSUR*<br>*Shab* |

## *Méthodes d'étude de la fonction cardiaque*

Afin d'étudier la fonction cardiaque, il est nécessaire de développer des méthodes permettant la détection de cette fonction. Plusieurs méthodes existent aujourd'hui, permettant la détection des battements cardiaques en temps réel (**Tableau 3**). L'étude pionnière dans le domaine, réalisée par Paternostro et al., utilisait des mouches anesthésiées entières filmées au travers de la cuticule dorsale, avec une fréquence de 30 images par seconde (Paternostro et al., 2001). Cependant, cette résolution est limitée et la fréquence d'images est trop faible afin de déterminer avec précision les paramètres cardiaques, en particulier le rythme. Depuis, deux méthodes basées sur ce principe ont été développées, et les plus utilisées sont : SOHA (Semi-automated Optical Heartbeat Analysis) sur des mouches semi-disséquées maintenues dans un milieu proche de l'hémolymphe, et TDTK qui utilise un transgène fluorescent du même nom pour filmer les mouches anesthésiées intactes. Une troisième méthode d'imagerie sur mouche anesthésiées intactes a également été mise au point en parallèle, l'Optical Coherence Tomography (OCT).

**Tableau 3 - Avantages et inconvénients de 3 méthodes d'imagerie cardiaque chez la drosophile.**

| **Méthode** | **Avantages** | **Inconvénients** |
|---|---|---|
| SOHA (Semi-automated Optical Heartbeat Analysis) | Détection précise du rythme cardiaque de façon semi-automatique<br>Détection de la direction de la contraction cardiaque<br>Dénervation permettant d'observer la fonction contractile d'origine myogénique<br>Utilisation sur des drosophiles au stade larvaire, pupe et adulte ; zebrafish et embryon de souris | Difficultés de détection des limites de contraction quand elle est prolongée<br>Temps de préparation des échantillons long<br>Détection manuelle des bords du tube pour le calcul des diamètres<br>Méthode ex-vivo<br>Risques de lésions des cardiomyocytes liés à la dissection |
| "TDTK" (Analyse des paramètres cardiaque in vivo par un transgène fluorescent) | Temps de préparation des échantillons court<br>Individus intacts<br>Détection des paramètres cardiaques entièrement automatisée | Impossibilité de distinguer les régulations autonomes des effets de la régulation nerveuses et/ou humorale |
| OCT (Optical Coherence Tomography) | Individus intacts<br>Utilisation de drosophiles au stade larvaire et adulte | Définition spatiale peu précise |

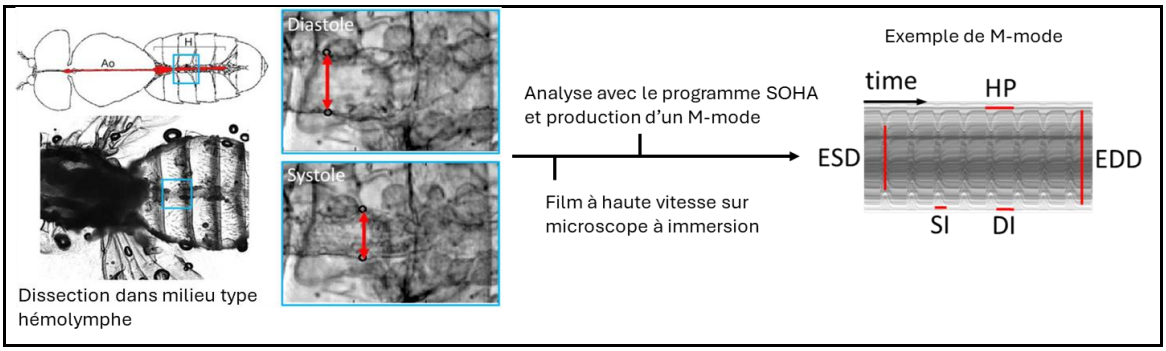



**Figure 24 - Protocole de la méthode SOHA.** Des mouches anesthésiées sont disséquées dans un milieu mimant l'hémolymphe pour révéler le cœur encore capable de battre. Les cœurs sont ensuite filmés à haute vitesse (100 à 200 images par secondes) et la diastole et la systole sont détectées manuellement avant d'analyser le film réalisé dans le programme SOHA et de produire un M-mode qui affiche le long de la ligne du temps une colonne de pixel afin d'en déduire les paramètres cardiaques de structure et de fonction. Abréviations : ESD = diamètre systolique, EDD = diamètre diastolique, HP = durée d'un battement cardiaque, SI = interval systolique, DI = interval diastolique. *Adapté de (Cannon and Bodmer, 2015)*.

***Semi-automated Optical Heartbeat Analysis (SOHA)***

SOHA, pour Semi-automated Optical Heartbeat Analysis (Analyse optique du battement cardiaque semi-automatique), est une méthode développée par Fink et al. / Ocorr et al. et basée sur la méthode établie par Paternostro et al. permettant la détection des changements d'intensité de la lumière passant à travers le cœur lors du cycle cardiaque (Cammarato et al., 2014; Cannon and Bodmer, 2015; Fink et al., 2009; Ocorr et al., 2009, 2007; Paternostro et al., 2001). Cependant, avec la méthode SOHA, le cœur est disséqué, et c'est la face ventrale du cœur qui est filmée. Cette technique permet la détection de plusieurs nouveaux paramètres de la fonction cardiaque grâce à la réalisation de M-mode, ou kymogrammes.

Les drosophiles sont tout d'abord anesthésiées et disséquées partiellement dans un milieu mimant l'hémolymphe afin d'exposer la face ventrale du cœur. Il est ensuite filmé à haute vitesse (100-200 images par secondes) au niveau des segments A2-A3 et analysé par le programme SOHA, combinant deux algorithmes. Le programme crée d'abord un M-mode à partir d'un film réalisé. Le M-mode est un assemblage d'une colonne de 1 pixel de largeur, vue le long de la ligne du temps (**Figure 24**). Cette technique est similaire à celles utilisées pour analyser des échocardiographies chez l'humain.

A partir d'un M-mode, il est ensuite possible de mesurer automatiquement le rythme cardiaque. Les algorithmes utilisés par le programme SOHA détectent le mouvement de la paroi cardiaque correspondant à la systole et l'arrêt du mouvement correspondant à la diastole. Le programme peut alors mesurer l'intervalle diastolique (DI), donc la durée de la relaxation médiane, l'intervalle systolique (SI), la durée de la contraction médiane, et enfin la période cardiaque (HP), la durée d'un battement cardiaque médiane. La fréquence cardiaque est ensuite calculée à partir de la HP, et la variabilité de la HP, normalisée à la HP médiane, permet de mesurer l'arythmie. Il est également possible de quantifier la vitesse et la direction de la contraction.

La méthode SOHA est dite semi-automatique car elle nécessite une intervention de l'utilisateur, qui doit déterminer manuellement les limites du tube cardiaque en systole (ESD) et en diastole (EDD), et qui doit valider ou modifier la détection correcte des intervalles diastoliques et systoliques pour chacun des M-modes réalisés. Ces mesures sont utilisées afin de calculer la fraction d'éjection (FS), c'est-à-dire la capacité de contraction des parois cardiaques.

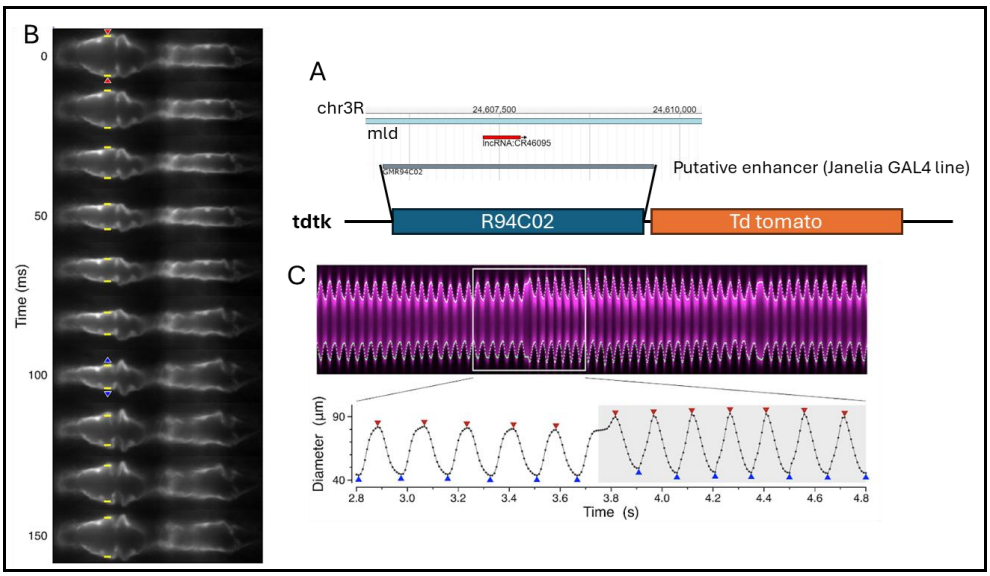



**Figure 25 - Détection des battements cardiaques grâce au transgène tdtk.** (A) Représentation graphique du transgène tdtk où le gène td tomato, exprimant une protéine fluorescente, est placé sous le contrôle de l'enhancer coeur-spécifique R94C02 (localisation indiquée à partir d'une capture Jbrowse). (B) Contraction et relaxation du cœur. Les barres jaunes horizontales représentent les bordures du tube en une localisation unique, les flèches rouges montrent le début de la contraction et les flèches bleues le début de la relaxation. (C) M-mode et digitalisation d'une colonne d'un pixel de large montrant les mouvements cardiaques au cours du temps. *Adapté de (Klassen et al., 2017)*.

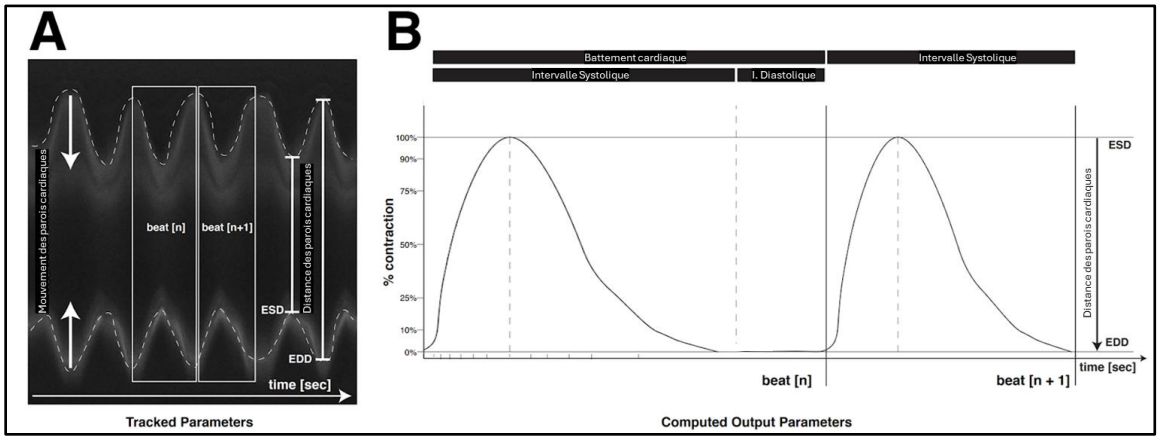



**Figure 26 - Détection automatique des paramètres cardiaques.** (A) M-mode d'un tube cardiaque indiquant les paramètres cardiaques mesurés directement sur l'image. (B) Représentation graphique schématique de la mesure mathématique des paramètres cardiaques. Abréviations : EDD = Diamètre Diastolique, ESD = Diamètre Systolique. Adapté d'une figure donnée par G. Vogler.

***TDTK***

La méthode que j'appelle "tdtk" est une approche utilisant un transgène fluorescent cœur-spécifique permettant de détecter le cœur au travers de la cuticule dorsale afin de déterminer divers paramètres de la fonction cardiaque *in vivo* (Klassen et al., 2017). Le transgène fluorescent "tdtk" est une construction plaçant l'expression du fluorophore rouge tdTomato sous le contrôle de l'enhancer R94C02, qui est cœur-spécifique (**Figure 25**).

Les drosophiles adultes intactes anesthésiées sont collées sur le dos sur une lamelle avec une colle transparente activée aux UV pour plaquer leur abdomen et thorax à la lamelle et détecter les mouvements cardiaques au travers de la lamelle et de la cuticule abdominale dorsale. Le cœur est ensuite filmé à haute vitesse (120-300 images par secondes) sous un microscope au niveau des segments A2-A3 excités avec une lumière à 555nm.

La détection des paramètres cardiaques établie par Klassen et al. est partiellement automatisée (Klassen et al., 2017), et utilise un algorithme permettant de générer un M-mode. L'algorithme détecte automatiquement les parois du tube, et segmente le M-mode en fonction de l'état de contraction du tube (**Figure 25**). En 2021, Georg Vogler, publie un script R qui automatise entièrement le processus de génération des M-mode et de détection de nombreux paramètres cardiaques (**Figure 26**) (Vogler, 2021). Les paramètres cardiaques détectables sont identiques à ceux décrits pour la méthode SOHA, mais l'augmentation de la résolution et de la quantité d'images par seconde permet de détecter avec plus de précision la vitesse de contraction et de relaxation, et la direction de la contraction.

***Optical Coherence Tomography (OCT)***

L'Optical Coherence Tomography (OCT) est une technique de microscopie qui reconstitue une image en 3 dimensions à partir de la mesure d'images en 2 dimensions prises dans deux coupes différentes (Yelbuz et al., 2002). Les images sont réalisées en envoyant une lumière à 1300 nm, qui passe dans les structures à 1-2 mm sous la cuticule, puis sont interprétées par interférométrie. Cette technique non-invasive se rapproche des échographies cardiaques (écho-doppler) utilisées chez l'humain.

Les mouches éveillées sont placées sur un gel avec la face dorsale vers l'objectif. Les segments A1-A3 du cœur sont ensuite mesurés en transversal et en longitudinal à la vitesse de 4000 scans par secondes et des M-modes sont générés à partir d'une image transverse étalée le long de la ligne du temps (Wolf et al., 2006). Cependant, la technique ne permet pas d'avoir une quantité d'images par seconde élevée, rendant ainsi la mesure de la fréquence cardiaque plus imprécise comparé aux méthodes SOHA et tdtk, mais la mesure des diamètres cardiaques est très précise grâce aux images transversales.

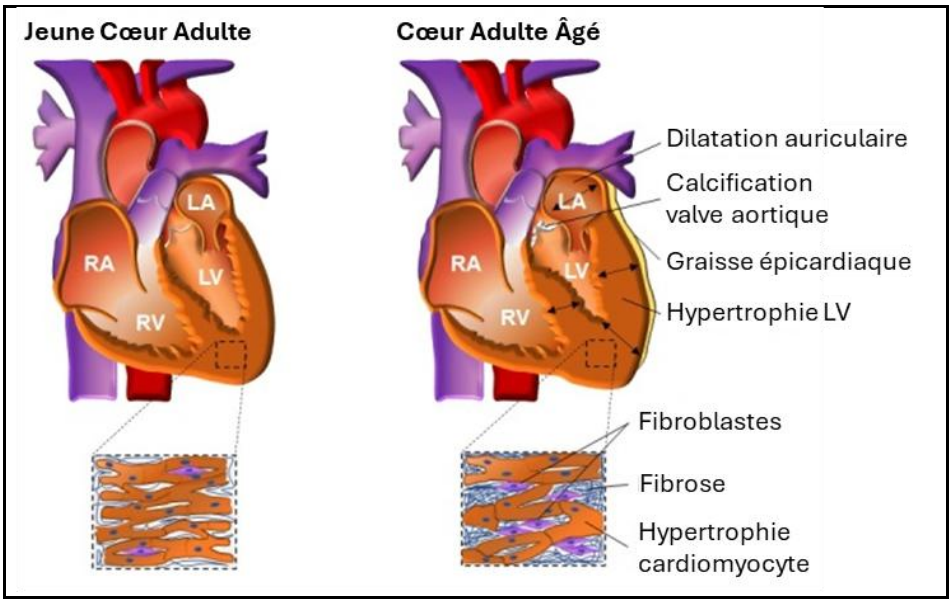



**Figure 27 - Modifications de la structure du cœur humain au cours du vieillissement.** Représentation schématique des modifications de la structure cardiaque et des remodelages du tissu myocardique liés à l'âge. Abréviations : RA = Oreillette Droite, LA = Oreillette Gauche, RV = Ventricule Droit, LV = Ventricule Gauche. *Modifié de (Ribeiro et al., 2023)*.

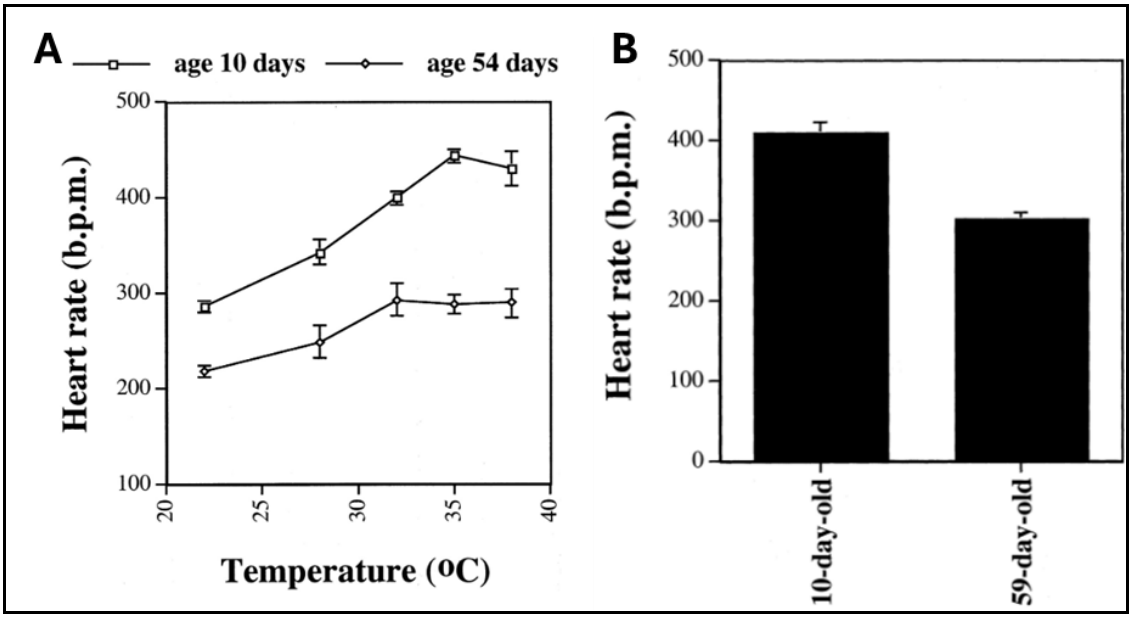



**Figure 28 - Diminution de la réserve cardiaque avec l'âge en condition de stress.** (A) Fréquence cardiaque maximale mesurée sur des drosophiles âgées de 10 ou 54 jours à différentes températures. (B) Fréquence cardiaque maximale mesurée sur des drosophiles âgées de 10 ou 59 jours après stimulation cardiaque imposée. *Source (Paternostro et al., 2001)*.

# Chapitre 2. Le vieillissement cardiaque

Le vieillissement est, au sens large, défini comme le changement progressif des traits physiques, tissulaires ou cellulaires au cours de la vie d'un organisme (da Costa et al., 2016). La recherche s'intéresse principalement aux changements ayant des effets délétères sur un organe, un tissu ou une fonction cellulaire et qui augmentent les risques de maladies et la mortalité (Blice-Baum et al., 2018; da Costa et al., 2016). Cette définition restreinte du vieillissement est celle du terme plus précis de sénescence. Ici, j'utiliserai le terme de vieillissement, au sens de sénescence, puisqu'il s'agit du plus largement répandu dans les publications scientifiques.

## Effets physiologiques

Avec l'âge, le cœur humain subit plusieurs modifications structurales (**Figure 27**) : hypertrophie du ventricule gauche, dilatation des oreillettes, dépôt de graisse épicardique et calcification des valves (Ribeiro et al., 2023). A l'échelle du tissu myocardique, un remodelage est également observé, le nombre de cardiomyocytes diminue, ceux-ci s'hypertrophient et l'augmentation du nombre de fibroblastes dans le tissu induit une fibrose.

Au contraire, chez la drosophile, aucune augmentation de masse ou d'épaisseur du tube cardiaque n'a été rapportée jusqu'à présent, et plusieurs études rapportent même une diminution des diamètres diastoliques et systoliques avec l'âge (Blice-Baum et al., 2018; Cammarato et al., 2008; Cannon et al., 2017; Kaushik et al., 2012; Nishimura et al., 2014). De plus, une hypertrophie des cardiomyocytes, détectée par la mesure de l'épaisseur de la paroi cardiaque, n'a pu être observée qu'après la manipulation génétique chez l'adulte ou la larve d'acteurs de la voie Ras, du couplage excitation/contraction, ou de la RNAse Z (Migunova et al., 2023; Petersen et al., 2022; Yu et al., 2015, 2013).

De façon similaire aux mammifères, l'environnement extracellulaire des cardiomyocytes de la drosophile est modifié avec l'âge. En effet, la matrice extracellulaire se remodèle et change sa composition avec l'âge, avec par exemple une accumulation des protéines Viking et Pericardin, indiquant une fibrose du tube cardiaque (Ribeiro et al., 2023; Sessions and Engler, 2016).

En partie lié aux modifications structurales, la fonction cardiaque chez la drosophile est altérée au cours du vieillissement et ces modifications sont remarquablement conservées entre la drosophile et les mammifères. La première étude du vieillissement cardiaque chez la drosophile en 2001 a permis de démontrer une diminution de la réserve cardiaque similaire à celle observée chez l'humain (**Figure 28**) (Lakatta, 2001; Paternostro et al., 2001). Pour cela les auteurs ont établi deux protocoles de stress afin d'augmenter le rythme cardiaque. Le premier protocole utilise l'augmentation de la température afin d'augmenter le rythme cardiaque, le

deuxième protocole utilise un courant électrique afin de stimuler le cœur à une fréquence choisie afin de déterminer la fréquence cardiaque maximale (Paternostro et al., 2001). Ces deux expériences montrent que chez des drosophiles âgées, la fonction cardiaque est diminuée par rapport aux drosophiles jeunes.

La diminution de la fonction cardiaque avec l'âge est donc conservée entre la drosophile et les mammifères, cependant une différence importante est à noter. Chez les mammifères, au repos, le rythme cardiaque ne change pas ou très faiblement avec l'âge, et c'est uniquement en condition de stress qu'une diminution du rythme cardiaque maximal est observée, en moyenne 0,7 bpm (battements par minute) par an (Ribeiro et al., 2023). En revanche, chez la drosophile, une diminution du rythme cardiaque avec l'âge est observée au repos, qui a été observée dès cette première étude et confirmée par d'autres par la suite (Blice-Baum et al., 2017; Cammarato et al., 2008; Cannon et al., 2017; Fink et al., 2009; Monnier et al., 2012; Ocorr et al., 2007; Paternostro et al., 2001; Wessells et al., 2004).

Depuis cette étude pionnière, d'autres chez la drosophile ont pu démontrer que plusieurs modifications de la fonction cardiaque sont conservées avec les mammifères :

- Augmentation des arythmies et il est décrit qu'elles peuvent être de type asystole ou fibrillation (Blice-Baum et al., 2017; Cammarato et al., 2008; Cannon et al., 2017; Fink et al., 2009; Monnier et al., 2012; Nishimura et al., 2014; Ocorr et al., 2007).
- Diminution de la force de contraction (Blice-Baum et al., 2017; Cammarato et al., 2008; Cannon et al., 2017; Kaushik et al., 2015; Nishimura et al., 2014). Chez les mammifères, malgré cette diminution, des mécanismes de compensation permettent de conserver le volume d'éjection et le débit cardiaque avec l'âge (Ribeiro et al., 2023).
- Enfin, des signes de dysfonction diastolique, notamment l'augmentation de la rigidité myocardique et la diminution de la vitesse de contraction/relaxation, et qui est cohérent avec une diminution de la force de contraction (Blice-Baum et al., 2017; Kaushik et al., 2015, 2012; Nishimura et al., 2014).

Les arythmies et dysfonctions du rythme liées à l'âge sont associées à des dysfonctions du mécanisme de contraction, notamment des canaux ioniques. En effet chez la drosophile, la durée de la phase de dépolarisation, détectée par imagerie de l'influx de calcium, est augmentée avec l'âge (Santalla et al., 2014), et il a été démontré que la mutation des gènes codant pour une sous-unité des canaux calciques voltage-dépendant diminue la fréquence cardiaque et augmente les arythmies avec l'âge (Lam et al., 2018).

Le cycle du calcium dépend également des canaux potassium qui permettent la sortie d'ions potassium de la cellule. L'inhibition de l'expression de deux gènes codant pour des canaux

potassiques dans le cœur provoque un vieillissement cardiaque prématuré (Akasaka et al., 2006; Ocorr et al., 2007). La mutation du le gène *KCNQ*, tout comme son orthologue humain *KCNQ1*, codant pour un canal $K^+$ localisé à la membrane plasmique, diminue le rythme cardiaque et augmente les arythmies et les arrêts cardiaques induits par stress électrique avec l'âge (Ocorr et al., 2007).

Le cycle du calcium n'est pas le seul mécanisme cellulaire modifié au cours du vieillissement cardiaque, d'autres processus ont pu être mis en évidence dans le vieillissement des cardiomyocytes. Cependant, avant de détailler les mécanismes impliqués dans le vieillissement cardiaque, il me semble important d'aborder quelques théories qui ont été avancées sur l'origine de la sénescence cellulaire.

## Théories du vieillissement

20-30% des variations naturelles du vieillissement observé au sein des populations humaines pourraient être expliqués par des facteurs génétiques (Lipsky and King, 2015), et plusieurs mécanismes impliqués ont été identifiés dans de nombreuses études. Ces différents mécanismes ont pendant longtemps été regroupés sous deux groupes de théories expliquant l'origine du vieillissement cellulaire.

Le premier groupe dethéorie, appelée théories génétiques, ou théories du vieillissement programmé, postule que le vieillissement cellulaire est génétiquement déterminé et que les organismes ont une horloge interne qui programme la longévité (Lipsky and King, 2015). Cette théorie est supportée par l'observation de nombreux gènes qui influencent la longévité dans plusieurs organismes. Il est proposé que des gènes du vieillissement contrôlent les processus métaboliques impliqués dans le vieillissement, notamment les voies insuline et TOR (target-of-rapamycin).

Cependant, ce groupe de théories est peu accepté par la communauté scientifique, notamment parce qu'il implique l'existence de gènes menant à la détérioration de l'organisme(da Costa et al., 2016; Lipsky and King, 2015). Au contraire, il apparaît que le vieillissement ne subit pas ou peu de pression de sélection, mais plutôt que la pression de sélection est concentrée sur la survie jusqu'à la maturité reproductive de l'organisme pour assurer la conservation de l'espèce dans le temps, plutôt que la survie de l'individu (Barzilai et al., 2012).

Le second groupe de théories, appelées théories par dommages, ou théories stochastiques, propose que l'accumulation de dommages au cours du temps provoque le vieillissement cellulaire. La nature de ces dommages est multiple, parmi les plus rapportés se trouvent les dommages de l'ADN, le

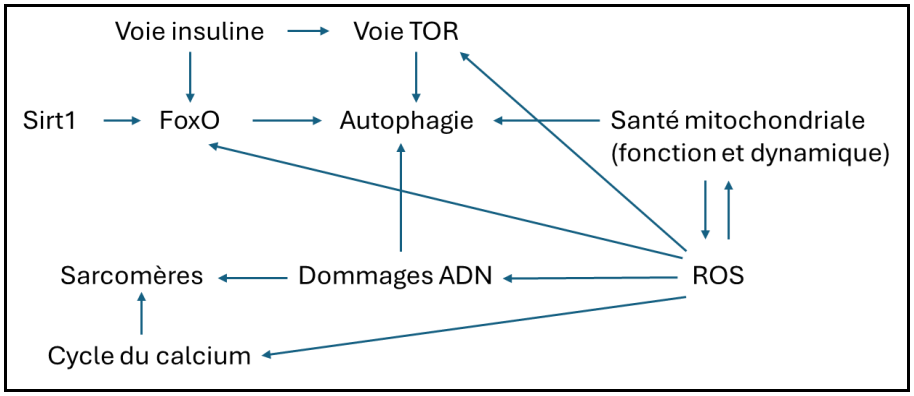



**Figure 29 - Schéma des gènes et mécanismes contribuant au vieillissement cardiaque chez la drosophile.** Abréviations : TOR = Target of Rapamycin, FoxO = Forkhead box, subgroup O, ROS = Espèce Oxygénée Réactive. *Adapté de (Cannon and Bodmer, 2015; Picca et al., 2018)*.

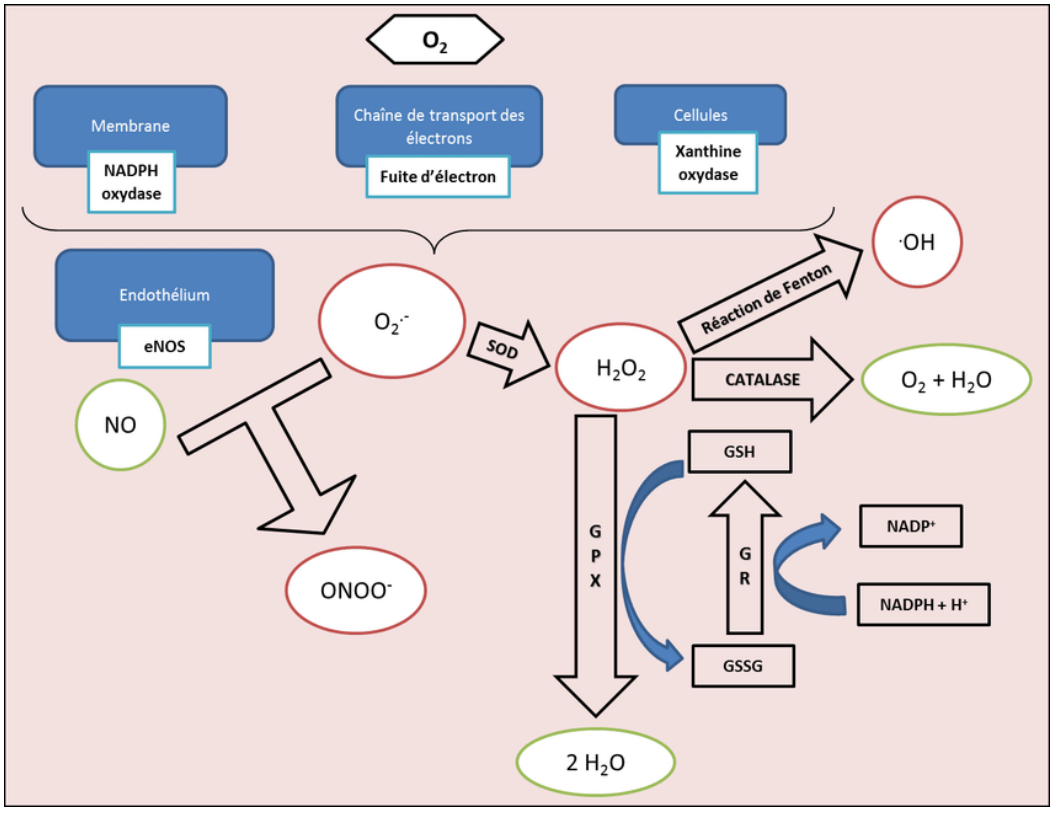



**Figure 30 - Schéma de la production et dégradation des espèces oxygénées réactives.** Les espèces oxygénées (en rouge) sont produites à partir de 3 sources : la NADPH oxydase (Nox), la chaîne respiratoire de la mitochondrie, en particulier la chaîne de transport d'électron, et la Xanthine oxydase. Les espèces réactives oxygénées sont prises en charge par plusieurs enzymes pour être dégradées. Abréviations : NO = Monoxyde d'azote, $O_2^-$ = Anion superoxyde, $ONOO^-$ = Peroxynitrite, $H_2O_2$ = Peroxyde d'hydrogène, OH = Radical hydroxyle, SOD = Superoxide dismutase, GPX = Glutathion peroxydase, GSH = Glutathion, GSSG = Disulfure de glutathion, GR = Glutathion réductase, NADP = Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NADPH = NADP réduite. *Source (Raberin, 2019)*.

stress oxydatif et les dommages mitochondriaux. Il est également proposé que la cellule, au cours du temps, a une capacité amoindrie de réparation de ces dommages, notamment par l'autophagie, entraînant donc un cercle vicieux responsable du vieillissement (Lipsky and King, 2015).

Dans le but de découvrir les mécanismes responsables du vieillissement cardiaque, plusieurs cribles génétiques et études transcriptomiques ont été réalisés chez la drosophile (Blice-Baum et al., 2017; Cannon et al., 2017; Monnier et al., 2012). Ils ont permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes cellulaires impliqués dans le vieillissement cardiaque : stress oxydatif et dysfonctions mitochondriales associées, protéostasie, fibrose liée à la matrice extracellulaire, et plusieurs voies de signalisation comme la voie insuline et la voie TOR. Ces résultats montrent une conservation des processus de vieillissement cellulaire dans le cœur et leur étude chez la drosophile pourrait permettre de mieux comprendre la part de facteurs génétiques impliqués.

Le vieillissement est un processus complexe impliquant de nombreuses voies cellulaires et moléculaires interconnectées et décrire chaque processus précisément est un véritable défi (Cannon and Bodmer, 2015; Picca et al., 2018). Ce manuscrit n'a pas pour ambition de décrire chaque voie impliquée dans le vieillissement cardiaque, mais de donner une vue générale des processus impliqués chez les mammifères et la drosophile et de ne se focaliser que sur quelques-uns (**Figure 29**).

# Processus cellulaires du vieillissement cardiaque

## *Effet des ROS*

Les ROS sont des radicaux libres instables et capables d'interagir avec d'autres molécules. Un mécanisme du vieillissement proposé est l'accumulation dans le temps des ROS et leurs effets délétères sur la cellule qui induisent les pathologies associées au vieillissement (Harman, 1956). Plusieurs études ont montré que les ROS sont impliqués dans les CVD, et ont un effet important sur le vieillissement cardiaque (Yan et al., 2021).

Les trois principaux ROS sont l'anion superoxyde ($O_2^-$), le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$) et le radical hydroxyle (OH). Ils sont produits par plusieurs sources dans la cellule, notamment la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) oxydase (Nox) localisée à la membrane plasmique, la monoamine oxydase (MAO) et la chaîne respiratoire mitochondriale par la fuite d'électrons (**Figure 30**) (Raberin, 2019).

Les acteurs impliqués dans la génération de ROS et leur dégradation sont conservés chez les mammifères et la drosophile. Chez les mammifères, la surproduction de ROS au cours du vieillissement par Nox2 et MAO, deux protéines qui contribuent à la formation de $O_2^-$ et de $H_2O_2$,

est associée à des dysfonctions cardiaques (Villeneuve et al., 2013; Wang and Shah, 2015). Cette surproduction de ROS modifie l'activité de plusieurs voies cellulaires, notamment le contrôle du flux calcique au cours de la contraction (Kozai et al., 2014), l'induction de la voie TGF-beta/Smad (Lyu et al., 2018), et l'inhibition de la voie TOR par l'oxydation de certains de ses acteurs induisant une diminution de l'autophagie (Oka et al., 2017; Shao et al., 2014).

En comparant des données de transcriptome cardiaque sur des drosophiles jeunes (10 jours) et âgées (40 jours), un enrichissement en gènes également surexprimés en condition de stress oxydatif a été observée (Monnier et al., 2012). Cet article démontre également que la manipulation génétique du gène *catalase*, codant pour un antioxydant permettant la dégradation du $H_2O_2$, régule le vieillissement cardiaque. La surexpression de ce gène atténue le vieillissement cardiaque chez la souris et la drosophile. Chez des souris âgées, cette préservation passe par une diminution de l'accumulation de protéines mitochondriales oxydées et une augmentation de la fraction d'éjection (Dai and Rabinovitch, 2009). Chez les drosophiles âgées, la surexpression de la *catalase* augmente la fréquence cardiaque et diminue les arythmies (Monnier et al., 2012).

De plus, le facteur de transcription Nrf2, qui régule l'expression de gènes antioxydants, y compris *catalase-1* et *SOD1 (superoxyde dismutase 1)* chez les mammifères est associé à une augmentation des risques de CVD avec l'âge (Chen and Maltagliati, 2018). Chez la drosophile, l'implication de Nrf2 a été mise en évidence dans un modèle de dysfonctions cardiaques liées à l'âge induit par la mutation de LamC, un gène codant pour une lamine (Bhide et al., 2018). Dans ce modèle, l'inhibition cœur-spécifique de l'expression de *CncC* (Cap-n-collar C, orthologue de Nrf2) n'a pas d'effet sur la fonction cardiaque, cependant, en combinaison avec le mutant *LamC*, elle permet de restaurer la fonction cardiaque. Bien qu'aucune modification de la quantité de ROS n'ait été observée dans leur modèle, les auteurs émettent l'hypothèse que la translocation de CncC dans le noyau induit la surexpression de gènes antioxydants. Selon les auteurs, cette surproduction d'antioxydant pour compenser la surproduction de ROS, finit par épuiser le système antioxydant, et les ROS s'accumulent à nouveau et provoquent des défauts qui ne peuvent alors être pris en charge que par une augmentation de l'autophagie (Bhide et al., 2018).

De façon intéressante, chez la drosophile, un mécanisme de régulation de la fonction cardiaque par les ROS au cours du vieillissement cardiaque a été mis en évidence dans les cellules péricardiaques. En effet, l'induction de ROS par l'inhibition uniquement dans les cellules péricardiaques de l'expression du gène *catalase* induit une augmentation des arythmies chez des drosophiles jeunes (7 jours) et âgées (28 jours), alors que l'induction de ROS dans les cellules péricardiaques et les cardiomyocytes n'a aucun effet sur les arythmies chez des mouches jeunes (Lim et al., 2014; Monnier et al., 2012).

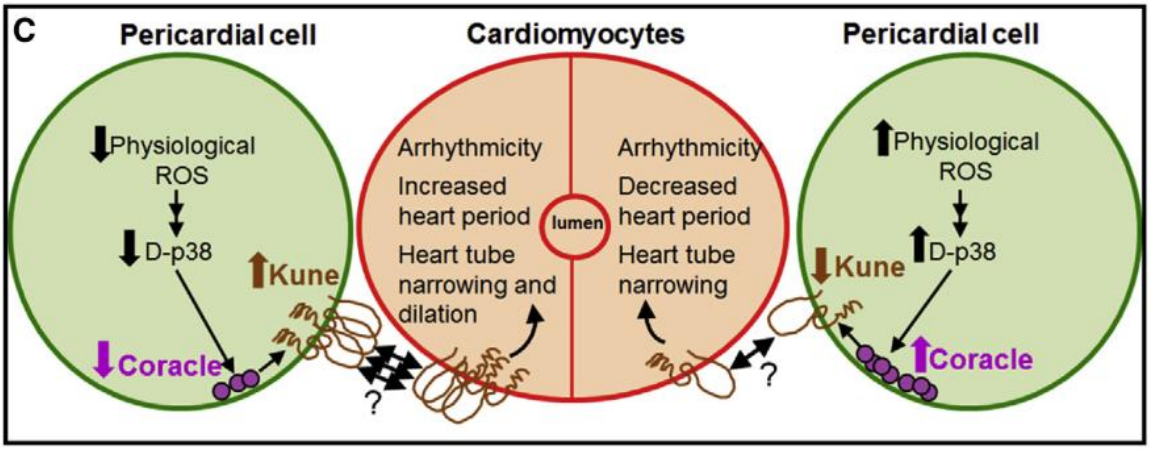



**Figure 31 - Modèle de l'effet des ROS dans les cellules péricardiaques et leur impact sur les cardiomyocytes.** Abréviations : ROS = Espèces oxygénées réactives, Cora = Coracle. *Source (Lim et al. 2019)*.

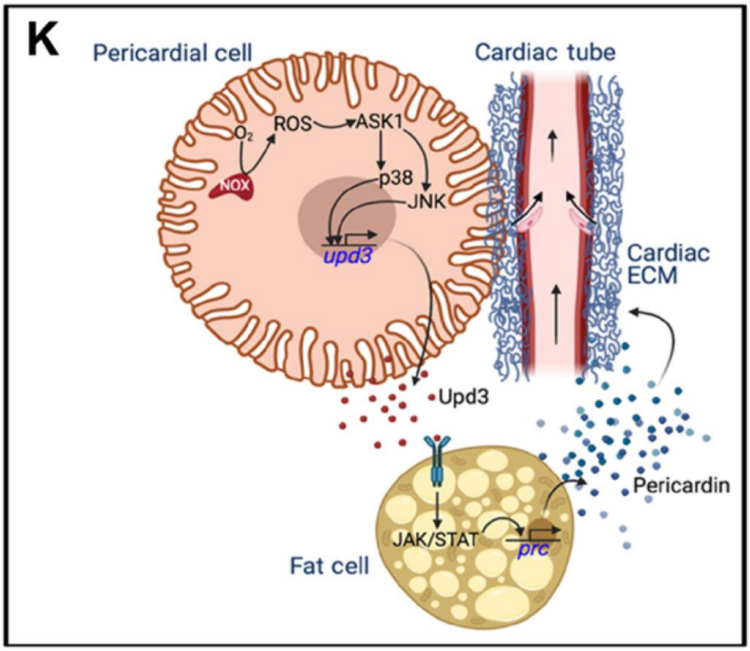



**Figure 32 - Modèle de communication entre les cardiomyocytes, les cellules péricardiaques et le corps gras.** Les cellules péricardiaques et le corps gras régulent la fonction des cardiomyocytes en contrôlant le dépôt de Pericardine (prc), composant de la matrice extracellulaire. Les flèches indiquent la direction du flux d'hémolymphe dans le tube cardiaque. *Source (Gera et al., 2022)*.

De façon étonnante, l'inhibition de la quantité de ROS par la surexpression du gène *catalase* spécifiquement dans les cellules péricardiaques a le même effet au cours du vieillissement que l'inhibition du gène *catalase* (Lim et al., 2014). Une régulation fine de la quantité de ROS par les cellules péricardiaques semble donc nécessaire à la fonction cardiaque au cours du vieillissement, et deux études proposent un modèle du mécanisme impliqué (Lim et al., 2019, 2014). Ce modèle suggère que la production de ROS dans les cellules péricardiaques régule l'abondance de la protéine transmembranaire Kune à leur surface. Par un mécanisme encore inconnu, la quantité de Kune à la surface des cardiomyocytes est influencée par celle présente sur les cellules péricardiaques. Cette variation de l'expression de Kune sur les cardiomyocytes impacte ensuite la physiologie cardiaque, par un mécanisme également inconnu, soulignant l'importance d'un équilibre précis de son expression, orchestré par les cellules péricardiaques (**Figure 31**).

Une autre étude montre également que dans les cellules péricardiaques, la voie p38 induit l'expression d'*upd3*, codant pour un ligand capable de se fixer à un récepteur des cellules du corps gras entourant le tube cardiaque. Le modèle propose que ce signal active la voie JAK/STAT qui en réponse active l'expression de *pericardin*, une protéine de la matrice extracellulaire qui s'accumule ensuite autour du tube cardiaque (**Figure 32**) (Gera et al., 2022). L'accumulation de Pericardin autour du cœur a par ailleurs déjà été associée à une détérioration du vieillissement cardiaque avec une augmentation des arythmies, et une diminution du rythme cardiaque, alors que la diminution de l'accumulation de Pericardin améliore le vieillissement cardiaque (Bouska and Bai, 2021; Vaughan et al., 2018).

Chez la drosophile, il semble donc que le rôle des ROS sur la régulation de la fonction cardiaque au cours du vieillissement soit en partie lié à une action paracrine des cellules péricardiaques et du corps gras, deux types cellulaires sécréteurs. Chez les mammifères, plusieurs études pointent vers l'importance de la communication entre cellules endothéliales, constituants de l'endocarde, et cardiomyocytes, et en particulier il a pu être mis en évidence que les ROS produits par les deux types cellulaires impactent la fonction cardiaque, bien que le mécanisme de communication ne soit pas clair (Zhang and Shah, 2014).

Compte tenu de l'importance d'un faible niveau de ROS dans le maintien des fonctions cellulaires au cours du vieillissement, de nombreuses études ont exploré l'utilisation d'antioxydants dans le but de prévenir, voire d'inverser, le vieillissement cardiaque. Cependant, la diminution des ROS par des détoxifiants est souvent inefficace voire néfaste dans le contexte des CVD (Kornfeld et al., 2015). De plus, les ROS en faible quantité sont nécessaires à la fonction cellulaire dont la protection contre les dommages cellulaires, dans le cas de la *mitohormesis*. Cette théorie élaborée en 2006 définit la réponse hormétique, c'est-à-dire une stimulation à

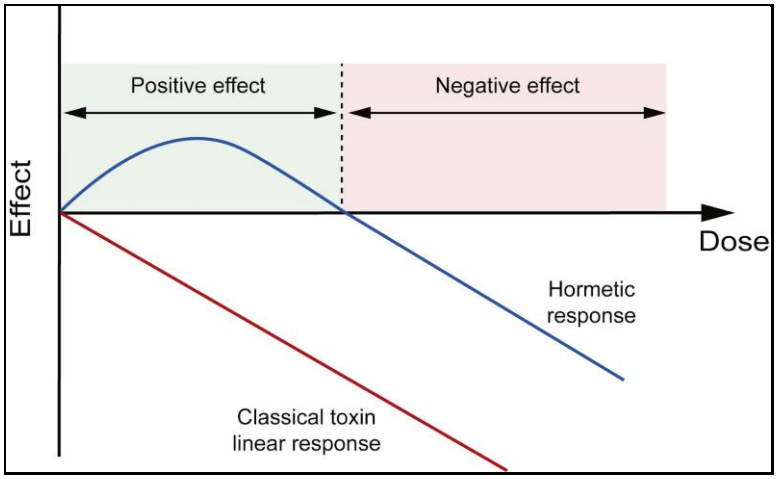



**Figure 33 - Modèle de la réponse hormétique.** Dans le modèle classique de la réponse aux toxines, une augmentation progressive de la dose de toxine entraîne une réponse linéaire entre la dose et ses effets (par exemple, toxicité ou mortalité) représentée par la ligne rouge. L'hormésis se caractérise par une réponse non linéaire (ligne bleue) où de faibles doses ont un effet bénéfique, mais des doses plus élevées ont un effet négatif. *Source (Bárcena et al. 2018)*.

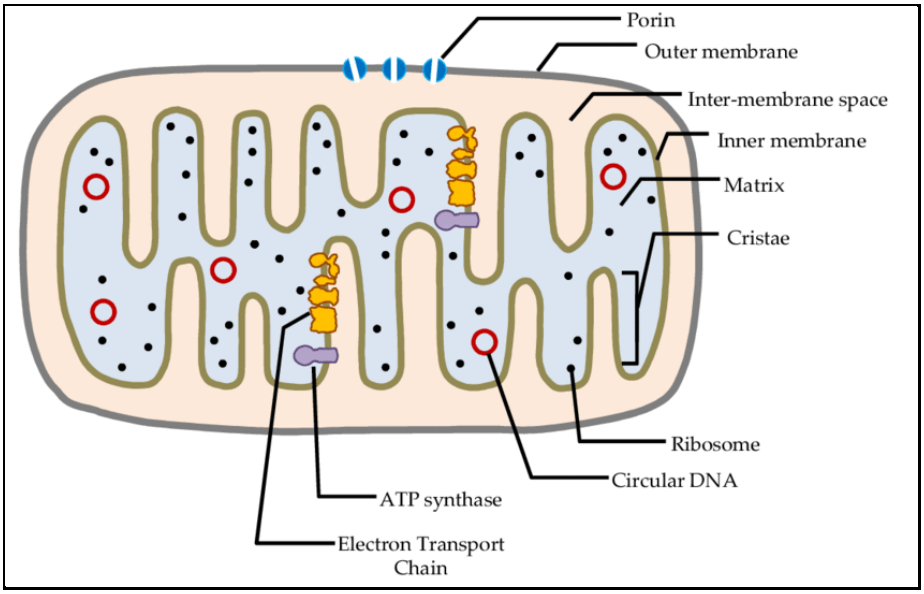



**Figure 34 - Schéma de la structure de la mitochondrie.** *Source (Mohamed Yusoff, 2015)*.

faible dose et une inhibition à haute dose, d'un stress mitochondrial permettant une meilleure santé cellulaire (**Figure 33**). Par exemple, chez le nématode, la restriction du glucose dans l'alimentation améliore la durée de vie et induit une augmentation des ROS et une suractivation de la catalase, ainsi qu'une suractivation de la respiration mitochondriale (Bárcena et al., 2018). Les ROS et la mitochondrie semblent donc interagir au cours du vieillissement cardiaque.

## *Effet de la mitochondrie*

### ***Fonction mitochondriale***

La mitochondrie, source de 90% de l'ATP nécessaire à la fonction du cardiomyocyte, est associée au vieillissement cardiaque. La mitochondrie est un organelle à deux membranes, une membrane externe et une membrane interne invaginée pour former des cristae, séparées par un espace intermembranaire. Dans les cristae, à la membrane interne se trouve la chaîne respiratoire (Electron Transport Chain - ETC), productrice d'énergie grâce à l'activité de l'ATP synthase. Dans la matrice mitochondriale, les ribosomes et l'ADN mitochondrial (ADMmt) permettent la production de protéines mitochondriales (**Figure 34**) (Mohamed Yusoff, 2015).

Plusieurs études, dans le cœur du rat et de la souris, détaillent la modification de la structure de la mitochondrie avec l'âge à l'aide d'images de microscopie électronique (El'darov et al., 2015; Vue et al., 2023). Dans ces deux modèles, la taille de la mitochondrie diminue avec l'âge et la densité des cristae par mitochondrie diminue chez des rongeurs âgés. Cependant, des études précédentes n'ont pas observé ces mêmes phénotypes (Xie et al., 2023).

La fonction primordiale de la mitochondrie pour le cardiomyocyte est la production d'ATP par l'ETC. Située à la membrane interne des cristae de la mitochondrie, les complexes I à IV de la chaîne respiratoire permettent les échanges de protons H+ de la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire afin de permettre à l'ATP synthase, aussi appelée complexe V, de produire de l'ATP par le passage de protons de l'espace intermembranaire à la matrice (**Figure 35**). Au cours du vieillissement, l'activité de ces complexes diminue, et notamment l'activité de l'ATP synthase est négativement corrélée avec le vieillissement (Xie et al., 2023). Chez la drosophile, des données de transcriptome montrent un enrichissement en gènes de la chaîne respiratoire parmi les gènes sous-exprimés dans le cœur avec l'âge (Monnier et al., 2012), impliquant donc une diminution de son activité avec l'âge.

La diminution de l'activité mitochondriale est accompagnée d'une réduction de NAD+ (Nicotinamide adenine dinucleotide), produite par le complexe I de l'ETC, compromettant la fonction des sirtuines, une famille de protéines régulant négativement la sénescence. Chez la souris et la drosophile, la surexpression de NAD+ améliore le vieillissement cardiaque, montrant

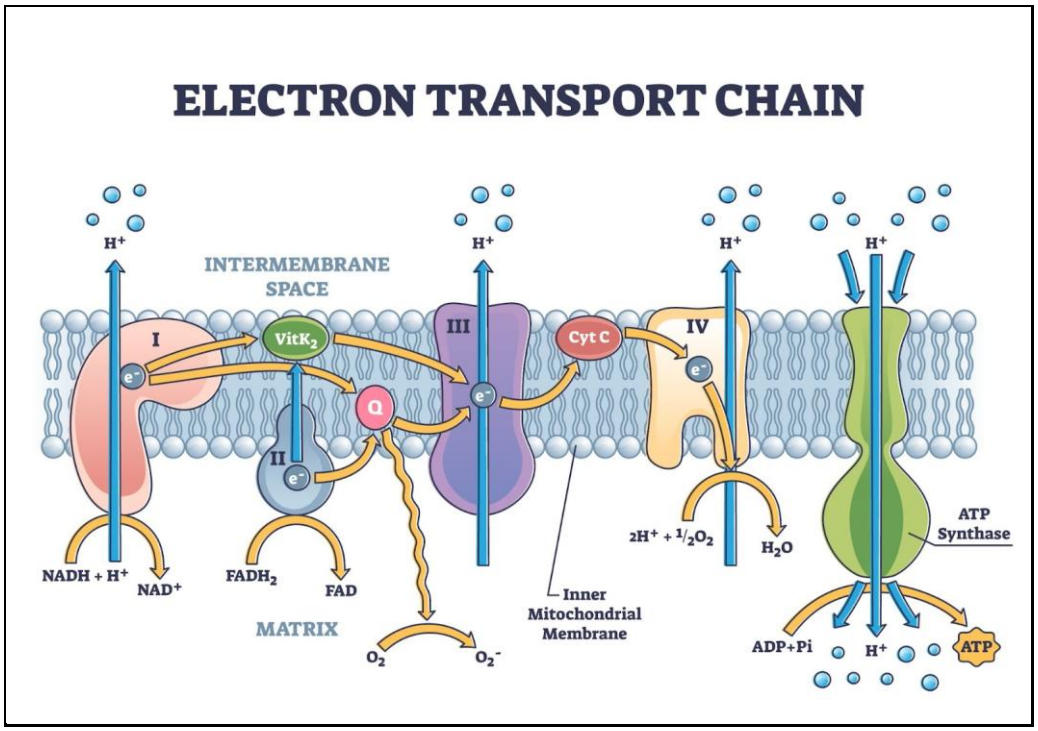



**Figure 35 - Complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.** La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de 5 complexes localisés à la membrane interne de la mitochondrie. Les complexes I à IV, ainsi que les coenzymes quinone co-enzyme Q10 (Q) et Cytochrome C (Cyt C) permettent la sortie d'ions H+ vers l'espace intermembranaire de la mitochondrie, qui sont nécessaires à l'activité du complexe V, aussi appelé ATP synthase. Les flèches bleues indiquent le transfert d'ions $H^+$ par les différents complexes, et les flèches jaunes les transferts d'électrons et les produits des différents complexes. *Source : (https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-chaine-respiratoire-2029/, consulté le 14/10/24).*

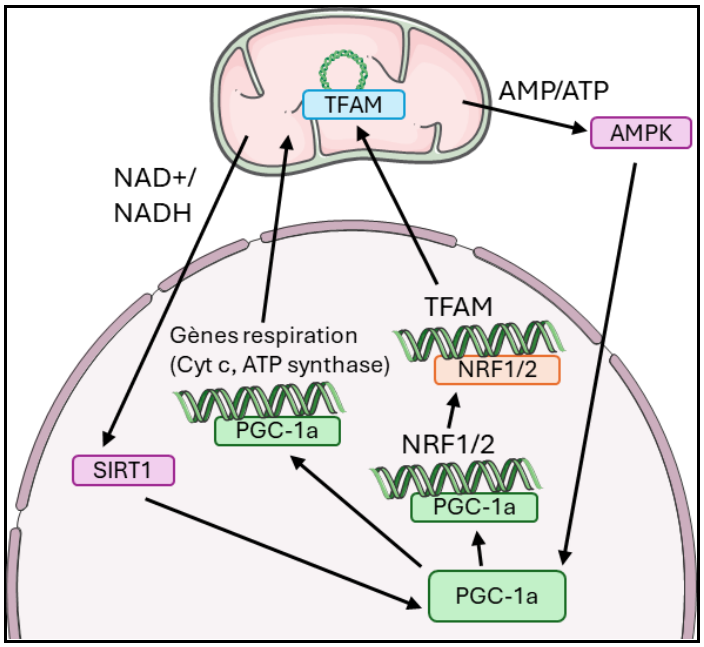



**Figure 36 - PGC-1a régule transcriptionnellement les gènes de l'homéostasie mitochondriale.** Abréviations : TFAM = mitochondrial transcription factor A, NRF = nuclear respiratory factor, PGC-1a =

ainsi la conservation du rôle de la mitochondrie sur la sénescence cardiaque (Blice-Baum et al., 2018; Xie et al., 2023; Yan et al., 2021).

La famille des Sirtuines est une large famille de déacétylases utilisant le NAD+, dont 2 membres, SIRT1 et SIRT3, jouent un rôle cardioprotecteur au cours du vieillissement. SIRT1 est majoritairement localisé dans le noyau et active des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique (notamment la glycolyse et le cycle des acides gras). SIRT3 est localisé à la matrice mitochondriale et joue un rôle de senseur de NAD+ afin de réguler l'activité mitochondriale et la production d'ATP par l'ETC. La surexpression de SIRT3 diminue la fibrose et l'hypertrophie cardiaque induite par un traitement à l'Angiotensine 2 chez la souris (Xie et al., 2023).

En résumé, la mitochondrie joue un rôle central dans le vieillissement cardiaque. Elle produit l'énergie sous forme d'ATP pour le cardiomyocyte, et elle est régulée par les protéines sirtuines, qui régulent en parallèle le métabolisme énergétique de la cellule. La mitochondrie est également sensible aux dommages induits par les ROS, qu'elle contribue à produire, notamment les dommages ADNmt. Dans des cellules à longue durée de vie telles que les cardiomyocytes, le renouvellement des mitochondries est donc essentiel, et donc la biogenèse, la mitophagie et la dynamique mitochondriales ont été étudiées au cours du vieillissement.

***Biogenèse mitochondriale***

La biogenèse mitochondriale est définie comme la croissance et la division des mitochondries existantes et requiert l'expression coordonnée de gènes mitochondriaux et nucléaires. Au cours du vieillissement cardiaque, la biogenèse mitochondriale augmente en réponse aux dommages oxydatifs et est donc considérée comme un mécanisme de réparation (Quan et al., 2020). Détaillé dans la **Figure 36**, trois facteurs de transcription nucléaires contrôlent la biogenèse mitochondriale : NRF (nuclear respiratory factor), PGC-1a (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha) et TFAM (transcription factor A) (Wang et al., 2023). PGC-1a est activé notamment par la désacétylation par les sirtuines pour activer la transcription de *nrf*. PGC-1a et NRF sont ensuite capables de former un complexe pour induire l'expression de *tfam*. En parallèle, ces deux facteurs de transcription régulent l'expression de gènes nucléaires impliqués dans la chaîne respiratoire notamment. TFAM transloque ensuite dans la mitochondrie pour contrôler l'expression des gènes mitochondriaux (Quan et al., 2020).

PGC-1a est considéré comme un régulateur majeur de la biogenèse mitochondriale, cependant son rôle au cours du vieillissement semble contradictoire. Dans un modèle de souris transgénique permettant la surexpression cœur-spécifique et temps-spécifique, la surexpression de PGC-1a dans des souris tout juste nées permet d'augmenter la biogenèse mitochondriale, mais avec l'âge la surexpression de PGC-1a augmente les dysfonctions

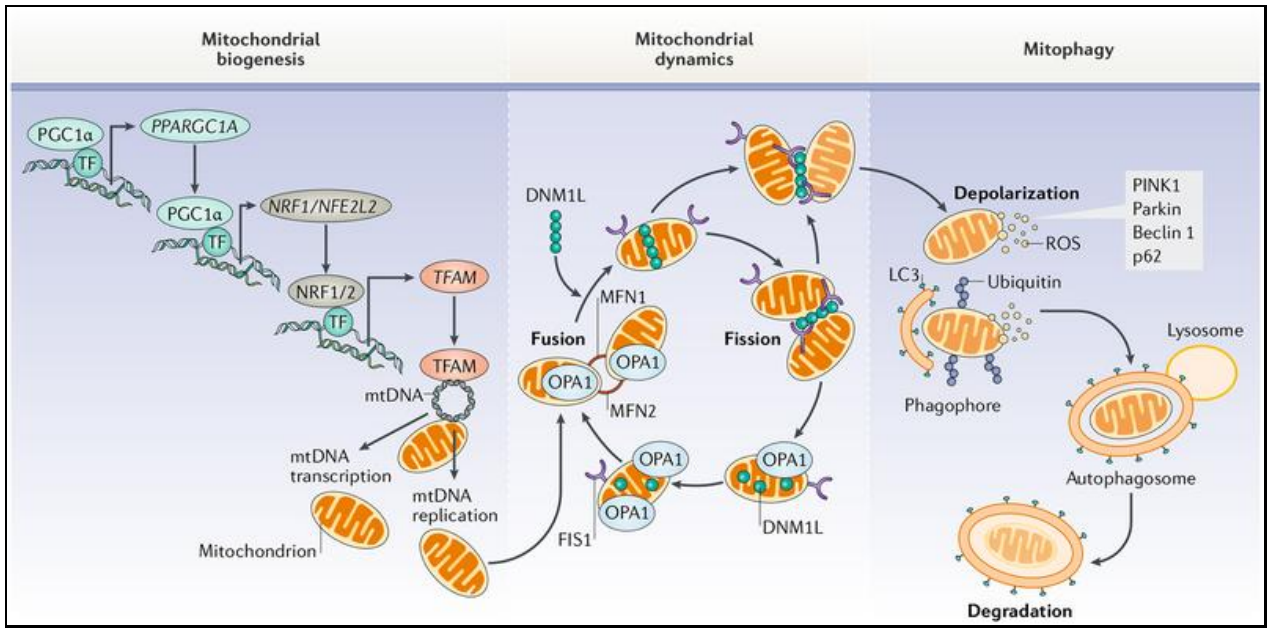



**Figure 37 - Voies de contrôle de la qualité des mitochondries.** L'homéostasie mitochondriale est assurée par la coordination de la biogenèse mitochondriale, de la dynamique et de l'autophagie. L'augmentation de PGC1a (proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1a) active la transcription de TFAM (mitochondrial transcription factor A). Le TFAM est ensuite importé dans les mitochondries par la machinerie d'importation des protéines et atteint sa destination finale sur l'ADN mitochondrial (ADNmt). Là, TFAM augmente l'expression des gènes codant pour les sous-unités de la chaîne de transport des électrons, ce qui entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène, de la synthèse d'ATP et du contenu mitochondrial. Les changements dans la morphologie mitochondriale sont sous le contrôle des protéines de fusion (MFN1, MFN2, OPA1) et de fission (DNM1L, FIS1). Les composants mitochondriaux sont finalement recyclés par une voie autophagique spécialisée, connue sous le nom de mitophagie. Abréviations : MFN=Mitofusin, OPA1=Optic Atrophy Protein 1, DNML1=dynamin 1-like protein, FIS1=fission 1, LC3=Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta, NRF=Nuclear respiratory factor, ROS=Espèces oxygénées réactives. *Source (Picca et al., 2018)*.

mitochondriales et le développement de cardiomyopathies (Russell et al., 2004). En revanche, l'induction de l'expression de PGC-1a par l'exercice dans un modèle de souris au vieillissement rapide, induit par des dysfonction mitochondriales, améliore la fonction mitochondriale et diminue l'apoptose dans le cœur (Safdar et al., 2011). La surexpression de l'orthologue de PGC-1a chez la drosophile, Spargel, améliore la résistance aux arrêts cardiaques induits par un courant électrique chez des mouches jeunes. En revanche, cette surexpression chez des mouches âgées ayant effectué un protocole d'exercice pendant 3 semaines, consistant en une série de 5 jours de grimpe répétée le long du tube, induit une meilleure résistance aux arrêts cardiaques (Tinkerhess et al., 2012).

Le rôle de PGC-1a dans la régulation du vieillissement cardiaque reste donc encore à étudier afin de mieux comprendre ses fonctions âge-dépendantes, mais ceci montre que la biogenèse mitochondriale est importante pour le vieillissement cardiaque.

***Dynamique mitochondriale***

Les mitochondries fusionnent et se fragmentent de façon dynamique, permettant une adaptation à leur environnement. Ces processus modifient la structure des mitochondries, qui sont plutôt sphériques et petites en cas de fission, et allongées et tubulaires en cas de fusion. Dans la cellule, la balance entre fusion et fission est essentielle au contrôle de la qualité des mitochondries (**Figure 37**) (Picca et al., 2018). La fusion d'une mitochondrie endommagée avec une mitochondrie saine peut favoriser sa réparation et limiter l'accumulation de mutation de l'ADNmt. En revanche, lors de dégâts trop importants, la fission permet d'éliminer les organites endommagés (Ikeda et al., 2014).

Cette balance dynamique de la mitochondrie est médiée par différentes GTPases. Opa1 (Optic atrophy 1), Mfn1 (Mitofusin 1) et Mfn2 induisent ensemble la fusion des mitochondries, et DNM1L (Dynamin 1 like, aussi nommée Drp1, pour Dynamin-related protein 1) promeut la fission des mitochondries. Cette balance fusion/fission est nécessaire à l'adaptation pour répondre aux stress, et il est donc intéressant d'étudier ces mécanismes au cours du vieillissement cardiaque (Ikeda et al., 2014).

Plusieurs études réalisées par le même laboratoire illustrent le rôle de la dynamique mitochondriale chez la souris. Elles utilisent un transgène inductible de façon temps et cœur-spécifique afin de réguler l'expression des gènes *Dnm1L/Drp1*, *Mfn1* et *Mfn2* dans les cardiomyocytes des souris adultes (Gong et al., 2015; Song et al., 2015, 2017). Les auteurs démontrent que la surexpression de *Dnm1L/Drp1* pendant toute la vie de la souris induit la fragmentation des mitochondries mais n'induit pas de dysfonction cardiaque (Song et al.,

2015), et de même pour la surexpression de Mfn2, les mitochondries sont davantage fusionnées mais cela n'induit pas de dysfonction (Song et al., 2017). Au contraire, la délétion de *Dnm1L/Drp1*, ou la double délétion de *Mfn1/Mfn2* altère la fonction cardiaque et diminue la longévité des souris (Song et al., 2015). Enfin, de façon remarquable, la délétion simultanée de *Drp1/Dnm1L*, *Mfn1* et *Mfn2* sauve partiellement la fonction cardiaque malgré une hypertrophie cardiaque et améliore la survie des individus (Song et al., 2017).

Ces études mettent en avant une balance intéressante où l'équilibre entre fusion et fission n'est pas nécessairement le plus important pour les cardiomyocytes, puisqu'aucune dysfonction cardiaque n'est observée lorsque les mitochondries sont davantage fusionnées ou fragmentées comparé à la condition contrôle. Au contraire, il semble que la capacité à être dynamique soit le mécanisme le plus important pour la santé mitochondriale, comme le suggèrent les résultats des délétions de protéines impliquées dans la fusion et la fission.

***Mitophagie et autophagie***

Les mitochondries endommagées au-delà de toute réparation sont éliminées par macro-autophagie, une forme spécialisée d'autophagie qui a pour but d'éliminer les composants cytoplasmiques endommagés, généralement en réponse à un stress comme le stress oxydatif, en les encapsulant dans un autophagosome pour ensuite détruire le contenu grâce au lysosome. L'initiation de l'autophagie est régulée négativement par la voie TOR et en particulier le complexe TORC1, et est régulée positivement par AMPK (AMP-activated protein kinase) (Miyamoto, 2019).

La dégradation de la mitochondrie par autophagie, aussi appelée mitophagie (**Figure 37, droite**), est médiée par PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) et Parkin. En réponse à une dépolarisation de la membrane mitochondriale, PINK1 s'accumule à la membrane externe de la mitochondrie et recrute Parkin. Parkin est une protéine E3 ubiquitine-ligase qui, en réponse à sa phosphorylation induite par Pink1, polyubiquitine des protéines mitochondriales qui sont reconnues par l'autophagosome. Une deuxième voie non canonique indépendante de PINK1 et Parkin permet également d'activer la mitophagie, mais pour cette introduction je me concentrerai sur la voie canonique (Miyamoto, 2019).

La diminution de l'autophagie (et donc de la mitophagie) avec l'âge est admise par la communauté scientifique (Wang et al., 2019), cependant, la manipulation génétique de gènes clés montre des effets contradictoires. En effet, la mutation de *Parkin* chez la souris montre une fonction mitochondriale normale dans les cardiomyocytes. Cependant, elles sont désorganisées et plus petites qu'en condition contrôle (Kubli et al., 2013). Au contraire, la surexpression de *Parkin* (induite par l'inhibition de son répresseur *p53*) augmente la mitophagie et améliore la santé mitochondriale tout en améliorant la fonction cardiaque avec l'âge (Hoshino et al., 2013).

De même, la mutation de *Atg5* (Autophagy-related gene 5), protéine impliquée dans la formation de l'autophagosome, chez la souris augmente les dysfonctions cardiaques, et notamment altère le cycle du calcium, et les mitochondries sont désorganisées et dysfonctionnelles, augmentant le stress oxydatif (Ljubojević-Holzer et al., 2021). Au contraire, la potentialisation de l'autophagie par la surexpression d'Atg5 diminue la fibrose cardiaque liée à l'âge (Pyo et al., 2013).

L'autophagie est une cible thérapeutique courante pour améliorer la fonction cardiaque, par exemple, l'utilisation de la rapamycine, un inhibiteur de la voie TOR, ou du revastrol, activateur de la voie AMPK, augmente l'autophagie et améliore la fonction cardiaque avec l'âge (Ren and Zhang, 2018). Il apparaît donc que l'autophagie est une piste de traitement thérapeutique du vieillissement cardiaque, cependant les mécanismes sous-jacents de la balance fine permettant l'action bénéfique de l'autophagie restent encore à explorer.

### *Liens entre métabolisme et vieillissement*

Depuis plusieurs années, les pistes thérapeutiques privilégiées afin de préserver la santé cardiaque, et le vieillissement cardiaque, impliquent la modification du mode de vie des individus. En effet, le mode de vie influe grandement sur le métabolisme, et comme j'ai pu le préciser dans le Chapitre 1, les facteurs comportementaux sont des facteurs de risques majeurs des CVD. Il apparaît alors intéressant de mieux comprendre les liens entre métabolisme et vieillissement cardiaque.

L'activité physique et un mode de vie plus sain sont des recommandations contre les CVD, notamment en lien avec le vieillissement. Plusieurs études dans divers modèles et cohortes ont démontré que l'activité physique permet d'améliorer la fonction cardiaque. Moléculairement, l'activité physique augmente l'expression de PGC-1a et SIRT1 et SIRT3 dans les cardiomyocytes, suggérant une amélioration de la fonction mitochondriale et une diminution du stress oxydatif dans plusieurs modèles animaux, dont la drosophile (Cannon et al., 2017; Wang et al., 2019).

De nombreuses études ont été réalisées sur l'alimentation et son impact sur la fonction cardiaque, en particulier les régimes alimentaires riches en gras ou en sucre, favorisant l'obésité qui est un facteur de risque des maladies cardiovasculaires. Ces effets sont médiés par deux voies de signalisation sensibles aux nutriments : la voie insuline et la voie TOR dont le rôle sur la fonction cardiaque a extensivement été étudiée chez les mammifères et la drosophile (Blice-Baum et al., 2018; Cannon et al., 2017; Miyamoto, 2019; Xie et al., 2023; Yan et al., 2021). Une piste thérapeutique étudiée pour améliorer le vieillissement cardiaque est la restriction calorique. Il s'agit d'une diminution de la quantité de calories consommées par l'alimentation

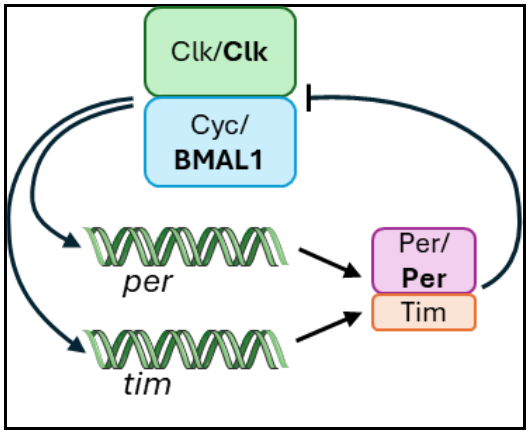



**Figure 38 - Les protéines de la boucle du rythme circadien dans les neurones.** Le rythme circadien dépend d'une boucle de régulation centrée autour de Clk (Clock) et Cyc/BMAL1 qui est conservée chez la drosophile et les mammifères. La protéine orthologue chez les mammifères est indiquée en gras. Abréviations : Cyc = Cycle, Per = Period, Tim = Timeless. *Adapté de (Patke et al., 2020)*.

sans atteindre la malnutrition, et ce régime alimentaire augmente l'autophagie par le biais de la voie TOR, et indirectement de la voie insuline, qui active la voie TOR (Blice-Baum et al., 2017; Picca et al., 2018; Wang et al., 2019; Yan et al., 2021).

## Interaction entre le rythme circadien et le vieillissement cardiaque

Les fonctions cardiovasculaires varient en fonction du moment de la journée. Par exemple, le rythme et la contractilité cardiaque diminuent pendant la phase de sommeil, comparé à la phase d'éveil chez l'humain (Martino and Young, 2015). L'horloge circadienne chez les mammifères est contrôlée par le noyau suprachiasmatique localisé dans l'hypothalamus et réagit aux stimuli lumineux reçus par la rétine (Roth et al., 2023). Un exemple intéressant de disruption de l'horloge circadienne est le cas des travailleurs de nuit, dont les horaires sont à contre-courant de l'horloge circadienne normale pour l'humain. Chez ces travailleurs, il a été rapporté un risque plus important de maladies cardiaques et maladies coronariennes (Martino and Young, 2015). Chez la drosophile, un petit groupe de cellules induisant le rythme, appelés neurones circadiens, dans le cerveau contrôlent l'horloge circadienne, également sous le contrôle de la lumière (Patke et al., 2020).

D'un point de vue moléculaire, l'horloge circadienne chez les mammifères et la drosophile est très conservée. En effet, elle repose sur une boucle de rétro-action transcriptionnelle-traductionnelle (**Figure 38**). Chez la drosophile Period (Per) et Timeless (Tim) sont deux facteurs de transcription formant un complexe capable d'inhiber la transcription de *clock* (*clk*) et *cycle* (*cyc*), deux facteurs de transcription activateurs de l'expression de *per* et *tim*. Chez les mammifères, c'est le complexe Per/Cry (Cryptochrome) qui inhibe le complexe Clk/Bmal1 (Bmal1 est l'orthologue de Cycle), eux-mêmes activateurs de l'expression de *per* et *cry*. Dans les neurones circadiens, l'horloge moléculaire permet la régulation de nombreux processus, notamment l'éclosion, l'alimentation ou la reproduction (Patke et al., 2020).

Au cours du vieillissement, chez les mammifères, il y a une désynchronisation de l'horloge circadienne centrale ce qui impacte la fonction des organes, notamment le cœur. Chez les mammifères, Per est directement régulé par la lumière, et il est rapporté que son expression est diminuée chez les individus âgés, et que chez des individus jeunes, la réduction induite de son expression diminue la sensibilité à la lumière de façon similaire à celle observée chez des individus âgés (Gibson et al., 2009). De plus, un modèle de souris déplété du gène BMAL1 abolit l'oscillation du rythme cardiaque et induit des cardiomyopathies liées à l'âge (Roth et al., 2023).

Chez les mammifères, il a pu être démontré que la fonction cardiaque dépend de l'horloge circadienne centrale, mais également d'une horloge circadienne périphérique cardiaque. En

effet, sur des cœurs de rats perfusés *ex vivo*, donc complètement isolés de toute régulation neuro-humorale, il a été observé une augmentation de l'activité cardiaque et de la consommation d'oxygène la nuit, période d'activité des rats (Young et al., 2001). D'autres études utilisent un protocole de désynchronisation forcée de patients, qui sont éclairés dans la journée avec une faible lumière selon un cycle de 20 à 28 heures, ce qui désynchronise les processus biologiques du cycle jour-nuit. Il a été rapporté dans plusieurs de ces études que le rythme cardiaque conserve une rythmicité de 24 heures, avec un pic autour de 16 heures (heure biologique). Ces études démontrent donc l'existence d'une horloge circadienne intrinsèque au cœur.

De façon intéressante, un modèle de souris déficient pour BMAL1 spécifiquement dans les cardiomyocytes montre de nombreux phénotypes cardiaques associés au vieillissement notamment une diminution de la fraction d'éjection, une augmentation de la fibrose cardiaque, une hypertrophie cardiaque et une diminution du rythme cardiaque (Gottlieb et al., 2021; Ingle et al., 2015; Sonkar et al., 2022; Young et al., 2014; Zhang et al., 2023). En revanche, le rythme de vie de ces souris n'est pas altéré, à l'exception de l'activité physique diminuée, pouvant être liée aux phénotypes cardiaques observés (Gottlieb et al., 2021). Il apparaît donc que la fonction cardiaque avec l'âge pourrait dépendre de l'horloge circadienne centrale, mais également d'une horloge périphérique.

Dans les cardiomyocytes, l'expression d'un certain nombre de gènes dépend de l'horloge circadienne et oscille en fonction de la période de la journée, et, de façon notable, le métabolisme énergétique, la régulation du stress oxydatif et les canaux ioniques sont soumis au rythme circadien. Dans les modèles de délétion cardiomyocyte-spécifique de BMAL1 et CLOCK, environ 10% du transcriptome cardiaque est dérégulé, y compris des gènes impliqués dans la transduction du signal, le métabolisme et la protéostasie. De plus, l'expression des composants du sarcomère comme MHCa, MHCb oscille dans la journée, et c'est également le cas pour les niveaux protéiques de MHC, tropomyosine, et troponin I et T (Martino and Young, 2015).

De façon intéressante, le rythme circadien périphérique peut être régulé par l'activité physique, ou encore par l'alimentation. En particulier, il a été démontré dans plusieurs modèles que l'alimentation régulée dans le temps (Time Restricted Feeding - TRF) régule le rythme circadien périphérique, indépendamment du rythme central autonome (Roth et al., 2023). Chez la drosophile, un transcriptome cardiaque, réalisé à différents moments de la journée en condition TRF ou contrôle (Ad Libitum Feeding - ALF), montre que l'expression de nombreux gènes oscille au cours de la journée, et en particulier, les gènes impliqués dans la chaîne respiratoire mitochondriale sont sous-exprimés en condition TRF (Gill et al., 2015). Cette étude pionnière chez la drosophile, démontre que, tout comme chez les mammifères (Roth et al.,

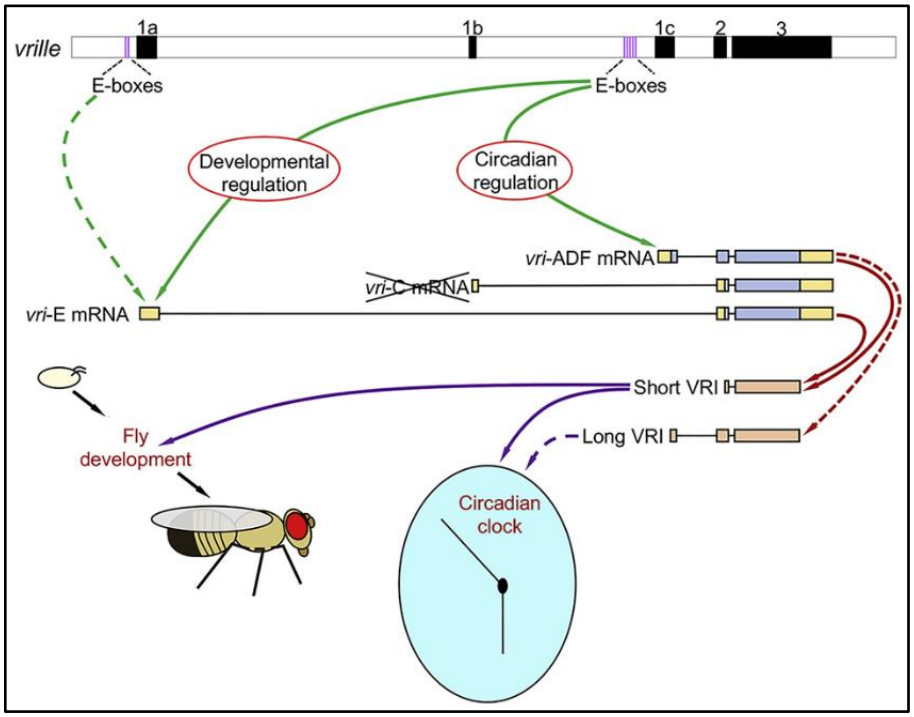



**Figure 39 - Vrille code pour plusieurs isoformes protéiques impliquées dans le développement et le rythme circadien.** Le gène vrille code pour deux isoformes protéiques. L'expression de ces isoformes est contrôlée par deux enhancers composés de motifs E-box, reconnus par le facteur de transcription Clock. Les motifs localisés à proximité de l'exon 1 c contrôlent l'expression des transcrits vri-A, vri-D, vri-F (vri-ADF), et vri-E dans le développement et le rythme circadien. Le transcrit vri-E code pour l'isoforme courte de vrille, impliquée dans le développement et le rythme circadien. Les transcrits ADF codent en majorité pour l'isoforme courte, mais également pour l'isoforme longue de vrille, impliquée dans le rythme circadien. *Source (Gunawardhana et al., 2021)*.

2023), les individus TRF âgés perdent du poids globalement, sans diminuer leur consommation alimentaire et ils augmentent leur activité physique (Gill et al., 2015). De plus, les auteurs observent une amélioration des paramètres cardiaques avec l'âge chez les individus TRF, notamment une diminution de la durée du battement cardiaque et des arythmies, et une augmentation de la capacité de contraction. Ces résultats tendent à montrer que la prise alimentaire restreinte dans la journée améliore les fonctions cardiaques avec l'âge, et que cette amélioration est liée à la fonction mitochondriale (Melkani and Panda, 2017).

Cependant, chez la drosophile, aucune étude n'a démontré de rôle périphérique du rythme circadien dans le cœur, et même, Gill et al. dans leur étude, démontrent que en condition ALF, la mutation complète de quatre gènes du rythme circadien central, *Clock, Cycle, Period* et *Timeless*, ne montrent pas de phénotypes cohérents entre eux sur la fonction cardiaque (Gill et al., 2015). A l'heure actuelle, seul un gène, *Vrille*, impliqué dans une deuxième boucle de régulation du rythme circadien central, a été démontré pour réguler le vieillissement cardiaque chez la drosophile.

## *Vrille, régulateur de l'horloge circadienne, du développement et du vieillissement cardiaque*

Chez la drosophile, Vrille (Vri), orthologue de NFIL3 chez l'humain, a été écrit pour la première fois en 1997. Ce gène localisé sur chromosome 2L, code pour 5 transcrits et 2 isoformes, une courte et une longue (George and Terracol, 1997; Gunawardhana et al., 2021). Il a tout d'abord été décrit pour être impliqué dans le développement embryonnaire, comme un interacteur génétique de *dpp* notamment dans l'établissement des veines d'ailes, mais a également été décrit comme intervenant dans la régulation du rythme circadien (**Figure 39**), et au cours du vieillissement cardiaque (Cyran et al., 2003; George and Terracol, 1997; Monnier et al., 2012).

Dans les neurones du rythme circadien, Vri est un facteur répresseur de *Clk*, en compétition avec Pdp1, son paralogue, qui se fixe sur le même site de fixation (Cyran et al., 2003; Glossop et al., 2003). Vri est un facteur clé de la seconde boucle de régulation de l'expression de *Clk*, et sa mutation altère le rythme d'activité locomotrice (Blau and Young, 1999; Gunawardhana et al., 2021; Gunawardhana and Hardin, 2017; Richhariya et al., 2023), et l'expression de gènes en aval de la boucle principale du rythme circadien (Glossop et al., 2003; Gunawardhana and Hardin, 2017).

Vri est également impliqué dans le développement. En effet, des mutants nuls homozygotes pour Vri ne se développent pas après le stade embryonnaire (George and Terracol, 1997; Gunawardhana and Hardin, 2017), et des mutants hétérozygotes présentent des défauts de

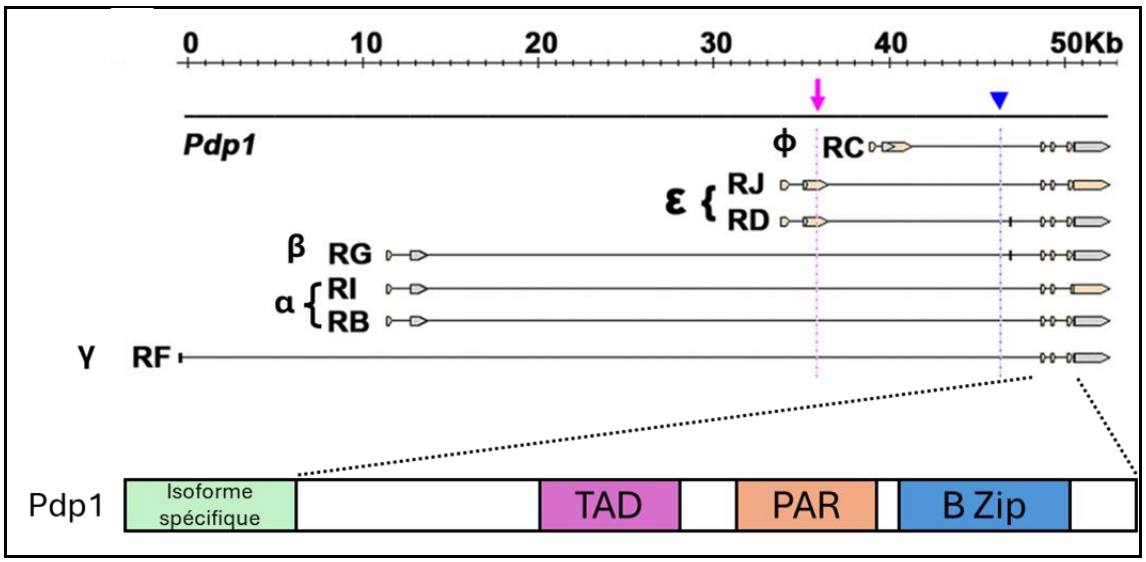



**Figure 40 - Structure de Pdp1. Le gène Pdp1 code pour 13 transcrits dont les principales formes décrites sont représentées ici.** Les domaines protéiques communs sont schématisés en dessous. La flèche rose indique l'emplacement de la mutation spécifique à l'isoforme impliquée dans le rythme circadien. *Adapté de (Cyran et al., 2001; Lim et al. 2007; Reddy et al., 2000; Zheng et al. 2009)*.

développement de la trachée, une diminution de la capacité de locomotion et de la taille des cellules des soies (Szuplewski et al., 2010, 2003).

Afin de décortiquer la fonction des différentes isoformes de Vri, une étude a généré un mutant des transcrits Vri-RA, RD et RF (Vri-ADF) et aucun défaut développemental chez ce mutant n'a été observé (Gunawardhana et al., 2021). Cette étude a permis d'établir que la forme la plus abondante de la protéine est la forme courte, et qu'elle est codée par tous les transcrits. De façon intéressante, cette étude montre également que les sites de fixation du facteur de transcription Clk (E-box) en amont du site initial de transcription des transcrits Vri-ADF, sont nécessaires pour la viabilité, et régulent donc les deux sites initiaux de transcription.

Comme je le précisais à la fin de la partie précédente, une précédente étude réalisée dans l'équipe, démontre que Vri modifie la fonction cardiaque avec l'âge (Monnier et al., 2012). Cette étude a réalisé un microarray sur des cœurs de drosophiles jeunes ou âgées et a observé parmi les gènes différentiellement exprimés un enrichissement en gènes impliqués dans les processus mitochondriaux (respiration cellulaire, chaîne de transport d'électrons). De façon intéressante, un régulateur potentiel commun de ces gènes nucléaires impliqués dans la fonction mitochondriale, est Vri.

La manipulation génétique de l'expression de *vri* spécifiquement dans le cœur adulte démontre que vrille régule le vieillissement cardiaque. Plus spécifiquement, l'invalidation par RNAi de *vri* préserve de la diminution du rythme cardiaque et de l'augmentation des arythmies, tandis que la surexpression de *vri* a l'effet inverse. Ces résultats pointent vers un rôle cœur-spécifique de Vrille, qui pourrait réguler le vieillissement cardiaque en ciblant des gènes impliqués dans la fonction mitochondriale.

Puisque Vri possède un seul et unique paralogue chez la drosophile, Pdp1, qui cible le même site de fixation, il est intéressant d'analyser le rôle de Pdp1 dans le cœur.

### *Pdp1, gène du rythme circadien avec des fonctions pléiotropiques*

Pdp1 (pour PAR domain protein 1) a été décrit pour la première fois par le laboratoire du Dr. Sortis en 1997, puis en 2000 (Lin et al., 1997; Reddy et al., 2000). La protéine Pdp1 a tout d'abord été identifiée comme un facteur de transcription du gène codant pour la *tropomyosin I*, se fixant à un *enhancer* à proximité de sites de fixation de *Mef2*, facteur de transcription musculaire, dans l'embryon. Elle appartient à la famille des facteurs de transcription bZIP (pour basic leucin zipper) et possède un domaine PAR (prolin and acidic amino acid rich) adjacent à un domaine de fixation à l'ADN (**Figure 40**). Cette protéine tient son nom de l'orthologie qu'elle présente avec 3 protéines de la sous-famille de facteurs de transcription PAR bZIP qui sont HLF (Hepatic Leukemia Factor),

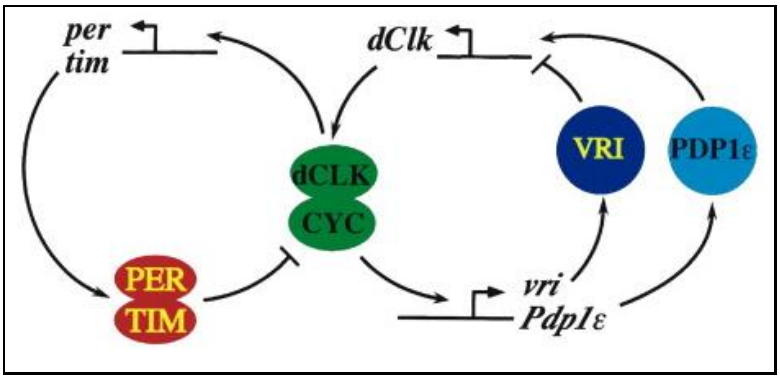



**Figure 41 - Vri et Pdp1 régulent Clk dans une deuxième boucle de régulation.** Dans les neurones circadiens, le dimère Clk/Cyc active l'expression de per et tim. Per et Tim interagissent ensemble pour former un dimère qui inhibe le dimère dClk/Cyc, formant ainsi une boucle d'auto-régulation à la base du rythme circadien. Le dimère dClk/Cyc active également l'expression de vri et Pdp1 (en particulier le transcrit Pdp1e). Vri et Pdp1e sont en compétition pour réguler l'expression de dClk. Vri est un répresseur de dClk, alors que Pdp1e est un activateur. Abréviations : dClk = Clock, Cyc = Cycle, Vri = Vrille, Per = Period, Tim = Timeless, Pdp1e = Par-domain protein 1 isoforme E. *Source (Cyran et al., 2001)*.

TEF (Thyrotroph Embryonic Factor) et DBP (D site of albumin promoter (albumin D-box) Binding Protein).

A l'origine, ce laboratoire a décrit 6 isoformes de la protéine Pdp1, codées par le gène *Pdp1* situé sur le chromosome 3L. Aujourd'hui, la base de données Ensembl répertorie 13 transcrits alternatifs du gène *Pdp1* (**Figure 40**), exprimés à partir de 4 sites de transcription différents, codant pour au moins 4 isoformes. De façon intéressante, 2 enhancers ont également été identifiés dans les introns 1 et 2 du gène permettant l'expression embryonnaire dans le corps gras et l'intestin pour l'un, et les muscles du pharynx et de la paroi du corps pour l'autre.

En 2007, la fonction des domaines protéiques de l'isoforme epsilon, spécifiquement exprimée dans la tête des drosophiles (Cyran et al., 2003), a permis de déterminer que le domaine bZIP en C terminal est nécessaire et suffisant à la localisation nucléaire de la protéine, et que la fonction spécifique de cette isoforme pourrait venir d'un domaine d'activation transcriptionnel en N terminal, dans la partie unique de l'isoforme (Lim et al., 2007).

Ces articles décrivent une première fonction de Pdp1 en se fixant à un *enhancer* du gène de la Tropomyosin I pour augmenter son expression pendant le développement embryonnaire. En particulier, il est décrit que l'isoforme Pdp1-alpha se fixe à cet *enhancer* et que cette fixation peut être inhibée par l'isoforme Pdp1-delta. Cependant, le mécanisme par lequel ces deux isoformes interagissent sur cet *enhancer* reste inconnu. Depuis ces articles, 2 isoformes ont particulièrement été étudiées dans deux processus cellulaires différents : Pdp1-epsilon (regroupant isoformes RD et RJ) dans le rythme circadien et Pdp1-gamma dans le corps gras.

Pdp1-epsilon (Pdp1e pour la suite de ce manuscrit) est une isoforme codée par deux transcrits : *Pdp1-RD* et *pdp1-RJ*. Ces deux transcrits sont exprimés dans la tête des drosophiles et leur fonction a été démontrée comme identique dans le rythme circadien (Zheng et al., 2009). L'expression de *Pdp1e* cycle en fonction de la journée selon le rythme circadien (Cyran et al., 2003; Ueda et al., 2002), probablement en raison de sites de fixation de l'hétérodimère Clk/Cyc 4kb en amont du gène (Cyran et al., 2003; McDonald and Rosbash, 2001). Il a été démontré *in vitro* que Pdp1e et son paralogue Vri sont en compétition pour le même site de fixation sur le gène *clk* bien que le mécanisme de cette compétition reste inconnu (Cyran et al., 2003; Lim et al., 2007). Ces deux gènes forment donc une seconde boucle de régulation de *clk* dans le rythme circadien (**Figure 41**).

Pdp1e semble donc impliqué dans la régulation transcriptionnelle de *clk*, cependant les études *in vivo* sur des lignées mutantes ou transgéniques ne se recoupent pas exactement. Bien que tous les mutants (spécifiques de la forme epsilon) et tous les RNAi (exprimés spécifiquement dans les cellules du rythme circadien) allongent la durée du cycle d'activité locomotrice (Benito

et al., 2007; Cyran et al., 2003; Lim et al., 2007; Zheng et al., 2009), l'effet sur la transcription du gène *clk* semble variable (Benito et al., 2007; Zheng et al., 2009). Il est également intéressant de noter que dans un contexte mutant pour Pdp1e, la surexpression de *clk* ne permet pas de sauver le phénotype sur l'activité locomotrice (Zheng et al., 2009), et il apparaît alors que Pdp1e est un effecteur de Clk, dont les cibles permettent de réguler l'activité locomotrice pendant la journée. Ces cibles sont pour le moment inconnues.

Bien que la fonction moléculaire de Pdp1e ait essentiellement été étudiée sur l'activité locomotrice dans les neurones impliqués dans le rythme circadien, quelques études montrent un effet pléiotropique de cette isoforme. La mutation de Pdp1e (ou sa sous-expression spécifiquement dans les neurones du rythme circadien) diminue la résistance aux pesticides des drosophiles (Beaver et al., 2010). Plus étonnant, la diminution de l'expression de Pdp1 dans les neurones circadiens ou dans le corps gras diminue les comportements de parade nuptiale chez la drosophiles mâles (Benito et al., 2010). *Pdp1* est également exprimé dans l'intestin adulte et suit des variations liées au cycle jour/nuit (Parasram et al., 2024), et chez *P. apterus* (insecte communément appelé Gendarme) l'expression de l'orthologue de Pdp1, Pdp1[iso1], dans l'intestin est régulée par des glandes endocrines (Bajgar et al., 2013).

La fonction circadienne de Pdp1 reste encore peu connue, en particulier ses cibles qui semblent impliquées dans divers processus biologiques, et il apparaît intéressant d'étudier plus avant ce gène dans d'autres organes. Décortiquer la fonction de chaque isoforme semble difficile, du fait de leur forte ressemblance. De manière remarquable, c'est par un heureux effet de sérendipité que l'impact de l'isoforme Pdp1-gamma (Pdp1g) sur le corps gras a été révélé : lors de tests visant à inhiber l'expression de Pdp1 à l'aide d'ARN double brin, une réduction inattendue de la quantité de gouttelettes graisseuses a été observée (Dzitoyeva and Manev, 2013). En plus des fonctions que j'ai détaillé tout au long de cette partie, Pdp1 a également été associé à la croissance larvaire, la mitose, l'endoréplication, la croissance néoplasique régulée par la voie Notch dans le disque d'aile, et à la régulation du métabolisme énergétique par les voies Insuline et TOR chez *T. castaneum* (Li et al., 2014; Logeay et al., 2022; Reddy et al., 2006).

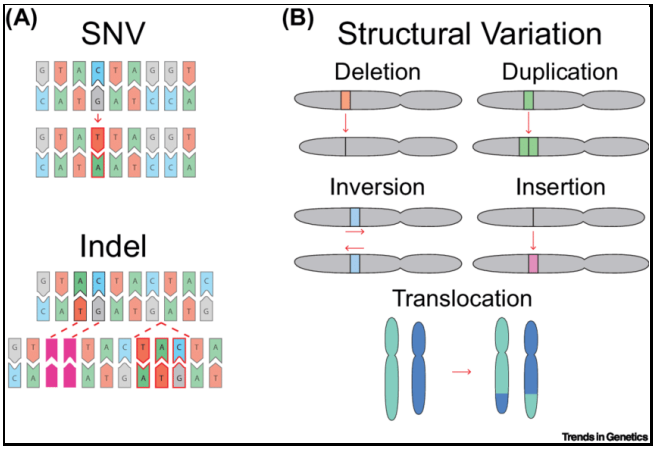



**Figure 42 - Différents types de variants dans le génome.** *Source (Nesta et al., 2021).*

# Chapitre 3. Etude des variations naturelles

Entre deux individus non-apparentés, il est estimé que le génome diffère de 0.5%, soit environ 15 millions de paires de bases. En moyenne, chaque individu porte plusieurs centaines de ces variations génétiques connues ou prédites pour endommager les gènes et leur fonction, et déclencher des pathologies (Jackson et al., 2018). Cependant, il est rare qu'une seule variation provoque une pathologie, depuis plusieurs années, la recherche met en évidence l'importance de l'interaction des variations entre elles et avec l'environnement pour induire une susceptibilité à des pathologies. C'est notamment le cas dans les pathologies multifactorielles comme le diabète de type 2, des maladies inflammatoires ou des pathologies cardiaques (McCarthy et al., 2008). Le vieillissement cardiaque est un trait complexe, multifactoriel, et afin d'en décrypter les mécanismes moléculaires, mon projet de thèse analyse l'architecture génétique des variations naturelles associées au vieillissement cardiaque.

## Variations génétiques

Les variations génétiques peuvent également être qualifiées de mutations, c'est-à-dire de modifications de la séquence ADN, cependant le terme de mutation renvoie à un imaginaire plutôt négatif, et à des effets délétères et pathogéniques d'une mutation pour l'organisme. Par exemple, plus de 400 mutants du gène *LMNA*, codant pour les Lamines A et C, sont associés à des dystrophies des muscles squelettiques, et des maladies cardiovasculaires (Bhide et al., 2018). Cependant, d'après la base de données Leiden Muscular Dystrophy (https://databases.lovd.nl/shared/genes/LMNA), 1831 variations ont été rapportées dans le gène LMNA, dont 373 n'ont pas d'effet. Afin de distinguer les mutations des variations neutres, le terme de variant est préféré par la communauté scientifique et sera donc utilisé dans ce manuscrit.

Classiquement, les variations génétiques sont classées en trois grands types : les variations d'un seul nucléotide (SNV, ou SNP pour polymorphisme d'un seul nucléotide), les indels et les variants structuraux (**Figure 42**) (Nesta et al., 2021). Les SNP sont les variations les plus couramment retrouvées dans la population, chez l'humain il est estimé qu'il existe 11 millions de SNP (soit 1 toutes les 300 paires de bases) (Jackson et al., 2018). Les indels, pour insertions et délétions sont des modifications courtes du génome (moins de 1000 paires de bases) contrairement aux variants structuraux qui concernent des modifications plus larges.

Ces variations peuvent entraîner diverses conséquences pour la cellule en fonction de leur localisation. Le génome a classiquement été découpé en plusieurs localisations :

- Les régions transcrites des gènes, comprenant des exons codant pour des protéines, et des introns non codants, ainsi que deux parties exoniques non traduites au début

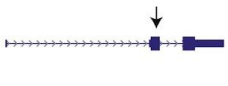
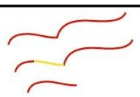
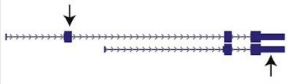
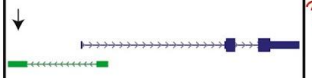
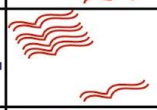
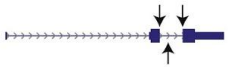
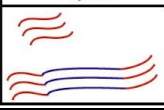
| Variant Location | Transcript Map | Transcript Product | Transcript description | Potential Outcome |
|---|---|---|---|---|
| Coding (standard interpretation) |  |  | Synonymous/ Missense/ Nonsense | Homeostasis/ Altered Product/ Loss of function |
| Isoform specific/ Noncoding regulatory |  |  | Isoform loss/alteration Altered translation | Aberrant expression patterns |
| Promoter/Enhancer/ Looping/cis-regulatory lncRNA |  |  | Over/ Under expression | Aberrant expression patterns |
| Splice Donor/Acceptor Branchpoint |  |  | Skipped exon/ Retained intron | Altered product Nonsense Mediated Decay |

**Figure 43 - Impact sur le transcrit et la fonction du gène des variants en fonction de leur localisation.** *Source (Gloss and Dinger, 2018)*.

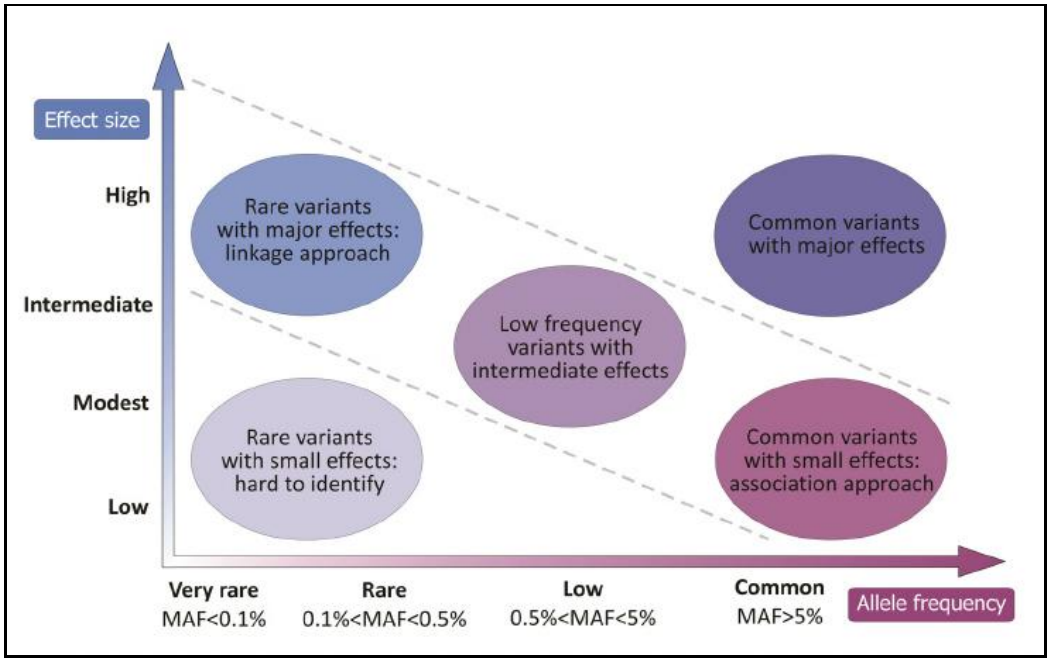



**Figure 44 - Relation entre la fréquence d'un allèle et son effet.** Représentation de la fréquence d'un allèle dans la population, mesurée par la MAF (fréquence de l'allèle mineur), et de son effet sur un phénotype mesuré. L'hypothèse largement acceptée est que les variants rares ont des effets forts sur un phénotype (en haut à gauche sur le graphique), alors que des variants plus communs ont un effet faible (en bas à droite sur le graphique). Le GWAS permet de détecter les variants à effet faible et communément retrouvés dans la population. *Source (Zemunik et al. 2011)*.

et à la fin du gène, appelées respectivement 5' UTR et 3' UTR (UTR=UnTranslated Regions, régions non traduites)

- Les régions en amont et en aval, appelées respectivement *upstream* et *downstream* localisées directement à côté du gène dans les séquences non transcrites. De façon notable, dans la région *upstream* on trouve le promoteur du gène, permettant son expression, et dans ces régions non codantes se trouvent des éléments régulateurs.
- Les régions intergéniques, localisées loin des gènes, classiquement à plus de 2000-5000 paires de bases, contenant également des régions régulatrices.

La base de données européenne Ensembl, classifie les variants en fonction de leur localisation et/ou de leur conséquence s'ils se trouvent dans un gène. Sans toutes les citer (**Figure 43**), des modifications dans la séquence codante du gène peuvent modifier le transcrit et la protéine en résultant en modifiant sa séquence (variation faux sens) ou en induisant une protéine plus courte (variation non sens) ce qui peut induire une perte de fonction de la protéine. Cependant, des modifications dans la séquence codante peuvent également être silencieuses (aussi qualifiées de synonymes) et ne pas modifier la protéine. Des variants introniques peuvent également altérer l'épissage des transcrits et résulter en des protéines modifiées aberrantes. Enfin, certains variants localisés dans des régions non codantes peuvent affecter des régions régulatrices des gènes, affectant alors l'expression des gènes. (Gloss and Dinger, 2018)

Ces variants, à l'échelle de la population, sont détectés à partir d'un génome de référence, commun à au moins 50% de la population, et sont définis comme une différence de séquence par rapport à ce génome de référence. Pour chaque variant il est donc possible de définir un variant référence, ou allèle majeur, et un variant alternatif, ou allèle mineur. En fonction de leur fréquence dans la population, les variants alternatifs sont qualifiés de rares (moins de 1% de la population), peu fréquents (1 à 5% de la population) et fréquents (plus de 5% de la population).

L'hypothèse fondatrice de la recherche de variants naturels dans la population est celle de la "maladie commune, variant commun", autrement dit, une maladie fréquente dans la population sera probablement influencée par des variants fréquents à faible effet sur le phénotype (**Figure 44**) (Dehghan, 2018; Zemunik et al., 2011). La détection de ces variants communs à effet faible se fait classiquement par GWAS.

## Méthode GWAS

Le GWAS est une méthode d'étude permettant d'associer statistiquement l'effet d'un variant fréquent dans une population d'individus non apparentés à un phénotype étudié. Par exemple, le locus 9p21, présent dans 20-25% de la population caucasienne, et contenant plusieurs SNP en déséquilibre de liaison est associé, par une étude GWAS sur 4 populations caucasiennes

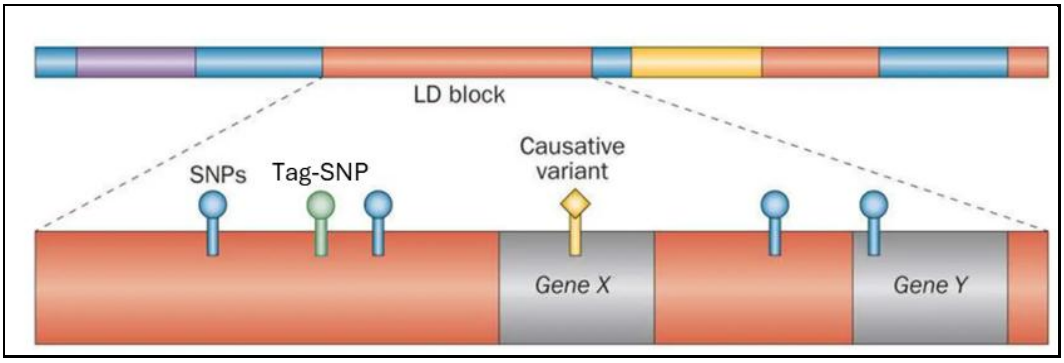



**Figure 45 - Un tag-SNP séquencé dans un bloc de déséquilibre de liaison n'est pas nécessairement le variant causal du phénotype observé.** Au dessus sont représentés des blocs de déséquilibre de liaison (LD block) colorés, et dessous un zoom sur l'un de ces blocs. Au sein d'un bloc les variants (SNPs) sont en déséquilibre de liaison, et donc la détection d'un seul variant (Tag-SNP, en vert) permet d'associer tous les autres variants au phénotype étudié. Cependant, tous les variants ne causent pas le phénotype, il est donc nécessaire de chercher le variant causal (en jaune). *Adapté d'un cours de Mme Ibrahim (Université de Minia, site consulté en septembre 2024, https://fr.slideshare.net/slideshow/introduction-to-haplotype-blocks-pptx/262610865#23 ).*

indépendantes, à une augmentation des risques de maladies coronariennes de 30-40% (McPherson et al., 2007). Un design expérimental commun afin de déterminer ce type d'association est celui du "cas-témoin". Dans ce design, le groupe témoin "sain" est comparé à un groupe cas "malade" et l'association de chaque SNP connu dans le génome est testée (McCarthy et al., 2008). Un autre design d'étude GWAS se base sur une cohorte dans la population générale, permettant ainsi l'évaluation de mesures longitudinales communes, comme l'indice de masse corporelle, le niveau d'éducation, le style de vie ou le vieillissement (Wijmenga and Zhernakova, 2018).

Ce deuxième design expérimental est devenu particulièrement utilisé ces dernières décennies avec la création de larges banques de données comme la *UK BioBank* qui contient les données d'environ 500 000 individus et a permis l'analyse GWAS de nombreux traits (Uffelmann et al., 2021). Cependant, les millions de variants connus ne sont pas génotypés pour tous les individus, la tâche est herculéenne et prend bien trop de temps et de ressources. Le génotypage des individus n'est donc réalisé que sur un nombre restreint de SNP, appelés tag-SNP, qui sont ensuite associés au phénotype par l'analyse GWAS. Cependant, l'effet de variants à proximité du tag-SNP non génotypés peut être inféré à partir de l'effet du tag-SNP grâce aux efforts de la communauté scientifique de découper le génome en blocs de déséquilibre de liaison (LD). Pour le dire simplement, les allèles contenus dans un bloc sont hérités ensemble par la génération suivante et de par leur proximité dans le génome ces blocs ont une très faible fréquence de recombinaison interne (**Figure 45**) (Frazer et al., 2009). Par conséquent, lorsqu'un GWAS associe un tag-SNP à un phénotype, ce n'est pas nécessairement le SNP causal du phénotype, mais probablement un SNP en déséquilibre de liaison à ce locus.

De nombreuses études et plusieurs méta-analyses ont étudié de multiples phénotypes cardiaques, comme la fibrillation atriale ou les anomalies d'électrocardiogrammes (Malik et al., 2018; Nielsen et al., 2018; Paludan-Müller et al., 2016; Verweij et al., 2020). Ces études ont mis en évidence de multiples loci, dont certains sont communs à plusieurs CVD. Une base de données publique, le *CardioVascular Disease Knowledge Portal* (broadcvdi.org), a été mise en place afin de regrouper un maximum de ces données et de les harmoniser afin de mieux comprendre l'architecture génétique des CVD (Costanzo et al., 2023). Cependant, aucune étude jusqu'à présent chez l'humain n'a été menée afin d'associer des variants communs au vieillissement cardiaque.

La réalisation de GWAS chez l'humain présente plusieurs limites. Outre les coûts et ressources nécessaires au génotypage de centaines de milliers de SNPs, l'étude avec un design de cohorte nécessite un grand nombre d'individus afin de détecter les effets les plus faibles des variants (Wijmenga and Zhernakova, 2018). Cependant, la majorité des cohortes actuelles, dont

la *UK BioBank*, ont un biais de représentation en faveur des populations nord-européennes/caucasiennes, ce qui pose un problème de représentativité, puisque les variants n'ont pas la même fréquence dans toutes les ethnies (McCarthy et al., 2008).

En plus de ces limites, une fois les GWAS analysés, les associations détectées ne permettent pas d'interpréter directement les fonctions biologiques associées au phénotype étudié. En effet, à un locus donné, le tag-SNP associé n'est pas nécessairement causal et comprend de nombreux SNP en déséquilibre de liaison. Il convient donc d'étudier les SNPs du locus, et leurs conséquences, qu'ils soient dans un gène ou une région régulatrice potentielle (McCarthy et al., 2008). Ces validations fonctionnelles sont souvent longues et difficiles, à cause de l'effet faible des variants testés d'une part, mais également car dans le cas de variants localisés dans une région régulatrice, la cible de cette région n'est pas toujours connue, et si elle l'est, la modification de l'expression de cette cible peut être compensée par un autre gène paralogue, liée à la grande redondance génétique chez l'humain.

## Drosophila Genetic Reference Panel (DGRP)

Le *Drosophila Genetic Reference Panel* (DGRP) est une collection de 205 lignées consanguines issues d'une population sauvage utilisée pour étudier par GWAS les variations génétiques naturelles et leur association à divers phénotypes tels que la longévité, le comportement, la résistance à l'environnement ou la fonction cardiaque (Huang et al., 2014; Mackay et al., 2012).

Des individus ont été capturés dans la population sauvage de *Drosophila melanogaster* de la ville de Raleigh en Caroline du Nord aux Etats-Unis en 2003. Les individus ont ensuite été croisés pendant 20 générations en croisement frère-soeur afin d'isogéniser les lignées et de fixer leur génotype. Initialement il y avait 1500 isofemelles, dont seules 205 lignées se sont maintenues, impliquant que les lignées les plus délétères ont été purgées.

Les lignées ont ensuite été séquencées par la technologie Illumina short read puis cartographiées au génome de référence dm3. Grâce à ce réassemblage, 4.565.215 variants ont été identifiés, dont 87% sont des SNP, et les autres sont des délétions, insertions et microsatellites. Les variants structuraux plus larges tels que des insertions d'éléments transposables ou duplications et inversions de portions du génome ne sont pas détectés en raison du séquençage short read.

Dans les lignées DGRP, disponibles dans le stock *Bloomington Drosophila Stock Center* (bdsc.indiana.edu), les variants présentent l'avantage d'être homozygote dans 95% des cas, ce qui permet la réalisation de GWAS sur de multiples individus ayant le même génome, mais aussi

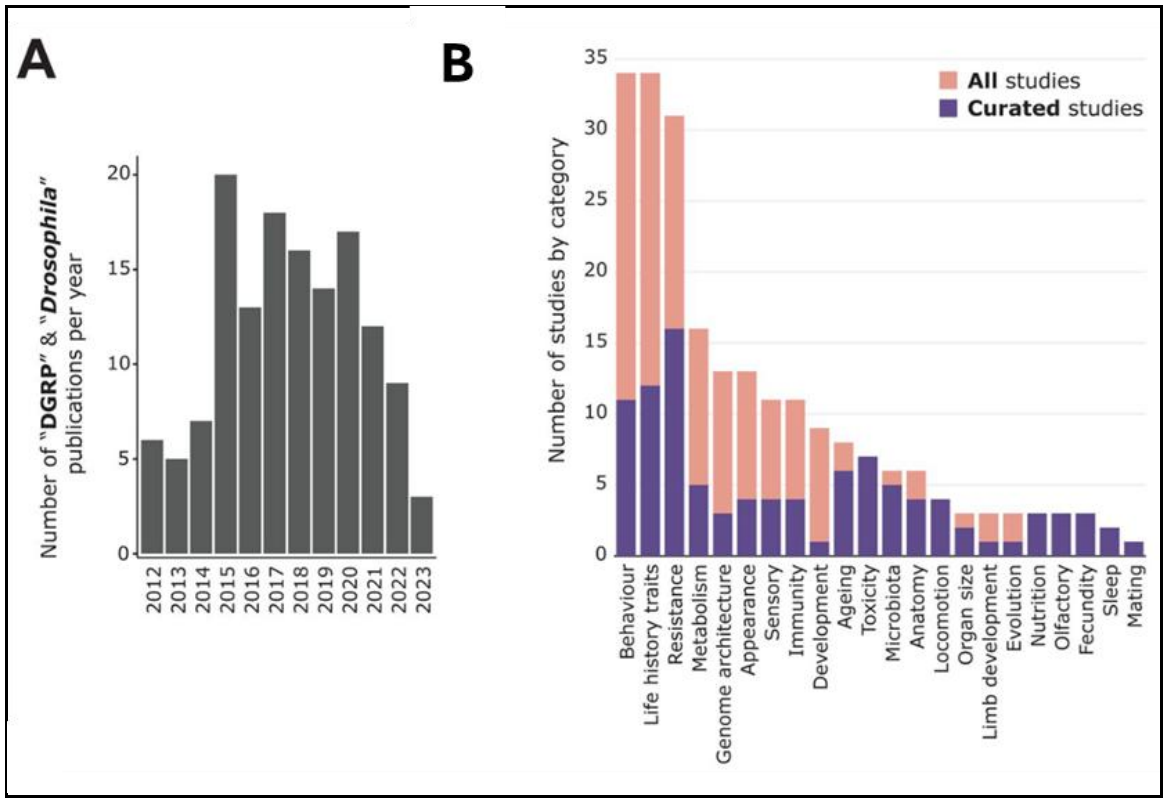



**Figure 46 - Données générales sur la base de données DGRPool.** (A) Résultats de la recherche "Drosophila DGRP" sur Pubmed. (B) Nombre d'études par catégorie de phénotype étudiée. *Source (Gardeux et al., 2023)*.

la détection de phénotypes demandant beaucoup de matériel, comme les données omiques. De plus, la drosophile possède un faible déséquilibre de liaison, et donc chaque variant associé à un phénotype est considéré comme un variant causal. Cet avantage permet d'élucider plus rapidement les mécanismes moléculaires impliqués dans le phénotype étudié. Depuis la publication des lignées DGRP en 2012, 135 études ont été menées sur ces lignées sur des phénotypes variés (**Figure 46**), et compilées sur une base de données harmonisée appelée DGRPool (dgrpool.epfl.ch) en 2023 (Gardeux et al., 2023).

De façon intéressante, plusieurs articles ont utilisé les lignées DGRP pour étudier des phénotypes de vieillissement. Parmi ces 8 études, au moment de la rédaction de ce manuscrit, 3 phénotypes ont été analysés : la longévité (naturelle ou en condition de stress) (Arya et al., 2010; Harrison et al., 2020; Huang et al., 2020; Ivanov et al., 2015; Jin et al., 2020; Wilson et al., 2020), l'activité locomotrice au cours du vieillissement (Carbone et al., 2016; Wilson et al., 2020), et la fécondité au cours du vieillissement (Durham et al., 2014; Wong and Holman, 2023).

Ces études mettent en évidence des voies connues impliquées dans le vieillissement (**Tableau 4**) : la voie TOR, la voie insuline, la fonction mitochondriale, en particulier la production de ROS et la chaîne respiratoire et le métabolisme énergétique de la cellule. Mais elle a également mis en évidence d'autres voies associées au vieillissement dont des canaux voltage dépendant, la voie Wnt et de nombreuses protéines au rôle encore inconnu.

**Tableau 4 - Liste des gènes ayant au moins un variant associé à un phénotype de vieillissement.** Les gènes sont classés par voies impliquées, et les phénotypes associés ont été récupérés à partir de la base de données DGRPool. Références : (1) (Carbone et al., 2016), (2) (Ivanov et al., 2015), (3) (Durham et al., 2014), (4) (Huang et al., 2020), (5) (Wilson et al., 2020), (6) (Arya et al., 2010)

| **Voie** | **Gène (abréviation)** | **Phénotype associé** |
|---|---|---|
| **TOR** | *Chrb* | Phototaxie (1)<br>Longévité (2, 3)<br>Fécondité (3) |
| | *Slif* | Phototaxie (1)<br>Longévité (2) |
| | *Mipp2* | Longévité (4) |
| | *Dcma* | Longévité (5) |
| **Insuline** | *ush* | Phototaxie (1)<br>Longévité (3, 4)<br>Fécondité (3) |
| **Mitochondrie/Chaîne respiratoire/production ROS** | *ATPsynD* | Longévité (2) |
| | *Sima* | Phototaxie (1) |

| | | |
|---|---|---|
| | | Longévité (2, 4)<br>Fécondité (3) |
| | *Nos* | Phototaxie (1)<br>Longévité (2, 4, 6)<br>Fécondité (3) |
| **Métabolisme énergétique** | *Bmm* | Longévité (4)<br>Fécondité (3) |
| | *CG8343* | Longévité (3) |
| | *Eno* | Phototaxie (1)<br>Longévité (4) |
| **Matrice extracellulaire** | *Nep1* | Phototaxie (1)<br>Longévité (2, 4) |
| **Voie Wnt** | *CG11523* | Longévité (4) |
| | *Drl-2* | Phototaxie (1)<br>Longévité (3, 4)<br>Fécondité (3) |
| **Canaux voltage dépendant** | *Cac* | Phototaxie (1)<br>Longévité (4)<br>Fécondité (3) |
| | *Elk* | Longévité (2, 4)<br>Fécondité (3) |
| **Rôles inconnus** | *Dls* | Longévité (5) |
| | *CG13004* | Phototaxie (1)<br>Longévité (4) |
| | *CG7294* | Phototaxie (1) |
| | *Msr-110* | Phototaxie (1)<br>Longévité (4, 6) |
| | *CG18622* | Phototaxie (1)<br>Longévité (5) |
| | *Osi24* | Phototaxie (1)<br>Longévité (3)<br>Fécondité (3) |

Afin de démontrer l'efficacité d'un outil intégré à DGRPool permettant de calculer des corrélations entre les phénotypes à travers les études qu'ils ont manuellement réannoté, Gardeux et al. ont étudié la corrélation de 50 phénotypes avec la longévité (**Figure 47**) (Gardeux et al., 2023). A partir des résultats des GWAS, ils ont calculé une corrélation entre les résultats de l'étude sur la longévité réalisée par Arya et al. (Arya et al., 2010) et tous les phénotypes recensés dans la base de données harmonisée DGRPool. De façon intéressante, cette étude montre une corrélation de 8 études ayant étudié la longévité entre elles, réalisées avec des laboratoires différents, et une corrélation avec d'autres phénotypes étudiés, notamment la durée du sommeil, des composants de la cuticule et la résistance au stress oxydatif. Également, cette étude montre que plusieurs phénotypes sont anti-corrélés avec la longévité comme l'activité, la quantité de nourriture consommée et d'autres composants de la cuticule.

Il apparaît donc que les mécanismes impliqués dans le vieillissement, ici la longévité, sont également impliqués dans d'autres processus qui ne sont pas nécessairement associés au vieillissement (comme les composants de la cuticule). Ceci montre l'interconnexion des mécanismes cellulaires et moléculaires et donc l'importance de caractériser les réseaux moléculaires et leurs interactions entre eux pour déchiffrer leur architecture et l'impact qu'une modification d'une partie du réseau aura sur les autres mécanismes.

## Etude des variations naturelles de la fonction cardiaque

La première étude des variations naturelles de la fonction cardiaque en utilisant les lignées DGRP a été réalisée dans l'équipe avant le début de mon projet de thèse (Saha et al., 2022b). Dans cette étude 7 paramètres cardiaques ont été mesurés sur 167 lignées DGRP. Pour chaque lignée, 12 mouches femelles âgées de 7 jours ont été disséquées et filmées en utilisant la méthode SOHA. L'analyse des vidéos assistée par logiciel SOHA a permis d'extraire 7 paramètres : la durée du cycle cardiaque (*Heart Period*), la durée de la contraction (*Systolic Interval*), la durée de la relaxation (*Diastolic Interval*), l'index d'arythmie (*Arrhythmia Index*), la fraction d'éjection (*Fractional Shortening*), le diamètre maximal de contraction (*End Systolic Diameter*) et le diamètre maximal en relaxation (*End Diastolic Diameter*).

Pour chacun de ces paramètres cardiaques, un GWAS a été réalisé sur la moyenne des phénotypes de chacune des lignées en utilisant un modèle linéaire mixte, et les 100 variants avec la meilleure p valeur pour chaque trait ont été sélectionné pour l'analyse. De façon intéressante, ces variants sont enrichis en gènes codant pour les fibres contractiles, les canaux ioniques, et, bien qu'ils ne soient pas enrichis, certains gènes impliqués dans le développement et la fonction cardiaque ont au moins un variant associé dans l'étude. De plus, une large proportion des gènes identifiés interagit ensemble dans un large réseau d'interaction génétique et protéique, suggérant une régulation globale, notamment transcriptionnelle de la fonction cardiaque. Par

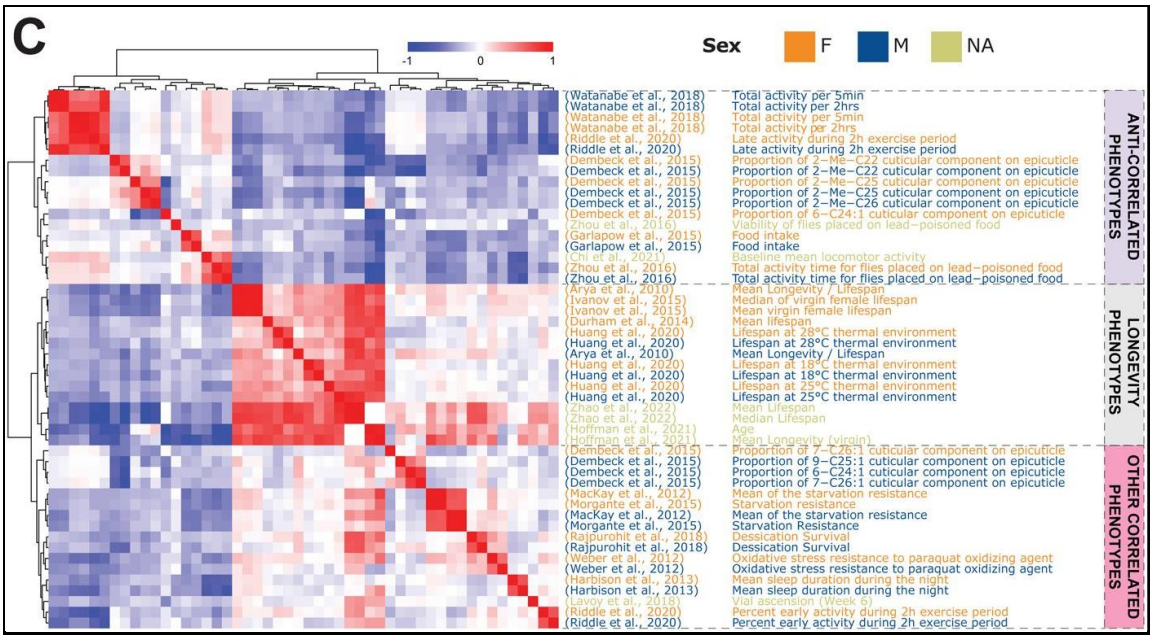



**Figure 47 - Corrélation des phénotypes associés à la longévité.** Phénotypes corrélés avec la longévité (étude de (Arya et al., 2010)) classés en 3 catégories : les phénotypes de longévité, les phénotypes corrélés, et les phénotypes anti-corrélés. *Source (Gardeux et al., 2023)*.

ailleurs, l'enrichissement des variants localisé dans la région *upstream* des gènes suggère également l'importance de la régulation transcriptionnelle sur la fonction cardiaque.

Afin de caractériser ces régions régulatrices associées à la fonction cardiaque, l'étude a réalisé une étude sur les 150 paires de bases autour des variants localisés dans les régions non codantes et identifie des motifs potentiels de fixation pour des facteurs de transcription sur-représentés. De façon intéressante, certains de ces facteurs de transcription ont été associés à des variations de la fonction cardiaque par les analyses GWAS, notamment Tin, facteur de transcription clé du développement et de la fonction cardiaque. Le rôle de différents facteurs de transcription identifiés a été validé par l'analyse de la fonction cardiaque en condition d'inhibition de ces facteurs de transcription. Ces résultats supportent donc l'hypothèse d'un réseau régulateur de la fonction cardiaque dont les acteurs clés sont des facteurs de transcription, qui peuvent être identifiés par GWAS.

De façon également notable, les gènes associés dans les différents GWAS réalisés ont été comparés à des données humaines issues de la littérature. Cela a révélé un enrichissement entre les gènes associés aux maladies cardiovasculaires et maladies coronariennes chez l'humain, et les orthologues des gènes associés aux variations de la fonction cardiaque chez la drosophile. Ceci supporte la vision d'une conservation des processus cellulaires et moléculaires de la fonction cardiaque entre les organismes. Au global, cette étude suggère que les GWAS permettent d'identifier des réseaux de régulation cardiaque conservés entre les deux espèces, connus, mais également inconnus.

En effet, les résultats de l'équipe montrent que tous les variants détectés ne sont pas associés à des gènes connus dans la fonction cardiaque, et permettent d'identifier de nouvelles voies de régulation potentielles de la fonction cardiaque. En exemple, les gènes *poxm* (orthologue de *PAX9*) et *sr* (orthologue de *EGR2*) ont été identifiés comme ayant un rôle dans la régulation du rythme cardiaque. Ces gènes, bien que connus pour leur rôle dans d'autres processus, n'étaient pas associés auparavant à la fonction cardiaque. Les expériences d'inhibition cœur-spécifique chez la drosophile de *poxm* et *sr* montrent une diminution significative de la durée du battement cardiaque, confirmant ainsi leur implication dans la régulation cardiaque. De plus, dans des cardiomyocytes humains en culture, la diminution de l'expression de *PAX9* et *EGR2* induit un raccourcissement de la durée du potentiel d'action, suggérant un rôle conservé dans la modulation du rythme cardiaque.

Pour résumer, cette étude, à la base de mon projet de thèse, montre que l'architecture de la fonction cardiaque est conservée entre l'humain et la drosophile, et appuie l'importance d'identifier les réseaux de régulation pour comprendre les mécanismes de la fonction cardiaque.

# Hypothèses et résumé des résultats

Afin d'élucider les mécanismes impliqués dans les variations naturelles du vieillissement cardiaque, j'ai tout d'abord analysé des données de GWAS réalisées dans l'équipe avec la méthodologie que j'ai détaillée précédemment (Saha et al., 2022b). Ces analyses réalisées sur 8 paramètres cardiaques ont permis d'analyser l'architecture des variations naturelles associées au vieillissement cardiaque, en particulier la localisation génétique des variants associés ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués. Au cours de l'analyse fonctionnelle de ces gènes, des acteurs connus du vieillissement cardiaque ont été identifiés, validant ainsi l'approche, mais de nouveaux acteurs potentiels ont également été mis en évidence.

En particulier, Vri et Pdp1 ont tous deux des variants associés à la variation du diamètre cardiaque avec l'âge. Il a déjà été démontré que Vri régule le vieillissement cardiaque (Monnier et al., 2012), et l'identification de son paralogue, Pdp1 suggère qu'ils pourraient réguler le vieillissement cardiaque au sein d'un même réseau. De plus, Vri et Pdp1 ont été prédits comme régulateurs de plusieurs gènes nucléaires impliqués dans la fonction mitochondriale possédant des variants associés à la variation du diamètre cardiaque avec l'âge. Ces résultats, cohérents avec ceux présentés par (Monnier et al., 2012), suggèrent que Pdp1 régule la fonction cardiaque avec l'âge en régulant la fonction mitochondriale. En effet, mes travaux de thèse montrent que la modification de l'expression de Pdp1 spécifiquement dans le cœur adulte régule le vieillissement cardiaque. De plus, l'inhibition de Pdp1 modifie le réseau mitochondrial des cardiomyocytes, et Pdp1 interagit génétiquement avec MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter), un acteur connu du transport du calcium dans la matrice mitochondriale. **Ces résultats font l'objet d'un article publié dans bioRxiv au moment de la rédaction de ce manuscrit et qui est joint ci-après.**

Dans le but d'approfondir le rôle de Pdp1 sur la fonction mitochondriale, j'ai réalisé une analyse préliminaire du rôle de Pdp1 sur la production d'ATP, et ces résultats suggèrent que l'inhibition de Pdp1 dans les cellules musculaires, diminue effectivement la production d'ATP. **Ces résultats sont décrits à la suite de l'article.**

Enfin, au début de ma thèse, l'analyse des réseaux GWAS avait identifié un autre facteur de régulation connu dans la fonction cardiaque, Ubx, comme associé au vieillissement cardiaque. Bien que par la suite, il s'est avéré qu'Ubx ne possède aucun variant associé dans les GWAS du vieillissement de la fonction cardiaque, j'ai réalisé des analyses de l'effet d'Ubx sur la fonction cardiaque adulte. **Ces résultats, présentés en dernière partie des résultats**, montrent qu'Ubx régule le vieillissement cardiaque.

# Résultats

## Natural variations of aging of cardiac performance in Drosophila identifies a central function for the PAR domain bZIP transcription factor Pdp1/dHLF in cardiac senescence

L'identification des facteurs génétiques influençant la sénescence cardiaque dans les populations naturelles est essentielle à notre compréhension du vieillissement cardiaque et à l'identification de l'étiologie des troubles cardiaques associés dans les populations humaines. Cependant, il est pratiquement impossible de déterminer les fondements génétiques de caractéristiques complexes chez l'homme, en raison de l'impossibilité de contrôler le contexte génétique et les interactions gène-environnement. La drosophile présente des similitudes frappantes avec l'homme en ce qui concerne le vieillissement cardiaque, et ses nombreux avantages permettent de l'utiliser comme modèle afin de caractériser l'architecture génétique du vieillissement cardiaque.

En nous appuyant sur une vaste collection de lignées consanguines issues du Drosophila Genetic Reference Panel (DGRP), nous fournissons une analyse précise de la sénescence cardiaque dans une population naturelle de mouches. Ceci a permis la découverte d'un nombre sans précédent de variants et de gènes significativement associés à la variation naturelle du vieillissement cardiaque. En particulier, ces gènes associés sont enrichis en gènes ayant des orthologues humains impliqués dans les maladies cardiaques et des artères coronaires, pointant à nouveau la conservation de la fonction cardiaque entre les deux espèces.

Nous nous sommes concentrés sur la fonction du facteur de transcription Pdp1 pour lequel plusieurs variants ont été trouvés associés à la variation naturelle du vieillissement de multiples traits fonctionnels cardiaques. Nous avons montré que Pdp1 régule directement la fonction cardiaque au cours du vieillissement par l'analyse de la fonction cardiaque *in vivo* en condition d'invalidation ou de surexpression de *Pdp1*. Nous avons suggéré que cette régulation de la fonction cardiaque passe par la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la fonction mitochondriale par Pdp1. En effet, Pdp1 est prédit pour réguler directement plusieurs gènes nucléaires impliqués dans la fonction mitochondriale, et l'invalidation de *Pdp1* dans le cœur adulte diminue le réseau mitochondrial dans les cardiomyocytes. De plus, *Pdp1* interagit génétiquement *MCU*, un gène nucléaire codant pour un canal calcique mitochondrial.

Dans l'ensemble, notre travail fournit une ressource unique concernant la génétique du vieillissement cardiaque dans une population naturelle.

**Dans cet article, j'ai réalisé l'intégralité des analyses fonctionnelles de Pdp1, ce qui comprend les analyses de la fonction cardiaque *in vivo* sur 3 transgènes différents, ainsi que leur analyse statistique, l'étude de la mitochondrie par imagerie confocale, de leur mise au point dans le laboratoire, à l'analyse des images, et enfin la détection *in vivo* de la fonction cardiaque en condition mutante pour Pdp1 et MCU et leur analyse statistique. J'ai analysé fonctionnellement les résultats des GWAS générés par S. Saha, co première auteure de cet article, et élaboré toutes les figures présentes sur cet article.**

# Natural variations of aging of cardiac performance in Drosophila identifies a central function for the PAR domain bZIP transcription factor *Pdp1/dHLF* in cardiac senescence

Katell Audouin[1]*, Saswati Saha[1,2]*, Laurence Röder[1], Sallouha Krifa[1], Nathalie Arquier[1,3], Laurent Perrin[1,3]**

*Equal contribution

**Author for correspondence (laurent.perrin@univ-amu.fr)

1- Aix Marseille University, INSERM, TAGC, UMR_S_1090, Turing Center for Living systems, Marseille, France

2- Present address: Argenx France SAS, 24, rue du Gouverneur Général Eboué 92130 Issy les Moulineaux, France.

3- CNRS, Marseille, France

**http://biorxiv.org/content/early/2024/10/01/2024.09.30.615759?ct**

**Summary**

The identification of genetic factors influencing cardiac senescence in natural populations is central to our understanding of cardiac aging and to identify the etiology of associated cardiac disorders in human populations. However, the genetic underpinning of complex traits in human is almost impossible, due to the infeasibility to control genetic background and gene-environment interactions. *Drosophila* has striking similarities in cardiac aging with humans, highlighting the conserved nature of cardiac aging for organisms with a heart. Leveraging on a large collection of inbred lines from the Drosophila Genetic Reference Panel (DGRP), we provide an accurate analysis of cardiac senescence in a natural population of flies. This permitted the discovery of an unprecedented number of variants and associated genes significantly associated to the natural variation of cardiac aging. We focused on the function of the PAR domain bZIP transcription factor Pdp1 for which several variants were found associated with natural variation of the aging of multiple cardiac functional traits. We demonstrated that *Pdp1* cell autonomously plays a central role in cardiac senescence and might do so by regulating mitochondria homeostasis. Overall, our work provides a unique resource regarding the genetics of cardiac aging in a natural population.

**Introduction:**

As for most traits in human populations, cardiac aging and common associated diseases and disorders have a complex genetic basis. Their manifestations depend on multiple, often interacting, segregating genes that also interact with environmental factors. Still, description and functional testing of the genetic architecture underlying cardiovascular aging is of fundamental importance, as it will impact our understanding of the biological basis of associated diseases. This however requires not only the identification of a detailed part list of genes affecting these traits, but also of the actual causal variants, their allele frequencies, molecular effects and individual as well as collective effects on organismal phenotypes.

The identification of loci at which alleles with subtle effects segregate in human populations through Genome Wide Association Studies (GWAS) has been performed for many complex traits including cardiovascular diseases. This led to the identification of large collections of loci potentially linked to cardiac function and disorders[1–4]. However, due to large blocks of linkage disequilibrium in the human genome, the identification of causal variants and genes is challenging. Furthermore, the genetic underpinning of complex traits in human populations is complicated by gene-gene interactions (epistasis) which may result in failure to reproduce associations in different populations with different genetic backgrounds, and by genotype-environment interactions which may result in lack of reproducibility between populations, when associations that are significant in one population in one environment cannot be resolved in another population under different environmental conditions. Altogether this makes the understanding of genetic architecture of complex traits a daunting challenge.

There is therefore a compelling need for comparative studies in model organisms. The genetically tractable *Drosophila* model system has proven to be a potent model in elucidating conserved genetic networks of heart development and of adult heart function and aging [5–10]. Human and fly hearts share many homologous and orthologous genes and gene products, including sarcomeric proteins and ion channels. Heart function can easily be manipulated *in vivo* and the effects of these manipulations are not immediately lethal ($O_2$ is delivered by a separate tracheal system) allowing quantitative analysis of malfunctioning hearts [11,12]. A number of cardiac aging studies in *Drosophila* have revealed striking similarities in cardiac aging with vertebrates/humans and *Drosophila,* both in terms of heart physiology and transcriptional changes [10,13–16]. This highlights the conserved nature of cardiac aging for organisms with a heart.

We recently investigated the natural variations of cardiac performances among a natural population of young (1 week) adult female flies. We used the Drosophila Genetic Reference Panel (DGRP), a community resource constituted of a panel of inbred lines that have been created by mating full siblings of wild-caught iso-female lines for 20 generations[17]. The use of inbred lines allows for assessing the effect of genetic variations on distinct but constant genetic backgrounds and teasing out the effect of genotype from environmental effects. We have used an established *in situ* heart preparation protocol that permits precise quantification of heart function in the fly[11]. We demonstrated substantial among-lines variations of cardiac performances and identified genetic variants associated with the cardiac traits that were extensively validated *in vivo*. This pointed out a central role of gene regulatory network deviations in the genetic architecture of these complex traits. Importantly, we documented correlations between genes associated with cardiac phenotypes in both flies and humans, which supports a conserved genetic architecture regulating adult cardiac function from arthropods to mammals[18].

Here we report an in-depth characterization of the aging of cardiac performance traits in flies, starting from a large panel of individuals in the DGRP, from 193 inbred lines analyzed both in young and aging females. Using statistical models based on individual phenotypes, the genome-wide association studies identified a large collection of variants that remained significant genome-wide after Bonferroni correction for multiple testing. Importantly, we found that a significant proportion of human orthologs of identified genes were identified in GWAS studies for cardiac disorders, further highlighting the conserved nature of cardiac functioning. We focused on the role of transcription factors (TFs) in the genetic architecture of natural variation of cardiac aging. We identified a central function for *PAR-domain protein 1* (*Pdp1*) - encoding a bZIP TF orthologous to human HLF and TEF TFs - in the control of senescence of both cardiac contractility and rhythmicity. We also provide several lines of evidence indicating that *Pdp1* may affect cardiac aging by regulating mitochondria number and physiology.

## Results

### Screening the DGRP for aging of heart performances

We previously reported the analysis of the genetic architecture of natural variations of cardiac performance traits in young adult females in the DGRP. Heart parameters were measured in 1-week-old females for 167 DGRP lines[18] using high-speed video recording of the heart beating on semi-intact preparations of individual flies[19,20]. Here, we wanted to identify the genetic variants associated with the age-dependent modifications of cardiac performance traits. 4 weeks old female flies of the same DGRP lines were therefore analyzed for cardiac performances using the same setup (12 females per lines). The high mortality rate we -and others[21]- observed in a significant proportion of DGRP lines from 30 days onward for standard laboratory temperature of 25°C prevented the analysis at older ages. A batch of 26 additional lines were analyzed at both ages, bringing the total number of lines analyzed to 193, representing a total of more than 4000 individual flies (2297 flies at 1 week, 2084 flies at 4 weeks, see Data S1).

High-speed videos were analyzed using the Semi automated Heartbeat Analysis software (SOHA, http://www.sohasoftware.com/) which allows quantification of several cardiac functional parameters (Figure 1A) allowing 8 different traits to be measured on each individual. We analyzed cardiac traits related to rhythmicity – systolic intervals (SI, time elapsed between the beginning and the end of the contraction), diastolic intervals (DI, time elapsed between two contractions), heart period (HP, the duration of a total cycle (HP= DI + SI)) and arrhythmia index, to evaluate the variability of the cardiac rhythm (AI, std-dev(HP)/ mean (HP)). We also analyzed cardiac traits related to contractility – the diameters of the heart in diastole (end diastolic diameter, EDD), in systole (end systolic diameters (ESD), and the fractional shortening which measures contraction efficiency (FS = (EDD-ESD)/EDD). In addition, cardiac output - which measures the volumetric flow rate of the heart (CO = SV/HP, where SV is the stroke volume (volume of hemolymph pumped by the heart per beat))- was also analyzed.

### Phenotypic description of heart aging in the DGRP

The 8 cardiac traits were compared between young (1 week) and aged (4 weeks) flies after performing quality control checks on the phenotype data (see M&M). Strong aging trends were observed across the different traits (see Figure 1B). Given the size of the sample analyzed, our phenotypic description of drosophila cardiac functional senescence in a natural population is unprecedented. Except for fractional shortening, which did not significantly change from 1 to

4 weeks in the DGRP population observed, all other cardiac performance traits displayed significant age-related modifications. In old flies, heartbeats were lengthened at all phases of the cardiac cycle (HP, DI, and SI were longer at 4 weeks compared to one week) and the arrhythmias index increased, slightly but significantly. In addition, we noticed a constriction of the heart both in diastole and in systole, with a reduction of EDD and ESD with age. Accordingly, cardiac output – which is a function of both heart rate and cardiac volumes- was strongly reduced at week 4. Figure 2A and Supp Figure 1A illustrate how, for each DGRP line, average cardiac trait values evolve from 1 to 4 weeks. Even in the case of FS, which at the level of the whole population appears not to be affected by age (figure 1B), DGRP lines show great variability in trends with age, suggesting a major influence of genetic factors that influenced the evolution of FS with age. Overall, the phenotypes were poorly correlated with each other, with the exception of HP with DI, EDD with ESD and, to a lesser extent, HP with SI (Figure 2B).

To assess the influence of genetic diversity on the evolution of cardiac traits we have computed the broad sense heritability (H2) (see M&M) for each phenotype. The broad sense heritability ranged from 0.165 (AI) to 0.399 (SI) (Table 1).

| **Cardiac traits** | **Nb lines 1w** | **Nb line 4w** | **Nb line 1w and 4w** | **$H_2$ (1 to 4 w)** |
|---|---|---|---|---|
| Arrhythmia Index | 181 | 178 | 166 | 0.165 |
| Cardiac Output | 178 | 168 | 155 | 0.271 |
| End Diastolic Diameter | 183 | 170 | 161 | 0.272 |
| End Systolic Diameter | 178 | 169 | 158 | 0.229 |
| Diastolic Interval | 186 | 178 | 172 | 0.258 |
| Fractional Shortening | 183 | 167 | 159 | 0.209 |
| Heart Period | 186 | 178 | 172 | 0.279 |
| Systolic Interval | 190 | 174 | 171 | 0.399 |

Table 1: Summary statistics over all DGRP genotypes assayed. Number of lines available for GWAS in each phenotype and at each age after QC check (see M&M). Broad sense heritability (H2) of evolution of traits means between 1 and 4 weeks suggested heritability of corresponding traits.

**Performing GWAS for natural variations of aging of cardiac performance**

To identify the potential candidate variants associated with the aging of cardiac traits, we performed a single marker GWAS using a linear mixed model on the DGRP phenotypes at 1 week and 4 weeks, accounting for the effects of Wolbachia infection and common polymorphism inversions (Figure 2C and Figure S1; see M&M). GWAS was performed separately for all eight cardiac traits and SNPs/variants were ranked based on their p-values.

SNPs were selected after a stringent statistical correction for false positives based on Bonferroni correction, derived by dividing 1,635,932 SNPs into 0.05, giving a genome-wise significance threshold of 3×10e-8 (Table S1, Figure 2C, and Figure S1; see M&M). The number of SNPs selected using the above threshold varied from 12 (CO) to 178 (EDD) and, overall, 380 unique variants were identified (see Table 2). Note that in most DGRP studies GWAS are performed on the mean of the phenotypes for DGRP lines, thereby restricting the power of the studies. Here, the linear mixed model was applied on individual cardiac performance traits of a large population of flies (> 8 individuals per line and per age, see M&M). These replicated measures enhanced the power of our associations.

Identified variants were mapped onto the dm6 genome in order to identify associated genes (Table S1). Compared to random expectation, variants were depleted for non-synonymous coding alleles and for mutations affecting genes 3' UTR (Figure 2D), suggesting that most deleterious mutations affecting cardiac aging were counter selected in the population. Selected variants mapped into 12 (CO) to 107 (EDD) genes (Table 2), identifying a total of 244 unique genes across the 8 cardiac traits analyzed. GWAS for senescence of HP and DI identified partially overlapping gene sets (Figure 2E), and the same was true, but to a lesser extent, for GWAS on ESD and EDD. This is in line with the correlations identified among corresponding phenotypes (Figure 2B).

| **Cardiac traits** | **variants** | **Genes** |
|---|---|---|
| Diastolic Interval | 25 | 20 |
| Systolic Interval | 40 | 29 |
| End Systolic Diameter | 65 | 38 |
| End Diastolic Diameter | 174 | 107 |
| Arrhythmia Index | 20 | 15 |
| Fractional Shortening | 39 | 33 |
| Heart Period | 24 | 17 |
| Cardiac Output | 12 | 12 |
| | *380* | *244* |

Table 2. Number of variants and genes identified by GWAS for the aging of cardiac performance trait. Total number of (non-redundant) variants and genes identified across all traits are indicated below.

**Functional annotations of associated genes**

Remarkably, GWAS for aging of ESD identified a variant within the *vrille* (vri) gene (Table S1), encoding a conserved bZIP transcription factor that we previously identified as a master regulator of cardiac aging[22]. In addition, the set of genes associated to ESD also included the *catalase* (*cat*) gene encoding a reactive oxygen species-scavenging enzyme, whose activity was demonstrated to prevent cardiac senescence[22]. The recovery of variants for both *vri* and *cat* in GWAS for cardiac aging represents strong arguments in favor of the accuracy of our association analyses.

In an attempt to gain insights into the biological processes affected by natural variation of cardiac senescence, we searched for Gene Ontologies annotations overrepresented within the set of genes identified across all GWAS (https://biit.cs.ut.ee/gplink/l/0YrfbOT9RO). Overall, only a few functional annotations were identified as overrepresented among GWAS associated genes – mainly related to development and morphogenesis. Enrichment analyses therefore did not allow the deciphering of enriched molecular and/or cellular processes affected in the genetic architecture of cardiac senescence. Strikingly however, when compared to the whole set of genes in the fly genome, GWAS associated genes are enriched for genes that have an ortholog in the human genome (FC 1,16, Table 3) indicating that, overall, genes associated to natural variations of cardiac aging have evolutionarily conserved functions. In addition, the set of drosophila genes identified here throughout GWAS for natural variations of cardiac aging is enriched for genes whose human orthologs have been found associated to cardiac disorder (FC 1,5) and to CAD (Coronary Artery Disfunction; FC 1,69), suggesting that cardiac aging in flies and cardiac pathologies in humans share an overlapping genetic basis.

The majority of the variants identified across all GWAS are located in introns, downstream and upstream of the candidate genes, or in intergenic regions (Table S1), suggesting that they affect cardiac senescence via modulation of gene expression. This may represent a common feature of the genetics underpinning of natural variation of complex traits. As a matter of facts, we already established that natural variation of cardiac performance in young flies primarily affect gene regulatory networks and identified a number of transcription factors involved[18]. Table 4 lists all the TFs identified in our GWAS.

Among all identified TFs, a few were retrieved in different GWAS and therefore associated to the natural variation of several cardiac aging traits. This in particular was the case for *Par domain protein 1* (*Pdp1*), an ortholog of mammalian HLF, DBP and VBP/TEF bZip transcription factors. Variants within the *Pdp1* gene were associated to variations of aging of ESD, EDD and SI, suggesting its involvement in the natural variations in the aging of both rhythmicity and contractility.

| | **Fly genome** | **GWAS Aging** | **Fold Change** | **pvalue** |
|---|---|---|---|---|
| Fly genes | 17895 | 244 | | |
| Human orthologs | 10647 | 168 | 1.16 | 0.001 |
| Coronary Artery Diseases | 451 | 12 | 1.69 | 0.027 |
| Cardiac Disorders | 1225 | 29 | 1.50 | 0.007 |

Table 3: Conserved genes associated with natural variations of aging of cardiac traits from flies to humans. Enrichment analyses for genes conserved in human and for genes whose human ortholog is associated with either coronary artery diseases (CAD) or cardiac disorders. Second row (human ortholog): Number of fly genes that display a human ortholog according to DIOPT (https://www.flyrnai.org/diopt; high and moderate rank, Table S2). Third and fourth rows: Number of genes whose human ortholog (high and moderate rank) has been associated with CAD or cardiac disorders by genome-wide associations studies (GWAS) in human populations[18]. Fold change (FC): Ratio between expected (based on successes observed on fly genome) and observed number of successes in respective GWAS gene sets. pval: hypergeometric p-value.

| Gene | FlybaseID | AI | EDD | DI | FS | HP | ESD | SI | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pdp1 | FBgn0016694 | | 1 | | | | 1 | 1 | 3 |
| dsf | FBgn0015381 | | 1 | | | | 1 | | 2 |
| CG15269 | FBgn0028878 | | | 1 | | 1 | | | 2 |
| shep | FBgn0052423 | | 1 | | | | | 1 | 2 |
| odd | FBgn0002985 | | 1 | | | | | | 1 |
| pum | FBgn0003165 | 1 | | | | | | | 1 |
| trx | FBgn0003862 | | | | | | 1 | | 1 |
| twi | FBgn0003900 | | | | 1 | | | | 1 |
| fd96Cb | FBgn0004898 | | 1 | | | | | | 1 |
| mirr | FBgn0014343 | | | | | 1 | | | 1 |
| vri | FBgn0016076 | | | | | | 1 | | 1 |
| Su-var-2-HP2 | FBgn0026427 | 1 | | | | | | | 1 |
| ADD1 | FBgn0026573 | | | | | | 1 | | 1 |
| CG3838 | FBgn0032130 | | 1 | | | | | | 1 |
| toe | FBgn0036285 | | | | 1 | | | | 1 |
| grh | FBgn0259211 | | | | 1 | | | | 1 |

Table 4: List of genes encoding transcription factor identified across GWAS for cardiac aging. Traits for which variants in genes were associated ( ($p<3e-8$) are indicated. Genes are ranked according to the number of traits for which they were identified, across all 8 GWAS (column 'total').

**Pdp1, a bZip transcription factor with multiple effects on cardiac senescence**

The *Pdp1* gene encodes multiple protein isoforms and is involved in a variety of biological processes. It regulates muscle genes expression during differentiation and was shown to control that of *Tropomyosin I*, possibly throughout interaction with Mef2[23]. It also regulates cellular lipid contents in fat body, similarly to mammalian HLF[24]. *Pdp1* is also involved in organismal growth control and its expression was shown to be sensitive to nutritional conditions[25]. In addition, it was characterized as an interactor of *vri* in clock neurons, forming together with *clock*, a second feedback loop in the drosophila circadian clock[26]. There, Pdp1 ε isoform and Vri display antagonistic activity, being respectively direct activator and repressor of the *clock* gene, by direct binding on the same DNA motif[26]. It was therefore striking to identify both *vri* and *Pdp1* in GWAS for natural variations of cardiac aging. As mentioned

above, *vri* impact on cardiac aging has been characterized previously and its loss of function significantly reduces age-related cardiac dysfunctions[22]. Hence, we investigated *Pdp1* function in the heart, taking advantage of a heart-specific inducible driver[22]. This allowed us to perform adult specific gene knock-down (KD) and over-expression (OE), independently of developmental effects. As shown in Figure 3, *Pdp1* KD markedly accelerated senescence of AI - whose increase throughout aging was amplified- and also enhanced the reduction of both systolic and diastolic diameters with age. On the contrary, *Pdp1* KD appeared to delay the effects of age on traits related to cardiac rhythm. We indeed observed a mild - but significant - reduction of SI increase with age, and a reduced DI and HP with age, while both parameters display an increased trend in controls. Similar trends, although less pronounced, were observed using an independent RNAi construct (Figure S4). Remarkably, the effects of *Pdp1* OE were opposite to those observed following its KD (Figure 3B). It markedly prevented AI increase from 1 to 7 weeks. Also, although the aging trend was not significant, *Pdp1* OE led to cardiac hypertrophy with age, more noticeable in diastole. Conversely, HP, DI, and SI increase with age were amplified. Overall, *Pdp1* contribution to cardiac aging appears to be complex, with beneficial (HP, DI and SI) or detrimental (ESD, DD, AI) effects, depending on the traits considered.

***Pdp1* may affect heart function through the regulation of mitochondria physiology**

We previously reported that the set of potential Vri cardiac targets during the aging process was strongly enriched in genes encoding mitochondrial proteins[22], suggesting that *vri* affects cardiac senescence by impinging on mitochondria function. Several variants located in nuclear gene encoding proteins involved in mitochondria function and physiology were retrieved in our GWAS (Table 5), supporting the implication of mitochondria (dys)function in cardiac aging. In addition, in an attempt to decipher the gene regulatory network(s) that may be affected by natural variation of cardiac aging, we used the i-cistarget method, which takes advantage of a comprehensive library of TF-binding motifs and of ChIP-seq experiments together with ranking statistics to predict potential regulatory TFs among set of genes[27]. We aimed to identify potential regulators of gene sets identified by GWAS that have variants associated to the natural variation of aging of cardiac traits. Remarkably, when genes associated to natural variations of ESD were used, Vri and Pdp1 were predicted as potential regulators by i-cisTtarget (https://gbiomed.kuleuven.be/apps/lcb/i-cisTarget/reports/e37e86a59b1774e6c4512368f40f7d4b40d42c81/report.html). In addition,

potential Vri and Pdp1 target genes included themselves together with *milt* and *larp*, that respectively regulate mitochondria transport[28–30] and mitochondrial protein translation, thus impinging on mitochondrial DNA (mtDNA) replication[31].

| Gene | FlybaseID | EDD | DI | FS | HP | ESD | SI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| milt | FBgn0262872 | | | | | 1 | |
| larp | FBgn0261618 | | | | | 1 | |
| MCU | FBgn0042185 | 1 | | | | 1 | |
| MICU1 | FBgn0039029 | 1 | 1 | | 1 | | |
| CG12464 | FBgn0033861 | | | | | | 1 |
| mRpL27 | FBgn0053002 | | | 1 | | | |
| Atg1 | FBgn0260945 | 1 | | | | | |
| CG9399 | FBgn0037715 | 1 | | | | | |
| Vsp13D | FBgn0052113 | 1 | | | | | |
| pmi | FBgn0044419 | 1 | | | | | |
| Cat | FBgn0000261 | 1 | | | | | |

Table 5: List of genes encoding proteins involved in mitochondria physiology identified across GWAS carried out for cardiac aging. Traits for which variants in these genes were associated ($p<3e-8$) are indicated.

Taken together, these observations suggested that, similar to its paralogous gene *vri*, *Pdp1* may affect cardiac function and aging at least in part by impinging on mitochondria function. To test this hypothesis, we analyzed mitochondria networks in cardiomyocytes from 1 week adult flies with heart specific knock down or over-expression of *Pdp1*. As shown both in longitudinal and transversal sections of hearts, *Pdp1* KD was associated to a reduction of mitochondria network in cardiac cells, where these organelles appeared restricted to the apical part of the cardiomyocytes, while they formed a much larger network in control cardiomyocytes (Figure 4 A-D and Figure S5). In addition, the fluorescent signal from mitochondria tethered GFP (mito-GFP) was significantly reduced in *Pdp1* KD heart (Figure 4G). *Pdp1* OE did not affect the size of the mitochondria network (Figure 4E, F) and had no significant effect on mito-GFP associated fluorescent signal (Figure 4G), though the signal appeared to be variable from heart to heart, with some hearts displaying a strong increase of GFP signal compared to controls (Sup Figure 5C).

To determine whether *Pdp1* function may be associated to mitochondria activity and/or physiology, we tested whether *Pdp1* interacts genetically with genes identified in the GWAS and encoding mitochondria proteins. We chose to test *MCU* (Mitochondrial Calcium Uniporter) which encodes the pore-forming subunit of the mitochondrial calcium uniporter channel (mtCU), a multi-protein complex that spans the inner mitochondrial membrane and is involved in the rapid uptake of calcium into the mitochondrial matrix[32–34]. Variants in *MCU* were associated to natural variations of aging of multiple cardiac traits (Table 5). In addition, a variants in *CG4704*, encoding the fly MICU1 ortholog[35] – one of the accessory regulatory proteins of the mtCU[36] – was also retrieved in our GWAS (Table 5). The identification of multiple variants in different mtCU components strongly suggested that calcium regulation of mitochondrial physiology might play a key role during cardiac aging. As shown in Figure 4 H and Figure S6, while flies heterozygous for loss of function mutations for *MCU* (*$MCU^{1}$*) and *Pdp1* (*$Df(3L)BSC631^{Pdp1}$*) displayed no or weak effects on cardiac traits, we found true genetic interactions between *$MCU^{1}$* and *$Df(3L)BSC631^{Pdp1}$* for several cardiac functional parameters, including HP, SI and MAD-HP – the latter measures HP variations and therefore illustrates cardiac arrhythmias. Indeed, regarding these traits, *$MCU^{1}$*; *$Df(3L)BSC631^{Pdp1}$* double heterozygous flies displayed phenotypes that were significantly different from both control flies and flies carrying single heterozygous alleles. These results are strong support for an involvement of *Pdp1* in regulating mitochondria function in the heart.

**Discussion**:

In this study, leveraging on a large collection of inbred lines from the DGRP and on the phenotypic characterization of over 4000 individuals, we provide an accurate analysis of cardiac senescence in a natural population of flies. This strategy permitted the discovery of an unprecedented number of variants (and associated genes) significantly associated to the natural variation of these complex traits. Indeed, a large number of variants remained significant after Bonferroni correction for multi-testing, a situation rarely encountered in GWAS using the DGRP collection. Despite the high number of variant we confidently associated to natural variations of cardiac aging, we failed to identify enriched annotations among the corresponding genes. This suggests that the deterioration of cardiac function with age is the result of complex interplays between a range of molecular and cellular processes. We however characterized an enrichment for genes whose orthologs are associated to cardiac disorders in humans, in agreement with the known conservation of cardiomyocytes structure, function and aging[37–39]. Our GWAS results therefore represent a unique resource regarding the genetics of cardiac aging in a natural population.

The genetic architecture of senescence of cardiac traits appears dominated by variants located in non-coding regions (introns, intergenic regions) that most probably affect gene expression regulation. To gain insight into the gene regulatory networks affected by natural variation of cardiac aging, we focused on natural variations that affected *Pdp1*, encoding a bZIP transcription factor paralogous to *vri* which we previously demonstrated to regulate cardiac aging. Importantly, variants within *Pdp1* were independently associated with the senescence of EDD, ESD and SI and both *vri* and *Pdp1* were themselves predicted as transcriptional regulators of a set of genes identified in GWAS for natural variations of aging of ESD.

In agreement with our GWAS results, heart specific knock down or overexpression of *Pdp1* profoundly affected the modification of several cardiac traits with age. In the case of traits related to rhythm (HP, DI, SI), *Pdp1* KD prevented the effects of age on these cardiac traits, what supports a function of *Pdp1* in promoting cardiac aging. Conversely, with respect to arrhythmia index and systolic and diastolic diameters, *Pdp1* KD accelerated heart senescence, indicating that *Pdp1* function rather prevented cardiac aging of these specific traits.

Hence *Pdp1* function during cardiac aging appears complex. Opposite contributions to cardiac aging may be supported by distinct isoforms, since the *Pdp1* locus encodes at least 6 isoforms[40]. Further characterization of isoform specific contributions will be necessary to disentangle the contribution of *Pdp1* to cardiac aging.

*Pdp1* effects on the modifications of cardiac performances with age may be mediated, at least in part, by its impact on mitochondria physiology. Indeed, *Pdp1*, together with *vri*, was predicted to regulate genes implicated in the control of mitochondria activity. In addition, we showed that modulating *Pdp1* cardiac activity impacted the size of cardiomyocytes mitochondria network and we characterized a genetic interaction between MCU, a key component of calcium mitochondria homeostasis, and *Pdp1*.

Given the central role of mitochondria in energy metabolism and cell survival, the heart is highly susceptible to perturbations of mitochondria homeostasis. Mitochondrial influence on age related cardiac dysfunctions is therefore largely recognized[41,42]. We indeed identified variants in several regulators of mitochondria physiology, such as *larp*, *Milton*, *Catalase*, together with *MCU* and *MICU1*, two components of mtCU, the mitochondria Calcium Uniporter. This suggests a sensitivity of cardiac aging to variations in mitochondria physiology. Interestingly, our GWAS did not revealed variant in genes encoding core components of mitochondria activity - such as ETC (electron transport chain) components - associated with natural variation of cardiac aging. Not surprising, this observation suggests a strong selection pressure on alleles for these genes, that may have therefore been subjected to selection purification. Overall, our observations demonstrate that, in a natural population, the effects of mitochondria dysfunctions on heart function impact the genetic architecture of its aging. By suggesting that the bZIP transcription factor *Pdp1* – and possibly its paralogue *vri*- controls mitochondria physiology in cardiomyocytes throughout the regulation of some key component that regulate mitochondria homeostasis, our results pave the way towards the identification of a regulatory network involved in heart senescence and regulating mitochondria's activity.

*Pdp1* and *vri* have been shown to be regulators of the core clock gene *clock* in the central nervous system[26,40], thus playing an essential role in the circadian oscillator in clock neurons. Whether both genes are also involved in setting the circadian clock in the heart is an open question and it is tempting to speculate that *Pdp1* activity in the heart - and its impact on cardiac aging - may be also related to an effect on the circadian clock. Indeed, several data from mice indicate that aberrant regulation of cardiomyocytes circadian clock contribute to the etiology of cardiac dysfunction and diseases[43]. In flies, reinforcing the circadian oscillator by time restricted feeding was shown to improve cardiac function with age, supporting the contribution of the circadian clock to healthy cardiac aging[44]. Several data from Gill et al[44] suggested however that an hypothetical *Pdp1* contribution to cardiac intrinsic circadian clock

may not be linked to its effect on cardiac aging. Indeed, while we observed a marked increase of AI following cardiac *Pdp1* knock down, loss of function alleles for clock genes displayed no (*clk*$^{ar}$) or opposite effects (*cyc*$^{01}$, *per*$^{01}$ and *tim*$^{01}$) at 5 weeks of age. In addition, neither *Pdp1* nor *vri* cardiac expression was found modified upon time restricted feeding – which seems to exclude their involvement in improved cardiac function upon circadian rhythm reinforcement.

*Pdp1* has been implicated in a plethora of biological processes. By describing yet another function for this bZIP transcription factor, our study put forward the idea of the pleiotropic function of *Pdp1* in processes as diverse as muscle differentiation[23], circadian clock regulation[26], neoplastic growth[45], organismal growth control[25] and cardiac functional senescence (this study). Pdp1 is highly homologous to the PAR subfamily of mammalian bZIP transcription factors HLF, DBP and VBP/TEF. Our results therefore may highlight possible processes and diseases affected by these TFs in humans.

## Methods

### Fly strains and husbandry

Fly stocks from the DGRP collection were obtained from Bloomington Drosophila Stock Centre. Flies were reared on standard corn flour medium at 25°C, 50% relative humidity and 12h light/dark cycles. Newly emerged adults (less than 24h) where collected and housed for 7 days or 28 days. 12 flies per DGRP line where dissected and used for high- speed movie capture.
The gene switch experiments were done using R94C02::tdTomato (attP2) (hereafter called tdtk)[10] combined with Hand-Geneswitch as a stable stock. Driver-line (tdtk; Hand>Genewitch) virgins were crossed to UAS-RNAi males, UAS-Overexpression males or corresponding isogenic control males. Flies were raised at 25°C on standard fly food. Flies were collected within 24 hours of eclosion under brief CO2 anesthesia and housed in groups of 25. Fly food contains 82.5 mg/ml Yeast, 34 mg/ml Corn meal, 50mg/ml Sucrose, 11,5 mg/ml Agar, 0,5% Methyl 4-hydroxybenzoate (stock solution: 200g/l in ethanol) and RU 232,5 µM (stock solution: 20mg/ml in ethanol) for the RU100 condition (equivalent volume of ethanol was added in the RU0 control condition). Flies were raised at 25°C under a 12hr-12hr light cycle and transferred every two days onto fresh food.
Confocal imaging were realized using UAS-mitoGFP combined with Hand-GAL4 as a stable stock. Driver line (Hand>mitoGFP) virgins were crossed to UAS-RNAi males, Overexpression males or UAS-RNAi control males. To avoid developmental defects, flies were raised at 18°C on standard fly food throughout development and collected within 24 hours of eclosion under brief CO2 anesthesia and housed in groups of 25. Flies were raised at 25°C for 1 week under a 12hr-12hr light cycle and transferred every two days onto fresh food.
The *Pdp1* defficiency, *Df(3L)BSC631*, was recombined with tdtk as a stable line. All mutant lines were backcrossed into the same isogenic control background. *Df(3L)BSC631*, tdtk and tdtk control virgins were crossed with $MCU^{1}$ mutant line or isogenic control line. Flies were raised on standard fly food and kept at 18°C. Female progeny were collected and aged to 1 week at 25°C, at which point they were imaged and analyzed.

| Name | Genotype | Origin |
|---|---|---|
| Hand>Geneswitch | w ; tdtk ; Hand-Geneswitch | |
| Hand>mitoGFP | w ; Hand-GAL4, UAS-mitoGFP ; | |
| KD_*Pdp1* | w ; UAS-Pdp1-RNAi ; | VDRC – 110551 |
| OE_*Pdp1* | w ;; UAS-Pdp1-3HA | FlyORF – F001683 |
| KD_*Pdp1* (2) | y[1],v[1] ; UAS-Pdp1-RNAi ; | BDSC – BL40863 |
| WT (KD_*Pdp1*) | w ;; | VDRC – 60100 |
| WT (OE_*Pdp1*) | y[1],v[1] ;; UAS-GFP | BDSC – BL35786 |
| WT (KD_*Pdp1* (2)) | y[1],v[1] ; UAS-Send2-RNAi ; | BDSC - BL42850 |
| $MCU^{1}$ | w ;; MCU[1]/TM6B | Gift from A.Whitworth |
| $Df(3L)BSC631^{Pdp1}$ | w ;; Df(3L)BSC631/TM6C | BL25722 |
| Tdtk | w ; sco/CyO ; tdtk (attp2) | |

**Semi-intact preparations and SOHA analysis of DGRP strains**

Analysis of cardiac function parameters on DGRP flies was achieved on denervated, semi-intact adult female *Drosophila*[19]. 3000 frames of movies were taken at high speed (140fps) with a Hamamatsu ORCAFlash4.0 digital CMOS camera (Hamamatsu Photonics) and using HCI imaging software (Hamamatsu Photonics). These movies were processed using SOHA (http://www.sohasoftare.com/) to measure cardiac parameters.

**Heritability**

Heritability is the quantification of the overall phenotypic variation that is attributable to genetic factors. Estimating heritability for complex traits like aging is not straightforward and here we have used a bootstrap approach to obtain heritability due to phenotype aging. For each phenotype, after quality control (see below), from 167 to 175 lines were retained, with 8-12 replicates (individuals) per line at each age. For the DGRP dataset we cannot track the same fly at age 1 and age 4 because to extract the phenotype, the flies are dissected. Hence, we have created bootstrap datasets where within a line, the phenotype for all possible observations at age 1-Week is paired with all possible observations at age 4-Week. For instance, if for line 1, we have 8 observations at age 1 Week and 10 at age 4 Week, then the new bootstrap dataset will have 80 observations, where each age 1 Week observation is paired with each age 4 Week observation. We have used this bootstrap data to obtain the trait difference between age 4 Week and age 1 Week and then calculated the heritability estimates based on the bootstrapped dataset with the trait difference between the two ages. Essentially, the above approach helps us randomly select all possible aging trends from our sample of flies from week 1 to week 4 and determine the heritability of overall aging trend in the DGRP population for each phenotype. We have alternatively also tried to randomly draw 12 observations per line within each age and

create a dataset with 167-175 lines (depending on the phenotype) and 12 observations at each age and calculated the heritability estimates based on the trait difference between the two ages. We arrived at approximately similar estimates for heritability with the above two approaches.

**GWAS analyses**

Quality Control (QC) was done for each phenotype at each age separately. All phenotype distributions were treated for outliers using standard outlier treatment i.e., removing the observations that lie outside the range [Q1-1.5*IQR; Q3+1.5*IQR], where Q1/Q3 are the first and third quartile of the phenotype values in each line and IQR = Q3- Q1. The removed data were validated by the biologists as technical outliers by looking back at the original experimental results. For GWAS analysis of aging cardiac traits, only those lines that display at least 8 individuals at both 1 and 4 weeks were retained. Depending on the trait, GWAS was performed on 155 to 172 lines (see Table 1).

After quality control, the 8 cardiac traits were compared between 1 week and 4 weeks and except for fractional shortening, there was a strong effect of aging on the phenotype evident from the descriptive plots (box plots) of the phenotype distribution (see Figure 1B). We have also performed quality control on the pooled data from all the lines at each age and removed outliers using a similar method as stated above. In addition, we have conducted a statistical two-sample t-test to test if the phenotype trend varies with age (see Figure S1). Almost, all the traits significantly vary with age except fractional shortening. Spearman correlations were also calculated based on the difference between the average of line means at each age for each cardiac trait (see Figure 2E).

Genotype data linked to the cardiac phenotypes were obtained using the GWAS web tool developed for DGRP by Mackay[17]. It comprised four million high-quality SNPs among which 95% were homozygous. Typical quality assurance procedures involving maintaining the genotype call (GC) rate at 90% for each chromosome, removing SNPs with minor allele frequency (MAF)>0.019 (that is in 3 lines out of 155, where approximately 155-172 lines were available for GWAS after QC with line observations available at both ages) were performed to get rid of any poor-quality genotype data.

After the QC checks, single marker GWAS was performed on 1,635,932 SNPs from the DGRP data using a linear mixed model (LMM). When testing a marker for association with the phenotype, LMM is a standard application in GWAS, where the variables of interest are modeled as fixed, whereas random effects account for nuisance variation and are integrated out[46]. The linear mixed model included the following covariates: Wolbachia infection status,

common polymorphic inversions (data provided by the DGRP Consortium), dates on which the flies were dissected, age of the fly, the SNP (one SNP at a time), the interaction between SNP and age as fixed effects and the strain within each age as random effect. The significance of the interaction between SNP and age in the above model determines the impact of SNP on the aging of the phenotype and helps in determining the list of significant markers that have an impact on aging. SNPs were selected after correction of obtained p values for multi-testing using genome wide Bonferroni adjustment method, the threshold for selection at p< 0,05 was 3 10e-8 (~0.05/1,635,932). Note that GWAS analysis on DGRP data is primarily conducted on phenotype line means, but in this study, we have used LMM on the individual phenotypes using all the replicates within each line thereby increasing the overall power of the study.

**Annotation of variants according to dm6**

Variants present in the DGRP population (VCF file downloadable on the DGRP website: www.dgrp2.gnets.ncsu.edu) were annotated according to dm6 using Variant Effect Predictor (VEP, Ensembl, https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP, default parameters). The following pipeline was then applied to prioritize annotations of each variant. Annotation within one (or more) gene exons were first selected. If the variant was not in a gene exon, annotations within an intron and/or 1kb upstream or downstream of a gene were selected. If the variant was not annotated previously, the closest gene (5kb max) was selected upstream or downstream. If no gene was within this reach, the SNP was annotated in the intergenic region.

**Statistical analysis of DGRP cardiac traits:**

Phenotypic correlation between each trait pair was computed using Spearman correlation. Pearson chi-squared test was applied to test if the genomic location of variants associated with cardiac traits is biased toward any particular genomic region when compared against the whole set of variants in the entire genome of the DGRP population. Quantification of the overlap between the gene sets associated with the different cardiac traits was done using the overlap coefficient/overlap index.

**Human orthologs**

DIOPT v9.0 (https://www.flyrnai.org/diopt, default parameters) was used to identify orthologs of fly and human gene lists (lien site web). Human gene lists were compiled as described previously[18] for enrichment analysis of Cardiac Disorder and Coronary Artery Diseases.

Enrichment p-values were based on a test following the hypergeometric distribution. Enrichment (FC) were calculated as the ratio between observed and expected successes in samples (based on the observations in the population).

**G profiler and i-cisTarget analysis:**

Gene Ontology enrichments were analysed using g:Profiler (https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost) with default parameters (except Organism = Drosophila melanogaster).

Transcription factor enrichment analysis was done on the genes associated with the End Systolic Diameter using i-cisTarget (https://gbiomed.kuleuven.be/apps/lcb/i-cisTarget/index.php) with default parameters.

**In vivo imaging of fly hearts**

For *in vivo* imaging of beating hearts, flies were mounted as described[10] and were illuminated with green light (3 mW power). Five seconds movies of the beating heart were acquired at 300 fps and high-speed recordings were then processed using a custom R script[47].

Each experiment was independently normalized. Each individual was normalized to the mean of their control condition, then plotted altogether. Aging trends were modelized using a linear model and compared with an ANOVA test. For single age analysis, a Wilcoxon test was applied between conditions.

**Immunochemistry**

1 week old female flies were dissected in 1X-PBS (Gibco ref:10010-15) to remove the ventral part of the abdomen, the gut and ovaries to expose the heart. For antibody staining, individuals were fixed for 1 hour in 1×PBS and 4% paraformaldehyde at room temperature, washed with BBT (1×PBS, 0.1% Tween 20 (VWR, ref:28829.296), 0.1% BSA (Euromedex, ref:04-100-810-C), permeabilized for 1 hour in 1×PBS, 1% Triton X-100, washed 3 times with BBT, and incubated for 60 minutes with saturation medium (1×PBS, 0.1% Tween 20, 10% BSA). Primary antibody (chicken anti-GFP at 1:10000 dilution (Abcam, ref: AB13970) was incubated overnight at 4°C in BBT. After 4 washes (15' each) in BBT, samples were incubated for 60 minutes with saturation medium at RT, and for 1 hour at RT with anti-chicken Alexa 488 antibody (Life technology, ref:A11039, 1:500 dilution) in BBT and washed 4 times in BBT. Samples were then incubated for 20 minutes in saturation medium, 10 minutes in saturation medium with phalloïdine-555 (Invitrogen, ref:A34055, 1:1000 dilution) and washed with BBT before mounting them in VectaShield (Vector Laboratories, H-1900).

**Confocal imaging**

Observations and images acquisitions were carried out using a LSM 780 Zeiss confocal microscope. Fluorescence quantification was achieved for each heart on 2 to 4 cardiomyocytes of segment A2 and A3, one 1 Z-stack where the pair of ostia is visible. A square of 200px by 200px for each quantification was used to measure the average fluorescence intensity of the GFP by measuring for each pixel the grey intensity using Fiji/ImageJ. Wilcoxon test was applied to calculate statistical difference between control and tested condition.

**Author contributions**

Katell Audouin: Investigation, formal analysis, visualization, Writing - editing. Saswati Saha: Data curation, Formal analysis, Visualization, Methodology, Writing - original draft. Laurence Röder: Investigation, Writing - editing. Sallouha Krifa: ressources. Nathalie Arquier: Funding acquisition, ressources, Writing - editing. Laurent Perrin: Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Project administration.

**Acknowledgements**

The project leading to this manuscript has received funding from Excellence Initiative of Aix-Marseille University - A*MIDEX (A*Midex International) to LP, A*MIDEX PEP to NA (AMX-21-PEP-020), and ANR (grant n°ANR-22-CE17-0051-03) to NA. We thank the Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC), the Vienna Drosophila Research Center (VDRC) and A. Whitworth for fly stocks. Centre de Calcul Intensif d'Aix-Marseille is acknowledged for granting access to its high-performance computing resources.

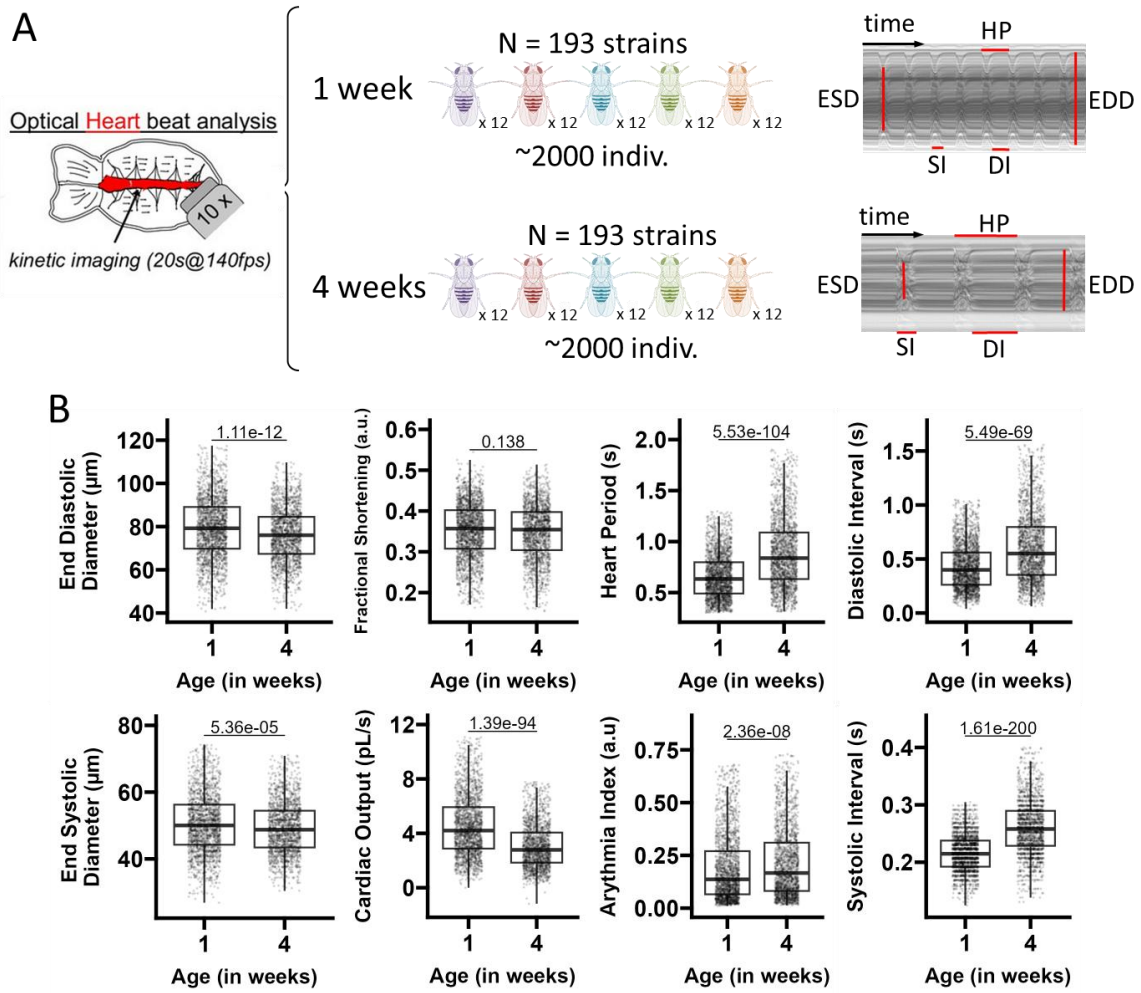
We thank Frederic Gallardo and Tahagan Titus for their technical assistance in fly food preparation. and E. Castellani from the IBDM Imaging Facility and France Bio-Imaging infrastructure - ANR-10 INBS-04-01.

**Bibliography**


1. Roselli, C. *et al.* Multi-ethnic genome-wide association study for atrial fibrillation. *Nat. Genet.* **50**, 1225–1233 (2018).
2. Verweij, N. *et al.* The Genetic Makeup of the Electrocardiogram. *Cell Syst* **11**, 229-238.e5 (2020).
3. Shah, S. *et al.* Genome-wide association and Mendelian randomisation analysis provide insights into the pathogenesis of heart failure. *Nat Commun* **11**, 163 (2020).
4. van Setten, J. *et al.* PR interval genome-wide association meta-analysis identifies 50 loci associated with atrial and atrioventricular electrical activity. *Nature Communications* **9**, 2904–2904 (2018).
5. Wolf, M. J. *et al.* Drosophila as a model for the identification of genes causing adult human heart disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1394–9 (2006).
6. Ocorr, K. *et al.* Genetic Control of Heart Function and aging. *Trends in Cardiovascular Medicine* **17**, 177–182 (2007).
7. Rosenthal, N., Harvey, R. P., Bodmer, R. & Frasch, M. Development and Aging of the Drosophila Heart. in *Heart Development and Regeneration* 47–86 (2010).
8. Piazza, N. & Wessells, R. J. Drosophila models of cardiac disease. *Progress in molecular biology and translational science* **100**, 155–210 (2011).
9. Ocorr, K. *et al.* Age-dependent electrical and morphological remodeling of the Drosophila heart caused by hERG/seizure mutations. *PLoS genetics* **13**, e1006786 (2017).
10. Klassen, M. P. *et al.* Age-dependent diastolic heart failure in an in vivo *Drosophila* model. *eLife* **6**, 209–218 (2017).
11. Ocorr, K., Fink, M., Cammarato, A., Bernstein, S. & Bodmer, R. Semi-automated Optical Heartbeat Analysis of small hearts. *Journal of visualized experiments : JoVE* 3–6 (2009) doi:10.3791/1435.
12. Ocorr, K., Akasaka, T. & Bodmer, R. Age-related cardiac disease model of Drosophila. *Mechanisms of ageing and development* **128**, 112–6 (2007).
13. Wessells, R. J., Fitzgerald, E., Cypser, J. R., Tatar, M. & Bodmer, R. Insulin regulation of heart function in aging fruit flies. *Nature genetics* **36**, 1275–81 (2004).
14. Ocorr, K. *et al.* KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in Drosophila that mimic the effects of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 3943–8 (2007).
15. Monnier, V. *et al.* dJun and Vri/dNFIL3 Are Major Regulators of Cardiac Aging in Drosophila. *PLoS Genetics* **8**, (2012).
16. Cannon, L. *et al.* Expression patterns of cardiac aging in Drosophila. *Aging Cell* **16**, 82–92 (2017).
17. Mackay, T. F. C. *et al.* The Drosophila melanogaster Genetic Reference Panel. *Nature* **482**, 173–8 (2012).
18. Saha, S. *et al.* Genetic architecture of natural variation of cardiac performance from flies to humans. *eLife* **11**, e82459.
19. Fink, M. *et al.* A new method for detection and quantification of heartbeat parameters in Drosophila, zebrafish and embryonic mouse heart. *Biotechniques* **46**, 101–113 (2010).
20. Cammarato, A., Ocorr, S. & Ocorr, K. Enhanced assessment of contractile dynamics in Drosophila hearts. *BioTechniques* **58**, 77–80 (2014).
21. Huang, W. *et al.* Context-dependent genetic architecture of Drosophila life span. *PLOS Biology* **18**, e3000645 (2020).
22. Monnier, V. *et al.* dJun and Vri/dNFIL3 Are Major Regulators of Cardiac Aging in

Drosophila. *PLoS Genetics* **8**, (2012).
23. Lin, S.-C., Lin, M.-H., Horváth, P., Reddy, K. L. & Storti, R. V. PDP1, a novel Drosophila PAR domain bZIP transcription factor expressed in developing mesoderm, endoderm and ectoderm, is a transcriptional regulator of somatic muscle genes. 12.
24. Dzitoyeva, S. & Manev, H. Reduction of Cellular Lipid Content by a Knockdown of *Drosophila PDP1γ* and Mammalian Hepatic Leukemia Factor. *Journal of Lipids* **2013**, e297932 (2013).
25. Reddy, K. L., Rovani, M. K., Wohlwill, A., Katzen, A. & Storti, R. V. The Drosophila Par domain protein I gene, Pdp1, is a regulator of larval growth, mitosis and endoreplication. *Developmental Biology* **289**, 100–114 (2006).
26. Cyran, S. A. *et al.* vrille , Pdp1 , and dClock Form a Second Feedback Loop in the Drosophila Circadian Clock University of Illinois at Chicago. *cell* **112**, 329–341 (2003).
27. Potier, D., Atak, Z. K., Sanchez, M. N., Herrmann, C. & Aerts, S. Using cisTargetX to Predict Transcriptional Targets and Networks in Drosophila. *Methods In Molecular Biology Clifton Nj* **786**, 291–314 (2012).
28. Pekkurnaz, G., Trinidad, J. C., Wang, X., Kong, D. & Schwarz, T. L. Glucose Regulates Mitochondrial Motility via Milton Modification by O-GlcNAc Transferase. *Cell* **158**, 54–68 (2014).
29. Cox, R. T. & Spradling, A. C. Milton controls the early acquisition of mitochondria by Drosophila oocytes. *Development* **133**, 3371–3377 (2006).
30. Glater, E. E., Megeath, L. J., Stowers, R. S. & Schwarz, T. L. Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* **173**, 545–557 (2006).
31. Zhang, Y. *et al.* PINK1 Inhibits Local Protein Synthesis to Limit Transmission of Deleterious Mitochondrial DNA Mutations. *Mol Cell* **73**, 1127-1137.e5 (2019).
32. Baughman, J. M. *et al.* Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 341–345 (2011).
33. Garbincius, J. F., Luongo, T. S. & Elrod, J. W. The debate continues – What is the role of MCU and mitochondrial calcium uptake in the heart? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **143**, 163–174 (2020).
34. Garbincius, J. F. & Elrod, J. W. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease. *Physiol Rev* **102**, 893–992 (2022).
35. FlyBase Gene Report: Dmel\CG4704. https://flybase.org/reports/FBgn0039029.htm.
36. Csordás, G. *et al.* MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial $Ca^{2+}$ uniporter. *Cell Metab* **17**, 976–987 (2013).
37. Zhao, Y., van de Leemput, J. & Han, Z. The opportunities and challenges of using Drosophila to model human cardiac diseases. *Frontiers in Physiology* **14**, (2023).
38. Perrin, L. & Röder, L. Cardiac pathologies and aging: Lessons from a tiny heart. *Medecine/Sciences* **32**, (2016).
39. Diop, S. B. & Bodmer, R. Gaining Insights into Diabetic Cardiomyopathy from Drosophila. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **26**, 618–627 (2015).
40. Zheng, X. *et al.* An isoform-specific mutant reveals a role of PDP1 epsilon in the circadian oscillator. *J Neurosci* **29**, 10920–10927 (2009).
41. Picca, A. *et al.* Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ageing. *Nat Rev Cardiol* **15**, 543–554 (2018).
42. Sagar, S. & Gustafsson, A. B. Cardiovascular aging: the mitochondrial influence. *J Cardiovasc Aging* **3**, 33 (2023).
43. Martino, T. A. & Young, M. E. Influence of the cardiomyocyte circadian clock on cardiac physiology and pathophysiology. *J Biol Rhythms* **30**, 183–205 (2015).
44. Gill, S., Le, H. D., Melkani, G. C. & Panda, S. Time-restricted feeding attenuates age-

related cardiac decline in Drosophila. *Science* **347**, 1265–1269 (2015).
45. Logeay, R. *et al.* Mechanisms underlying the cooperation between loss of epithelial polarity and Notch signaling during neoplastic growth in Drosophila. *Development* **149**, dev200110 (2022).
46. Lippert, C. *et al.* FaST linear mixed models for genome-wide association studies. *Nat Methods* **8**, 833–835 (2011).
47. Vogler, G. 2022. R-script to analyze fluorescent Drosophila melanogaster hearts. 17d63fb. Github. https:// github.com/kaustubhad/fastman




**<u>Figure 1.</u> Cardiac aging in the DGRP**

A. Cardiac performance traits were analyzed on 1 week and 4 weeks old females flies from 193 DGRP lines on semi-intact preparations of *ex-vivo* isolated hearts (see M&M). Up to 12 individuals per DGRP line were analyzed. Total number of individuals examined are indicated. Right: Representative M-modes at 1 week and 4 weeks. DI = Diastolic Interval; SI = Systolic Interval; HP = Heart Period; EDD = End Diastolic Diameter; ESD = End Systolic Diameter. Fractional Shortening (FS = EDD - ESD/EDD), Arrythmia index (AI = Std Dev(HP)/HP) and Cardiac output (CO = ($\pi$(EDD$^2$/2) - $\pi$(ESD$^2$/2))/HP) were also measured.

B. Boxplot of all individual fly phenotypes compared between 1 and 4 weeks in the whole DGRP population analyzed. Wilcoxon rank sum test was applied to test the significance between 1- and 4-weeks values.

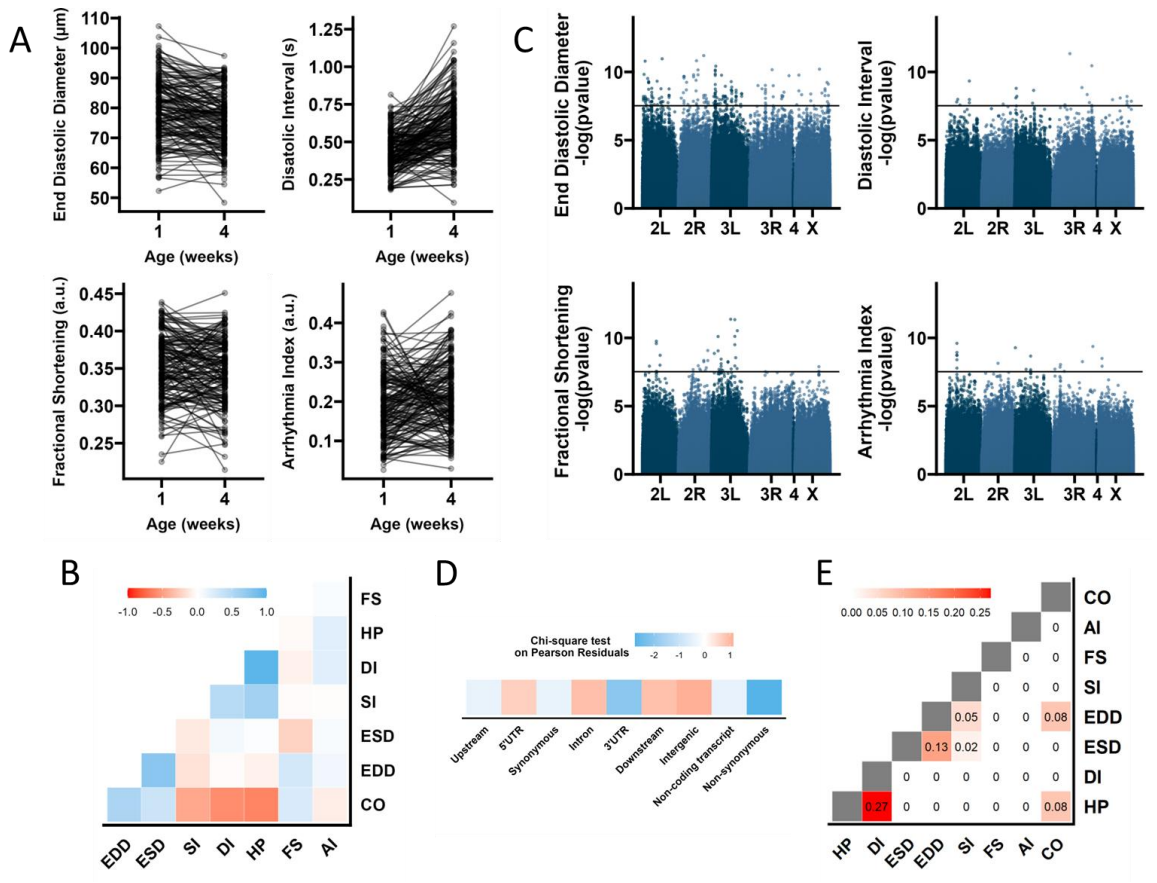



**Figure 2. Genome-Wide associations studies (GWAS) for aging of cardiac performance in the DGRP.**

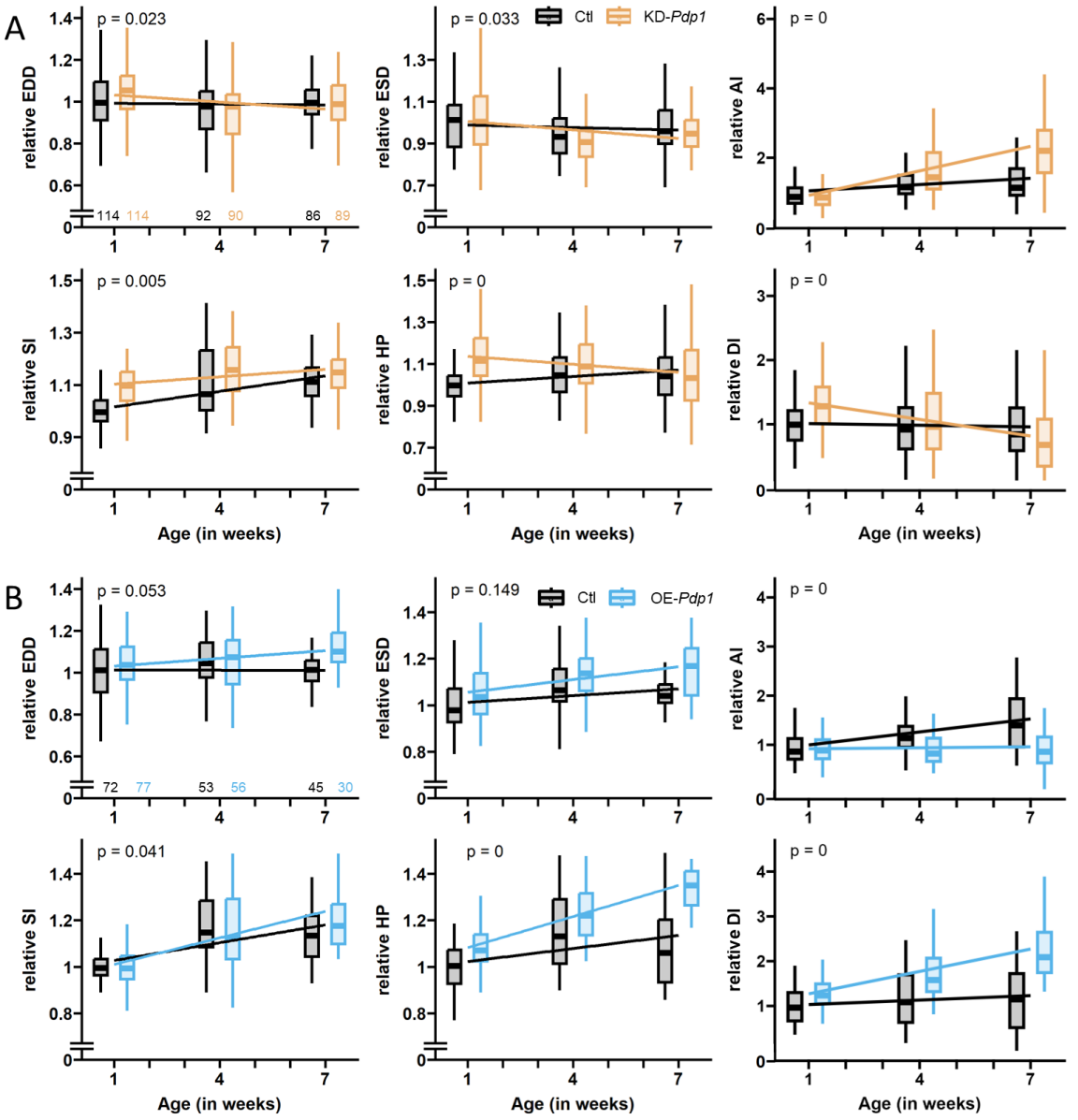
A. Reaction norm plot of phenotypic mean for all DGRP lines at 1 and 4 weeks for EDD, FS, DI and AI phenotypes (see Figure S1 for other traits). The mean phenotypic values for each line at each age are connected by a line, allowing to monitor the trend differences among DGRP lines.

B. Overall correlations between senescence of cardiac traits in the DGRP. Spearman correlations were calculated based on the difference between the average of line means at each age for each cardiac trait.

C. Manhattan plot showing the results of GWAS performed on cardiac traits modifications with age (see Figure S1 for other traits). The genome wide significance threshold (3e-8) is indicated by a black line.

D. Pearson residuals of chi-square tests from the comparison of randomly selected SNP in the DGRP with variants associated with cardiac traits. According to Variant Effect Predictor (VEP) and a custom pipeline of annotation priorization (see M&M), SNPs are attributed to different localization categories. SNPs are attributed to genes if they are within the gene transcription unit (5' and 3' UTR, synonymous and non-synonymous coding, introns) or within 5 kb from transcription start site (TSS) and transcription end site (TES) (5 kb upstream, 5 kb downstream). Intergenic: SNPs not attributed to genes (>5 kb from TSS and TES).

E. Overlap coefficient of gene sets associated with the different cardiac traits analyzed.




**<u>Figure 3.</u> Heart-specific conditional knock-down (KD) or overexpression (OE) of *Pdp1* modulate cardiac senescence.**

Cardiac performance was analyzed on intact anesthetized females flies at indicated ages. Number of individuals analysed are indicated on the first plot for each genotype. Individual values were normalized to the mean of the control condition at 1 week. Linear model was applied to analyze the statistical difference between aging trends of control and either *Pdp1* knock-down (A) or over-expression (B).

(A) Effect of *Pdp1* RNAi mediated gene knockdown (KD). w/w; tdtk/UAS>dsRNA(*Pdp1*)$^{VDRC\text{-}KK}$ ; Hand>GeneSwitch-Gal4 /+ flies fed (KD-*Pdp1*) or not (Ctl) with 100µg/ml of RU486 from adult eclosion onward were imaged at 1 week, 4 weeks and 7 weeks.

(B) Effect of *Pdp1* over expression (OE). w/w; tdtk/UAS>*Pdp1*; Hand>GeneSwitch-Gal4 /+ flies fed (OE-*Pdp1*) or not (Ctl) with 100µg/ml of RU486.

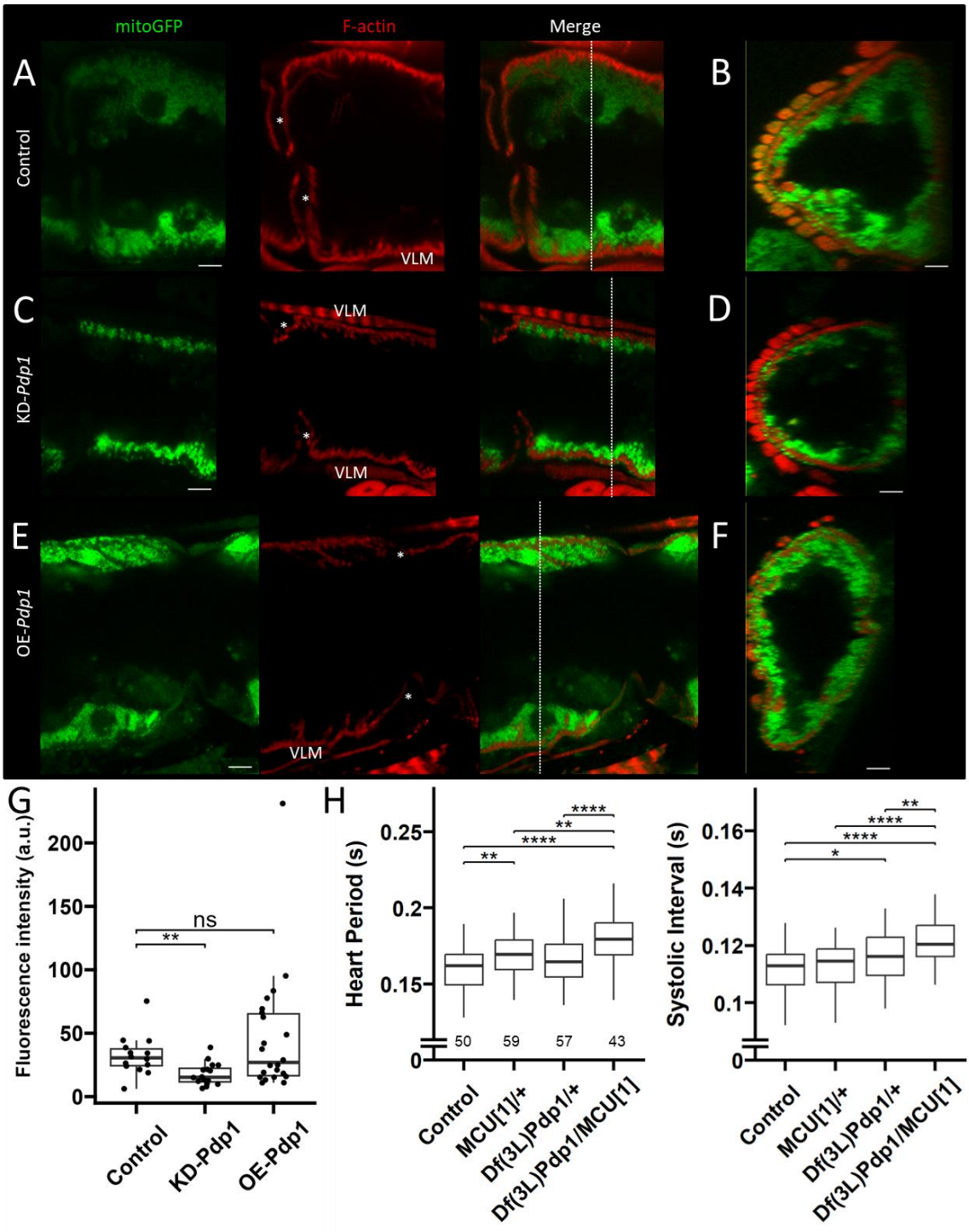



**Figure 4.** ***Pdp1*** **loss of function affects mitochondria accumulation and genetically interact with** ***MCU*****.** (Legend on the right page)

**Figure 4.** ***Pdp1*** **loss of function affects mitochondria accumulation and genetically interact with** ***MCU*****.**
(A-F) Confocal imaging of fixed hearts stained for mitochondria tethered GFP (mitoGFP) and filamentous actin (F-actin) of control (A-B : w/w;Hand-GAL4,mitoGFP/+); heart specific *Pdp1* knock down (C,D : w/w;Hand-GAL4,mitoGFP/ UAS>dsRNA(Pdp1)$^{VDRC\text{-}KK}$) and heart specific *Pdp1* overexpression (E,F: w/w;Hand-GAL4,mitoGFP/+;UAS-Pdp1 /+ ). Individuals were kept at 18°C throughout development, shifted at 25 °C at adulthood and imaged at 1 week. (A,C,E) Longitudinal view of A2-A3 segment of the heart. (B,D,F) Reconstructed orthogonal view of the heart at segment A3 (doted white line in A,C,E).
(G) Fluorescence quantification of mitoGFP signals from segments A2 and A3 calculated using the average gray intensity of 200*200px squares (see M&M). Wilcoxon test was applied to calculate statistical difference between control and tested condition. A minimum of 5 heart was analyzed in each condition.
(H) Cardiac performance traits analyzed on adult female flies at 1 week. Control: w/w; tdtk/+; *MCU*$^{1}$ : w;tdtk/+;*MCU*$^{1}$ /+; Df(3L)*Pdp1*: w/w;tdtk/+;Df(3L)BSC631$^{Pdp1}$/+ and MCU$^{1}$/ Df(3L)*Pdp1*: w/w;tdtk/+; MCU$^{1}$ / Df(3L)BSC631$^{Pdp1}$. Wilcoxon test was applied to calculate statistical difference between conditions. Abbreviations - VLM=Ventral Longitudinal Muscles, *=Ostia. Scale 10µm.
* (p<0,05) / ** (p<0,01) / *** (p<0,001) / **** (p<0,0001)

**Supplementary tables and data online: (see on https://amubox.univ-amu.fr/s/jLtsKwATb6NBneL )**

Table S1: Variant with MAF>5% and their annotations identified by GWAS for senescence of cardiac performance traits at p: 0,05 after genome wide Bonferroni correction (3 10-8 cutoff).

Table S2: Fly cardiac aging GWAS genes and corresponding human orthologs identified with DIOPT (https://www.flyrnai.org/diopt)

Dataset S1: Raw data of individual values for cardiac traits in the DGRP. Phenotypic value were determined from high-speed video recording on dissected flies and movie analysis performed using SOHA.

Dataset S2: Raw data of individual values for cardiac traits using the high throughput method on intact anesthetized flies. Phenotypic values were determined from high-speed video recording on intact flies expressing tdtk transgene and movie analyzed using tdtk analysis script by Vogler 2022[47].

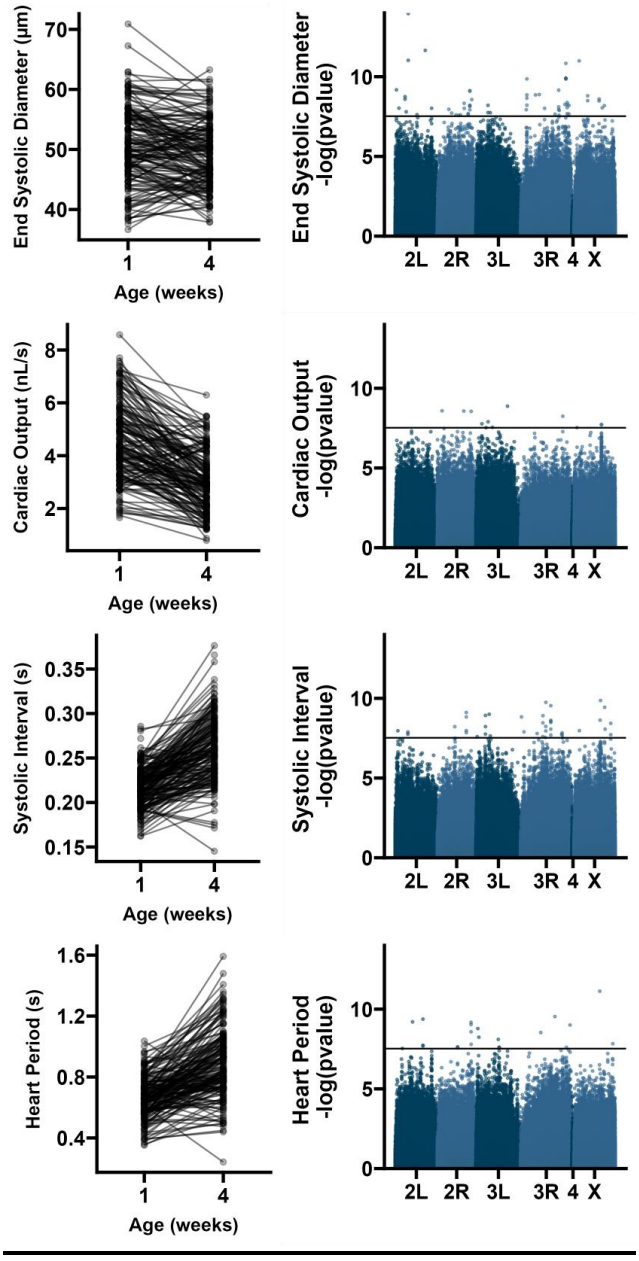



**Figure S1 (related to Figure 2).**

Genome-Wide associations studies (GWAS) for aging of cardiac traits.

(A) Reaction norm plot of each DGRP strain at 1 and 4 weeks for ESD, CO, SI and HP. The mean phenotypic values for each line at each age are connected by a line, allowing to monitor the trend differences among DGRP line.

(B) Manhattan plot showing the results of GWAS performed on aging phenotypes (ESD, CO, SI and HP). The genome wide significance threshold (3e-8) is indicated by a black line

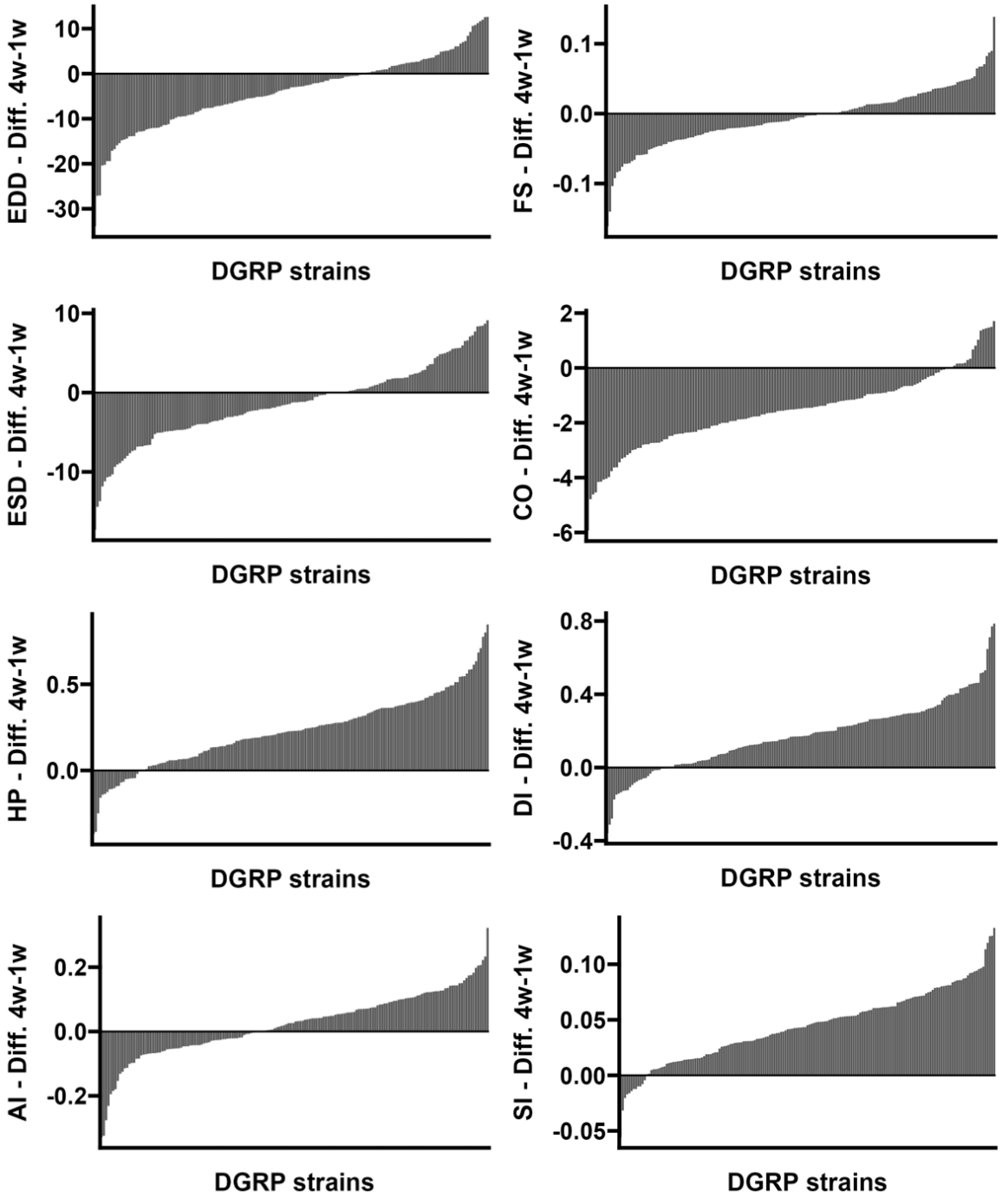



**Figure S2 (related to Figure 2).**

Barplot of trait evolution during aging for each DGRP strain individually

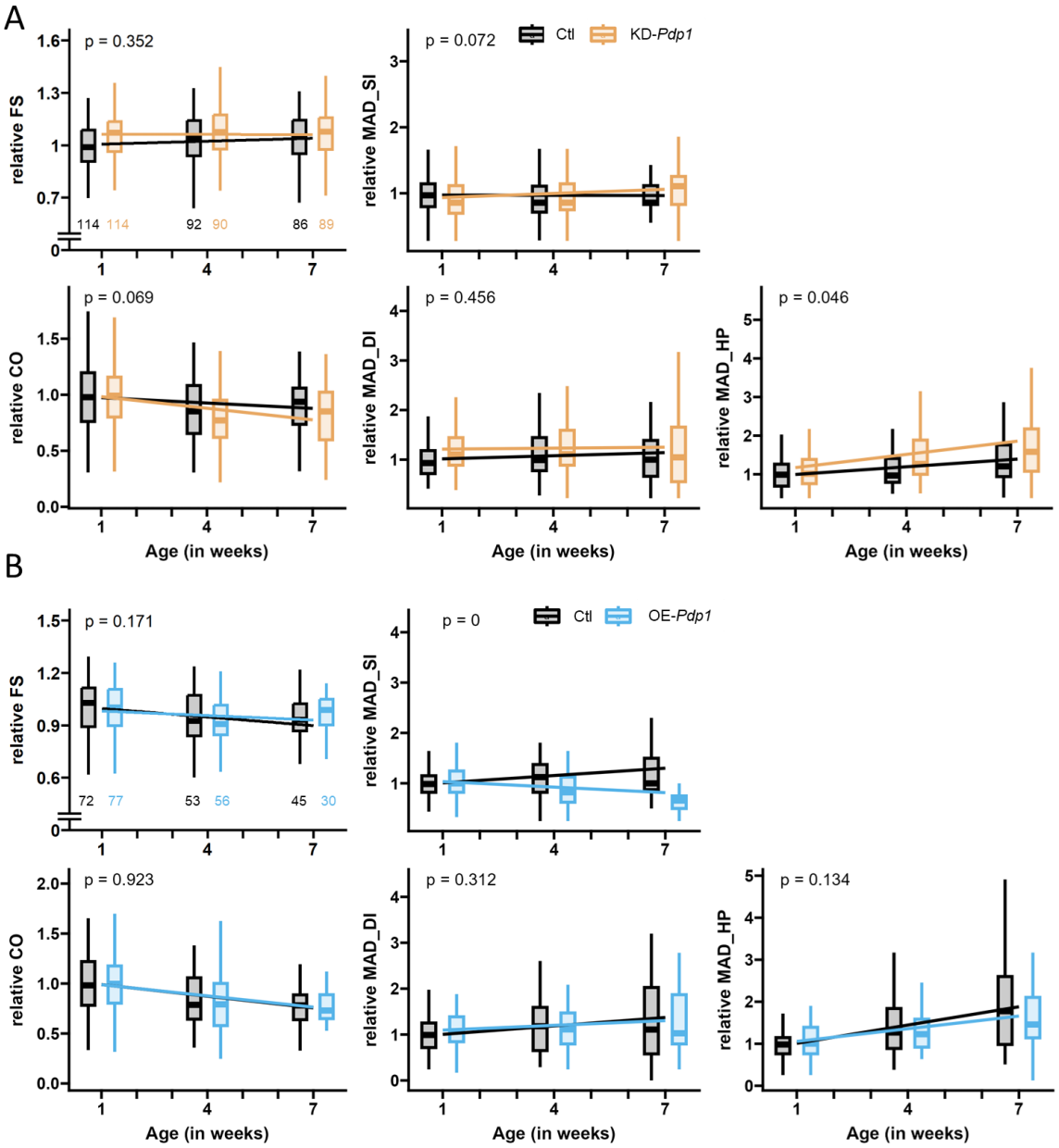



**Figure S3 (related to Figure 3).**

Heart-specific conditional knock-down (KD) or overexpression (OE) of *Pdp1* modulate cardiac senescence.

Cardiac performance was analyzed on intact anesthetized females flies at indicated ages. Number of individuals examined are noted on one plot in color. Individual values were normalized to the mean of the control condition at 1 week. Linear model applied to calculate statistical difference between aging trends of control and condition.

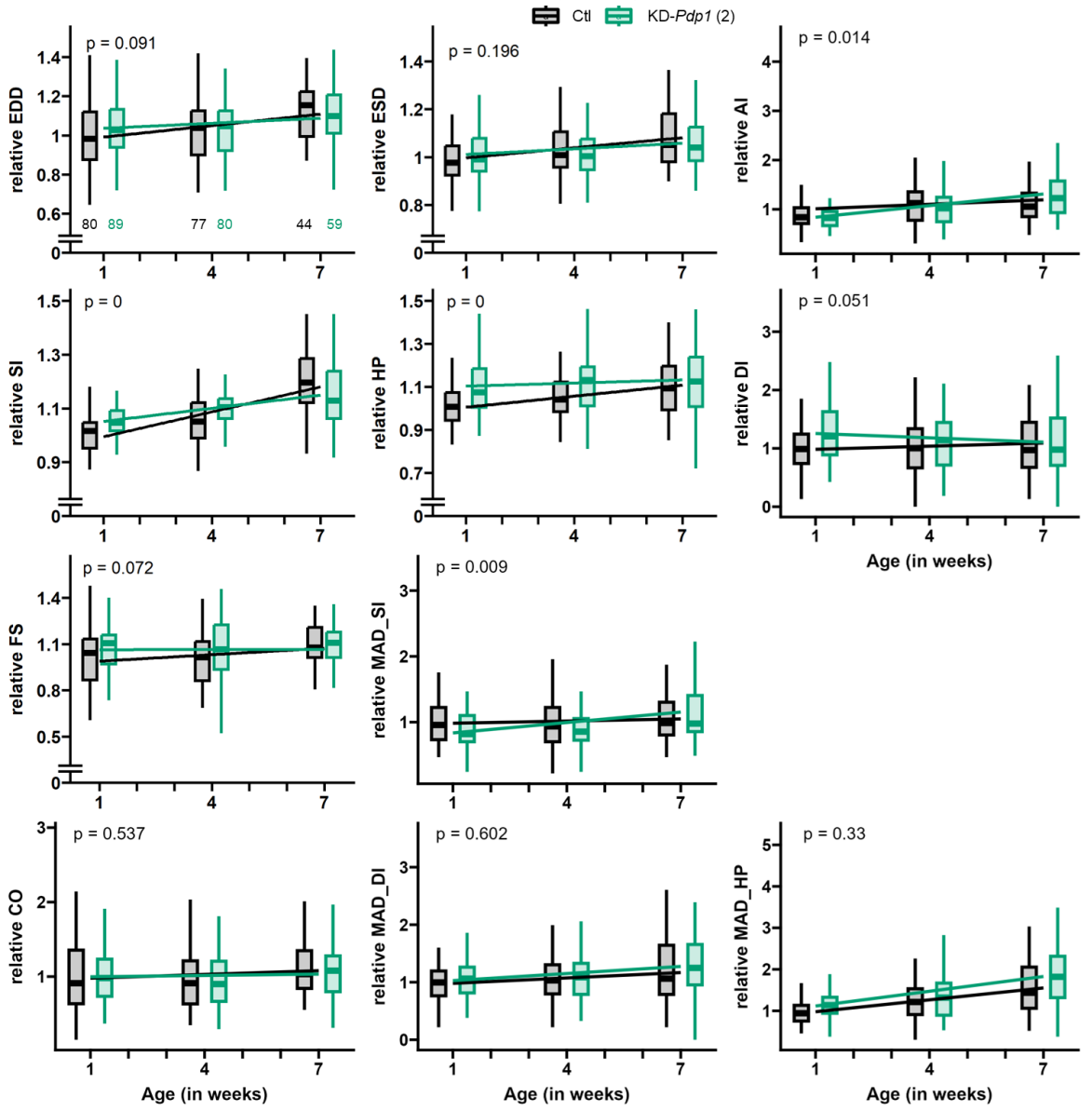



**Figure S4 (related to Figure 3).**

Heart-specific conditional knock-down with an additional RNAi construct (KD-*Pdp1* (2)) modulate cardiac senescence.

Cardiac performance was analyzed on intact anesthetized females flies at indicated ages. n= number of individuals examined. Number of individuals examined are noted on one plot in color. Individual values were normalized to the mean of the control condition at 1 week. Linear model applied to calculate statistical difference between aging trends of control and condition. w/w; tdtk/UAS>dsRNA(Pdp1)$^{BDSC\text{-}TRiP}$; Hand>GeneSwitch-Gal4 /+ flies fed (KD-Pdp1) or not (Ctl) with 100µg/ml of RU486 from adult eclosion onward were imaged at 1 week, 4 weeks and 7 weeks.

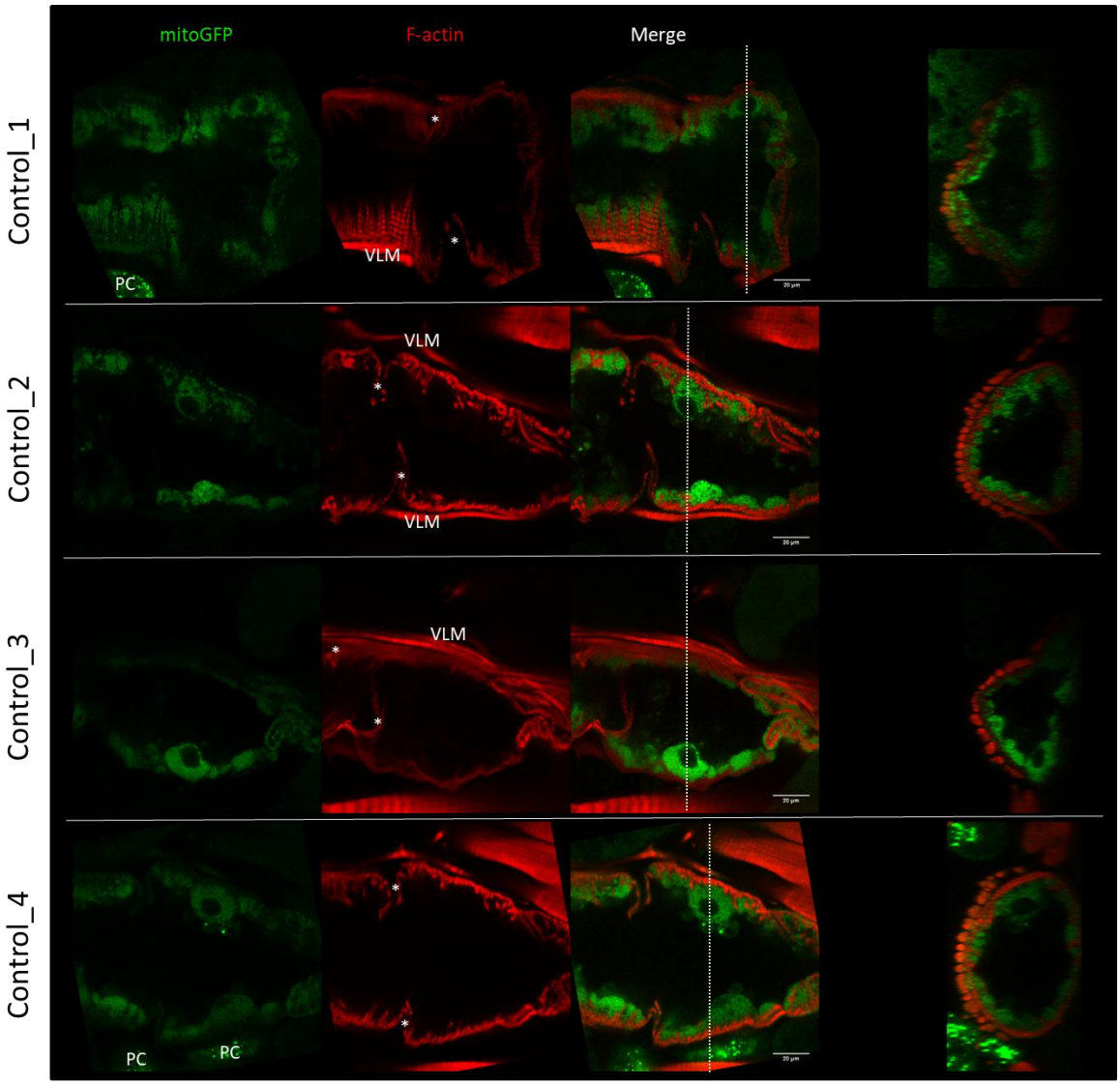



**Figure S5A (related to figure 4)**

Confocal imaging of fixed hearts stained for mitochondria tethered GFP (mitoGFP) and filamentous actin (F-actin) of control (A; w/w;Hand-GAL4,mitoGFP/+); *Pdp1* KD (B, w/w;Hand-GAL4,mitoGFP/ UAS>dsRNA(Pdp1)$^{VDRC-KK}$) and *Pdp1* OE (C, w/w;Hand-GAL4,mitoGFP/UAS-Pdp1). Individuals were kept at 18°C throughout development, shifted at 25 °C at adulthood and imaged at 1 week. Longitudinal view of A2-A3 segment of the heart. Reconstructed orthogonal view of the heart at segment A3 is shown on the left Abbreviations – PC=Pericardiac Cell, VLM=Ventral Longitudinal Muscles, *=Ostia. Scale 10µm.

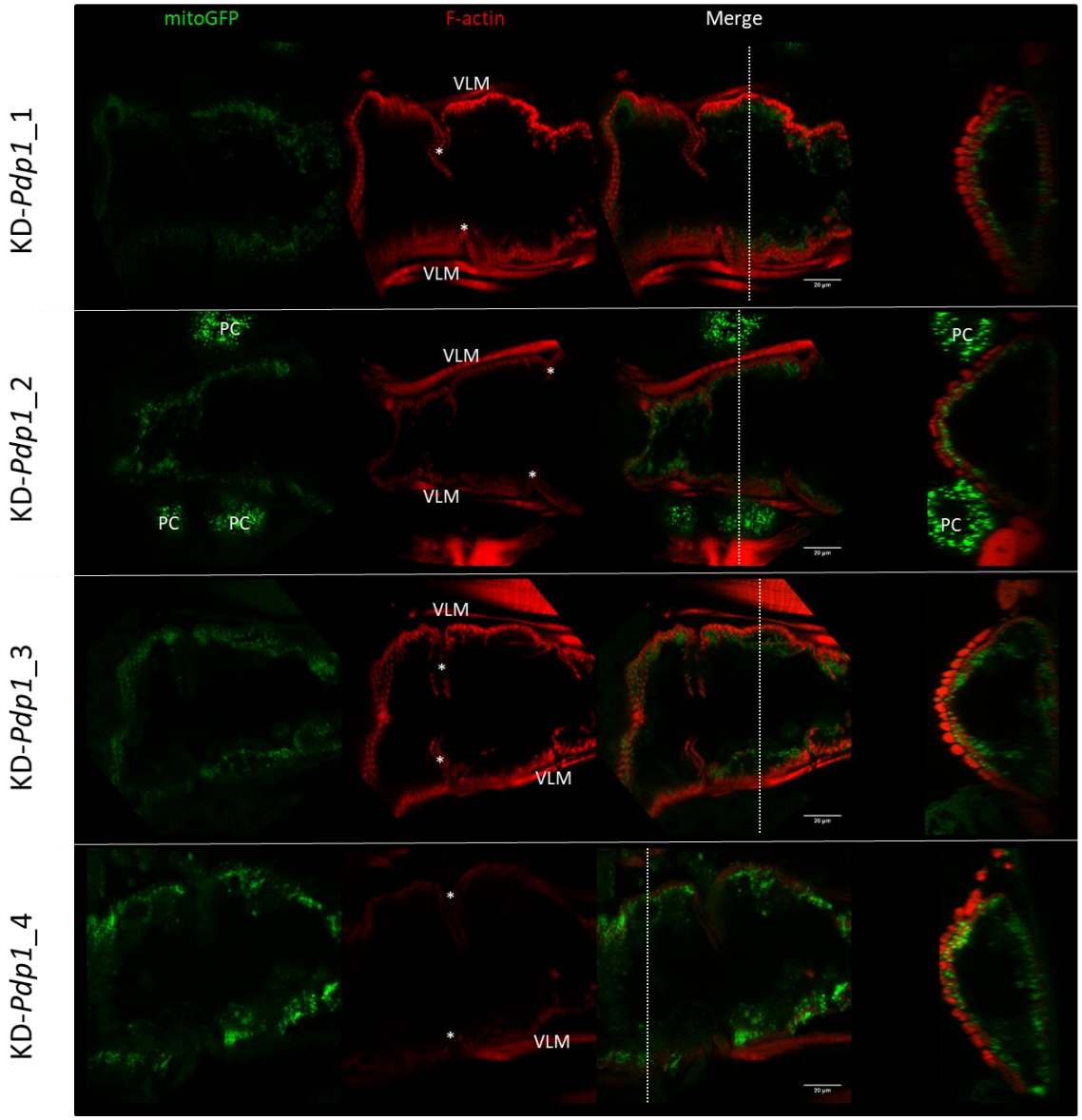



**Figure S5B (related to figure 4)**

Confocal imaging of fixed hearts stained for mitochondria tethered GFP (mitoGFP) and filamentous actin (F-actin) of control (A; w/w;Hand-GAL4,mitoGFP/+); *Pdp1* KD (B, w/w;Hand-GAL4,mitoGFP/ UAS>dsRNA(Pdp1)$^{VDRC-KK}$) and *Pdp1* OE (C, w/w;Hand-GAL4,mitoGFP/UAS-Pdp1). Individuals were kept at 18°C throughout development, shifted at 25 °C at adulthood and imaged at 1 week. Longitudinal view of A2-A3 segment of the heart. Reconstructed orthogonal view of the heart at segment A3 is shown on the left Abbreviations – PC=Pericardiac Cell, VLM=Ventral Longitudinal Muscles, *=Ostia. Scale 10µm.

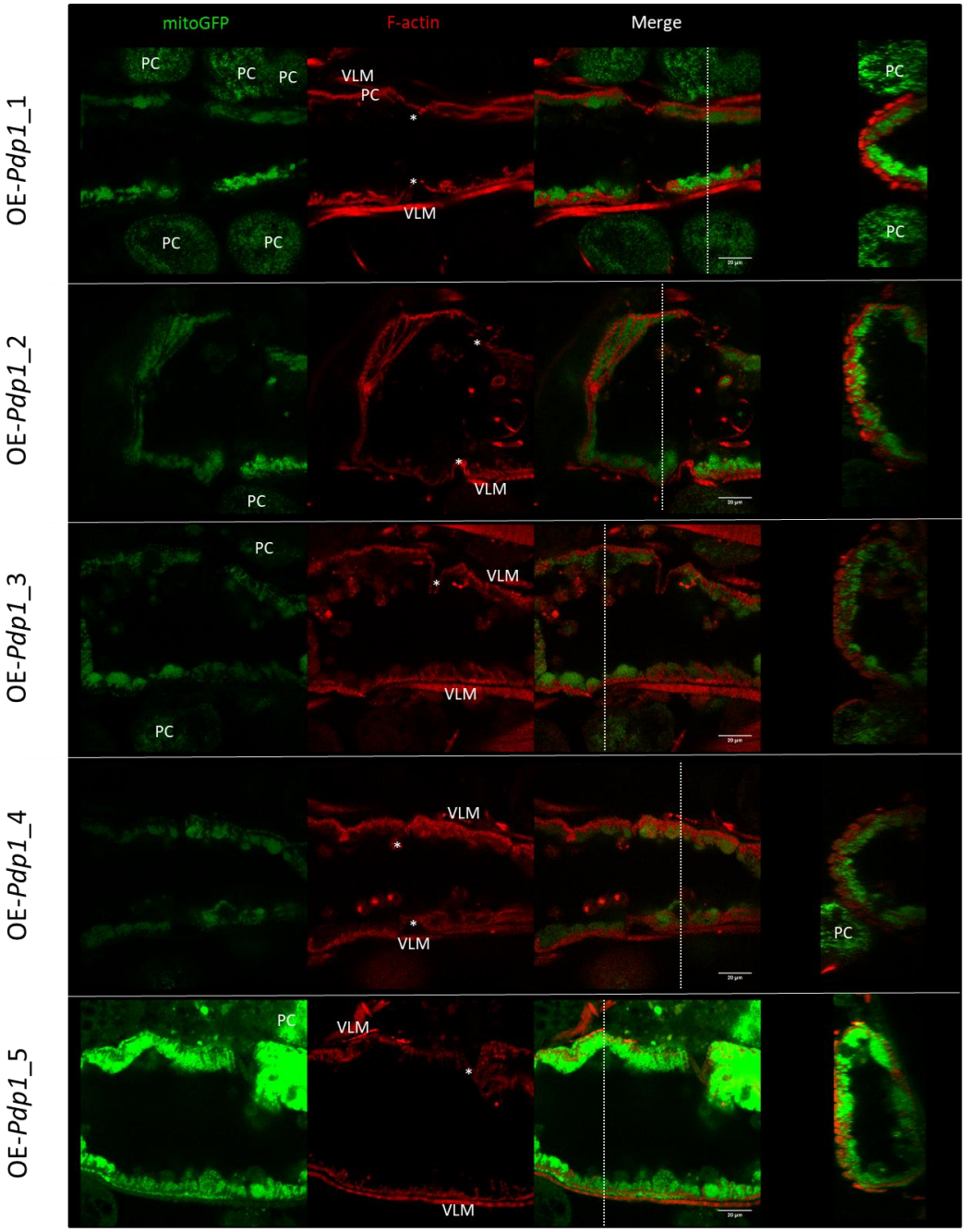



**Figure S5C (related to figure 4)**

Confocal imaging of fixed hearts stained for mitochondria tethered GFP (mitoGFP) and filamentous actin (F-actin) of control (A; w/w;Hand-GAL4,mitoGFP/+); *Pdp1* KD (B, w/w;Hand-GAL4,mitoGFP/ UAS>dsRNA(Pdp1)$^{VDRC-KK}$) and *Pdp1* OE (C, w/w;Hand-GAL4,mitoGFP/UAS-Pdp1). Individuals were kept at 18°C throughout development, shifted at 25 °C at adulthood and imaged at 1 week. Longitudinal view of A2-A3 segment of the heart. Reconstructed orthogonal view of the heart at segment A3 is shown on the left Abbreviations – PC=Pericardiac Cell, VLM=Ventral Longitudinal Muscles, *=Ostia. Scale 10µm.

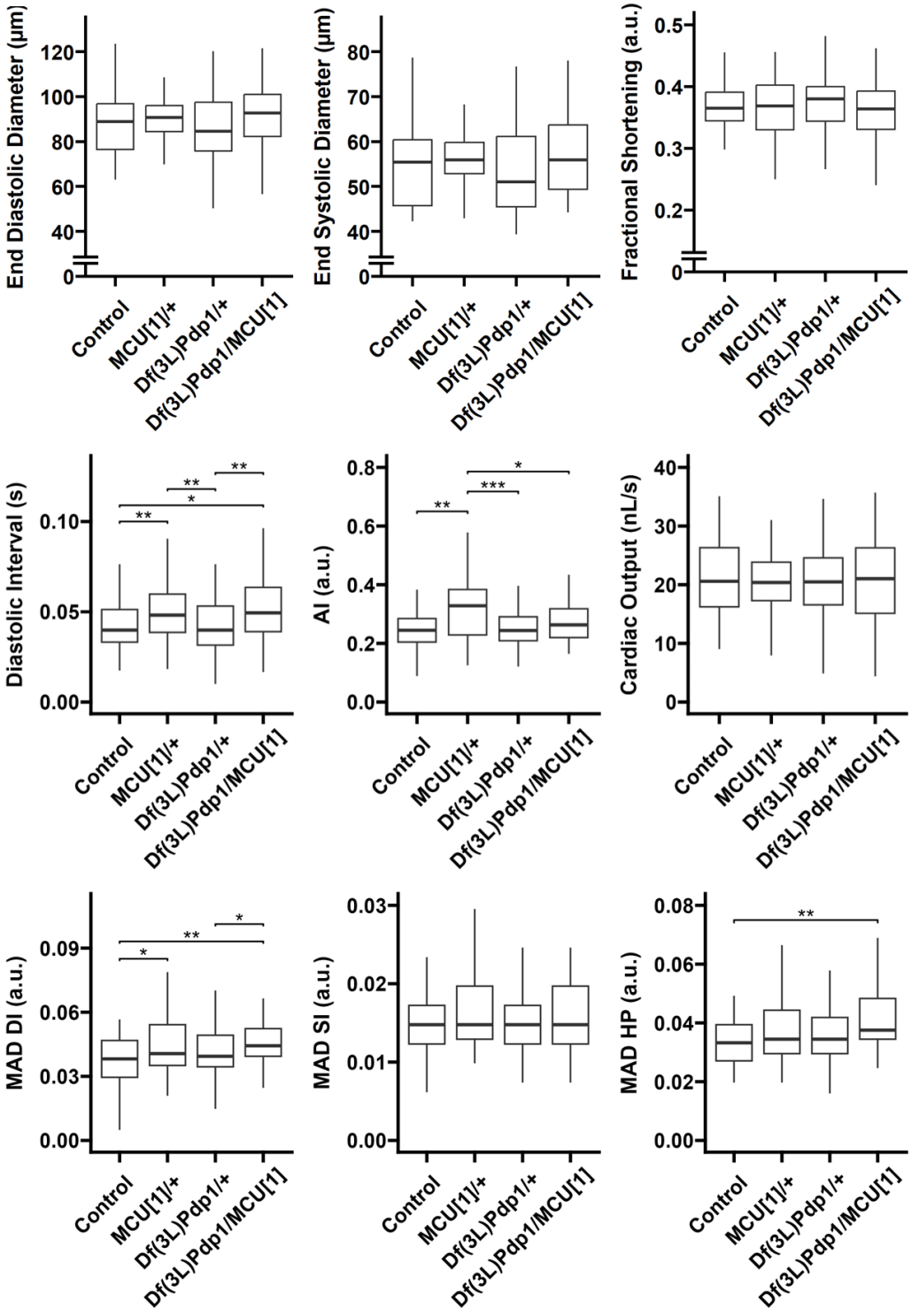



**Figure S6 (related to Figure 4):**

Cardiac performance traits analyzed on adult female flies at 1 week. Control: w/w; tdtk/+; *MCU*$^{1}$ : w;tdtk/+;*MCU*$^{1}$ /+; Df(3L)*Pdp1*: w/w;tdtk/+;Df(3L)BSC631$^{Pdp1}$/+ and MCU$^{1}$/ Df(3L)*Pdp1*: w/w;tdtk/+; MCU$^{1}$ / Df(3L)BSC631$^{Pdp1}$. Wilcoxon test was applied to calculate statistical difference between conditions. Abbreviations - VLM=Ventral Longitudinal Muscles, *=Ostia. Scale 10µm.

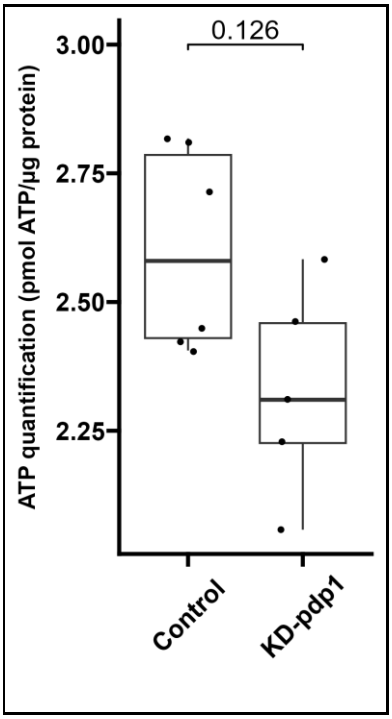



**Figure 48 – Effet de l'invalidation de Pdp1 dans les IFM sur la production d'ATP.** Quantification de l'ATP de thorax entiers en condition Control (Mef2-GAL4>60100) ou KD-Pdp1 (Mef2-GAL4>UAS-RNAi Pdp1-VDRC110551). Chaque point représente 5 thorax de femelles âgées d'une semaine. Le test statistique utilisé est un test de Wilcoxon.

# Effet de Pdp1 sur la quantité d'ATP

Dans l'article, nous avons démontré que Pdp1 régule le réseau mitochondrial dans les cardiomyocytes, et interagit génétiquement avec MCU, un gène nucléaire codant pour une protéine mitochondriale. Afin d'étudier le rôle de Pdp1 sur la fonction mitochondriale, j'ai détecté la quantité d'ATP en condition d'invalidation de Pdp1 (KD-Pdp1) ou en condition contrôle (Control).

Dans un premier temps, j'ai détecté l'ATP dans un pool des 10 cœurs adultes sauvages en utilisant un kit de détermination de l'ATP basé sur la luciférase. La production de la luminescence de la luciférase est dépendante de l'ATP, et par conséquent, la quantité de luminescence produite représente la quantité d'ATP contenue dans l'échantillon testé. Cependant, d'après les tests réalisés sur 10 coeurs, la quantité d'ATP détectée est proche du seuil minimal de détection du kit (données non présentées), et j'ai donc utilisé les muscles indirects du vol (Indirect Flight Muscles - IFM) comme modèle. Ces muscles striés, localisés dans le thorax, présentent certaines propriétés en commun avec celles des cardiomyocytes.

Afin de normaliser les différents échantillons testés, la quantité de protéines est déterminée par dosage colorimétrique, et rapportée à la quantité d'ATP dosée. En condition KD-Pdp1, dans tous les muscles, ou en condition contrôle, j'ai donc mesuré la quantité d'ATP dans les thorax entiers, en grande partie composés d'IFM, sur des drosophiles âgées d'une semaine. Les résultats, présentés sur la **Figure 48** montrent que le KD-Pdp1 dans les IFM a tendance à diminuer la quantité d'ATP produite (p-valeur = 0.126). Cette analyse complémentaire soutient donc que Pdp1 serait un régulateur du vieillissement cardiaque en contrôlant la fonction mitochondriale, cependant, le nombre d'échantillons testés est insuffisant et il est donc indispensable de refaire cette analyse afin de déterminer si cette différence est significative.

## Matériel et Méthodes

### *Lignées de drosophiles et croisements*

Les expériences de détermination de l'ATP ont été réalisées avec une lignée *driver* Mef2-GAL4 croisée avec des femelles vierges UAS-RNAi ou contrôle identiques à celles utilisées dans l'article. Les drosophiles ont été croisées à 18°C sur un milieu standard, et ont été collectées dans les 24h suivant leur éclosion puis maintenues à 25°C en cycle jour/nuit de 12h/12h, sur milieu standard pendant 1 semaine en changeant leur milieu tous les deux jours.

| Nom | Génotype | Origine |
|---|---|---|
| Mef2>GAL4 | w ; ; mef2-GAL4 | Donné par équipe F. Schnorrer |
| KD_Pdp1 | w ; UAS-Pdp1-RNAi ; | VDRC – 110551 |
| Ctrl (KD_Pdp1) | w ;; | VDRC – 60100 |

### *Détermination d'ATP et de protéines*

Les femelles âgées d'une semaines ont été disséquées afin de retirer les pattes, les ailes, la tête et l'abdomen et les thorax ont été placés dans une solution anti-ATPase (Guanidin-HCl 6M, TRIS 100mM, EDTA 0.25M, eau stérile, pH 7.8). Après avoir été broyés manuellement, les échantillons sont ensuite rapidement réfrigérés dans l'azote liquide puis bouillis pendant 5 minutes. La quantité d'ATP est détectée en triplicats en utilisant le kit ATP determination (invitrogen, selon les recommandations fournisseur) et la luminescence est mesuré au VICTOR Nivo (Revvity). La quantité de protéine est détectée avec le réactif Protein Assay Dye (Bio-Rad, selon les recommandations fournisseur) et mesurée au VICTOR Nivo (Revvity).

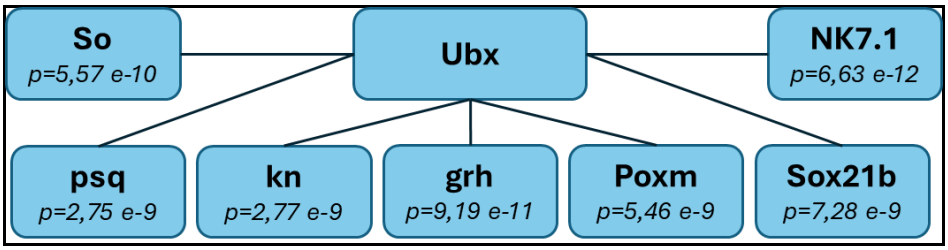



**Figure 49 - Réseau d'interaction directe de la protéine Ubx avec des facteurs de transcription identifiés dans les GWAS sur le vieillissement cardiaque.** La p-valeur indiquée sous chaque interacteur est celle du variant le mieux associé s'il y en a plusieurs. Les interactions sont représentées par des traits et ont été identifiées par la technique du BiFC (Bischof et al., 2018). Abréviations : So = Sine Oculis, psq = pipsqueak, kn = knot,grh = grainy head, Poxm = pox meso.

# Rôle de Ubx sur le vieillissement cardiaque

Avant mon arrivée dans le laboratoire, l'équipe du Dr. Laurent Perrin avait déjà réalisé l'intégralité de la détection des paramètres cardiaques des 193 lignées DGRP âgées de 1 et 4 semaines, et entrepris une première analyse GWAS sur la variation de 8 paramètres cardiaques avec l'âge. Cette analyse préliminaire des données, réalisée avec la même méthodologie que celle décrite dans le manuscrit, a mis en évidence que *Ultrabithorax (Ubx)* possède 4 variants associés à la variation cardiaque de l'intervalle systolique (**Table 4**) dont le variant le mieux associé de l'analyse.

**Tableau 5 – Liste des variants associés à la variation naturelle du vieillissement cardiaque localisés dans le gène *Ubx*.**

| symbol | Chr | position_chr | SNP | pvalue | type | MAF |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ubx | 3R | 12541171 | INS | 3,7748E-15 | INTRON | 0,05194805 |
| Ubx | 3R | 12540429 | SNP | 1,4606E-12 | INTRON | 0,05696203 |
| Ubx | 3R | 12540447 | SNP | 1,3794E-10 | INTRON | 0,05031447 |
| Ubx | 3R | 12548191 | SNP | 9,1977E-09 | INTRON | 0,08536585 |

*Ubx* est un gène homéotique impliqué dans la différenciation antéro-postérieure pendant l'embryogenèse. Dans le cœur, il est tout d'abord exprimé dans les cardiomyocytes et les ostioles du cœur embryonnaire et larvaire au niveau des segments A1-A4, puis, pendant la métamorphose, son expression change et se restreint aux ostioles dans ces mêmes segments. Cependant, sa fonction dans le cœur adulte reste actuellement inconnue et donc identifier des variants dans ce gène, qui sont associés au vieillissement cardiaque, est intéressant.

Ubx est un facteur de transcription interagissant avec d'autres protéines comme extradenticle (exd), et cette interaction permet l'augmentation de l'affinité d'Ubx à ses sites de fixation (Chan et al., 1994). La fixation d'Ubx spécifique en fonction des segments dépendrait de ses protéines partenaires, cependant leur identification reste encore à élucider. Une technique de fluorescence utilisée afin de détecter les interactions protéines-protéines a précédemment testé plusieurs interacteurs d'Ubx (Bischof et al., 2018). Dans une analyse préliminaire à mon arrivée au laboratoire, la liste de ces interacteurs a été comparée aux gènes ayant au moins un variant associé dans un GWAS, et plusieurs ont été retrouvés (**Figure 49**). Ubx semble apparaître alors

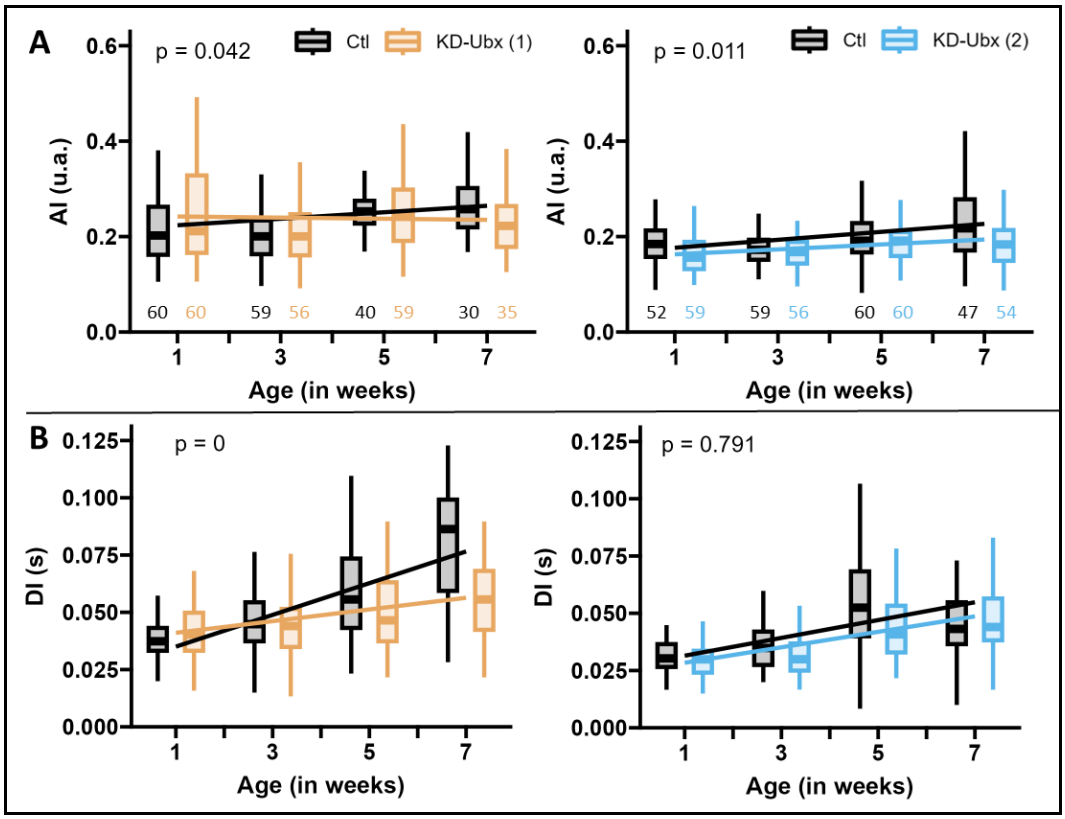



**Figure 50 - L'inhibition de Ubx spécifiquement dans le cœur atténue le vieillissement cardiaque.** La performance cardiaque a été analysée sur des individus femelles anesthésiées âgés de 1, 3, 5 ou 7 semaines. Le nombre d'individus est indiqué sur le premier graphique pour chaque génotype. Un modèle linéaire a été appliqué pour analyser la différence statistique de l'évolution de chaque paramètre au cours du vieillissement entre le contrôle (Ctl) et l'inhibition d'Ubx. L'inhibition de Ubx a été médiée avec un RNAi (A) VDRC-GD ou (B) BDSC-TRiP, et comparés à leur contrôle respectif, en utilisant le driver Hand>GAL4.

dans le vieillissement cardiaque comme un facteur clé de la régulation transcriptionnelle du cœur.

Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai entrepris d'analyser la fonction cardiaque à 4 âges différents (1, 3, 5 et 7 semaines) en condition d'inhibition de *Ubx* (**Figure 50 et Figures 52 et 53**). Pour cela j'ai croisé 2 RNAi différents, ou leur contrôle respectif, avec un pilote d'expression (appelé *driver* pour le reste de ce manuscrit) spécifique du cœur, Hand-GAL4 à 27°C. La descendance a ensuite été maintenue à cette température toute la durée de l'expérience par lot de 20 femelles fécondées et changée de milieu tous les 2 jours.

Les femelles ont ensuite été filmées à l'aide du système Tdtk, décrit dans le Chapitre 1 de l'introduction, maintenu de façon stable dans une lignée *Hand-GAL4, tdtk*, et analysées à l'aide du script automatisé créé par G. Vogler (Vogler, 2021). La **Figure 50** montre une préservation des arythmies induites avec l'âge (**A**) avec deux RNAi différents dirigés contre Ubx ($p=0.042$ et 0.011), et, pour l'un des RNAi seulement, une préservation de la dysfonction diastolique avec l'âge (**B**) ($p<0.001$). L'inhibition d'Ubx semble donc avoir un effet protecteur sur le vieillissement cardiaque.

D'autres paramètres cardiaques montrent également cet effet protecteur pour le KD-Ubx (1) (**Figure 52**), l'invalidation d'Ubx diminue la variabilité du rythme cardiaque avec l'âge (mesuré par les MAD SI, MAD DI et MAD HP), et atténue le vieillissement de la durée du battement cardiaque (HP). A noter également que l'invalidation KD-Ubx (2) aggrave la fraction d'éjection (mesuré par le FS) (**Figure 53**).

Cependant, cette expérience a été réalisée en inhibant l'expression de *Ubx* tout au long du développement, le *driver* Hand est en effet exprimé dès le stade 12 de l'embryon (Kölsch and Paululat, 2002). L'effet observé sur le vieillissement cardiaque de l'inhibition d'Ubx pourrait donc être le résultat d'un effet développemental sur le vieillissement et non de la fonction d'Ubx dans le cœur adulte.

Afin d'étudier spécifiquement la fonction d'Ubx dans le cœur adulte, j'ai utilisé le système inductible Geneswitch (Osterwalder et al., 2001). Dans ce système, la protéine GAL4 est modifiée, appelée Geneswitch sous cette forme, pour induire l'expression du transgène sous contrôle des séquences UAS uniquement en présence de RU486, aussi appelée mifepristone, grâce à la modification de sa conformation. Grâce à ce système, le transgène est induit de façon tissue spécifique, grâce au *driver*, et temps-spécifique, par l'ajout de RU486 dans la nourriture.

J'ai donc croisé les deux RNAi dirigés contre Ubx utilisés précédemment avec la lignée possédant le *driver* Hand-Geneswitch, à 25°C dans un milieu ne contenant pas de RU486. Dès l'émergence, les adultes sont placés sur un milieu soit contenant du RU486 (RU200), soit

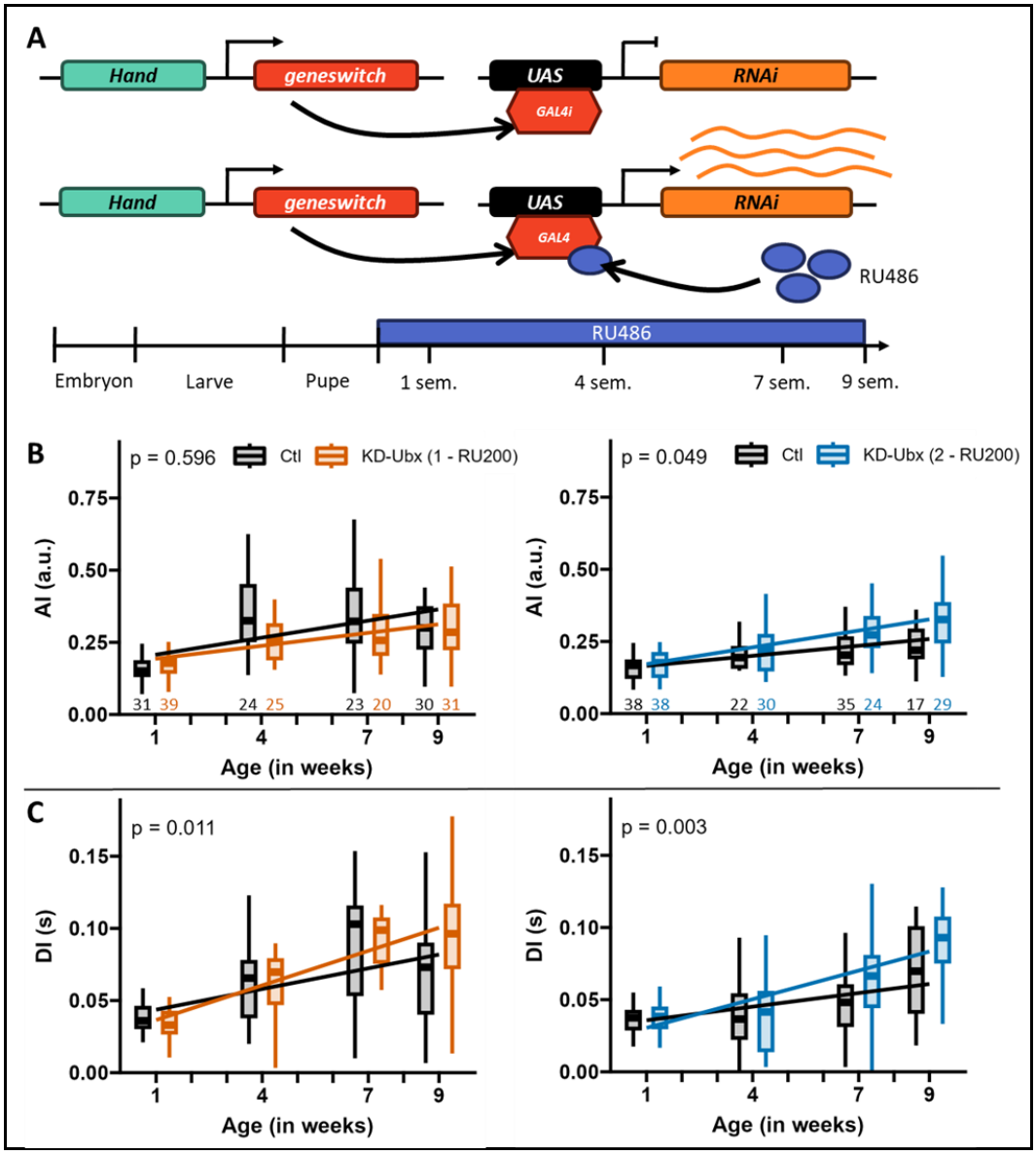



**Figure 51 - L'inhibition de Ubx spécifiquement dans le cœur adulte aggrave le vieillissement cardiaque.** (A) Schéma expérimental illustrant que l'activation de la protéine GAL4 dépend de l'ajout de RU486. Ajout de RU486 dans le milieu des drosophiles femelles analysées dès l'émergence de l'adulte et jusqu'à 9 semaines. La performance cardiaque a été analysée sur des individus femelles anesthésiées âgés de 1, 4, 7 ou 9 semaines. Le nombre d'individus est indiqué sur le premier graphique pour chaque génotype. Un modèle linéaire a été appliqué pour analyser la différence statistique de l'évolution de chaque paramètre au cours du vieillissement entre le contrôle (Ctl) et l'inhibition d'Ubx. L'inhibition de Ubx a été médiée avec un RNAi (B) VDRC-GD ou (C) BDSC-TRiP, et 200µg/mL de RU486, et comparé à leur contrôle sans RU486.

contenant de l'éthanol (Ctl), par lot de 20 femelles fécondées et changées de milieu tous les 2 jours (**Figure 51A**).

Comme précédemment, les femelles sont ensuite filmées et analysées à l'aide du système tdtk, maintenu de façon stable dans la lignée *driver* Hand-Geneswitch, tdtk. J'ai analysé la fonction cardiaque à 4 âges (1, 4, 7 et 9 semaines) (**Figure 51** et **Figure 54 et 55**), et l'expérience montre pour les 2 RNAi différents une aggravation de la dysfonction diastolique avec l'âge (**Figure 51C**), et pour l'un des RNAi une aggravation des arythmies avec l'âge (**Figure 51B**). L'inhibition de Ubx spécifiquement dans le cœur adulte a donc un effet aggravant sur le vieillissement cardiaque.

Le vieillissement d'autres phénotypes cardiaques est également modifié avec l'âge. L'invalidation par KD-Ubx (1) (**Figure 54**) aggrave la durée du battement cardiaque (HP), allant dans le sens d'une aggravation du vieillissement cardiaque. Cependant, l'invalidation par le KD-Ubx (2) (**Figure 55**) montre une préservation de la durée de la contraction cardiaque avec l'âge. Ces phénotypes vont plutôt dans le sens d'une préservation du vieillissement cardiaque.

Ubx semble donc avoir une modification de sa fonction au cours du cycle de vie de la drosophile. Cependant, au cours de ces analyses, il est apparu que plusieurs lignées DGRP ayant permis de réaliser les GWAS ont été dupliquées à au moins 1 des points temporels. Ceci a biaisé l'analyse des variants puisque certains génotypes ont été répliqués plus de fois. Les GWAS ont donc été réanalysés sans ces duplications, et bien que des variants dans Ubx aient été identifiés, suite à la correction de Bonferroni, ils ne sont pas significatifs. C'est également le cas pour presque tous les partenaires d'Ubx présentés dans la **Figure 49**. L'unique gène possédant un variant associé à la variation de la fonction cardiaque avec l'âge est NK7.1.

# Matériel et Méthodes

## *Lignées et Croisements*

Les expériences d'invalidation d'Ubx au cours du développement et de l'âge adulte ont été réalisées en combinant le transgène tdtk avec le *driver* Hand-GAL4 dans un stock stable (nommée Hand>GAL4 par la suite). Des vierges de la lignée *driver* Hand>GAL4 ont été croisées avec des mâles UAS-RNAi ou leur contrôle. Les drosophiles ont été croisées à 27°C sur un milieu standard, et ont été collectées dans les 24h suivant leur éclosion puis maintenues à 27°C en cycle jour/nuit de 12h/12h, sur milieu standard en changeant leur milieu tous les deux jours.

Les expériences d'invalidation d'Ubx au stade adulte uniquement ont été réalisées en suivant le protocole décrit dans l'article avec la lignée *driver* Hand>Geneswitch. Une différence est à noter par rapport à ce protocole, puisque les drosophiles récoltées ont été maintenues sur un

milieu contenant soit 465µM de RU (condition RU200), soit un volume équivalent d'éthanol (condition RU0).

| Nom | Génotype | Origine |
|---|---|---|
| Hand>GAL4 | w ; Hand-GAL4 ; tdtk | |
| Hand>Geneswitch | w ; tdtk ; Hand-Geneswitch | |
| KD-Ubx (1) | w ;; UAS-Ubx RNAi | VDRC 37825 |
| KD-Ubx (2) | y,sc,v ;; UAS-Ubx RNAi | BDSC 34993 |
| Control (KD-Ubx (1)) | w ;; | VDRC 60000 |
| Control (KD-Ubx (2)) | y,v ;; UAS-Vg RNAi | BDSC 31970 |

### *Détection de la fonction cardiaque (TDTK)*

La détection de la fonction cardiaque a été réalisée avec la méthode TDTK et analysées tel que décrit dans le matériel et méthode de l'article (voir article dans la première partie ce des résultats).

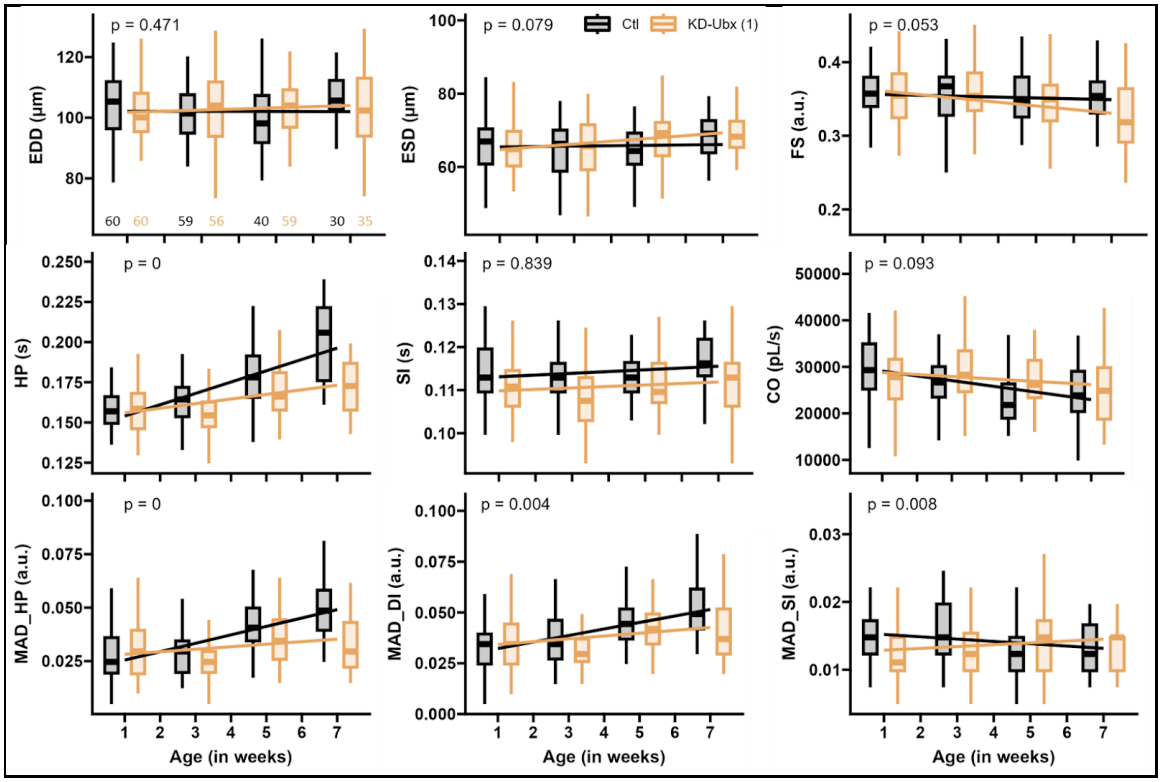



**Figure 52 - L'inhibition de Ubx spécifiquement dans le cœur atténue le vieillissement cardiaque.** La performance cardiaque a été analysée sur des individus femelles anesthésiées âgés de 1, 3, 5 ou 7 semaines. Le nombre d'individus est indiqué sur le premier graphique pour chaque génotype. Un modèle linéaire a été appliqué pour analyser la différence statistique de l'évolution de chaque paramètre au cours du vieillissement entre le contrôle (Ctl) et l'inhibition d'Ubx. L'inhibition de Ubx a été médiée avec un RNAi VDRC-GD, et comparés à son contrôle.

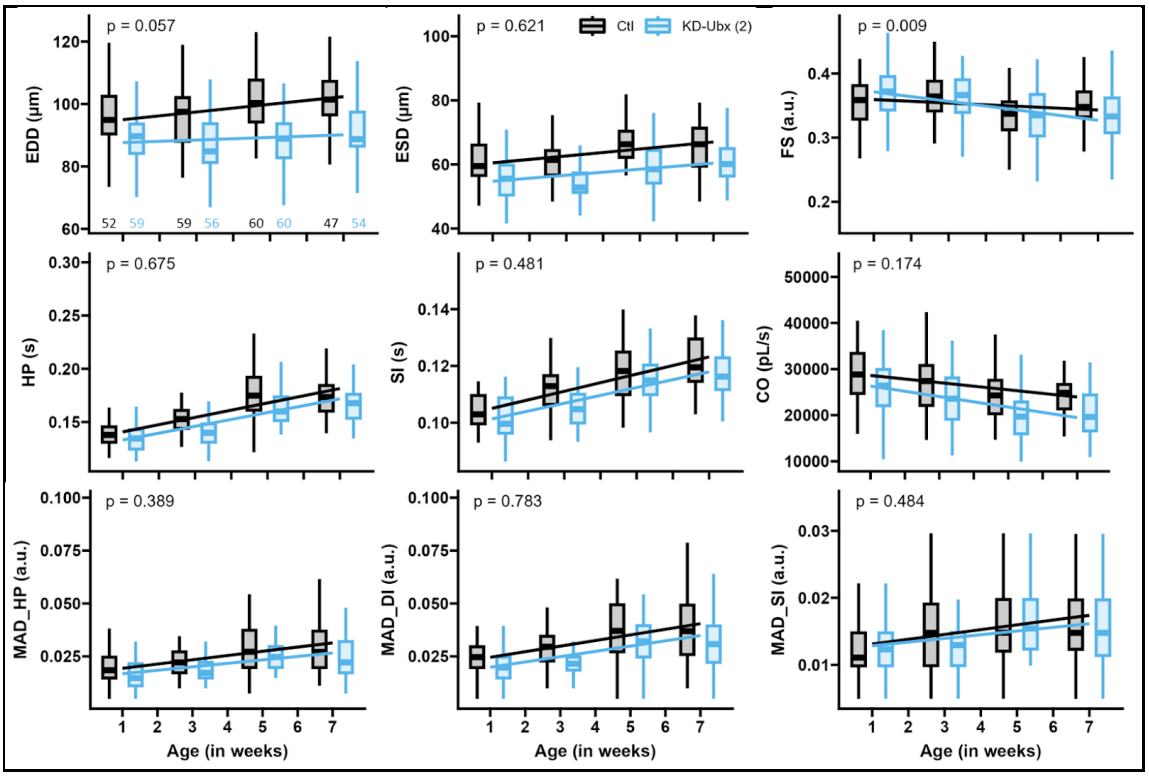



**Figure 53 - L'inhibition de Ubx spécifiquement dans le cœur atténue le vieillissement cardiaque.** La performance cardiaque a été analysée sur des individus femelles anesthésiées âgés de 1, 3, 5 ou 7 semaines. Le nombre d'individus est indiqué sur le premier graphique pour chaque génotype. Un modèle linéaire a été appliqué pour analyser la différence statistique de l'évolution de chaque paramètre au cours du vieillissement entre le contrôle (Ctl) et l'inhibition d'Ubx. L'inhibition de Ubx a été médiée avec un RNAi BDSC-TRiP, et comparés à son contrôle.

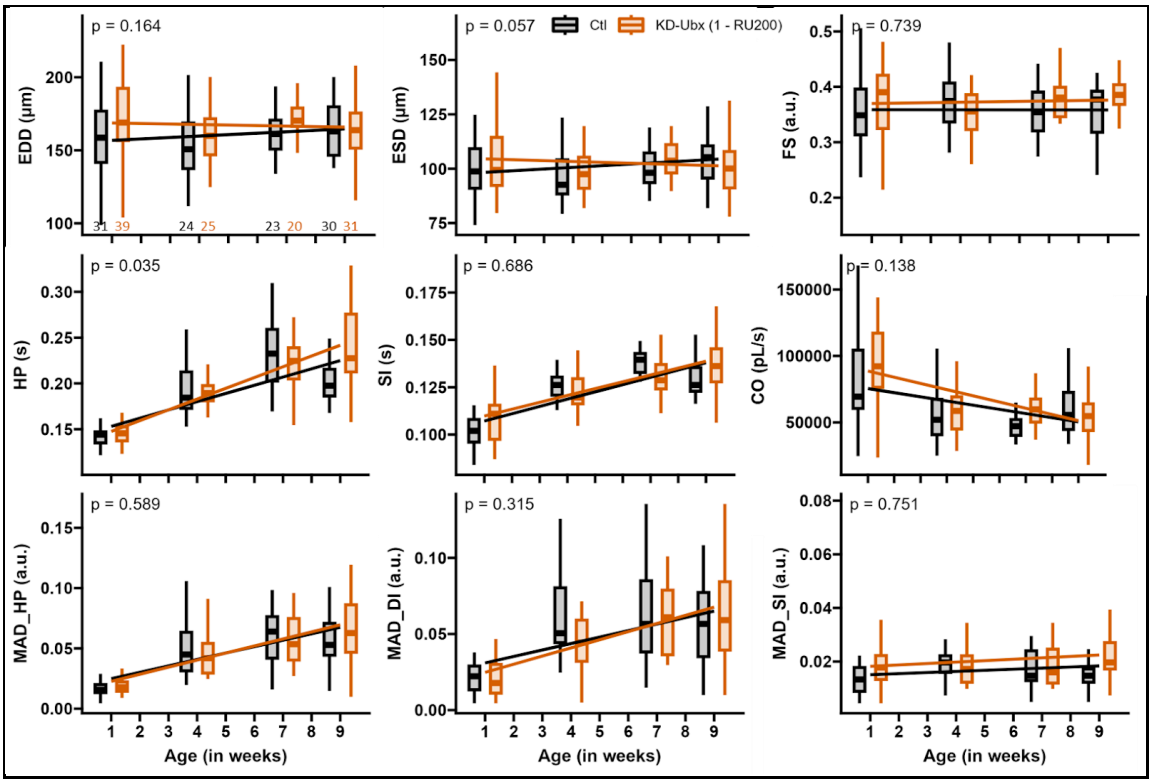



**Figure 54 - L'inhibition de Ubx spécifiquement dans le cœur adulte aggrave le vieillissement cardiaque.** La performance cardiaque a été analysée sur des individus femelles anesthésiées âgés de 1, 4, 7 ou 9 semaines. Le nombre d'individus est indiqué sur le premier graphique pour chaque génotype. Un modèle linéaire a été appliqué pour analyser la différence statistique de l'évolution de chaque paramètre au cours du vieillissement entre le contrôle (Ctl) et l'inhibition d'Ubx. L'inhibition de Ubx a été médiée avec un RNAi VDRC-GD et 200µg/mL de RU486, et comparé à son contrôle sans RU486.

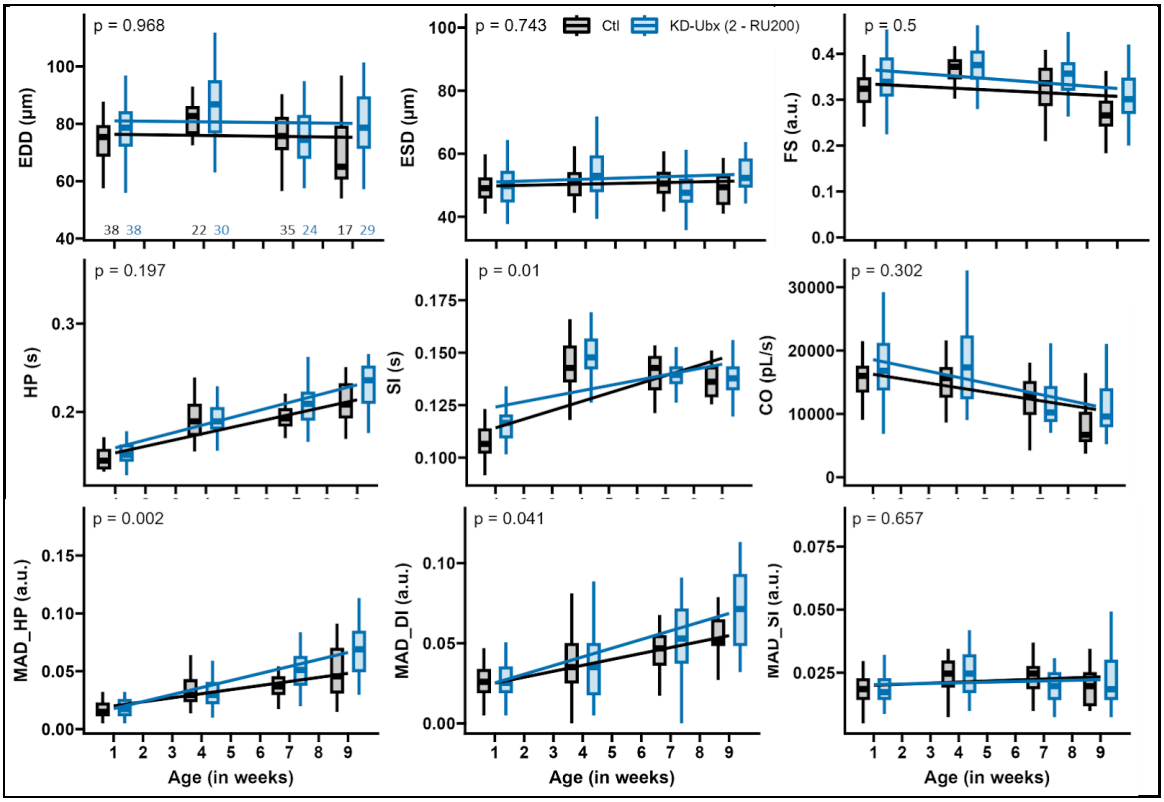



**Figure 55 - L'inhibition de Ubx spécifiquement dans le cœur adulte aggrave le vieillissement cardiaque.** La performance cardiaque a été analysée sur des individus femelles anesthésiées âgés de 1, 4, 7 ou 9 semaines. Le nombre d'individus est indiqué sur le premier graphique pour chaque génotype. Un modèle linéaire a été appliqué pour analyser la différence statistique de l'évolution de chaque paramètre au cours du vieillissement entre le contrôle (Ctl) et l'inhibition d'Ubx. L'inhibition de Ubx a été médiée avec un RNAi BDSC-TRiP et 200µg/mL de RU486, et comparé à son contrôle sans RU486.

# Discussion

La fonction cardiaque à 1 semaine et la sénescence cardiaque sont grandement influencées par des facteurs génétiques. L'analyse des variations naturelles la fonction cardiaque chez des drosophiles jeunes suggère que l'héritabilité est de 26 à 57% (Saha et al., 2022b), et ce chiffre varie entre 20 et 40% pour la sénescence de la fonction cardiaque. Cependant, la complexité du vieillissement de la fonction cardiaque ne pourrait être expliquée par quelques acteurs et mécanismes, et il est donc nécessaire de caractériser les interactions de ces acteurs et mécanismes, leur architecture. Afin d'obtenir une vision large et non-biaisée de ces acteurs, l'équipe du Dr. Perrin s'est spécifiquement intéressée à l'effet des variations naturelles dans une population naturelle sur l'évolution des paramètres cardiaques avec l'âge, détectable par GWAS. Dans ce but, la collection DGRP a été utilisée. Elle est constituée de plus de 200 lignées, et est largement utilisée par la communauté scientifique pour l'étude des variations naturelles.

Cette collection permet de quantifier l'héritabilité d'un phénotype étudié, et par ailleurs, grâce à des GWAS, d'identifier des variants associés. 8 paramètres cardiaques, décrivant la structure ou la fonction cardiaque, ont été mesurés sur les individus de 193 lignées de la collection DGRP à deux âges (1 et 4 semaines). Un GWAS a été réalisé pour l'évolution de chacun de ces paramètres avec l'âge, et, au total, a permis d'associer significativement 380 variants et 244 gènes après l'application de la correction de Bonferroni ($3\ 10^{-8}$ dans notre cas), corrigeant pour les tests statistiques multiples, et qui est classiquement utilisée pour l'étude de GWAS chez l'humain. Il s'agit de la première étude GWAS réalisée avec la collection DGRP qui possède la puissance statistique nécessaire pour appliquer cette correction, grâce au modèle mathématique utilisé. Dans de nombreuses études GWAS utilisant les DGRP, le seuil appliqué afin de déterminer la significativité d'un variant, est de $10^{-5}$. En effet, la collection DGRP possède 205 lignées, donc 205 génotypes différents, limitant ainsi la puissance statistique d'une étude GWAS utilisant cette collection. Chez l'humain, des bases de données comme la UK BioBank regroupent des dizaines de milliers de génotypes, permettant ainsi d'avoir une puissance statistique considérable lors de la réalisation de GWAS. Dans notre étude, un modèle linéaire mixte a été appliqué sur les données individuelles, plutôt que sur les moyennes des lignées, ce qui a augmenté la puissance des associations.

Les gènes associés à la variation du vieillissement cardiaque ont tout d'abord été décrits par l'analyse ontologique (Gene Ontology) de leur fonction (Biological Process, Molecular Function) et de leur localisation cellulaire (Cellular Component). Cependant, aucun terme précis n'est enrichi parmi cette liste de gènes. En revanche, cette liste de gènes est enrichie en gènes dont les orthologues humains sont associés aux maladies cardiovasculaires. Ces analyses suggèrent

que les processus impliqués dans le vieillissement cardiaque sont conservés entre la drosophile et l'humain, et qu'ils impliquent des processus cellulaires et moléculaires variés.

Il existe une très grande conservation de séquence entre les gènes chez la drosophile et les gènes impliqués dans des pathologies humaines (Reiter et al., 2001), et grâce à cela, la drosophile est un modèle couramment utilisé pour tester l'effet de gènes identifiés, notamment en GWAS, sur la fonction d'intérêt. (Wangler et al., 2017) Ces validations se basent sur l'hypothèse que les gènes orthologues conservent leur fonction entre les espèces. De plus, les GWAS permettent majoritairement d'identifier des variants dans les régions non-codantes du génome, notamment les régions régulatrices, dont la conservation entre les espèces est peu définie. (Wangler et al., 2017)

Afin de décrypter les gènes et voies de signalisation impliquées dans le vieillissement cardiaque, il serait intéressant de réaliser un criblage des gènes associés, en utilisant les avantages génétiques du modèle drosophile. Plus spécifiquement, afin de caractériser l'architecture de ces processus, l'étude des 16 facteurs de transcription identifiés par le GWAS et de leurs cibles permettra d'avoir une vision plus globale des réseaux moléculaires impliqués dans le vieillissement cardiaque. Dans l'article, nous avons utilisé iCisTarget, un outil capable de mesurer l'enrichissement en site de fixation de facteurs de transcription prédits ou démontrés. L'analyse avec iCisTarget a été réalisée sur la liste de gènes associés à des variants significativement associés à la variation de la structure du cœur avec l'âge, et a mis en évidence un enrichissement en sites de fixation pour Vri et Pdp1. Cependant, l'outil n'est plus mis à jour depuis 2019 (dernier article publié en 2015 (Potier et al., 2014), copyright du site daté de 2019), et de nouvelles données, notamment de ChIP-seq (séquençage de la chromatine après immunoprécipitation), ont été publiées (regroupées dans la base de données ReMap (Hammal et al., 2022)) et pourraient donc raffiner ces résultats. Un package R a été créé afin d'analyser les enrichissements en site de fixation de facteurs de transcription à partir d'une table de coordonnées génétiques, en les comparant aux sites identifiés dans la base de données ReMap 2018 (données non publiées, package disponible sur Github). En utilisant la base de données de 2022 pour les ChIP réalisés chez la drosophile, il serait intéressant d'identifier les enrichissements en facteurs de transcription localisés autour des variants associés à la variation de la fonction cardiaque avec l'âge.

Au cours de ce projet j'ai étudié 2 facteurs de transcription, Ubx et Pdp1. J'ai montré avec 2 RNAi différents que Ubx régule le vieillissement cardiaque, avec un effet protecteur lorsqu'il est inhibé au cours du développement, et un effet d'aggravation lorsque celui-ci est inhibé au cours du stade adulte uniquement.

Ubx est un facteur de transcription dont le rôle au cours du développement cardiaque a été largement étudié (Lo et al., 2002; Perrin et al., 2004; Ponzielli et al., 2002) et dont l'expression cardiaque est modifiée au cours de la métamorphose (Monier et al., 2005). En effet, dans le tube cardiaque embryonnaire et larvaire, Ubx est exprimé dans les cardiomyocytes et les ostioles, mais pendant la métamorphose et le stade adulte, son expression est restreinte aux ostioles du cœur adulte. Au cours de mes travaux j'ai mis en évidence pour la première fois que la fonction adulte et cœur-spécifique d'Ubx joue un rôle dans le maintien de la fonction cardiaque avec l'âge.

Le *driver* utilisé, Hand-Gal4, est exprimé au stade adulte dans les cardiomyocytes et les cellules péricardiaques, mais pas dans les ostioles. L'expression d'Ubx à partir de la métamorphose étant inhibée dans les cardiomyocytes, il apparaît donc que Ubx pourrait avoir une fonction dans les cellules péricardiaques au stade adulte. Cependant, actuellement aucune description de l'expression de Ubx dans les cellules péricardiaques n'a été réalisée, et il est donc nécessaire de vérifier si la protéine est exprimée dans ces cellules, en réalisant une immunofluorescence avec un anticorps spécifique. Mais également, d'étudier de façon cellule-spécifique sa fonction, en utilisant des *driver* spécifiques des cardiomyocytes (Tin-GAL4) ou des cellules péricardiaques (Prc-GAL4). De plus, il a déjà pu être démontré que les cellules péricardiaques peuvent réguler la physiologie cardiaque adulte de façon paracrine (Lim et al., 2019). Dans les cellules péricardiaques, une modification de la quantité de ROS, entraînait alors une cascade de régulation modifiant ainsi l'accumulation de la protéine de surface Kune, provoquant une modification de la physiologie cardiaque. En particulier, la modification de l'accumulation de Kune augmente les arythmies et la durée de la période cardiaque avec l'âge, des phénotypes qui sont également altérés en modulant l'expression d'Ubx dans mes expériences. Il serait donc intéressant de décrypter l'effet de la modification de l'expression d'Ubx sur l'accumulation de cette protéine de surface.

Le domaine de fixation d'Ubx, l'homéodomaine, est très similaire à celui des autres protéines homéotiques, et est capable de se fixer avec une grande affinité à des séquences ADN spécifiques mais aux séquences similaires. Au stade adulte, Ubx a été décrit comme un régulateur de la voie Dpp/Mad dans l'intestin, ou encore dans le maintien des neurones. (Issa et al., 2019; Li et al., 2016) Il apparaît alors intéressant d'identifier les cibles transcription d'Ubx dans le cœur en réalisant un RNAseq du cœur adulte, en condition d'inhibition d'Ubx pendant le développement ou spécifiquement dans le cœur adulte ou en condition contrôle. L'analyse différentielle de ces cibles permettra de déterminer les processus spécifiques régulés par Ubx dans le cœur adulte.

De plus, deux mécanismes ont été décrits permettant de modifier les cibles transcriptionnelles d'Ubx ou de moduler leur niveau d'expression. Ubx est capable d'interagir

avec une autre protéine homéotique, Extradenticle, ce qui module la spécificité de l'interaction avec leur site de fixation. (Chan et al., 1994; Crocker et al., 2014) Etudier spécifiquement dans le cœur les sites de fixation d'Ubx est cependant un véritable défi, compte tenu de la faible quantité de matériel, mais pourrait permettre de déterminer si Extradenticle, ou de nouveaux cofacteurs, pourraient être impliqué dans la fonction transcriptionnelle de Ubx au stade adulte. Enfin, Ubx possède plusieurs isoformes, et il a été démontré qu'un mutant Ubx ne produisant qu'une seule isoforme fonctionnelle de la protéine affecte sa fonction transcriptionnelle au cours du développement, démontrant ainsi l'importance l'épissage alternatif pour la fonction de Ubx (Reed et al., 2010). Au cours du vieillissement cardiaque, la production des différentes isoformes pourrait être altérée ou déséquilibrée, et ainsi mener à des modifications de l'expression de ses cibles transcriptionnelles. Il serait donc intéressant d'identifier les différentes isoformes présentes dans le cœur adulte à différents âges et leur proportion à l'aide de qPCR isoformes spécifiques, ou d'observer l'effet de chaque isoforme sur la fonction cardiaque adulte par des mutant spécifiques induits à l'âge adulte. Grâce à des lignées UAS-Cas9, le screening de nombreux gènes a pu être réalisé de façon tissue spécifique, en utilisant une collection de lignées contenant les ARN guides dans leur génome (sgRNA). (Port et al., 2020) A partir de cette technique il serait envisageable d'utiliser le driver Hand-Geneswitch, inductible au stade adulte uniquement, pour exprimer le sgRNA spécifiquement dans le cœur adulte, sans altérer le développement.

Les GWAS réalisés dans ce projet ont également permis d'identifier 16 facteurs de transcription, dont Vrille et Pdp1. Vrille et Pdp1 sont deux facteurs de transcription de type bZIP et se fixant sur le même site de fixation. (Cyran et al., 2003) De plus, Vrille a auparavant été décrit comme un régulateur de la fonction cardiaque au cours du vieillissement. (Monnier et al., 2012) Mes résultats montrent que, tout comme Vrille, la modification de l'expression de *Pdp1* dans les cardiomyocytes altère la fonction cardiaque au cours du vieillissement. De façon notable, les phénotypes identifiés en GWAS ayant des variants dans Vrille ou Pdp1 ne sont pas les phénotypes montrant une variation avec l'âge en condition de gain ou de perte de fonction. L'utilisation pour des validations fonctionnelles de RNAi ou de transgènes pourrait expliquer que les phénotypes observés soient différents, mais également, les variants identifiés en GWAS pourraient avoir des effets systémiques modulant la fonction cardiaque. Enfin, les variants identifiés sont localisés dans des régions potentiellement régulatrices – puisque tous ces variants sont localisés dans des introns – et pourraient donc moduler finement l'expression de Vrille et Pdp1.

L'étude des cibles potentielles de Pdp1 et Vrille identifiés en GWAS a révélé plusieurs gènes nucléaires codant pour une protéine impliquée dans la fonction mitochondriale, et nous avons émis l'hypothèse que Vrille et Pdp1 pourraient réguler la sénescence cardiaque en régulant les fonctions mitochondriales. Les résultats présentés montrent que l'inhibition de l'expression de

*Pdp1* dans les cardiomyocytes altère le réseau mitochondrial des cardiomyocytes, et la quantité d'ATP produite dans les IFM. De plus, Pdp1 interagit génétiquement avec MCU, un canal calcique mitochondrial codé par un gène nucléaire. Ceci suggère donc que Pdp1 régule la fonction mitochondriale. Ces résultats, réalisés sur des individus jeunes, ne rendent cependant pas compte des phénotypes de vieillissement, et devraient donc être répliqués sur des individus âgés. De plus, dans les IFM, la diminution de la quantité d'ATP observée pourrait provenir d'un manque de production de cet ATP, mais également d'une surconsommation. Afin d'élucider le mécanisme sous-jacent, il est possible de réaliser un Western blot afin d'observer la quantité d'ATP synthase dans les IFM. Enfin, il serait intéressant d'observer par immunomarquage les mitochondries de façon plus précises. Dans les expériences réalisées, ces mitochondries cardiaques ne sont pas identifiables individuellement, limitant donc la description du réseau mitochondrial. Afin de confirmer ce réseau il serait intéressant de réaliser un marquage dirigé contre l'ATP synthase, mais il serait également intéressant de décrire le réseau mitochondrial dans les IFM.

Le gène *Pdp1* code pour plusieurs isoformes, dont l'isoforme Pdp1e est impliquée dans la régulation du rythme circadien dans les neurones Clock, et l'isoforme Pdp1g est exprimée dans le corps gras, mais sa fonction moléculaire sur les gouttelettes lipidiques est encore méconnue. (Dzitoyeva and Manev, 2013; Zheng et al., 2009) Il serait alors intéressant d'étudier plus en détails l'expression et la fonction de ces isoformes sur la fonction cardiaque au cours du vieillissement, en exprimant spécifiquement les isoformes d'intérêt.

L'isoforme Pdp1e est impliquée dans le rythme circadien, et il est connu que l'altération systémique du rythme circadien altère plusieurs fonctions, dont la fonction cardiaque. (Martino and Young, 2015) Chez la drosophile, la mutation systémique des différents acteurs du rythme circadien altère la fonction cardiaque, cependant les phénotypes observés sont très différents pour chacun des acteurs. (Gill et al., 2015) De plus, des RNA-seq réalisés sur le cœur adulte à différentes heures de la journée montrent que l'expression de Pdp1 oscille au cours de la journée. (Gill et al., 2015) Mais de façon intéressante, chez la souris, des modèles mutant pour deux gènes du rythme circadien spécifiquement dans le cœur montrent un rôle tissu-spécifique de ces gènes. (Ingle et al., 2015; Young et al., 2014) Il serait intéressant d'étudier chez la drosophile le rôle tissu-spécifique de Pdp1e, afin de mieux comprendre les mécanismes systémiques et tissu-spécifiques du rythme circadien sur la fonction cardiaque.

L'utilisation d'un GWAS afin d'étudier un phénotype complexe comme le vieillissement cardiaque a permis de détecter 244 gènes statistiquement associés au phénotype, et selon le modèle, chacune de ces variations a un effet faible sur le phénotype étudié. Ces observations entrent alors dans le modèle polygénique de l'épistasie, selon lequel de nombreux gènes influent

sur un trait complexe. Les variants ayant un effet faible sur les gènes, peuvent isolément avoir un faible effet sur un phénotype, potentialisé quand ils sont en interaction avec d'autres variants. Un autre modèle d'épistasie, le modèle omnigénique, a également été théorisé. (Boyle et al., 2017) Dans ce modèle, seul un petit nombre de gènes influence un phénotype, mais l'ensemble des gènes exprimés dans une cellule d'intérêt sont interconnectés dans un réseau global, provoquant ainsi des effets sur le phénotype par ricochet. Il apparaît alors intéressant dans un trait complexe comme le vieillissement cardiaque, qui d'après nos résultats impacterait de nombreuses voies cellulaires, d'étudier l'épistasie entre les gènes ou les variants, afin de mieux caractériser les réseaux d'interaction et donc de modéliser l'architecture génétique.

Cependant, étudier l'épistasie des variants des lignées DGRP est un véritable défi en raison de leur nombre. En effet, dans une configuration idéale, chaque variant est testé en interaction avec tous les autres variants, cependant, si l'on prend l'exemple des plus de 4 millions de variants identifiés dans les lignées DGRP, tester les 7,998x10^9 combinaisons binaires demanderait une puissance de calcul considérable. Il est donc important de trouver des méthodes permettant l'étude de l'épistasie dans les lignées DGRP à une échelle plus raisonnable.

L'équipe du Dr. Perrin a précédemment établi une méthode nommée *epi-MEIF*, capable d'évaluer l'interaction épistatique entre les variants, y compris sur des données longitudinales, puisqu'elle a également été testée sur les données de GWAS du vieillissement cardiaque (Saha et al., 2022a). Cette méthode évalue l'effet de l'interaction de 2 à 4 variants, et permet ainsi de créer un réseau d'interaction génétique entre les variants. Les lignées DGRP permettent d'évaluer l'effet d'environ 4.5 millions de variants, cependant la puissance de calcul nécessaire à l'analyse par *epi-MEIF* de l'intégralité de ces variants est bien trop importante, et une sélection de variants est nécessaire. Dans l'analyse de validation de la méthode réalisée par S. Saha, un seuil a été utilisé pour diminuer le nombre de variants à tester, seuls les variants dont la p-valeur est inférieure à 10-5 ont été utilisés. L'utilisation de cette méthode sur l'ensemble des données GWAS du vieillissement cardiaque permettrait ainsi de former un réseau d'interaction statistique et potentiellement de découvrir de nouvelles voies de régulation de la sénescence cardiaque.

Ces travaux montrent de façon tissu-spécifique que Pdp1 et Ubx ont un effet sur la physiologie cardiaque au cours du vieillissement. De plus, Pdp1 apparaît comme un régulateur potentiel de la fonction mitochondriale, bien que de plus amples recherches soient nécessaires pour le confirmer, et élucider les mécanismes moléculaires impliqués. La fonction de ces deux gènes pourrait être modifiée au cours du vieillissement cardiaque ou contribuer à ces altérations, entraînant ainsi les phénotypes observés. En effet, la théorie du vieillissement la plus commune actuellement implique une accumulation de dommages cellulaires, notamment des altérations

de la fonction mitochondriale. Le rôle de Pdp1 sur la régulation de la mitochondrie au cours du vieillissement cardiaque serait en accord avec cette théorie.

Cependant, le vieillissement est un phénomène touchant tout l'organisme, toutes les cellules, et, bien que nous nous soyons focalisés sur la fonction cardiaque dans ces travaux, les variants identifiés par nos analyses GWAS sont présents dans l'intégralité des cellules de l'organisme. Il apparaît alors intéressant d'étudier la pléiotropie de ces variants, et des gènes qui leur sont associés. Afin d'étudier la pléiotropie des variations associées au vieillissement cardiaque, il apparaît intéressant d'utiliser la collection DGRP, étudiée depuis plusieurs années pour de nombreux phénotypes variés. La base de données DGRPool (Gardeux et al., 2023) recense les données de GWAS réalisées sur les données DGRP, et a, pour une quarantaine d'études au moment de la rédaction de ce manuscrit, manuellement traité les résultats des études individuelles. Il serait alors intéressant à partir de ces données d'analyser le comportement des 380 variants significativement associés à la variation d'un trait cardiaque avec l'âge, en réalisant des études de corrélation.

De plus, il est intéressant d'élucider si ces effets pléiotropiques sont délétères, ou bénéfiques pour l'organisme. En effet, de précédentes études se sont intéressées à l'effet des variations génétiques sur la longévité (Huang et al., 2020; Magwire et al., 2010). De façon intéressante, une étude a testé chez la drosophile l'effet de mutations induites par insertions aléatoires d'éléments P, sur la longévité, et a pu confirmer que 58 mutations permettent d'étendre la longévité des individus (Magwire et al., 2010). Cependant, toutes ces mutations ont également au moins un effet délétère sur la résistance à la sous-alimentation, l'activité locomotrice, ou la résistance au froid. Cet effet pléiotropique de ces mutations est qualifié dans la littérature de pléiotropie antagoniste, un locus ayant à la fois un effet bénéfique sur un caractère et délétère sur un autre (Mackay and Anholt, 2024). Les données générées dans ces travaux de thèse, combinées à la base de données DGRPool permettraient ainsi une étude plus large de l'architecture génétique des variants en intégrant les données à l'échelle de l'organisme.

Enfin, l'étude des données de la fonction cardiaque à 4 semaines uniquement n'a actuellement pas encore été réalisée. L'étude par GWAS de ces données permettrait alors d'analyser l'architecture de la variation génétique de la fonction cardiaque sur des drosophiles âgées. Il sera alors intéressant de comparer des variants et gènes associés aux mêmes traits cardiaques sur les individus âgés d'1 semaine et de 4 semaines. Cette comparaison permettra alors de décrypter comment l'âge modifie l'architecture génétique de la fonction cardiaque.

La collection DGRP, très utilisée pour l'étude des variations naturelles, ne permet cependant pas de détecter toutes les variations. En effet, grâce à la réalisation de GWAS, il est possible de détecter l'effet de SNP et d'Indel, mais pas les variants structuraux, qui sont des réarrangements

chromosomiques plus larges. L'utilisation d'autres outils permettrait alors de compléter la description des variations naturelles, en utilisant des modèles de populations multi parentales (MMP). Cette stratégie permet à partir d'un faible nombre de parents initiaux de créer une population mosaïque de ces parents fondateurs, et de détecter l'effet de variations plus larges, en particulier de variants structuraux, sur un phénotype. Chez la drosophile, une collection a été conçue dans ce but, la collection DSPR (Drosophila Synthetic Population Ressource). (Long et al., 2014)

Pour terminer, l'étude du vieillissement est un domaine complexe et la définition même de vieillissement reste floue. Certains l'envisagent comme une forme de pathologie, de dégradation soignable afin d'améliorer la durée et la qualité de vie, mais il est également possible de l'envisager comme une variable dynamique influencée par la génétique et l'environnement. Ces travaux envisagent le vieillissement de la physiologie cardiaque comme un phénotype, et tentent d'élucider leur composante génétique, mais à long terme, la compréhension de l'architecture génétique de la fonction cardiaque et sa dynamique avec l'âge pourrait permettre de modéliser la composante génétique du vieillissement cardiaque, rentrant alors dans une approche plus intégrée de l'étude du vieillissement. (Tsurumi and Li, 2020)

# Bibliographie


Ahmad, S.M., 2017. Conserved signaling mechanisms in Drosophila heart development. Dev. Dyn. https://doi.org/10.1002/dvdy.24530

Akasaka, T., Klinedinst, S., Ocorr, K., Bustamante, E.L., Kim, S.K., Bodmer, R., 2006. The ATP-sensitive potassium (KATP) channel-encoded dSUR gene is required for Drosophila heart function and is regulated by tinman. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 11999–2004. https://doi.org/10.1073/pnas.0603098103

Arya, G.H., Weber, A.L., Wang, P., Magwire, M.M., Negron, Y.L.S., Mackay, T.F.C., Anholt, R.R.H., 2010. Natural Variation, Functional Pleiotropy and Transcriptional Contexts of Odorant Binding Protein Genes in Drosophila melanogaster. Genetics 186, 1475–1485. https://doi.org/10.1534/genetics.110.123166

Bajgar, A., Dolezel, D., Hodkova, M., 2013. Endocrine regulation of non-circadian behavior of circadian genes in insect gut. J. Insect Physiol. 59, 881–886. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.06.004

Bárcena, C., Mayoral, P., Quirós, P.M., 2018. Mitohormesis, an Antiaging Paradigm. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 340, 35–77. https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.002

Barzilai, N., Guarente, L., Kirkwood, T.B.L., Partridge, L., Rando, T.A., Slagboom, P.E., 2012. The place of genetics in ageing research. Nat. Rev. Genet. 13, 589–594. https://doi.org/10.1038/nrg3290

Beaver, L.M., Hooven, L.A., Butcher, S.M., Krishnan, N., Sherman, K.A., Chow, E.S.-Y., Giebultowicz, J.M., 2010. Circadian clock regulates response to pesticides in Drosophila via conserved Pdp1 pathway. Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol. 115, 513–520. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq083

Benito, J., Hoxha, V., Lama, C., Lazareva, A.A., Ferveur, J.-F., Hardin, P.E., Dauwalder, B., 2010. The circadian output gene takeout is regulated by Pdp1epsilon. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 2544–2549. https://doi.org/10.1073/pnas.0906422107

Benito, J., Zheng, H., Hardin, P.E., 2007. PDP1ε Functions Downstream of the Circadian Oscillator to Mediate Behavioral Rhythms. J. Neurosci. 27, 2539–2547. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4870-06.2007

Bhide, S., Trujillo, A.S., O'Connor, M.T., Young, G.H., Cryderman, D.E., Chandran, S., Nikravesh, M., Wallrath, L.L., Melkani, G.C., 2018. Increasing autophagy and blocking Nrf2 suppress laminopathy-induced age-dependent cardiac dysfunction and shortened lifespan. Aging Cell 17, e12747. https://doi.org/10.1111/acel.12747

Bier, E., Bodmer, R., 2004. Drosophila, an emerging model for cardiac disease. Gene 342, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.07.018

Bischof, J., Duffraisse, M., Furger, E., Ajuria, L., Giraud, G., Vanderperre, S., Paul, R., Björklund, M., Ahr, D., Ahmed, A.W., Spinelli, L., Brun, C., Basler, K., Merabet, S., 2018. Generation of a versatile BiFC ORFeome library for analyzing protein-protein interactions in live Drosophila. eLife 7. https://doi.org/10.7554/eLife.38853

Blau, J., Young, M.W., 1999. Cycling vrille expression is required for a functional Drosophila clock. Cell 99, 661–71.

Blice-Baum, A.C., Guida, M.C., Hartley, P.S., Adams, P., Bodmer, R., Cammarato, A., 2018. As time flies by: Investigating cardiac aging in the short-lived Drosophila model. BBA - Mol. Basis Dis. #pagerange#-#pagerange#. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.11.010

Blice-Baum, A.C., Zambon, A.C., Kaushik, G., Viswanathan, M.C., Engler, A.J., Bodmer, R., Cammarato, A., 2017. Modest overexpression of FOXO maintains cardiac proteostasis and ameliorates age-associated functional decline. Aging Cell 16, 93–103. https://doi.org/10.1111/acel.12543

Bodmer, R., 1993. The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila. Dev. Camb. Engl. 118, 719–729.
Bouska, M.J., Bai, H., 2021. Loxl2 is a mediator of cardiac aging in Drosophila melanogaster; genetically examining the role of aging clock genes. G3 GenesGenomesGenetics. https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab381
Boyle, E.A., Li, Y.I., Pritchard, J.K., 2017. An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. Cell 169, 1177–1186. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.038
Cammarato, A., Dambacher, C.M., Knowles, A.F., Kronert, W.A., Bodmer, R., Ocorr, K., Bernstein, S.I., 2008. Myosin Transducer Mutations Differentially Affect Motor Function, Myofibril Structure, and the Performance of Skeletal and Cardiac Muscles. Mol. Biol. Cell 19, 553–562. https://doi.org/10.1091/mbc.e07-09-0890
Cammarato, A., Ocorr, S., Ocorr, K., 2014. Enhanced assessment of contractile dynamics in Drosophila hearts. BioTechniques 58, 77–80. https://doi.org/10.2144/000114255
Cannon, L., Bodmer, R., 2015. Genetic manipulation of cardiac aging. J. Physiol. https://doi.org/10.1113/JP270563
Cannon, L., Zambon, A.C., Cammarato, A., Zhang, Z., Vogler, G., Munoz, M., Taylor, E., Cartry, J., Bernstein, S.I., Melov, S., Bodmer, R., 2017. Expression patterns of cardiac aging in Drosophila. Aging Cell 16, 82–92. https://doi.org/10.1111/acel.12559
Carbone, M.A., Yamamoto, A., Huang, W., Lyman, R.A., Meadors, T.B., Yamamoto, R., Anholt, R.R.H., Mackay, T.F.C., 2016. Genetic architecture of natural variation in visual senescence in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, E6620–E6629. https://doi.org/10.1073/pnas.1613833113
Chan, S.-K., Jaffe, L., Capovilla, M., Botas, J., Mann, R.S., 1994. The DNA binding specificity of ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with extradenticle, another homeoprotein. Cell 78, 603–615. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90525-8
Chen, Q.M., Maltagliati, A.J., 2018. Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection. Physiol. Genomics 50, 77–97. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00041.2017
Costanzo, M.C., Roselli, C., Brandes, M., Duby, M., Hoang, Q., Jang, D., Koesterer, R., Kudtarkar, P., Moriondo, A., Nguyen, T., Ruebenacker, O., Smadbeck, P., Sun, Y., Butterworth, A.S., Aragam, K.G., Lumbers, R.T., Khera, A.V., Lubitz, S.A., Ellinor, P.T., Gaulton, K.J., Flannick, J., Burtt, N.P., 2023. Cardiovascular Disease Knowledge Portal: A Community Resource for Cardiovascular Disease Research. Circ. Genomic Precis. Med. 16, e004181. https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.123.004181
Cripps, R.M., Olson, E.N., 2002. Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network. Dev. Biol. 246, 14–28. https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0666
Crocker, J., Abe, N., Rinaldi, L., McGregor, A.P., Frankel, N., Wang, S., Alsawadi, A., Valenti, P., Plaza, S., Payre, F., Mann, R.S., Stern, D.L., 2014. Low Affinity Binding Site Clusters Confer Hox Specificity and Regulatory Robustness. Cell 160, 191–203. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.041
Curtis, N. j., Ringo, J. m., Dowse, H. b., 1999. Morphology of the pupal heart, adult heart, and associated tissues in the fruit fly, Drosophila melanogaster. J. Morphol. 240, 225–235. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(199906)240:3<225::AID-JMOR2>3.0.CO;2-V
Cyran, S.A., Buchsbaum, A.M., Reddy, K.L., Lin, M.-C., Glossop, N.R.J., Hardin, P.E., Young, M.W., Storti, R.V., Blau, J., 2003. *vrille*, *Pdp1*, and *dClock* Form a Second Feedback Loop in the *Drosophila* Circadian Clock. Cell 112, 329–341. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00074-6
da Costa, J.P., Vitorino, R., Silva, G.M., Vogel, C., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T., 2016. A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects. Ageing Res. Rev. 29, 90–112. https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.005
Dai, D.-F., Rabinovitch, P.S., 2009. Cardiac aging in mice and humans: the role of mitochondrial oxidative stress. Trends Cardiovasc. Med. 19, 213–220. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2009.12.004

Dehghan, A., 2018. Genome-Wide Association Studies, in: Evangelou, E. (Ed.), Genetic Epidemiology: Methods and Protocols. Springer, New York, NY, pp. 37–49. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7868-7_4

Denholm, B., Skaer, H., 2009. Bringing together components of the fly renal system. Curr. Opin. Genet. Dev. 19, 526–532. https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.08.006

DESA/Population Division, 2023. World Social Report 2023: Leaving No One Behind In An Ageing World | DESA Publications [WWW Document]. URL https://desapublications.un.org/publications/world-social-report-2023-leaving-no-one-behind-ageing-world (accessed 10.14.24).

Dulcis, D., Levine, R.B., 2005. Glutamatergic innervation of the heart initiates retrograde contractions in adult Drosophila melanogaster. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 25, 271–280. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2906-04.2005

Durham, M.F., Magwire, M.M., Stone, E.A., Leips, J., 2014. Genome-wide analysis in Drosophila reveals age-specific effects of SNPs on fitness traits. Nat. Commun. 5, 4338–4338. https://doi.org/10.1038/ncomms5338

Dzitoyeva, S., Manev, H., 2013. Reduction of Cellular Lipid Content by a Knockdown of Drosophila PDP1 γ and Mammalian Hepatic Leukemia Factor. J. Lipids 2013, 297932. https://doi.org/10.1155/2013/297932

El'darov, Ch.M., Vays, V.B., Vangeli, I.M., Kolosova, N.G., Bakeeva, L.E., 2015. Morphometric examination of mitochondrial ultrastructure in aging cardiomyocytes. Biochem. Mosc. 80, 604–609. https://doi.org/10.1134/S0006297915050132

Fink, M., Callol-Massot, C., Chu, A., Ruiz-Lozano, P., Belmonte, J.C.I., Giles, W., Bodmer, R., Ocorr, K., 2009. A New Method for Detection and Quantification of Heartbeat Parameters in Drosophila, Zebrafish, and Embryonic Mouse Hearts. BioTechniques 46, 101–113. https://doi.org/10.2144/000113078

Frazer, K.A., Murray, S.S., Schork, N.J., Topol, E.J., 2009. Human genetic variation and its contribution to complex traits. Nat. Rev. Genet. 10, 241–251. https://doi.org/10.1038/nrg2554

Gardeux, V., Bevers, R.P.J., David, F.P.A., Rosschaert, E., Rochepeau, R., Deplancke, B., 2023. DGRPool: A web tool leveraging harmonized Drosophila Genetic Reference Panel phenotyping data for the study of complex traits. eLife 12. https://doi.org/10.7554/eLife.88981.1

George, H., Terracol, R., 1997. The vrille gene of Drosophila is a maternal enhancer of decapentaplegic and encodes a new member of the bZIP family of transcription factors. Genetics 146, 1345–1363. https://doi.org/10.1093/genetics/146.4.1345

Gera, J., Budakoti, P., Suhag, M., Mandal, L., Mandal, S., 2022. Physiological ROS controls Upd3-dependent modeling of ECM to support cardiac function in Drosophila. Sci. Adv. 8, eabj4991. https://doi.org/10.1126/sciadv.abj4991

Gibson, E.M., Williams, W.P., Kriegsfeld, L.J., 2009. Aging in the Circadian System: Considerations for Health, Disease Prevention, and Longevity. Exp. Gerontol. 44, 51–56. https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.05.007

Gill, S., Le, H.D., Melkani, G.C., Panda, S., 2015. Time-restricted feeding attenuates age-related cardiac decline in Drosophila. Science 347, 1265–1269. https://doi.org/10.1126/science.1256682

Gloss, B.S., Dinger, M.E., 2018. Realizing the significance of noncoding functionality in clinical genomics. Exp. Mol. Med. 50, 1–8. https://doi.org/10.1038/s12276-018-0087-0

Glossop, N.R.J., Houl, J.H., Zheng, H., Ng, F.S., Dudek, S.M., Hardin, P.E., 2003. VRILLE feeds back to control circadian transcription of Clock in the Drosophila circadian oscillator. Neuron 37, 249–61.

Gong, G., Song, M., Csordas, G., Kelly, D.P., Matkovich, S.J., Dorn, G.W., 2015. Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation. Science 350, aad2459. https://doi.org/10.1126/science.aad2459

González-Rosa, J.M., 2022. Zebrafish Models of Cardiac Disease: From Fortuitous Mutants to Precision Medicine. Circ. Res. 130, 1803–1826. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.122.320396

Gottlieb, L.A., Larsen, K., Halade, G.V., Young, M.E., Thomsen, M.B., 2021. Prolonged QT intervals in mice with cardiomyocyte-specific deficiency of the molecular clock. Acta Physiol. 233, e13707. https://doi.org/10.1111/apha.13707

Gunawardhana, K.L., Hardin, P.E., 2017. VRILLE Controls PDF Neuropeptide Accumulation and Arborization Rhythms in Small Ventrolateral Neurons to Drive Rhythmic Behavior in Drosophila. Curr. Biol. 27, 3442-3453.e4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.010

Gunawardhana, K.L., Rivas, G.B.S., Caster, C., Hardin, P.E., 2021. Crosstalk between vrille transcripts, proteins, and regulatory elements controlling circadian rhythms and development in Drosophila. iScience 24. https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101893

Hammal, F., de Langen, P., Bergon, A., Lopez, F., Ballester, B., 2022. ReMap 2022: a database of Human, Mouse, Drosophila and Arabidopsis regulatory regions from an integrative analysis of DNA-binding sequencing experiments. Nucleic Acids Res. 50, D316–D325. https://doi.org/10.1093/nar/gkab996

Harman, D., 1956. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. J. Gerontol. 11, 298–300. https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298

Harrison, B.R., Wang, L., Gajda, E., Hoffman, E.V., Chung, B.Y., Pletcher, S.D., Raftery, D., Promislow, D.E.L., 2020. The metabolome as a link in the genotype-phenotype map for peroxide resistance in the fruit fly, Drosophila melanogaster. BMC Genomics 21, 341. https://doi.org/10.1186/s12864-020-6739-1

Hoshino, A., Mita, Y., Okawa, Y., Ariyoshi, M., Iwai-Kanai, E., Ueyama, T., Ikeda, K., Ogata, T., Matoba, S., 2013. Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. Nat. Commun. 4, 2308. https://doi.org/10.1038/ncomms3308

Huang, C.L.-H., 2017. Murine Electrophysiological Models of Cardiac Arrhythmogenesis. Physiol. Rev. 97, 283–409. https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2016

Huang, W., Campbell, T., Carbone, M.A., Jones, W.E., Unselt, D., Anholt, R.R.H., Mackay, T.F.C., 2020. Context-dependent genetic architecture of Drosophila life span. PLOS Biol. 18, e3000645. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000645

Huang, W., Massouras, A., Inoue, Y., Peiffer, J., Ràmia, M., Tarone, A.M., Turlapati, L., Zichner, T., Zhu, D., Lyman, R.F., Magwire, M.M., Blankenburg, K., Carbone, M.A., Chang, K., Ellis, L.L., Fernandez, S., Han, Y., Highnam, G., Hjelmen, C.E., Jack, J.R., Javaid, M., Jayaseelan, J., Kalra, D., Lee, S., Lewis, L., Munidasa, M., Ongeri, F., Patel, S., Perales, L., Perez, A., Pu, L., Rollmann, S.M., Ruth, R., Saada, N., Warner, C., Williams, A., Wu, Y.-Q., Yamamoto, A., Zhang, Y., Zhu, Y., Anholt, R.R.H., Korbel, J.O., Mittelman, D., Muzny, D.M., Gibbs, R.A., Barbadilla, A., Johnston, J.S., Stone, E.A., Richards, S., Deplancke, B., Mackay, T.F.C., 2014. Natural variation in genome architecture among 205 Drosophila melanogaster Genetic Reference Panel lines. Genome Res. 24, 1193–208. https://doi.org/10.1101/gr.171546.113

Ikeda, Y., Sciarretta, S., Nagarajan, N., Rubattu, S., Volpe, M., Frati, G., Sadoshima, J., 2014. New Insights into the Role of Mitochondrial Dynamics and Autophagy during Oxidative Stress and Aging in the Heart. Oxid. Med. Cell. Longev. 2014, 210934. https://doi.org/10.1155/2014/210934

Ingle, K.A., Kain, V., Goel, M., Prabhu, S.D., Young, M.E., Halade, G.V., 2015. Cardiomyocyte-specific Bmal1 deletion in mice triggers diastolic dysfunction, extracellular matrix response, and impaired resolution of inflammation. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 309, H1827-1836. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00608.2015

Issa, A.R., Picao-Osorio, J., Rito, N., Chiappe, M.E., Alonso, C.R., 2019. A Single MicroRNA-Hox Gene Module Controls Equivalent Movements in Biomechanically Distinct Forms of Drosophila. Curr. Biol. 29, 2665-2675.e4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.082

Ivanov, D.K., Escott-Price, V., Ziehm, M., Magwire, M.M., Mackay, T.F.C., Partridge, L., Thornton, J.M., 2015. Longevity GWAS Using the Drosophila Genetic Reference Panel. J. Gerontol. Ser. A 70, 1470–1478. https://doi.org/10.1093/gerona/glv047

Jackson, M., Marks, L., May, G.H.W., Wilson, J.B., 2018. The genetic basis of disease. Essays Biochem. 62, 643–723. https://doi.org/10.1042/EBC20170053

Jin, K., Wilson, K.A., Beck, J.N., Nelson, C.S., Iii, G.W.B., Harrison, B.R., Djukovic, D., Raftery, D., Brem, R.B., Yu, S., Drton, M., Shojaie, A., Kapahi, P., Promislow, D., 2020. Genetic and metabolomic architecture of variation in diet restriction-mediated lifespan extension in Drosophila. PLOS Genet. 16, e1008835. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008835

Johnson, E., Ringo, J., Bray, N., Dowse, H., 1998. Genetic and pharmacological identification of ion channels central to the Drosophila cardiac pacemaker. J. Neurogenet. 12, 1–24. https://doi.org/10.3109/01677069809108552

Junion, G., Jagla, K., 2022. Diversification of muscle types in *Drosophila* embryos. Exp. Cell Res. 410, 112950. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112950

Kaushik, G., Spenlehauer, A., Sessions, A.O., Trujillo, A.S., Fuhrmann, A., Fu, Z., Venkatraman, V., Pohl, D., Tuler, J., Wang, M., Lakatta, E.G., Ocorr, K., Bodmer, R., Bernstein, S.I., Van Eyk, J.E., Cammarato, A., Engler, A.J., 2015. Vinculin network–mediated cytoskeletal remodeling regulates contractile function in the aging heart. Sci. Transl. Med. 7, 292ra99. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa5843

Kaushik, G., Zambon, A.C., Fuhrmann, A., Bernstein, S.I., Bodmer, R., Engler, A.J., Cammarato, A., 2012. Measuring passive myocardial stiffness in Drosophila melanogaster to investigate diastolic dysfunction. J. Cell. Mol. Med. 16, 1656–1662. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01517.x

Klassen, M.P., Peters, C.J., Zhou, S., Williams, H.H., Yeh Jan, L., Nung Jan, Y., 2017. Age-dependent diastolic heart failure in an in vivo Drosophila model. eLife. https://doi.org/10.7554/eLife.20851

Klinedinst, S.L., Bodmer, R., 2003. Gata factor Pannier is required to establish competence for heart progenitor formation. Dev. Camb. Engl. 130, 3027–38.

Kölsch, V., Paululat, A., 2002. The highly conserved cardiogenic bHLH factor Hand is specifically expressed in circular visceral muscle progenitor cells and in all cell types of the dorsal vessel during Drosophila embryogenesis. Dev. Genes Evol. 212, 473–485. https://doi.org/10.1007/s00427-002-0268-6

Kornfeld, O.S., Hwang, S., Disatnik, M.-H., Chen, C.-H., Qvit, N., Mochly-Rosen, D., 2015. Mitochondrial reactive oxygen species at the heart of the matter: new therapeutic approaches for cardiovascular diseases. Circ. Res. 116, 1783–1799. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305432

Kozai, D., Ogawa, N., Mori, Y., 2014. Redox Regulation of Transient Receptor Potential Channels. Antioxid. Redox Signal. 21, 971–986. https://doi.org/10.1089/ars.2013.5616

Kubli, D.A., Quinsay, M.N., Gustafsson, Å.B., 2013. Parkin deficiency results in accumulation of abnormal mitochondria in aging myocytes. Commun. Integr. Biol. 6, e24511. https://doi.org/10.4161/cib.24511

Lakatta, E.G., 2001. Heart aging: a fly in the ointment? Circ. Res. 88, 984–6.

Lam, A., Karekar, P., Shah, K., Hariharan, G., Fleyshman, M., Kaur, H., Singh, H., Gururaja Rao, S., 2018. Drosophila Voltage-Gated Calcium Channel α1-Subunits Regulate Cardiac Function in the Aging Heart. Sci. Rep. 8, 6910. https://doi.org/10.1038/s41598-018-25195-0

Lehmacher, C., Abeln, B., Paululat, A., 2012. The ultrastructure of Drosophila heart cells. Arthropod Struct. Dev. 41, 459–474. https://doi.org/10.1016/j.asd.2012.02.002

Li, H., Qi, Y., Jasper, H., 2016. Ubx dynamically regulates Dpp signaling by repressing Dad expression during copper cell regeneration in the adult Drosophila midgut. Dev. Biol. 419, 373–381. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.08.027

Li, Z., Jiang, J., Chen, Y., You, L., Huang, Y., Tan, A., Li, Z., Jiang, J., Niu, B., Meng, Z., 2014. PDP1 REGULATES ENERGY METABOLISM THROUGH THE IIS-TOR PATHWAY IN THE RED FLOUR BEETLE, Tribolium castaneum. Arch. Insect Biochem. Physiol. 85, 127–136. https://doi.org/10.1002/arch.21146

Lim, C., Lee, J., Koo, E., Choe, J., 2007. Targeted inhibition of *Pdp1ε* abolishes the circadian behavior of *Drosophila melanogaster*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 364, 294–300. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.009

Lim, H.-Y., Bao, H., Liu, Y., Wang, W., 2019. Select Septate Junction Proteins Direct ROS-Mediated Paracrine Regulation of Drosophila Cardiac Function. Cell Rep. 28, 1455-1470.e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.004

Lim, H.-Y., Wang, W., Chen, J., Ocorr, K., Bodmer, R., 2014. ROS regulate cardiac function via a distinct paracrine mechanism. Cell Rep. 7, 35–44. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.029

Lin, S.-C., Lin, M.-H., Horváth, P., Reddy, K.L., Storti, R.V., 1997. PDP1, a novel Drosophila PAR domain bZIP transcription factor expressed in developing mesoderm, endoderm and ectoderm, is a transcriptional regulator of somatic muscle genes. Development 124, 4685–4696. https://doi.org/10.1242/dev.124.22.4685

Lipsky, M.S., King, M., 2015. Biological theories of aging. Dis. Mon., Issues on Aging 61, 460–466. https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2015.09.005

Ljubojević-Holzer, S., Kraler, S., Djalinac, N., Abdellatif, M., Voglhuber, J., Schipke, J., Schmidt, M., Kling, K.-M., Franke, G.T., Herbst, V., Zirlik, A., von Lewinski, D., Scherr, D., Rainer, P.P., Kohlhaas, M., Nickel, A., Mühlfeld, C., Maack, C., Sedej, S., 2021. Loss of autophagy protein ATG5 impairs cardiac capacity in mice and humans through diminishing mitochondrial abundance and disrupting Ca2+ cycling. Cardiovasc. Res. 118, 1492–1505. https://doi.org/10.1093/cvr/cvab112

Lo, P.C.H., Skeath, J.B., Gajewski, K., Schulz, R. a., Frasch, M., 2002. Homeotic Genes Autonomously Specify the Anteroposterior Subdivision of the Drosophila Dorsal Vessel into Aorta and Heart. Dev. Biol. 251, 307–319. https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0839

Lockwood, W.K., Bodmer, R., 2002. The patterns of *wingless*, *decapentaplegic*, and *tinman* position the *Drosophila* heart. Mech. Dev. 114, 13–26. https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00044-8

Logeay, R., Géminard, C., Lassus, P., Rodríguez-Vázquez, M., Kantar, D., Heron-Milhavet, L., Fischer, B., Bray, S.J., Colinge, J., Djiane, A., 2022. Mechanisms underlying the cooperation between loss of epithelial polarity and Notch signaling during neoplastic growth in Drosophila. Development 149, dev200110. https://doi.org/10.1242/dev.200110

Long, A.D., Macdonald, S.J., King, E.G., 2014. Dissecting complex traits using the Drosophila Synthetic Population Resource. Trends Genet. 30, 488–495. https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.009

Luengo-Fernandez, R., Walli-Attaei, M., Gray, A., Torbica, A., Maggioni, A.P., Huculeci, R., Bairami, F., Aboyans, V., Timmis, A.D., Vardas, P., Leal, J., 2023. Economic burden of cardiovascular diseases in the European Union: a population-based cost study. Eur. Heart J. 44, 4752–4767. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehad583

Lyu, G., Guan, Y., Zhang, C., Zong, L., Sun, L., Huang, X., Huang, L., Zhang, L., Tian, X.-L., Zhou, Z., Tao, W., 2018. TGF-β signaling alters H4K20me3 status via miR-29 and contributes to cellular senescence and cardiac aging. Nat. Commun. 9, 2560. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04994-z

Mackay, T.F.C., Anholt, R.R.H., 2024. Pleiotropy, epistasis and the genetic architecture of quantitative traits. Nat. Rev. Genet. 25, 639–657. https://doi.org/10.1038/s41576-024-00711-3

Mackay, T.F.C., Richards, S., Stone, E. a, Barbadilla, A., Ayroles, J.F., Zhu, D., Casillas, S., Han, Y., Magwire, M.M., Cridland, J.M., Richardson, M.F., Anholt, R.R.H., Barrón, M., Bess, C., Blankenburg, K.P., Carbone, M.A., Castellano, D., Chaboub, L., Duncan, L., Harris, Z.,

Javaid, M., Jayaseelan, J.C., Jhangiani, S.N., Jordan, K.W., Lara, F., Lawrence, F., Lee, S.L., Librado, P., Linheiro, R.S., Lyman, R.F., Mackey, A.J., Munidasa, M., Muzny, D.M., Nazareth, L., Newsham, I., Perales, L., Pu, L.-L., Qu, C., Ràmia, M., Reid, J.G., Rollmann, S.M., Rozas, J., Saada, N., Turlapati, L., Worley, K.C., Wu, Y.-Q., Yamamoto, A., Zhu, Y., Bergman, C.M., Thornton, K.R., Mittelman, D., Gibbs, R. a, 2012. The Drosophila melanogaster Genetic Reference Panel. Nature 482, 173–8. https://doi.org/10.1038/nature10811

Magwire, M.M., Yamamoto, A., Carbone, M.A., Roshina, N.V., Symonenko, A.V., Pasyukova, E.G., Morozova, T.V., Mackay, T.F.C., 2010. Quantitative and Molecular Genetic Analyses of Mutations Increasing Drosophila Life Span. PLoS Genet. 6, e1001037. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001037

Mahida, S., Lubitz, S.A., Rienstra, M., Milan, D.J., Ellinor, P.T., 2011. Monogenic atrial fibrillation as pathophysiological paradigms. Cardiovasc. Res. 89, 692–700. https://doi.org/10.1093/cvr/cvq381

Malik, R., Chauhan, G., Traylor, M., Sargurupremraj, M., Okada, Y., Mishra, A., Rutten-Jacobs, L., Giese, A.-K., van der Laan, S.W., Gretarsdottir, S., Anderson, C.D., Chong, M., Adams, H.H.H., Ago, T., Almgren, P., Amouyel, P., Ay, H., Bartz, T.M., Benavente, O.R., Bevan, S., Boncoraglio, G.B., Brown, R.D., Butterworth, A.S., Carrera, C., Carty, C.L., Chasman, D.I., Chen, W.-M., Cole, J.W., Correa, A., Cotlarciuc, I., Cruchaga, C., Danesh, J., de Bakker, P.I.W., DeStefano, A.L., den Hoed, M., Duan, Q., Engelter, S.T., Falcone, G.J., Gottesman, R.F., Grewal, R.P., Gudnason, V., Gustafsson, S., Haessler, J., Harris, T.B., Hassan, A., Havulinna, A.S., Heckbert, S.R., Holliday, E.G., Howard, G., Hsu, F.-C., Hyacinth, H.I., Ikram, M.A., Ingelsson, E., Irvin, M.R., Jian, X., Jiménez-Conde, J., Johnson, J.A., Jukema, J.W., Kanai, M., Keene, K.L., Kissela, B.M., Kleindorfer, D.O., Kooperberg, C., Kubo, M., Lange, L.A., Langefeld, C.D., Langenberg, C., Launer, L.J., Lee, J.-M., Lemmens, R., Leys, D., Lewis, C.M., Lin, W.-Y., Lindgren, A.G., Lorentzen, E., Magnusson, P.K., Maguire, J., Manichaikul, A., McArdle, P.F., Meschia, J.F., Mitchell, B.D., Mosley, T.H., Nalls, M.A., Ninomiya, T., O'Donnell, M.J., Psaty, B.M., Pulit, S.L., Rannikmäe, K., Reiner, A.P., Rexrode, K.M., Rice, K., Rich, S.S., Ridker, P.M., Rost, N.S., Rothwell, P.M., Rotter, J.I., Rundek, T., Sacco, R.L., Sakaue, S., Sale, M.M., Salomaa, V., Sapkota, B.R., Schmidt, R., Schmidt, C.O., Schminke, U., Sharma, P., Slowik, A., Sudlow, C.L.M., Tanislav, C., Tatlisumak, T., Taylor, K.D., Thijs, V.N.S., Thorleifsson, G., Thorsteinsdottir, U., Tiedt, S., Trompet, S., Tzourio, C., van Duijn, C.M., Walters, M., Wareham, N.J., Wassertheil-Smoller, S., Wilson, J.G., Wiggins, K.L., Yang, Q., Yusuf, S., Bis, J.C., Pastinen, T., Ruusalepp, A., Schadt, E.E., Koplev, S., Björkegren, J.L.M., Codoni, V., Civelek, M., Smith, N.L., Trégouët, D.A., Christophersen, I.E., Roselli, C., Lubitz, S.A., Ellinor, P.T., Tai, E.S., Kooner, J.S., Kato, N., He, J., van der Harst, P., Elliott, P., Chambers, J.C., Takeuchi, F., Johnson, A.D., Sanghera, D.K., Melander, O., Jern, C., Strbian, D., Fernandez-Cadenas, I., Longstreth, W.T., Rolfs, A., Hata, J., Woo, D., Rosand, J., Pare, G., Hopewell, J.C., Saleheen, D., Stefansson, K., Worrall, B.B., Kittner, S.J., Seshadri, S., Fornage, M., Markus, H.S., Howson, J.M.M., Kamatani, Y., Debette, S., Dichgans, M., 2018. Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes. Nat. Genet. 50, 524–537. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0058-3

Martino, T.A., Young, M.E., 2015. Influence of the Cardiomyocyte Circadian Clock on Cardiac Physiology and Pathophysiology. J. Biol. Rhythms 30, 183–205. https://doi.org/10.1177/0748730415575246

McCarthy, M.I., Abecasis, G.R., Cardon, L.R., Goldstein, D.B., Little, J., Ioannidis, J.P.A., Hirschhorn, J.N., 2008. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. Nat. Rev. Genet. 9, 356–369. https://doi.org/10.1038/nrg2344

McDonald, M.J., Rosbash, M., 2001. Microarray Analysis and Organization of Circadian Gene Expression in *Drosophila*. Cell 107, 567–578. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00545-1

McPherson, R., Pertsemlidis, A., Kavaslar, N., Stewart, A., Roberts, R., Cox, D.R., Hinds, D.A., Pennacchio, L.A., Tybjaerg-Hansen, A., Folsom, A.R., Boerwinkle, E., Hobbs, H.H., Cohen, J.C., 2007. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. Science 316, 1488–1491. https://doi.org/10.1126/science.1142447

Melkani, G.C., Panda, S., 2017. Time-restricted feeding for prevention and treatment of cardiometabolic disorders. J. Physiol. 595, 3691–3700. https://doi.org/10.1113/JP273094

Mensah, G.A., Fuster, V., Murray, C.J.L., Roth, G.A., Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks Collaborators, 2023. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks, 1990-2022. J. Am. Coll. Cardiol. 82, 2350–2473. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2023.11.007

Meyer, C., Drechsler, M., Meyer, H., Paululat, A., 2023. Differentiation and function of cardiac valves in the adult Drosophila heart. J. Exp. Biol. 226, jeb245839. https://doi.org/10.1242/jeb.245839

Migunova, E., Rajamani, S., Bonanni, S., Wang, F., Zhou, C., Dubrovsky, E.B., 2023. Cardiac RNase Z edited via CRISPR-Cas9 drives heart hypertrophy in Drosophila. PloS One 18, e0286214. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286214

Miyamoto, S., 2019. Autophagy and cardiac aging. Cell Death Differ. 26, 653–664. https://doi.org/10.1038/s41418-019-0286-9

Mohamed Yusoff, A.A., 2015. Understanding Mitochondrial DNA in Brain Tumorigenesis. pp. 3–27.

Molina, M.R., Cripps, R.M., 2001. Ostia, the inflow tracts of the Drosophila heart, develop from a genetically distinct subset of cardial cells. Mech. Dev. 109, 51–59. https://doi.org/10.1016/s0925-4773(01)00509-3

Monier, B., Astier, M., Sémériva, M., Perrin, L., 2005. Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the Drosophila heart. Development 132. https://doi.org/10.1242/dev.02091

Monnier, V., Iché-Torres, M., Rera, M., Contremoulins, V., Guichard, C., Lalevée, N., Tricoire, H., Perrin, L., 2012. dJun and Vri/dNFIL3 Are Major Regulators of Cardiac Aging in Drosophila. PLoS Genet. 8. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1371/journal.pgen.1003081

Nesta, A.V., Tafur, D., Beck, C.R., 2021. Hotspots of Human Mutation. Trends Genet. TIG 37, 717–729. https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.10.003

Nielsen, J.B., Thorolfsdottir, R.B., Fritsche, L.G., Zhou, W., Skov, M.W., Graham, S.E., Herron, T.J., McCarthy, S., Schmidt, E.M., Sveinbjornsson, G., Surakka, I., Mathis, M.R., Yamazaki, M., Crawford, R.D., Gabrielsen, M.E., Skogholt, A.H., Holmen, O.L., Lin, M., Wolford, B.N., Dey, R., Dalen, H., Sulem, P., Chung, J.H., Backman, J.D., Arnar, D.O., Thorsteinsdottir, U., Baras, A., O'Dushlaine, C., Holst, A.G., Wen, X., Hornsby, W., Dewey, F.E., Boehnke, M., Kheterpal, S., Mukherjee, B., Lee, S., Kang, H.M., Holm, H., Kitzman, J., Shavit, J.A., Jalife, J., Brummett, C.M., Teslovich, T.M., Carey, D.J., Gudbjartsson, D.F., Stefansson, K., Abecasis, G.R., Hveem, K., Willer, C.J., 2018. Biobank-driven genomic discovery yields new insight into atrial fibrillation biology. Nat. Genet. 50, 1234–1239. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0171-3

Nishimura, M., Kumsta, C., Kaushik, G., Diop, S.B., Ding, Y., Bisharat-Kernizan, J., Catan, H., Cammarato, A., Ross, R.S., Engler, A.J., Bodmer, R., Hansen, M., Ocorr, K., 2014. A dual role for integrin-linked kinase and b1-integrin in modulating cardiac aging. Aging Cell 13, 431–440. https://doi.org/10.1111/acel.12193

Ocorr, K., Fink, M., Cammarato, A., Bernstein, S., Bodmer, R., 2009. Semi-automated Optical Heartbeat Analysis of small hearts. J. Vis. Exp. JoVE 1435. https://doi.org/10.3791/1435

Ocorr, K., Reeves, N.L., Wessells, R.J., Fink, M., Chen, H.-S.V., Akasaka, T., Yasuda, S., Metzger, J.M., Giles, W., Posakony, J.W., Bodmer, R., 2007. KCNQ potassium channel mutations

cause cardiac arrhythmias in Drosophila that mimic the effects of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 3943–3948. https://doi.org/10.1073/pnas.0609278104

Oka, S.-I., Hirata, T., Suzuki, W., Naito, D., Chen, Y., Chin, A., Yaginuma, H., Saito, T., Nagarajan, N., Zhai, P., Bhat, S., Schesing, K., Shao, D., Hirabayashi, Y., Yodoi, J., Sciarretta, S., Sadoshima, J., 2017. Thioredoxin-1 maintains mechanistic target of rapamycin (mTOR) function during oxidative stress in cardiomyocytes. J. Biol. Chem. 292, 18988–19000. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.807735

Olson, E.N., 2006. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. Science 313, 1922–7. https://doi.org/10.1126/science.1132292

Osterwalder, T., Yoon, K.S., White, B.H., Keshishian, H., 2001. A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 12596–12601. https://doi.org/10.1073/pnas.221303298

Paludan-Müller, C., Svendsen, J.H., Olesen, M.S., 2016. The role of common genetic variants in atrial fibrillation. J. Electrocardiol. 49, 864–870. https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2016.08.012

Parasram, K., Zuccato, A., Shin, M., Willms, R., DeVeale, B., Foley, E., Karpowicz, P., 2024. The emergence of circadian timekeeping in the intestine. Nat. Commun. 15, 1788. https://doi.org/10.1038/s41467-024-45942-4

Paternostro, G., Vignola, C., Bartsch, D.-U., Omens, J.H., McCulloch, A.D., Reed, J.C., 2001. Age-Associated Cardiac Dysfunction in Drosophila melanogaster. Circ. Res. 88, 1053–1058. https://doi.org/10.1161/hh1001.090857

Patke, A., Young, M.W., Axelrod, S., 2020. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 21, 67–84. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0179-2

Perrin, L., Monier, B., Ponzielli, R., Astier, M., Semeriva, M., 2004. Drosophila cardiac tube organogenesis requires multiple phases of Hox activity. Dev. Biol. 272. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.04.036

Perrin, L., Röder, L., 2016. Cardiac pathologies and aging: Lessons from a tiny heart. Medecine/Sciences 32. https://doi.org/10.1051/medsci/20163205013

Petersen, C.E., Tripoli, B.A., Schoborg, T.A., Smyth, J.T., 2022. Analysis of Drosophila cardiac hypertrophy by microcomputerized tomography for genetic dissection of heart growth mechanisms. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 322, H296–H309. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00387.2021

Picca, A., Mankowski, R.T., Burman, J.L., Donisi, L., Kim, J.-S., Marzetti, E., Leeuwenburgh, C., 2018. Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ageing. Nat. Rev. Cardiol. 15, 543–554. https://doi.org/10.1038/s41569-018-0059-z

Ponzielli, R., Astier, M., Chartier, A., Gallet, A., Thérond, P., Sémériva, M., 2002. Heart tube patterning in Drosophila requires integration of axial and segmental information provided by the Bithorax Complex genes and hedgehog signaling. Dev. Camb. Engl. 129, 4509–21.

Port, F., Strein, C., Stricker, M., Rauscher, B., Heigwer, F., Zhou, J., Beyersdörffer, C., Frei, J., Hess, A., Kern, K., Lange, L., Langner, N., Malamud, R., Pavlović, B., Rädecke, K., Schmitt, L., Voos, L., Valentini, E., Boutros, M., 2020. A large-scale resource for tissue-specific CRISPR mutagenesis in Drosophila. eLife 9, e53865. https://doi.org/10.7554/eLife.53865

Potier, D., Seyres, D., Guichard, C., Iche-Torres, M., Aerts, S., Herrmann, C., Perrin, L., 2014. Identification of cis-regulatory modules encoding temporal dynamics during development. BMC Genomics 15. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-534

Pyo, J.-O., Yoo, S.-M., Ahn, H.-H., Nah, J., Hong, S.-H., Kam, T.-I., Jung, S., Jung, Y.-K., 2013. Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. Nat. Commun. 4, 2300. https://doi.org/10.1038/ncomms3300

Quan, Y., Xin, Y., Tian, G., Zhou, J., Liu, X., 2020. Mitochondrial ROS-Modulated mtDNA: A Potential Target for Cardiac Aging. Oxid. Med. Cell. Longev. 2020, 9423593. https://doi.org/10.1155/2020/9423593

Raberin, A., 2019. Hypoxémie induite à l'exercice (HIE) et adaptations à l'exercice d'athlètes entraînés en endurance lors de l'acclimatation en altitude modérée : approche globale, systémique et cellulaire.

Reddy, K.L., Rovani, M.K., Wohlwill, A., Katzen, A., Storti, R.V., 2006. The *Drosophila Par domain protein I* gene, *Pdp1*, is a regulator of larval growth, mitosis and endoreplication. Dev. Biol. 289, 100–114. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.10.042

Reddy, K.L., Wohlwill, A., Dzitoeva, S., Lin, M.H., Holbrook, S., Storti, R.V., 2000. The Drosophila PAR domain protein 1 (Pdp1) gene encodes multiple differentially expressed mRNAs and proteins through the use of multiple enhancers and promoters. Dev. Biol. 224, 401–414. https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9797

Reed, H.C., Hoare, T., Thomsen, S., Weaver, T.A., White, R.A.H., Akam, M., Alonso, C.R., 2010. Alternative Splicing Modulates Ubx Protein Function in Drosophila melanogaster. Genetics 184, 745–758. https://doi.org/10.1534/genetics.109.112086

Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., Bier, E., 2001. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. Genome Res. 11, 1114–1125. https://doi.org/10.1101/gr.169101

Ren, J., Zhang, Y., 2018. Targeting Autophagy in Aging and Aging-Related Cardiovascular Diseases. Trends Pharmacol. Sci. 39, 1064–1076. https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.10.005

Ribeiro, A.S.F., Zerolo, B.E., López-Espuela, F., Sánchez, R., Fernandes, V.S., 2023. Cardiac System during the Aging Process. Aging Dis. 14, 1105–1122. https://doi.org/10.14336/AD.2023.0115

Richhariya, S., Shin, D., Le, J.Q., Rosbash, M., 2023. Dissecting neuron-specific functions of circadian genes using modified cell-specific CRISPR approaches. Proc. Natl. Acad. Sci. 120, e2303779120. https://doi.org/10.1073/pnas.2303779120

Rizki, T.M., Rizki, R.M., 1978. Larval adipose tissue of homoeotic bithorax mutants of Drosophila. Dev. Biol. 65, 476–482. https://doi.org/10.1016/0012-1606(78)90042-8

Roth, J.R., Varshney, S., de Moraes, R.C.M., Melkani, G.C., 2023. Circadian-Mediated Regulation of Cardiometabolic Disorders and Aging with Time-Restricted Feeding. Obes. Silver Spring Md 31, 40–49. https://doi.org/10.1002/oby.23664

Rotstein, B., Paululat, A., 2016. On the Morphology of the Drosophila Heart. J. Cardiovasc. Dev. Dis. 3, 15. https://doi.org/10.3390/jcdd3020015

Russell, L.K., Mansfield, C.M., Lehman, J.J., Kovacs, A., Courtois, M., Saffitz, J.E., Medeiros, D.M., Valencik, M.L., McDonald, J.A., Kelly, D.P., 2004. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. Circ. Res. 94, 525–533. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000117088.36577.EB

Safdar, A., Bourgeois, J.M., Ogborn, D.I., Little, J.P., Hettinga, B.P., Akhtar, M., Thompson, J.E., Melov, S., Mocellin, N.J., Kujoth, G.C., Prolla, T.A., Tarnopolsky, M.A., 2011. Endurance exercise rescues progeroid aging and induces systemic mitochondrial rejuvenation in mtDNA mutator mice. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 4135–4140. https://doi.org/10.1073/pnas.1019581108

Saha, S., Perrin, L., Röder, L., Brun, C., Spinelli, L., 2022a. Epi-MEIF: detecting higher order epistatic interactions for complex traits using mixed effect conditional inference forests. Nucleic Acids Res. 50, e114. https://doi.org/10.1093/nar/gkac715

Saha, S., Spinelli, L., Castro Mondragon, J.A., Kervadec, A., Lynott, M., Kremmer, L., Roder, L., Krifa, S., Torres, M., Brun, C., Vogler, G., Bodmer, R., Colas, A.R., Ocorr, K., Perrin, L., 2022b. Genetic architecture of natural variation of cardiac performance from flies to humans. eLife 11, e82459. https://doi.org/10.7554/eLife.82459

Salvage, S., Huang, C., Jackson, A., 2020. Cell-Adhesion Properties of β-Subunits in the Regulation of Cardiomyocyte Sodium Channels. Biomolecules 10, 989. https://doi.org/10.3390/biom10070989

Santalla, M., Valverde, C.A., Harnichar, E., Lacunza, E., Aguilar-Fuentes, J., Mattiazzi, A., Ferrero, P., 2014. Aging and CaMKII alter intracellular Ca2+ transients and heart rhythm in Drosophila melanogaster. PloS One 9, e101871. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101871

Schaub, C., März, J., Reim, I., Frasch, M., 2015. Org-1-Dependent Lineage Reprogramming Generates the Ventral Longitudinal Musculature of the Drosophila Heart. Curr. Biol. CB. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.029

Sellin, J., Albrecht, S., Kölsch, V., Paululat, A., 2006. Dynamics of heart differentiation, visualized utilizing heart enhancer elements of the Drosophila melanogaster bHLH transcription factor Hand. Gene Expr. Patterns GEP 6, 360–375. https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.09.012

Sessions, A.O., Engler, A.J., 2016. Mechanical Regulation of Cardiac Aging in Model Systems. Circ. Res. 118, 1553–62. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.307472

Sessions, A.O., Kaushik, G., Parker, S., Raedschelders, K., Bodmer, R., Van Eyk, J.E., Engler, A.J., 2016. Extracellular matrix downregulation in the Drosophila heart preserves contractile function and improves lifespan. Matrix Biol. https://doi.org/monier

Shao, D., Oka, S.-I., Liu, T., Zhai, P., Ago, T., Sciarretta, S., Li, H., Sadoshima, J., 2014. A redox-dependent mechanism for regulation of AMPK activation by Thioredoxin1 during energy starvation. Cell Metab. 19, 232–245. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.013

Song, M., Mihara, K., Chen, Y., Scorrano, L., Dorn, G.W., 2015. Mitochondrial fission and fusion factors reciprocally orchestrate mitophagic culling in mouse hearts and cultured fibroblasts. Cell Metab. 21, 273–285. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.011

Song, W., Owusu-Ansah, E., Hu, Y., Cheng, D., Ni, X., Zirin, J., Perrimon, N., 2017. Activin signaling mediates muscle-to-adipose communication in a mitochondria dysfunction-associated obesity model. Proc. Natl. Acad. Sci. 201708037–201708037. https://doi.org/10.1073/pnas.1708037114

Sonkar, R., Berry, R., Latimer, M.N., Prabhu, S.D., Young, M.E., Frank, S.J., 2022. Augmented Cardiac Growth Hormone Signaling Contributes to Cardiomyopathy Following Genetic Disruption of the Cardiomyocyte Circadian Clock. Front. Pharmacol. 13, 836725. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.836725

Souidi, A., Jagla, K., 2021. Drosophila Heart as a Model for Cardiac Development and Diseases. Cells 10, 3078. https://doi.org/10.3390/cells10113078

Szuplewski, S., Fraisse-Véron, I., George, H., Terracol, R., 2010. vrille is required to ensure tracheal integrity in Drosophila embryo. Dev. Growth Differ. 52, 409–418. https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2010.01186.x

Szuplewski, S., Kottler, B., Terracol, R., 2003. The Drosophila bZIP transcription factor Vrille is involved in hair and cell growth. Development 130, 3651–3662. https://doi.org/10.1242/dev.00588

Taghli-Lamallem, O., Plantié, E., Jagla, K., 2016. Drosophila in the Heart of Understanding Cardiac Diseases: Modeling Channelopathies and Cardiomyopathies in the Fruitfly. J. Cardiovasc. Dev. Dis. 3, 7. https://doi.org/10.3390/jcdd3010007

Tao, Y., Schulz, R.A., 2007. Heart development in Drosophila. Semin. Cell Dev. Biol. 18, 3–15. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.12.001

Tinkerhess, M.J., Healy, L., Morgan, M., Sujkowski, A., Matthys, E., Zheng, L., Wessells, R.J., 2012. The Drosophila PGC-1α Homolog spargel Modulates the Physiological Effects of Endurance Exercise. PLOS ONE 7, e31633. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031633

Tsurumi, A., Li, W.X., 2020. Aging mechanisms—A perspective mostly from *Drosophila*. Adv. Genet. 1, e10026. https://doi.org/10.1002/ggn2.10026

Ueda, H.R., Matsumoto, A., Kawamura, M., Iino, M., Tanimura, T., Hashimoto, S., 2002. Genome-wide Transcriptional Orchestration of Circadian Rhythms in*Drosophila**210. J. Biol. Chem. 277, 14048–14052. https://doi.org/10.1074/jbc.C100765200

Uffelmann, E., Huang, Q.Q., Munung, N.S., de Vries, J., Okada, Y., Martin, A.R., Martin, H.C., Lappalainen, T., Posthuma, D., 2021. Genome-wide association studies. Nat. Rev. Methods Primer 1, 1–21. https://doi.org/10.1038/s43586-021-00056-9

United Nations, 2024. World Population Prospects 2024: Summary of Results | DESA Publications [WWW Document]. URL https://desapublications.un.org/publications/world-population-prospects-2024-summary-results (accessed 10.14.24).

van Opbergen, C.J.M., van der Voorn, S.M., Vos, M.A., de Boer, T.P., van Veen, T.A.B., 2018. Cardiac Ca2+ signalling in zebrafish: Translation of findings to man. Prog. Biophys. Mol. Biol., The Use of Zebrafish for Cardiac Research 138, 45–58. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.05.002

Vaughan, L., Marley, R., Miellet, S., Hartley, P.S., 2018. The impact of SPARC on age-related cardiac dysfunction and fibrosis in Drosophila. Exp. Gerontol., Cardiovascular Ageing 109, 59–66. https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.011

Verweij, N., Benjamins, J.-W., Morley, M.P., van de Vegte, Y.J., Teumer, A., Trenkwalder, T., Reinhard, W., Cappola, T.P., van der Harst, P., 2020. The Genetic Makeup of the Electrocardiogram. Cell Syst. 11, 229-238.e5. https://doi.org/10.1016/j.cels.2020.08.005

Villeneuve, C., Guilbeau-Frugier, C., Sicard, P., Lairez, O., Ordener, C., Duparc, T., De Paulis, D., Couderc, B., Spreux-Varoquaux, O., Tortosa, F., Garnier, A., Knauf, C., Valet, P., Borchi, E., Nediani, C., Gharib, A., Ovize, M., Delisle, M.-B., Parini, A., Mialet-Perez, J., 2013. p53-PGC-1α pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice. Antioxid. Redox Signal. 18, 5–18. https://doi.org/10.1089/ars.2011.4373

Vogler, G., 2021. gvogler/FlyHearts-tdtK-Rscripts: First release of the R tdtK script. (First). Zenodo. https://doi.org/10.5281/zenodo.4749935

Vogler, G., Liu, J., Iafe, T.W., Migh, E., Mihaly, J., Bodmer, R., 2014. Cdc42 and formin activity control non-muscle myosin dynamics during Drosophila heart morphogenesis. J. Cell Biol. 206, 909–922. https://doi.org/10.1083/jcb.201405075

Vue, Z., Garza-Lopez, E., Neikirk, K., Katti, P., Vang, L., Beasley, H., Shao, J., Marshall, A.G., Crabtree, A., Murphy, A.C., Jenkins, B.C., Prasad, P., Evans, C., Taylor, B., Mungai, M., Killion, M., Stephens, D., Christensen, T.A., Lam, J., Rodriguez, B., Phillips, M.A., Daneshgar, N., Koh, H.-J., Koh, A., Davis, J., Devine, N., Saleem, M., Scudese, E., Arnold, K.R., Vanessa Chavarin, V., Daniel Robinson, R., Chakraborty, M., Gaddy, J.A., Sweetwyne, M.T., Wilson, G., Zaganjor, E., Kezos, J., Dondi, C., Reddy, A.K., Glancy, B., Kirabo, A., Quintana, A.M., Dai, D.-F., Ocorr, K., Murray, S.A., Damo, S.M., Exil, V., Riggs, B., Mobley, B.C., Gomez, J.A., McReynolds, M.R., Hinton Jr., A., 2023. 3D reconstruction of murine mitochondria reveals changes in structure during aging linked to the MICOS complex. Aging Cell 22, e14009. https://doi.org/10.1111/acel.14009

Wang, M., Shah, A.M., 2015. Age-associated pro-inflammatory remodeling and functional phenotype in the heart and large arteries. J. Mol. Cell. Cardiol., Perspectives on Cardiovascular Aging: Top to Bottom 83, 101–111. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.02.004

Wang, S., Long, H., Hou, L., Feng, B., Ma, Z., Wu, Y., Zeng, Y., Cai, J., Zhang, D., Zhao, G., 2023. The mitophagy pathway and its implications in human diseases. Signal Transduct. Target. Ther. 8, 1–28. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01503-7

Wang, Y., Li, Y., He, C., Gou, B., Song, M., 2019. Mitochondrial regulation of cardiac aging. Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. 1865, 1853–1864. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.008

Wangler, M.F., Hu, Y., Shulman, J.M., 2017. Drosophila and genome-wide association studies: a review and resource for the functional dissection of human complex traits. Dis. Model. Mech. 10, 77–88. https://doi.org/10.1242/dmm.027680

Wasserthal, L.T., 2007. Drosophila flies combine periodic heartbeat reversal with a circulation in the anterior body mediated by a newly discovered anterior pair of ostial valves and `venous' channels. J. Exp. Biol. 210, 3707–3719. https://doi.org/10.1242/jeb.007864

Wei, X., Yohannan, S., Richards, J.R., 2023. Physiology, Cardiac Repolarization Dispersion and Reserve, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Wessells, R.J., Fitzgerald, E., Cypser, J.R., Tatar, M., Bodmer, R., 2004. Insulin regulation of heart function in aging fruit flies. Nat. Genet. 36, 1275–1281. https://doi.org/10.1038/ng1476

Wijmenga, C., Zhernakova, A., 2018. The importance of cohort studies in the post-GWAS era. Nat. Genet. 50, 322–328. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0066-3

Wilson, K.A., Beck, J.N., Nelson, C.S., Hilsabeck, T.A., Promislow, D., Brem, R.B., Kapahi, P., 2020. GWAS for Lifespan and Decline in Climbing Ability in Flies upon Dietary Restriction Reveal decima as a Mediator of Insulin-like Peptide Production. Curr. Biol. 30, 2749-2760.e3. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.020

Wolf, M.J., Amrein, H., Izatt, J.A., Choma, M.A., Reedy, M.C., Rockman, H.A., 2006. Drosophila as a model for the identification of genes causing adult human heart disease. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 1394–1399. https://doi.org/10.1073/pnas.0507359103

Wolf, M.J., Rockman, H.A., 2008. Drosophila melanogaster as a model system for the genetics of postnatal cardiac function. Drug Discov. Today Dis. Models, Cardiovascular disease models 5, 117–123. https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2009.02.002

Wong, H.W.S., Holman, L., 2023. Pleiotropic fitness effects across sexes and ages in the Drosophila genome and transcriptome. Evolution 77, 2642–2655. https://doi.org/10.1093/evolut/qpad163

World Health Organization, 2021. World Health Statistics 2020: Monitoring Health for the SDGs, Sustainable Development Goals, 1st ed. ed. World Health Organization, Geneva.

Xie, S., Xu, S.-C., Deng, W., Tang, Q., 2023. Metabolic landscape in cardiac aging: insights into molecular biology and therapeutic implications. Signal Transduct. Target. Ther. 8, 114. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01378-8

Yan, M., Sun, S., Xu, K., Huang, X., Dou, L., Pang, J., Tang, W., Shen, T., Li, J., 2021. Cardiac Aging: From Basic Research to Therapeutics. Oxid. Med. Cell. Longev. 2021, 9570325. https://doi.org/10.1155/2021/9570325

Yelbuz, T.M., Choma, M.A., Thrane, L., Kirby, M.L., Izatt, J.A., 2002. Optical coherence tomography: a new high-resolution imaging technology to study cardiac development in chick embryos. Circulation 106, 2771–2774. https://doi.org/10.1161/01.cir.0000042672.51054.7b

Young, M.E., Brewer, R.A., Peliciari-Garcia, R.A., Collins, H.E., He, L., Birky, T.L., Peden, B.W., Thompson, E.G., Ammons, B.-J., Bray, M.S., Chatham, J.C., Wende, A.R., Yang, Q., Chow, C.-W., Martino, T.A., Gamble, K.L., 2014. Cardiomyocyte-Specific BMAL1 Plays Critical Roles in Metabolism, Signaling, and Maintenance of Contractile Function of the Heart. J. Biol. Rhythms 29, 257–276. https://doi.org/10.1177/0748730414543141

Young, M.E., Razeghi, P., Cedars, A.M., Guthrie, P.H., Taegtmeyer, H., 2001. Intrinsic Diurnal Variations in Cardiac Metabolism and Contractile Function. Circ. Res. 89, 1199–1208. https://doi.org/10.1161/hh2401.100741

Yu, L., Daniels, J., Glaser, A.E., Wolf, M.J., 2013. Raf-mediated cardiac hypertrophy in adult Drosophila. Dis. Model. Mech. 6, 964–76. https://doi.org/10.1242/dmm.011361

Yu, L., Daniels, J.P., Wu, H., Wolf, M.J., 2015. Cardiac hypertrophy induced by active Raf depends on Yorkie-mediated transcription. Sci. Signal. 8, ra13. https://doi.org/10.1126/scisignal.2005719

Zeitouni, B., Sénatore, S., Séverac, D., Aknin, C., Sémériva, M., Perrin, L., 2007. Signalling Pathways Involved in Adult Heart Formation Revealed by Gene Expression Profiling in Drosophila. PLOS Genet. 3, e174. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030174

Zemunik, T., Boraska, V., Zemunik, T., Boraska, V., 2011. Genetics of Type 1 Diabetes, in: Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/21880

Zhang, M., Shah, A.M., 2014. ROS signalling between endothelial cells and cardiac cells. Cardiovasc. Res. 102, 249–257. https://doi.org/10.1093/cvr/cvu050

Zhang, N., Yu, H., Liu, T., Zhou, Z., Feng, B., Wang, Y., Qian, Z., Hou, X., Zou, J., 2023. Bmal1 downregulation leads to diabetic cardiomyopathy by promoting Bcl2/IP3R-mediated mitochondrial Ca2+ overload. Redox Biol. 64, 102788. https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102788

Zheng, X., Koh, K., Sowcik, M., Smith, C.J., Chen, D., Wu, M.N., Sehgal, A., 2009. An Isoform-Specific Mutant Reveals a Role of PDP1ε in the Circadian Oscillator. J. Neurosci. 29, 10920–10927. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2133-09.2009

Zornik, E., Paisley, K., Nichols, R., 1999. Neural transmitters and a peptide modulate Drosophila heart rate. Peptides 20, 45–51. https://doi.org/10.1016/s0196-9781(98)00151-x