



HAL
open science

Identification et caractérisations fonctionnelles de variants génétiques rares associés aux cardiopathies.

Pauline Andrieux

► **To cite this version:**

Pauline Andrieux. Identification et caractérisations fonctionnelles de variants génétiques rares associés aux cardiopathies.. Sciences du Vivant [q-bio]. Aix-Marseille Université, 2023. Français. NNT : 0000AIXM0000 . tel-04408896

HAL Id: tel-04408896

<https://hal.science/tel-04408896v1>

Submitted on 22 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université

Le 19 Décembre 2023 par

Pauline Andrieux

Identification et caractérisations fonctionnelles de variants génétiques rares associés aux cardiopathies.

Discipline

Biologie santé

Spécialité

Génétique

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

Frédérique MAGDINIER

Présidente du jury

Marseille Medical Genetics
Marseille

Jean-Jacques SCHOTT

Rapporteur

Institut du Thorax
Nantes

Veronique PAQUIS-FLUCKLINGER

Rapporteuse

Institute for Research on Cancer
and Aging - Nice

Vincent PROCACCIO

Examineur

Centre Hospitalier Universitaire
Angers

Alice CARRIER

Examinatrice

Centre de recherche en cancérologie
de Marseille

Christophe CHEVILLARD

Directeur de thèse

Theories and Approaches of
Genomic Complexity - Marseille

Affidavit

Je soussignée, Pauline Andrieux, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Christophe Chevillard, 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 23 octobre 2023

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Pauline Andrieux', written in a cursive style.

Liste de publications et/ou brevets et participation aux conférences

Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. **Andrieux P**, Chevillard C, Cunha-Neto E, Nunes JPS. Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 20;22(21):11338. doi: 10.3390/ijms222111338. PMID: 34768767; PMCID: PMC8583510.
2. **Andrieux P***, Nunes JPS*, Brochet P, Almeida RR, Kitano E, Honda AK, Iwai LK, Andrade-Silva D, Goudenège D, Alcântara Silva KD, Vieira RS, Levy D, Bydlowski SP, Gallardo F, Torres M, Bocchi EA, Mano M, Santos RHB, Bacal F, Pomerantzeff P, Laurindo FRM, Teixeira PC, Nakaya HI, Kalil J, Procaccio V, Chevillard C*, Cunha-Neto E*. Co-Exposure of Cardiomyocytes to IFN- γ and TNF- α Induces Mitochondrial Dysfunction and Nitro-Oxidative Stress: Implications for the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Front Immunol.* 2021 Nov 11;12:755862. doi: 10.3389/fimmu.2021.755862. PMID: 34867992; PMCID: PMC8632642.
3. Ouarhache M, Marquet S, Frade AF, Ferreira AM, Ianni B, Almeida RR, Nunes JPS, Ferreira LRP, Rigaud VO, Cândido D, Mady C, Zaniratto RCF, Buck P, Torres M, Gallardo F, **Andrieux P**, Bydlowsky S, Levy D, Abel L, Cardoso CS, Santos-Junior OR, Oliveira LC, Oliveira CDL, Nunes MDC, Cobat A, Kalil J, Ribeiro AL, Sabino EC, Cunha-Neto E*, Chevillard C*. Rare Pathogenic Variants in Mitochondrial and Inflammation-Associated Genes May Lead to Inflammatory Cardiomyopathy in Chagas Disease. *J Clin Immunol.* 2021 Jul;41(5):1048-1063. doi: 10.1007/s10875-021-01000-y. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33660144; PMCID: PMC8249271.
4. Silva KDA*, Nunes JPS*, **Andrieux P**, Brochet P, Almeida RR, Kuramoto Takara ACK, Pereira NB, Abel L, Cobat A, Zaniratto RCF, Levy D, Bydlowski SP, Cecconello I, Seguro FCBDC, Kalil J, Chevillard C*, Cunha-Neto E*. Chagas Disease Megaesophagus Patients Carrying Variant *MRPS18B* P260A Display Nitro-Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Response to IFN- γ Stimulus. *Biomedicines.* 2022 Sep 7;10(9):2215. doi: 10.3390/biomedicines10092215. PMID: 36140315; PMCID: PMC9496350.
5. **Andrieux P***, Nunes JP*,....., Cunha-Neto E[†] and Chevillard C[†]. Functional characterization of mitochondria related pathogenic variants associated to an increase risk to develop severe chronic Chagas cardiomyopathy. Article en préparation.

6. Gallardo F*, Brochet P*, Goudenège D, Nunes JPS, **Andrieux P**, Ianni B, Frade AF, Mady C, Santos RHB, Kuramoto A, Steffen S, Stolf AN, Fiorelli AI, Bocchi EA, Pisseti CW, Saba B, Diac FC, Sampaio MF, Gaiotti FA, Marin-Neto JA, Fragata A, Zaniratto RCF, Siqueira S, Peixoti GDL, Bacal F, Buch P, Almeida RR, Lin-Wang HT, Schmidt A, Hirata MH, Donadi EA, Pereira AC, Rodrigues Junior V, Martinelli M, Naslajsky M, Kalil J, Procaccio V*, Cunha-Neto E*, Chevillard C*. Mitochondrial DNA haplogroups and variants predispose to Chagas disease cardiomyopathy. Soumis à Hearts.
7. Nunes JPS, Roda VM, **Andrieux P**, Kalil J, Chevillard C, Cunha-Neto E. Inflammation and mitochondria in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. Revue en cours de publication dans le journal Experimental Biology and Medicine en 2023.

Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. 1Day Meeting CRISPR Screening in Cancer Discovery – Cancéropole Provence-Alpes-Côte d'Azur – Marseille - 26 septembre 2022
2. COLLOQUE EDSVS 2022 - campus CNRS Joseph Aiguier à Marseille - 18 octobre 2022. **Poster.**

Résumé

La maladie de Chagas est une maladie parasitaire causée par *Trypanosoma cruzi*. Elle affecte environ 8 millions de personnes, et se divise en deux phases : aigüe et chronique. La phase aigüe est généralement asymptomatique et la phase chronique, évolue dans 30% des cas, en cardiomyopathies chagasiennes chroniques (CCC). Ce sont des cardiomyopathies dilatées, caractérisées par une infiltration de lymphocytes Th1 dans le cœur induisant une forte réaction inflammatoire médiée par la production de Tumor Necrosis Factors alpha (TNF- α) et d'Interféron gamma (IFN- γ). Des dysfonctionnements mitochondriaux sont également observés dans le tissu cardiaque de patients atteints de CCC. L'association de ces deux observations nous a conduits à étudier l'impact du TNF- α et de l'IFN- γ sur les fonctions mitochondriales en stimulant des cardiomyocytes humains avec ces deux cytokines. Cette analyse a démontré une altération significative dans la production d'énergie et une augmentation du stress oxydatif et nitrosatif, suggérant un effet direct du TNF- α et de l'IFN- γ sur les mitochondries cardiaques. Le développement des CCC n'est observé que dans 30% des cas, mais ce pourcentage semble plus important dans certaines familles, suggérant une contribution génétique dans cette pathologie. Nous avons donc séquencé l'ADN de 6 familles Brésiliennes multi-cas et avons mis en évidence 7 mutations hétérozygotes impliquées dans l'inflammation et le fonctionnement mitochondrial. En nous concentrant sur 3 variants localisés dans les gènes d'intérêt DHODH, UMPS et RPU3D3, nous avons observé une altération amplifiée des fonctions mitochondriales dans des cardiomyocytes mutés stimulés par du TNF- α et de l'IFN- γ .

Pour conclure, ces différents résultats illustrent l'impact des cytokines pro-inflammatoires sur la fonction mitochondriale qui, potentiellement couplés à des variants spécifiques, pourraient expliquer partiellement le développement des CCC.

Mots clés : Maladie de Chagas, cardiomyopathies, cardiomyopathies dilatées, mitochondrie, variants génétiques, OXPHOS, processus pathogéniques.

Abstract

Chagas disease is a parasitic disease caused by *Trypanosoma cruzi*. It affects around 8 million people, and is divided into two phases: acute and chronic. The acute phase is generally asymptomatic, while the chronic phase develops into chronic chagasic cardiomyopathy (CCC) in 30% of cases. These are dilated cardiomyopathies characterized by the infiltration of Th1 lymphocytes into the heart, inducing a strong inflammatory response mediated by the production of Tumor Necrosis Factors alpha (TNF- α) and Interferon gamma (IFN- γ). Mitochondrial dysfunction is also observed in the cardiac tissue of CCC patients. The combination of these two observations led us to study the impact of TNF- α and IFN- γ on mitochondrial functions by stimulating human cardiomyocytes with these two cytokines. This analysis demonstrated a significant alteration in energy production and an increase in oxidative and nitrosative stress, suggesting a direct effect of TNF- α and IFN- γ on cardiac mitochondria. The development of CCCs is observed in only 30% of cases, but this percentage seems higher in some families, suggesting a genetic contribution in this pathology. We sequenced the DNA of 6 Brazilian multi-case families and identified 7 heterozygous mutations involved in inflammation and mitochondrial function. Concentrating on 3 variants localized in genes DHODH, UMPS and RPUSD3, we observed an amplified impairment of mitochondrial functions in mutated cardiomyocytes stimulated with TNF- α and IFN- γ .

In conclusion, these different results illustrate the impact of pro-inflammatory cytokines on mitochondrial function which, potentially coupled with specific variants, could partially explain the development of CCCs.

Key words: Chagas disease, cardiomyopathies, dilated cardiomyopathies, mitochondria, genetic variants, OXPHOS, pathogenic processes.

Remerciements

Cette thèse m'a apporté beaucoup de choses que ce soit professionnellement ou personnellement. Elle m'a permis de parfaire mes connaissances et de murir sur le plan scientifique. Pourtant, ces dernières années de thèse ont été dures pour moi, à cause de problèmes de santé qui ont impacté sa faisabilité, et sans toutes les personnes que je vais citer, je n'aurais pu mener à terme celle-ci ; alors un grand MERCI à elles.

Je voudrais, tout d'abord, adresser toute ma gratitude aux membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie la Dr Frédérique Magdinier qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse, avec qui j'ai eu la joie de découvrir la recherche lors de mon stage de M1.

Je remercie mes deux rapporteurs, le Dr Jean-Jacques Schott et la Pr Veronique Paquis-Flucklinger. Je suis honorée que vous ayez accepté d'évaluer ce travail et que vous fassiez partie de mon jury.

Je remercie également mes deux examinateurs, le Pr Vincent Procaccio et la Dr Alice Carrier d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et de m'avoir prodigué de précieux conseils tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier Vincent Carrillo, Laurent Ben Soussan, Olivier Giancaterinol et Docteur Irene Sari-Minodier de AMU pour m'avoir accompagné dans mon nouveau statut de travailleur Handicapé, pour avoir tout mis en œuvre pour palier à mon handicap. Un grand merci à vous.

Merci également à Laurie Prévotat et Marie Brun, pour avoir trouvé des solutions pour permettre, au mieux, l'aménagement de mon travail.

Je tiens à remercier également Adrien Vinatier, Fatima Yahiaoui, Mathieu Pophillat et Dr Laurence AZOULAY de l'INSERM pour leur accompagnement, leur soutien et les réunions mises en place à mon retour d'opération.

Un grand merci également à Thierry Brue, Cécile Bernard et le Conseil Scientifique de MarMaRa pour m'avoir financé 6 mois en plus, pour finir ma thèse, sans eux je n'y serais pas arrivé.

Je remercie Myriam Ramadour pour toute l'aide qu'elle m'a apporté sur le manuscrit de thèse, les nombreuses relectures et pour tout le reste : ta bienveillance, ton efficacité, ta bonté, merci beaucoup.

Je tiens à remercier le Dr Christophe Chevillard, mon directeur de thèse, d'abord pour m'avoir permis de réaliser cette superbe thèse, de m'avoir donné ma chance. Merci de m'avoir guidé sur le chemin de la recherche et d'avoir fait grandir mon esprit scientifique.

Merci d'avoir été d'un si grand soutien dans le travail mais aussi dans mes soucis personnels. Vous vous êtes battu pour moi, pour que tout se passe au mieux, et pour cela merci beaucoup. J'espère vraiment qu'on pourra encore travailler ensemble, nous avons encore beaucoup d'articles, de revues à écrire et de découvertes à faire.

Je tiens à remercier Pauline Brochet pour être le carré de Pauline². Merci d'avoir été là pour moi aussi bien dans la vie que dans le travail. J'ai toujours voulu faire une thèse mais je ne savais pas que la thèse allait me faire rencontrer une véritable amie. Merci pour tous, je relirai le livre avec ma mitochondrie pour toujours avec beaucoup d'émotion. Je te souhaite le meilleur en pro et en perso dans ta nouvelle aventure américaine, hâte de rencontrer ton troisième chat.

Je tiens à remercier Magali Torres et Frédéric Gallardo qui ont été un véritable soutien tout au long de ma thèse. Autant au niveau des manipulations, qu'au niveau des discussions et des conseils.

Je tiens à remercier nos collaborateurs Brésiliens : le Pr Edecio Cunha-Neto, le Pr Jorge Kalil, João Paulo Silva Nunes, Luiz Felipe Souza e Silva, Rafael Pedro Madeira, Vinicius Moraes de Paiva Roda pour leur expertise, leur travail et pour l'intérêt porté à mes travaux.

Je tiens à remercier mes stagiaires Ambre Borie et Alysée Gongora pour m'avoir aidé dans mon travail, avoir contribué à la thèse ainsi que pour les superbes moments passés avec elles.

Je tiens également à remercier Héléa Guérin pour les moments de rigolade, de ragot et pour tout le travail qu'elle a fait sur ma thèse. Tu n'as pas compté tes heures. Tu as été d'un grand soutien pour m'aider à finir ma thèse dans les temps. Je te souhaite le meilleur dans la vie comme dans le travail et j'espère qu'on pourra retravailler ensemble.

Je tiens à remercier l'intégralité du TAGC pour leur conseil, leur écoute et leur bienveillance. Merci d'abord au directeur du laboratoire Pascal Rihet pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans son laboratoire. Merci également à Benoit Ballester et Laurence Röder pour avoir été à l'écoute afin que ma thèse se passe au mieux. Merci Benoit d'avoir accepté d'abandonner tes travaux et ton ordinateur pour participer à mes comités de thèse. A un moment tu en avais même assez de cette pathologie !

Et Merci à tous les doctorants (et pas doctorants aussi) pour les midis de décompression et de discussions, ceux-ci ont été important. Pauline, Juliette, Mathieu, Katell, Thomas, Megan, Pierre, Loréna, Florian, Jean-Christophe, Gaëlle, Fayrouz, Sébastien, Megane, Sébastien, Charbel, Quentin, Samantha, Julie, Romain, Charlyne.

Merci plus particulièrement à Juliette et Mathieu pour tous les après-midis de ménage en PCC, de rigolade mais aussi de conseils et d'aides.

Je tiens également à remercier Bernard Binétruy, avec qui j'ai effectué mon stage de M2. Les connaissances et les compétences acquises m'ont été précieuses.

Je remercie également Tristan Gicquel concernant sa précieuse expertise et aide sur le Seahorse, les mitochondries isolées et tous les conseils qui l'a su m'apporter.

Je tiens également à remercier Thi Tien Nguyen pour avoir toujours été à l'écoute, notamment en culture cellulaire.

Merci à Nordine Abdoul-Galil pour ses sourires et sa bienveillance.

Un grand merci à toi Justine. Ça fait presque deux ans que l'on se voit 3 fois par semaine pour que je rééduque mon langage et je suis très heureuse d'être tombé sur toi, tu es une personne merveilleuse et c'est grâce à toi que j'ai fait autant de progrès alors merci.

Je tiens à remercier également le Pr Philippe Metellus pour m'avoir opéré, suivi et d'avoir été si efficace et bienveillant vis-à-vis de ma santé.

Maintenant dans un registre qui s'éloigne un peu du travail. Je tiens à remercier ma famille, mes parents : Maman et Papa c'est grâce à vous que j'en suis là, vous m'avez transmis votre combattivité à toute épreuve et peut-être aussi l'affection pour la biologie merci pour ça. Merci pour votre soutien sans faille dans le travail et dans la vie, les appels quotidiens après le travail, tous les bons moments, y compris les glaces, le weekend pour me remonter le moral. Je remercie également mes deux grands frères : Benjamin et Matthieu, ma belle-sœur Marion et mes quatre superbes neveux pour leurs soutiens. Un grand merci à mon oncle Bernard et ma tante Joëlle ainsi que leur chien Shannel pour les weekends de détente. Ma cousine Audrey et Romain, mon cousin Damien et Cécile. Merci à tous mes autres oncles et tantes, cousins, cousines qui ont toujours cru en moi.

Merci à ma belle-famille, Augusta et Inès, pour leur soutien et les moments de détente, chaque weekend.

Merci à toutes mes copines qui ont été là pour moi ces dernières années : Eva, Charline, Zoé, Noémie, Marine, Manon, Marion, Sophie et Coralie.

Et en dernier, le meilleur pour la fin, merci à toi mon chérie Hugo, c'est grâce à toi que j'ai trouvé cette thèse et c'est clairement grâce à toi que je suis arrivé au bout. Merci pour ton soutien, ton aide, des relectures, la mise en place de la bibliographie et de la table des matières. Merci d'avoir été là dans les bons et les mauvais moments, on a vécu des choses pas faciles, mais ensemble, on a survécu et cela m'a rendu plus forte. Et merci à mon chien Sydney d'avoir été d'une aide précieuse, surtout après les dures journées.

Encore Merci et Bonne lecture.

Abréviation

4HNE : 4-hydroxynonenal

Acétyl-CoA : l'acétyl-coenzyme A

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

AMPK : Protéine kinase activée par l'AMP

APAF1 : Facteur d'activation de la protéase de l'apoptose 1

ARN : Acides ribonucléiques

ARNs : ARN monocaténaire

ARVC : Cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène

ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain

CARD : Domaines de recrutement des caspases

CCC : Cardiomyopathies Chagasiques Chroniques

CLR : Récepteurs de lectine de type C

CME : Mégaoesophage Chagastique

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMH : Cardiomyopathie hypertrophique

CNV : Copy Number Variations

CoQ10 : Quinone coenzyme Q10

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

DAMP : Motifs moléculaires associés aux dommages

DCM : Cardiomyopathie dilatée

DHX58 : DExH-Box Helicase 58

DRP1 : Dynamine 1

DTU : Unités de Typage Discrètes

ECP : Eosinophil cationic protein

EDN : Eosinophil

EKG : Electrocardiogramme

ELISA : Dosage immuno-enzymatique

EMCV : Virus de l'encéphalomyocardite

EPO : Eosinophil peroxydase

FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide

FcεR : Récepteur d'IgE de haute affinité

FDCC : Forme Digestive Chronique Chagastique

FE-S : Groupes fer-souffre

FIS1 : Fission mitochondriale 1

Gsdmd : Gasdermine D

GWAS : Etude pangénomique ou Genome Wide Association Study

IFN 1 : Interféron de type 1

IFN-γ : Interféron gamma

Ig : Immunoglobulines

IL : Interleukines

INF2 : Formine Inverted Formin 2

IP3Rs : Récepteurs de l'inositol 1,4,5-trisphosphate

iPS : Cellules Souches Pluripotentes Induites

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

LC3 : Microtubules 1A/1B-chaîne lumineuse 3

LPS : Lipopolysaccharides

LVNC : Cardiomyopathie avec non-compaction de la paroi du ventricule gauche

MAM : Membrane associée aux mitochondries

MAVS : Mitochondrial antiviral signaling protein

MBP : Major basic protein

mCa⁺ : Ca⁺ mitochondrial

MCU : Transporteurs de calcium mitochondrial

MCU : Uni-transporteurs de calcium mitochondrial

MDA5 : Protéine 5 associée à la différenciation du mélanome

MEF : Fibroblastes d'embryons de souris

Mff : Facteur de fission mitochondriale

MFN : Mitofusines

MICOS : Mitochondrial contact site and cristae organizing system

MiD49 et MiD51 : Protéines de la dynamique mitochondriale de 49 et 51 kDa

MOMP : Perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie

MPP : Matrix processing peptidases

mPTP : Pore de transition de la perméabilité mitochondriale

MTN : Maladies Tropicales Négligées

mtROS : ROS mitochondriaux

NAC : Antioxydants N-acétyl-L-cystéine

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NET : Neutrophil extracellular traps

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B

NK : Natural Killer

NLR : Récepteurs de types NOD

NLRP3 : NOD-like receptor protein 3

NO : Nitric Oxide

NOS2 : Nitric Oxide Synthase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPA1 : Optic Atrophy 1

OXPHOS : Phosphorylation oxydative

PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes

PARL : Presenilin-associated rhomboid like

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase

PG : Gallate de propyle

PINK1: PTEN-induced putative kinase 1

ppp : 5'-triphosphate

PRR : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

PYD : Domaine pyrin

RE : Réticulum Endoplasmique

RIG-1 : Inductible par l'acide rétinoïque

RLR : Récepteurs de type RIG I

ROS : Espèces réactives à l'oxygène

RyRs : Récepteurs de la ryanodine

SeV : Virus de Sendai

SIRT : Sirtuines

SNP : Single Nucleotide Polymorphisms

T. cruzi : Trypanosoma cruzi

TCA : cycle de l'acide tricarboxylique

TGF- β (TGF-beta): Transforming growth factor-beta

TLR : Récepteurs de type toll

TNF : Facteur de nécrose tumorale

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

TRAIL : Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

UBL : Domaine ubiquitine-like

UCP2 : Uncoupling Protein 2

VDAC1 : Canal anionique dépendant du voltage-1

WES : Séquençage de l'exome entier

$\Delta\Psi_m$: Potentiel de membrane mitochondriale

Table des matières

Affidavit	2
Liste de publications et/ou brevets et participation aux conférences.....	3
Résumé.....	5
Abstract	6
Remerciements	7
Abréviation	10
Partie 1 : Introduction	20
Chapitre 1 : La maladie de Chagas	20
I. Découverte de la maladie	20
II. Epidémiologie de la maladie de Chagas	22
1. Situation au Brésil.....	23
2. En Europe.....	24
III. Les acteurs de la maladie.....	25
1. Le parasite.....	25
1.1. Morphologie	25
1.2. Les stades de développement	26
1.3. Différentes espèces	27
2. Les vecteurs <i>T. cruzi</i>	30
2.1. Les espèces de punaises hématophages.....	30
2.2. Les mesures antivectorielles	32
IV. Mode de transmission	34
1. La transmission materno foetal.....	34
2. La transfusion sanguine	34
3. La transplantation d'organes.....	34
4. La transmission orale.....	37
5. La transmission sexuelle	37
V. Les phases de la pathologie	37
1. Phase aigüe.....	37
1.1. Clinique.....	37
1.2. Diagnostic	38
1.3. Traitement.....	38
2. Phase chronique	39
2.1. Cardiomyopathies Chagasiques Chroniques (CCC)	39
a. Clinique.....	39
b. Diagnostic	41
c. Traitement.....	45
2.2. Forme digestive	48

a.	Clinique.....	48
b.	Diagnostic.....	49
c.	Traitement.....	50
Chapitre 2 : Réponse immunitaire et facteur génétique		51
I.	La réponse immunitaire.....	51
1.	La réponse innée.....	52
1.1.	Les phagocytes	52
a.	Les monocytes-macrophages.....	53
b.	Les cellules dendritiques	54
c.	Les polynucléaires	54
1.2.	Les cellules NK	55
1.3.	Les mastocytes	57
1.4.	Le système du complément.....	57
2.	Immunité adaptative	58
2.1.	Les lymphocytes B	58
2.2.	Les lymphocytes T.....	58
3.	Les cytokines.....	58
II.	La réponse immune de l'hôte contre le parasite dans les CCC.....	62
1.	Phase aigüe.....	62
2.	Phase chronique	62
III.	Les variations génétiques	63
1.	Définition	63
2.	Méthode d'étude.....	64
IV.	Déterminisme génétique des cardiomyopathies.....	65
1.	La cardiomyopathie dilatée	66
2.	La cardiomyopathie hypertrophique.....	68
3.	La cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène.....	69
4.	La cardiomyopathie restrictive	70
5.	La cardiomyopathie avec non-compaction du ventricule gauche.....	70
V.	Déterminisme génétique de la maladie de Chagas	71
1.	Les études Cas-Témoins et les gènes candidats	71
1.1.	Polymorphisme dans le système HLA.....	71
1.2.	Polymorphismes dans les cytokines, les chimiokines et leurs récepteurs	74
1.3.	Autres gènes	74
2.	Etude d'association pangénomique	78
Chapitre 3 : La mitochondrie.....		79
I.	Origine de la mitochondrie	79
II.	Principale fonction mitochondriale	83

1.	La chaine respiratoire	83
2.	La dynamique mitochondriale	92
2.1.	La fusion.....	92
2.2.	La fission	93
3.	Mitophagie.....	94
4.	La régulation du Calcium	96
5.	Apoptose.....	97
Chapitre 4 : Implication de la mitochondrie dans les maladies		99
III.	Implication de la mitochondrie dans les maladies infectieuses	99
IV.	Implication de la mitochondrie dans les cardiomyopathies.....	103
1.	La cardiomyopathie dilatée	103
2.	La cardiomyopathie hypertrophique.....	105
3.	Insuffisance cardiaque	105
Objectifs		106
Partie 2 : Résultats.....		110
I.	L'étude de l'effet du TNF- α et de l'IFN- γ au niveau mitochondrial sur des cardiomyocytes humains.....	110
II.	Le rôle de la mitochondrie dans infection et inflammation.	131
III.	Le rôle de l'inflammation et des mitochondries dans la maladie de Chagas.	149
IV.	La mise en évidence de variants génétiques qui amplifieraient le phénotype des patients CCC.....	165
V.	Etudes fonctionnelles des variants pathogéniques situés dans la chaine respiratoire mitochondriale et associés aux cardiomyopathies chagasiques.	183
VI.	La mise en évidence de variants génétiques associées aux formes digestives graves de la maladie de Chagas.	212
VII.	Analyse de variants mitochondriaux pouvant prédisposer aux cardiomyopathies chagasiques.....	229
Partie 3 : Discussion et perspectives.....		250
I.	L'effet du TNF- α et de l'IFN- γ sur des cardiomyocytes humains	251
II.	Variants génétiques qui amplifieraient le phénotype des patients atteints de la maladie de Chagas.	257
1.	Variants génétiques rares famille spécifique trouvée dans les patients CCC.....	257
2.	Variants génétiques sur des individus non apparentés trouvés chez des patients CME.	258
3.	Variants génétiques mitochondriaux chez des individus non apparentés trouvés dans les patients CCC.....	259
III.	Etude fonctionnelle des variants	259
Bibliographies		264

Table des figures & tableaux

Figure 1 : Le docteur Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1879-1934).....	21
Figure 2 : Photographie de la première patiente diagnostiquée avec la maladie de Chagas.....	21
Figure 3 : Carte mondiale des cas de la maladie de Chagas ⁵	22
Figure 4 : Carte de l'incidence de la maladie de Chagas en Europe.....	23
Figure 5 : Dessin schématique de Trypanosoma cruzi publié en 1909 par le Docteur Carlos Chagas..	25
Figure 6 : La morphologie de T. cruzi	26
Figure 7 : Le cycle du parasite du parasite T. cruzi.....	27
Figure 8 : Evolution des DTUs selon deux modèles.....	28
Figure 9 : La répartition des sept lignées sur le continent américain	29
Figure 10 : Distribution des sept lignées en fonction de l'environnement sauvage et domestique	30
Figure 11 : Schéma des phases de développement des triatomes	31
Figure 12 : La répartition de 20 espèces de triatomes sur le continent américain.....	32
Table 1 : Tableau des organes transplantés ayant pour donneurs des patients infectés par T. cruzi aux Etats-Unis et devenir des receveurs.....	36
Figure 13 : Photographie de patients en phase aigüe.....	37
Figure 14 : Schéma explicatif du système de conduction cardiaque et des anomalies identifiées chez les patients présentant la maladie de Chagas.....	40
Figure 15 : Schéma de plusieurs anomalies myocardiques retrouvées chez les patients CCC	41
Figure 16 : ECG d'un patient souffrant de la maladie de Chagas ayant trois altérations : le bloc de branche droit, un hémibloc antérieur gauche et une extrasystole ventriculaire	43
Figure 17 : Radiographie du thorax chez un patient atteint de cardiomyopathie chagassique montrant une augmentation de la surface cardiaque.....	44
Figure 18 : Echocardiographie d'un patient présentant une cardiomyopathie dilatée avec une fraction d'éjection du ventricule gauche réduite de 15 à 20 % avec une hypokinésie globale sévère et un épanchement péricardique de taille légère à modérée.....	44
Figure 19 : IRM cardiaque d'un patient souffrant de la maladie de Chagas	45
Figure 20 : Un œsophagogramme baryté d'un patient atteint d'une mégacœsophage chagassique avancé	49
Figure 21 : Le système immunitaire est divisé en deux lignes de défense contre les microorganismes : l'immunité innée et l'immunité adaptative.	51
Figure 22 : Etape de la phagocytose d'une cellule phagocytaire sur un pathogène.....	53
Figure 23 : Polarisation des monocytes en macrophages M1 et M2	54
Figure 24 : Image prise au microscope à balayage coloré, d'un neutrophile utilisant un NET pour capturer des bactéries.....	55
Figure 25 : Orientation de la réponse immunitaire par les cellules NK.	56
Figure 26 : Les différentes fonctions du complément.....	57
Table 2 : Présentation des différentes chimiokines, de leurs récepteurs et de leurs caractéristiques physiologiques.....	61
Figure 27 : Les techniques d'étude en génétique et leurs variants associés.	65
Figure 28 : Schéma des différentes formes de cardiomyopathie	66
Figure 29 : Schéma de la structure et des protéines présentes dans le sarcomère	67
Figure 30 : Les gènes impliqués dans le développement de la CMH	68

Figure 31 : Structure des desmosomes	69
Table 3 : Les gènes HLA	73
Table 4 : Polymorphismes dans les cytokines, les chimiokines et leurs récepteurs	76
Table 5 : Polymorphisme des autres gènes.....	77
Figure 32 : Structure de la mitochondrie	79
Figure 33 : Représentation schématique de l'ADNmt Humain	81
Figure 34 : Les différents signaux en jeu dans la phagocytose d'une cellule apoptotique	82
Figure 35 : Les différentes voies métaboliques produisant de l'ATP	84
Figure 36 : Schéma générale du cycle de Krebs	85
Figure 37 : Schéma générale du cycle de la β -oxydation des acides gras	86
Figure 38 : Complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale.	86
Figure 39 : Représentation schématique du complexe I avec la répartition de ses sous-unités	87
Figure 40 : Représentation schématique du complexe II.....	88
Figure 41 : Représentation schématique du complexe III.....	89
Figure 42 : Représentation schématique du complexe IV	90
Figure 43 : Représentation de l'ATP synthase.....	90
Figure 44 : Structure des supercomplexes mitochondriaux	92
Figure 45 : Mécanismes de fusion et de fission	93
Figure 46 : Mécanisme de fission mitochondriale.	94
Figure 47 : Mécanisme de la Mitophagie	95
Figure 48 : La régulation du calcium intracellulaire	96
Figure 49 : Mécanisme d'activation de l'apoptose	98
Figure 50 : La mitochondrie au centre des voies RLR, NLR et TLR	99
Figure 51 : Schéma des dysfonctionnements mitochondriaux impliqués dans l'induction de la cardiomyopathie dilatée (DCM).	104
Figure 52 : La mitochondrie au centre de la réponse anti T. cruzi.	107
Figure 53 : Schéma de l'effet du TNF- α et de l'IFN- γ sur la mitochondrie dans la maladie de Chagas.....	251
Figure 54 : Représentation graphique de l'expression des gènes de la famille sirtuine dans des cardiomyocytes humains non stimulés et stimulés pendant 24h avec du TNF- α et de l'IFN- γ	253
Figure 55 : Schéma de l'effet du TNF- α et de l'IFN- γ sur les protéines SIRT1, SIRT2, SIRT3 et SIRT5 .	254
Figure 56 : Modèle de sauvetage des dysfonctionnements mitochondriaux dans la cardiomyopathie de la maladie de Chagas grâce à des molécules pharmacologiques impliquées dans les voies STAT1/ NF-kB/NOS2 ou MAPK/ NF-kB/NOS2	256
Figure 57 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale et de son lien avec la voie de biosynthèse des pyrimidines	261
Figure 58 : Les iPS générés à partir de la famille nucléaire où la mutation du gène DHODH a été trouvée	262

Partie 1 : Introduction

Chapitre 1 : La maladie de Chagas

I. Découverte de la maladie

La maladie de Chagas ou *Trypanosoma* américaine a été découverte en 1909 par le docteur Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1879-1934) ¹ (Figure 1). Celui-ci est né en 1878, dans une exploitation de café, près de la ville d'Oliveria, dans l'état du Minas Gerais au Brésil ². Il est diplômé de la faculté de médecine de Rio de Janeiro en 1903 pour avoir écrit une thèse sur le paludisme, sous la direction du docteur Oswaldo Cruz. En Juin 1907, une épidémie de paludisme fait rage chez les ouvriers participant à l'extension des chemins de fer entre Corinto et Pirapora, compromettant les travaux et le Dr Carlos Chagas est envoyé sur place afin de mettre en œuvre une campagne contre le paludisme. Il installe son laboratoire dans un wagon de chemin de fer dans la ville de Laussance et commence à examiner les espèces animales de cette région. Il s'intéresse aussi bien aux parasites qu'aux insectes vecteurs qui pourraient les transmettre. En examinant le sang d'un singe (*Callithrix penicillata*), il identifie un nouveau protozoaire de la famille des *Trypanosoma* : *Trypanosoma minasense*, parasite non pathogène pour le singe. Il continue ses investigations et imagine que, comme le paludisme avec le moustique, il pourrait y avoir un insecte vecteur qui pourrait transporter le parasite. On lui parla alors de punaises hématophages qui proliféreraient dans les maisons en terre des habitants pauvres de la région. Cette punaise est nommée par la population « Barbeira » et vient piquer les habitants, la nuit, au niveau du visage. Carlos Chagas va examiner de nombreuses punaises et va trouver dans les intestins de celles-ci, un protozoaire flagellé. N'ayant pas les moyens d'analyser plus en détails ce protozoaire flagellé, il envoie quelques insectes à l'institut de Manganguihso. A l'institut, le docteur Oswaldo Cruz va mettre en contact les insectes envoyés par Carlos Chagas avec des ouistitis, et va observer, 20 à 30 jours après, l'infection par des formes de *Trypanosoma* dans le sang. Carlos Chagas, de retour de Laussance, analyse ces protozoaires flagellés et se rend compte qu'il vient de découvrir une nouvelle espèce de *Trypanosoma* et la nomme *Trypanosoma cruzi* en l'honneur d'Oswaldo Cruz, son maître de thèse.

Suite à cette découverte, Carlos Chagas retourne dans la ville de Laussane et s'interroge sur l'existence d'autres hôtes vertébrés du parasite, avec l'idée que l'homme pourrait en être un. Il cherche le parasite chez les résidents des maisons infectées par la punaise hématophage ainsi que chez les animaux domestiques. Il va ainsi mettre en évidence le parasite chez un chat, et peu après, en février 1909, chez une petite fille de deux ans. Cette petite fille, Bérénice, va présenter des signes cliniques associant une forte fièvre, un œdème de la face, une augmentation de la rate et la présence du parasite dans le sang. Elle fut la première patiente diagnostiquée avec la maladie de Chagas¹. Bérénice restera asymptomatique le reste de sa vie et mourut de mort naturelle à l'âge de 73 ans (Figure 2). Le docteur Carlos Chagas aura identifié, de manière remarquable, le parasite : *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), son insecte vecteur : la punaise hématophage, ainsi que les symptômes cliniques comprenant : la fièvre, une augmentation de la rate et un œdème sur la face. Il sera nommé au prix Nobel deux fois en 1913 et 1921, sans victoire, mais reste, cependant, une fierté brésilienne ³.

Pour sensibiliser aux conséquences de la maladie de Chagas, une journée mondiale de la maladie de Chagas a été instaurée en 2019 par décision de la soixante-douzième Assemblée mondiale de la santé. Cette journée est célébrée le 14 avril en référence au premier cas humain montré par le docteur Carlos Chagas à cette même date en 1909 : la petite Bérénice.



Figure 1 : Le docteur Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1879-1934).

Source: Biblioteca Virtual Carlos Chagas auteur J. Pinto.



Figure 2 : Photographie de la première patiente diagnostiquée avec la maladie de Chagas. (A) Bérénice : première patiente avec un diagnostic de maladie de Chagas. (B) Journal brésilien relatant l'histoire de la maladie de Chagas et de Bérénice, titrant "La maladie de Chagas a été découverte ici" (en haut), et : "Et c'est le premier cas" (en bas). Source : Archives de l'Instituto Oswaldo Cruz

II. Epidémiologie de la maladie de Chagas

En 2020, la maladie de Chagas a touché environ 6 à 7 millions de personnes dans le monde et conduit à des maladies chroniques incurables faisant 10 000 morts par an (Figure 3). Cette maladie est endémique du continent américain, principalement d'Amérique Latine. Cependant au cours de ces dernières années, le profil épidémiologique de la maladie a changé, autant dans les régions touchées qui sont de plus en plus vastes que dans les lieux de contamination. Nous sommes passés d'une transmission plutôt rurale à une transmission urbaine, l'évolution s'expliquant par la modification des modes de vie et la mobilité des populations qui sont de plus en plus urbanisées⁴. De plus cette mobilité des populations entraîne une très forte augmentation des cas dans des régions non endémiques comme aux Etats Unis, au Canada ou dans de nombreux pays européens et en Afrique⁵.

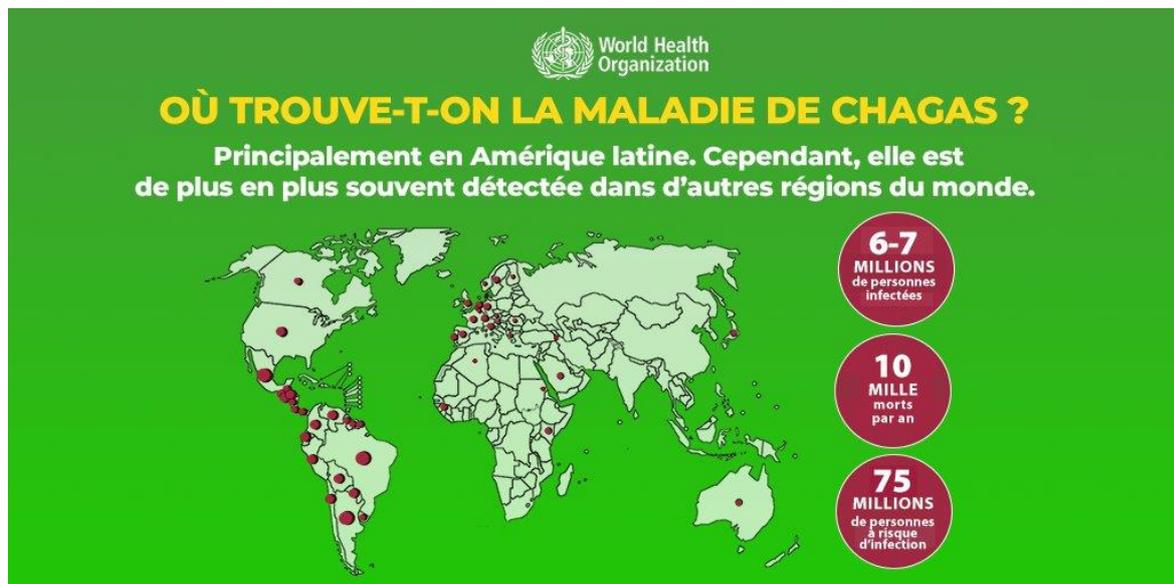


Figure 3 : Carte mondiale des cas de la maladie de Chagas⁵.

Dans les zones non endémiques comme l'Europe, le Canada, l'Afrique et le Japon, les punaises hématophages vectrices de la maladie de Chagas ne sont pas présentes. Outre la migration des populations qui explique beaucoup de cas, de nombreuses contaminations sont issues de transfusions sanguines. En effet peu de pays recherchent, de façon systématique, la maladie de la Chagas sur les donneurs à risques, seuls la France, le royaume Uni et l'Espagne ont mis en place cette stratégie⁶. En Europe les pays montrant une forte incidence sont l'Espagne, l'Italie, le Portugal ainsi de la Suisse, la Suède et les Pays-Bas⁷ (Figure 4).

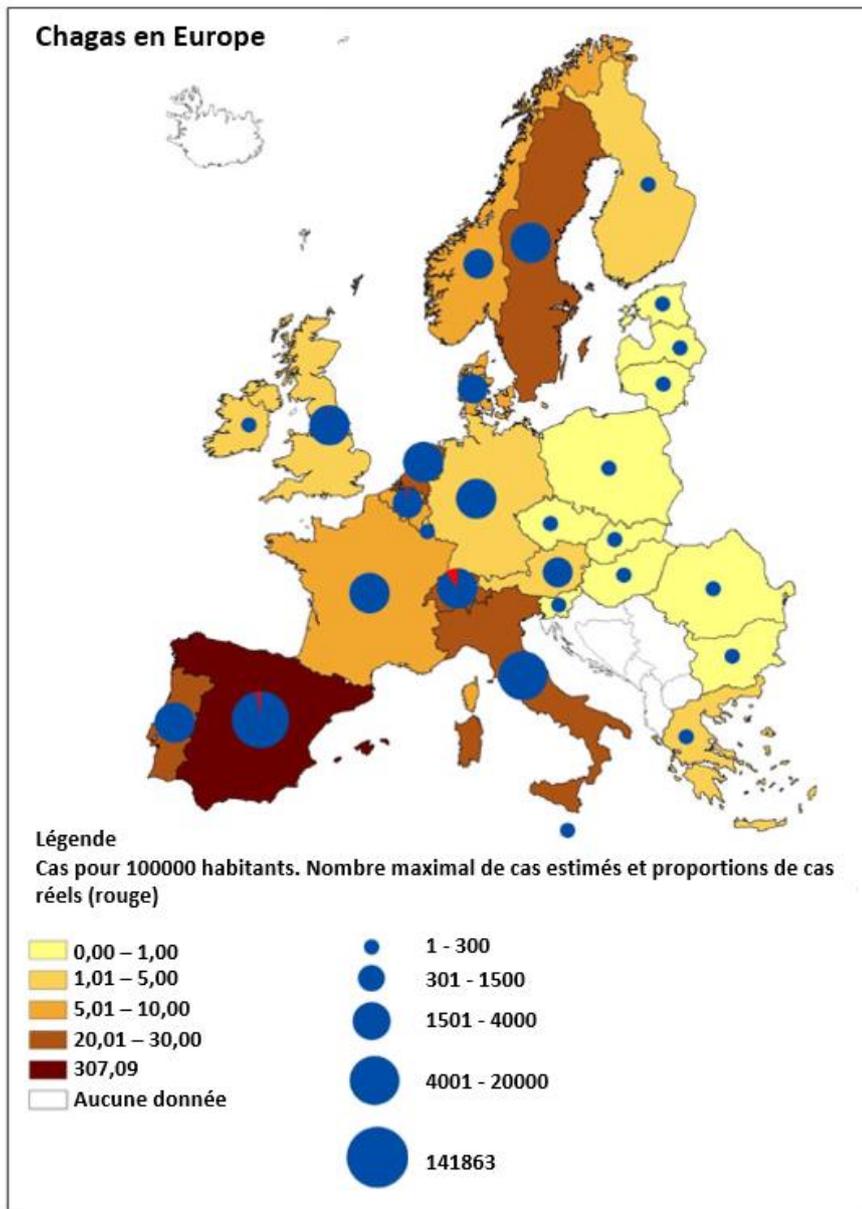


Figure 4 : Carte de l'incidence de la maladie de Chagas en Europe ⁷. Les cercles bleus représentent le nombre de cas maximal. Les secteurs en rouge dans les cercles bleus montrent la proportion de patients identifiés et publiés ⁸.

1. Situation au Brésil

Au Brésil, la maladie de Chagas est un problème de santé publique important à cause de la forte morbidité et mortalité qui lui sont associés. Une étude a identifié le nombre de décès dus à la maladie de Chagas entre 2000 et 2019, pendant cette période 22 663 092 décès ont été enregistrés au Brésil ⁹. Sur ces 22 663 092 décès, 122 291 sont directement causés par la maladie de Chagas : pour 94 788 décès, la maladie de Chagas était considérée comme une cause non explicitée et pour 27 503 le décès est associé à la maladie de Chagas ⁹. Le nombre annuel moyen de décès de la maladie de Chagas au Brésil est de 6 114,6 ⁹. Ces décès sont le plus fréquemment dus à l'atteinte cardiaque chronique de la maladie de Chagas (dans 87,9 % des cas), puis à l'atteinte digestive chronique dans 12,5 % des cas et enfin à l'atteinte cardiaque de la phase aiguë dans 3,0% des cas ⁹. Dans cette étude on remarque un taux de

mortalité plus élevée chez les hommes de ≥ 80 ans à la couleur de peau noire ayant suivi une scolarité de 1 à 3 ans et résidant dans la région du centre-ouest ⁹. Cette étude montre également une diminution de la mortalité au cours de cette période mais malgré cela, la maladie de Chagas reste une cause importante de décès dans le pays. De plus les personnes ayant une forme chronique de la maladie de Chagas sont des patients ayant beaucoup de comorbidités et sont plus sensibles à toutes formes d'infections comme par exemple à la pandémie mondiale du COVID-19 ⁹.

Au Mexique, une étude a mis en évidence que le coût d'un patient atteint de la maladie de Chagas diagnostiqué et traité revient à 10 160 dollars américains alors que le coût d'une personne non diagnostiquée revient à 11 877 dollars américains ¹⁰. Au cours de la pandémie mondiale du COVID-19, le coût économique a dû être plus élevé étant donné que les patients avec une forme chronique de la maladie de Chagas avaient plus de risque de développer une forme grave de COVID-19. Le diagnostic et le traitement dans les pays endémiques sont vraiment des enjeux majeurs tant économiques que sociétaux.

2. En Europe

En Europe on estime que plus de 4 millions de personnes originaires d'Amérique Latine vivaient en Europe en 2011 ¹¹ et que 68 000 à 123 000 personnes souffriraient de la maladie de Chagas ¹². L'Espagne est le pays d'Europe le plus touché avec environ 47 000 à 67 000 personnes atteintes ^{13,14}. L'Italie est le deuxième pays d'Europe le plus touché avec environ 5 000 à 7 000 personnes atteintes de la maladie de Chagas ¹⁴. On estime que 2116 personnes sont infectées par le parasite *T. cruzi* en France et 850 personnes au Portugal ¹⁴ (Figure 4).

Pour mettre un terme à la propagation de la maladie de Chagas, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a organisé en 2009 plusieurs réunions afin de contrôler la maladie dans les pays non endémiques et de contribuer à l'effort mondial pour interrompre la transmission de la maladie. L'objectif est de dépister systématiquement le sang ou les organes destinés à la transfusion et à la transplantation, et d'améliorer le diagnostic clinique et la prise en charge des patients ¹⁵.

III. Les acteurs de la maladie

1. Le parasite

1.1. Morphologie

La première image du parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) a été publiée, en 1909, par Carlos Chagas sous le nom *Schizotrypanum cruzi*. Le chercheur en a effectué une observation minutieuse qui lui a permis de réaliser des dessins schématiques à partir de parasites colorés à la coloration de Giemsa (Figure 5). En observant ce parasite dans plusieurs environnements comme le sang, les cultures cellulaires et les insectes, il a noté que ce parasite était pourvu de structures typiques telles que le noyau, le kinétoplaste et les flagelles. Sur les dessins schématiques publiés par Carlos Chagas, on observe également, sur plusieurs images, des granules dans les cytoplasmes des parasites, ces granules sont des acidocalcisomes caractéristiques des trypanosomatides^{16,17} (Figure 5).



Figure 5 : Dessin schématique de *Trypanosoma cruzi* publié en 1909 par le Docteur Carlos Chagas^{16,17}.

Le kinétoplaste est une région spécialisée de la mitochondrie qui abrite l'ADN mitochondrial¹⁸. Cette structure est localisée à côté du corps basal du flagelle. Deux éléments sont importants pour différencier les stades du cycle cellulaire des trypanosomes : le premier est la distance entre le corps basal du flagelle-kinétoplaste par rapport au noyau de la cellule, et la deuxième est la taille du flagelle (Figure 6). La taille du flagelle peut varier de 2 à plus de 20 μm au cours du cycle cellulaire de *T. cruzi*¹⁸. Ce parasite a de nombreuses formes et une grande hétérogénéité comme le montre Carlos Chagas dans les nombreux schémas et dessins détaillés qu'il a publiés¹⁶. Le cycle de vie du parasite *T. cruzi* se décompose en trois grandes formes principales : le trypomastigote, l'épimastigote et l'amastigote. En

premier, le stade trypomastigote se caractérise par un noyau médian et la structure corps basal du flagelle -Kinétoplaste en position postérieure, et une membrane ondulante sous le flagelle. Ensuite le stade epimastigote est assez similaire au stade trypomastigote ; cependant la structure corps basal du flagelle - Kinétoplaste se situe de manière antérieure au noyau. Et enfin, le stade amastigote est de forme ovale avec un flagelle presque inexistant (Figure 6).

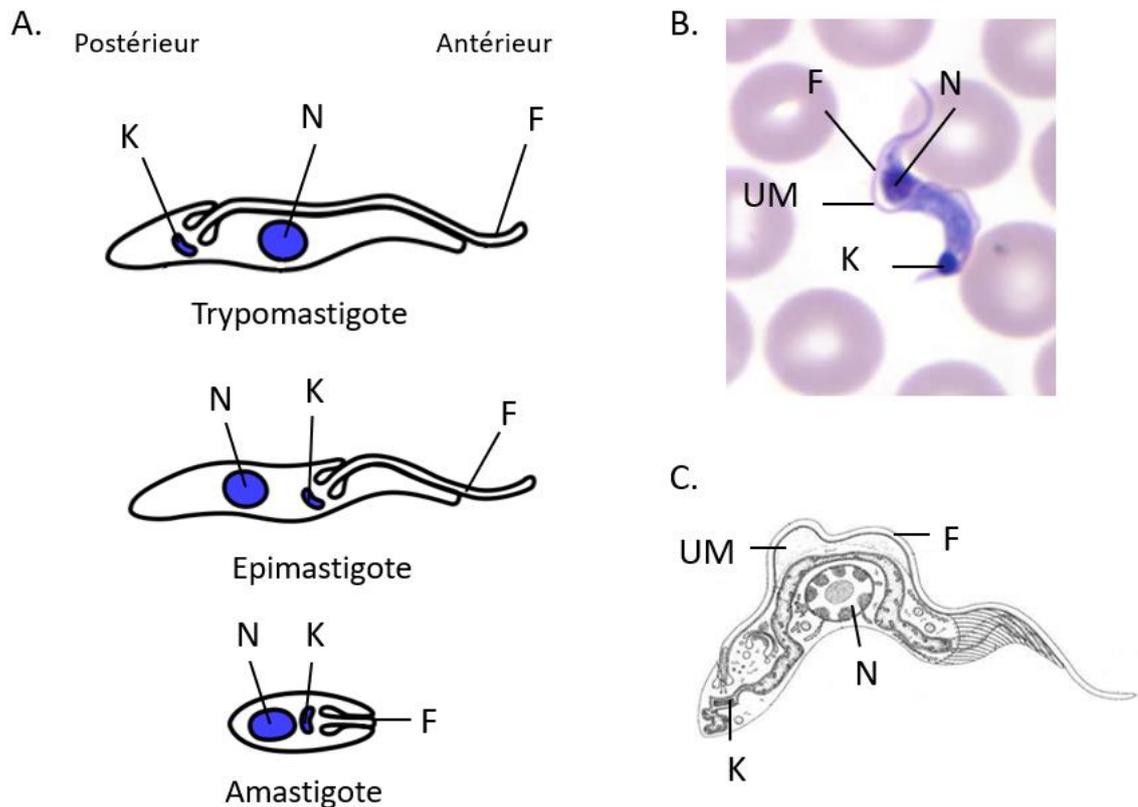


Figure 6 : La morphologie de *T. cruzi*. A. Les trois stades du cycle cellulaire de *T. cruzi*. B. Le stade Trypomastigote du parasite *T. cruzi* en coloration Giemsa dans du sang. C. Dessin schématique de la morphologie du stade Trypomastigote du parasite *T. cruzi*. K=Kinétoplaste, N=Noyau, F=Flagelle, UM= Membrane ondulante ¹⁹.

1.2. Les stades de développement

Ce parasite a un cycle de vie complexe, il va se reproduire, à la fois dans des hôtes invertébrés et des hôtes vertébrés ²⁰. Tout va débuter lorsque l'hôte invertébré, ici une punaise hématophage vectrice de la maladie de Chagas, va prendre son repas sanguin sur un hôte vertébré infecté par *T. cruzi*. Le parasite va passer dans l'estomac de la punaise sous la forme trypomastigote et va se transformer en sphéromastigote, phase intermédiaire où il a une forme arrondie, puis en épimastigote. A l'état épimastigote, le parasite peut se multiplier, avant de se transformer en trypomastigote métacyclique. La punaise infectée par le parasite, va prendre son repas sanguin sur un hôte vertébré et une fois le repas terminé, va déféquer, libérant le parasite sous forme trypomastigote métacyclique dans les fèces.

L'hôte, en se grattant, va permettre au parasite de rentrer dans la circulation sanguine. Le trypomastigote métacyclique va ensuite pénétrer dans les cellules par un processus d'endocytose. Une fois dans le cytoplasme, le parasite passe de la forme trypomastigote métacyclique à la forme amastigote. Ces amastigotes vont se diviser, et quand la cellule sera saturée, elles se retransformeront en trypomastigotes pour aller infecter d'autres cellules par le biais de la circulation sanguine ²¹. Le parasite sous forme amastigote peut également infecter directement les cellules, lorsque la cellule d'origine se rompt avant d'avoir eu la possibilité de transformer les amastigotes en trypomastigotes ²² (Figure 7).

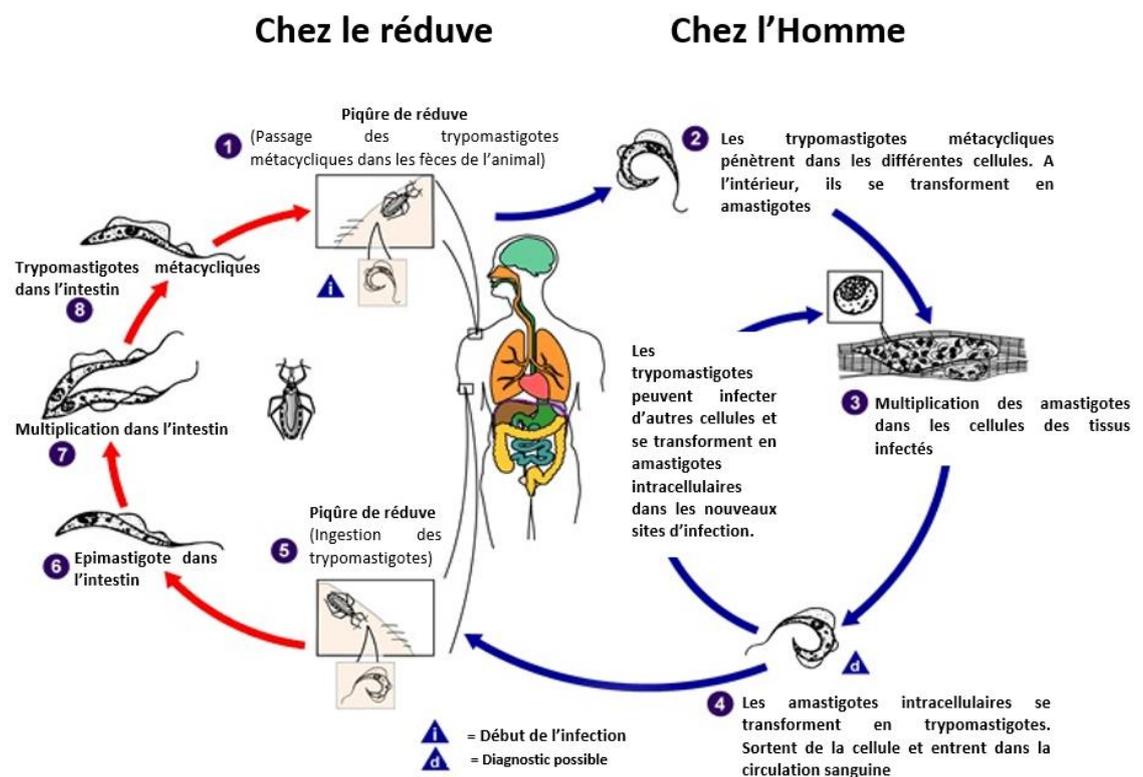


Figure 7 : Le cycle du parasite du parasite *T. cruzi*. Image du Centers for Disease Control and Prevention, Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria.

1.3. Différentes espèces

Il existe plusieurs espèces de protozoaires *Trypanosoma cruzi* qui sont divisées en différents groupes sur la base de profils de marqueurs génétiques, biologiques et biochimiques. En effet, un consensus a été proposé en 2009 par un comité d'experts pour délimiter 6 lignées majeures ou unités de typage discrètes (DTU) nommées TcI-TcVI ²³. En 2012, une nouvelle lignée, du nom de Tcbat, a été découverte chez les chauves-souris ^{24,25}. La communauté scientifique ne savait pas si cette nouvelle lignée, trouvée exclusivement sur des chauves-souris, était à inclure dans les lignées majeures des espèces de *T. cruzi*. Plus tard, des équipes ont trouvé de l'ADN de Tcbat chez des êtres humains, sur le cœur d'une momie au Chili ²⁶ et chez une enfant en Colombie ²⁷. Ainsi, après de multiples analyses de

cette lignée et la présence de nombreux marqueurs moléculaires, la communauté scientifique a reconnu la lignée Tcbat comme la septième lignée²⁸⁻³⁰.

Le parasite *T. cruzi* est principalement diploïde³¹, et sa méthode de réplication cellulaire est un processus asexué connu : la fission binaire. Théoriquement les DTUs devraient évoluer par accumulation des mutations discrètes lors de la fission binaire. Cependant il a été mis en évidence que certaines DTUs comme la TcV et TcVI auraient une origine hybride entre les TcIII et la TcIV^{32,33}. Deux modèles tentent d'expliquer l'évolution de ces DTU hybrides, le modèle des deux hybridations³⁴ et le modèle des trois ancêtres³⁵. Le modèle des deux hybridations part du postulat que TcI et TcII viennent d'un ancêtre commun. Par la suite ; TcI et TcII se sont hybridés pour former TcIV et TcIII et une deuxième hybridation entre TcIII et TcII aurait formé TcV et TcVI. Concernant le modèle des trois ancêtres, les trois premières Tc après l'ancêtre commun seraient TcI, TcII et TcIII. Une hybridation des TcII et TcIII aurait donné TcV et TcVI mais l'explication pour TcIV reste inconnue²⁹ (Figure 8).

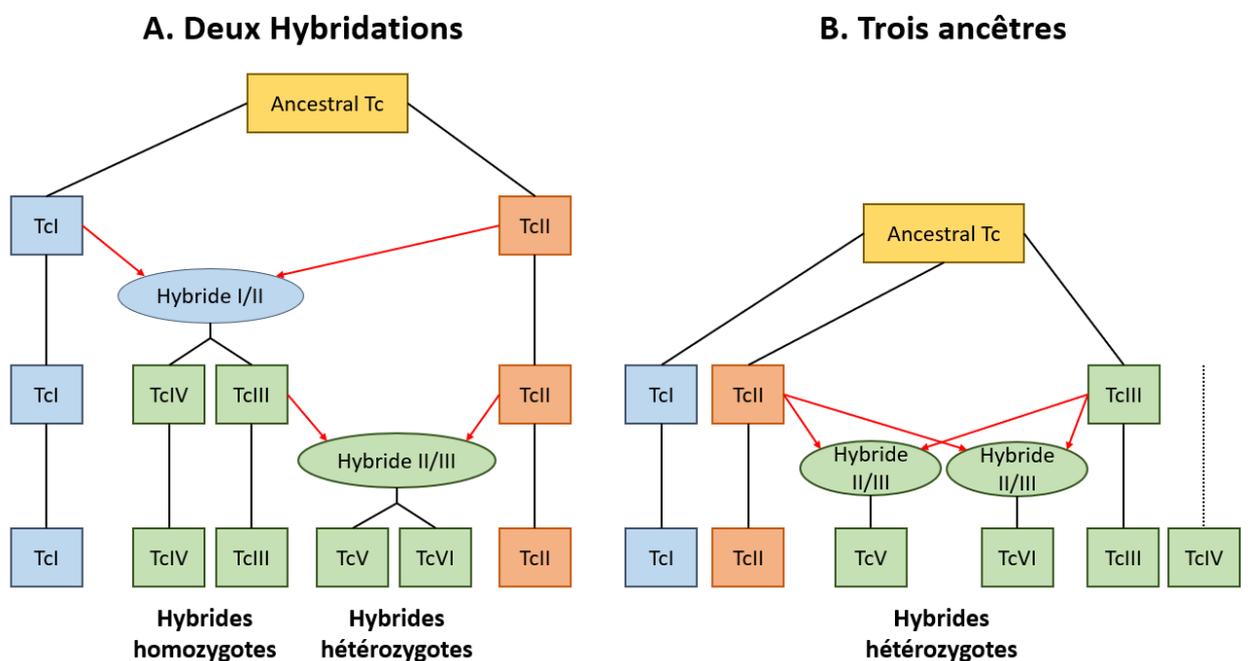


Figure 8 : Evolution des DTUs selon deux modèles. A. Le modèle des deux hybridations, B. Le modèle des trois ancêtres communs²⁹.

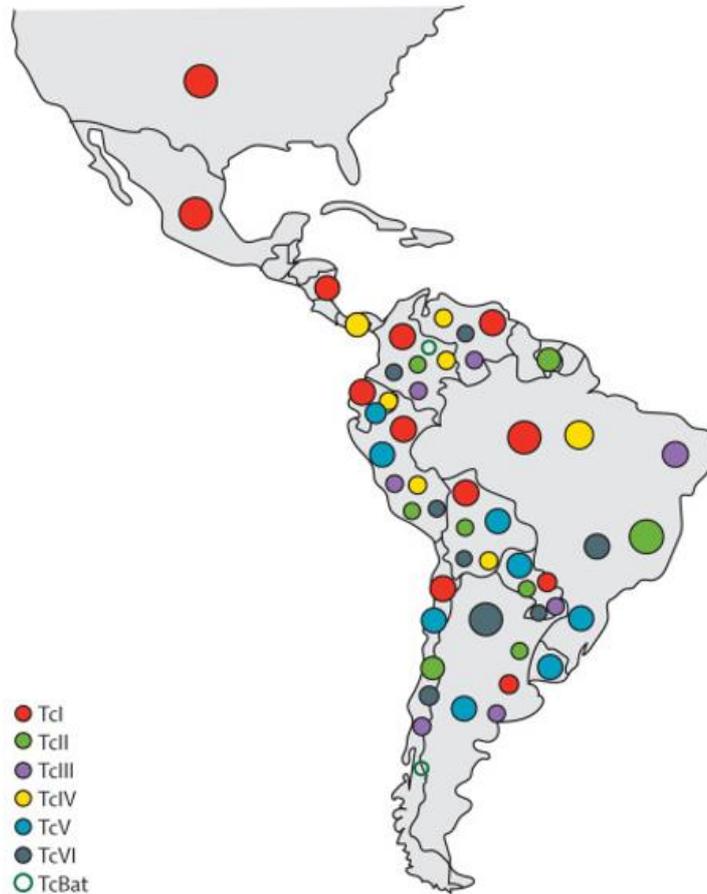


Figure 9 : La répartition des sept lignées sur le continent américain ³⁶.

Ces sept lignées sont réparties différemment sur le continent américain. En effet les lignées TcI et TcIV se retrouvent sur tout le continent américain alors que les lignées TcII, TcIII, TcV et TcVI ne concernent que le nord et le sud du continent. Enfin, la nouvelle lignée TcBat se rencontre à trois endroits bien spécifiques pour le moment, en Colombie, au Chili et au Brésil ³⁶ (Figure 9).

Le parasite *T. cruzi* circule aussi bien dans un environnement domestique que dans un environnement sauvage. Ses différents cycles vont avoir des vecteurs et des réservoirs différents. Les lignées TcII, TcIV, TcV et TcVI sont retrouvées en majorité dans un environnement domestique alors que les lignées TcI, TcIII et TcBat sont plutôt présentes dans un environnement sauvage ³⁷ (Figure 10).

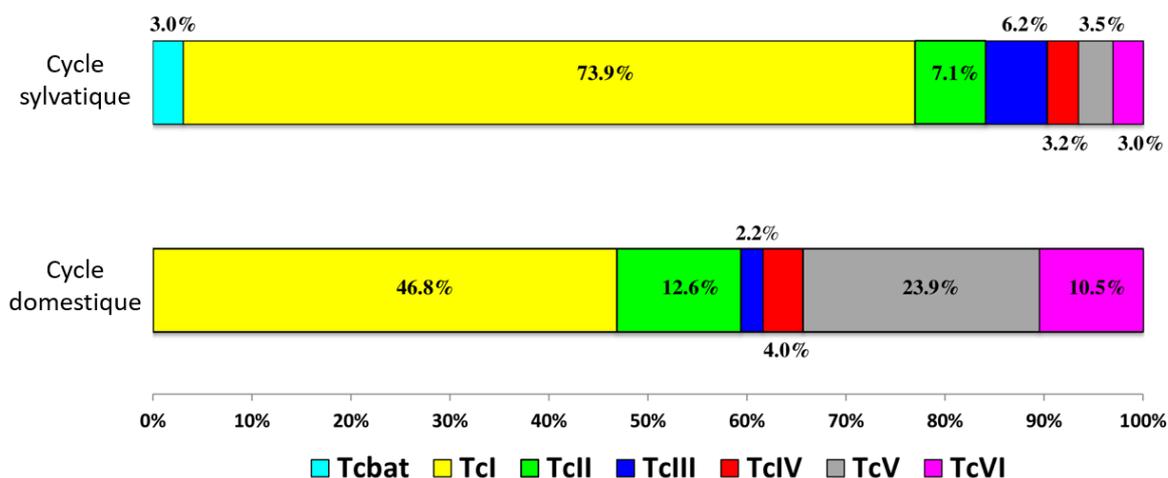


Figure 10 : Distribution des sept lignées en fonction de l'environnement sauvage et domestique³⁷.

2. Les vecteurs *T. cruzi*

2.1. Les espèces de punaises hématophages

La transmission vectorielle de la maladie de Chagas se fait via une punaise hématophage nommée Triatome. Ces punaises appartiennent à l'ordre des hémiptères, aux sous-ordres des Hétéroptères, à la famille des Reduviidae et à la sous-famille des Triatominae. Il existe 152 espèces de triatomes connues à ce jour^{38,39}. Cependant, seules 137 ont été identifiées comme pouvant transmettre la maladie de Chagas⁴⁰. Les membres de la famille des triatomes sont des insectes hémimétaboles, c'est-à-dire qu'ils ont besoin d'un repas sanguin pour se développer. Ces insectes naissent sous forme d'œufs et ont cinq phases de développement nymphal avant leur forme adulte (Figure 11). A partir de la sortie de l'œuf, ces insectes vont avoir besoin de sang pour se développer. La quantité de sang ingérée va dépendre de l'espèce et du stade de développement de l'insecte. Ces punaises vont se nourrir presque exclusivement la nuit et leurs piqûres sont indolores grâce à l'action de molécules anesthésiantes et anticoagulantes se trouvant dans leur salive⁴¹.

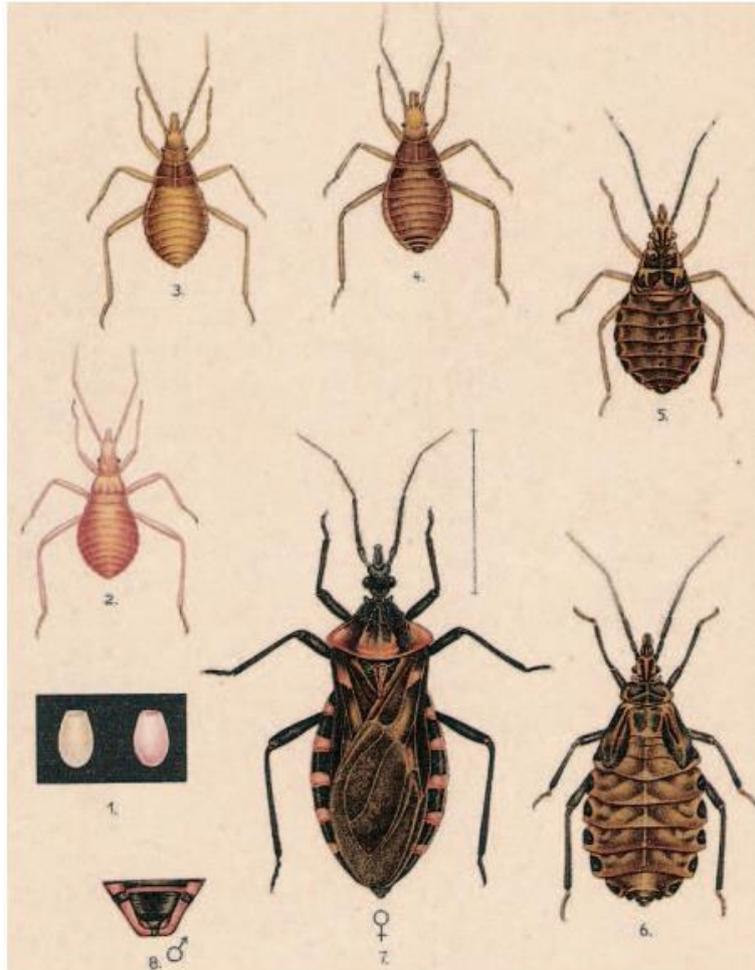


Figure 11 : Schéma des phases de développement des triatomes. 1. Oeufs 2.-3.-4.-5.-6 cinq phases de développement nymphal, 7. adulte femelle 8. Adulte mâle ⁴¹.

Lorsque la punaise prend son repas sanguin dans un hôte infecté par le parasite *T. cruzi*, le parasite va passer dans l'estomac de la punaise et se multiplier. Une fois la punaise infectée, elle va reprendre un repas sanguin, déféquer et infecter un deuxième hôte vertébré. Le parasite *T. cruzi* peut être transmis à l'homme mais aussi à plus de 150 espèces d'animaux, domestiques ou sauvages qui seront des réservoirs pour le parasite ^{41,42}. Il est très difficile d'éliminer la progression de ces punaises car une grande partie de la faune sauvage des pays endémiques est infectée par le parasite *T. cruzi*. Ce réservoir sauvage va être en contact avec le réservoir domestique avec, pour conséquence, la transmission à l'homme ⁴². De plus, le contexte socio-économique des pays endémiques va jouer un rôle important car les punaises vont se cacher dans les maisons mal isolées et sales. La transmission de *T. cruzi* à l'homme se fait principalement par ces cinq espèces de punaises *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis* et *Panstrongylus megistus* ^{43,44} (Figure 12).

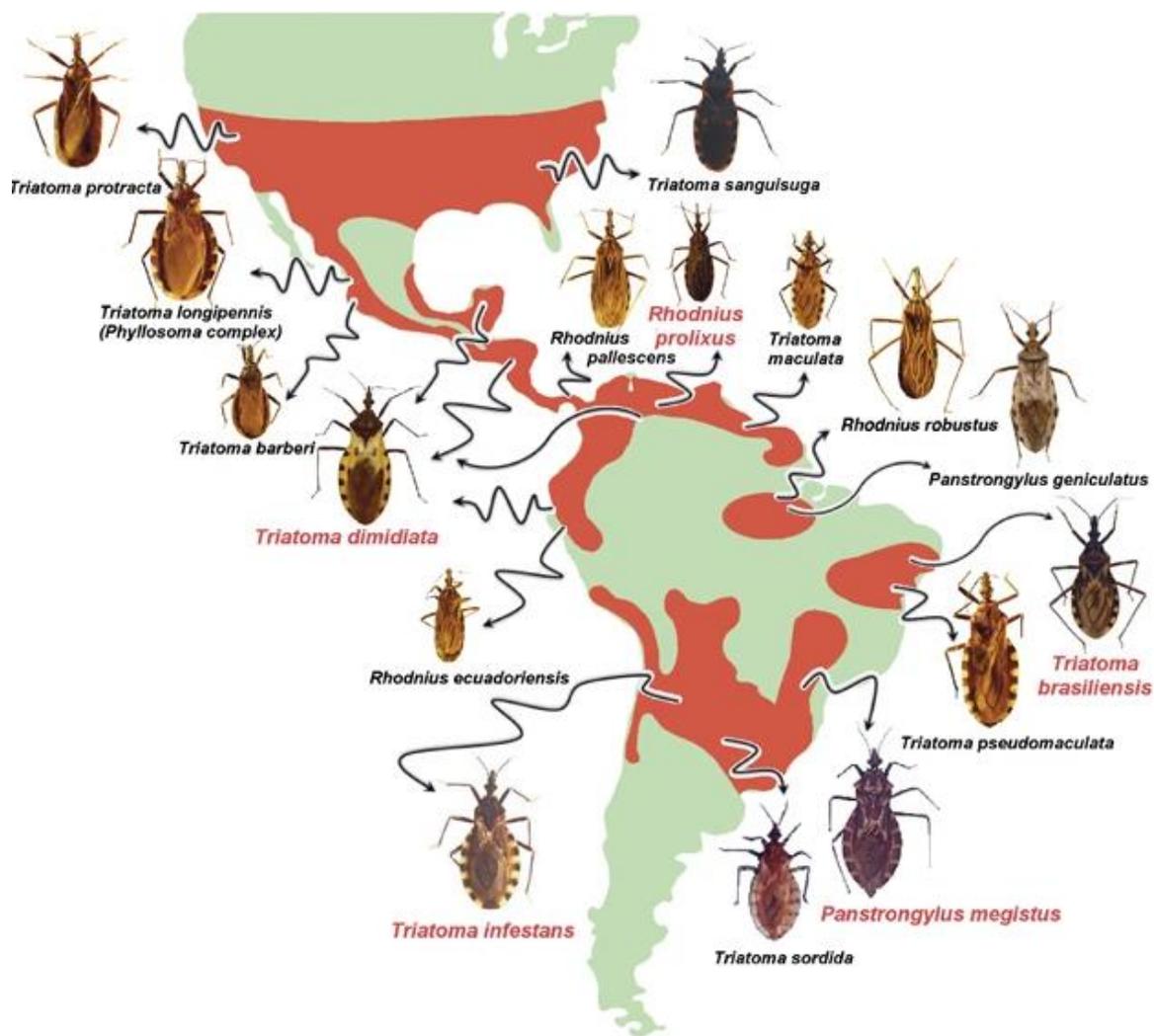


Figure 12 : La répartition de 20 espèces de triatomines sur le continent américain. Localisation en rouge, les noms surlignés en rouge sont les espèces les plus fréquemment responsables de la transmission à l'homme⁴⁴.

2.2. Les mesures antivectorielles

A l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin pour la maladie de Chagas, et les coûts des soins médicaux engendrés par la maladie sont colossaux dans les pays endémiques. En 2005, l'OMS a classé la maladie de Chagas parmi les maladies tropicales négligées (MTN). Pour parvenir à limiter le nombre de personnes atteintes de cette maladie, l'OMS avait rédigé cinq objectifs pour 2020. Le premier point était d'essayer d'interrompre la transmission vectorielle à domicile par une pulvérisation d'insecticides effectuée autour des habitations, le but étant de diminuer le nombre de punaises pour diminuer le nombre d'hôtes vertébrés infectés. L'élimination de la punaise par insecticide est efficace mais temporaire et les pays utilisant cette méthode doivent être vigilants et mener des surveillances constantes⁴⁵.

De bonnes pratiques d'hygiène doivent être mises en place en parallèle comme l'amélioration des logements, le maintien de la propreté et l'utilisation de moustiquaires de

lit, afin de prévenir les infestations par les vecteurs. Ces mesures doivent bien sûr être complétées par la mise au point de campagne d'éducation et de sensibilisation aux mesures de prévention possibles⁵. Le deuxième et le troisième point évoqués par OMS concernent l'interruption de la transmission par transfusion et transplantation d'organes testant systématiquement les échantillons. Le quatrième point est l'élimination de la maladie de Chagas congénitale. Enfin, le dernier point est la couverture à 75 % de la population éligible par un traitement antiparasitaire⁵.

IV. Mode de transmission

Le parasite *T. cruzi* est transmis à l'homme via une punaise hématophage dans les zones endémiques. Il existe cependant d'autres moyens de transmission comme la transmission materno fœtal, la transfusion sanguine, la transplantation d'organe, la transmission orale de denrées contaminées et la transmission sexuelle.

1. La transmission materno fœtal

Une infection aigüe de la maladie de Chagas pendant la grossesse peut entraîner des fausses couches, des accouchements prématurés et des enfants avec un faible poids de naissance. En effet, une mère infectée en début de grossesse, transmet le parasite par voie placentaire à son enfant. La plupart des enfants sont asymptomatiques mais lorsque les symptômes se manifestent, les nouveau-nés vont présenter des difficultés respiratoires, une jaunisse ou des myocardites. Dans les zones endémiques, le dépistage est très important car même si les nouveau-nés ne présentent aucun symptôme, ils peuvent déclarer 20 à 30 ans après, des formes chagasiennes chroniques cardiaques ou digestives qui sont actuellement sans traitement⁴⁶⁻⁵². Si les nouveau-nés sont asymptomatiques, il est possible d'observer la transmission de la maladie de Chagas en étudiant le sang du cordon ombilical après la naissance, et en cherchant la présence du parasite ou des anticorps envers celui-ci⁵²⁻⁵⁴. De plus, des prises de sang doivent être effectuées pendant plusieurs mois après la naissance du nouveau-né pour détecter la présence d'anticorps antiparasitaires ou du parasite lui-même. Cette surveillance permet une prise en charge rapide du nouveau-né⁵⁵.

2. La transfusion sanguine

La transmission de la maladie de Chagas par transfusion sanguine était, dans la zone endémique, le deuxième mode de transmission de la maladie en 1991, et concernait 18-48% des cas⁵⁶. Le Brésil a rendu obligatoire le test des poches de sang pour les anticorps anti-*T. cruzi*⁵⁷. La transfusion sanguine est un véritable problème dans les zones non endémiques puisque, en l'absence d'insecte vecteur, elle est le principal mode de transmission. Pour prévenir les contaminations par poche de sang infecté, plusieurs stratégies ont été mises en place. L'exclusion de donneurs par le biais d'entretiens et de dépistages en laboratoire sont les moyens mis en place en Australie, en Belgique, au Canada, en France, au Japon, au Luxembourg, en Nouvelle-Zélande, en Norvège, en Espagne, en Suède, en Suisse, au Royaume-Uni et aux États-Unis⁵⁸⁻⁶⁰.

3. La transplantation d'organes

La transmission de la maladie de Chagas par la transplantation d'organes est une problématique qui touche aussi bien les pays endémiques que les pays non endémiques. En effet un donneur infecté transmettra la maladie presque à chaque fois. En 2005 et 2006 le parasite *T. cruzi* a été transmis par deux donneurs pendant une greffe cardiaque, ce qui a entraîné la mort des deux receveurs⁶¹. Sachant que le cœur est un réservoir important du parasite, la transplantation de cœur d'un donneur séropositif est peu recommandée, surtout qu'avec une immunosuppression, pour accepter la greffe, les risques de réémergence du parasite sont très importants⁶². Pour les autres organes comme le rein, le foie et les poumons, la transplantation d'organes d'un donneur infecté est possible mais avec une surveillance constante après la transplantation⁶² (Table 1).

Donneur	Organe	Date de la transplantation	Date à laquelle le receveur a été diagnostiqué	Age du receveur et symptôme clinique	Traitement du receveur	Résultats du receveur
Homme immigré d'Amérique centrale	Rein et pancréas	5 Mars 2001	23 Avril 2001	Femme de 37 ans avec de la fièvre. <i>T. cruzi</i> dans le sang périphérique sur frottis sanguin	Nifurtimox pendant 4 mois, Première cure terminée et une seconde cure en cours	Mort (8 Octobre 2001). Myocardite Chagasique
	Rein	5 Mars 2001	> 23 Avril 2001	Femme de 68 ans. Asymptomatique. Hémogramme positif à <i>T. cruzi</i>	Nifurtimox pendant 4 mois	Vivant
	Foie	5 Mars 2001	> 23 Avril 2001	32 ans. Asymptomatique. Hémogramme positif à <i>T. cruzi</i>	Nifurtimox pendant plusieurs semaines (mort pendant le traitement)	Mort (8 Juillet 2001). Septicémie et insuffisance hépatique et rénale.
Homme voyageant au Mexique. Mère du patient née au Mexique	Cœur	Décembre 2005	Février 2006	Homme de 64 ans. Rejet d'organe diagnostiqué en janvier 2006. Anorexie, fièvre et diarrhée. PCR positive à <i>T. cruzi</i>	Nifurtimox	Mort (Avril 2006). Rejet d'organe. Sans lien avec la maladie de Chagas
	Foie	Décembre 2005	NA	Sérologie et PCR négatives pour <i>T. cruzi</i>	Pas de traitement	Vivant

Donneur	Organe	Date de la transplantation	Date à laquelle le receveur a été diagnostiqué	Age du receveur et symptôme clinique	Traitement du receveur	Résultats du receveur
	Rein	Décembre 2005	NA	Sérologie et PCR négatives pour <i>T. cruzi</i>	Pas de traitement	Vivant
	Rein	Décembre 2005	NA	Sérologie et PCR négatives pour <i>T. cruzi</i>	Pas de traitement	Vivant
Homme immigré de El Salvador	Cœur	Janvier 2006	Février 2006	73 ans avec fièvre, fatigue, éruption abdominale. Présence de <i>T. cruzi</i> dans les frottis sanguins.	Nifurtimox	Mort (Juin 2006). Insuffisance cardiaque. Sans lien avec la maladie de Chagas
	Foie	Janvier 2006	NA	Sérologie et PCR négatives pour <i>T. cruzi</i>	Pas de traitement	Vivant
	Rein	Janvier 2006	NA	Sérologie et PCR négatives pour <i>T. cruzi</i>	Pas de traitement	Vivant
	Rein	Janvier 2006	NA	Sérologie et PCR négatives pour <i>T. cruzi</i>	Pas de traitement	Vivant

Table 1 : Tableau des organes transplantés ayant pour donneurs des patients infectés par *T. cruzi* aux Etats-Unis et devenir des receveurs⁶².

4. La transmission orale

La transmission orale du parasite est courante dans les zones endémiques, et constitue la principale source de contamination des humains, des insectes vecteurs et des animaux. En Amérique du sud plusieurs épidémies ont impliqué des aliments contaminés liquides (du jus de canne, du jus d'orange, de la soupe et de l'eau) ou solides (mandarines et de goyaves)^{63,64}.

5. La transmission sexuelle

Plusieurs études *in vivo* ont mis en évidence une transmission sexuelle de la maladie de Chagas. En effet, des équipes ont montré que des souris mâles et femelles ont infecté des partenaires naïfs non infectés⁶⁵⁻⁶⁷. De plus, le parasite *T. cruzi* a été retrouvé dans des éjaculats humains, et lorsque l'on met un aliquot de sperme humain dans le vagin de souris femelles naïves, ces femelles vont présenter une infection à *T. cruzi*⁶⁸.

V. Les phases de la pathologie

La maladie de Chagas se divise en deux phases, une phase aiguë et une phase chronique.

1. Phase aiguë

1.1. Clinique

La phase aiguë est la rencontre du parasite avec son hôte. La rencontre peut se faire de différentes manières en fonction des différents modes de transmission connus (Voir le chapitre III 2. Et IV). La phase aiguë dure entre 6 à 8 semaines, elle est la plupart du temps asymptomatique, mais dans certains cas les patients vont présenter des symptômes comme de la fièvre, des malaises, une augmentation du foie et de la rate et des nœuds lymphatiques. Cinq pour cent des patients vont présenter une phase aiguë sévère et vont souffrir de myocardite, encéphalite ou méningo-encéphalite^{69-72,72-74}. La pénétration du parasite à travers la peau de l'hôte peut parfois provoquer un signe de Romana (Figure 13A) ou des chagomes (Figure 13B).

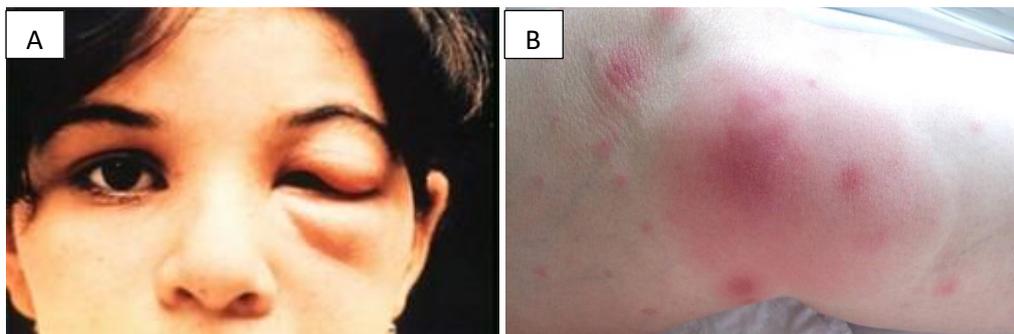


Figure 13 : Photographie de patients en phase aiguë. A. Photographie d'un patient présentant le signe de Romana. B. Photographie d'un patient présentant un Chagome^{75,76}.

1.2. Diagnostic

Dans la phase aigüe, deux mois après l'infection, on utilise plusieurs techniques pour mettre en évidence le parasite *T. cruzi*. La première méthode est la voie directe, c'est-à-dire d'observation du parasite dans un frottis sanguin. Cette méthode directe est efficace pendant le premier mois mais, il est plus difficile d'identifier le parasite ensuite. Afin de pallier à cette problématique de temps trois techniques permettent de multiplier le parasite ou le génome : le xénodiagnostic, l'hémoculture et l'amplification génomique ⁷⁷.

- Le xénodiagnostic est un test basé sur les réduves, insectes vecteurs de la maladie de Chagas. Ces insectes non infectés sont nourris par le sang du patient, et le contenu de leur intestin est testé pour une recherche de parasites pendant les 4 semaines qui suivent ⁷⁸. Cette technique a été longtemps utilisée en Amérique latine, mais au vu de techniques plus sensibles et moins difficiles à mettre en place comme la réaction en chaîne par polymérase (PCR) elle a été abandonnée dans son utilisation diagnostique.

-L'Hémoculture consiste à mettre en culture le prélèvement de sang veineux dans le but de multiplier le parasite afin de pouvoir l'identifier. Cette technique a une sensibilité de 35% même si cette sensibilité augmente en prolongeant la culture d'au moins 6 mois ⁷⁷. Cette technique, longue pour obtenir une bonne sensibilité, est souvent délaissée au profit de la PCR.

-L'amplification génomique ou PCR peut avoir plusieurs cibles pour identifier le parasite. L'ADN kinétoplastique, le kinétoplaste qui est un ADN circulaire dans le mitochondrion ou l'ADN nucléaire ⁷⁷.

1.3. Traitement

Il y a deux stratégies possibles pour traiter la maladie de Chagas : la première vise à éliminer le parasite, stratégie privilégiée lors de la phase aigüe ou à la recrudescence du parasite en phase chronique ; la deuxième stratégie consiste à traiter les symptômes qui sont survenus après l'infection ⁷⁵.

En phase aigüe les traitements vont avoir pour but l'élimination du parasite pour diminuer la probabilité de développer plus tard des symptômes qui pourraient évoluer en phases chroniques ⁷⁹.

Deux traitements sont utilisés comme antiparasitaires, le Benznidazole et le Nifurtimox.

Le Benznidazole est un promédicament nitro-hétérocyclique. Le terme « promédicament » signifie qu'il a besoin d'être activé pour avoir un effet. Dans le cas présent, c'est le parasite *T. cruzi* qui va l'activer grâce à des enzymes les nitro-réductases trypanosomales de type I. Ces enzymes n'ont pas d'homologues chez le mammifère. Une fois activé, le Benznidazole va avoir une activité trypanocide en produisant des métabolites toxiques ⁸⁰.

Le Nifurtimox est un 5-nitrofurane, le métabolisme de cette molécule conduit à la formation de radicaux libres, d'anions superoxydes et de peroxyde d'hydrogène hautement toxiques pour le parasite ⁸¹. Les radicaux libres sont très toxiques pour *T. cruzi*, car celui-ci est déficient dans son mécanisme de détoxification ⁸².

Les deux traitements sont administrés pendant 30 à 90 jours sans besoin d'une hospitalisation. Ces traitements sont aussi utilisés pour les nouveau-nés dès leur naissance dans le cas d'une transmission congénitale, mais sont contre-indiqués pendant la grossesse⁸³.

2. Phase chronique

La phase chronique arrive de 10 à 30 ans après la phase aiguë⁷². Trente pour cent des patients vont passer en phase chronique asymptomatique, parmi eux, 70% vont rester asymptomatiques et 30% vont évoluer en phase chronique symptomatique. Ces patients vont développer des maladies cardiaques, digestives ou mixtes cardio-digestives⁴³. Dans la population endémique, 20% à 30% vont développer des cardiomyopathies chagasiennes chroniques (CCC) et 10% à 15% des maladies digestives comme un méga colon ou un méga œsophage⁷².

2.1. Cardiomyopathies Chagasiennes Chroniques (CCC)

a. Clinique

Les CCC résultent du remodelage du cœur. Les patients vont développer le plus souvent une rigidité du myocarde, un dysfonctionnement systolique et diastolique, une anomalie du système de conduction, des arythmies, une cardiomyopathie dilatée, des événements thromboemboliques, voire une mort subite^{71,84,85}. La cause principale de décès dans la maladie de Chagas est la mort subite qui représente 55% à 65% de la mortalité. Les autres causes de mortalité se répartissent pour 25-30% aux suites d'une insuffisance cardiaque et 10-15% à des événements thromboemboliques⁸⁶⁻⁸⁸.

Plus précisément les patients vont présenter des **anomalies du système de conduction** notamment (Figure 14) :

- Une dysfonction du nœud sinusal (Figure 14.a).
- Un bloc auriculo-ventriculaire qui signifie un problème de conduction entre les oreillettes et les ventricules (Figure 14.b).
- Un bloc de branche c'est à dire un blocage des impulsions électriques à travers les branches droite ou gauche du faisceau de Hys (ou faisceau de His) (Figure 14.c).
- Une fibrillation auriculaire qui marque une contraction rapide et désordonnée des oreillettes (Figure 14.d).
- Une arythmie ventriculaire qui indique des contractions irrégulières des ventricules (Figure 14.e)⁸⁹.

Toutes ces anomalies du système de conduction vont avoir un impact sur les données d'électrocardiogramme (EGG) du patient et vont modifier significativement les ondes P, Q, R, S, T permettant de poser un diagnostic sur les anomalies du patient.

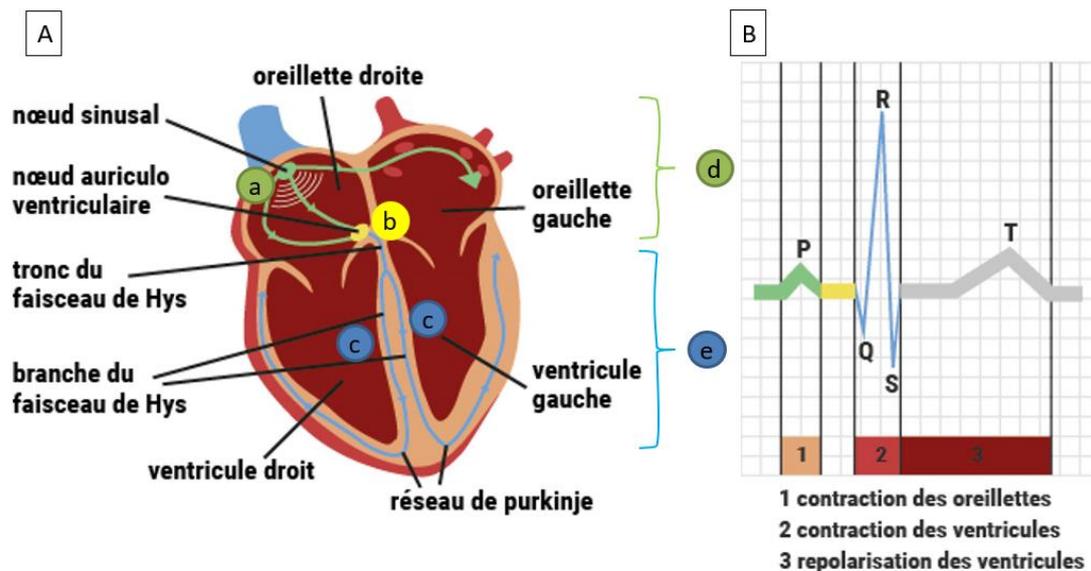


Figure 14 : Schéma explicatif du système de conduction cardiaque et des anomalies identifiées chez les patients présentant la maladie de Chagas. Vert/a/d : dépolarisation des oreillettes/dysfonction du nœud sinusal/fibrillation auriculaire Jaune/b : passage du signal entre les oreillettes et le ventricule/ bloc auriculo-ventriculaire. Bleu/c/e : dépolarisation ventriculaire/ bloc de branche/ arythmie ventriculaire ^{89,90}.

Les patients vont aussi présenter des **anomalies myocardiques** avec par exemple (Figure 15) :

- Des anomalies segmentaires et globales du mouvement de la paroi.
- Des cardiomyopathies dilatées qui se traduisent par une dilatation du ventricule gauche. Cette dilatation va entraîner une augmentation de la taille du ventricule qui va avoir du mal à se contracter efficacement (Figure 15.B).
- Une régurgitation des valves mitrale et/ou tricuspide c'est-à-dire une mauvaise fermeture des valves, qui entraîne une remontée du sang dans les oreillettes. Ces valves sont situées entre les oreillettes et les ventricules droits et gauches comme indiqué sur le schéma Figure 15.A.
- Un anévrisme cardiaque est une dilatation localisée au niveau du ventricule gauche, le plus souvent apical même s'il peut survenir dans plusieurs segments du ventricule gauche ⁸⁹ (Figure 15.C).

Ces troubles vont amener le cœur des patients chagasiques à être en insuffisance cardiaque avec une fraction d'éjection diminuée. La fraction d'éjection est la proportion de sang éjectée du cœur à chaque battement, elle est normale entre 55 à 60%. Pour les patients CCC elle varie à 40% pour les patients en CCC modérée à moins de 40% pour les CCC sévères ^{89,91}.

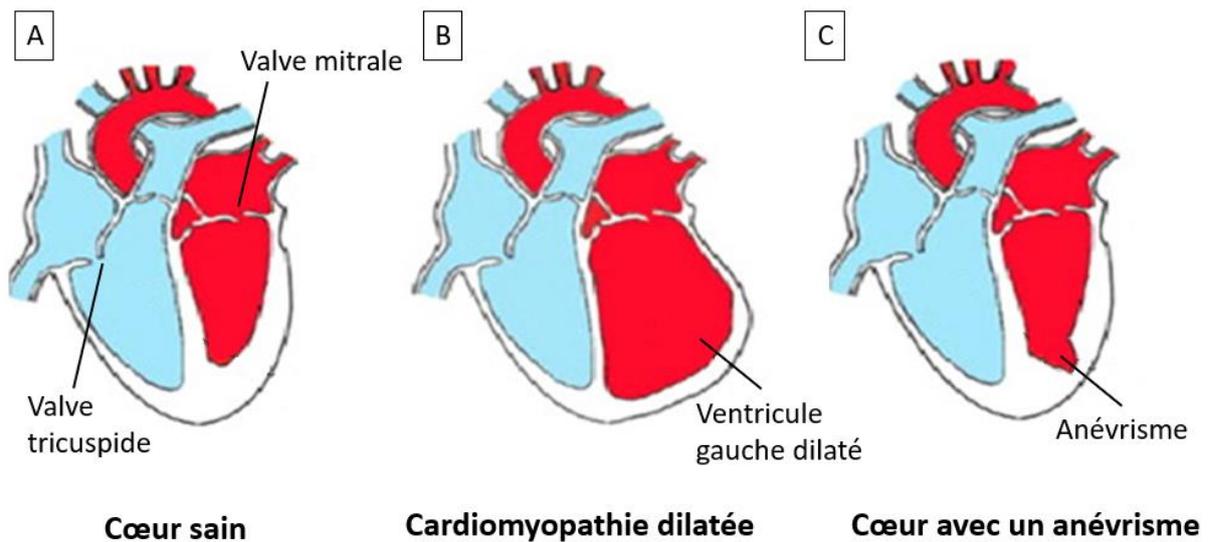


Figure 15 : Schéma de plusieurs anomalies myocardiques retrouvées chez les patients CCC. A. Cœur sain où sont indiquées les valves tricuspide et mitrale. B. Représentation d'une cardiomyopathie dilatée C. Anévrisme schématisé sur le ventricule gauche au niveau du segment apical ⁹².

Toutes les anomalies du système de conduction ou myocardique évoquées précédemment sont des facteurs à risque pour développer une thrombo-embolie cardiaque ⁸⁹. Une thrombose est la formation d'un caillot qui va obstruer la lumière d'un vaisseau sanguin ou d'une artère.

Tous les symptômes cliniques vont varier en fonction du degré de l'atteinte cardiaque. En effet les formes légères de CCC peuvent entraîner des modifications des électrocardiogrammes (ECG) sans pour autant provoquer des dysfonctionnements du ventricule gauche ^{85,93}.

La mort subite arrive plus fréquemment chez les hommes entre 30 et 50 ans, et encore plus fréquemment chez les personnes présentant des arythmies ventriculaires ^{88,94}. Cependant, il arrive que la mort subite soit le premier symptôme de la maladie de Chagas, ces personnes n'ayant préalablement présenté aucun autre symptôme ⁸⁸.

b. Diagnostic

En phase chronique, la parasitémie étant faible, la mise en évidence du parasite de manière directe comme en phase aiguë n'est pas possible. Cependant la recherche d'anticorps contre le parasite est un bon moyen d'observer si le patient a été en contact avec le parasite *T. cruzi*. Plusieurs méthodes de diagnostic peuvent être mises en place : l'immunofluorescence indirecte, le dosage immuno-enzymatique (ELISA) et l'hémagglutination indirecte.

L'immunofluorescence indirecte : cette technique a pour principe de détecter des anticorps d'intérêt grâce à un anticorps secondaire fluorescent.

Le sérum du patient va être mis en contact avec des parasites *T. cruzi* et les anticorps du patient s'ils sont présents, vont se fixer aux antigènes du parasite. Des anticorps secondaires

fluorescents sont ensuite ajoutés et viennent se fixer sur la partie constante de l'anticorps d'intérêt, révélant ainsi sa présence ou non ⁹⁵.

Le dosage immuno-enzymatique indirecte (ELISA indirecte) : cette technique a pour principe de détecter des anticorps d'intérêt grâce à une réaction enzymatique qui va libérer un composant coloré quantifiable par spectroscopie selon le protocole suivant :

- Des antigènes du parasite sont fixés à une surface.
- L'échantillon de sérum du patient est déposé sur la surface, les anticorps reconnaissant les antigènes vont donc se fixer, si le patient présente des anticorps dirigés contre *T. cruzi*.
- Des anticorps secondaires conjugués à un enzyme, qui reconnaissent la partie constante de l'anticorps d'intérêt vont être ajoutés.
- Le substrat de l'enzyme va terminer l'analyse afin d'émettre un signal chromogénique analysable par spectrophotométrie. Si le patient n'a pas d'anticorps contre *T. cruzi* il n'y aura pas de signal, et inversement si le patient présente des anticorps, il y aura un signal.

Cette méthode est peu onéreuse et a une bonne sensibilité ^{95,96}.

L'hémagglutination indirecte : Cette technique a pour principe d'identifier des anticorps d'intérêt grâce à la réaction d'agglutination des globules rouges.

- Des globules rouges vont être liés à des antigènes de *T. cruzi*.
- Le sérum du patient va être mis en contact avec les globules rouges et s'il présente des anticorps anti-*T. cruzi*, ces derniers vont se fixer aux antigènes sur les globules rouges.
- Des anticorps secondaires qui reconnaissent la partie constante de l'anticorps d'intérêt vont être ajoutés. Si les anticorps d'intérêt sont présents, les globules rouges vont s'agglutiner et former des agglutinats reliés par les anticorps secondaires. Si le patient n'a pas d'anticorps anti-*T. cruzi*, aucun agglutinat ne sera observé ⁹⁵.

Il y a plusieurs techniques pour diagnostiquer la CCC ; en effet étant donné le large éventail de signes cliniques associés à la CCC, chaque technique va être privilégiée par rapport à un groupe de signes cliniques.

Certains patients vont présenter des anomalies du système de conduction, anomalies décelables au cours d'un ECG. L'ECG a pour principe de mesurer les champs électriques du cœur grâce à un électrocardiographe via des électrodes situées sur le corps. La fonction cardiaque est possible en raison du système de conduction cardiaque. Les oreillettes se contractent grâce au signal électrique qui commence au niveau du nœud sinusal et se propage dans les oreillettes droite et gauche. Cette phase est la dépolarisation des oreillettes et se nomme l'onde P sur un ECG. Le signal électrique arrive au niveau du nœud auriculo-ventriculaire qui a pour fonction le passage des impulsions des oreillettes aux ventricules avec un léger décalage afin que les ventricules puissent se remplir totalement avant de se contracter ; ce délai se traduit par le segment PQ. Le signal se propage ensuite dans le faisceau de His qui se divise en deux branches, la branche droite qui se dirige vers le ventricule droit et la branche gauche orientée vers le ventricule gauche. Le signal va ensuite remonter vers le réseau de Purkinje. Le signal passant dans le réseau His-Purkinje correspond à la dépolarisation des ventricules et sur ECG aux ondes QRS. Parallèlement à la dépolarisation des ventricules, se passe la repolarisation atriale, mais son signal est obscurci par le grand complexe QRS ⁹⁷. Les patients atteints de CCC vont présenter plusieurs

anomalies visibles à l'ECG comme une dysfonction du nœud sinusal, un bloc auriculo-ventriculaire, un bloc de branche, une fibrillation auriculaire ou une arythmie ventriculaire modifiant les ondes PQRST⁹⁸ (Figure 16).

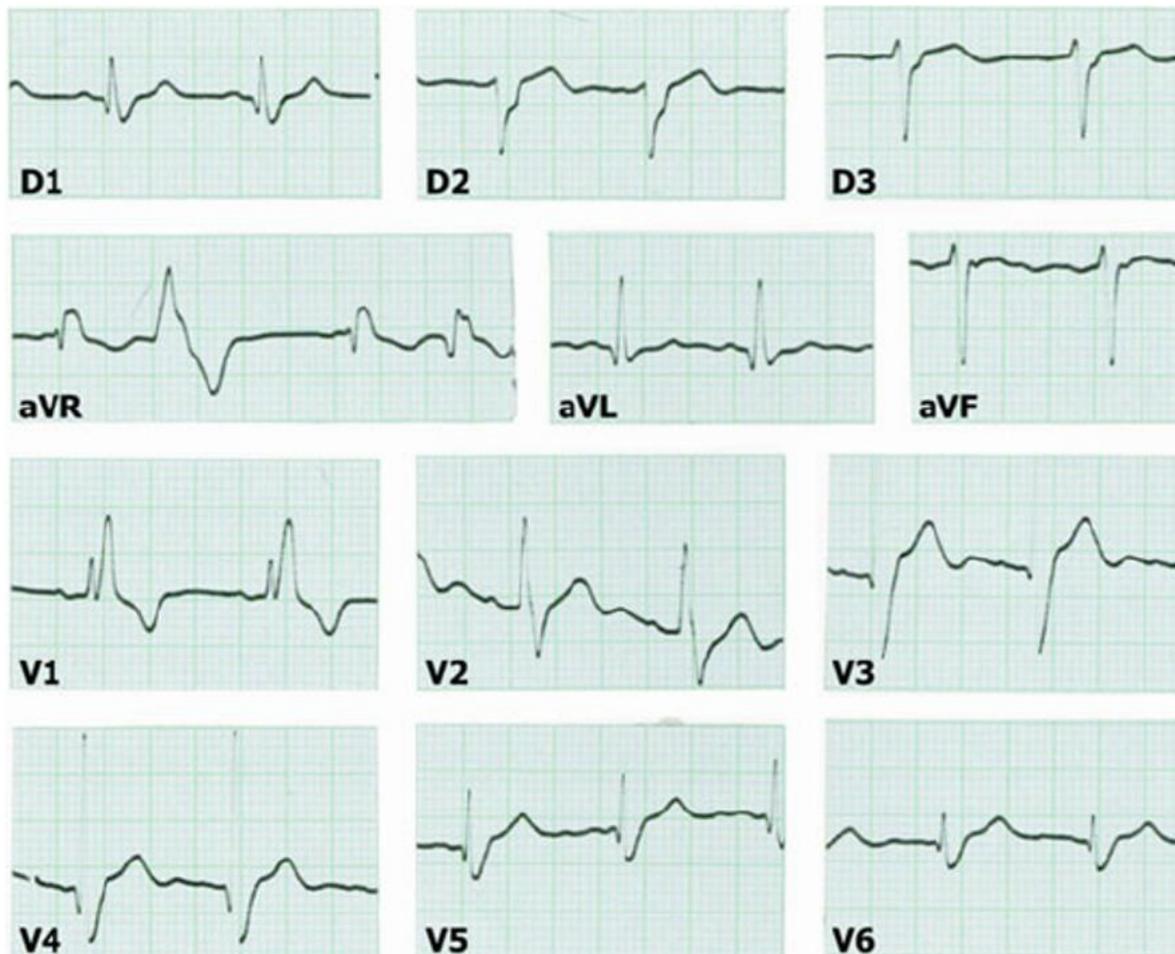


Figure 16 : ECG d'un patient souffrant de la maladie de Chagas ayant trois altérations : le bloc de branche droit, un hémibloc antérieur gauche et une extrasystole ventriculaire⁹⁹.

Les patients qui présentent un dysfonctionnement ventriculaire gauche sont indiqués pour une surveillance électrocardiographique continue du type Holter afin de détecter des bradyarythmies ou des tachyarythmies qui ne sont pas visibles avec un ECG ponctuel, car ces troubles reposent sur le nombre de battements par minute¹⁰⁰.

Une radiographie du thorax est utile pour évaluer des anomalies myocardiques telles qu'une hypertrophie cardiaque. Cette technique est une technique d'imagerie médicale basée sur la projection de rayon X^{95,98,100} (Figure 17).



Figure 17 : Radiographie du thorax chez un patient atteint de cardiomyopathie chagastique montrant une augmentation de la surface cardiaque ⁹⁵.

Une échocardiographie est une technique médicale utilisant des ultrasons pour obtenir une image du cœur en mouvement. Cette technique permet de mettre à évidence des anomalies segmentaires et globales du mouvement de la paroi, des anévrismes cardiaques, une thrombo-embolie cardiaque, mais aussi la régurgitation des valves mitrale et/ou tricuspide ^{95,98} (Figure 18).

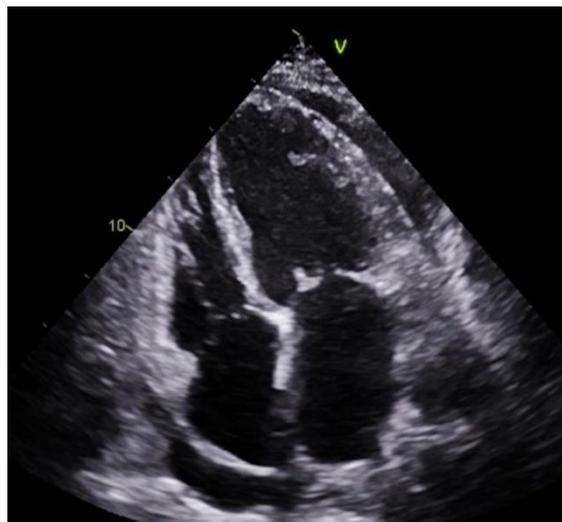


Figure 18 : Echocardiographie d'un patient présentant une cardiomyopathie dilatée avec une fraction d'éjection du ventricule gauche réduite de 15 à 20 % avec une hypokinésie globale sévère et un épanchement péricardique de taille légère à modérée ⁹⁸.

Une imagerie par résonance magnétique (IRM) cardiaque est une technique d'imagerie de haute qualité qui utilise un appareil émettant des ondes électromagnétiques grâce à un gros aimant. Cette technique permet non seulement d'observer l'anatomie et la fonction cardiaque mais aussi de déterminer le volume de la cavité cardiaque, le degré de contractilité et la présence d'un thrombus. Une perfusion de gadolinium au cours de l'examen permet d'identifier la fibrose ^{95,98,101} (Figure 19).

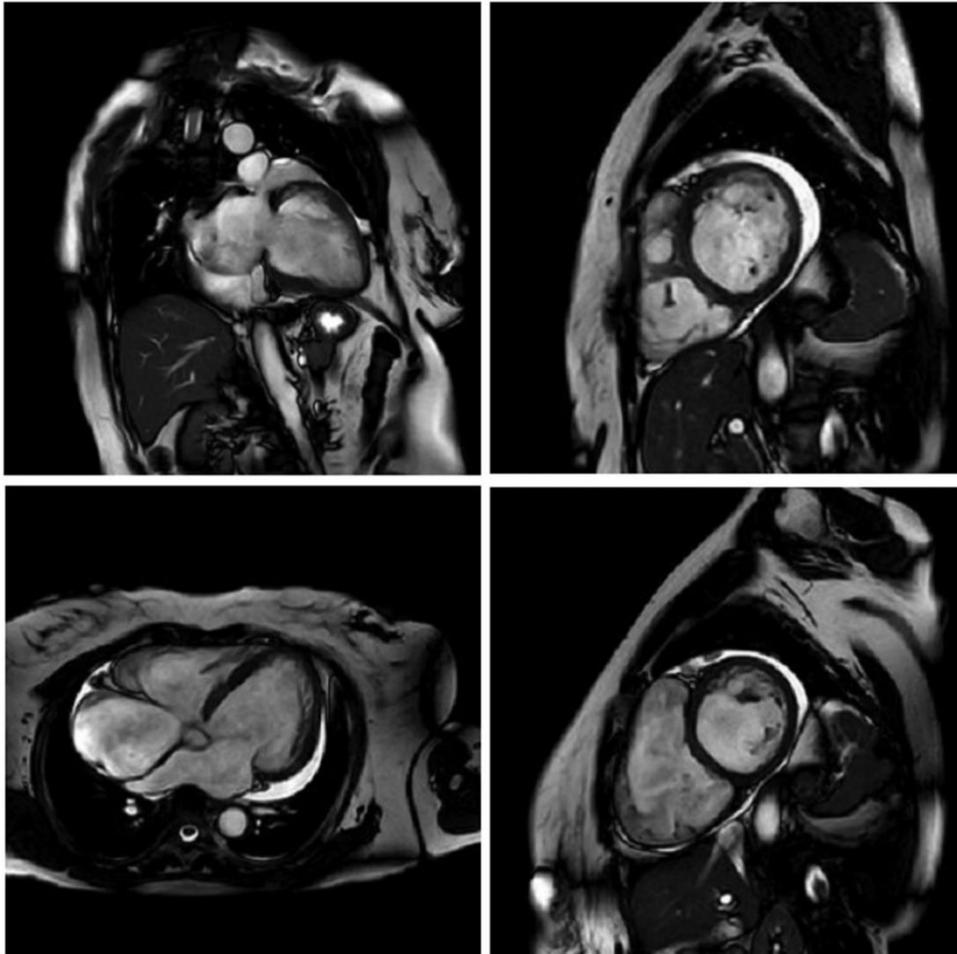


Figure 19 : IRM cardiaque d'un patient souffrant de la maladie de Chagas. On observe une oreillette droite significativement dilatée et une régurgitation tricuspide, une oreillette gauche dilatée, une insuffisance mitrale, et un épanchement péricardique ⁹⁵.

c. Traitement

Le Nifurtimox et le benznidazole sont les seuls médicaments connus pour être efficaces dans la lutte de *T. cruzi* dans la phase aiguë de la maladie ou lors d'une infection congénitale, mais leurs effets restent limités dans la phase chronique de la maladie de Chagas.

Le Nifurtimox est un anti parasitaire qui réduit la sévérité et la durée de l'infection en phase aiguë ; cependant, en phase chronique, il présente de nombreux effets secondaires et dans 40% des cas, les patients vont développer des maux de tête, des vomissements, des nausées, de la somnolence, de l'anorexie, de l'irritabilité ou des troubles psychiatriques ¹⁰².

Le Nifurtimox peut même-être nocif pour les patients adultes déjà atteints de cardiomyopathies car il présente, dans un modèle expérimental une toxicité cardiaque et pancréatique¹⁰³.

Le benznidazole est efficace en phase aigüe mais également lors de la réactivation de l'infection chez les patients transplantés¹⁰⁴. Ce médicament a des effets similaires au Nifurtimox mais il est préféré car les effets secondaires sont moindres¹⁰⁵.

Ces médicaments ont des résultats controversés quant à leur action dans la phase chronique. Plusieurs études, sur des modèles expérimentaux^{106,107} ou chez l'homme¹⁰⁸⁻¹¹¹, apportent des preuves du bénéfice d'un traitement trypanocidaire en phase chronique alors que d'autres études montrent leur inefficacité^{112,113}.

Ces traitements seuls manque efficacité pour la phase chronique mais plusieurs équipes on essayer de combiner le benznidazole avec un autre médicament afin de voir si les deux ensembles pouvais avoir un effet synergique. Une étude a testé la combinaison entre le benznidazole et le posaconazole (Inhibiteur de la biosynthèse de l'ergostérol de *T. cruzi*) mais cette combinaison n'a pas eu l'effet synergique attendu sur l'élimination du parasite chez des patients infectés¹¹⁴. Tandis qu'une autre étude a évalué la combinaison entre le benznidazole et deux autres médicaments la colchicine et chloroquine¹¹⁵. La colchicine est un médicament anti-inflammatoire qui bloque la polymérisation des microtubules ce qui interfère avec l'internalisation de *T. cruzi*¹¹⁶. La chloroquine est un agent qui provoque la perturbation du fonctionnement des lysosomes, ce qui empêche l'invasion de *T. cruzi* dépendante des lysosomes¹¹⁷. L'association du benznidazole et de la colchicine *in vitro* montre une cytotoxicité et une faible activité anti parasitaire. Alors que l'association du benznidazole et de la chloroquine a montré *in vitro* et *in vivo* un effet synergique en réduisant l'infection de *T. cruzi* de manière plus importante que le benznidazole seul¹¹⁵.

La combinaison de médicament et la réutilisation de médicament pourraient être une nouvelle option de traitement pour la maladie de Chagas.

Afin de traiter les insuffisances cardiaques des patients CCC, une combinaison de médicaments est utilisée en routine : des β -bloquants, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine, de la digoxine, des diurétiques et des anticoagulants^{118,119}.

Les β -bloquants vont inhiber les récepteurs β -adrénergiques, ce qui va réduire les troubles du rythme cardiaque en inhibant le système nerveux autonome et en réduisant le système rénine-angiotensine-aldostérone. En effet cette famille de médicaments offre une protection contre le développement d'arythmie ventriculaire et par conséquent contre la mort subite¹²⁰. Ce médicament est indiqué quand la fraction d'éjection est réduite^{118,119}.

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine sont des molécules qui permettent de limiter la synthèse de l'angiotensine II et de l'aldostérone. Ce traitement permet donc une vasodilatation myocardique. Il est recommandé chez les patients avec une fraction d'éjection réduite et une altération segmentaire du mouvement de la paroi^{118,119}.

La digoxine permet une augmentation de la contractilité myocardique, ainsi qu'un ralentissement de la conduction dans le nœud auriculo-ventriculaire. Bénéfique chez certains patients CCC atteints de tachycardies supraventriculaires, la digoxine doit être évitée chez les patients présentant une anomalie de conduction au niveau ou en dessous du nœud auriculo-ventriculaire, le bloc cardiaque risquant d'être aggravé à ce niveau-là ^{118,119}.

Les diurétiques augmentent l'élimination urinaire, entraînant une diminution de la rétention d'eau et l'amélioration des symptômes cardiaques. Ce traitement est aussi recommandé pour les patients ayant une fraction éjection réduite ^{118,119}.

Les anticoagulants sont des médicaments antiplaquettaires, qui ont pour rôle de prévenir les événements thromboemboliques. Ce traitement est indiqué pour les patients CCC présentant des anévrismes apicaux ¹⁰⁰, ou des patients où la présence d'une thrombus cardiaque a été détectée par échocardiographie ^{100,118,119}.

Il existe des traitements plus invasifs pour traiter les patients atteints de CCC réfractaire aux traitements médicamenteux, comme l'implantation de stimulateurs cardiaques, de défibrillateurs automatiques implantables, des procédures ablatives ou la transplantation cardiaque.

L'implantation d'un stimulateur cardiaque se fait par l'implantation d'électrodes le plus souvent dans la partie médio-septale du ventricule droit jusqu'au site apical. Ces électrodes vont envoyer des impulsions électriques lorsque la fréquence cardiaque est trop basse¹²¹. Ce traitement est indiqué pour les patients présentant un bloc auriculo-ventriculaire ou/et un syndrome sinusal symptomatique ^{118,119}.

Un défibrillateur automatique implantable est un petit dispositif implanté sous la peau en dessous de la clavicule devant le muscle pectoral. Ce dispositif va, comme un stimulateur cardiaque, envoyer des impulsions électriques mais seulement lorsque le rythme cardiaque est trop rapide. Ce traitement est envisagé lorsque les patients ont une arythmie ventriculaire sévère et un risque élevé de mort subite ^{118,119}.

Le traitement par ablation de la tachycardie ventriculaire consiste à détruire ou isoler les zones du cœur à l'origine de l'arythmie. Ce traitement est instauré en deuxième recours quand la médication orale est un échec ^{119,122}.

La transplantation cardiaque était contre-indiquée aux patients atteints de la maladie de Chagas à cause de la réactivation possible du parasite après la transplantation et l'immunosuppression mais depuis les années 1990, les progrès des programmes d'immunosuppression ont permis aux patients de pouvoir jouir de ce traitement ¹²³. Les critères de sélection sont similaires à n'importe quelle transplantation cardiaque, mais le clinicien doit tenir compte de la présence possible un mégaoesophage ou d'un mégacôlon, qui serait contre-indiqué à la transplantation cardiaque ^{124,125}. L'immunosuppression exercée pendant une transplantation cardiaque d'un patient CCC est plus faible comparée à une transplantation cardiaque de patient non CCC afin éviter la réactivation du parasite ; cependant une surveillance à vie de *T. cruzi* est nécessaire. Si la réactivation du parasite a lieu après la transplantation, une médication au benznidazole offre un traitement efficace

^{125,126}. Les patients CCC transplantés cardiaques ont généralement un taux de survie meilleur que dans la population générale des patients transplantés ^{123,127}. En effet, on retrouve une probabilité de survie à 1 an, 2 ans, 6 ans et 10 ans de 83%, 76%, 62% et 46% respectivement ¹²³.

2.2. Forme digestive

a. Clinique

La forme digestive chronique chagastique (FDCC) est due à une atteinte du système nerveux entérique causée par l'infection à *T. cruzi* ¹²⁸. Le système nerveux entérique coordonne plusieurs fonctions motrices du tube digestif. Les patients FDCC vont développer des dilatations du tractus gastro-intestinal (mégacôlon, méga œsophage, méga estomac, méga duodénum, méga junum) et des troubles moteurs de ces mêmes organes ¹²⁸. Les segments du système digestif les plus touchés dans la FDCC sont l'œsophage, le colon et le rectum.

On peut observer une sialorrhée (une salivation excessive) chez presque tous les patients atteints de FDCC ¹²⁹. Chez la plupart de ces patients, une altération de la mobilité œsophagienne et un méga œsophage vont entraîner différents symptômes tels que la dysphagie (sensation de gênes dans la progression des aliments au cours de la déglutition), une odynophagie (douleur lors de la déglutition), des douleurs épigastriques, des régurgitations ; dans les cas graves, une malnutrition et une perte de poids sont observées ¹²⁸.

Les cas de mega estomac sont rares et pour la plupart du temps sans conséquence ¹³⁰. La physiopathologie des patients atteints de FDCC est une détérioration des neurones présents dans l'estomac, entraînant des anomalies de mobilité gastrique et sécrétoire ¹³¹. Les patients FDCC vont présenter une dysrythmie gastrique qui est une perturbation de l'activité myoélectrique générée par des cellules dans l'estomac ¹³². La perturbation des impulsions excitatrices va être en partie responsable du retard de vidange retrouvé chez des patients FDCC ^{131,133}. Ces patients vont aussi présenter moins de sécrétion acide gastrique que des sujets sains ¹³⁴.

La présence de cholélithiases (dépôt durci de bile qui se forme dans la vésicule biliaire) est plus massive chez des patients FDCC atteints d'un méga œsophage que chez les sujets sains ¹³⁰. De plus une étude a testé les fonctions motrices de la vésicule biliaire chez des patients FDCC atteints de méga œsophage et de mégacôlon et l'étude a mis en évidence que la vésicule biliaire de ces patients était hypersensible aux stimuli avec une contraction plus précoce et plus importante. Cette différence de contraction suggère une altération de l'innervation intrinsèque inhibitrice de la vésicule biliaire ¹³⁵.

Plusieurs patients FDCC vont développer des méga duodénums ou des méga junum, ce qui entraîne une altération de la mobilité de l'intestin grêle et peut provoquer une prolifération bactérienne, une stéatorrhée et une diarrhée ^{130,136}.

Les symptômes associés au mégacôlon sont une constipation chronique, de la diarrhée, des douleurs abdominales et des ténésmes rectaux ¹³⁷. La destruction des neurones dans la région du colon et du rectum entraîne une diminution de la mobilité basale ¹³⁸, causant un manque de relaxation du sphincter anal interne, à l'origine des constipations chroniques vues chez les patients FDCC ¹³⁷.

b. Diagnostic

Afin de diagnostiquer la forme digestive chronique chagastique, il faut identifier si le patient a déjà rencontré le parasite *T. cruzi*. Comme pour le diagnostic des cardiomyopathies chagastiques chroniques, la mise en évidence d'anticorps contre le parasite est un bon moyen d'observer si le patient a été en contact avec celui-ci. Plusieurs méthodes de diagnostic peuvent être mises en place, de manière similaire au CCC : l'immunofluorescence indirecte, le dosage immuno-enzymatique (ELISA) et l'hémagglutination indirecte. (Voir le paragraphe diagnostic des cardiomyopathies chagastiques chroniques)

En fonction des symptômes décrits par le patient, les cliniciens vont orienter le diagnostic vers des examens qui visent une partie de l'appareil digestif.

Afin de diagnostiquer le méga œsophage pressant chez les patients FDCC, il existe trois outils. Le premier est l'œsophagogramme baryté, examen radiologique qui consiste à faire ingérer au patient de la baryte, produit de contraste opaque au rayon X puis de prendre plusieurs radiographies (Figure 20). Le deuxième est l'endoscopie supérieure ; cet examen fait descendre une petite caméra par la bouche pour voir l'œsophage. Et le troisième est la manométrie œsophagienne qui évalue la pression et la mobilité de l'œsophage grâce à une sonde¹³⁰. La technique de manométrie est également utilisée pour estimer la mobilité du duodénum¹³⁶ ou de la région sigmoïde et du rectum¹³⁰.



Figure 20 : Un œsophagogramme baryté d'un patient atteint d'une mégaoesophage chagastique avancé¹³⁹.

Dans le but de repérer des perturbations dans l'activité électrique de l'estomac telles que des dysrythmies gastriques, une électrogastrographie va être réalisée chez les patients FDCC. Cette méthode est non invasive et permet d'enregistrer les signaux électriques qui traversent l'estomac et qui contrôlent les contractions¹³².

Pour diagnostiquer le mégacôlon, une simple radiographie abdominale peut être suffisante mais les techniques de tomodensitométrie ou un lavement baryte permettent de mieux visualiser des segments coliques dilatés ¹⁴⁰.

c. Traitement

Il n'y a pas de traitement général pour soigner les patients atteints de FDCC, seuls les symptômes et la partie de l'appareil digestif le plus touché vont être pris en charge.

Le traitement d'un méga œsophage a pour but de diminuer la pression dans l'œsophage afin d'améliorer le passage des aliments dans l'organe avec, dans un premier temps une prise médicamenteuse d'isosorbide ou de nifédipine, vasodilatateurs qui réduisent les symptômes ^{141,142}. Dans un second temps, une dilatation pneumatique ou de la chirurgie peuvent être un moyen de traiter ces patients de manière plus durable ^{130,142}.

Pour traiter un mégacolon, il est conseillé de changer ses habitudes de vie, en optant pour un régime alimentaire sain, riche en fibres et un apport hydrique important. Des laxatifs peuvent être également prescrits contre la constipation. Les interventions chirurgicales ne sont effectuées qu'en derniers recours, lors de constipations réfractaires aux laxatifs, de torsion de colon (volvulus) ou en cas d'ulcère ^{142,143}.

Chapitre 2 : Réponse immunitaire et facteur génétique

I. La réponse immunitaire

Le système immunitaire est le système de défense de l'organisme face à un agent pathogène. Ce système se divise en deux lignes de défense : **immunité innée** et **immunité adaptative**. La réponse immunitaire est possible grâce à de nombreux types cellulaires mais également grâce des glycoprotéines nommées cytokines ou chemokines, essentielles au mécanisme immunitaire (Figure 21).

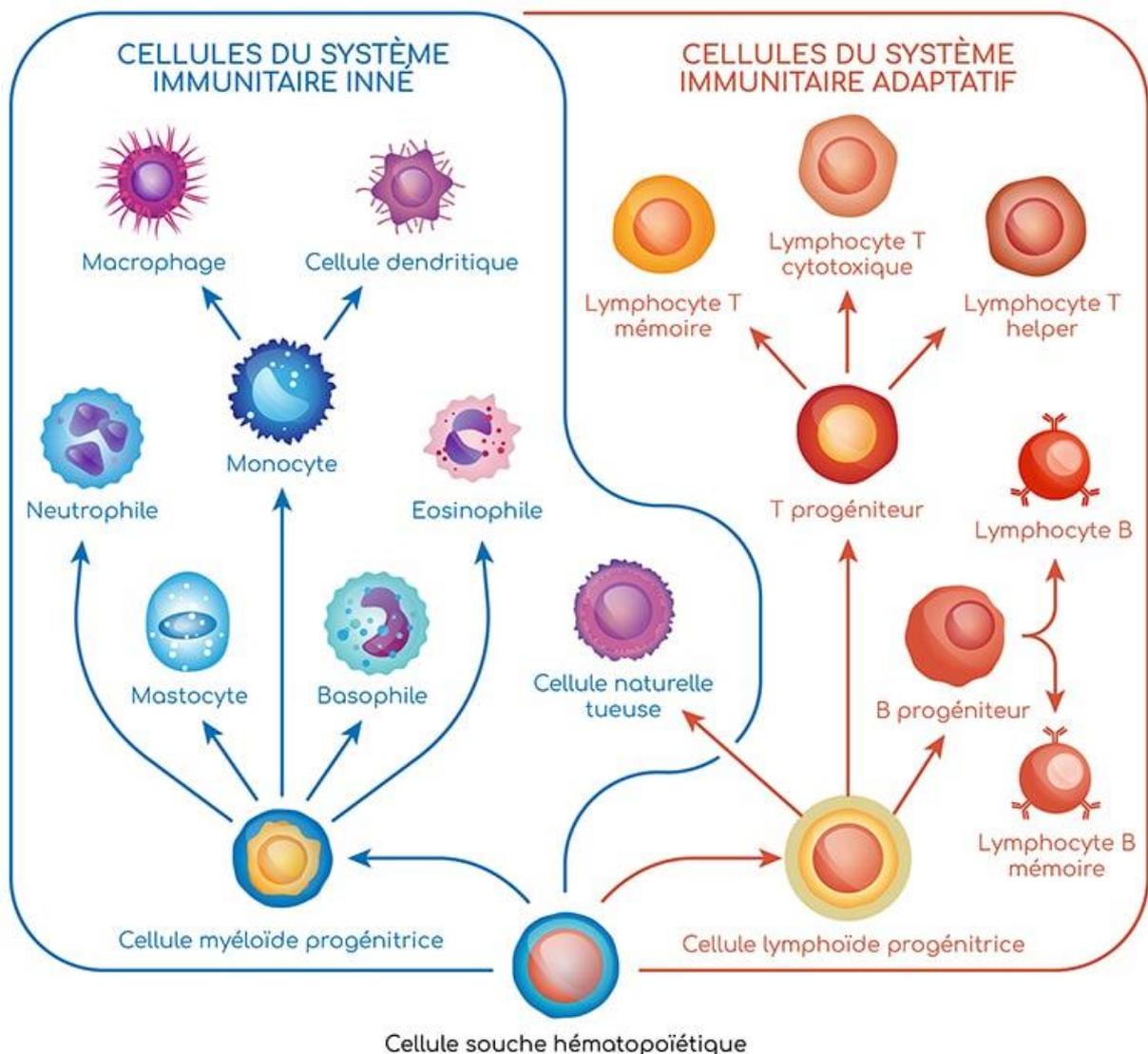


Figure 21 : Le système immunitaire est divisé en deux lignes de défense contre les microorganismes : l'immunité innée et l'immunité adaptative. A partir d'une cellule souche hématopoïétique, deux types de progéniteurs vont se différencier, un progéniteur myéloïde et un progéniteur lymphoïde. La cellule myéloïde progénitrice va quant à elle évoluer en

monocyte qui lui-même va se différencier en macrophage et en cellule dendritique. Cette progénitrice va également se différencier en polynucléaires (basophile, neutrophile et éosinophile) et en mastocytes. De son côté, la cellule lymphoïde progénitrice va se différencier en progéniteurs T et B et en cellules naturelles tueuses (les cellules NK). Les progéniteurs B vont évoluer en lymphocytes B mémoire et en lymphocytes B qui vont eux-mêmes se différencier en plasmocytes. Les cellules progénitrices T vont se différencier en lymphocytes T mémoire, en lymphocytes T cytotoxique (CD8+) et en lymphocytes T helper (CD4+). Les cellules de l'immunité innée proviennent de la cellule progénitrice myéloïde à part pour la cellule NK qui descend de la cellule progénitrice lymphoïde. Les cellules du système immunitaire adaptatif proviennent de la cellule progénitrice lymphoïde ¹⁴⁴.

1. La réponse innée

L'immunité innée est la première voie de défense de l'organisme, elle s'active immédiatement en présence d'un agent infectieux. Elle a la particularité d'être non spécifique et être dépourvue de mémoire, c'est-à-dire qu'elle réagira de la même manière quel que soit l'agent infectieux et le nombre d'expositions à celui-ci.

La réponse innée met en jeu plusieurs constituants pour défendre l'organisme : les phagocytes (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, polynucléaires), les cellules Natural Killer (NK), les mastocytes et le système du complément (Figure 21).

1.1. Les phagocytes

Les cellules phagocytaires ont la capacité d'endocyter les agents pathogènes ou les cellules mortes, grâce à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) qui reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et des motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP) (Figure 22).

Il y a quatre familles de PRR, les récepteurs de type toll (TLR) ¹⁴⁵, les récepteurs de types NOD (NLR), les récepteurs de lectin de type C (CLR) et les récepteurs de type RIG I (RLR). Tous ces PRR vont avoir comme résultats d'activer une réponse pro inflammatoire avec la sécrétion d'interférons de type I via la voie nuclear factor-kappa B (NF- κ B) ^{146,147}.

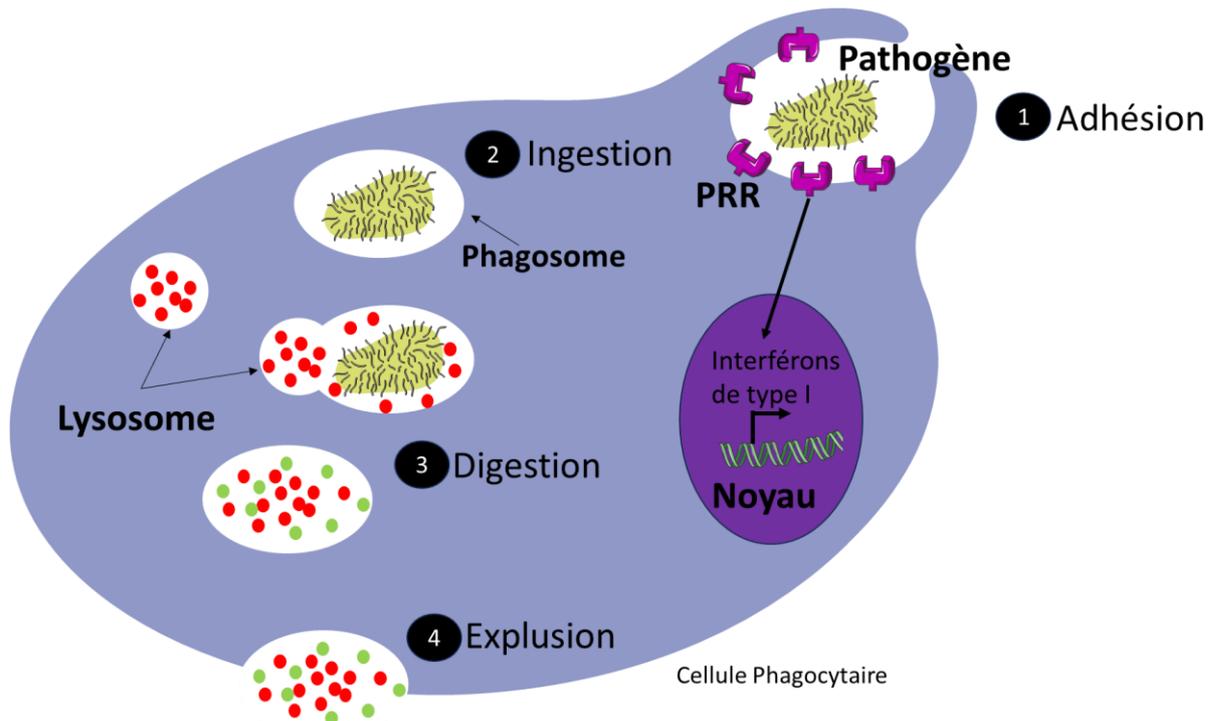


Figure 22 : Etape de la phagocytose d'une cellule phagocytaire sur un pathogène. La première étape est l'adhésion, l'agent pathogène va être reconnu par des PRR qui vont, via la voie NF- κ b, l'activer avec la sécrétion d'interférons de type I. La seconde étape va être l'ingestion du pathogène dans la cellule par endocytose. Par la suite le lysosome va venir fusionner avec le phagosome afin de détruire le pathogène avec des enzymes lysosomiques, c'est la digestion. Une fois l'agent pathogène détruit, le lysat va être expulsé de la cellule, c'est la quatrième étape d'expulsion.

a. Les monocytes-macrophages

Les monocytes sont des cellules qui peuvent se différencier en cellules dendritiques et en plusieurs lignées de macrophages (M1 et M2) en fonction de leur environnement cytokinique. Lorsque les monocytes se retrouvent dans un environnement avec de l'interféron gamma (IFN- γ), et des lipopolysaccharides (LPS), composants majeurs de la membrane bactérienne, ils vont se différencier en macrophages M1, macrophages associés à l'inflammation. Si les monocytes sont en présence d'interleukines (IL), IL-4 ou d'IL-13, ils vont se différencier en macrophages M2 qui, de leur côté, sont associés à une réponse anti-inflammatoire et d'immunorégulation ¹⁴⁸ (Figure 23). Les macrophages sont pourvus de molécules de classes I et II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), qui leur permettent de jouer le rôle de cellule présentatrice d'antigène.

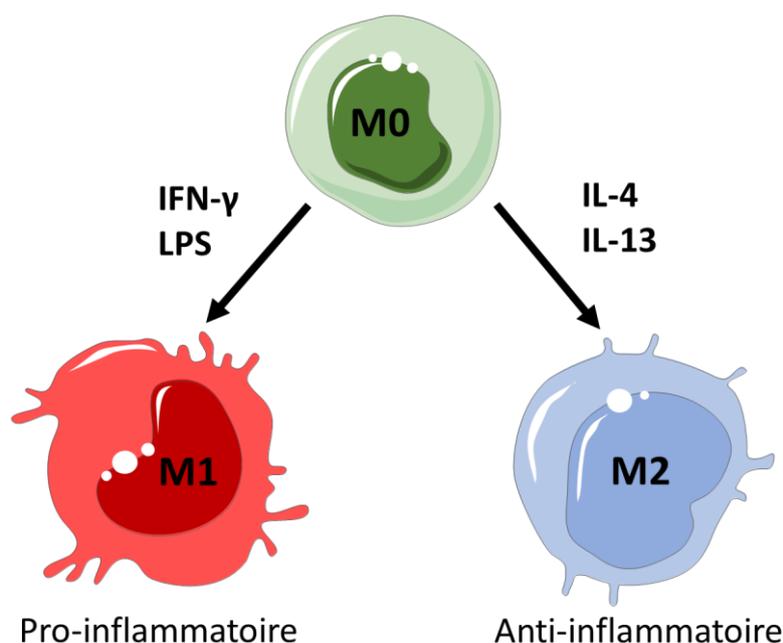


Figure 23 : Polarisation des monocytes en macrophages M1 et M2. Le monocyte (M0) va se polariser en macrophage M1 lors de son contact avec de l'IFN- γ et du LPS dans un but pro-inflammatoire. Inversement, lorsque que le monocyte va être en contact avec de l'IL-4 et de l'IL-13, il va se polariser en macrophage M2 pour une réponse anti-inflammatoire.

b. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont issues de la différenciation des monocytes. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) portant des molécules de classes I et II du CMH. Lorsque des cellules dendritiques immatures rencontrent un PAMP reconnu par un PRR, celles-ci vont augmenter leur fonction phagocytaire dans le but d'internaliser l'antigène du pathogène. Une fois internalisé, l'antigène va être modifié avant d'être présenté au CMH. Cette présentation d'antigène est essentielle pour la réponse immunitaire adaptative, puisqu'elle va permettre d'activer les lymphocytes T et B et de polariser la réponse immune (Th1, Th2, et T régulateur).

c. Les polynucléaires

Les polynucléaires sont composés de trois groupes : les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles. Ces polynucléaires vont, grâce à leur capacité de phagocytose et leurs granules, pouvoir détruire les agents pathogènes. Ces polynucléaires participent à l'allergie et aux actions anti parasitaires.

Les cellules neutrophiles ont un rôle antimicrobien, entre leurs aptitudes à dégranuler, leur capacité à la phagocytose et le relargage de leurs filets extracellulaires nommés neutrophil extracellular traps (NET). Les Net sont composés d'ADN, histones décondensées et d'autres protéines qui vont venir capturer des agents pathogènes ¹⁴⁹ (Figure 24).

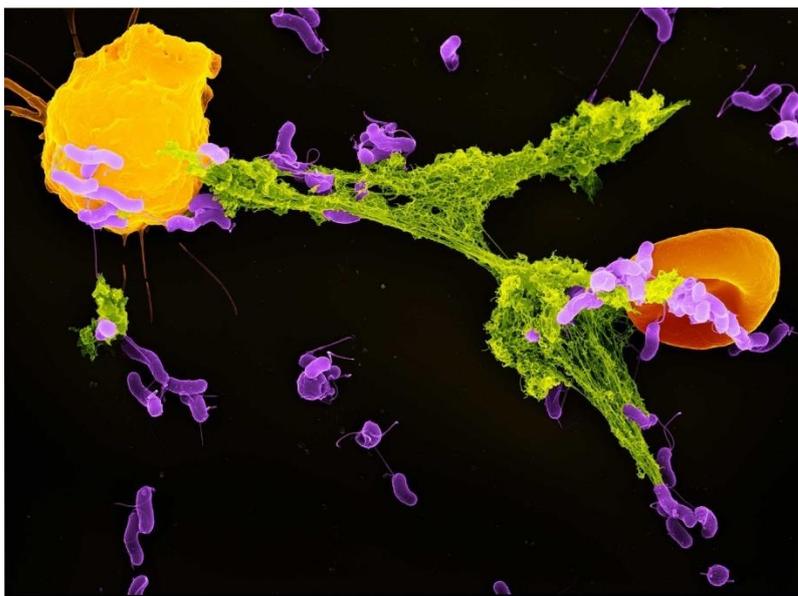


Figure 24 : Image prise au microscope à balayage coloré, d'un neutrophile utilisant un NET pour capturer des bactéries. Le neutrophile est en jaune sur l'image, le NET en vert et les bactéries en violet ¹⁵⁰.

Les polynucléaires basophiles sont des cellules possédant des granules basophiles dans leur cytoplasme, elles circulent dans le sang et ont un rôle dans l'inflammation. Ces cellules possèdent un récepteur d'IgE de haute affinité (FcεR) et, une fois celui-ci activé par des antigènes il permet la dégranulation avec la libération d'histamine, la sécrétion de cytokines, chimiokines et de protéases ^{151,152}.

L'activation de ces cellules peut également se faire indépendamment des IgE. Les polynucléaires basophiles sont impliqués dans l'infiltration des éosinophiles, dans la polarisation des macrophages en macrophage M2, dans la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes TH2, et dans la mise en place du système immunitaire humorale. Ces cellules ont un rôle central dans les réactions allergiques et dans la réponse antiparasitaire ^{151,152}.

Les polynucléaires éosinophiles ont des rôles pro inflammatoire et cytotoxique. En effet ces cellules sont capables de libérer des espèces réactives à l'oxygène (ROS), ainsi que quatre protéines très basiques qui ont un rôle cytotoxique : la MBP (major basic protein), la ECP (eosinophil cationic protein), la EPO (eosinophil peroxydase), la EDN (eosinophil). Ce cocktail va permettre de défendre l'organisme contre des agents pathogènes tout en alarmant le système immunitaire ¹⁵³.

1.2. Les cellules NK

Les cellules NK sont des cellules avec une activité cytotoxique. Elles ont pour objectif d'éliminer les cellules qui ne possèdent pas, à leur surface, de CMH avec l'antigène. Cela permet d'éliminer les cellules tumorales, les cellules étrangères et les cellules infectées par un virus ¹⁵⁴. En plus de participer à l'immunosurveillance, ces cellules vont orienter la réponse immunitaire, soit vers une réponse pro inflammatoire : en sécrétant des cytokines pro inflammatoire (IFN-γ), en favorisant l'activation des cellules dendritiques et la

présentation antigène aux lymphocytes T grâce à la lyse des cellules infectées. Soit vers une réponse anti-inflammatoire en libérant de l'IL-10 et en lysant les cellules dendritiques ou les lymphocytes T activés ¹⁵⁵ (Figure 25). En effet, la libération d'IL-10 va diminuer l'activation des cellules immunitaires. Les cellules NK en lysant les cellules dendritiques, qui sont des cellules présentatrices d'antigène, vont diminuer la présentation antigénique et donc le nombre de lymphocytes T activés. De plus, les cellules NK peuvent directement lyser les lymphocytes T activés et donc diminuer leur activation. Dans certains cas, cela va entraîner la persistance du virus, mais cela prévient le développement d'une maladie auto-immune dû aux lymphocytes T ¹⁵⁵.

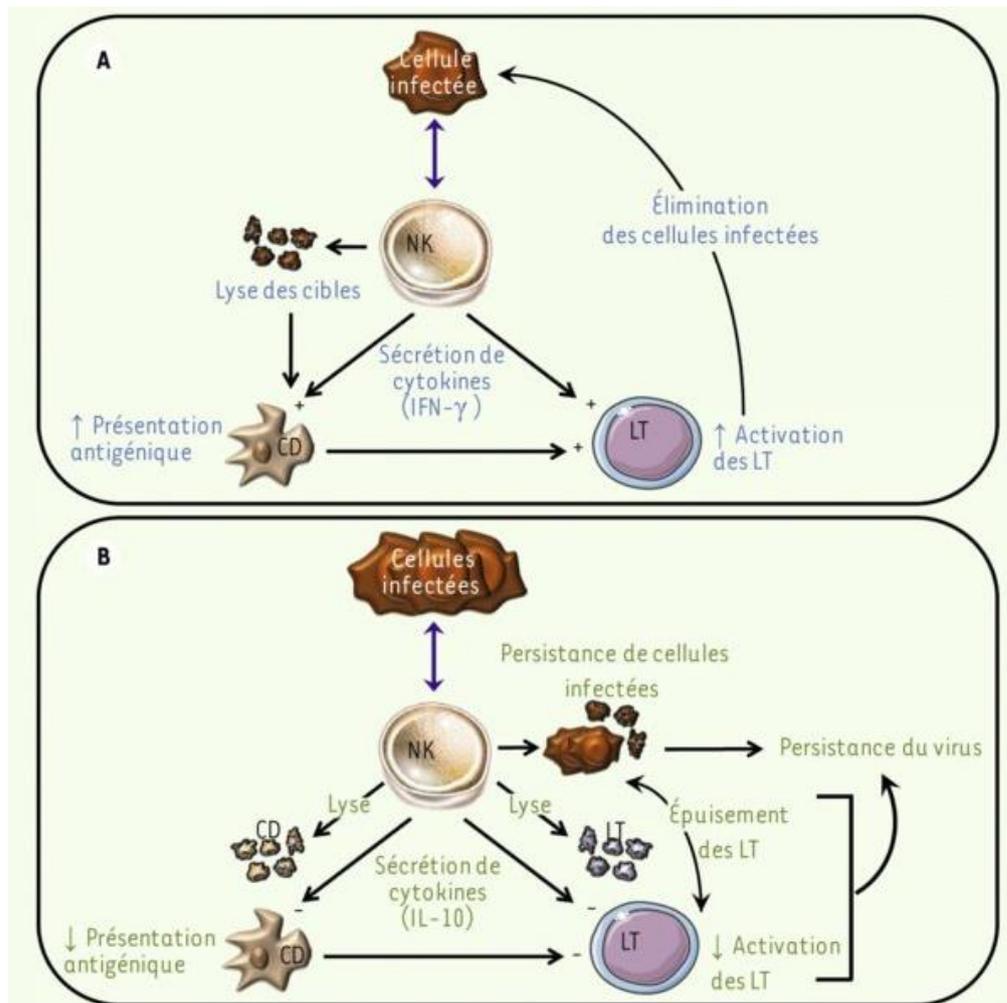


Figure 25 : Orientation de la réponse immunitaire par les cellules NK. A. Les cellules NK peuvent orienter la réponse immunitaire vers une réponse pro inflammatoire, en lysant la cellule cible et en présentant les débris cellulaires aux cellules dendritiques (CD) et aux lymphocytes T (LT) afin de les activer. Les cellules NK vont aussi sécréter de l'IFN- γ , une cytokine pro inflammatoire. Tous ces moyens vont avoir pour conséquence l'élimination des cellules infectées. B. Les cellules NK vont pouvoir également orienter la réponse vers une réponse anti-inflammatoire en sécrétant de l'IL-10 et en lysant les cellules dendritiques et les lymphocytes T activés ¹⁵⁵.

1.3. Les mastocytes

Les mastocytes sont des sentinelles de l'immunité innée ; une fois en contact avec l'agent pathogène, ces cellules vont s'activer dans le but de recruter les cellules immunitaires telles que les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles sur le site de l'inflammation. Pour cela ces cellules vont sécréter du facteur de nécrose tumorale (TNF), de l'histamine, des protéases, des molécules d'adhésion et augmenter la perméabilité vasculaire afin de permettre une réponse rapide et localisée au niveau du site de l'infection^{156,157}.

1.4. Le système du complément

Le système du complément est une cascade d'enzymes qui participent à l'inflammation, à l'opsonisation, à la lyse de cellules pathogènes et au recrutement des lymphocytes B. L'opsonisation est un processus où des molécules du complément recouvrent un agent pathogène pour que celui-ci soit phagocyté (Figure 26). Le système du complément peut être activé par trois voies : la voie classique, la voie des lectines et la voie alternative¹⁵⁴.

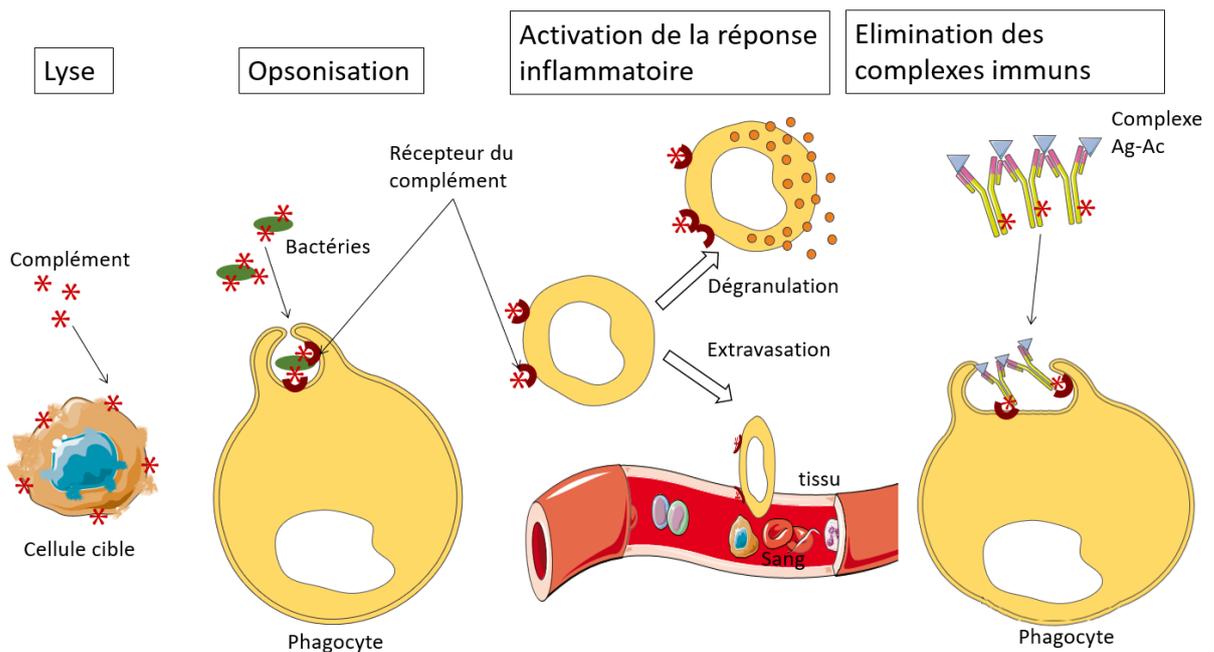


Figure 26 : Les différentes fonctions du complément. Une de ces fonctions est la lyse des cellules grâce à la formation du complexe d'attaque membranaire. Une autre fonction est l'opsonisation qui est un mécanisme où des molécules du complément recouvrent un agent pathogène pour que celui-ci soit phagocyté. Le complément va aussi activer la réponse inflammatoire en activant la dégranulation des mastocytes. Enfin, le complément va permettre l'élimination de complexes immuns¹⁵⁸.

2. Immunité adaptative

L'immunité adaptative constitue la deuxième ligne de défense de l'organisme. Il s'agit d'une défense moins rapide que l'immunité innée lors du premier contact, puisque la production d'anticorps s'effectue en 2 ou 3 semaines. Mais contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative a une mémoire. Lors d'un contact ultérieur avec le même pathogène, en 3 ou 5 jours toutes les cellules du système adaptative vont se multiplier pour défendre l'organisme. L'immunité adaptative est aussi spécifique aux antigènes d'un agent infectieux grâce aux récepteurs des lymphocytes T et B. L'immunité adaptative se divise en deux réponses, immunité humorale qui est assurée par la production d'anticorps médiés par les lymphocytes B, et l'immunité cellulaire assurée par les lymphocytes T (Figure 21).

2.1. Les lymphocytes B

Dans un premier temps les lymphocytes B se développent dans la moelle osseuse, puis ces lymphocytes naïfs d'antigènes spécifiques se déplacent vers la périphérie. L'activation des lymphocytes B se fait à la rencontre de l'antigène. Il y a deux moyens différents pour activer des lymphocytes B, l'activation dépendante des cellules T et celle indépendante des cellules T. L'activation des lymphocytes B va contribuer à leur différenciation en plasmocytes et en lymphocytes B mémoire. Les plasmocytes sont des cellules qui produisent plusieurs types d'anticorps les immunoglobulines (Ig) : IgG, IgM, IgA, IgE et IgD. L'immunité humorale via les anticorps est principalement dirigée contre les agents infectieux extracellulaires¹⁵⁹.

2.2. Les lymphocytes T

Les Lymphocytes T commencent leur développement dans la moelle osseuse mais migrent rapidement sous forme de thymocytes dans le thymus. L'activation des lymphocytes T se fait grâce à la présentation d'antigènes via les CPA. Une fois activées, les cellules vont proliférer et se différencier en plusieurs effecteurs, en lymphocytes CD4 (Th1, Th2, T régulateur), en lymphocytes CD8 et en lymphocytes T mémoire. Les lymphocytes CD4 Th1 sont des cellules inflammatoires qui activent les macrophages et produisent des cytokines pro inflammatoires (tels que IFN- γ et TNF- α). Les lymphocytes CD4 Th2 activent quant à elles les cellules B. Les lymphocytes T régulateurs participent à la tolérance immunitaire en inhibant la prolifération d'autres lymphocytes T, et ont ainsi une action immunosuppressive. Les lymphocytes CD8 sont des cellules cytotoxiques qui tuent les cellules tumorales, étrangères et infectées par un virus¹⁵⁹.

3. Les cytokines

Les cytokines sont des protéines secrétées, à faible poids moléculaire (6 à 70 kDa); ces petites protéines sont essentielles à la réponse immunitaire et agissent comme médiateurs au réseau de communication immunitaire¹⁶⁰. Les cytokines peuvent être classées en fonction de leur rôle au sein du système immunitaire comme pro-inflammatoire et anti-inflammatoire (Table 2).

Les cytokines pro-inflammatoires incluent les interleukines (IL) IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) et les interférons dont l'interféron gamma (IFN- γ). Ces cytokines pro-inflammatoires facilitent la réaction inflammatoire et activent les cellules immunocompétentes. En effet, les interleukines IL-7 et l'IL-12 ont pour rôle la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes Th1¹⁶¹. De même que le TNF- α permet l'activation des macrophages, des lymphocytes T et des cellules NK¹⁶². L'IFN- γ quant à lui est essentielle dans la réponse contre les agents pathogènes¹⁶³.

Les cytokines anti-inflammatoires sont de petites molécules immunorégulatrices qui inhibent la réaction inflammatoire excessive. Ces cytokines sont l'IL-1, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10, l'IL 11, l'IL 13 et le facteur de croissance transformant β (TGF- β)¹⁵⁹. Afin d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse anti-inflammatoire, l'IL-13 va permettre la différenciation des macrophages en macrophages M2¹⁴⁸. Parallèlement l'IL-4 et l'IL 10 vont permettre la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes Th2. Enfin le TGF- β prévient la production d'auto-anticorps.

Certaines cytokines sont à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires comme l'IL-6. Un équilibre dynamique s'exerce entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, et la rupture de cet équilibre peut donner lieu à de nombreuses pathologies comme le cancer¹⁶⁴, le diabète¹⁶⁵, les maladies cardiovasculaires¹⁶⁶ ou gastro intestinales¹⁶⁷.

Il existe un autre sous-groupe de cytokines appelées chimiokines, ce sont de petites protéines qui permettent la migration des cellules immunitaires sur le site de l'inflammation (chimiotaxies)^{168,169}. On dénombre aujourd'hui 47 chimiokines et 18 récepteurs décrits. Ces chimiokines sont regroupées en 4 groupes en fonction de leur famille de récepteurs : CC, XCL, CXC et CX3C. Même si leur rôle principal est d'être chimio attractantes elles ont d'autres caractéristiques physiologiques soit inflammatoire soit homéostatique¹⁷⁰.

Nom	Chromosome	Récepteur(s) chimiokines	Caractéristiques physiologiques
Famille de récepteur CC			
CCL1	17q11.2	CCR8	Inflammation
CCL2	17q11.2	CCR2	Inflammation
CCL3	17q11.2	CCR1, CCR5	Inflammation
CCL4	17q11.2	CCR5	Inflammation
CCL5	17q11.2	CCR1, CCR3, CCR5	Inflammation
CCL6	Inconnu	Inconnu	Inconnu
CCL7	17q11.2	CCR1, CCR2, CCR3	Inflammation
CCL8	17q11.2	CCR3	Inflammation
CCL9	Inconnu	Inconnu	Inconnu
CCL10	Inconnu	Inconnu	Inconnu
CCL11	17q11.2	CCR3	Inflammation
CCL12	Inconnu	CCR2	Inconnu
CCL13	17q11.2	CCR2, CCR3	Inflammation
CCL14	17q11.2	CCR1	Inconnu
CCL15	17q11.2	CCR1, CCR3	Inconnu
CCL16	17q11.2	CCR1	Inconnu
CCL17	16q13	CCR4	Inflammation, Homéostatique
CCL18	17q11.2	Inconnu	Homéostatique
CCL19	9p13	CCR7	Homéostatique
CCL20	2q33-q37	CCR6	Inflammation, Homéostatique
CCL21	9p13	CCR7	Homéostatique
CCL22	16q13	CCR4	Inflammation, Homéostatique
CCL23	17q11.2	CCR1	Inconnu
CCL24	7q11.23	CCR3	Inflammation

CCL25	19p13.2	CCR9	Homéostatique
CCL26	7q11.23	CCR3	Inflammation
CCL27	9p13	CCR10	Homéostatique
CCL28	5(?)	CCR10	Inflammation, Homéostatique
Famille de récepteur XC			
XCL1	1q23	XCR1	Inconnu
XCL2	1q23	XCR1	Inconnu
Famille de récepteur CXC			
CXCL1	4q12-q13	CXCR2 et CXCR1	Inflammation
CXCL2	4q12-q13	CXCR2	Inflammation
CXCL3	4q12-q13	CXCR2	Inflammation
CXCL4	4q12-q13	Inconnu	Inconnu
CXCL5	4q12-q13	CXCR2	Inconnu
CXCL6	4q12-q13	CXCR1, CXCR2	Inconnu
CXCL7	4q12-q13	CXCR2	Inconnu
CXCL8	4q12-q13	CXCR1, CXCR2	Inflammation
CXCL9	4q21.21.21	CXCR3	Inflammation
CXCL10	4q21.21.21	CXCR3	Inflammation
CXCL11	4q21.21.21	CXCR3	Inflammation
CXCL12	10q11.1	CXCR4	Inconnu
CXCL13	4q21	CXCR5	Homéostatique
CXCL14	5q31	Inconnu	Homéostatique
CXCL15	Inconnu	Inconnu	Inconnu
CXCL16	17p13	CXCR6	Inflammation
Famille de récepteur CX3C			
CX3CL1	16q13	CX3CR1	Inflammation

Table 2 : Présentation des différentes chimiokines, de leurs récepteurs et de leurs caractéristiques physiologiques¹⁷⁰.

II. La réponse immune de l'hôte contre le parasite dans les CCC

1. Phase aigüe

En phase aigüe, le parasite *T. cruzi* circule dans le sang sous sa forme trypomastigote, et dans les modèles animaux le parasite a été repéré dans tous les tissus⁶⁹. Le parasite, bien que présent dans plusieurs types cellulaires tels que les myocytes, les fibroblastes, les adipocytes et les cellules endothéliales, *T. cruzi*, montre un tropisme pour les cellules cardiaques¹⁷¹⁻¹⁷³. Chez la personne parasitée, les macrophages et les cellules dendritiques vont s'activer par l'interaction de PAMP par les PRR. Chaque PRR permet la sécrétion d'interféron de type I et de cytokines pro-inflammatoires via la voie NF- κ B¹⁴⁶. Le parasite va être identifié par les PRR, surtout les TLR. En effet les TLR2 vont reconnaître l'alkylacylglycérol et le lipophosphoglycane du parasite, les TLR2 et TLR4 vont reconnaître les glycoisitolphospholipides et le glycosylphosphatidyl inositol de *T. cruzi* et le TLR9 va distinguer l'ADN génomique du parasite¹⁷⁴. La reconnaissance du parasite par les PRR va entraîner une réponse inflammatoire avec la production de cytokines pro inflammatoires telles qu'IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-1 β et IL-6^{175,176}. Ces cytokines vont participer au contrôle de l'infection, en favorisant un profil pro inflammatoire des cellules, plus particulièrement en activant les macrophages M0 en M1, les NK et les lymphocytes en lymphocytes Th1¹⁷⁷ et en lymphocytes T cytotoxiques CD8^{178,179}. Les cellules NK activées vont produire de l'IFN- γ . La production d'IFN- γ et de TNF- α va générer du nitric oxide (NO) par induction de nitric oxide synthase (NOS2)^{180,181}. La production de NO va avoir une forme d'action antiparasitaire. Cependant pour éviter une surproduction de NO, les cytokines régulatrices (IL-4, IL-10 et le TGF- β) inhibent cette production.

Cela étant, dans la maladie de Chagas, on observe un déséquilibre entre cytokines pro et anti-inflammatoires, avec une surproduction de cytokines pro inflammatoires. Une trop forte production de NO et l'activation non contrôlée des cellules NK et des macrophages peuvent ainsi conduire à des dommages tissulaires. Une fois le parasite rentré dans les cellules, il va se multiplier sous forme amastigote et les principaux effecteurs de la réponse immunitaire stimulés à ce moment de l'infection font être les macrophages et les lymphocytes T⁶⁹. Dans toutes les biopsies des patients présentant une myocardite en phase aigüe, on retrouve une infiltration de lymphocytes T CD4 et T CD8¹⁸². De plus, les personnes décédées en phase aigüe montrent une rupture des cellules où les amastigotes se sont multipliés, ce qui entraîne une réaction inflammatoire très importante. Cependant, la plupart du temps la phase aigüe cause peu ou pas de réaction inflammatoire aussi bien dans les modèles animaux que chez les patients infectés par le parasite^{175,182}.

2. Phase chronique

En phase chronique les patients présentant un CCC montrent une absence de parasitémie dans les tissus cardiaques¹⁸³. Cependant la réponse immunitaire mise en place par l'organisme pour tuer le parasite en phase aigüe ne va pas s'arrêter⁸⁹ et il en résulte un remodelage de la matrice collagénique du cœur. Les cellules immunitaires infiltrant le cœur sont des cellules inflammatoires de types lymphocytes Th1 et macrophages M1¹⁸⁴. La réponse Th1 va sécréter principalement de l'IFN- γ et du TNF- α et induire de faibles

productions d'IL-4, IL-6, IL-7 et IL-15 favorisant ainsi les mécanismes inflammatoires¹⁸⁴. En effet, une infiltration incessante de cellulaires immunitaires dans le cœur va entraîner des lésions des fibres cardiaques provoquant une accumulation de matrice extracellulaire afin de remplacer la perte cellulaire. Ce mécanisme est nommé fibrose et induit sur le long terme des effets délétères au fonctionnement cardiaque^{184,185} (Voir chapitre 1). En plus des dommages tissulaires dus à une infiltration excessive des cellules inflammatoires, d'une surproduction de cytokines pro inflammatoires telles que l'IFN- γ et du TNF- α et d'une surproduction de NO et de ROS, il existe des dommages tissulaires dus à un processus d'auto-immunité. La présence d'auto-anticorps, réagissant à la fois avec des protéines du parasite et des protéines du patient, plus particulièrement une protéine cardiaque a été montrée¹⁸⁶. Une étude réalisée chez des patients CCC concluait à la réaction de l'anticorps dirigé contre la protéine B13 de *T. cruzi* avec de la myosine cardiaque¹⁸⁷. La myosine cardiaque est une protéine qui joue un rôle important dans la contraction cardiaque, car elle se lie à l'actine et raccourcit les sarcomères.

Dans la maladie de Chagas, l'organisme met en place une combinaison de réponses immunes afin d'éliminer le parasite *T. cruzi* mais le système va se déséquilibrer et entraîner la mise en place de cardiomyopathies chagasiennes chroniques.

III. Les variations génétiques

1. Définition

L'information génétique est transmise grâce à de l'ADN (acide désoxyribonucléique) des parents à la descendance. Dans une cellule l'information génétique se retrouve à deux endroits, au niveau du noyau (sous forme de 23 paires de chromosomes) et au niveau des mitochondries (ADN circulaire).

Dans le noyau, les chromosomes sont présents en deux exemplaires, l'un provenant de la mère et l'autre au père. De plus dans les chromosomes à un locus donné on retrouve des gènes, qui sont composés, de séquences codantes pour une protéine appelées exons, et de séquences non codantes nommées introns. Les gènes vont être transcrits en molécules ARN (acides ribonucléiques) puis certains vont être traduits en protéines. Pour ce faire, à l'échelle de l'ARN messenger, au niveau d'un cadre ouvert de lecture, un groupe de trois nucléotides appelé codon va coder pour un acide aminé afin de former des protéines. Le génome nucléaire code pour environ 20 000 gènes codant pour une protéine et environ 22 000 gènes qui codent uniquement pour des molécules ARN (ARNr, ARNt).

La séquence d'un gène peut être mutée, c'est-à-dire qu'elle diffère de la séquence de référence. Dans la population, il existe plusieurs versions d'un gène, appelées allèles. Une mutation ou un variant peut-être pathogénique c'est-à-dire délétère est associé à une maladie, ou bénin non délétère et sans effet pathogénique. Puisqu'un individu possède des gènes en deux exemplaires, l'un provenant de la mère et l'autre du père, s'il présente une mutation identique sur les deux gènes, l'individu est dit homozygote muté pour ce gène. Si la mutation ne concerne qu'un gène, l'individu est alors hétérozygote muté. Lorsqu'une mutation est retrouvée à une fréquence supérieure à 1% dans la population on le nomme polymorphisme¹⁸⁸. Il existe trois types de polymorphisme. Le premier est le Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) qui est le polymorphisme d'un nucléotide, il peut s'agir d'une insertion, d'une délétion ou d'une substitution d'un nucléotide. Ces trois éléments ont

un impact sur la séquence de la protéine car en changeant le codon, cela va modifier la séquence de la protéine et créer des variants non synonymes. Lorsque la substitution s'effectue avec un acide nucléique qui ne change pas le codon, ce sont des variants synonymes. Le deuxième type de polymorphisme est le Copy Number Variations (CNV) qui désigne la variation d'une région génomique dont la séquence est supérieure à 1kb, il peut s'agir d'une insertion, d'une délétion ou d'une duplication de cette région. Enfin le dernier type de polymorphisme est le polymorphisme de répétitions qui consiste en la répétition d'une séquence de taille variable allant de de 1 à 4 bases (Microsatellite), de 10 à 60 bases (Minisatellite) à plus de 1001 nucléotides (megasatellite)¹⁸⁸.

Les variants sont divisés en trois classes en fonction de leur fréquence d'apparition dans une population. En effet quand un variant est retrouvé à une fréquence inférieure à 1%, ce variant est rare. Les variants retrouvés chez 1% et 5% de la population sont des variants peu fréquents, et en dessus de 5% ce sont des variants fréquents¹⁸⁹.

Dans la mitochondrie, l'ADN mitochondrial (ADNmt) est exclusivement d'origine maternelle. Le nombre de copies d'ADNmt peut varier de plusieurs dizaines à quelques centaines par cellule, en fonction du type cellulaire. Les variants peuvent être sur toutes les copies de l'ADNmt, on parle alors d'état homoplasmique ou sur une proportion variable et on parle d'état hétéroplasmique¹⁹⁰. Contrairement aux variants nucléaires où les variants sont définis par l'absence ou la présence d'une mutation, pour l'ADNmt on définit la variation par rapport à la fréquence des variants, cette fréquence se nomme hétéroplasmie.

2. Méthode d'étude

Les trois classes de variants sont associées à différents types de maladies. Notamment, les variants rares sont associés à des maladies mendéliennes ou monofactorielles c'est-à-dire que l'anomalie d'un seul gène entraîne la maladie. Ces maladies sont héréditaires et se transmettent de façon autosomique, elles sont liées à l'X de manière dominante ou récessive. Afin de mettre en évidence des variants rares causaux pour une maladie, la méthode appropriée est un séquençage d'exomes (ou même un séquençage de génome entier) sur des familles de susceptibilité. Des familles où la maladie d'intérêt va être retrouvée plusieurs fois au cours des générations, vont être recrutées, et un séquençage de leurs exomes va être effectué. Cette méthode va mettre en évidence des variants codants non synonymes, pathogéniques rares¹⁹¹ (Figure 27).

Il existe de nombreuses maladies communes, multifactorielles ou polygéniques, qui ne sont pas dues à une anomalie génétique d'un seul gène mais à de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. Afin d'étudier ces maladies, plusieurs méthodes sont possibles. Ainsi pour étudier des variants peu fréquents, il est possible de réaliser un séquençage d'exomes sur des individus non apparentés afin d'obtenir des variants codants non synonymes pathogéniques, des variants synonymes régulateurs et des variants d'épissages¹⁹¹ (Figure 27). Ces variants peu fréquents, retrouvés chez 1% à 5% de la population, ont un effet important sur les maladies multifactorielles. Concernant les variants fréquents, même si leur effet est moindre, ils sont importants dans les maladies communes. Ces variants peuvent être mis en évidence grâce à une analyse GWAS (Genome Wide Association Study). Cette étude est une étude d'association pangénomique c'est-à-dire qu'une cohorte d'individus va être recrutée afin d'effectuer une étude cas-témoins ; le groupe témoins sains va être comparé à un groupe d'individus malades par rapport au SNP

connu pour la maladie dans tout le génome. La GWAS va pouvoir mettre en évidence des variants communs introniques, des variants communs en 5'UTR et des variants communs intergéniques¹⁹¹ (Figure 27).

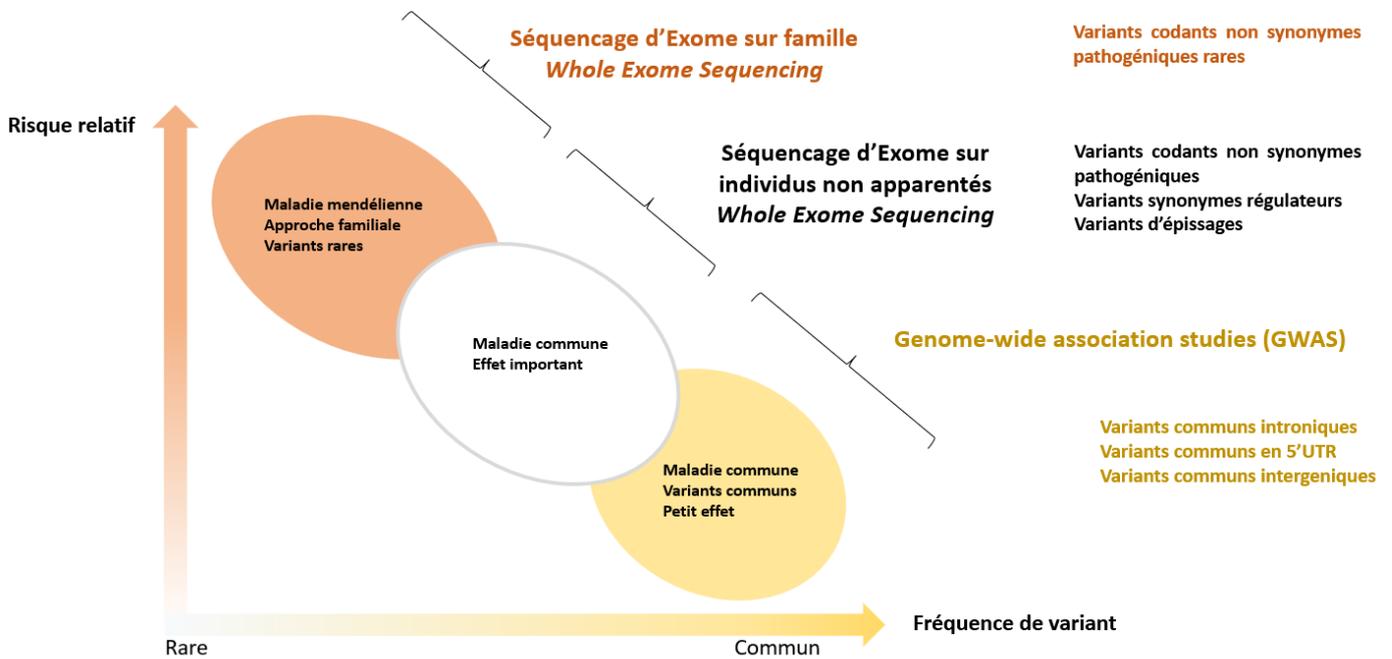


Figure 27 : Les techniques d'étude en génétique et leurs variants associés. Source adaptée¹⁹¹.

IV. Déterminisme génétique des cardiomyopathies

Une cardiomyopathie est une maladie où le muscle cardiaque est structurellement et fonctionnellement anormal. Il existe plusieurs formes de cardiomyopathies causées par différents facteurs génétiques et environnementaux comme les cardiomyopathies dilatées, les cardiomyopathies hypertrophiques, les cardiomyopathies ventriculaires droites arythmogènes, les cardiomyopathies restrictives et les cardiomyopathies avec non-compaction du ventricule gauche¹⁹² (Figure 28).

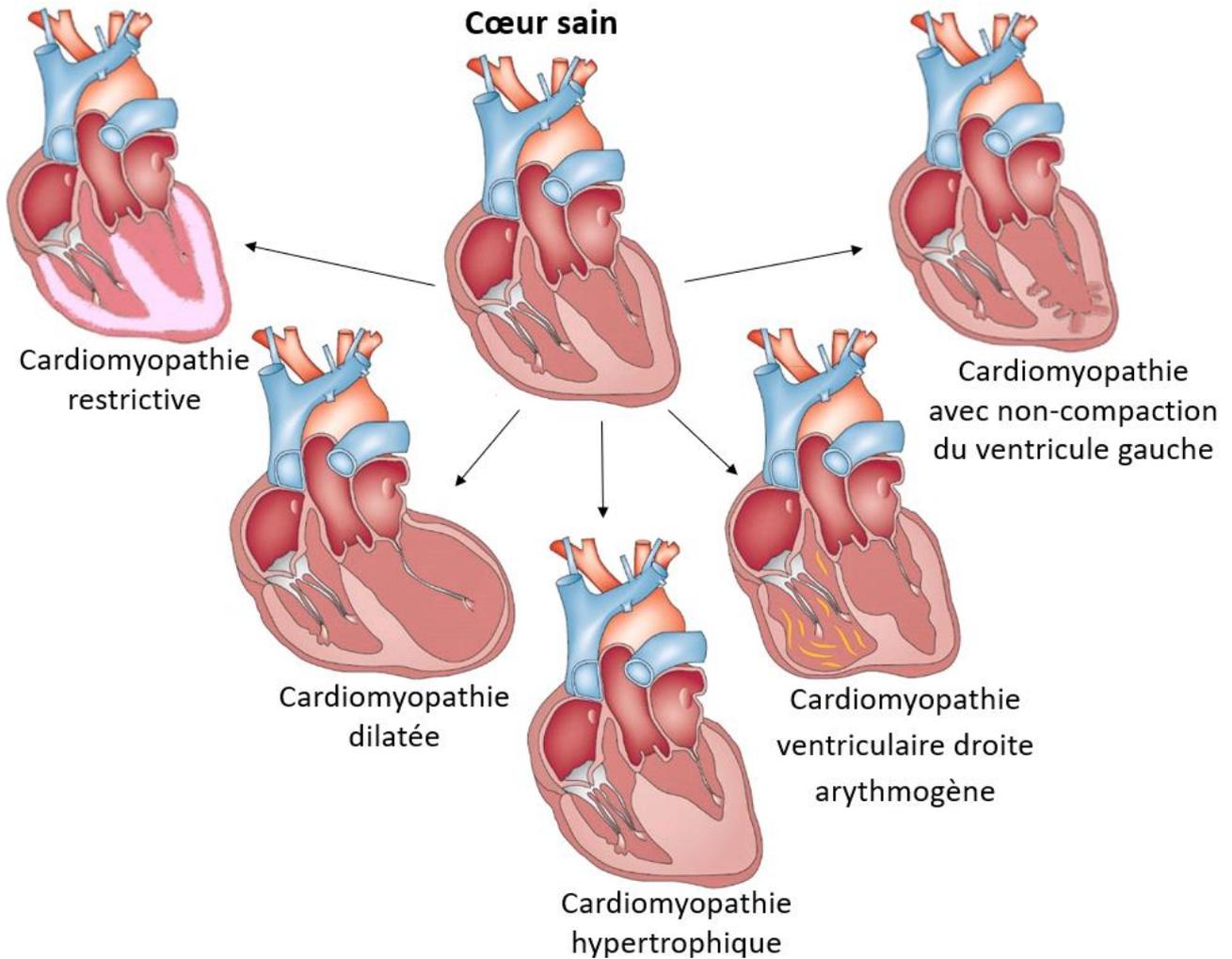


Figure 28 : Schéma des différentes formes de cardiomyopathie. La cardiomyopathie restrictive entraîne une rigidité du myocarde. La cardiomyopathie dilatée provoque une dilatation du ventricule gauche. La cardiomyopathie hypertrophique se caractérise par un épaississement et un raidissement de la paroi des ventricules. La cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène où les cardiomyocytes vont être remplacés progressivement par des cellules adipeuses et de la fibrose. Enfin la cardiomyopathie avec non-compaction du ventricule gauche où le ventricule gauche présente des trabéculations et a un aspect spongieux. Schéma adapté ¹⁹³.

1. La cardiomyopathie dilatée

Une cardiomyopathie dilatée (DCM) est caractérisée par une dilatation du ventricule gauche associée à un trouble de contraction sans hypertension, valvulopathie, cardiopathie congénitale ou coronaropathie ¹⁹⁴. Il y a plusieurs déclencheurs possibles de cette maladie, des déclencheurs génétiques ou non génétiques.

Les déclencheurs non génétiques peuvent être des changements tels que l'inflammation, l'environnement (alcools, drogues, chimio toxines) ou des troubles métaboliques ¹⁹⁵. En raison du panel possible de déclencheurs de la DCM, l'évolution clinique des patients est hétérogène ; en effet les patients peuvent présenter des signes

d'insuffisance cardiaque, des arythmies, des événements thrombotiques ou une mort cardiaque subite¹⁹⁶.

Au niveau des déclencheurs génétiques des DCM, de nombreux gènes sont impliqués dans le sarcomère, les protéines de l'enveloppe nucléaire, les desmosomes, les protéines du cytosquelette, les protéines du disque Z, les canaux ioniques et les protéines du réticulum sarcoplasmique¹⁹⁷. Les principaux gènes impliqués dans l'apparition de la DCM sont la *TTN* et la *LMNA*^{198,199}.

La titine est la plus grosse protéine du corps humain, son gène *TTN* comprend 363 exons et elle est impliquée dans le sarcomère. En effet cette protéine se lie à la myosine et son domaine PEVK est responsable de l'extension du sarcomère (Figure 29). Les variants les plus retrouvés dans les patients DCM pour le gène de la titine sont des variants tronqués. Les patients DCM ayant des variants dans le gène de la titine ont un meilleur pronostic avec une bonne réponse au traitement avec un défaut de conduction faible¹⁹⁷⁻¹⁹⁹.

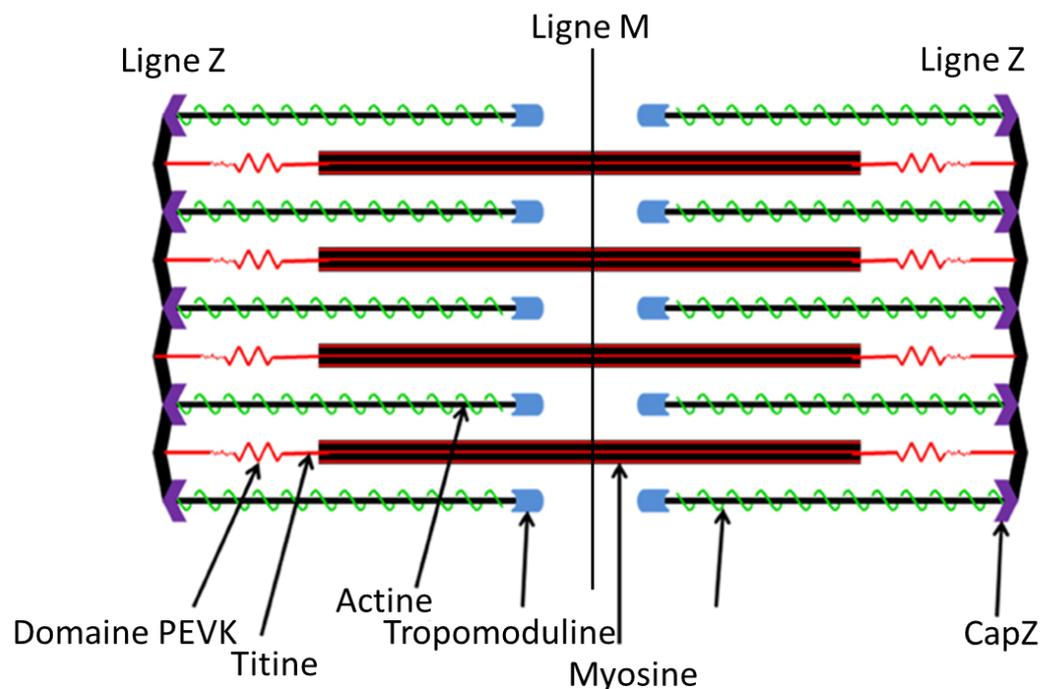


Figure 29 : Schéma de la structure et des protéines présentes dans le sarcomère. La titine est composée d'un domaine PEVK qui confère au sarcomère une certaine élasticité. La titine est associée au filament épais de myosine. La ligne Z est composée des protéines CapZ, cette ligne est le pont d'ancrage de l'actine. L'actine est quant à elle associée à la tropomoduline. Schéma adapté²⁰⁰.

Le gène *LMNA* code pour les protéines de lamine A et C, ces deux types de lamines sont synthétisés par épissage alternatif. Ces protéines sont des protéines de l'enveloppe nucléaire, en effet dans le noyau, la lamina nucléaire formée des lamines A, B et C sont une structure essentielle, qui participe à la liaison entre les chromosomes et le noyau²⁰¹. Les patients DCM qui ont une mutation dans ce gène ont un mauvais pronostic, avec une faible réponse au traitement et ont souvent de l'arythmie^{197,198}. Ses patients vont devoir le plus

souvent bénéficier d'une transplantation cardiaque, ou d'une implantation de défibrillateur pour prévenir la mort subite ²⁰².

2. La cardiomyopathie hypertrophique

Une cardiomyopathie hypertrophique (CMH) se caractérise par une hypertrophie du ventricule gauche du cœur, avec un épaississement et un raidissement de la paroi des ventricules, ce qui entraîne un blocage à la sortie du cœur. La CMH est une maladie des protéines du sarcomère, en effet 40 à 60% des patients atteints du CMH ont un variant au niveau des gènes des protéines du sarcomère. Les variants les plus trouvés chez les patients sont des variants dans les gènes codant pour la chaîne lourde de la myosine (*MYH7*) et dans les gènes qui codent pour la protéine de liaison de la myosine C (*MYBPC3*) ²⁰³. D'autres variants sont également retrouvés dans les gènes du sarcomère comme des variants dans les gènes des myofilaments minces, dans le disque Z, dans la ligne M, dans les gènes apparentés au calcium et dans le gène de la *TTN* (Figure 30).

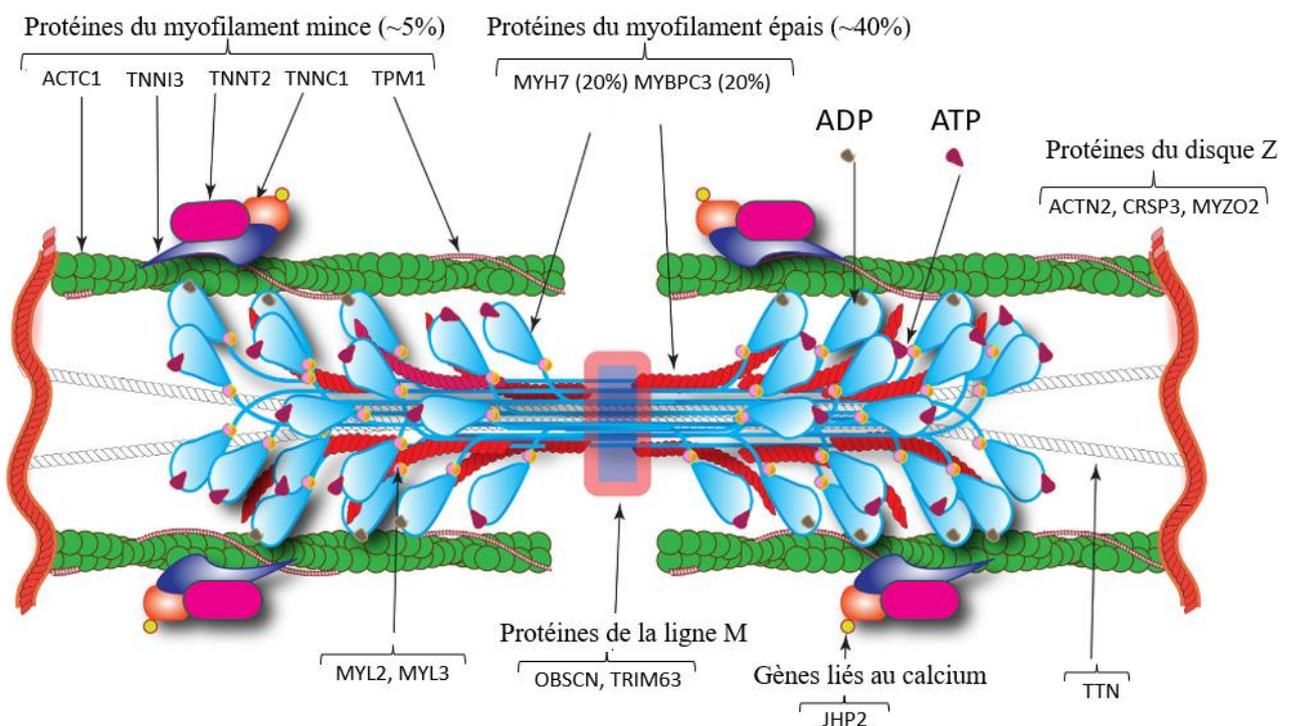


Figure 30 : Les gènes impliqués dans le développement de la CMH. Des variants ont été trouvés chez 5% des patients, dans les gènes des protéines du myofilament mince (tels *ACTC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TNNC1*, *TPM1*). Quarante pourcents des patients montrent des mutations dans les gènes *MYH7* et *MYBPC3*, gènes codant pour les myofilaments épais. Il a été également montré que des mutations dans les gènes *ACTN2*, *CRSP3* et *MYZO2*, protéines du disque Z étaient impliquées dans le développement de la CMH. On retrouve aussi des variants dans les gènes des protéines de la ligne M (*OBSCN*, *TRIM63*), dans les gènes liés au calcium comme *JHP2*, dans les gènes *MYL2*, *MYP3* et dans le gène de la *TTN*. Schéma traduit ²⁰⁴.

3. La cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène

Une cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène (ARVC) est une maladie où au niveau du ventricule droit et secondairement du ventricule gauche, les cardiomyocytes sont remplacés progressivement par des cellules adipeuses et de la fibrose. Cette maladie est associée à des insuffisances cardiaques, de l'arythmie et de la mort subite^{203,205}. L'ARVC est une maladie qui touche souvent les jeunes adultes puisque 80% des patients sont diagnostiqués avant l'âge de 40 ans²⁰³. Cette cardiomyopathie est une maladie des desmosomes. Un desmosome est une structure protéique intercellulaire qui forme la jonction cellule-cellule et qui sert comme point d'ancrage des filaments intermédiaires, afin de former un réseau intercellulaire fonctionnel. Cette structure est très importante dans le cœur car elle permet le passage par conduction du signal électrique et la contraction des cellules cardiaques²⁰⁶. Le desmosome est composé de cinq protéines, la **plakoglobine** jonctionnelle codée par le gène *JUP*, la protéine **plakophiline-2** codée par le gène *PKP2*, la **desmoplakine** codée par le gène *DSP*, la **desmogléine-2** codée par le gène *DSG2*, et enfin le **desmocolline-2** codée par le gène *DSC2* (Figure 31). Dans l'ARVC on retrouve des variants génétiques dans ces cinq gènes, ces variants sont responsables d'environ la moitié des cas de la maladie avec une grande majorité des mutations trouvés dans le gène *PKP2*^{203,206}.

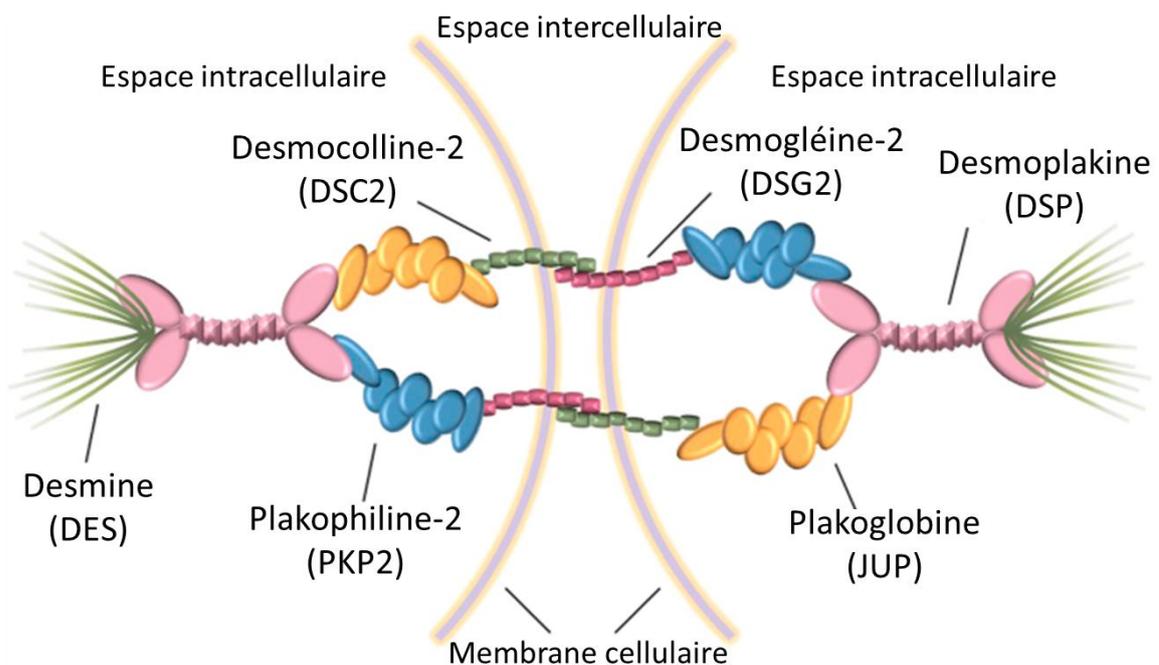


Figure 31 : Structure des desmosomes²⁰⁶.

La moitié des mutations en cause dans l'ARVC sont des mutations dans les gènes du desmosome, mais il existe d'autres mutations dans d'autres gènes, également connues pour être à l'origine de cette maladie, comme une mutation dans le gène *TMEM43* qui code pour une protéine transmembranaire nucléaire^{203,206,207}. Des mutations dans le gène *TTN* ont aussi été retrouvées pour l'ARVC^{203,206,208}, ainsi que des mutations dans les gènes *TGTB3* et *RYR2*. Le gène *TGTB3* code pour une protéine sécrétée de la super famille des protéines TGT-beta (transforming growth factor-beta). Le gène *RYR2* quant à lui code pour un récepteur à

la ryanodine localisé dans le réticulum sarcoplasmique indispensable à la contraction cardiaque puisqu'il contrôle les ions calcium ^{203,206}. On retrouve également des mutations dans le gène *DES* qui code pour la desmine qui est une fibre intermédiaire dans les myocytes ^{203,206} (Figure 31).

4. La cardiomyopathie restrictive

La cardiomyopathie restrictive est une maladie cardiaque entraînant une altération du remplissage ventriculaire due à une augmentation de la rigidité du myocarde. Cette pathologie peut toucher les deux ventricules, mais la cavité bi ventriculaire ou la fonction systolique sont proches de la normal. Cette cardiomyopathie entraîne des arythmies, des troubles de la conduction et des symptômes d'insuffisance cardiaque ²⁰⁹. Les mutations connues intervenir dans la cardiomyopathie restrictive sont présentes dans les gènes qui codent pour les sous-unités du sarcomère tels que le gène *TNNT2* qui code pour la troponine T, le gène *TNNI3* qui code pour la troponine I, l' α -actine codée par le gène *ACTC*, et le gène *MYH7* qui code pour la B chaîne lourde de la myosine ^{203,209}. Des variants faux sens ont été également trouvés dans le gène *DES* qui code pour la desmine ^{203,210}.

5. La cardiomyopathie avec non-compaction du ventricule gauche.

La cardiomyopathie avec non-compaction du ventricule gauche (LVNC) est une pathologie dans laquelle fonction cardiaque est progressivement détériorée, le ventricule gauche est fortement trabéculé et montre un aspect spongieux. Les patients LVNC présentent des hypertrophies ventriculaires, une augmentation des événements thromboemboliques et de la mort subite du nourrisson. Cette pathologie est due à un arrêt de la compaction myocardique pendant le premier trimestre embryonnaire ²⁰³. La plupart des mutations en cause dans la LVNC sont, comme pour les cardiomyopathies DCM ou HCM, des mutations dans les gènes codant pour les composants du sarcomère comme *MYH7*, *MYBPC3*, *ACTC1*, *TNNT2* ^{203,211}. De plus, comme pour les cardiomyopathies DCM, des mutations dans le gène *LMNA* ont été retrouvées ^{202,211}. La LVNC est possiblement due à une perturbation de la mise en place de la paroi entre les deux ventricules cardiaques et la mitochondrie va être un acteur essentiel dans le développement cardiaque grâce à son rôle dans l'apoptose et dans la production d'ATP. Plusieurs études ont mis en évidence des mutations dans les gènes impliqués dans les fonctions mitochondriales chez des patients LVNC ²¹¹. En effet, des mutations dans le gène *ND1* codant pour la sous-unité 1 de la NADH déshydrogénase et une mutation dans le gène *ATP8* sous-unité 8 de l'ATPase ont été trouvées ²¹².

V. Déterminisme génétique de la maladie de Chagas

Encore aujourd'hui le développement de la CCC reste mal compris. Au vu d'une agrégation des cas de CCC dans certaines familles et le développement des CCC chez un tiers des patients présentant la maladie de Chagas, on peut penser qu'il y a une composante génétique à la susceptibilité de la maladie^{184,213}. Cette maladie est multifactorielle, incluant à la fois la composante génétique, des facteurs environnementaux, des facteurs comportementaux et des facteurs parasitaires. Les patients présentant la CCC montrent une réaction immunitaire plus importante que les patients asymptomatiques, avec une infiltration de cellules immunitaires dans les tissus du myocarde, et notamment de lymphocytes Th1, induisant une forte production de Tumor Necrosis Factors alpha (TNF- α) et d'interférons gamma (IFN- γ)^{184,214,215}. De ce fait, la pathogenèse de la maladie peut être due à un polymorphisme génétique au niveau du système immunitaire.

1. Les études Cas-Témoins et les gènes candidats

1.1. Polymorphisme dans le système HLA

Le système HLA ou CMH est un groupe de gènes situé au niveau du chromosome 6, ces gènes vont coder pour un ensemble de protéines importantes pour le système immunitaire.

Le système HLA est divisé en trois groupes : HLA de classe I (A, B et C), HLA de classe II (DR, DQ et DP), HLA de classe III, il code pour plusieurs composants du complément (C2, C4 et facteur B) et également pour le TNF²¹⁶. Plusieurs études ont mis en évidence que des polymorphismes dans les gènes *HLA* seraient associés à une sensibilisation à l'infection de *T. cruzi* et au développement des CCC (Table 3). Néanmoins, on ne retrouve pas de consensus quant à l'association des polymorphismes du gène *TNF* sur le développement de l'infection à *T. cruzi* ou au développement de la CCC. En effet plusieurs études ont montré une association des polymorphismes du gène *TNF* avec le développement des CCC et de l'infection à *T. cruzi*²¹⁷⁻²²¹ alors que d'autres ne peuvent l'affirmer²²²⁻²²⁵.

Gène	Allèles/génotypage	Population	Association	
HLA-A	A*68	Mexique	CCC ¹⁸⁴	
	A*30	Brésil	Toutes les formes chroniques ²²⁶	
HLA-B	B*39	Mexique	Infection et CCC ²²⁷	
	B*35	Mexique	CCC ²²⁷	
	B*40 en présence de Cw3	Chili	CCC ²²⁸	
HLA-C	B*14 :02	Bolivie	Toutes les formes chroniques ²²⁹	
	C*03 en LD avec B*40 et B*15	Venezuela	CCC ²³⁰	
HLA-DRB1	KIR2DS2 en présence de HLA-C1	Brésil	CCC ²³¹	
	DRB1*14-DQB1*0301 haplotype	Pérou	Infection ²³²	
	DR16 et DR4	Mexique	Infection et CCC ²²⁷	
	DRB1*1503 et DRB1*1103	Argentine	Infection et CCC ²³³	
	DRB1*0409	Argentine	Infection ²³⁴	
	DRB1*01, DRB1*08 et DRB1*1501	Venezuela	CCC ²³⁵	
	DRB1*01 et DQB1*0501	Venezuela	CCC ²³⁶	
	DRB1*01	Bolivie	Toutes les formes chroniques ²²⁹	
	HLA-DQB1	DQB1*0303	Venezuela	CCC ²³⁵
		DQB1*0302 et DQB1*06	Brésil	Toutes les formes chroniques ²²⁶
HLA-DPB1	DPB1*0401, DPB1*2301 et DPB1*3901	Venezuela	CCC ²³⁶	
MICA	MICA*011	Bolivie	Infection ²²⁹	
	DRB1*01-B*14-MICA*011 haplotype	Bolivie	Toutes les formes chroniques ²²⁹	
	MICA-129	Brésil	CCC ²³¹	

Gène	Allèles/génotypage	Population	Association
MICB	MICB*008	Bolivie	Pas d'association ²²⁹
HLA-G	3' UTR	Brésil	Toutes les formes chroniques ²³⁷
TNF	TNFa -238A	Brésil	Infection ²¹⁷
	TNFa -1031C et -308A	Colombie	CCC ²¹⁸
	TNFa-308	Mexique	CCC ²¹⁸
	TNFa microsatellite et-308	Brésil	CCC ²²⁰
	TNFd3, TNFb7, TNFa8 ; TNFa2-b4-c2-d3-e2 and TNFa8-b1-c1-d3-e3 haplotypes	Brésil	Infection et toutes les formes chroniques ²²¹
	TNFa microsatellite et -308	Brésil	Pas d'association ²²²
	TNFa -308, -244 and -238 et TNFb	Pérou	Pas d'association ²²³
	TNFa -308	Brésil	Pas d'association ²²⁴
	TNFa -308	Brésil	Pas d'association ²²⁵
LTA	LTA +80 et +252	Brésil	CCC ²³⁸
	LTA +252	Brésil	CCC ²³⁹
	LTA +80 et +252	Brésil	Pas d'association ²²⁴
BAT1	BAT1 – 22C/G et –348C/T	Brésil	CCC ^{240,241}
	BAT1 – 22C/G	Brésil	CCC ²²⁴
CYP21A2	V281L	Bolivie	CCC ²⁴²
IKBL	IKBL–62A/T et –262A/G	Brésil	CCC ²⁴³

Table 3 : Les gènes HLA ²¹⁶. (Tableau traduit)

1.2. Polymorphismes dans les cytokines, les chimiokines et leurs récepteurs

Les cytokines sont des molécules essentielles de la réponse immunitaire, elles vont permettre de la moduler et la polariser pour éviter la progression de l'infection. Le polymorphisme des cytokines pro inflammatoires comme IL-17, IL-18 ou le IFN- γ entraîne une susceptibilité à l'infection par *T. cruzi* et au développement de la CCC ²¹⁶ (Table 4).

Les chimiokines et leurs récepteurs permettent la migration des cellules immunitaires pendant l'inflammation, elles sont donc essentielles au bon déroulement du processus inflammatoire. Plusieurs polymorphismes des chimiokines comme CCL2, CXCL9 et CXCL10 sont associés au développement de la CCC ^{216,244,245}. Ainsi, le polymorphisme du récepteur CCR5, récepteur des chimiokines CCL2, CCL3, CCL4 et CCL5, est lui aussi associé au développement des CCC et de toutes les formes chroniques ²⁴⁵⁻²⁵² (Table 4).

1.3. Autres gènes

Plusieurs polymorphismes d'autres gènes ont été testés dans la maladie de Chagas par rapport à leur association avec d'autres maladies infectieuses. Par exemple, on peut citer les polymorphismes du gène Haptoglobine (*HP*) ^{265,266}, du gène lectine de liaison au mannose 2 (*MBL2*) ^{267,268}, du gène de la protéine adaptatrice contenant le domaine du récepteurs Toll-interleukine (*TIRAP*) ^{244,251}, du gène qui code pour les récepteurs de la vitamine 3 (*VDR*) ²⁶⁰, du gène de la lectine de liaison aux mannanes serines peptidases 2 (*MASP2*) ²⁶⁹, du gène codant pour l'actine alpha du muscle cardiaque 1 (*ACTC1*) ²⁵¹, du gène de la ficoline 2 (*FCN2*) ²⁷⁰ et le polymorphisme du gène de la protéine 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques (*CTLA4*) ²⁷¹ tous ces polymorphismes sont associés au développement de la CCC ou à une infection par *T. cruzi* (Table 5).

^{246,247} Gène	Chr	Nom du gène	Population	Association
IL-1A	2	Interleukine 1 alpha	Colombie	CCC ²⁵³
IL-1B	2	Interleukine 1 beta	Colombie	CCC ²⁵³
			Mexique	Pas d'association ²⁵⁴
IL-1RN	2	Antagoniste du récepteur de l'interleukine 1	Mexique	CCC ²⁵⁴
			Colombie	Pas d'association ²⁵³
IL-4	5	Interleukine 4	Bolivie	Infection ²⁵⁵
			Colombie	Pas d'association ²⁵⁶
IL-4R	16	Récepteur de l'interleukine 4	Colombie	CCC ²⁵⁶
IL-6	7	Interleukine 6	Colombie/ Pérou	Pas d'association ²⁵⁷
IL-10	1	Interleukine 10	Brésil	CCC
			Colombie	Pas d'association ²⁵⁶
			Brésil	Pas d'association ²²⁴
IL-12B	5	Interleukine 12B	Colombie	CCC ²⁵⁸
IL-17A	6	Interleukine 17A	Colombie	Infection et CCC ²⁵⁹
IL-18	11	Interleukine 18	Colombie	Infection ²⁶⁰
			Brésil	CCC ²⁶¹
IFNG	12	Interféron gamma (IFN-γ)	Colombie	Infection ²⁶²
			Brésil	CCC ²²⁴
			Colombie/ Pérou	Infection ²⁶³
TGFB	19	Transforming growth factor beta (TNF-α)		Pas d'association ²²⁴
			Brésil	
CCR5	3	Récepteur 5 de la chimiokine à motif C-C	Pérou	CCC ²⁴⁶
			Colombie	CCC ^{247,248}

^{246,247} Gène	Chr	Nom du gène	Population	Association
			Venezuela	CCC ²⁴⁹
			Argentine	CCC ²⁵⁰
			Brésil	CCC ²⁴⁵
			Brésil	CCC ²⁵¹
			Brésil	Toutes les formes chroniques ²⁵²
			Brésil	Pas d'association ²²⁵
CCR2	3	Récepteur 2 de la chimiokine à motif C-C	Colombie	CCC ^{247,248}
			Argentine	CCC ²⁵⁰
CCL2	17	Ligand 2 de la chimiokine à motif C-C	Brésil	CCC ^{244,251}
CXCL9	4	Ligand 9 de la chimiokine à motif C-X-C	Brésil	CCC ²⁴⁵
CXCL10	4	Ligand 10 de la chimiokine à motif C-X-C	Brésil	CCC ²⁴⁵
MIF	22	Facteur inhibiteur de la migration des macrophages	Colombie/ Pérou	Infection ²⁶⁴
CCL5	17	Ligand 5 de la chimiokine à motif C-C	Brésil	Pas d'association ²⁴⁵
CCL17	16	Ligand 17 de la chimiokine à motif C-C	Brésil	Pas d'association ²⁴⁵
CCL19	9	Ligand de chimiokine à motif C-C 19	Brésil	Pas d'association ²⁴⁵

Table 4 : Polymorphismes dans les cytokines, les chimiokines et leurs récepteurs ²¹⁶. (Tableau traduit).

Gène	Chr	Nom du gène	Population	Association
<i>HP</i>	16	Haptoglobine	Brésil	CCC ²⁶⁵
			Venezuela	Infection et CCC ²⁶⁶
<i>MBL2</i>	10	Lectine de liaison au mannose 2	Brésil	Infection et CCC ²⁶⁷
			Chili	Infection ²⁶⁸
<i>TIRAP</i>	11	Protéine adaptatrice contenant le domaine du récepteur Toll-interleukine	Brésil	CCC ^{244,251}
<i>VDR</i>	12	Récepteur de la vitamine D3	Colombia	CCC ²⁶⁰
<i>MASP2</i>	1	Lectine de liaison aux mannane sérine peptidase 2	Brésil	CCC ²⁶⁹
<i>ACTC1</i>	15	Actine alpha du muscle cardiaque 1	Brésil	CCC ²⁵¹
<i>FCN2</i>	9	Ficoline 2	Brésil	Toutes les formes chroniques ²⁷⁰
<i>CTLA4</i>	2	Protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques	Brésil	CCC ²⁷¹

Table 5 : Polymorphisme des autres gènes ²¹⁶. (Tableau traduit)

2. Etude d'association pangénomique

Les études cas-témoins, les Whole exome sequencing et les études pangénomiques (GWAS: Genome Wide Association Study) ont permis de mettre en évidence une contribution génétique dans le développement de la CCC. La GWAS permet une analyse globale des polymorphismes génétiques communs (fréquence minimale des allèles supérieures à 1-5 %), dans des études cas-témoins, évaluant des centaines de milliers de polymorphismes sur l'ensemble du génome²⁷² et pas seulement sur les polymorphismes codants comme pour le Whole exome sequencing. Le GWAS permet de souligner l'importance des variants intergéniques ou introniques.

Afin d'avoir une bonne puissance statistique, le GWAS est sensible au nombre d'échantillons. Une première étude portant sur 600 patients brésiliens n'a pas atteint la puissance statistique souhaitée, car aucun SNP ne s'est avéré fortement associé à la CCC²⁷³. Une autre étude regroupant plus de patients avec des cohortes recrutées en Colombie, en Argentine et en Bolivie a, quant à elle, pu détecter un locus de susceptibilité²⁷⁴. Ce locus a été identifié sur le chromosome 11 (rs2458298). Ce marqueur rs2458298 se situe à proximité du gène *SAC3D1/SHD1*. Ce gène est un régulateur transcriptionnel du gène *STAT5*²⁷⁵. Le gène *STAT5* est connu pour être un cardioprotecteur chez l'homme²⁷⁶. De plus, ce locus rs2458298 est en eQTL avec deux gènes (*SNX15* et *BATF2*). En effet eQTL (expression quantitative trait loci) signifie qu'un polymorphisme du locus rs2458298 va influencer la transcription de ces gènes voisins, ici *SNX15* et *BATF2*. Le gène *BATF2* code pour un facteur de transcription qui a été associé à la maladie de Chagas et qui régule la voie Il-23-Th17, suggérant une fonction immunorégulatrice pendant l'infection par *T. cruzi* dans un modèle de souris²⁷⁷. Le gène *SNX15* code pour un membre de la famille des protéines de la nexine, qui a été associé à des maladies cardiovasculaires²⁷⁸.

Une troisième étude pangénomique et une méta-analyse ont été réalisées dans deux cohortes brésiliennes dans le but de mettre en évidence des susceptibilités génétiques pour développer les CCC²⁷⁹. Ainsi, un nouveau locus de susceptibilité, le locus (rs34238187) a été mis en évidence, il est situé sur le chromosome 18 à proximité du gène *C18orf42*. Par des études d'analyse haplotypique, les auteurs ont pu restreindre ce locus à un haplotype de 30Kb. Malheureusement, les auteurs ne sont pas arrivés à identifier le variant génétique causal responsable de l'association, ni les gènes spécifiques modulés par l'haplotype de susceptibilité²⁷⁹.

Chapitre 3 : La mitochondrie

I. Origine de la mitochondrie

La mitochondrie est une organelle cellulaire des cellules eucaryotes, elle est composée de deux membranes de bicouche lipidique, la membrane externe et la membrane interne, qui sont séparées par l'espace inter membranaire. La membrane interne est organisée sous forme d'invaginations appelées crêtes. De plus L'ADN mitochondrial et les ribosomes sont situés dans la matrice mitochondriale (Figure 32).

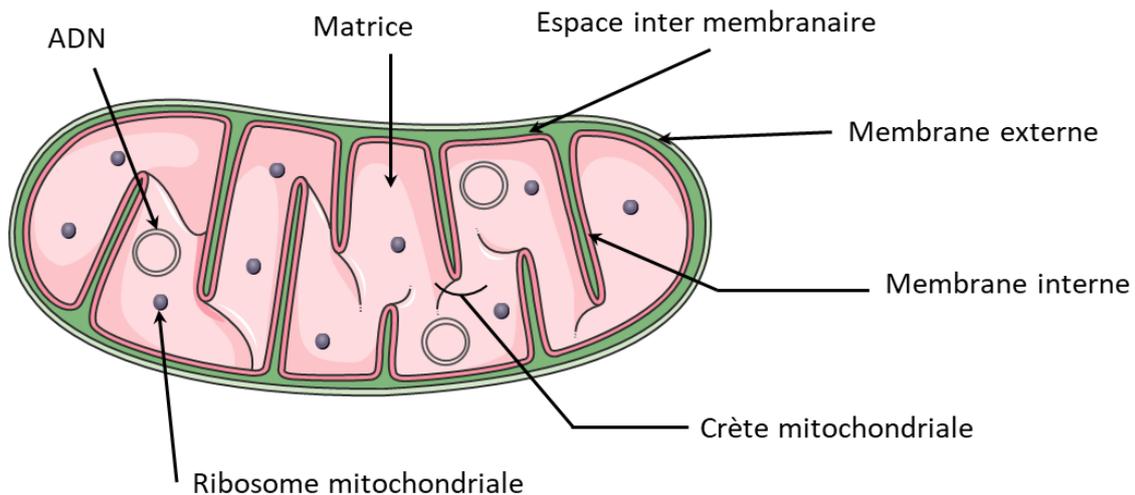


Figure 32 : Structure de la mitochondrie. La mitochondrie est un organite cellulaire composé de deux membranes : externe et interne, d'un espace inter membranaire et d'une matrice. Cet organite est la centrale énergétique de la cellule, il va produire de l'ATP grâce la chaîne respiratoire et au cycle de Krebs. Les complexes de la chaîne respiratoire sont localisés au niveau de la membrane interne, celle-ci forme des crêtes. Dans la matrice mitochondriale on retrouve de nombreuses protéines qui servent notamment au cycle de Krebs, des ribosomes mitochondriaux et de l'ADN mitochondrial circulaire.

Les premières descriptions de ces organites ont été réalisées en 1890 par Richard Altmann. Il a observé l'existence de granules à l'intérieur des cellules colorées à l'osmium et les a appelées "bioplastes". Il les décrit comme des "organismes élémentaires" dotés d'une autonomie en termes de métabolisme et de génétique. Le nom de mitochondrie n'est apparu que plus tard, en 1898, lorsque Carl Benda l'a nommé à partir du grec "mitos" (fil) et "chondros" (granule).

Les cellules eucaryotes contrairement aux procaryotes se définissent essentiellement par l'existence d'un noyau structuré et la présence d'organites dans le cytoplasme, comme les mitochondries. Les mitochondries et les cellules procaryotes présentent de nombreuses similitudes comme par l'exemple la composition de leurs membranes. En effet, la membrane interne de la mitochondrie et la membrane des procaryotes partagent un phospholipide essentiel à l'organisation de ces membranes : la cardiolipine²⁸⁰. De plus, l'information génétique est stockée sous forme d'ADN circulaire chez les procaryotes comme chez les mitochondries²⁸¹. Ces similitudes ont soulevé des questions sur l'origine de la cellule eucaryote. Auparavant, on considérait que les cellules eucaryotes descendaient d'une lignée

ancestrale qui s'était progressivement complexifiée à la suite de nombreuses mutations. Or, en 1918, Paul Poirier parle de symbiotes : "Ces organites ne seraient pour moi que des bactéries symbiotiques, ce que j'appelle des symbiotes". Quelques années plus tard, en 1967, la théorie endosymbiotique fut développée par Margulis : "Au cours de l'évolution de la mitose, les plastes photosynthétiques (eux-mêmes dérivés de procaryotes) ont été acquis symbiotiquement par certains de ces protozoaires pour former les algues eucaryotes et les plantes vertes"²⁸². En 1998, Martin et Müller ont proposé « l'hypothèse de l'hydrogène pour le premier eucaryote ». Cette hypothèse suggère la symbiose mutualiste entre une cellule hôte de type archéen et une alpha protéobactérie. En effet, la cellule hôte pourrait vivre de l'hydrogène présent dans le milieu et produirait du méthane dans les résidus métaboliques, alors que le symbiote, l'alpha protéobactérie, serait un organisme aérobic facultatif qui pourrait soit effectuer la fermentation produisant de l'hydrogène comme déchet, soit respirer en présence d'oxygène²⁸³. L'hôte et le symbiote bénéficient alors tous deux de cette association.

Après plusieurs études confirmant l'origine procaryote des mitochondries²⁸⁴, on peut se demander quand a eu lieu l'évolution de l'endosymbiose de la cellule eucaryote. Plusieurs théories sur l'apparition des mitochondries pourraient expliquer la formation des cellules eucaryotes. Le premier modèle (mito-tardif) propose que les mitochondries soient apparues alors que la cellule avait déjà acquis une certaine complexité. Un second modèle (mito-précoce) suggère que les mitochondries sont apparues avant la complexification de la cellule, et ce serait précisément l'acquisition de cet organite qui aurait permis à la cellule de se complexifier.

Que les mitochondries soient arrivées tôt ou tard, on peut penser que leur apparition a entraîné un certain nombre de changements au sein de l'hôte, changements qui ont permis son évolution vers les cellules eucaryotes que nous connaissons aujourd'hui. En effet, l'évolution du système endomembranaire fait partie des grands changements apportés par l'endosymbiose d'une archée et d'une alpha protéobactérie. Certains biologistes pensent que les mitochondries au sein des archées ont exercé une pression qui a permis la mise en place du système endomembranaire, notamment par la sécrétion de vésicules²⁸⁵.

Les mitochondries sont composées d'un génome circulaire de 16,6kb²⁸⁰. Contrairement à l'ADN nucléaire, l'ADNmt n'est pas associé aux protéines histones et est présent en une ou plusieurs copies par organite. Ce génome code pour 13 protéines nécessaires à la phosphorylation oxydative (OXPHOS), les ARNr 12S et 16S et 22 ARNt²⁸⁶ (Figure 33).

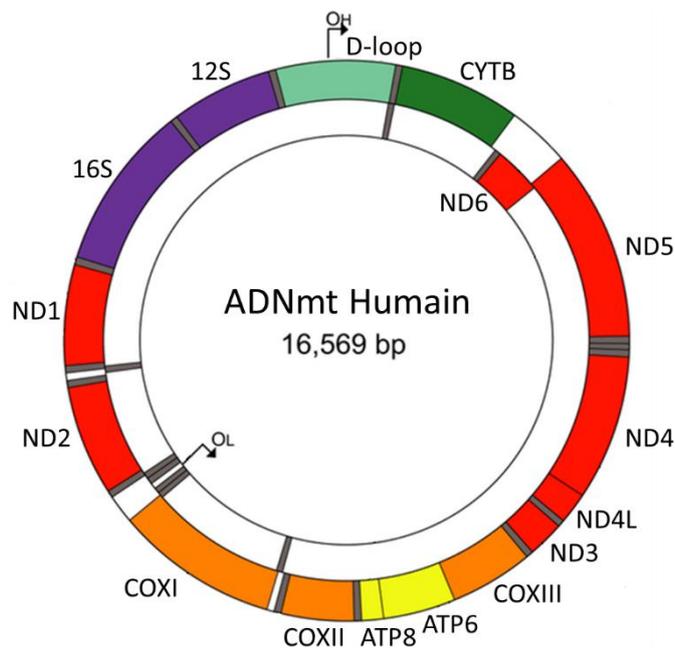


Figure 33 : Représentation schématique de l'ADNmt Humain. L'ADNmt est composé de deux brins, le brin lourd (brin H) et le brin léger (brin L). Neuf gènes sont codés par le brin léger alors que vingt-huit sont codés par le brin lourd. La région en vert clair représente la D-loop la région régulatrice de l'ADNmt ; le vert foncé correspond au gène codant pour le complexe III de la chaîne respiratoire ; les gènes en rouge codent pour le complexe I de la chaîne respiratoire ; les gènes en jaunes pour le complexe IV de la chaîne respiratoire ; en violet on retrouve la séquence des ARN ribosomiques et en gris la séquence des ARN de transfert. (Schéma adapté)²⁸⁷

Grâce à la conservation de la structure primaire des différentes sous-unités d'ARNr, il a été possible d'élaborer le premier arbre phylogénétique entre les mitochondries et les protéobactéries²⁸⁸⁻²⁹⁰, ce qui a permis d'identifier les alpha protéobactéries comme proches des mitochondries²⁹¹. En comparant ce génome avec celui des alpha protéobactéries, bien qu'homologues, une grande partie du génome mitochondrial a été perdue par rapport aux alpha protéobactéries ancestrales^{292,293}. La perte de ces gènes pourrait s'expliquer par l'élimination de gènes non essentiels au bon fonctionnement de ce micro-organisme dans son nouvel environnement. Si des gènes ayant la même utilité se trouvent dans le noyau, on peut penser que ceux qui se trouvent dans les mitochondries ont été perdus pour éviter une redondance énergétique coûteuse²⁹²⁻²⁹⁵. Ceci pourrait également s'expliquer par un transfert de gènes du génome mitochondrial vers le génome nucléaire²⁹⁶⁻²⁹⁸. Enfin, certaines études suggèrent une suppression des gènes redondants et non essentiels par des mutations aléatoires²⁹⁹. En outre, les mitochondries jouent également un rôle dans le mécanisme de mort cellulaire programmée, l'apoptose. L'apoptose est un mécanisme essentiel de l'homéostasie³⁰⁰, les signaux apoptotiques extracellulaires (Récepteurs de mort) ou intracellulaires (dommages de l'ADN, un stress au niveau du réticulum endoplasmique (RE) ou du stress oxydatif) conduisent à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et à la libération du cytochrome C, qui active les caspases. Cette activation mène à la condensation de la chromatine, à la fragmentation du noyau et, finalement, les cellules fragmentées sont éliminées par les macrophages sans induction d'inflammation. Le macrophage ou les phagocytes professionnels vont rencontrer des cellules-cibles potentielles, en interagissant avec elles via leurs protéines CD31 respectives, la cellule phagocyte va recevoir soit un signal de répulsion si la cellule est viable, soit des signaux de

phagocytose si la cellule est en apoptose ³⁰¹ (Figure 34). Kroemer a été le premier à proposer que l'apoptose a évolué au cours de la domestication des mitochondries ancestrales avec les cellules hôtes ancestrales comme un mécanisme de défense contre la cellule hôte ³⁰². Une étude plus récente, s'intéressant à la reconstruction de la machinerie apoptotique au niveau des mitochondries ancestrales, a montré que l'établissement de l'apoptose est le résultat d'une coévolution entre les mitochondries ancestrales et l'hôte. Au cours de l'évolution, la mitochondrie ancestrale et l'hôte ont chacun mis en place des armes pour éliminer l'autre. C'est la coévolution de ces deux organismes qui a permis de créer le mécanisme de mort cellulaire programmée tel que nous le connaissons aujourd'hui ³⁰³.

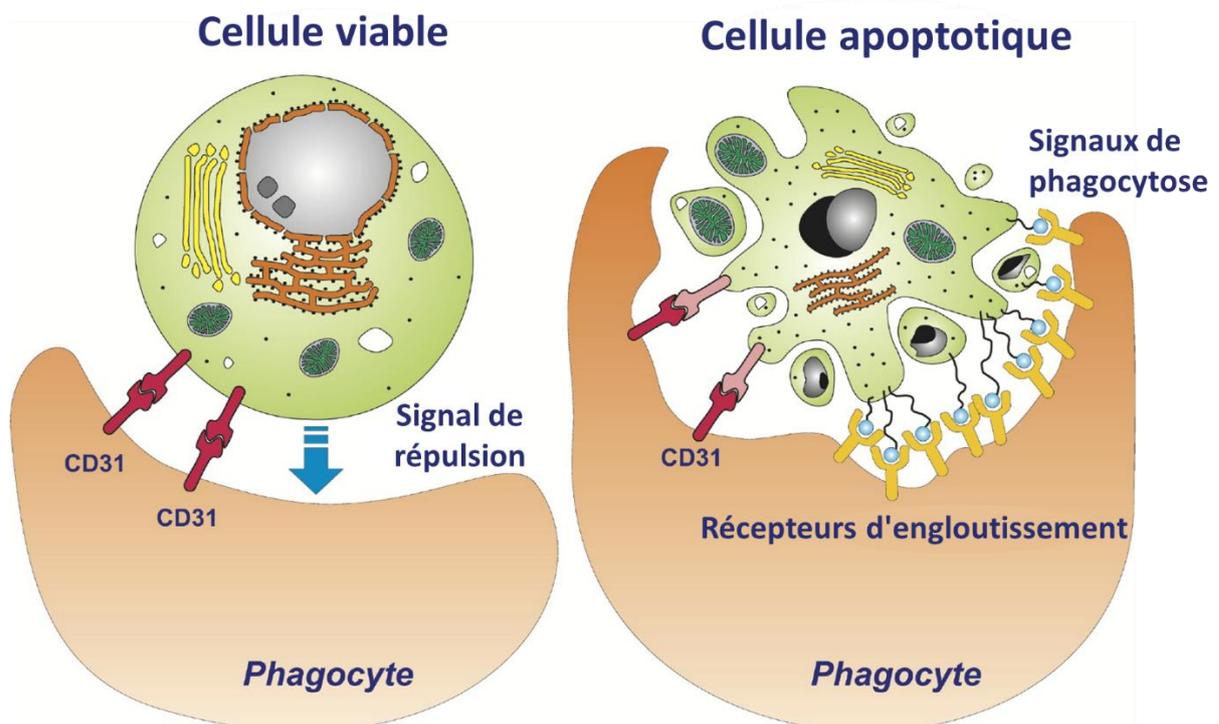


Figure 34 : Les différents signaux en jeu dans la phagocytose d'une cellule apoptotique. Lors de la rencontre entre une cellule viable et un phagocyte un signal de répulsion est mis en place grâce à l'interaction des protéines CD31. Lorsque le phagocyte rencontre une cellule apoptotique, les protéines CD31 de la cellule apoptotique vont être modifiées entraînant un signal de phagocytose. De plus les corps apoptotiques vont être reconnus par des récepteurs d'englobement, ce qui est là aussi un signal de phagocytose. (Schéma adapté) ³⁰¹

Le système OXPHOS est également un indicateur de la coévolution entre les mitochondries ancestrales et la cellule hôte, puisque nous avons constaté une réduction du génome mitochondrial ancestral dans la cellule hôte. En effet, les protéines de la phosphorylation oxydative, qui est un mécanisme essentiel de cet organelle, sont codées à la fois par des gènes présents dans l'ADNmt et dans le génome nucléaire ³⁰⁴. Sachant que le mécanisme de la phosphorylation oxydative est un mécanisme hérité des mitochondries ancestrales, cela prouve que lors de la domestication des mitochondries par la cellule, des échanges de gènes ont été effectués pour favoriser la survie des deux symbiotes. De plus, la coévolution entre les mitochondries ancestrales et l'hôte s'est faite de manière très

spécifique pour chaque espèce. En effet, les hybrides cellulaires réalisés entre un noyau humain et des mitochondries de chimpanzé ou de gorille présentent une diminution de 20% de la respiration cellulaire endogène ^{305,306}. La chaîne respiratoire permet de générer de l'énergie pour la cellule. Pour beaucoup, l'acquisition de ce mécanisme a été un pilier de l'évolution des cellules eucaryotes. En augmentant la production d'énergie ³⁰⁷, la cellule ancestrale a pu étendre son génome et permettre une augmentation de la complexité cellulaire ³⁰⁸. C'est pourquoi, cette augmentation d'énergie a permis à la cellule eucaryote de mettre en place plusieurs mécanismes tels que le cycle cellulaire, le trafic endomembranaire ³⁰⁸, la compartimentation du noyau ³⁰⁹ et la capacité à devenir multicellulaire.

II. Principale fonction mitochondriale

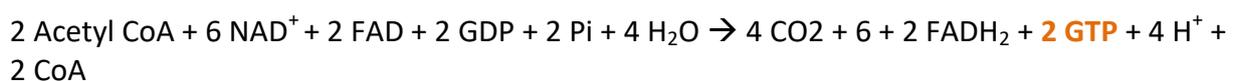
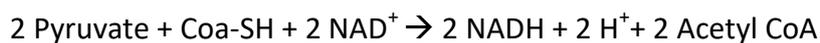
1. La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire mitochondriale correspond à une association de complexes protéiques au niveau de la membrane interne mitochondriale. Cette chaîne respiratoire de phosphorylation oxydative est un processus biologique clé qui permet la phosphorylation de l'ADP en ATP par l'ATP synthase grâce à l'énergie libérée par l'oxydation des donneurs d'électrons (le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) et La flavine adénine dinucléotide (FADH₂)) à travers la chaîne respiratoire ³¹⁰. L'OXPPOS est la plus grande productrice d'ATP dans les cellules, en effet OXPPOS produit 32 molécules ATP alors que la glycolyse et le cycle de Krebs n'en produisent que 2 chacune (Figure 35).

Bilan de la glycolyse :



Bilan du cycle de Krebs :



Bilan de la phosphorylation oxydative :



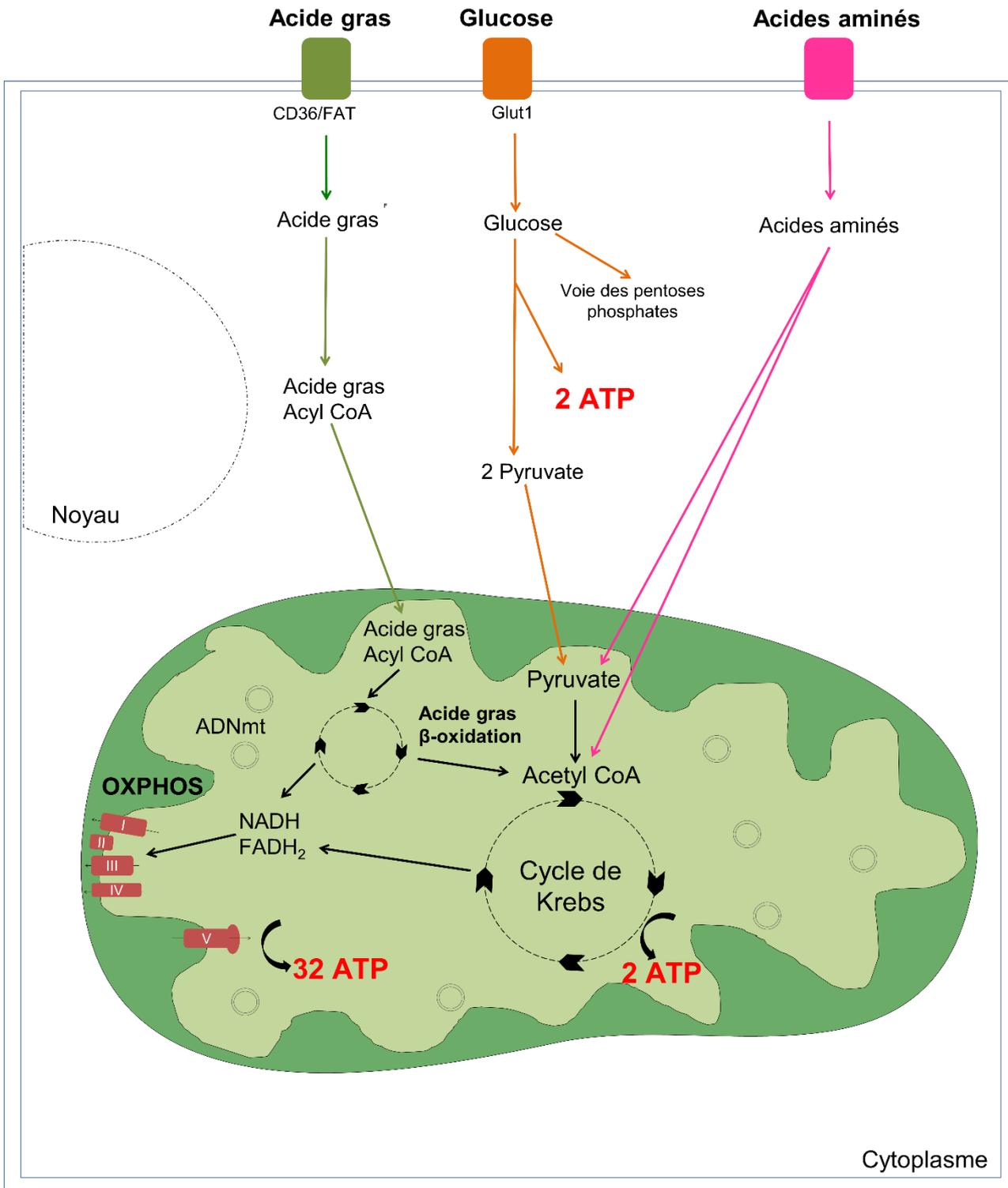


Figure 35 : Les différentes voies métaboliques produisant de l'ATP.

Les deux donneurs d'électrons NADH et FADH₂ proviennent du cycle de Krebs (cycle TCA ou cycle de l'acide tricarboxylique) et de la β -oxydation des acides gras (hélice de Lypen).

Le premier métabolite intermédiaire du cycle de Krebs est l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), un métabolite dérivé de la dégradation du glucose, des acides gras et des acides aminés. Ce métabolisme est ensuite combiné à l'oxaloacétate pour générer du citrate. Le citrate est converti en isocitrate, qui est, à son tour, converti par deux décarboxylations oxydatives en α -cétooglutarate et succinyl-CoA. Cette réaction génère du CO₂ et deux molécules de NADH. Le NADH généré à ce stade transfère des électrons principalement au complexe I de la chaîne respiratoire. Après la conversion du succinyl-CoA en succinate, l'oxydation du succinate génère du fumarate et le donneur d'électrons FADH₂, qui donnera ses électrons au complexe II. Le fumarate est, dans un deuxième temps, converti en malate puis en oxaloacétate et le cycle recommence³¹¹ (Figure 36).

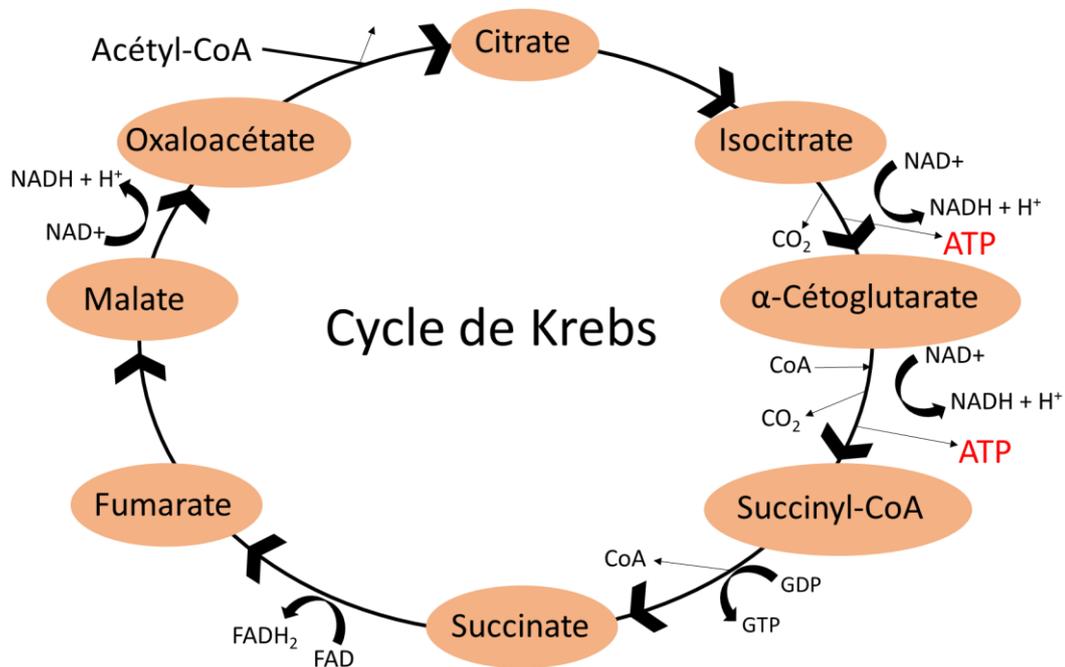


Figure 36 : Schéma générale du cycle de Krebs.

La β -oxydation des acides gras ou hélice de Lypen consiste en quatre réactions biochimiques. Les acides gras vont être transformés en acyl-Coa puis être transportés au niveau de la matrice mitochondriale. La première réaction biochimique de ce cycle est la déshydrogénation de l'acyl-Coa en trans- Δ^2 -énoyl-CoA avec production de FADH₂ par l'acyl-Coa déshydrogénase. La deuxième réaction est l'hydratation de la trans- Δ^2 -énoyl-CoA en L- β -hydroxyacyl-CoA par enzyme Énoyl-CoA hydratase. La troisième réaction est la formation de β -cétoacyl-CoA à partir de L- β -hydroxyacyl-CoA et de NADH + H⁺ par la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. La quatrième réaction est la tiolyse du β -cétoacyl-CoA en acyl-Coa et en acétyl-Coa par l'enzyme Acétyl-CoA C-acyltransférase. La molécule acyl-Coa produite va repartir dans la première réaction de ce cycle alors que l'acétyl-Coa va rejoindre le cycle de Krebs (Figure 37).

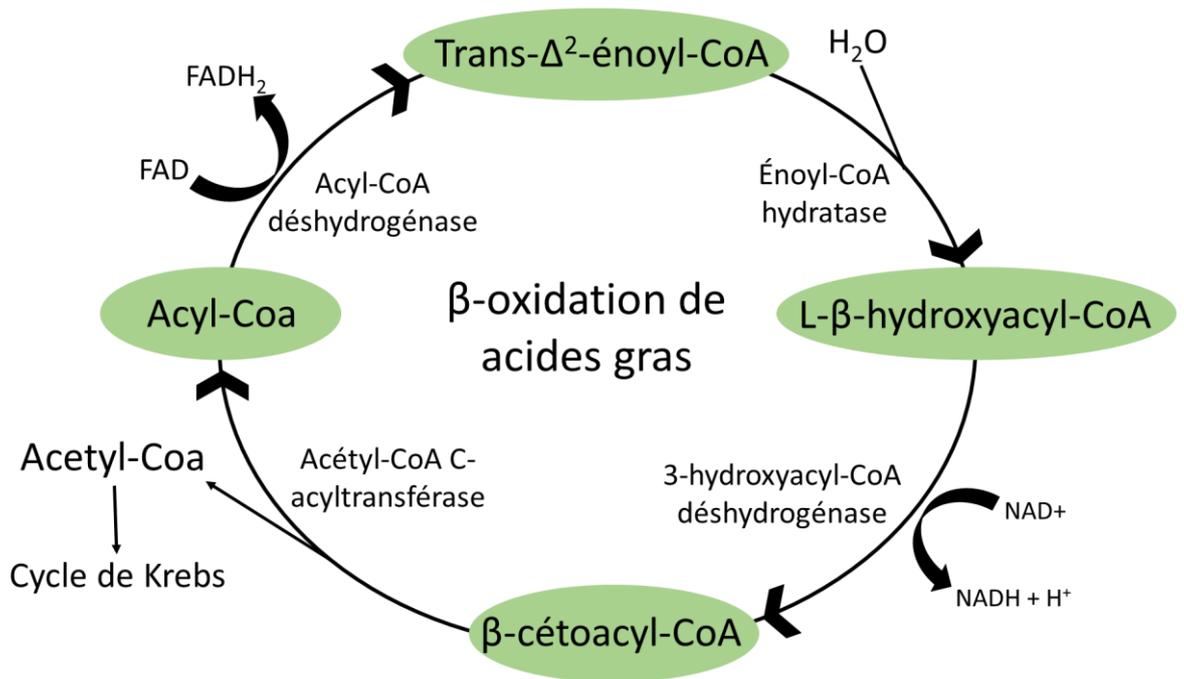


Figure 37 : Schéma générale du cycle de la β -oxydation des acides gras.

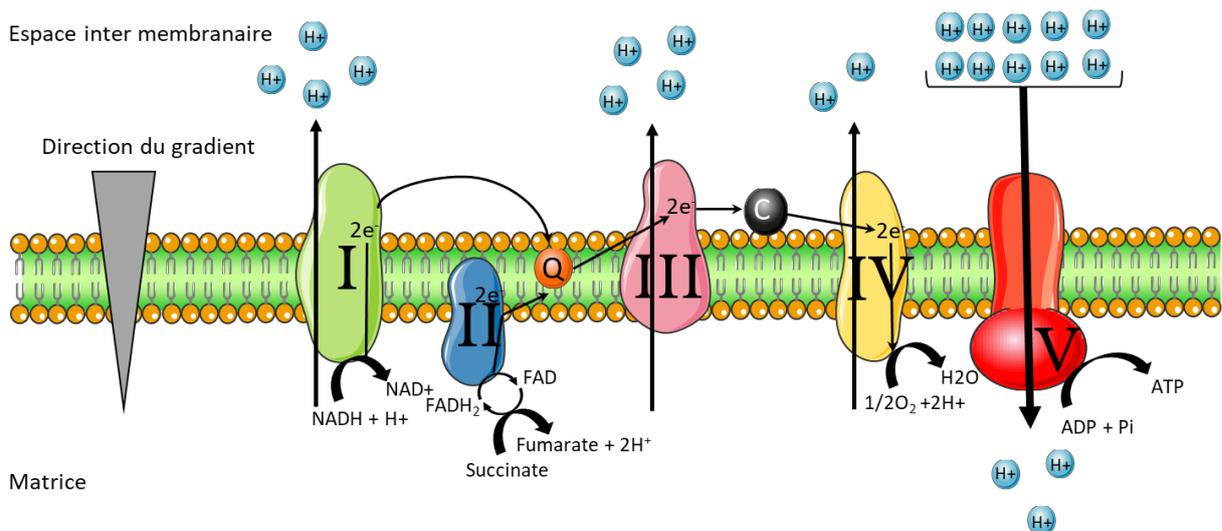


Figure 38 : Complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale.

La chaîne respiratoire OXPHOS est composée de cinq complexes et de deux coenzymes (Figure 38). La chaîne respiratoire mitochondriale est située au niveau de la membrane interne des mitochondries. Composée de quatre complexes et de deux coenzymes, elle permet la production d'ATP par phosphorylation oxydative. Les complexes I (NADH : coenzyme Q oxydoréductase) et II (succinate déshydrogénase) transfèrent chacun deux électrons à la quinone coenzyme Q10 (CoQ10). Les deux électrons transférés par le complexe I proviennent de l'oxydation du NADH, et ceux du complexe II de l'oxydation du succinate en fumarate. La CoQ10 permet le transfert des électrons vers le complexe III (oxydoréductase CoQ10-cytochrome C). Le complexe III transmet ensuite ces électrons au cytochrome C, qui fait le lien avec le complexe IV (cytochrome C oxydase). Le complexe IV

réduit l'O₂ dans une molécule de H₂O. Les complexes I, III et IV sont des pompes à protons, qui permettent le passage des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, dans le sens inverse du gradient. Les complexes I et III permettent le passage de quatre protons et le complexe IV de deux protons. Une fois l'espace intermembranaire enrichi en protons, le dernier complexe de la chaîne, l'ATP synthase, va permettre le passage des protons dans le sens du gradient. Ce flux de protons permettra la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP.

- Le complexe I est une NADH coenzyme Q oxydoréductase, composée de 45 sous-unités, dont 7 sont codées par l'ADNmt et les autres par l'ADN nucléaire. Il y a 14 sous-unités centrales qui exécutent la fonction bioénergétique de ce complexe. En plus de ces sous-unités centrales, le complexe I peut avoir des sous-unités accessoires, mais ces sous-unités ne sont pas impliquées dans la fonction bioénergétique. Leur fonction n'est pas bien connue, cependant elles pourraient améliorer le transport des électrons³¹². Le complexe I permet l'oxydation du NADH par la quinone coenzyme Q10 (CoQ10), libérant deux électrons au profit du complexe III et pompant quatre protons (H⁺) de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire (Figure 39).

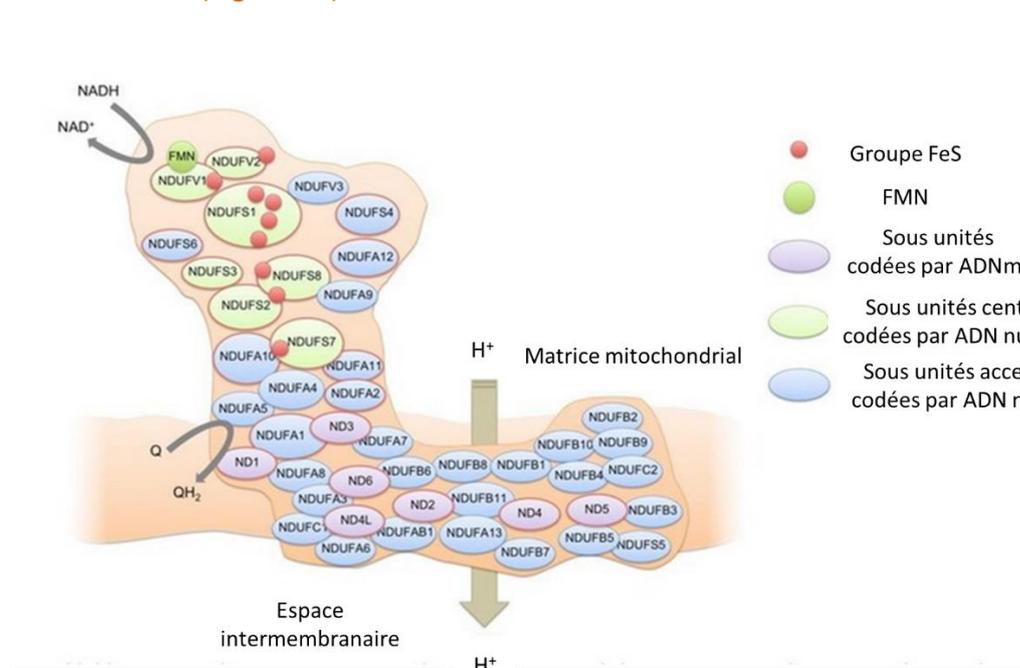


Figure 39 : Représentation schématique du complexe I avec la répartition de ses sous-unités. Les groupes fer-souffre (FE-S) sont impliqués dans le transport d'électron. FMN : Flavin Mononucléotide. (Schéma Adapté)³¹³

- Le complexe II est exclusivement codé par l'ADN nucléaire et possède quatre sous-unités avec un mécanisme d'action succinate coenzyme Q réductase. Son rôle principal dans l'OXPPOS est de transférer les électrons de l'oxydation du succinate au fumarate venant du cycle de Krebs vers la CoQ10. Cette réaction d'oxydoréduction

étant de faible énergie, le complexe II ne contribue pas au gradient de H^+ dans les mitochondries (Figure 40).

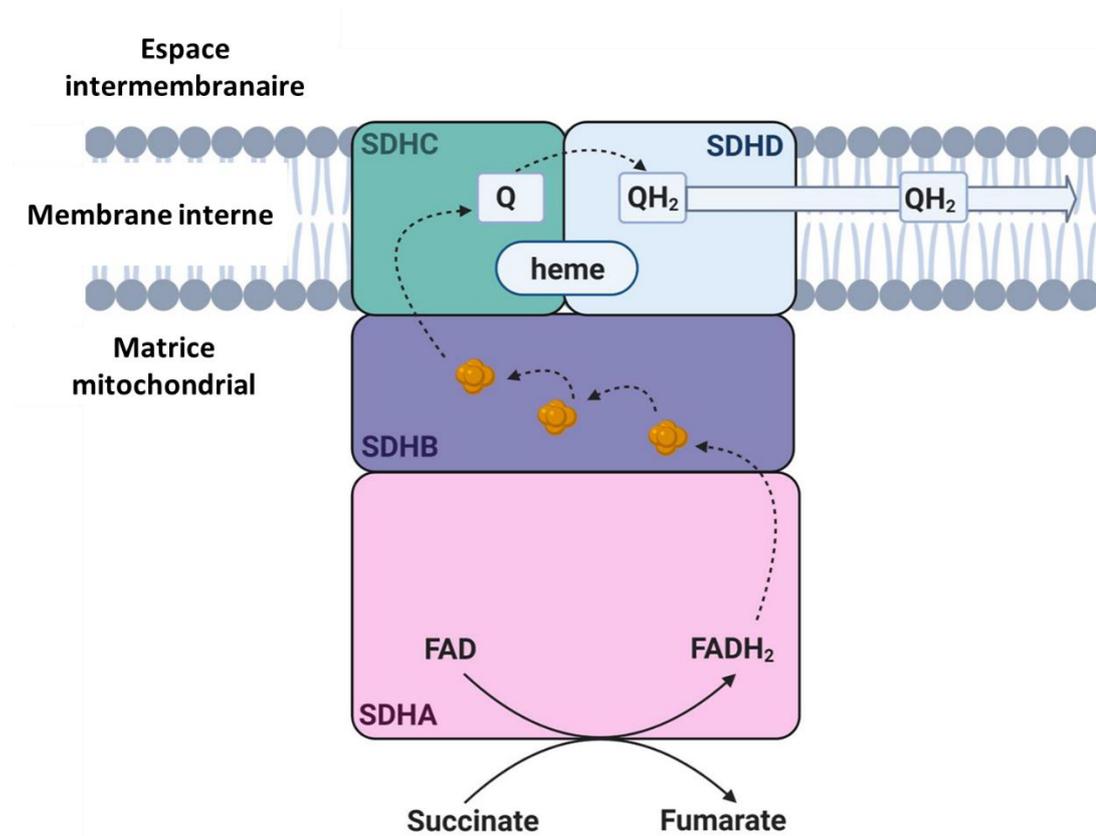


Figure 40 : Représentation schématique du complexe II. La sous-unité SDHA oxyde le succinate en fumarate et permet la réduction du FAD en FADH₂. Les électrons vont passer à la sous-unité SDHB grâce au groupe FE-S (en orange) jusqu'à la sous-unité SDHC où les électrons vont réduire l'ubiquinone (Q) en ubiquinol (QH₂). L'ubiquinol va traverser la sous-unité SDHD afin de transmettre les électrons jusqu'au complexe III. (Schéma adapté)³¹⁴

- Le complexe III est une oxydoréductase CoQ10-cytochrome C composée de 10 sous-unités. Le cytochrome B, protéine centrale de ce complexe, est codé par l'ADNmt et les autres sous-unités sont codées par l'ADN nucléaire. Le passage des électrons de la CoQ10 au cytochrome C permet de pomper quatre H^+ dans l'espace intermembranaire (Figure 41). Le cytochrome C permet la transition des électrons entre les complexes III et IV.

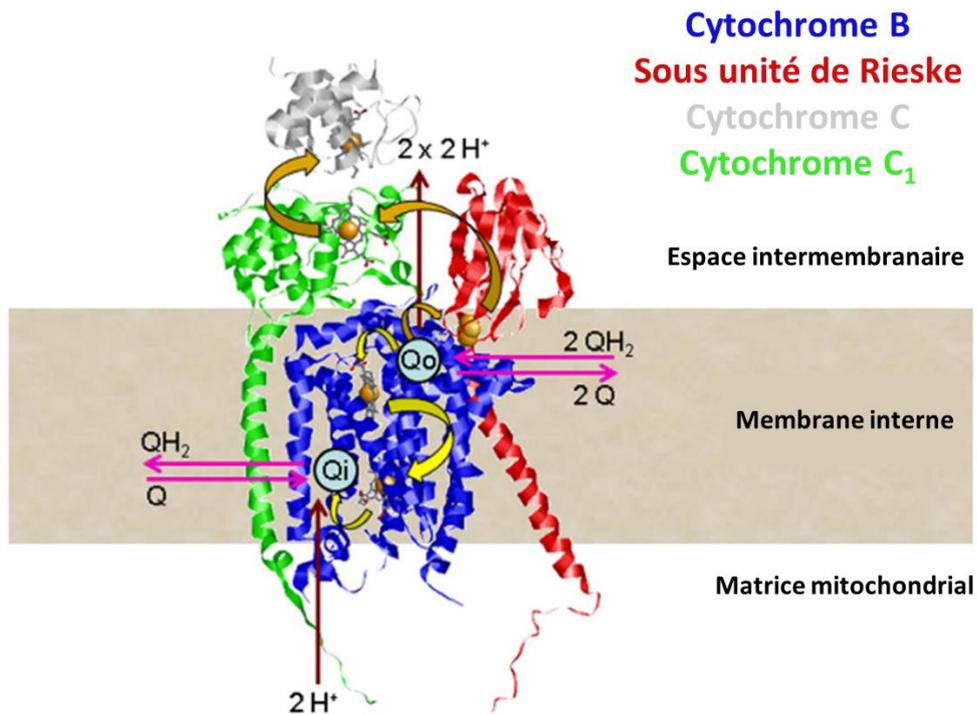


Figure 41 : Représentation schématique du complexe III. Sur les 10 sous-unités du complexe III seules 3 sont représentées, les sous-unités catalytiques le cytochrome B (bleu), la sous-unité de Rieske (rouge) et le cytochrome C₁ (vert). Le cytochrome C (gris) est également représenté en gris pour montrer le passage d'électrons. On peut voir les sites oxydation (Qo) et de réduction (Qi) de la quinol. (Schéma adapté)³¹⁵

- Le complexe IV a une action oxydase du cytochrome C qui transporte deux protons dans le sens opposé du gradient et réduit l'O₂ dans une molécule d'H₂O. Ce complexe est composé de 20 sous-unités, dont 3 codées par l'ADNmt. Enfin, tous les protons présents dans les espaces intermembranaires passent par l'ATP synthase. La force de ce gradient de protons conduit à la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique³¹⁰ (Figure 42).

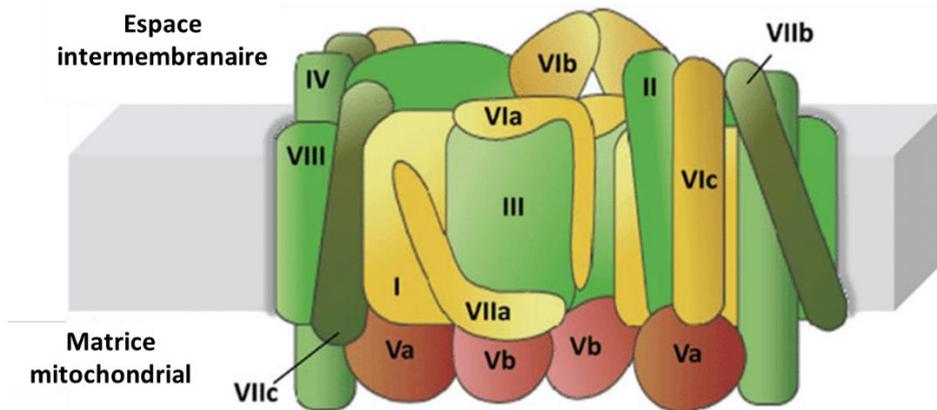


Figure 42 : Représentation schématique du complexe IV. Toutes les sous-unités représentées sont précédées de COX (cytochrome c oxidase). Les trois unités centrales COXI, COXII et COXIII sont codées par ADN mitochondrial. (Schéma adapté)³¹⁶

- L'ATP synthase est composée de 29 sous-unités, qui peuvent être séparées en deux régions fonctionnelles : F₀ et F₁. F₀ se trouve dans la membrane interne de la mitochondrie et F₁ dans la matrice mitochondriale. Dans tous les principaux complexes de la chaîne respiratoire, le passage des électrons pompe les protons vers l'extérieur. Ce flux crée une énergie électrochimique à l'intérieur des mitochondries, appelée force motrice des protons³¹⁷ (Figure 43).

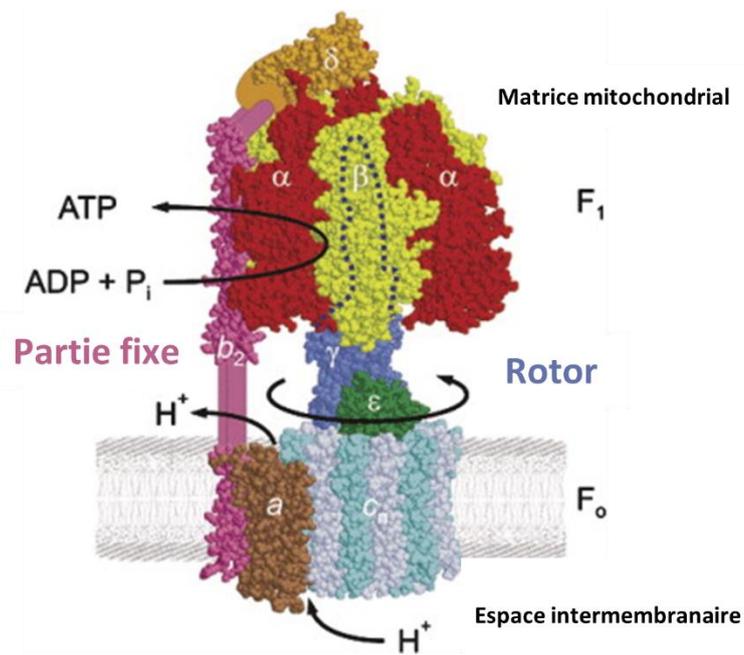


Figure 43 : Représentation de l'ATP synthase. La composante F₀ est mobile et peut tourner, alors que la composante F₁ est fixe. Les protons suivent le gradient électrochimique c'est-à-dire qu'ils vont passer de l'espace intermembranaire à la matrice mitochondriale, faisant tourner F₀. Cette rotation de F₀ va entraîner un changement de F₁ qui va permettre la production d'ATP. (Schéma adapté)³¹⁸

Les complexes mitochondriaux interagissent de manière stable les uns avec les autres dans les supercomplexes, comme le propose le "modèle de l'état solide" ³¹⁹. Deux supercomplexes différents ont été isolés à partir de cellules de cœur de bovin et de levure, en utilisant une technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide bleu natif (BN-PAGE) : I1III2IV4 et III2IV4. L'association des complexes I, III et IV est appelée "respirasome" ^{320,321} (Figure 44).

Afin d'étudier le passage direct des électrons entre les complexes, le coefficient de contrôle du flux métabolique a été calculé ³²² et une association entre les complexes I et III a été observée, alors que le complexe IV semble être distribué de manière aléatoire. De plus, les auteurs n'ont pas identifié de canal direct d'électrons entre le complexe II et les complexes III et IV ³²³. Chez les mammifères, les supercomplexes sont le plus souvent composés des complexes I, III et IV, sous la forme I + III₂ + IV₁₋₄ et I + III₂. Il a été montré qu'il existe une augmentation de ces complexes dans les muscles squelettiques humains pendant l'effort, montrant ainsi que ces super complexes sont codés en fonction de la demande énergétique ³²⁴.

Un autre argument en faveur des modèles à l'état solide est que la stabilité des supercomplexes dépend des complexes qui les constituent. En effet, une mutation dans le site d'assemblage du complexe III conduit à une déficience du complexe III ainsi que du supercomplexe I + III et à une réduction de la quantité de complexe I ³²⁵. Le complexe IV est également nécessaire à l'assemblage ou à la stabilité du complexe I ³²⁶.

L'organisation des crêtes mitochondriales participe également à la stabilité des supercomplexes. Les crêtes mitochondriales doivent leur organisation au mitochondrial contact site and cristae organizing system (MICOS), ce complexe se trouvant à la base des crêtes ³²⁷⁻³²⁹. La sous-unité MIC10 du complexe MICOS est particulièrement importante dans la formation de ces crêtes ^{330,331}. L'ATP synthase joue également un rôle important dans la stabilisation de ces crêtes, étant organisée en dimères au sommet des crêtes ^{332,333}. Les autres complexes respiratoires semblent se situer au niveau des surfaces planes des crêtes ^{334,335}.

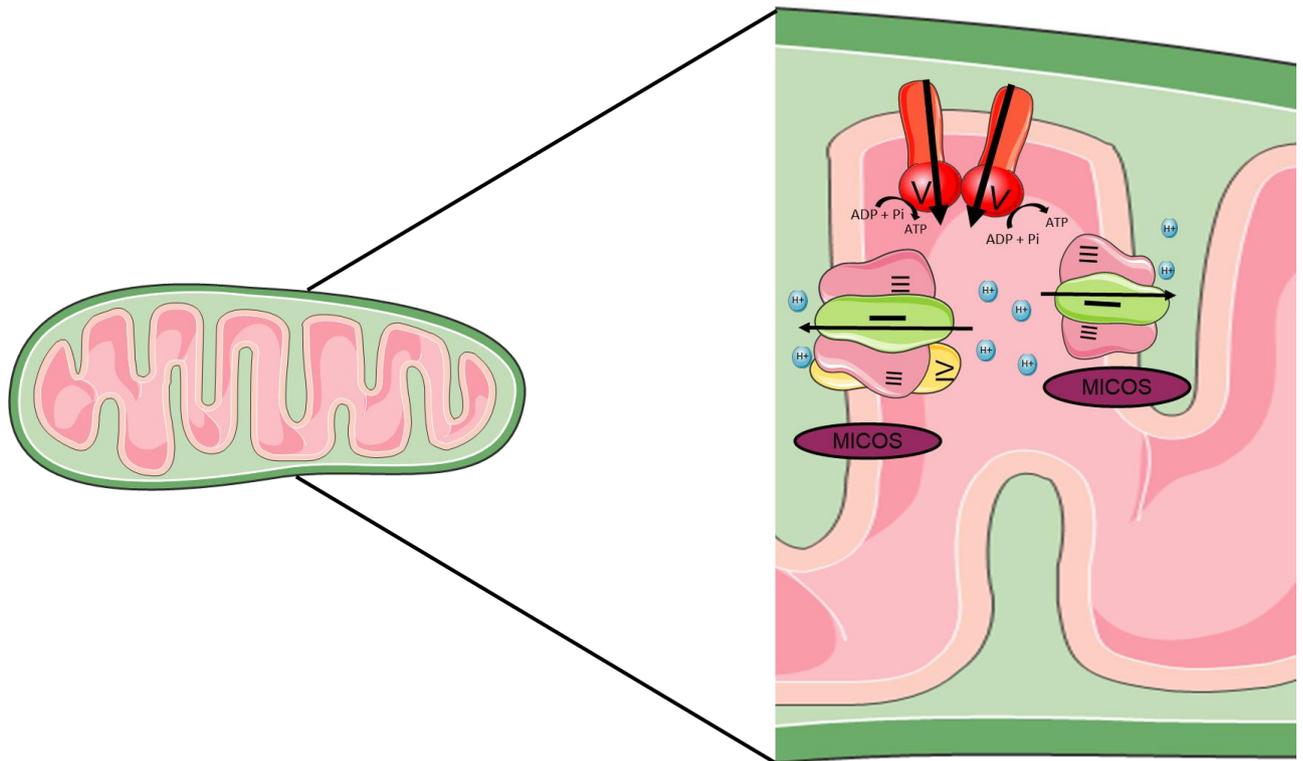


Figure 44 : Structure des supercomplexes mitochondriaux. La structure des crêtes mitochondriales est très importante dans le fonctionnement des mitochondries, en particulier dans la stabilité du supercomplexe. En effet, plusieurs protéines sont impliquées dans la stabilité de ces crêtes, entre l'ATP synthase située en haut et les sites de contact mitochondrial et systèmes d'organisation des cristaux (MICOS) situés en bas, se trouvent les supercomplexes. Les deux principaux supercomplexes présents chez les mammifères, I + III2 + IV1-4 et I + III2 sont représentés.

2. La dynamique mitochondriale

Les mitochondries forment un réseau d'organites dynamiques essentiels au bon fonctionnement de la cellule. Le réseau mitochondrial possède la capacité de se modifier en réponse à un stimulus, les mitochondries vont pouvoir fusionner, ou fissionner en fonction des besoins cellulaires. De plus les mécanismes de fusion et de fission mitochondriales permettent de maintenir des mitochondries fonctionnelles lorsque les cellules subissent un stress métabolique ou environnemental (Figure 45).

2.1. La fusion

La fusion est un mécanisme qui permet le rallongement du réseau mitochondrial. La fusion entre les membranes externes des mitochondries est médiée par des membres de la famille des dynamines ancrés dans la membrane, appelés mitofusines MFN1 et MFN2, alors que la fusion entre les membranes internes des mitochondries est médiée par un seul membre de la famille des dynamines, appelé optic atrophy 1 (OPA1) chez les mammifères.

La protéine OPA1 est codée par un transcrite qui subit un épissage alternatif et qui génère huit formes d'épissage. A partir de ces huit formes d'épissage, les protéases Yme1L et OMA1 vont venir les cliver afin de générer des isoformes OPA1 longues et courtes,

essentielles à la fusion de la membrane interne ³³⁶. De plus le remodelage des crêtes par l'ablation d'OPA1 conduirait à une perturbation de la formation des super complexes et à une diminution de la respiration ³³⁷.

2.2. La fission

La fission est un processus nécessaire à la création de nouvelles mitochondries, elle permet à une mitochondrie de se diviser pour donner deux mitochondries distinctes. Ces processus sont également utilisés pour séparer des sections endommagées et permettre l'élimination de celles-ci par mitophagie.

La mitochondrie qui va subir une fission s'installe au niveau de la membrane du RE. Le premier acteur de cette fission va être la formine Inverted Formin 2 (INF2), protéine qui permet la polymérisation des filaments d'actine. Ces filaments d'actine vont se polymériser entre le RE et la mitochondrie pour bien les ancrées l'un à l'autre et permettre une première constriction ³³⁸. Une fois la constriction terminée, un flux de calcium venant du RE va être importé dans la mitochondrie, ces deux stimulus vont permettre la division de la membrane interne ³³⁹. Ensuite, la fission de la membrane externe est médiée par la protéine DRP1, une GTPase, qui va former des spirales autour des mitochondries qui se resserrent, l'hydrolyse du GTP va permettre un changement de conformation de cette protéine entraînant la deuxième constriction qui va permettre de couper la membrane externe ³⁴⁰. Plusieurs protéines vont être nécessaires pour le recrutement de la protéine dynamine 1 (DRP1) depuis le cytosol comme la formine INF2 ou l'actine ^{339,341,342}, et les protéines à la membrane externe de la mitochondrie comme la protéine de fission mitochondriale 1 (FIS1), le facteur de fission mitochondriale (Mff) et les protéines de la dynamique mitochondriale de 49 et 51 kDa (MiD49 et MiD51) ³⁴³ (Figure 46).

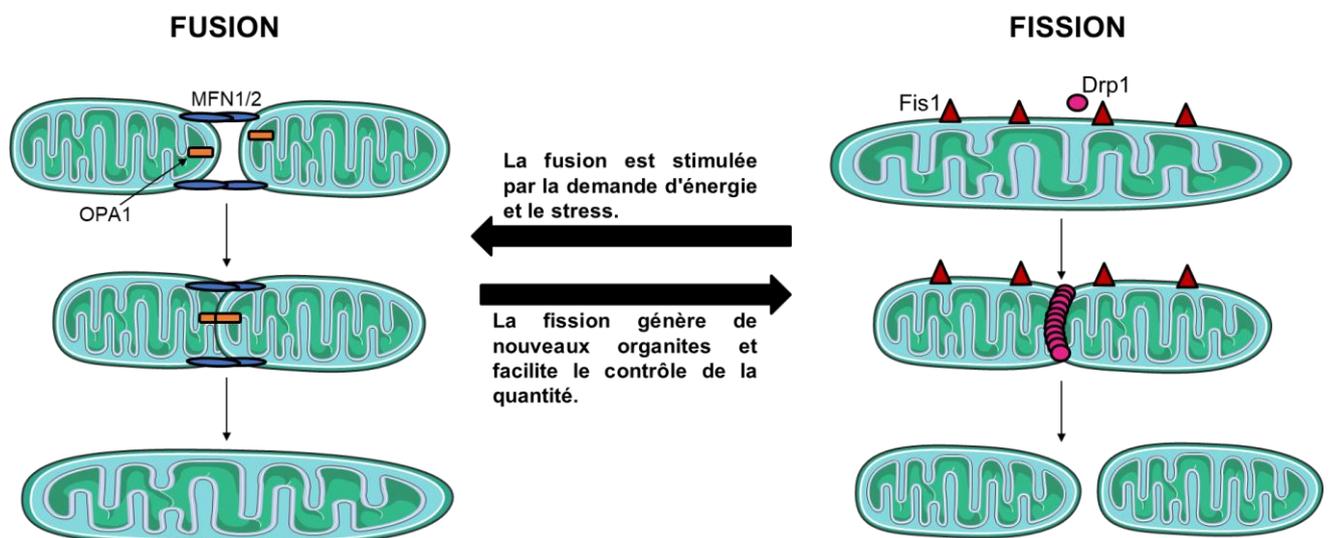


Figure 45 : Mécanismes de fusion et de fission. Les mécanismes de fusion et de fission jouent un rôle important dans la régulation de la morphologie et de la fonction des mitochondries. La fission est médiée par DRP1, une GTPase qui est recrutée dans le cytosol par FIS1 pour former des spirales autour des mitochondries qui resserrent les membranes

internes et externes. La fusion entre les membranes externes des mitochondries est médiée par MFN1 et MFN2, tandis que la fusion entre les membranes internes des mitochondries est médiée par OPA1.

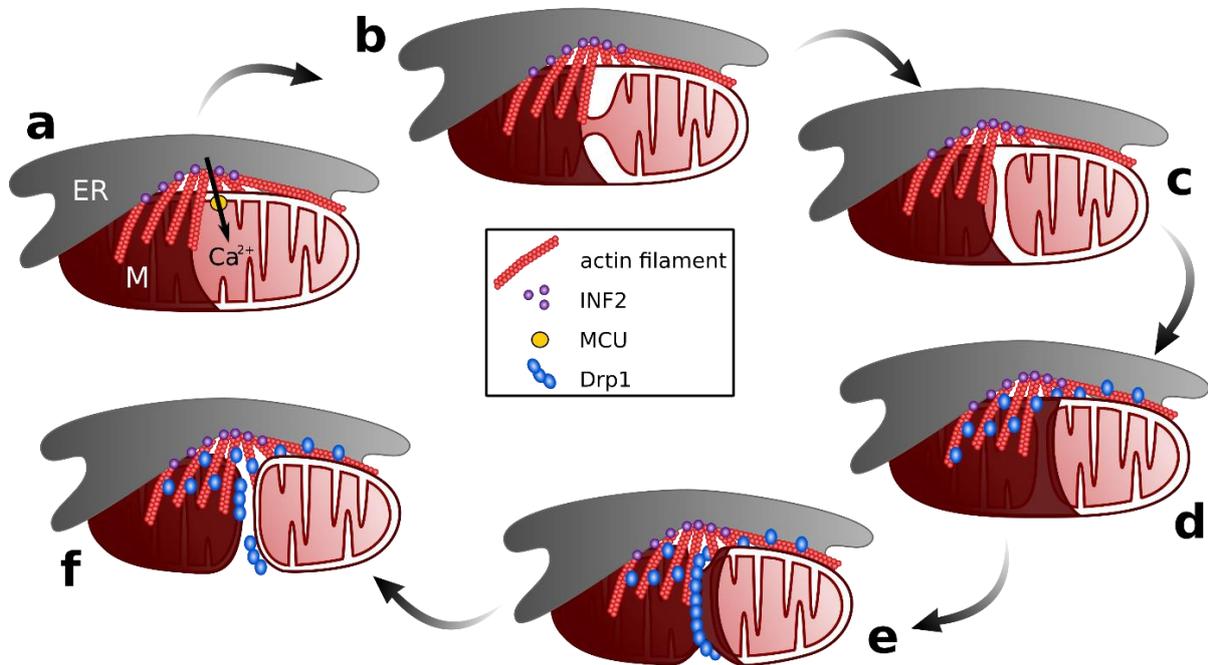


Figure 46 : Mécanisme de fission mitochondriale. a. Les protéines INF2 au niveau du RE vont venir polymériser l'actine dans le but de bien ancrer le RE à la mitochondrie, permettant le passage du flux de Ca^{2+} du RE à la mitochondrie en utilisant des transporteurs de calcium mitochondrial (MCU). b-c. Ce signal calcique ainsi que la constriction de la mitochondrie par l'actine vont permettre à la membrane interne de se diviser. d-e-f. Plusieurs protéines comme FIS1, Mff, MiD49 et MiD51 vont venir recruter la protéine DRP1. Cette protéine va alors former des spirales autour de la membrane externe et la ressermer jusqu'à la division complète de celle-ci³⁴⁴.

3. Mitophagie

La mitophagie est une forme spécifique d'autophagie, c'est un mécanisme essentiel dans l'homéostasie du réseau mitochondrial car elle permet l'élimination des mitochondries défectueuses ou sénescence. Deux protéines sont connues pour initier ce processus : PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) et Parkin^{345,346}. Dans des conditions non dysfonctionnelles, la protéine PINK1, située à la membrane mitochondriale externe, est dégradée par deux protéases, les matrix processing peptidases (MPP) et les presenilin-associated rhomboid like (PARL). Cependant, les infections ou les processus inflammatoires peuvent favoriser la dépolarisation de la membrane mitochondriale, un processus connu pour inhiber le clivage de PINK1, ce qui conduit à l'accumulation de PINK1 au niveau de la membrane mitochondriale. La membrane riche en PINK1, favorise l'activation de Parkin ; en effet PINK1 va venir phosphoryler en SER65 dans le domaine ubiquitine-like (UBL) de Parkin ce qui va l'activer. Parkin une fois activée, va ubiquitiner ces substrats dans les mitochondries³⁴⁶. Il y a plusieurs substrats liés à Parkin tel que le canal anionique dépendant du voltage-1 (VDAC1), MFN 1 et MFN 2 et Miro 1^{347,348}. En outre, PINK1 phosphoryle

également les monomères d'ubiquitine au niveau du SER65 dans le cytosol ³⁴⁹⁻³⁵¹, ce qui favorise la formation de chaînes d'ubiquitine qui assureront l'ubiquitination des protéines mitochondriales. Les protéines mitochondriales qui ont été ubiquitinées se lient aux récepteurs de l'autophagie tels que l'optineurine et le NDP52 recrutés par PINK1 ³⁵², qui se lient à la protéine associée aux microtubules 1A/1B-chaîne lumineuse 3 (LC3) liée au phagosome. Cela crée un autophagosome/mitophagosome, qui fusionne avec le lysosome pour détruire les mitochondries endommagées ³⁵³ (Figure 47). La dégradation de MFN 1 et MFN 2 à cause de la protéine Parkin, va avoir pour conséquence une fission mitochondriale et de la mitophagie ³⁴⁷.

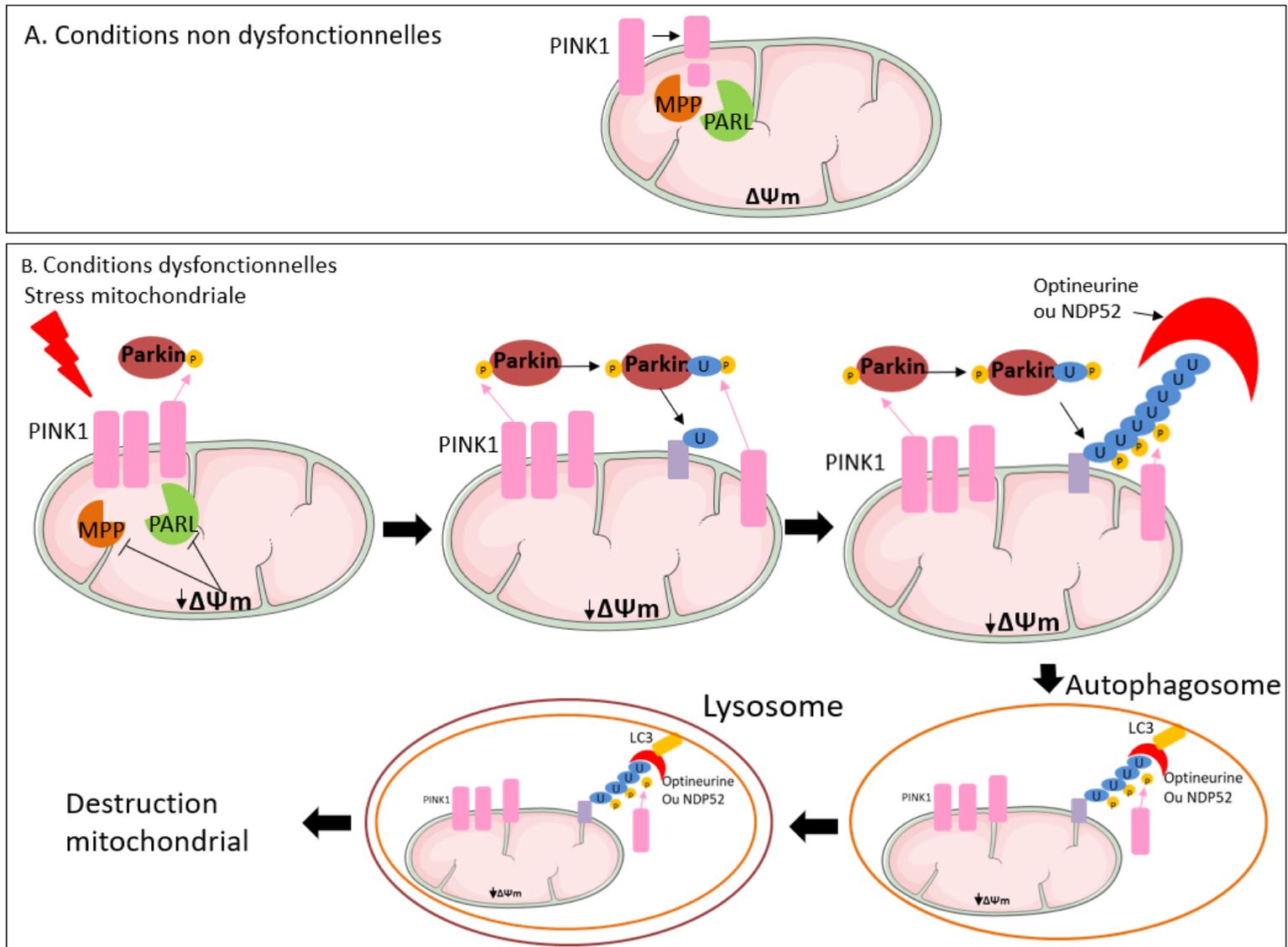


Figure 47 : Mécanisme de la Mitophagie. A. Dégradation de PINK1 par les protéines MPP et PARL dans des conditions non dysfonctionnelles. B. Dans des conditions dysfonctionnelles à cause d'un stress mitochondrial, on va retrouver une diminution du potentiel de membrane mitochondrial. Cette diminution va entraîner l'inhibition des protéines MPP et PARL, ce qui va causer une accumulation de PINK1 à la membrane mitochondriale. PINK1 va pouvoir recruter et activer par phosphorylation Parkin et Parkin une fois activée va ubiquitiner plusieurs protéines à la membrane mitochondriale. Une chaîne ubiquitine va alors se former,

phosphorylée par PINK1 et cette chaîne va être reconnue par les récepteurs d'autophagie l'optineurine et le NDP52 recrutés par PINK1. Ces récepteurs de l'autophagie vont se fixer à la protéine LC3 liée elle-même à l'autophagosome. La mitochondrie dysfonctionnelle, entourée par l'autophagosome, va alors se lier au lysosome afin de détruire la mitochondrie.

4. La régulation du Calcium

La régulation du calcium (Ca^{2+}) est un mécanisme essentiel dans de nombreux processus cellulaires tels que la contraction musculaire, la signalisation cellulaire, l'excitabilité membranaire, l'autophagie et la mort cellulaire programmée (l'apoptose) ^{354,355}. Plusieurs acteurs participent à la régulation calcique comme le RE qui est le principal réservoir de Ca^{2+} et la mitochondrie. En effet une interface dynamique nommée membrane associée aux mitochondries (MAM) va se mettre en place entre le RE et les mitochondries permettant le passage du Ca^{2+} ³⁵⁶. Dans le MAM, les récepteurs de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3Rs) et les récepteurs de la ryanodine (RyRs) situés à la membrane du RE, vont venir s'assembler au canal anionique dépendant du voltage 1 (VDAC1) qui se trouve au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, grâce à une chaperonne cytosolique Grp75. Une fois l'assemblage terminé, le Ca^{2+} va passer du RE à l'espace intermembranaire de la mitochondrie ^{354,355,357}. De même, pour passer de l'espace intermembranaire à la matrice mitochondriale, des canaux et des transporteurs spécialisés sont nécessaires pour permettre l'absorption de Ca^{2+} , on les appelle uni-transporteurs de calcium mitochondrial (MCU) ^{358,359}. Cependant afin d'éviter l'accumulation du Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale, les mitochondries sont pourvues d'échangeurs $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ et $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ qui vont pousser le Ca^{2+} vers l'espace intermembranaire ³⁶⁰ (Figure 48). Une absorption excessive de Ca^{2+} ou un manque d'absorption peuvent avoir un effet délétère sur les fonctions mitochondriales ³⁶¹.

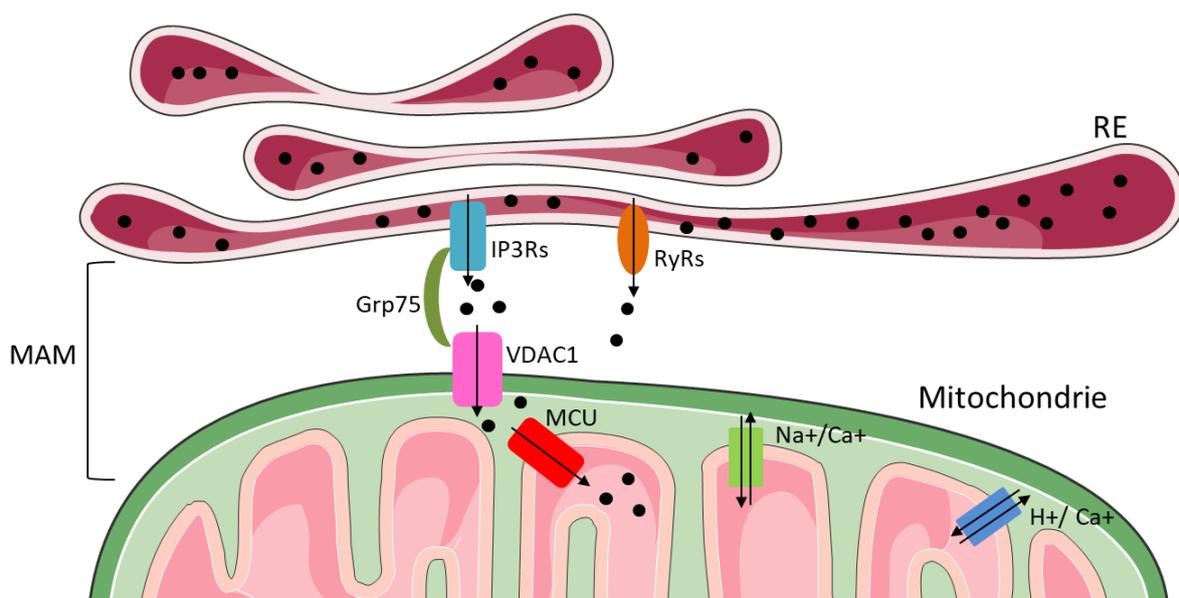


Figure 48 : La régulation du calcium intracellulaire. Le RE est le principal réservoir de calcium (Ca^{2+}) cellulaire. Pour que le calcium soit absorbé par la mitochondrie une interface dynamique nommée MAM se met en place entre les deux organelles. Deux récepteurs à la

membrane du RE, IP3Rs et RyRs vont s'assembler au canal VDAC1 à la membrane externe de la mitochondrie, grâce à une chaperonne cytosolique Grp75. Cette interface MAM permet au Ca^+ de passer du RE à l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Le Ca^+ va être conduit à la matrice mitochondriale grâce à des transporteurs nommée MCU. Afin d'éviter une surcharge de Ca^+ dans la matrice mitochondriale des échangeurs Na^+/Ca^+ et H^+/Ca^+ sont présents dans la membrane interne mitochondriale.

L'absorption du Ca^+ par la mitochondrie a également pour rôle la régulation de plusieurs fonctions mitochondriales comme la phosphorylation oxydative, la production de ROS, l'ouverture du pore de transition de la perméabilité mitochondriale (mPTP).

La présence accrue de Ca^+ mitochondrial (mCa^+) va moduler positivement plusieurs enzymes de TCA (la cétylglutarate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase et la pyruvate déshydrogénase) ce qui va permettre de stimuler la synthèse de NADH et de FADH_2 et par conséquent, d'augmenter l'OXPLOS, la production ATP et la production de ROS mitochondriaux (mtROS)^{362,363}. Une surcharge de mCa^+ va entraîner également l'ouverture du mPTP, et l'ouverture prolongée de ce pore va entraîner une dépolarisation de la membrane mitochondriale interne, un gonflement de la matrice et une rupture de membrane mitochondriale externe libérant le cytochrome C, provoquant l'apoptose³⁵⁵. De plus, en condition apoptotique, la protéine de fission Fis1 va venir cliver la protéine Bap31 en p20Bap31 afin d'augmenter le transfert de Ca^+ entre le RE et la mitochondrie, et stimuler le recrutement et l'activation de la procaspase 8³⁶⁴.

Toutefois, un défaut de transfert de Ca^+ dans la mitochondrie peut entraîner un déficit énergétique, avec une production d'ATP faible. Ce stress énergétique va induire la phosphorylation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) et déclencher l'autophagosome³⁶⁵.

5. Apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui permet aux tissus de se renouveler progressivement pour maintenir une homéostasie tissulaire sans provoquer d'inflammation. La cellule va se désagréger progressivement en s'entourant de membrane plasmique, ces bouts de cellules s'appellent des corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques vont être phagocytés sans libération de DAMP et donc sans réaction inflammatoire. Il y a plusieurs manières d'activer l'apoptose : l'activation par la mitochondrie ou l'activation par les récepteurs de mort.

Au niveau de la mitochondrie en cas de stress apoptotique c'est-à-dire de dommages de l'ADN, d'un stress au niveau du RE ou du stress oxydatif, les protéines BAX et BAK vont s'activer et ces protéines, de la famille BCL-2 vont induire la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP). Le MOMP va avoir pour conséquence la libération de protéines présentes dans l'espace intermembranaire dans le cytosol, comme par l'exemple le cytochrome C. La surcharge en Ca^+ dans la mitochondrie évoquée précédemment va avoir le même effet en libérant le cytochrome C dans le cytosol^{366,367}. Cette surcharge peut être due à un stress au niveau du RE³⁶⁸. Le cytochrome C une fois libéré dans le cytosol va se lier au facteur d'activation de la protéase de l'apoptose 1 (APAF1) qui active la caspase 9, qui elle-même active la caspase 3 et 7 entraînant une dégradation cellulaire apoptotique^{366,367}.

Au niveau de la membrane plasmique se trouvent des récepteurs de mort tels que les récepteurs TNF et tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL). Ces récepteurs, une fois activés par leurs ligands, vont venir activer la caspase 8 qui va elle-même activer les caspases 3 et 7 qui, comme décrit-ci-dessus vont entraîner une dégradation cellulaire et la mise en place de corps apoptotiques³⁶⁶. Ces récepteurs de mort vont aussi activer la protéine BID en la clivant en tBID, et tBID va activer le MOMP indépendamment de BAX et BAK^{366,369} (Figure 49).

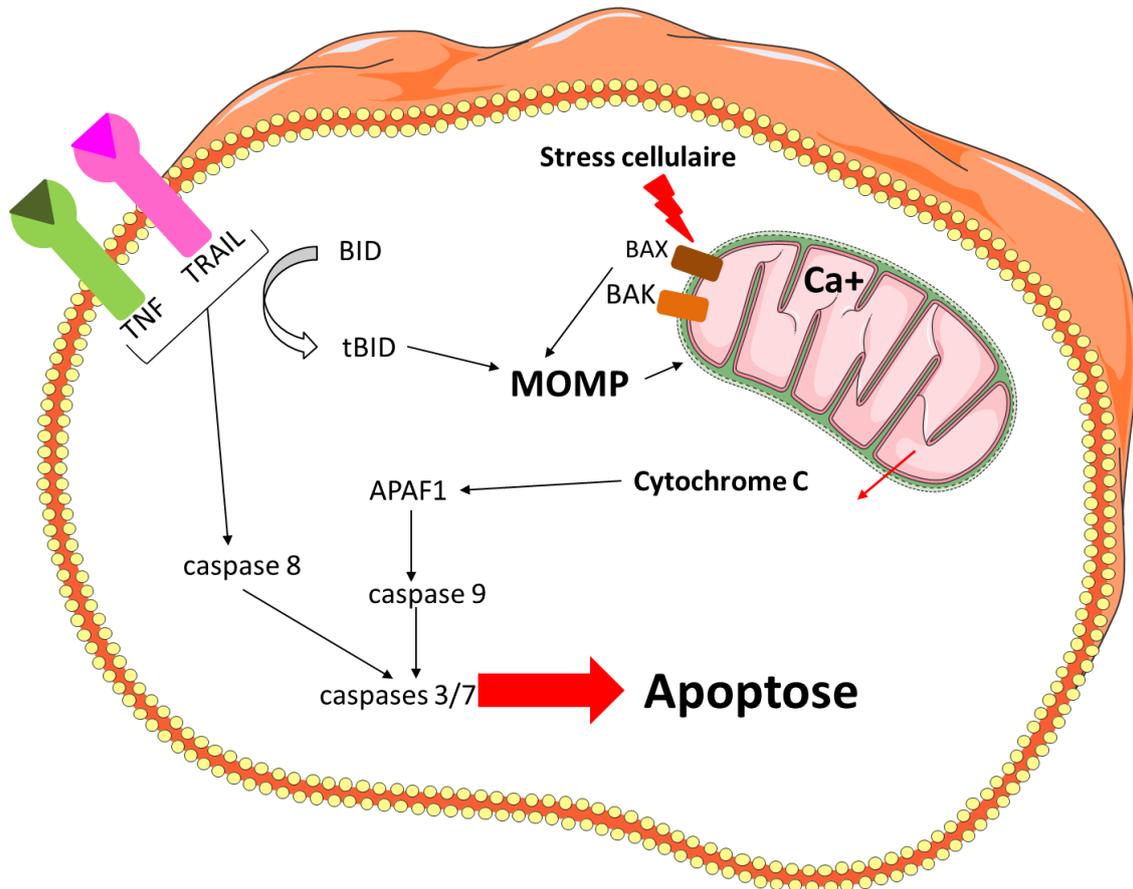


Figure 49 : Mécanisme d'activation de l'apoptose. Il y a plusieurs manières d'activer l'apoptose : l'activation par la mitochondrie ou l'activation par les récepteurs de mort. Au niveau de la mitochondrie, suite à un stress cellulaire, les protéines BAX et BAK à la surface des mitochondries vont induire la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP) et libérer le cytochrome C. Un stress cellulaire peut également augmenter la quantité de Ca⁺ dans la mitochondrie, ce qui va également avoir pour conséquence la libération du cytochrome C. Le cytochrome C va alors activer APAF1, qui va elle-même activer la caspase 9 qui va à son tour activer les caspases 3/7, qui vont enfin induire l'apoptose. Le second moyen de stimuler l'apoptose va être la voie des récepteurs de mort, en effet les récepteurs TNF et TRAIL une fois activés par leurs ligands, vont activer la caspase 8 qui va elle-même activer les caspases 3/7 pour mener en l'apoptose. Ces récepteurs de mort vont également activer la protéine BID qui va déclencher le MOMP indépendamment de BAX et de BAX.

réponse antivirale. Différents PAMPs tels que l'ARNdb, l'ARNs et le 5'-triphosphate (ppp) activent deux PRR cytoplasmiques, RIG-1 et MDA5. Ces PRR sont régulés par DHX58, qui régule positivement MDA5 et négativement RIG-1. Après l'interaction avec DHX58/RIG1/MDA5, MAVS est activé en recrutant différentes protéines, telles que TRAF3 et TRAF6. L'interaction entre MAVS et les protéines de fusion MFN1 et MFN2 (MFN) est essentielle pour la signalisation de la voie RLR. TRAF3 active le complexe TANK/NEMO/iKKe/TBK, qui phosphoryle les dimères d'IRF7 et d'IRF3, ce qui permet leur translocation dans le noyau et leur liaison aux séquences ISRE au niveau des promoteurs des gènes régulés par l'IFN de type I, tandis que TRAF6 active le complexe IKK. Ce complexe active NF- κ B en phosphorylant son inhibiteur I κ B α . Une fois activé, NF- κ B se déplace vers le noyau pour induire l'expression de gènes pro-inflammatoires. La voie NLR est impliquée dans un mécanisme de lutte contre les infections et les dommages cellulaires. Le principal complexe de cette voie est l'inflammasome NLRP3. L'inflammasome est un complexe multiprotéique contenant l'ASC, la pro-caspase 1 et le NLRP3. L'activation de l'inflammasome NLRP3 se fait à la fois au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. Le premier est lié à l'activation des TLR et à la production de pro-IL1b et de pro-IL18. Le second signal est basé sur la détection des PAMPs et DAMPs qui conduit à l'oligomérisation de NLRP3 et à l'interaction avec ASC. Ensuite, l'ASC recrute la pro-caspase 1 via le domaine d'activation et de recrutement des caspases (CARD). Une fois la caspase 1 activée, elle clive les pro-IL1b et pro-IL18, ce qui permet la libération de ces cytokines inflammatoires dans le milieu extracellulaire. En outre, la caspase 1 clive Gsdmd, ce qui permet la création d'un pore à la membrane plasmique et la pyroptose. En outre, MAVS est également nécessaire au recrutement de NLRP3 dans les membranes mitochondriales. La cardiolipine et le mtROS favorisent l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Dans le cas d'une infection virale, les mitochondries jouent un rôle dans la détection du virus. En effet, la MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein), protéine située à la membrane externe des mitochondries, joue un rôle central dans la voie de signalisation du récepteur RLR, qui conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron de type 1 (IFN 1) ³⁷⁰⁻³⁷³. En fait, deux PRR cytoplasmiques, le gène inductible par l'acide rétinoïque (RIG-1) et la protéine 5 associée à la différenciation du mélanome (MDA5) reconnaissent différents PAMPs tels que l'ARN double brin viral ou 5'-triphosphate (ppp) et l'ARN monocaténaire (ARNs) ³⁷⁴. Ces PRR sont régulés par la DExH-Box Helicase 58 (DHX58) ³⁷⁵, DHX58 régulant positivement MDA5 et négativement RIG-1 ³⁷⁶. RIG-1 et MAD5 sont des hélicases cytosoliques dotées d'une activité ATPase. L'extrémité C-terminale se lie à l'ARN viral et l'extrémité N-terminale se lie à deux domaines de recrutement des caspases (CARD) en tandem pour se lier à la protéine MAVS ³⁷⁴⁻³⁷⁸. Après l'interaction avec DHX58, MAVS est activé et forme le signalosome MAVS en recrutant différentes protéines, telles que les facteurs TRAF3 et TRAF6 associés au récepteur du TNF ^{379,380}. Le recrutement de TRAF3 et TRAF6 induit l'expression de l'IFN de type I et l'activation de la voie NF- κ B. En effet, TRAF3 active le complexe TANK/NEMO/iKKe/TBK, qui va phosphoryler les dimères d'IRF7 et d'IRF3, permettant leur translocation dans le noyau et leur liaison aux séquences ISRE au niveau des promoteurs des gènes régulés par l'IFN de type I. D'autre part, TRAF6 active le complexe IKK. Ce complexe active NF- κ B en phosphorylant son inhibiteur I κ B α . Une fois activé, NF- κ B transloque vers le noyau pour induire l'expression de gènes pro-inflammatoires ³⁸¹.

De plus, la dynamique mitochondriale régule la voie de signalisation RLR. Les mitochondries constituent un réseau dynamique qui se modifie en réponse aux exigences biologiques par le biais de la fusion et de la fission. Il a été démontré que l'interaction entre les protéines MAVS et MFNs ainsi que la fusion mitochondriale sont nécessaires dans la voie de signalisation RLR ³⁸². En effet, l'élongation mitochondriale et l'augmentation de la réponse RLR ont été observées après l'inhibition de DRP1 et FIS1 par shRNA et siRNA dans les cellules Hela infectées par la souche H4 SeV ³⁸². En outre, l'inhibition de MFN1 et MFN2 dans les fibroblastes d'embryons de souris (MEF) a réduit la réponse RLR contre le virus de SeV et le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) ³⁸³. Ainsi, les perturbations de la fission et de la fusion des mitochondries affectent la réponse au virus médiée par le RLR.

La chaîne de transport d'électrons de la phosphorylation oxydative produit des ROS, principalement dans les complexes I et III, et dans une moindre mesure dans le complexe II ³⁸⁴. Les ROS sont essentiels à la signalisation antivirale et à la réponse antibactérienne et antiparasitaire. Dans le cas de la signalisation antivirale, plusieurs observations suggèrent qu'une augmentation des ROS cellulaires amplifie la réponse RLR. Il a été démontré que la suppression du gène ATG5 de formation des vésicules autophagiques dans des MEF entraînait une augmentation de la production de ROS et des dommages mitochondriaux, ainsi qu'une augmentation de la signalisation RLR ^{385,386}. En outre, les auteurs ont décrit que la production d'interféron de type I par le biais de la signalisation RLR est diminuée par les antioxydants N-acétyl-L-cystéine (NAC) et le gallate de propyle (PG) ³⁸⁶. Ces expériences montrent que les niveaux constitutifs de ROS sont utilisés par RLR pour la signalisation. De plus, le blocage du complexe I par la roténone dans les cellules WT et mutées ATG5 a augmenté les ROS mitochondriaux et la réponse RLR contre l'infection par le virus de la stomatite vésiculaire (stimulation RIG-I) ou la transfection Poly I:C (stimulation MDA-5).

L'importance des ROS dans la réponse antibactérienne a été démontrée par l'ablation de la protéine régulatrice Uncoupling Protein 2 (UCP2). Des études ont montré que la fuite d'électrons pendant l'ETC produit des superoxydes qui se diffusent dans la membrane interne, oxydant les phospholipides et générant du 4-hydroxynonanal (4HNE). Le 4HNE active l'UCP qui découple la chaîne respiratoire mitochondriale, réduisant ainsi la force protonique et la formation de superoxyde ³⁸⁷. L'inactivation de l'UCP2 chez la souris a été associée à une production plus élevée de mtROS, à une production accrue d'interféron de type I et de cytokines pro-inflammatoires, et donc à une réponse antibactérienne accrue ^{388,389}. Les macrophages stimulés par le LPS présentaient une diminution de l'expression de l'UCP2, ce qui a entraîné une augmentation des mtROS et une production plus importante de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron de type I ³⁹⁰. On pense que les ROS mitochondriaux participent à l'éclatement oxydatif dans les macrophages activés et ces données ont révélé le rôle important des ROS générés par les mitochondries dans la lutte contre l'infection.

Les macrophages et les cellules dendritiques éliminent les micro-organismes par phagocytose. La proximité entre les phagosomes et les mitochondries permet aux mtROS de traverser le phagosome pour éliminer le pathogène. Après l'activation des TLR (TLR1, TLR2 et TLR4) par un pathogène, l'augmentation du mtROS, ainsi que le rapprochement des mitochondries et des phagosomes se font par l'activation des kinases Mst1 et Mst2. Ces kinases activent la GTPase Rac, ce qui permet l'assemblage du complexe TRAF6-ECSIT ³⁹¹. En

effet, le facteur TRAF6 se transloque vers la mitochondrie et se lie à ECSIT, jouant un rôle important dans l'assemblage du complexe I. La formation d'un complexe avec TRAF6 entraînera une augmentation de la production de mtROS ainsi que la proximité des mitochondries et du phagosome³⁹².

Les mitochondries sont également impliquées dans un mécanisme essentiel de lutte contre l'infection et les dommages cellulaires : l'inflammasome NLRP3. Ce mécanisme permet le recrutement de cellules inflammatoires sur le site de l'infection en permettant la sécrétion d'IL-1b mais aussi l'induction d'une réponse Th1 avec une augmentation de l'activité cytotoxique via la sécrétion d'IL-18^{393,394}. En plus de ces deux actions, l'inflammasome est impliqué dans une mort cellulaire particulière : la pyroptose. Cette mort cellulaire inflammatoire dépend de l'activation de l'inflammasome et a pour rôle d'éliminer les bactéries intracellulaires avant qu'elles ne prolifèrent trop, ainsi que d'induire un phénomène inflammatoire local avec le recrutement d'autres cellules immunitaires³⁹⁵⁻³⁹⁷.

L'inflammasome est un complexe multiprotéique contenant un adaptateur apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain (ASC), la pro-caspase 1 et le membre spécifique de la NOD-like receptor protein 3 (NLRP3)³⁹⁸. L'activation de l'inflammasome NLRP3 se fait au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. Le premier est lié à l'activation des récepteurs TLR et à la production de pro-IL1b et de pro-IL18^{399,400}. Le second signal est basé sur la détection des PAMPs et des DAMPs qui entraînent l'oligomérisation de NLRP3 et l'interaction avec l'adaptateur ASC par l'intermédiaire du domaine pyrin (PYD). Ensuite, l'ASC recrute la pro-caspase 1 par l'intermédiaire du domaine CARD. Une fois la caspase 1 activée, elle clive les pro-IL1b et pro-IL18, ce qui libère ces cytokines inflammatoires dans la circulation^{398,401-403}. En outre, la caspase 1 clive la gasdermine D (Gsdmd), ce qui permet la formation de pores dans la membrane plasmique et la pyroptose⁴⁰⁴. Les mitochondries sont très importantes dans l'activation du NLRP3. En effet, MAVS est nécessaire au recrutement de NLRP3 dans les membranes mitochondriales⁴⁰⁵. Le phospholipide cardiolipine passe de la membrane interne à la membrane externe des mitochondries pour se lier à NLRP3 et favoriser son activation⁴⁰⁶. En outre, les ROS mitochondriaux participent également à l'activation de NLRP3⁴⁰⁷⁻⁴⁰⁹.

L'infection par un agent pathogène n'est pas la seule cause d'inflammation ; en effet, les lésions tissulaires activent divers mécanismes inflammatoires par l'intermédiaire des DAMP. Les mitochondries étant d'origine procaryote²⁸³, on peut supposer que les composants procaryotes et mitochondriaux présentent des similitudes qui peuvent leur conférer un potentiel DAMP élevé⁴¹⁰. En effet, une étude a démontré que l'activation du système immunitaire par l'accumulation d'ADNmt dans le cytosol entraîne une réponse immunitaire antivirale^{411,412} et que l'oxydation de l'ADNmt entraîne l'activation de l'inflammasome^{411,413}. La cardiolipine est également considérée comme un DAMP mitochondrial⁴¹⁴. De plus, comme mentionné ci-dessus, elle permet l'activation de l'inflammasome NLRP3⁴⁰⁶.

En résumé, les mitochondries sont importantes pour déclencher la réponse immunitaire innée liée aux RLR, NLR ou TLR contre les virus, les bactéries, les champignons ou les lésions tissulaires stériles.

IV. Implication de la mitochondrie dans les cardiomyopathies.

La mitochondrie est un organe essentiel aux cellules cardiaques. Celles-ci ont besoin de beaucoup d'énergie pour se contracter et cet organe est le centre énergétique de la cellule. De plus, la mitochondrie est aussi responsable de l'homéostasie du calcium, et est impliqué dans le transport d'ions, dans l'apoptose et dans le métabolisme, des processus essentiels au bon fonctionnement du cœur. Le maintien de la qualité des mitochondries est essentiel dans les cellules cardiaques ; pour ce faire, l'intégrité du système de contrôle qualité des mitochondries est primordial. Ce système comprend le processus de dynamique mitochondriale, avec la fusion et la fission, et également la mitophagie ⁴¹⁵.

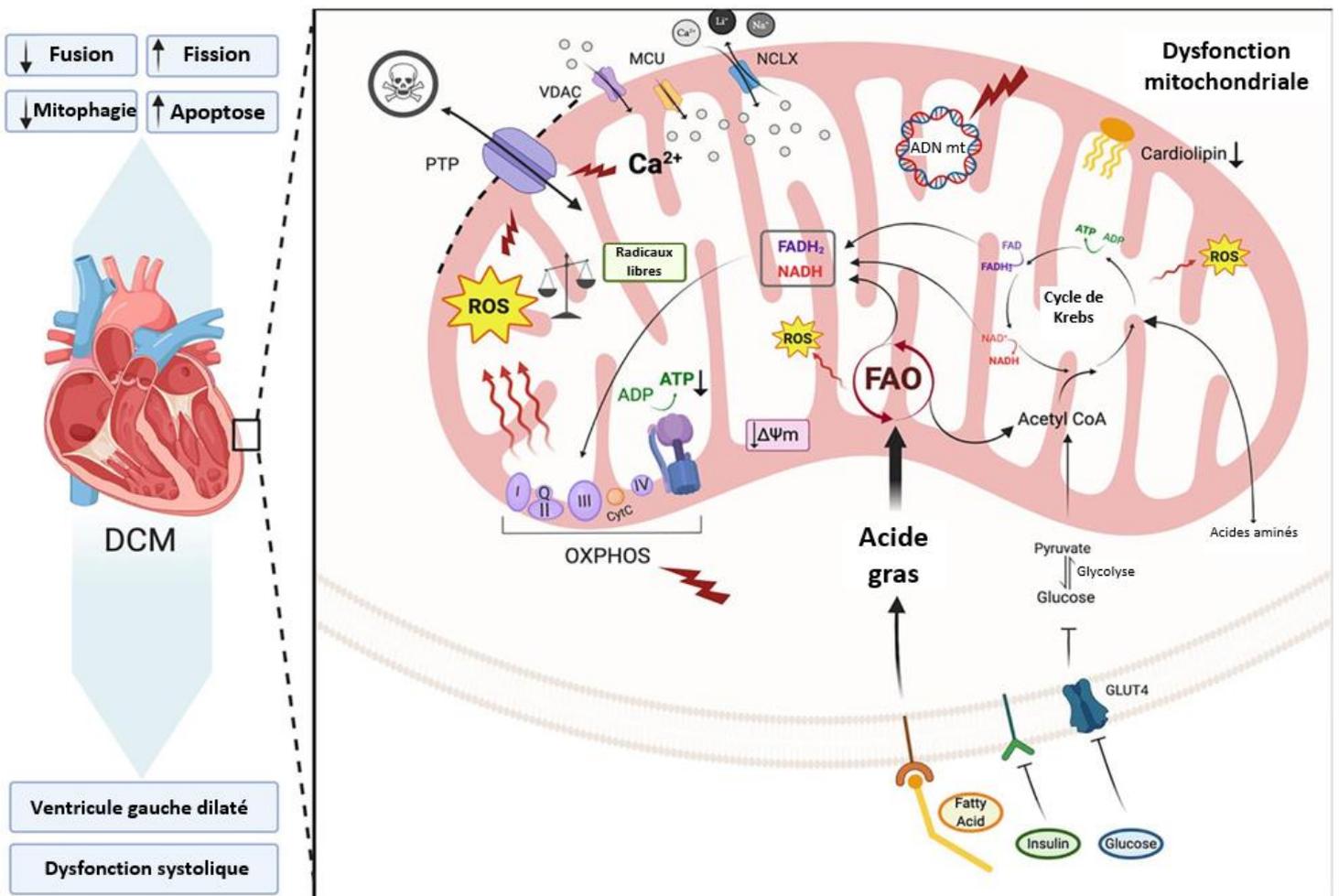
1. La cardiomyopathie dilatée

Dans les premiers stades de la cardiomyopathie, un dysfonctionnement de l'OXPPOS ainsi qu'une augmentation du nombre de mitochondries pour compenser cela, vont être observé ⁴⁰⁶. Cependant, au cours de la progression de la maladie, il a été mis en évidence une diminution du nombre de mitochondries, et du fait de l'ATP, et une augmentation des ROS ^{416,417}. Le stress cardiaque va entraîner une fibrose cardiaque résultant du déclenchement des mécanismes apoptotiques intrinsèques, comme un pic de Ca^{+} , et de ROS entraînant l'ouverture du pore de transition de la perméabilité mitochondriale (mPTP) ^{417,418}. La mitophagie va avoir pour but d'éliminer les mitochondries endommagées, mais au vu d'un trop grand stress cardiaque, la mitophagie va diminuer, laissant les mitochondries endommagées s'accumuler, le stress oxydatif augmenter et finissant par causer l'apoptose des cellules ^{415,417}. Les cellules cardiaques ont besoin de beaucoup d'énergie pour accomplir leur fonction ; il a été observé que certaines cardiomyopathies dilatées seraient dues à des dysfonctions au niveau de l'OXPPOS. On peut citer, par exemple, des défauts dans la synthèse de la coenzyme Q10 ⁴¹⁹, des groupes fer-souffre (FE-S) présents dans les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire, de la maintenance de l'ADNmt et un défaut de toute la machinerie de traduction mitochondriale. Ces défauts vont entraîner une diminution de l'ATP, une augmentation des ROS et une dérégulation du Ca^{+} ^{417,420} (Figure 51).

De plus un déséquilibre dans la balance entre la fusion et fission mitochondriales va aussi entraîner une cardiomyopathie ^{417,421,422}. Ce déséquilibre va entraîner des altérations du réseau mitochondrial ; dans tous les modèles animaux, une déplétion des protéines de fission ou de fusion de manière artificielle va entraîner des cardiomyopathies dilatées et des insuffisantes cardiaques. En effet dans le cœur adulte de souris une déplétion de Drp1, protéine de fission va entraîner une élongation du réseau mitochondrial, une perte de la mitophagie et une sensibilité à la cardiomyopathie ^{417,423} (Figure 51).

De plus, toujours dans le cœur de souris adulte, une déplétion des gènes MFN1 et MFN2, protéines impliquées dans la fusion mitochondriale entraîne une fragmentation du réseau mitochondrial, le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire et le développement d'une cardiomyopathie dilatée létale ⁴¹⁷.

Le cœur est un organe énergivore ⁴²⁴, il pourrait utiliser les acides gras comme substrats énergétiques alternatifs, l'oxydation des acides gras va donc être une voie essentielle. Une altération des enzymes clés de ce cycle va entraîner des cardiomyopathies dilatées ⁴²⁵. De même, une altération de la cardiolipine, lipide essentiel de la membrane interne mitochondriale pourrait aussi entraîner une sensibilité aux cardiomyopathies dilatées ⁴¹⁷. En effet, ce lipide est essentiel au fonctionnement des complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire et participe à la formation des surpercomplexes ⁴²⁶⁻⁴²⁸. Par conséquent,



une baisse de cardiolipine dans la membrane va contribuer à la surproduction de ROS ⁴¹⁷.

Figure 51 : Schéma des dysfonctionnements mitochondriaux impliqués dans l'induction de la cardiomyopathie dilatée (DCM). VDAC : Protéines du canal sélectif de l'anion dépendant du voltage, MCUC : complexe d'uniporteur de calcium mitochondrial, NCLX : échangeur mitochondrial Na^+/Ca^{2+} , OXPHOS : phosphorylation oxydative, ATP : adénosine triphosphate, ROS : espèces réactives à l'oxygène, TCA : cycle de l'acide tricarboxylique, FAO : oxydation des acides gras, GLUT-4 : transporteur de glucose de type 4, $\Delta\Psi_m$: potentiel de membrane mitochondriale, cyt C : cytochrome C. (Schéma Adapté) ⁴¹⁷

2. La cardiomyopathie hypertrophique

Au début de l'hypertrophie cardiaque, les cardiomyocytes ont besoin de beaucoup d'énergie pour grossir ; pour cela le nombre de mitochondries augmente pour produire davantage d'ATP ⁴²⁹. On observe une amplification du réseau mitochondrial dans des cœurs de rats hypertrophiques ⁴¹⁶. Mais, plus la pathologie progresse, plus le nombre de mitochondries diminue, jusqu'à une dysfonction diastolique et une insuffisance cardiaque ⁴³⁰. De plus, on retrouve une diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, entraînant une baisse de l'ATP, une baisse du potentiel de membrane des mitochondries, une augmentation du Ca⁺ intracellulaire et une augmentation de la production de ROS ⁴³¹. Il a été montré que l'évolution de l'hypertrophie cardiaque vers une maladie plus avancée, précède d'un dysfonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire I et II ⁴³². Dans l'hypertrophie cardiaque, on note un changement de substrat pour produire de l'ATP ; le cœur hypertrophique va oxyder le glucose au lieu d'oxyder des acides gras et l'oxydation du glucose étant moins efficace, il va produire moins d'ATP ^{431,433}. Ainsi, on observe une augmentation de l'absorption du glucose cardiaque chez les animaux hypertrophiques ⁴³⁴. La diminution de l'ATP, dans la cardiomyopathie hypertrophique, est due, en partie, à ce changement de substrat moins efficace ⁴³¹. La cardiomyopathie hypertrophique s'accompagne d'une lésion des mitochondries avec une diminution de l'ATP. Il a été mis en évidence que lors d'une hypertrophie cardiaque, il y avait une surcharge de Ca⁺ dans les mitochondries. Cette surcharge de Ca⁺ et l'augmentation de ROS vont entraîner l'ouverture du MPTP ^{431,435}.

3. Insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque pourrait être due à un dysfonctionnement mitochondrial, suivi d'un manque d'énergie ⁴³⁰. En effet, dans l'insuffisance cardiaque, on remarque des mitochondries altérées produisant peu d'ATP et beaucoup de stress oxydatif ⁴³⁶⁻⁴³⁸. De plus, on a pu observer chez les sujets souffrant d'insuffisance cardiaque, une diminution de l'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire ⁴³⁹. Il a été observé également, en phase terminale, une réduction des enzymes du cycle de Krebs comme l'isocitrate déshydrogénase, la malate déshydrogénase et l'aconitase ⁴⁴⁰. En outre, les cœurs de patients avec une insuffisance cardiaque montraient une défaillance au niveau de la réplication de l'ADNmt. Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'ADNmt code pour plusieurs protéines mitochondriales qui participent à la phosphorylation oxydative. Si on retrouve un épuisement de l'ADNmt, la conséquence sera la réduction des protéines codées par l'ADNmt, ce qui implique une altération des mécanismes mitochondriaux et plus particulièrement une altération de la phosphorylation oxydative ⁴⁴¹.

Objectifs

Le parasite *T. cruzi* va être déposé dans les déjections de la punaise sur la peau de l'hôte, à proximité du site de pique lors d'un repas sanguin. En se grattant, l'hôte va faire pénétrer le parasite au niveau de la lésion cutanée faite par le rédve. Dans l'épithélium, le parasite va activer l'expression de gènes pro inflammatoires par les cellules épithéliales infectées. De plus, des chimiokines, des interleukines (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL8, CCL20 et IL8) vont être induites afin de participer au recrutement de cellules phagocytaires professionnelles⁴⁴².

Lorsque le parasite va infecter une cellule, il va être reconnu par plusieurs Toll like récepteurs, comme les TLR2, TLR4 et TLR9. Les récepteurs TLR2 et TLR4 vont reconnaître les glycosyl-phosphatidylinositols (GPI) et les glycoprotéines de type mucines ancrées aux GPI, alors que le TLR9 va reconnaître l'ADN du parasite *T. cruzi*¹⁷³. Une fois activés, les TLR vont recruter une molécule adaptatrice cytosolique MyD88, qui va induire l'activation de la voie NF- κ B et conduire à la production de cytokines pro inflammatoires^{174,443} (Figure 52). En effet, il a été montré que les souris TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} et MyD88^{-/-} présentent une sensibilité accrue à l'infection par *T. cruzi*, et que la voie TLR9/ MyD88 induit la synthèse de IFN- γ et IL-12 lors de cette infection⁴⁴⁴. Ceci suggère donc que ces TLR sont les principaux effecteurs de la réponse au parasite. De plus, les macrophages ou les cellules dendritiques infectées et activées par des TLR vont produire de l'IL-12 et de l'IFN- γ ainsi que des radicaux oxygénés (ROS et NO). Les ROS sont produits par la chaîne respiratoire mitochondriale et les NO par les nitrites synthèses inductibles. Ce stress oxydatif a pour but d'éliminer le parasite⁴⁴⁵.

En plus des récepteurs TLR, les récepteurs NLR jouent également un rôle dans la réponse au parasite *T. cruzi*. Puisqu'il a été montré que l'inflammasome NLRP3/caspase 1/ASC participe à dans la production d'IL-1 β , de ROS et de NO^{446,447}.

Lorsque le parasite infecte les cellules, on peut observer une augmentation du Ca²⁺ cytoplasmique. Dans les cellules, l'excès de Ca²⁺ cytoplasmique va être absorbé par le réticulum endoplasmique, puis par la mitochondrie. Une surcharge de Ca²⁺ dans la mitochondrie va entraîner une ouverture de mPTP qui va conduire à une diminution du potentiel de membrane des mitochondries, à l'inefficacité de la chaîne respiratoire mitochondriale et à la production de ROS⁴⁴⁷.

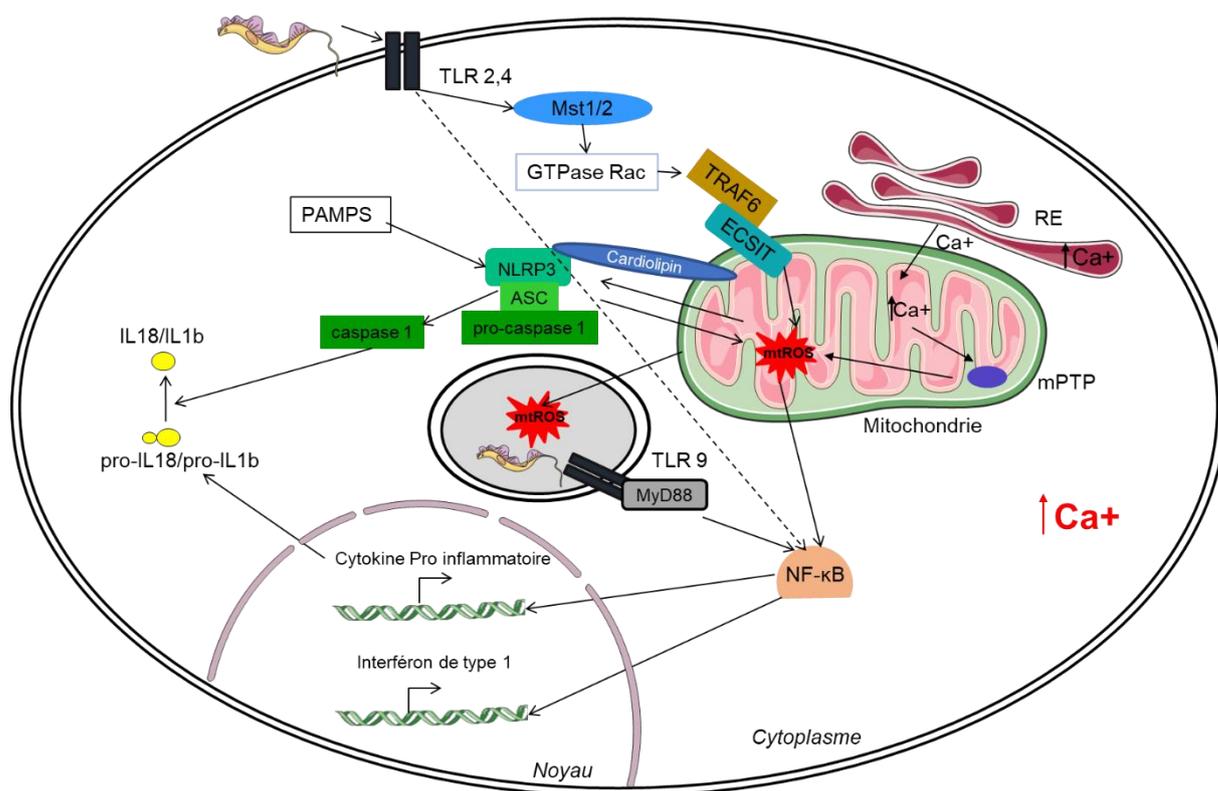


Figure 52 : La mitochondrie au centre de la réponse anti *T. cruzi*. Le parasite va être reconnu dans les TLR 2 et TLR4 à la surface des cellules. Ceci va activer les kinases Mst1 et Mst2, qui à leur tour activent la GTPase Rac permettant l'assemblage du complexe TRAF6-ECSIT. Le TRAF6 se transloque alors vers les mitochondries et se lie à l'ECSIT, formant le complexe TRAF6-ECSIT. Ce complexe va par la suite entraîner une augmentation de la production de ROS mitochondriaux (mtROS) ainsi qu'un rapprochement spatial des mitochondries du phagosome. Les bactéries présentes dans le phagosome seront détruites par l'action des mtROS. Dans les phagosomes, le TLR 9 va reconnaître le parasite *T. cruzi*, et grâce à la molécule adaptatrice cytosolique MyD88, permettre l'activation de la voie NF-κB. Les mtROS vont également permettre l'activation de cette voie. La voie NF-κB va induire la production de cytokines pro inflammatoires et d'interféron de type 1. Une augmentation de Ca^{2+} cytoplasmique va entraîner une augmentation de l'absorption de Ca^{2+} dans la mitochondrie, ce qui va mener à la production de mtROS. Le complexe NLRP3/caspase 1/ASC joue un rôle dans la production des IL-1 β , de ROS et de NO.

Afin de combattre le parasite *T. cruzi*, la cellule va mettre en place plusieurs stratégies. D'abord elle va reconnaître le parasite grâce à différents récepteurs (TLR2, 4, 9, NLRP3) qui vont induire, par plusieurs voies distinctes la production de cytokines pro inflammatoires et la production de ROS et de NO. La production de cytokines pro inflammatoires permet l'éveil d'une réponse pro inflammatoire avec le recrutement d'effecteurs tels que les lymphocytes Th1, les macrophages M1, les cellules NK et les lymphocytes CD8⁺ cytotoxiques. Simultanément, on note la production de ROS et de NO qui ont pour fonction la destruction du parasite. Dans la maladie de Chagas le parasite est bien détruit par le système immunitaire en phase aiguë. **Cependant en phase chronique, bien qu'il soit difficile de détecter des parasites dans les tissus, les voies pro inflammatoires continuent à être exacerbées, ce qui induit le développement des cardiomyopathies**

sévères. En effet on observe une forte production de TNF- α et IFN- γ ^{184,214,215} chez les personnes CCC. Cette forte inflammation va entraîner, entre autres, des dysfonctionnements mitochondriaux^{215,448,449}.

En effet, une analyse protéomique effectuée sur des ventricules gauches de patients atteints de différents types de cardiomyopathies (CCC, cardiomyopathie dilatée non infectieuse (DCM) et cardiomyopathie dilatée ischémique (IC)) a mis en évidence une diminution de l'activité mitochondriale et de la production d'énergie chez les patients atteints de CCC⁴⁵⁰. L'association de ces deux observations, c'est-à-dire la forte production de TNF- α et d'IFN- γ dans le cœur des patients, et le dysfonctionnement des mitochondries cardiaques, **nous a permis d'émettre l'hypothèse que l'IFN- γ et le TNF- α jouent un rôle dans les dysfonctionnements de ces mitochondries.**

Afin d'argumenter cette hypothèse :

1) Nous avons utilisé une lignée de cardiomyocytes humains afin de déterminer si l'IFN- γ et le TNF- α favorisent le dysfonctionnement mitochondrial et le stress nitro-oxydatif.

2) Nous avons comparé le tissu myocardique CCC aux biopsies de cardiomyopathies dilatées non chagasique (DCM) afin de déterminer si le dysfonctionnement mitochondrial et les marqueurs de stress oxydatif sont spécifiques à la maladie de Chagas.

3) Nous avons étudié l'impact de la costimulation par l'IFN- γ et le TNF- α sur les profils transcriptomiques et protéomiques.

4) Nous avons utilisé des agonistes et antagonistes des principaux processus associés à la réponse Th1 ou à l'inflammation permettant de restituer un fonctionnement correct du métabolisme énergétique mitochondrial tout en limitant le stress oxydatif.

L'évolution de la maladie de Chagas en CCC n'est retrouvée que dans 30% des cas. En zone d'endémie, une agrégation familiale des cas les plus graves a été observée¹⁸⁴. **Ces deux observations nous ont permis de poser l'hypothèse qu'il doit exister des variants/gènes de susceptibilité, qui induisent une aggravation des phénotypes cliniques les plus graves.** Des études d'association génétique sur des polymorphismes génétiques communs entre les deux groupes exposés à *T. cruzi* et présentant des phénotypes cardiaques divergents, CCC et ASY ont permis d'identifier de nombreux variants mais dans ces études, il est impossible de déterminer si les variants identifiés possèdent des fonctions causales.

Afin d'argumenter cette hypothèse :

1) Nous avons conduit des études de séquençage de l'exome entier sur des familles nucléaires présentant à la fois des cas graves et des patients asymptomatiques.

2) Nous avons recherché des variants génétiques rares et à fort impact présents uniquement chez les cas graves.

3) Nous avons essayé de définir l'impact de ces variants au regard du processus pathogénique.

Lors de la phase chronique de la pathologie les individus infectés restent très majoritairement asymptomatiques même si au cours du temps certains évoluent et deviennent symptomatiques développant des cardiomyopathies. De plus, une fraction des individus développe des atteintes digestives tout aussi invalidantes. Peu d'études ont été conduites sur ces formes digestives et encore moins d'études génétiques. Cela s'explique par la difficulté de recruter des familles multi cas avec ce phénotype. Cependant, notre unité de recherche a eu l'opportunité de recruter un certain nombre de cas permettant de conduire des études sur des individus non apparentés. **Nous avons voulu savoir si le contrôle génétique associé à ces formes digestives est le même que celui des cardiomyopathies même si les signes cliniques ne sont pas similaires.**

Afin de répondre à cette question :

- 1) Nous avons conduit des études de séquençage de l'exome entier sur des individus non apparentés présentant des formes digestives et des sujets asymptomatiques.
- 2) Nous avons recherché des variants génétiques rares et à fort impact plus fréquemment présents chez les patients atteints de forme digestive.

Comme on peut le constater, les hypothèses précédentes se focalisent sur l'étude de variants de gènes impliqués dans le fonctionnement mitochondrial ou dans le processus d'inflammation. Les études génétiques mises en place à ce jour se sont focalisées sur l'étude du génome nucléaire. Cependant, les mitochondries possèdent leur propre génome qui code pour un nombre limité de gènes (voir introduction). **Nous avons émis l'hypothèse que certains variants mitochondriaux venaient participer/complémenter au/le contrôle du déterminisme génétique des formes graves. Ceci avait déjà été décrit dans les cardiomyopathies associées au problème de non compaction de la paroi interne du ventricule gauche (LVNC).**

- 1) Nous avons un séquençage de l'ADN mitochondrial des individus asymptomatiques ou présentant des cardiomyopathies sévères ou modérées.
- 2) Nous avons recherché des variants génétiques rares plus fréquemment présents chez ces patients, en se basant sur l'hétéroplasmie.
- 3) Nous avons essayé de caractériser ces variants en utilisant les informations disponibles dans des bases de données spécifiques des variants mitochondriaux

Partie 2 : Résultats

I. L'étude de l'effet du TNF- α et de l'IFN- γ au niveau mitochondrial sur des cardiomyocytes humains.

Article 1 : Co-Exposure of Cardiomyocytes to IFN- γ and TNF- α Induces Mitochondrial Dysfunction and Nitro-Oxidative Stress: Implications for the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy

Pauline Andrieux*, João Paulo Silva Nunes*, Pauline Brochet, Rafael Ribeiro Almeida, Eduardo Kitano, André Kenji Honda, Leo Kei Iwai, Débora Andrade-Silva, David Goudenège, Karla Deysiree Alcântara Silva, Raquel de Souza Vieira, Débora Levy, Sergio Paulo Bydlowski, Frédéric Gallardo, Magali Torres, Edimar Alcides Bocchi, Miguel Mano, Ronaldo Honorato Barros Santos, Fernando Bacal, Pablo Pomerantzeff, Francisco Rafael Martins Laurindo, Priscila Camillo Teixeira, Helder I Nakaya, Jorge Kalil, Vincent Procaccio, Christophe Chevillard**, Edecio Cunha-Neto**.

Article publié dans Frontiers in Immunology en novembre 2021.

Présentation de la publication :

L'infection par le protozoaire *Trypanosoma cruzi* provoque la cardiomyopathie de la maladie de Chagas (CCC) et peut entraîner une arythmie, une insuffisance cardiaque et la mort. La maladie de Chagas touche 8 millions de personnes dans le monde, et la production chronique de cytokines IFN- γ et TNF- α par les cellules T ainsi que le dysfonctionnement mitochondrial sont des facteurs importants du mauvais pronostic de la maladie. Les mitochondries occupent 40 % du volume des cardiomyocytes et produisent 95 % de l'ATP cellulaire qui soutient les cycles de contraction du cœur tout au long de la vie. Puisque l'IFN- γ et le TNF- α ont été décrits comme affectant la fonction mitochondriale, nous avons émis l'hypothèse que l'IFN- γ et le TNF- α sont impliqués dans le dysfonctionnement mitochondrial myocardique observé chez les patients atteints de CCC.

Dans cette étude, nous avons quantifié les marqueurs du dysfonctionnement mitochondrial et du stress nitro-oxydatif dans le tissu cardiaque CCC et dans les cardiomyocytes humains AC-16 stimulés par l'IFN- γ /TNF- α . Nous avons constaté que le myocarde CCC présentait des niveaux accrus de stress nitro-oxydatif et une réduction de l'ADN mitochondrial par rapport au tissu myocardique de patients atteints de cardiomyopathie dilatée (CMD). Le traitement IFN- γ /TNF- α des cardiomyocytes AC-16 a induit une augmentation du stress nitro-oxydatif et une diminution du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Nous avons constaté que l'axe STAT1/NF- κ B/NOS2 est impliqué dans la diminution du $\Delta\Psi_m$ induite par l'IFN- γ /TNF- α dans les cardiomyocytes AC-16. En outre, le traitement avec des agonistes de l'AMPK, du NRF2 et de SIRT1 sauve le $\Delta\Psi_m$ dans les cellules stimulées par l'IFN- γ /TNF- α . Les analyses protéomiques par la technique LC-MS/MS et d'expression génique par RNA-seq ont révélé que les cellules traitées par l'IFN- γ /TNF- α corroborent le dysfonctionnement mitochondrial, le changement du potentiel membrane des mitochondries, l'altération du métabolisme des acides gras et la nécrose cardiaque/la mort cellulaire. En effet, dans l'étude d'expression génique, on observe que la

voie SIRTUIN, impliquée dans l'inhibition des dommages mitochondriaux et de l'inflammation, est inhibée, et des voies liées à l'interféron et aux dysfonctions mitochondriaux sont activées. Les tests fonctionnels effectués sur le respiromètre Seahorse ont montré que les cellules stimulées par les cytokines présentent une diminution de la production d'ATP glycolytique et mitochondriale. Notamment, nous observons une diminution de 33% de l'ATP total, avec une diminution de 30% de l'ATP glycolytique, contre 41% de l'ATP mitochondrial. Nous avons également observé par la technique de Seahorse que les cellules stimulées avec les cytokines présentaient une dépendance de l'oxydation des acides gras. La stimulation au TNF- α et à l'IFN- γ semble donc modifier la demande en énergie de la cellule, qui va adapter ses besoins en modifiant son utilisation des voies métaboliques. Nous avons également observé que les cellules stimulées montraient une augmentation de la fuite de protons et de la consommation d'oxygène non-mitochondrial.

L'ensemble de nos résultats suggère que l'IFN- γ et le TNF- α causent des dommages directs aux mitochondries des cardiomyocytes en favorisant le stress oxydatif et nitrosatif et en altérant les voies de production d'énergie. Nous émettons l'hypothèse que le traitement par des agonistes de l'AMPK, de NRF2 et de SIRT1 pourrait être une approche pour ralentir la progression de la cardiomyopathie due à la maladie de Chagas.

Dans cet article, je suis co-premier auteur, j'ai réalisé toutes les manipulations de Seahorse ce qui comprend : les tests de mesure de la respiration mitochondriale, les tests de mesure de l'ATP mitochondriale et glycolytique ainsi que les tests qui mesurent la dépendance et la capacité des cellules à oxyder différents carburants cellulaires (Glucose, glutamine et acide gras). J'ai réalisé également toutes les stimulations nécessaires à la réalisation du RNA-seq c'est-à-dire des stimulations à (0, 1h, 6h, 12h, 24h, 48h) et j'ai effectué toutes les extractions d'ARN. J'ai produit le schéma final de cet article et j'ai contribué à sa réaction.



OPEN ACCESS

Edited by:

Clarissa M. Maya-Monteiro,
Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz),
Brazil

Reviewed by:

Emiliano Medei,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil

Joseli Lannes-Vieira,
Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz),
Brazil

Claudia Paiva,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil

***Correspondence:**

Edecio Cunha-Neto
edecunha@gmail.com
Christophe Chevillard
christophe.chevillard@univ-amu.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

[‡]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 09 August 2021

Accepted: 11 October 2021

Published: 11 November 2021

Citation:

Nunes JPS, Andrieux P, Brochet P,
Almeida RR, Kitano E, Honda AK,
Iwai LK, Andrade-Silva D, Goudenège D,
Alcântara Silva KD, Vieira RdS, Levy D,
Bydlowski SP, Gallardo F, Torres M,
Bocchi EA, Mano M, Santos RHB,
Bacal F, Pomerantzef P, Laurindo FRM,
Teixeira PC, Nakaya HI, Kalil J,
Procaccio V, Chevillard C and
Cunha-Neto E (2021) Co-Exposure of
Cardiomyocytes to IFN- γ and TNF- α
Induces Mitochondrial Dysfunction and
Nitro-Oxidative Stress: Implications for
the Pathogenesis of Chronic Chagas
Disease Cardiomyopathy.
Front. Immunol. 12:755862.
doi: 10.3389/fimmu.2021.755862

Co-Exposure of Cardiomyocytes to IFN- γ and TNF- α Induces Mitochondrial Dysfunction and Nitro-Oxidative Stress: Implications for the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy

João Paulo Silva Nunes^{1,2,3,4†}, Pauline Andrieux^{4†}, Pauline Brochet⁴, Rafael Ribeiro Almeida^{1,3}, Eduardo Kitano¹, André Kenji Honda¹, Leo Kei Iwai⁵, Débora Andrade-Silva⁵, David Goudenège⁶, Karla Deysiree Alcântara Silva^{1,2}, Raquel de Souza Vieira¹, Débora Levy¹, Sergio Paulo Bydlowski¹, Frédéric Gallardo⁴, Magali Torres⁴, Edimar Alcides Bocchi⁷, Miguel Mano⁸, Ronaldo Honorato Barros Santos⁹, Fernando Bacal⁹, Pablo Pomerantzef⁹, Francisco Rafael Martins Laurindo¹⁰, Priscila Camillo Teixeira¹¹, Helder I. Nakaya¹², Jorge Kalil^{1,2,3}, Vincent Procaccio¹³, Christophe Chevillard^{4*†} and Edecio Cunha-Neto^{1,2,3*†}

¹Laboratory of Immunology, Heart Institute (Incor), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Division of Clinical Immunology and Allergy, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ³iii-Institute for Investigation in Immunology, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), São Paulo, Brazil, ⁴INSERM, UMR_1090, Aix Marseille Université, TAGC Theories and Approaches of Genomic Complexity, Institut MarMaRa, Marseille, France, ⁵Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling (CeTICS), Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, ⁶Department of Biochemistry and Genetics, University Hospital of Angers, Angers, France, ⁷Heart Failure Team, Heart Institute (Incor) Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁸Functional Genomics and RNA-based Therapeutics Laboratory, Center for Neuroscience and Cell Biology (CNC), University of Coimbra, Coimbra, Portugal, ⁹Division of Surgery, Heart Institute, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ¹⁰Laboratory of Vascular Biology, Heart Institute of the School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ¹¹Translational Research Sciences, Pharma Research and Early Development F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland, ¹²Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil, ¹³MitoLab, UMR CNRS 6015-INSERM U1083, Université d'Angers, Angers, France

Infection by the protozoan *Trypanosoma cruzi* causes Chagas disease cardiomyopathy (CCC) and can lead to arrhythmia, heart failure and death. Chagas disease affects 8 million people worldwide, and chronic production of the cytokines IFN- γ and TNF- α by T cells together with mitochondrial dysfunction are important players for the poor prognosis of the disease. Mitochondria occupy 40% of the cardiomyocytes volume and produce 95% of cellular ATP that sustain the life-long cycles of heart contraction. As IFN- γ and TNF- α have been described to affect mitochondrial function, we hypothesized that IFN- γ and TNF- α are involved in the myocardial mitochondrial dysfunction observed in CCC patients. In this study, we quantified markers of mitochondrial dysfunction and nitro-oxidative stress in CCC heart tissue and in IFN- γ /TNF- α -stimulated AC-16 human cardiomyocytes. We found that CCC myocardium displayed increased levels of nitro-oxidative stress and reduced mitochondrial DNA as compared with myocardial tissue from patients with dilated cardiomyopathy (DCM). IFN- γ /TNF- α treatment of AC-16 cardiomyocytes induced increased nitro-oxidative stress and decreased the mitochondrial membrane potential

($\Delta\Psi_m$). We found that the STAT1/NF- κ B/NOS2 axis is involved in the IFN- γ /TNF- α -induced decrease of $\Delta\Psi_m$ in AC-16 cardiomyocytes. Furthermore, treatment with mitochondria-sparing agonists of AMPK, NRF2 and SIRT1 rescues $\Delta\Psi_m$ in IFN- γ /TNF- α -stimulated cells. Proteomic and gene expression analyses revealed that IFN- γ /TNF- α -treated cells corroborate mitochondrial dysfunction, transmembrane potential of mitochondria, altered fatty acid metabolism and cardiac necrosis/cell death. Functional assays conducted on Seahorse respirometer showed that cytokine-stimulated cells display decreased glycolytic and mitochondrial ATP production, dependency of fatty acid oxidation as well as increased proton leak and non-mitochondrial oxygen consumption. Together, our results suggest that IFN- γ and TNF- α cause direct damage to cardiomyocytes' mitochondria by promoting oxidative and nitrosative stress and impairing energy production pathways. We hypothesize that treatment with agonists of AMPK, NRF2 and SIRT1 might be an approach to ameliorate the progression of Chagas disease cardiomyopathy.

Keywords: mitochondrial dysfunction, chronic Chagas disease cardiomyopathy, interferon gamma, energy metabolism, mitochondria

INTRODUCTION

Heart failure (HF) is an important worldwide public health problem. Available therapies are insufficient and do not fully address molecular abnormalities that occur in cardiomyocytes (1). Chagas disease cardiomyopathy (CCC) accounts for 25% of HF cases and is a major cause of death in Latin America (2, 3). CCC is a severe inflammatory dilated cardiomyopathy caused by persistent infection by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. While 60% of Chagas Disease (CD) patients are mostly asymptomatic in the so-called “indeterminate” form (IF) and do not develop heart disease, CCC patients (30%, roughly 8 million people) display HF, arrhythmia, and disability (4, 5). CCC patients have 50% shorter survival rate and worse prognosis compared to patients with cardiomyopathies of non-inflammatory etiologies, such as ischemic, idiopathic and hypertensive cardiomyopathies (2).

The pathogenesis of CCC is still to be completely understood (6). Low-grade chronic *T. cruzi* persistence, which drives continued production of IFN- γ and TNF- α by Th1 T cells immune cells, plays a central pathogenic role in CCC (2, 4, 5). Indeed, omics and immunohistochemistry studies revealed higher levels of IFN- γ and TNF- α in heart tissue from CCC patients compared to other cardiomyopathies (7–11). Activation of the NF- κ B/NOS2 axis by the continued production of IFN- γ /TNF- α can promote increased levels of intracellular reactive nitrogen species (RNS) which are important for parasite control (12, 13). However, long-term sustained activation of this axis may promote damaging accumulation of reactive oxygen species (ROS) through induction of NADP oxidases and overproduction of mitochondrial reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide anion (O₂⁻) and RNS, molecules widely known to induce mitochondrial dysfunction and disturbances of heart function (14, 15).

The heart is the most metabolically active organ in the body and has the highest content of mitochondria of any tissue (16). This is needed to meet the ever-demanding energy requirement for contraction and relaxation and about 95% of cellular ATP is utilized to support the contraction–relaxation cycle within the myocardium (16). Indeed, mitochondria contribute to the proper function of cardiomyocytes by multiple mechanisms (17). Beyond contraction, mitochondria also fine-tune cellular calcium homeostasis, apoptosis and oxidative stress and it has become increasingly clear that mitochondrial dysfunction is the source of heart energy deprivation in cardiomyopathies and heart failure of diverse etiologies (16).

Several myocardial mitochondrial enzymes were found to be selectively depressed in CCC as compared to other cardiomyopathies, including ATP synthase α , multiple fatty acid β -oxidation enzymes and creatine kinase activity [(18–20) and our unpublished observations] additionally, *in vivo* myocardial ATP production was shown to be reduced in CCC as determined by ³¹P-NMR spectroscopy (21). Taken together, results suggest that mitochondrial dysfunction may contribute to the worse prognosis of CCC. Since inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α are abundantly produced and are top upstream regulators of gene expression changes in CCC myocardium (9), and the sustained ROS and RNS production are known inducers of cardiomyocyte damage and mitochondrial dysfunction (22, 23), we hypothesized that such cytokines contribute to mitochondrial dysfunction observed in CCC (5).

Thus, this study aimed to investigate 1) whether CCC myocardial tissue display increased levels of mitochondrial dysfunction and oxidative/nitrosative stress markers compared to non-chagasic dilated cardiomyopathy biopsies (DCM); 2) whether IFN- γ and TNF- α promote mitochondrial dysfunction and nitro-oxidative stress in the human cardiomyocyte cell line AC-16; 3) whether the mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes is

triggered by the cytokines through the STAT1/NF- κ B/NOS2 signaling pathway; 4) whether agonists of mitochondrial protection pathways, such as AMPK, NRF2 and SIRT1 ameliorate mitochondrial dysfunction driven by the IFN- γ and TNF- α .

METHODS

Ethics Statement

Tissue collection was approved by the Institutional Review Board of the University of São Paulo, School of Medicine (CAPPesq approval number 852/05) and written informed consent was obtained from the patients. All experimental methods comply with the Helsinki declaration.

Patients and Sample Collection

Human left ventricular free wall heart tissue was collected from end-stage heart failure CCC patients (n=40) and non-chagasic dilated cardiomyopathy (DCM, n=31) patients (NYHA class 3 and 4) at the moment of heart transplantation. CCC patients presented positive *T. cruzi* serology and typical heart conduction abnormalities (right bundle branch block and/or left anterior division hemiblock) and had a histopathological diagnosis of myocarditis, fibrosis and hypertrophy. All heart tissue samples were cleared from pericardium and fat and quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The list of patients is described in **Table 1**.

Reagents

Interferon-gamma (IFN- γ , 300-02) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α , 300-01A) were purchased from Peptotech. AMPK agonists Metformin hydrochloride (PHR1084), AICAR (A9978), Resveratrol (R5010); SIRT1 agonist SRT1720 (SRT1720) and NRF-2/HO-1 agonist Protoporphyrin IX cobalt chloride (C1900) were purchased from Sigma-Aldrich. Inhibitors of NF- κ B Emodin (E7881) and JSH23 (J4455); IKK β inhibitor IKK16 (SML1138); STAT1 inhibitor Fludarabine (F2773) and NOS2 inhibitor 1400W (W4262) were purchased from Sigma-Aldrich. Inhibitors of MEK1 and MEK2 PD98059 (ab120234), JNK SP600125 (ab120065) and MAPK SB202190 (ab120638) were purchased from Abcam. Reagents were dissolved in DMSO or water (Metformin and AICAR) at 100x stock concentrations and maximum DMSO concentration used in cells was 1%. Monoclonal antibody against 3-nitrotyrosine (ab61392) was purchased from Abcam. Monoclonal antibody against NF- κ B p65 (sc-8008) was purchased from Santa Cruz Biotechnology.

Cell Culture

Human adult ventricular cardiomyocytes cell line AC-16 was kindly provided by Dr. Mercy Davidson (Columbia University, USA) (24). The cell line was propagated using Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 medium with 12.5% fetal bovine serum (FBS) without antibiotics for no longer than 8 passages. AC-16 cells were screened monthly for mycoplasma contamination (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit, Lonza)

TABLE 1 | List of the patients included in this study.

Code	Etiology	Sex	Age	EF (%)
CCC-S01	Severe CCC	F	61	27
CCC-S02	Severe CCC	M	60	35
CCC-S03	Severe CCC	F	64	30
CCC-S04	Severe CCC	M	61	21
CCC-S05	Severe CCC	F	60	20
CCC-S06	Severe CCC	M	41	19
CCC-S07	Severe CCC	M	15	17
CCC-S08	Severe CCC	M	28	29
CCC-S09	Severe CCC	M	32	12
CCC-S10	Severe CCC	F	32	19
CCC-S11	Severe CCC	M	41	23
CCC-S12	Severe CCC	M	58	20
CCC-S13	Severe CCC	M	36	25
CCC-S14	Severe CCC	F	47	27
CCC-S15	Severe CCC	F	63	37
CCC-S16	Severe CCC	F	44	25
CCC-S17	Severe CCC	M	39	20
CCC-S18	Severe CCC	M	58	25
CCC-S19	Severe CCC	M	66	21
CCC-S20	Severe CCC	M	50	25
CCC-S21	Severe CCC	M	51	23
CCC-S22	Severe CCC	M	58	29
CCC-S23	Severe CCC	M	58	28
CCC-S24	Severe CCC	F	66	25
CCC-S25	Severe CCC	F	45	20
CCC-S26	Severe CCC	F	60	24
CCC-S27	Severe CCC	F	39	20
CCC-S28	Severe CCC	M	51	35
CCC-S29	Severe CCC	F	61	15
CCC-S30	Severe CCC	F	47	35
CCC-S31	Severe CCC	F	46	20
CCC-S32	Severe CCC	F	61	27
CCC-S33	Severe CCC	F	58	30
CCC-S34	Severe CCC	F	49	15
CCC-S35	Severe CCC	M	49	21
CCC-S36	Severe CCC	M	62	21
CCC-S37	Severe CCC	M	57	29
CCC-S38	Severe CCC	M	59	17
CCC-S39	Severe CCC	M	48	19
CCC-S40	Severe CCC	F	54	36
DCM-01	DCM	M	52	30
DCM-02	DCM	F	32	20
DCM-03	DCM	F	24	29
DCM-04	DCM	M	46	25
DCM-05	DCM	M	15	29
DCM-06	DCM	M	55	25
DCM-07	DCM	F	29	25
DCM-08	DCM	M	36	14
DCM-09	DCM	M	26	25
DCM-10	DCM	M	42	9
DCM-11	DCM			
DCM-12	DCM	F	57	27
DCM-13	DCM	M	48	39
DCM-14	DCM	F	66	20
DCM-15	DCM	M	43	26
DCM-16	DCM	M	53	19
DCM-17	DCM	M	39	28
DCM-18	DCM	M	58	21
DCM-19	DCM	F	12	22
DCM-20	DCM	F	56	18
DCM-21	DCM	M	29	26
DCM-22	DCM	M	61	27
DCM-23	DCM	M	15	20

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Code	Etiology	Sex	Age	EF (%)
DCM-24	DCM	F	58	17
DCM-25	DCM	M	28	16
DCM-26	DCM	M	56	16
DCM-27	DCM	M	27	25
DCM-28	DCM	F	53	27
DCM-29	DCM	M	51	15
DCM-30	DCM	M	56	35
DCM-31	DCM	M	37	16

and were authenticated by PCR-based DNA Profiling (Eurofins Genomics, France).

Cell Stimuli and Investigation of Molecular Pathways

AC-16 cells were seeded (10^3 cells per 0.34 cm^2) for 24 hours (h) prior to stimulation with 10 ng/ml IFN- γ , or with 5 ng/ml TNF- α or with IFN- γ plus TNF- α for 48h. In certain experiments, cells were treated with serially diluted, by a factor of two, with agonists of AMPK (metformin, AICAR and resveratrol), NRF2 (Protoporphyrin IX cobalt chloride), SIRT1 (SRT1720) or inhibitors of NF- κ B (Emodin, JSH23), IKK β (IKK16), STAT1 (Fludarabine), NOS2 (1400W), MEK1 and MEK2 (PD98059), JNK (SP600125) and MAPK (SB202190) in combination or not with IFN- γ , TNF- α or both. Compound doses that provided the highest effect on mitochondrial $\Delta\Psi$ m and less than 10% loss on cell number were selected for further analysis.

LDH Release Assay

The release of lactate dehydrogenase (LDH) in the conditioned media is an indicator of cell cytotoxicity. AC-16 cardiomyocytes were stimulated with the cytokines for 48h and the LDH content was quantified using a LDH-Cytotoxicity Assay Kit II (Abcam) using SpectraMax[®] Paradigm[®].

Mitochondrial Membrane Potential and Cellular ROS

AC-16 cardiomyocytes were seeded in 96 well black plate (Corning 3603) at a density of 10^3 cells per 0.34 cm^2 and incubated in a humidified incubator at 37°C and 5% CO_2 for 24h. Then, cells were stimulated with the cytokines with or without the agonists/inhibitors for 48h. For mitochondrial membrane potential, cells were multi-labeled with $1.0\text{ }\mu\text{M}$ of tetramethylrhodamine, methyl ester, perchlorate (TMRM, ThermoFisher Scientific), 400 nM of MitoTracker DeepRed (ThermoFisher Scientific), NucGreen dead (ReadyProbes) and $1.0\text{ }\mu\text{M}$ of Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific) at 37°C 5% CO_2 for 30 min. Cells were washed once with Hanks' Balanced Salt solution containing calcium and magnesium (HBSS++). Micrographs were captured using ImageXpress Micro XLS Widefield High-Content Analysis system (Molecular Devices) at $100\times$ magnification and the mitochondrial membrane potential was evaluated in live cells (NucGreen negative) using the web-based software Columbus 2.7.1.133403 (PerkinElmer Inc.). Overlapped TMRM and Mitotracker DeepRed fluorescence

were considered for the measurement of mitochondrial $\Delta\Psi$ m. For cellular ROS, stimulated cells were washed once with HBSS++ and then labeled in the dark with $10\text{ }\mu\text{M}$ of H_2DCFDA (Abcam) and $1.0\text{ }\mu\text{M}$ of Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific) at 37°C 5% CO_2 for 30 min and fluorescence were measured at Ex/Em $485/535\text{ nm}$ and $360/461\text{ nm}$ respectively using SpectraMax[®] Paradigm[®].

NF- κ B Translocation

Stimulated AC-16 cells were fixed with 4% paraformaldehyde, $\text{pH}=7.4$ for 15 min at room temperature (RT), then incubated with ice-cold 0.5% Triton-X for 15 min and blocked with 3% BSA in PBS for 1h RT. Cells were incubated with 1:50 monoclonal mouse anti-NF- κ B p65 (SC-8008, Santa Cruz Biotechnology) in PBS + 1% BSA overnight at 4°C , then washed and kept in the dark with goat anti-mouse IgG1 Cross-Adsorbed Secondary Antibody (P-21129, ThermoFisher Scientific) 1:1000 in PBS + 1% BSA for 1h RT. Nuclei were stained with $2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ of DAPI (ThermoFisher Scientific) for 1h RT and images were acquired using ImageXpress Micro XLS Widefield High-Content Analysis system (Molecular Devices) at $40\times$ magnification. Nuclear NF- κ B translocation was measured using the software Columbus 2.7.1.133403 (PerkinElmer Inc.).

Assessment of 3-Nitrotyrosine

Relative quantification of nitrated protein was performed by assessing 3-nitrotyrosine (3-NT) as a mean to detect nitrosative stress. Cardiac fragments and stimulated AC-16 cells were lysed in aqueous lysis solution containing 10 mM HEPES, 0.32 M sucrose, 0.1 mM Na_2EDTA , 1.0 mM dithiothreitol, $125\text{ }\mu\text{g/ml}$ PMSF and $1.0\text{ }\mu\text{l/ml}$ of proteinase inhibitor cocktail (Sigma), $\text{pH}=7.4$. Cardiac fragments were lysed in a tissue homogenizer (Precellys 24) pre-chilled 4°C using 2.8 mm ceramic beads for 3 cycles of 10s (seconds) with 15s intervals at 5500 rpm . Cells were lysed with 1.4 mm ceramic beads for 2 cycles of 30s with 10s intervals at 5000 rpm . Cardiac and cell lysates were clarified by centrifugation at $10,000\text{ rcf}$ for 30 min at 4°C . A total of $5\text{ }\mu\text{g}$ of proteins was added to a nitrocellulose membrane, dried at 60°C for 15 min and then blocked with 3% Blotting Grade Blocker (BioRad) + TBS-T, for 1h at RT, under stirring. Membrane was washed with TBS-T and incubated with 1:1000 primary monoclonal antibody 3-nitrotyrosine (Abcam) in 3% BSA + TBS-T overnight 4°C . Then, membrane was washed twice and incubated with 1:1000 secondary antibody for 2h at RT, under agitation and protected from light. Fluorescence was captured using a scanner (LI-COR, Odyssey) or ECL revelation. Ponceau S images were captured using ImageQuant LAS-400 (GE Healthcare) and used for protein normalization.

ATP and Nitrite Production

Nitrite (NO_2^-) was measured in the conditioned media (phenol-free) of stimulated AC-16 cells using Griess Reagent Kit for Nitrite Determination (Molecular Probes) according to manufacturer's instructions. The cells were collected and lysed with TE buffer (100 mM Tris, 4 mM EDTA, $\text{pH}=7.5$) and ATP measured with a luciferase-based assay kit (ATP Determination Kit, ThermoFisher Scientific) according to manufacturer's instructions.

Nitrite absorbance and ATP-derived luminescence were measured in AC-16 cardiomyocytes using SpectraMax® Paradigm® (Molecular Devices). Measurement of nitrite in myocardial homogenates was performed by chemiluminescence with Nitric Oxide Analyzer (NOA 280, Zysense, United Kingdom).

Bioenergetic Function Analysis

A Seahorse XFe24 Analyzer (Agilent, Les Ulis, France) was used to survey bioenergetic function by measuring the oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) of live cells. A quantity of 3,500 cells/0.32cm² were seeded in 150 µl of specific media, incubated for 1h at room temperature for adhesion and stimulated with 350 µl of specific media containing IFN-γ (10 ng/ml final) and TNF-α (5 ng/ml final) for 48h. OCR and ECAR were obtained from 90% confluent monolayer culture. All the experiments were done according to the protocol provided by the manufacturer. Briefly, the Agilent Seahorse Cell Mito Stress Test kit assesses mitochondrial function. Multiple parameters are obtained such as, basal respiration, ATP-linked respiration, maximal and reserve capacities, and non-mitochondrial respiration. The ATP Real-Time rate kit is the only assay that quantifies the ATP production from glycolysis and mitochondria simultaneously. The Agilent Seahorse Mito Fuel Flex Test kit measures the basal state of mitochondrial fuel oxidation in live cells by providing information on the relative contributions of glucose, glutamine and long-chain fatty acid oxidation to basal respiration. All analyses were performed using the software Wave 2.6.1 (Agilent, Les Ulis, France).

mtDNA Quantification

Total DNA from cardiac fragments and AC-16 cells was extracted using the DNA extraction kit FlexiGene DNA kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. PCR reaction was conducted using MAXIMA SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific), 1 ng of template DNA and primers for mitochondrial encoded genes NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit 1 (MT-ND1, 5 pmol/µl), cytochrome b (MT-CYTB, 5 pmol/µl), cytochrome c oxidase subunit 3 (MT-COXIII, 5 pmol/µl). Nuclear gene Telomerase (TERT, 15 pmol/µl) was used as the endogenous control. The PCR reactions were done in QuantStudio 12K (Applied Biosystem) with the following cycling program, 1 cycle of 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 50°C for 2 min, 95°C for 15s, and 60°C for 1 min. The ratio of mtDNA/nuDNA was calculated using the formula $2^{2\Delta\Delta CT}$ (25).

RNA Extraction and Sequencing

AC-16 cells were crushed with ceramic beads (VK05, diameter 1.4 mm) in 350 µl of RLT lysis buffer supplemented with 3.5 µl of β-mercapto-ethanol. Total RNA was extracted by using the RNeasy Mini Kit adapted with Trizol. RNA quantity was measured with a 2100 Bioanalyzer. Total RNA Sequencing was provided by Genewiz. Ribosomal RNAs have been depleted, and samples were prepared for sequencing according to the Illumina TruSeq RNA Preparation Kit and subjected to pairwise

sequencing (2x150 bp) with the Illumina Novaseq sequencer. After sequencing, the raw data files (fastq) were generated.

Differential Expression Analysis

Raw data quality has been verified with FastQC (v0.11.5). Low-quality reads, Illumina adapters and reads smaller than 20 nucleotides were removed with Trimmomatic (v0.39) (26), using default values for other options. Reads were aligned on GRCh37 (hg19) human reference genome from Ensembl using STAR (v2.5.4b) (27), specifying that the reads are 2x150 nucleotides (paired-end). Alignment quality has been checked by BAMQC (qualimap v2.2.1) (28). Gene quantification was done with featureCounts (v2.0.0) (29), using the exons as features and the genes as attributes. The DESeq2 package (v1.26.0) has been used to normalize data and to perform the differential expression test (30). To improve log₂ fold change accuracy, DESeq2 shrinkage function has been applied to the test results, and p-value was corrected with Benjamini-Hochberg method. Genes having an adjusted p-value ≤ 0.05 and a |log₂ (FC)| ≥ 1.5 were considered to be differentially expressed genes (DEG). Then, results were analyzed by graphical methods with EnhancedVolcano (v1.4.0) and ggplot2 packages. Moreover, hierarchical clustering (HCA) based on spearman correlation was computed using gplots (v3.0.4) package, and principal component analysis (PCA) with factoextra (v1.0.7) and FactoMineR (v2.3) packages. We compared the AC-16 gene expression profile with the CCC gene expression profile (GSE84796) (31).

Proteomic Analysis of AC-16 Cardiomyocytes

The proteomic analysis of AC-16 cells under IFN-γ (10 ng/ml) and TNF-α (5 ng/ml) treatment was assessed by high-resolution mass spectrometric analysis. After 48h incubation with the combination of IFN-γ and TNF-α, proteins from AC-16 were extracted using lysis buffer (12 mM sodium deoxycholate, 12 mM *N*-lauroylsarcosine sodium salt, 100 mM Tris-HCl, pH=9.0) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Total cell lysates from control and IFN-γ+TNF-α-treated cells were subject to in-solution trypsin digestion according to Phase Transfer Surfactant (PTS)-aided trypsin digestion protocol (32). Digested proteins were desalted using StageTip protocol (33) and dried by centrifugation under vacuum. Peptide samples were analyzed by RP-LC-MS/MS. For MS analysis, peptide mixtures were dissolved in 0.1% formic acid (solution A). Aliquots of 3 µl were automatically injected by a nano chromatography EASY-nLCII system (Thermo Scientific) on a 40 mm x 100 µm ID C-18 pre-column packed with Jupiter 10 µm resin (Phenomenex) and submitted to a chromatographic separation in a 100 mm x 75 µm ID C-18 column packed with Reprosil-Pur 3 µm C-18 beads (Dr. Maisch) coupled to an LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Peptides were eluted with a linear gradient of 5-30% solution B (0.1% formic acid in acetonitrile) at 200 nl/min for 55 min. Spray voltage was set at 2.5kV and the mass spectrometer was operated in data dependent mode, in which one full MS scan was acquired in the m/z range of 400-1,800 at 60,000 resolution (at 400m/z)

followed by collisional induced fragmentation (CID) and MS/MS acquisition of the ten most intense ions from MS scan. Unassigned and +1 charge states were not subjected to fragmentation. The maximum injection time and AGC target were set to 100ms (milliseconds) and 1E6 for full MS, and 10ms and 1E4 for MS/MS. The minimum signal threshold to trigger fragmentation event, isolation window and normalized collision energy (NCE) were set to, respectively, 1000 cps, 2m/z and 35%. Dynamic peak exclusion (list size of 500) was applied to avoid the same m/z of being selected for the next 30s. Mass spectrometric raw data were processed using the software MaxQuant [version 1.6.2.10 (34)] and searched against a target human protein database (*Homo sapiens*, UniprotKB reviewed, 26,526 sequences) for protein identification and quantification. A False Discovery Rate (FDR) of 1% was required for both protein and peptide identifications. Label Free Quantification [MaxLFQ (35)] method was enabled. T-test was used for relative protein quantification and p-values were adjusted with the Benjamini-Hochberg method. Proteins with adjusted p-values \leq 0.05 were considered to be differentially expressed.

Statistical Analysis

Cell data are reported as the ratio to non-treated cells. Cell viability was calculated as the ratio of the number of live cells (NucGreen-negative) and total cells (NucGreen-negative plus NucGreen-positive cells) \times 100. The results were expressed as mean \pm standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM) when noted. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 9.2.0 software (GraphPad Software, Inc., CA). Data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test before statistical tests. A nonparametric Mann-Whitney test was applied if data were not normally distributed. In all other cases, one-way ANOVA followed by Dunn's *post hoc* test was applied for multiple comparisons. A p-value $<$ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Increased RNS and Decreased mtDNA Content in CCC Myocardial Tissue

We compared the nitro-oxidative profile of CCC and DCM myocardium. We first measured nitrite, a reactive nitrogen species (RNS) marker, by chemiluminescence with a NO Analyzer. We observed that CCC biopsies possess higher content of nitrite (132%; $p <$ 0.001) in comparison to DCM lysates (Figure 1A). Detection of nitrotyrosine, an additional nitro-oxidative stress marker, was performed by dot-blot. We observed a significantly higher nitrotyrosine immunoreactivity in CCC (27%; $p <$ 0.01) than DCM myocardial lysates (Figure 1B), indicating previous exposure to peroxynitrite. Also, mitochondrial DNA (MT-ND1) was lower in CCC (44%; $p <$ 0.001) than DCM myocardial samples (Figure 1C) indicating a reduction of mitochondrial mass.

IFN- γ and TNF- α Impair AC-16 Cardiomyocyte Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

To investigate the role of IFN- γ and TNF- α on AC-16 cardiomyocytes, we stimulated the cells with several concentrations of IFN- γ and TNF- α and we measured the mitochondrial $\Delta\Psi_m$ in a high content screening platform. This was performed to establish the concentrations of the cytokines for subsequent analyses. We observed that IFN- γ impaired the $\Delta\Psi_m$ of AC-16 48h after stimulation and this impairment was enhanced when IFN- γ was combined with TNF- α ; TNF- α alone failed to cause statistically significant reductions in $\Delta\Psi_m$ (Figures 2A, B). We then selected the concentrations of 10 ng/ml of IFN- γ and 5 ng/ml of TNF- α and we detected that IFN- γ and TNF- α decrease $\Delta\Psi_m$ of mitochondria larger than 10 μm^2 (Figures 2C, D) and the impact is higher on larger mitochondria (Supplementary Figure 1). We performed the LDH assay of the selected doses of IFN- γ (10 ng/ml) and TNF- α (5 ng/ml) and we observed no cytotoxicity (Figure 2E).

Cytokine-Stimulated AC-16 Cells Display Increased RNS and Decreased ATP and mtDNA

We investigated whether IFN- γ and TNF- α prompt nitrosative and oxidative stress in AC-16 cardiomyocytes. We used the Griess reaction to measure nitrite in the supernatant of 48h IFN- γ and TNF- α -stimulated AC-16 cells. Nitrite accumulation in the supernatant of AC-16 was increased by TNF- α alone and not by IFN- γ or their combination after 48h of incubation (Figure 3A). Detection of 3-NT was performed by dot-blot. We observed that although IFN- γ or the cytokine combination induced a median increase of 25-72% in protein nitration, this was not statistically significant, most likely due to the high dispersion (Figure 3B). Cytokine treatment of AC-16 cardiomyocytes with IFN- γ , TNF- α and combined for 48h reduced the amount of MT-ND1 as compared to non-stimulated cells (Figure 3C). We also measured reactive oxygen species (ROS) production in AC-16 stimulated cells stained with the fluorogenic dye H₂DCFDA and we found a 43% increase in ROS after stimulation with IFN- γ and TNF- α and 23% with TNF- α (Figure 3D). In addition, luminescence assay also showed that the TNF- α alone or combined with IFN- γ decreased 50% and 58%, respectively, the ATP content in AC-16 cardiomyocytes (Figure 3E).

Molecular Pathways Analysis of Cytokine-Induced $\Delta\Psi_m$ Reduction

In order to better understand the mechanisms by which IFN- γ and TNF- α diminish AC-16 $\Delta\Psi_m$, cells were treated with several compounds that activate or inhibit specific pathways. Each drug was titrated and the concentration of each compound was selected based on the highest restorative effect on $\Delta\Psi_m$ and no more than 10% loss on cell number (Supplementary Figures 2, 3). Concurrent treatment showed that agonists of signaling pathways related to response to stress and mitochondrial protection, such as AMPK (metformin, AICAR, resveratrol),

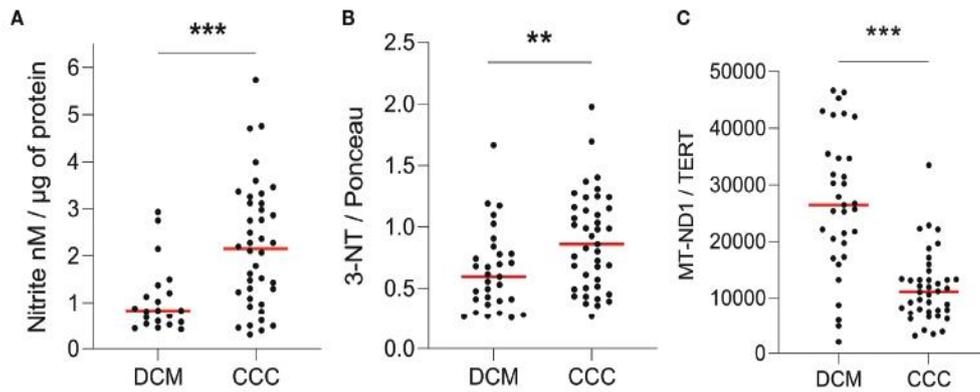


FIGURE 1 | Quantification of ROS, RNS and mitochondrial DNA in heart tissue. Lysates of left ventricular heart tissue were obtained from CCC (n = 40) and DCM (n = 31) patients and used for the quantification of **(A)** nitrite (nM) by chemiluminescence assay; **(B)** 3-nitrotyrosine by dot-blot and **(C)** copy number of the mitochondrial gene MT-ND1 by real time PCR. Red line: median; **p < 0.01; ***p < 0.001; Mann-Whitney test.

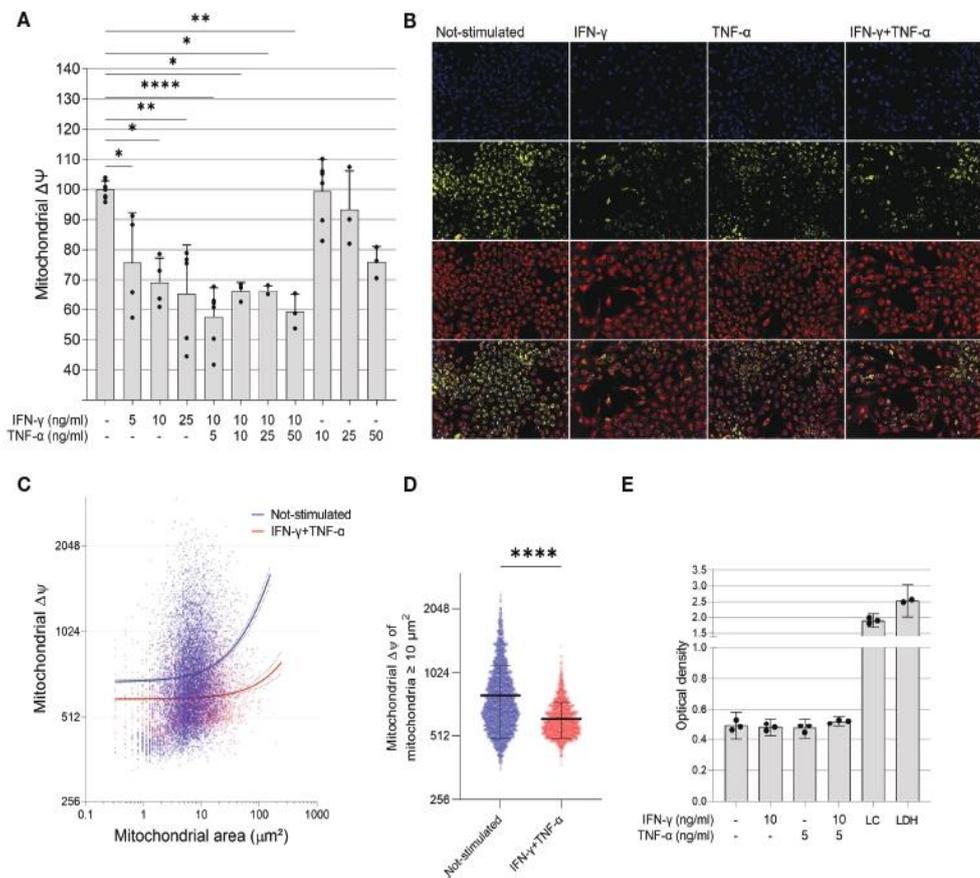


FIGURE 2 | Effect of IFN- γ and TNF- α on mitochondrial membrane potential in human cardiomyocytes AC-16 cells. Stimulated cells were multi-labelled with TMRM, Mitotracker DeepRed, NucGreen and DAPI. TMRM fluorescence was measured when colocalized with the fluorescence of Mitotracker Deep Red in live cells (NucGreen-negative). **(A)** IFN- γ and IFN- γ plus TNF- α downmodulate $\Delta\Psi_m$ 48h after stimulation. Data shown as percentage to not-stimulated cells. *p < 0.05; **p < 0.01; ****p < 0.0001; One-way Anova, Dunn's post test. **(B)** Representative micrographs of the effect of IFN- γ (10 ng/ml), TNF- α (5 ng/ml) and both on the fluorescence of TMRM. Magnification 100x. **(C)** Correlation between size (μm^2) and TMRM fluorescence intensity of segmented mitochondria of cells stimulated with 10 ng/ml of IFN- γ and 5 ng/ml of TNF- α . **(D)** $\Delta\Psi_m$ of mitochondria larger $\geq 10 \mu m^2$ of cells stimulated with 10 ng/ml of IFN- γ and 5 ng/ml of TNF- α . ****p < 0.0001 Mann-Whitney test. **(E)** Supernatant quantification of lactate dehydrogenase (LDH assay) on stimulated cells. Each dot in bar graphs represents an independent experimental replicate n \geq 3. LC: lysed AC-16 cells; LDH: lactate dehydrogenase positive control.

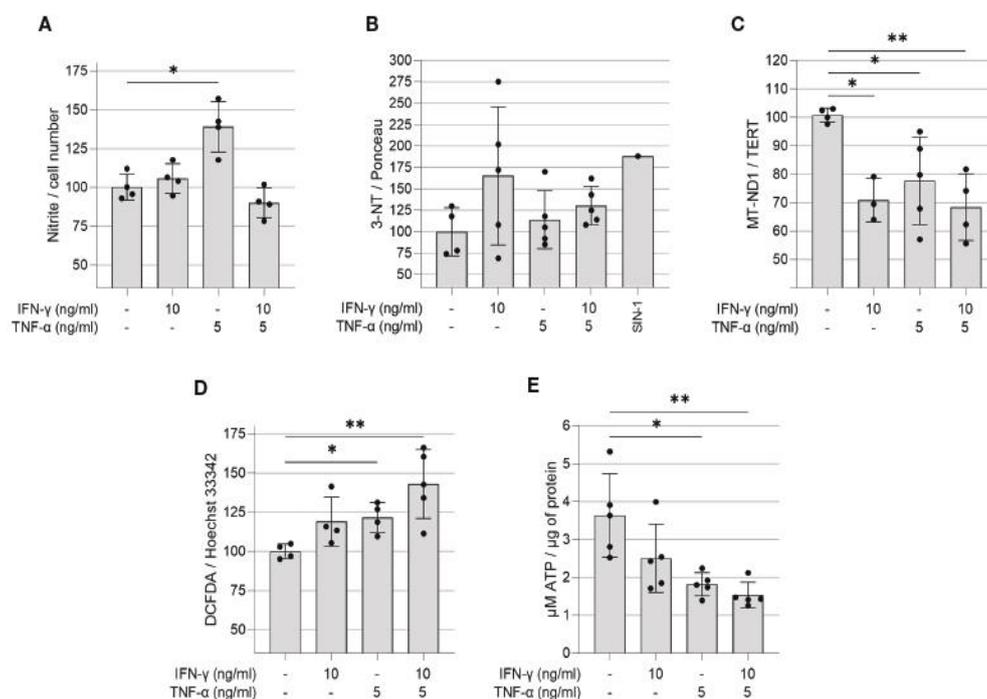


FIGURE 3 | Quantification of ROS, RNS, ATP and mitochondrial DNA in IFN- γ and TNF- α stimulated AC-16 cells. Human cardiomyocytes AC-16 cells were stimulated with 10 ng/ml of IFN- γ , 5 ng/ml of TNF- α or both for 48h. Then, cell lysates were used for the quantification of **(A)** nitrite (μ M) by Griess Reaction; **(B)** 3-nitrotyrosine by dot blot; **(C)** copy number of the mitochondrial gene MT-ND1 by real time PCR; **(D)** cellular reactive oxygen species (ROS) by fluorescence assay using the probe DCFDA and **(E)** ATP by luciferase-based assay. Data are shown as percentage to not-stimulated cells in **(A–D)** * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; one-way Anova Dunn's post test. Each dot represents an independent experiment $n \geq 3$.

NRF2 (Resveratrol and Protoporphyrin XI) and SIRT1 (SRT1720) restore $\Delta\Psi_m$ (Figures 4A–C). Additionally, inhibition of IFN- γ downstream molecules with selected antagonists such as fludarabine (STAT1 inhibitor), emodin (NF- κ B activation) JSH23 (NF- κ B nuclear translocation), IKK16 (I κ B kinase) and NOS2 (1400W) also restores AC-16 $\Delta\Psi_m$ (Figures 4D–G). Finally, inhibition of TNF- α -downstream molecules such as MEK (PD98059), JNK (SP600125) and MAPK (SB202190) also restores AC-16 $\Delta\Psi_m$ (Figures 4H–J respectively). The effect of NF- κ B inhibitors on NF- κ B nuclear translocation was validated by additional experiments. Immunocytochemistry shows that IFN- γ and TNF- α promote NF- κ B nuclear translocation (Figure 4K), which was antagonized with emodin and JSH23 and simultaneously restored $\Delta\Psi_m$ in AC-16 cardiomyocytes (Figures 4L–M). In addition, Figure 4N shows that NOS inhibitor 1400W significantly decreased nitrite accumulation caused by TNF- α ($p < 0.001$). A schematic representation of the signaling pathways and the targets of the compounds are detailed in Supplementary Figure 4.

IFN- γ +TNF- α Costimulation on the AC-16 Cell Line Induces a Significant Decrease of Total, Glycolysis and Mitochondrial ATP Production

The effect of IFN- γ +TNF- α stimulation on AC-16 was investigated by measuring the two major production pathways in mammalian

cells (glycolysis and oxidative phosphorylation). Twenty-two independent measurements were done on non-stimulated AC-16 cells and 16 independent measurements were done on IFN- γ +TNF- α stimulated AC-16 cells. The OCR, ECAR and PER values were used to calculate glycolytic and mitochondrial ATP (Figures 5A–D). IFN- γ +TNF- α induced a significant decrease of total ATP production (33%; $p=0.0001$) (Figure 5E), glycolysis ATP production (30%; $p<0.0001$) (Figure 5F), and the mitochondrial ATP production (41%; $p=0.02$) (Figure 5G) was in line with the previous finding (Figure 3E). The percentage of oxidative phosphorylation was unchanged (Figure 5H).

IFN- γ +TNF- α Costimulation on the AC-16 Cell Line Induces an Increase of the Basal Respiration, Maximal Respiration, and Spare Respiratory Capacity

Metabolic flux analyses were performed on AC-16 cells with or without cytokine stimulation during 48h ($n=21$) (Figure 5I). Figure 5J illustrates the parameters analyzed. Cytokine-stimulated AC-16 cardiomyocytes increased basal respiration (53%; $p=0.0007$) compared to unstimulated cells ($n=20$) (Figure 5K). Also, the cytokines increased 54% ($p=0.0009$) the basal respiration used to drive ATP production (Figure 5L). Cytokine stimulation for 48h induces a proton leak (51%) indicating alteration of the mitochondria integrity ($p=0.021$) (Figure 5M). We also identified that cytokine stimulation

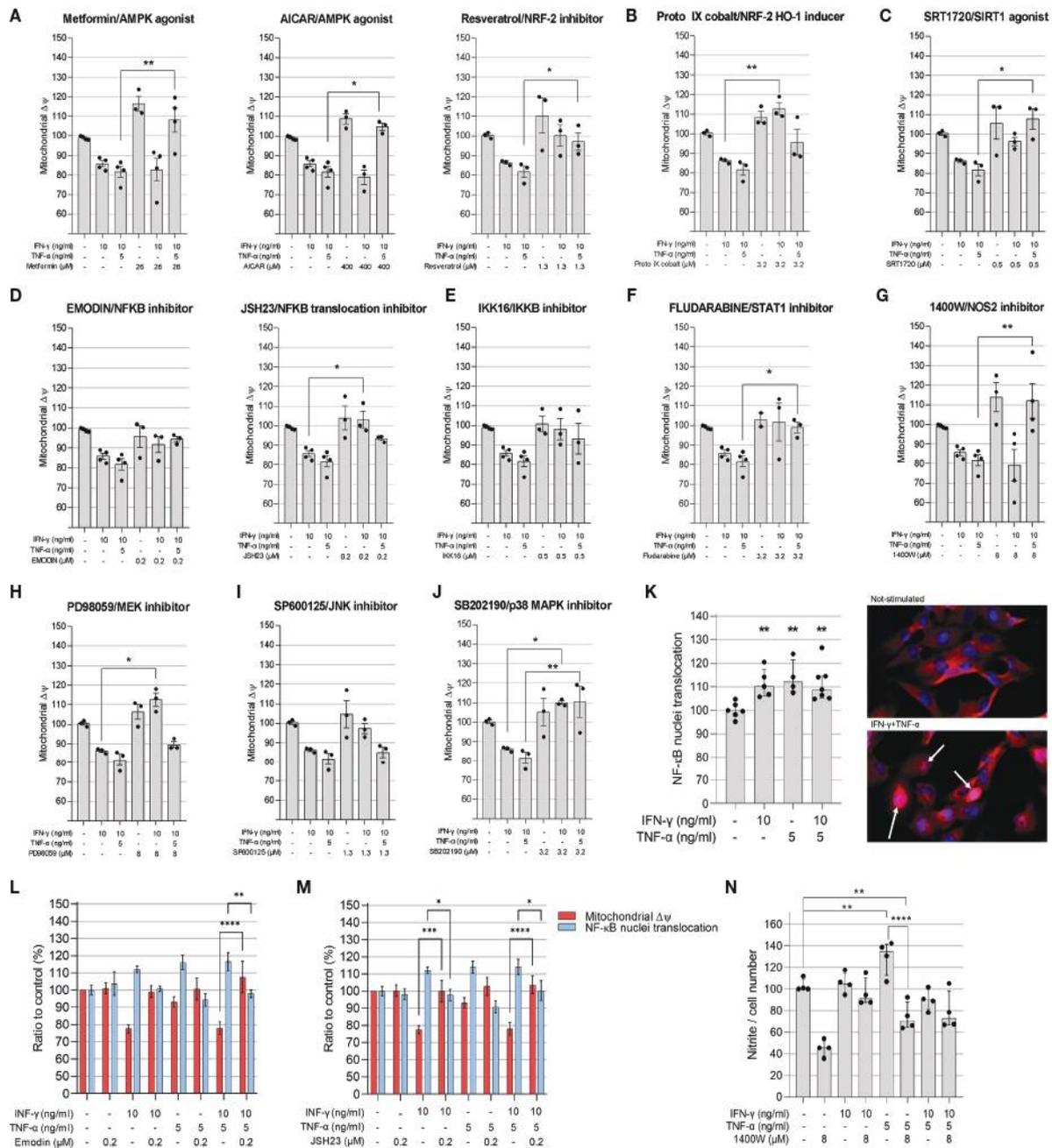


FIGURE 4 | Evaluation of compounds in the mitochondrial membrane potential of AC-16 cells. Selected doses of agonists of AMPK (A), NRF2 (B), SIRT1 (C) or inhibitors of NF-κB (D), IKKβ (E), STAT1 (F), NOS2 (G), MEK1 and MEK2 (H), JNK (I) and MAPK (J) were used alone or in combination with 10 ng/ml of IFN-γ or IFN-γ plus 5 ng/ml of TNF-α. Specific doses were selected based on the highest effect on mitochondrial ΔΨm and less than 10% loss on cell number. (K) The nuclear translocation of NF-κB in AC-16 cells was quantified by immunocytochemistry. Simultaneous measurement of ΔΨm and NF-κB translocation of cells stimulated with 10 ng/ml of IFN-γ or IFN-γ plus 5 ng/ml of TNF-α in combination with the NF-κB inhibitors (L) emodin and (M) JSH23. Statistics shown only when both ΔΨm and NF-κB translocation were significant. (N) the amount of nitrite (μM) in conditioned medium was measured by Griess reaction of cells stimulated with 10 ng/ml of IFN-γ or IFN-γ plus 5 ng/ml of TNF-α in combination with NOS2 inhibitor 1400W. Micrographs of NF-κB stains in the nucleus (white arrow). All data are shown as percentage to not-stimulated cells. Standard deviation is from ≥3 independent experiments. *p < 0.05; **p < 0.01; ****p < 0.0001 one-way Anova Dunn's post test.

increases the maximal respiration (44% higher) compared with unstimulated cells (p=0.0005) (Figure 5N). Similar results are obtained for the spare respiratory capacity, which is the difference between maximal respiration and basal respiration

(p=0.005) (Figure 5O). Cytokine stimulation also induced an increase in non-mitochondrial respiration (74%) compared to the non-mitochondrial respiration detected on unstimulated cells (p=0.014) (Figure 5P).

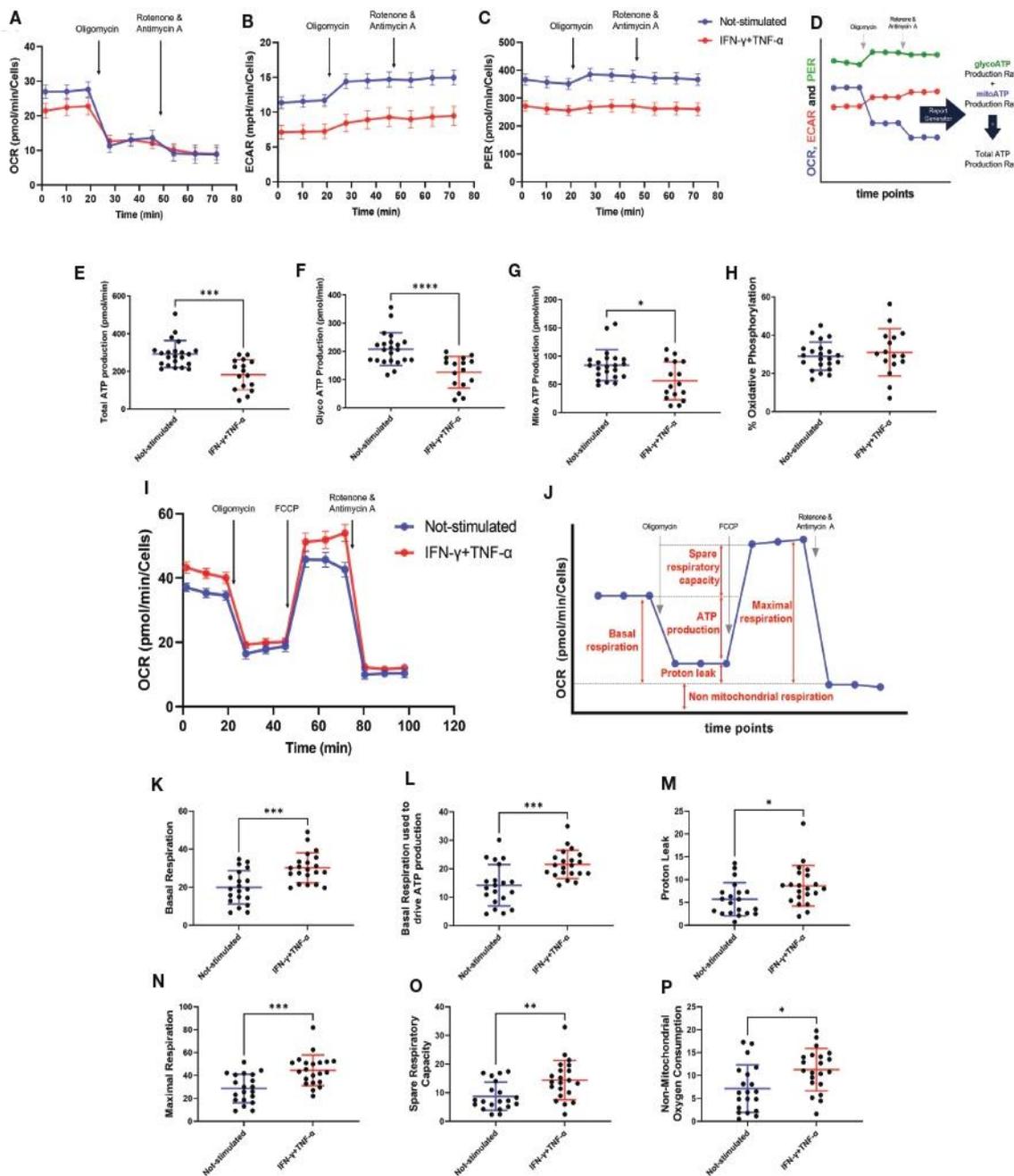


FIGURE 5 | Assessment of AC-16 respiration and ATP production in response to IFN- γ and TNF- α stimulation. Oxygen consumption rate (OCR), extracellular acidification rate (ECAR) and proton Efflux Rate (PER) of 48h IFN- γ (10 ng/ml) and TNF- α (5 ng/ml) -stimulated AC-16 cells were obtained in Seahorse XFe24 Analyzer. Arrows show injection of inhibitors of ATP synthase (oligomycin), mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler (FCCP) and OXPHOS complex I and III inhibitors (Rotenone and Antimycin A). **(A–C)** OCR, ECAR and PER measurement respectively obtained from ATP rate assay. **(D)** Calculation of mitochondrial and glycolytic ATP. **(E–G)** Quantification of total, glycolytic and mitochondrial ATP. **(H)** Percentage of oxidative phosphorylation. **(I)** OCR measurement of not-stimulated and cytokines-stimulated cells in the Mitostress test. **(J)** Representative graph showing the different parameters evaluated, such as **(K)** basal respiration, **(L)** basal respiration used to drive ATP production, **(M)** proton leak, **(N)** maximal respiration, **(O)** spare respiratory capacity and **(P)** non-mitochondrial oxygen consumption. Standard error of the mean in line graphs. Standard deviation is from ≥ 16 independent measurements. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ Mann-Whitney test.

IFN- γ +TNF- α Costimulation Decreases AC-16 Cells' Dependency of Fatty Acid and Glutamine Oxidation

We investigated the effect of IFN- γ +TNF- α on AC-16 cell's dependency and capacity of fuel oxidation using Seahorse. We

measured oxygen consumption after injection of different inhibitors (combined or not), such as: UK5099, inhibitor of the mitochondrial pyruvate carrier (MPC, glucose oxidation), BPTES, inhibitor of glutaminase GLS1 (KGA, glutamine oxidation) and etomoxir, an inhibitor of carnitine

palmitoyltransferase-1 (CPT-1, fatty acid oxidation). We then calculated the dependency, which is the cell's reliance on a particular fuel pathway to maintain basal respiration, and capacity, i.e. the ability of mitochondria to oxidize a fuel when other fuel pathways are inhibited.

We found that 48h stimulation with IFN- γ +TNF- α decreased 62% ($p=0.0104$ $n=9$) the reliance of AC-16 cells on glutamine (Figures 6A, D) and 87% dependency of fatty acid oxidation ($p=0.0411$ $n\geq 9$) (Figures 6B, E), with no effect on glucose dependency (Figures 6C, F). In addition, cells' capacity to oxidize fatty acid and glucose increased 46% ($p=0.0037$ $n\geq 10$ Figures 6H, K) and 105% ($p<0.0001$ $n\geq 11$ Figures 6I, L) respectively after stimulation with the cytokines. No changes were detected in glutamine capacity (Figures 6G, J). A summary of the global fuel oxidation of not-stimulated and cytokine-stimulated cells is shown in Figure 6M.

Mitochondrial Proteins Are Differentially Expressed Both in CCC and Cytokine-Treated AC-16 Cardiomyocytes

Extracted proteins from AC-16 were submitted to LC-MS/MS and comparative quantitative analysis of 1,211 identified proteins resulted in 275 differentially expressed proteins (DEP) between IFN- γ +TNF- α -treated AC-16 and non-treated AC-16; 37 DEPs were mitochondrial proteins, 25 being down-modulated and 12 up-regulated (Supplementary Table 1). Among downregulated proteins, 6 belonged to the TCA cycle and OXPHOS (ACO2, DLAT, FH, CS, NDUFV2, NDUFS8). We found reduced expression of two mitochondrial protein import enzymes (TIMM23, TOMM22) two linked to protein synthesis (RARS, GRSF1) and 2 to maintenance of mitochondrial membrane function and polarization (TRAP1, IMMT) and reduced levels of the ion carriers SLC25A40, SLC25A11, SLC25A3. We found downregulated proteins belonging to the lipid beta oxidation (ACOT13, HADH, FASN, ACAT1) and involved in ATP metabolism, ATP synthase regulation and ATP transport to the cytoplasm (ATPIF1, USMG5, PPIF and SLC25A6). PRDX3 and PRDX5 were downregulated and SOD2 was upregulated, consistent with oxidative stress. Reactome analysis of differentially expressed mitochondrial proteins disclosed repressed mitochondrial beta-oxidation and TCA cycle, increased glycolysis, increased mitochondrial protein import, ketone body metabolism and detoxification of reactive oxygen species. IPA canonical pathways analysis indicated mitochondrial dysfunction, reduced sirtuin-1 signaling, reduced TCA cycle, downregulated ketolysis, upregulation of superoxide radical degradation. A comparison of DEPs both in the cytokine-stimulated AC-16 cardiomyocytes and CCC myocardium (data not shown; submitted for publication) identified 19 matching proteins. Twelve out of the 19 were mitochondrial or related to energy metabolism, and 8 of them were similarly modulated in both proteome datasets. Among matching and differentially expressed mitochondrial proteins, we observed reduced expression of proteins including HADH and ACAT1 (fatty acid beta-oxidation), NDUFV2 (OXPHOS), and FH (TCA), with increased expression of PKM (glycolysis) and LAP3 (apoptosis).

Mitochondrial Genes Are Differentially Expressed in Cytokine-Treated AC-16 Cardiomyocytes

The AC-16 cell line was stimulated with IFN- γ and TNF- α during 1h to 48h. Gene expression analysis was performed in the various time points taking as reference the T=0h time point. We considered differentially expressed genes, genes characterized by a corrected p -value <0.05 (Benjamini Hochberg) and absolute \log_2 Fold Change >1.5 . A total of 1443 DEGs were detected in all these comparisons (Supplementary Table 2). These DEGs include mainly protein coding genes ($n=1149$, 79.6%), as well as pseudogenes ($n=68$, 4.7%), antisense ($n=89$, 6.2%) and lncRNAs ($n=94$, 6.5%). The largest number of DEGs were detected at 6h or 12h (T=1h: $n=214$; T=6h: $n=858$; T=12h: $n=847$; T=24h: $n=588$; T=48h: $n=234$). Volcano plots and heatmaps are described in Supplementary Figure 5 and Supplementary Table 3. The main pathways are linked to the immune response, to inflammation, to intracellular defense mechanisms, to fibrosis and cardiac diseases. Just after 1h of cytokine stimulation AC-16 cells increased the expression of cytokines and chemokines such as CXCL1, CCL2, CXCL2 and IL8, IRF1 and IRF9, indicating an interferon and pro-inflammatory signaling cascade with an overexpression of TNFAIP3 and NFKBIA which act as NFKB inhibitors. After 6h of stimulation, a large number of cytokine and chemokine genes and their receptors was upregulated, including CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IFNAR2, IFNGR2, STAT1, TNF, IL1A, IL1B, IL4R, IL6, IL7, IL7R, IL12A, IL15, IL15RA, IL20RB, IL21R, IL32, IL33 genes). We also performed the same experiments with IFN- γ or TNF- α alone (Figure 7 and Supplementary Table 4). Overall, we found 67 mitochondrial genes to be differentially expressed across at least one of the time points in response to combined cytokine stimulation. Differentially expressed mitochondrial genes peaked at 12h (46 genes) of which 25 were upregulated and 21 down-regulated (Supplementary Table 5). Among the top 10 canonical pathways of mitochondrial DEGs at 12h stimulus, we observed inhibition of the sirtuin signaling pathway, activation of aryl hydrocarbon receptor signaling, interferon signaling, and mitochondrial dysfunction. Toxicity-function pathways analysis at 12h indicated decreased transmembrane potential of mitochondria, fatty acid metabolism, mitochondrial dysfunction, pro-apoptosis, cardiac necrosis/cell death, cardiac hypertrophy among others (Supplementary Table 6). Mitochondrial dysfunction and decreased transmembrane potential were enriched toxicity functions in all time points starting at 6h (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we investigated the mitochondrial function, nitro-oxidative profile, and gene and protein expression of myocardial samples from CCC patients. We also surveyed the effect of IFN- γ and TNF- α in AC-16 cardiomyocytes' mitochondria. These

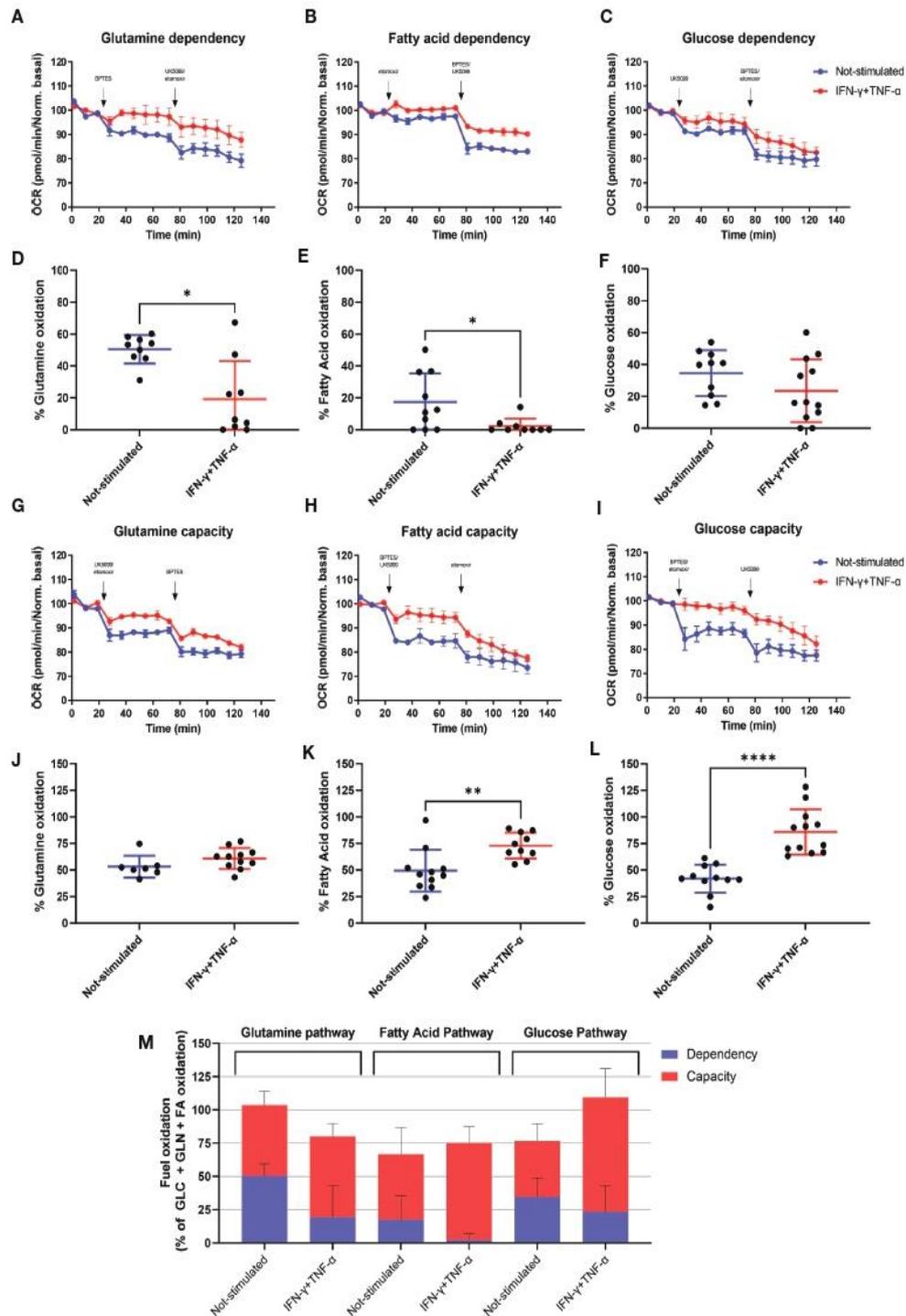


FIGURE 6 | Assessment of AC-16 fuel oxidation in response to IFN- γ and TNF- α stimulation. Oxygen consumption rate of 48h IFN- γ (10 ng/ml) and TNF- α (5 ng/ml)-stimulated AC-16 cells was obtained in Seahorse XFe24 Analyzer. Arrows show injection of inhibitors (combined or not) of molecules specific to different fuel oxidation pathways, such as; BPTES, inhibitor of glutaminase GLS1 (KGA, glutamine pathway), etomoxir, inhibitor of carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1, fatty acid pathway) and UK5099, inhibitor of the mitochondrial pyruvate carrier (MPC, glucose pathway). **(A–F)** OCR dependency of glutamine, fatty acid oxidation and glucose. **(G–I)** OCR capacity of glutamine, fatty acid oxidation and glucose. **(M)** Global fuel oxidation. Standard error of the mean in line graphs. Standard deviation is from ≥ 9 independent measurements. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ Mann-Whitney test.

cytokines are known to be selectively produced by the myocardium of CCC patients and not DCM (7–11, 36, 37). We have identified that CCC myocardium displays an increased nitro-oxidative stress profile, as well as reduced mtDNA content

in comparison to DCM samples and that these phenomena were also observed by IFN- γ /TNF- α treatment of AC-16 cardiomyocyte cell line. We performed mechanistic studies to better understand the role of the multiple signaling pathways in

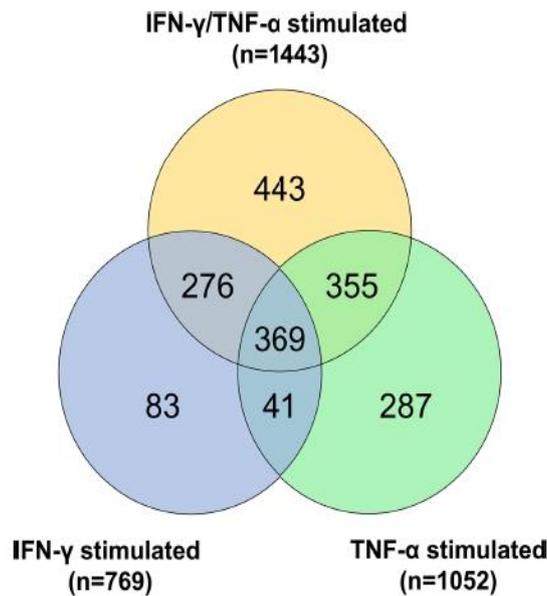


FIGURE 7 | Gene expression analysis on AC-16 cardiomyocytes. Cells were stimulated with IFN- γ (10 ng/ml) or TNF- α (5 ng/ml) or IFN- γ + TNF- α during 1 or 6 or 12 or 24 or 48h. On cardiomyocytes stimulated with TNF- α 1052 DEGs were detected whereas on cardiomyocytes stimulated with IFN- γ 769 DEGs were detected. Finally, on cardiomyocytes stimulated 48h with IFN- γ + TNF- α 1443 DEGs were detected. Venn diagram describes the DEGs shared by the various stimulations. Each stimulation was performed 4 times (4n).

the mitochondrial function of IFN- γ /TNF- α -treated AC-16 cardiomyocytes. We have found that the inhibition of STAT1/NF- κ B/NOS2 axis and activation of AMPK, NRF2 and SIRT1 signaling pathways promoted protective effects in the IFN- γ /TNF- α -induced impairment of mitochondrial $\Delta\Psi$. Pathways analysis of gene and protein expression involved mitochondrial dysfunction and decreased $\Delta\Psi_m$ were found in cytokine-treated AC-16 cells. In addition, we observed a cytokine-induced reduction in ATP production at the expense of mitochondrial energy metabolism in AC-16 cardiomyocytes that paralleled that observed in CCC myocardial tissue.

IFN- γ , but not TNF- α alone, was shown to impair the mitochondrial $\Delta\Psi_m$ of AC-16 cells. We also observed that concurrent treatment with IFN- γ and TNF- α results in a further decrease in $\Delta\Psi_m$, and this reduction is higher in larger mitochondria. This finding is especially crucial since the mitochondrial $\Delta\Psi_m$ is the OXPHOS proton motive force that drives ATP production through the ATP synthesis complex and thus it is an essential mechanism for contraction and survival of cardiac cells (38). Several *in vitro* studies have found the suppressing effect of TNF- α (39–42) and IFN- γ plus TNF- α (43) in mitochondrial $\Delta\Psi_m$ in different cell types.

IFN- γ exerts its deleterious effects in the mitochondria at least partially by potentiating TNF- α -mediated NF- κ B signaling (44). Activation of NF- κ B triggers transcriptional activity of NOS2, which in turn produces nitric oxide (NO) and in the presence of reactive oxygen species (ROS) produces peroxynitrite (ONOO $^-$) one of the most toxic and highly oxidative reactive species with substantial effects in mitochondria (45, 46). In our observations, IFN- γ and/or TNF- α can increase NF- κ B nuclear translocation,

nitrite and ROS production, and 3-nitrotyrosine accumulation in AC-16 cardiomyocytes. Peroxynitrite and protein nitration cause inactivation of enzymes, poly(ADP-ribosylation), mitochondrial dysfunction, impaired stress signaling and also potently inhibits myofibrillar creatine kinase (MM-CK), an important controller of heart contractility (47, 48) whose activity has been shown to be decreased in CCC (18). Increases in ROS by IFN- γ and/or TNF- α was also reported in several cell lines (39, 41, 49, 50), including cardiomyocytes (42, 51–53). Enhanced ROS production is associated with increased levels of lipid peroxidation, decreased mtDNA copy number and impaired OXPHOS capacity, affecting cardiomyocyte structure and function which triggers signaling pathways involved in myocardial remodeling and failure (54, 55). Enhanced oxidative stress has been observed in CCC heart tissue as measured by the accumulation of malondialdehyde (submitted for publication). We here reported reduction of mtDNA content in CCC myocardium and IFN- γ /TNF- α -stimulated cardiomyocytes. The mtDNA is a circular double stranded DNA located in the mitochondrial matrix and codes for 37 genes (56) and the 13 polypeptides are the essential subunits of the OXPHOS complexes I, III, IV, and V (56, 57). Deficiency in mtDNA replication was shown to cause ROS accumulation and oxidative stress in murine cardiomyocytes (58, 59), which is also indicative of a reduced mitochondrial mass. Thus, our data suggest that mtDNA reduction observed in the CCC myocardium might be linked to the oxidative stress observed in IFN- γ and TNF- α -treated human cardiomyocytes. This is corroborated by the gene and protein expression analysis in cytokine-treated AC-16 cardiomyocytes, where decreased levels of proteins involved in ATP generation mitochondrial protein

and ion import and mitochondrial structural maintenance proteins and upregulated expression of proteins involved in ATP catabolism and mitochondrial transition pore. In addition, we observed pathways analysis of CCC heart tissue indicative of mitochondrial dysfunction, increased oxidative stress, and cardiac necrosis, all pointing towards mitochondrial stress and reduced functional capacity. In line with these, stimulation with IFN- γ and TNF- α depleted ATP production in AC-16 cells. Previous studies described the dampening of energy metabolism enzymes in CCC heart tissue, such as ATP synthase α and creatine kinase activity in patients (18–20, 60) and studies with animal models correlated with this outcome (61). Decreased *in vivo* ATP production was also observed in the CCC myocardium (21). In addition, our group identified an accumulation of heterozygous pathogenic variations including loss-of-function and stopgain/truncation of key mitochondrial genes in CCC patients (62). The loss of function mutation in one of the studied families was dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) R135C. DHODH is involved in the oxidative phosphorylation by donating electrons to complex III and treatment with DHODH inhibitor Brequinar in IFN- γ +TNF- α -treated AC-16 cardiomyocytes caused additive damage to mitochondrial $\Delta\Psi_m$ (62).

The inhibition of IFN- γ and TNF- α downstream molecules and pathways - STAT1/NF- κ B, NOS2 - was important for the restoration of AC-16 $\Delta\Psi_m$ and reduction of nitrite levels in AC-16 cardiomyocytes. The inflammatory milieu (IFN- γ , TNF- α , and IL-1b) enhanced ROS production in *T. cruzi* infected cardiomyocytes (51). Also, ROS production directly signaled the nuclear translocation of RelA (p65), NF- κ B activation in AC-16 cells (63), indicating a positive feedback loop of stimulation between oxidative stress and NF- κ B signaling. Studies reported that long-term sustained increase in ROS and RNS promotes cardiomyocyte dysfunction and apoptosis (64) resulting in reduction of mitochondrial $\Delta\Psi_m$, lipid beta-oxidation (65) and ATP generation (66, 67).

We found that the treatment of AC-16 cells with agonists of AMPK (resveratrol, AICAR and metformin) and NRF2 (protoporphyrin IX cobalt and resveratrol) rescued $\Delta\Psi_m$. AMPK and NRF2 are involved in the cellular response to oxidative stress by countering the damaging effects of NF- κ B and by promoting ATP production and regulation of important physiological processes to restore heart function, such as autophagy (68–72). Our data showed that these agonists ameliorate IFN- γ /TNF- α -damaging effect to cardiomyocytes $\Delta\Psi_m$. Similarly, activation of AMPK (metformin) was shown to inhibit the enhancing effect of IFN- γ on the DOX-induced cardiotoxicity and prolonged the survival time in DOX-treated mice (65). Indeed, a recent study showed that antioxidants such as resveratrol and mitochondria-targeted antioxidants have potential benefits for the control of oxidative stress in the myocardium of mice with experimental Chagas disease cardiomyopathy (73). Our work potentially found the mechanistic link for the findings that treatment of chronically *T. cruzi*-infected mice with SIRT1 and/or AMPK agonists SIRT1720, resveratrol and metformin or antioxidants reduced

myocardial NF- κ B transcriptional activity, inflammation and oxidative stress, resulting in beneficial results for restoration of cardiac function (73, 74).

Our transcriptomic profiling on cytokine-stimulated AC-16 cardiomyocytes over time (0 to 48h) showed that a cardiomyocyte can respond to inflammatory stimuli by producing inflammatory cell-attracting chemokines and inflammatory cytokines on its own as early as 1h after stimulus, perpetuating inflammation. Previous studies by our group in a subset of 10 out of the 30 CCC samples studied here observed increased mRNA expression of multiple chemokines and cytokines (9, 36, 75) in CCC heart tissue. At each time point, several genes associated with the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway were differentially expressed. This pathway is also one of the main inducers of the NF- κ B pathway that is activated after inflammatory stimulus, ischemia/reperfusion, in congestive heart failure, dilated cardiomyopathy, after ischemic and pharmacological preconditioning, and in hypertrophy of isolated cardiomyocytes (76). Pathway analyses of gene and protein expression in the IFN- γ and TNF- α stimulated AC-16 cardiomyocytes profile were consistent with disturbances of ATP production and increased levels of reactive oxygen species. These metabolic changes affect cardiac ion channel gating, electrical conduction, intracellular calcium handling, and fibrosis formation.

As shown in the functional energy metabolism experiments, the integrity of the mitochondria is affected (proton leak). Therefore, cytokine-treated cardiomyocytes significantly increased their respiration (basal respiration, maximal respiration, spare respiratory capacity, as well as the percentage of basal respiration used to produce ATP. However, as mitochondria are less numerous (as seen with the reduced mitochondrial DNA) and their integrity is affected, the production of mitochondrial and glycolytic ATP is decreased in association with a significant decrease of the glutamine and fatty acid oxidation dependency – a reduction in metabolic flexibility that is found in failing hearts (77). This is in line with the IFN- γ and TNF- α induced NF- κ B activation and activation of expression of NADP oxidases, and inducible nitric oxide synthase (NOS2), leading to the production of large amounts of NO and reactive nitrogen species (12, 78, 79) leading to synthesis of the peroxynitrite anion (ONOO⁻) production, a strong oxidant arising from the reaction of NO with superoxide radical (O₂⁻) (46).

This study has limitations, since we studied frozen human heart tissue samples and cytokine-treated human cardiomyocytes *in vitro*. Although some of the changes observed in IFN- γ and TNF- α -treated AC-16 cardiomyocytes closely parallel those observed in CCC heart tissue, this convergence is not proof that the findings in tissue are induced by the same cytokines, since several other mechanisms can induce nitro-oxidative stress and mitochondrial damage in CCC myocardium and as a consequence of heart failure. Conversely, our results with cytokine-treated cardiomyocytes can bring insight not only about Chagas disease, but also in other cardiac disorders where IFN- γ and TNF- α play a role, such as inflammatory cardiomyopathies of other etiology.

This study demonstrated that stimulation with IFN- γ and TNF- α in human cardiomyocytes causes mitochondrial damage, oxidative and nitrosative stress, paralleling events observed in the cytokine-rich CCC heart tissue. It is important to notice that the part of the CCC samples analyzed here have been previously assessed for cytokine expression and IFN- γ was among the most highly expressed cytokine, while IFN- γ and TNF- α were the top upstream regulators (9, 36). Both CCC myocardium and stimulated cells exhibited damaging profiles in markers of cellular stress and increased ROS and RNS, and decreased ATP. Several mitochondrial-related pathways important for mitochondrial integrity, function and ATP production were dysregulated in cytokine-stimulated cells. Also, cytokine-stimulated cells exhibited impaired $\Delta\Psi_m$ and increased ROS and RNS and higher

amounts of ROS. It is important to point out the direct involvement of the STAT1/NF- κ B/NOS2 signaling pathway in the damaging effects of IFN- γ and TNF- α in cardiomyocytes' $\Delta\Psi_m$, as well as the restorative effects of stimulating the AMPK, NRF2 and SIRT1 pathways (Figure 8). Our results suggest that cytokine-induced disturbances in mitochondrial function and energy metabolism might play a role in the worse prognosis of Chagas disease cardiomyopathy. Therapy targeting mitochondrial function and energy imbalance should thus in principle be beneficial to restore cardiac function in CCC and other IFN- γ -dependent inflammatory heart diseases, like viral myocarditis and inflammatory cardiomyopathy of other etiologies, age-related myocardial inflammation and functional decline (80), myocardial infarction (81), and anthracycline antitumoral agent cardiotoxicity (65).

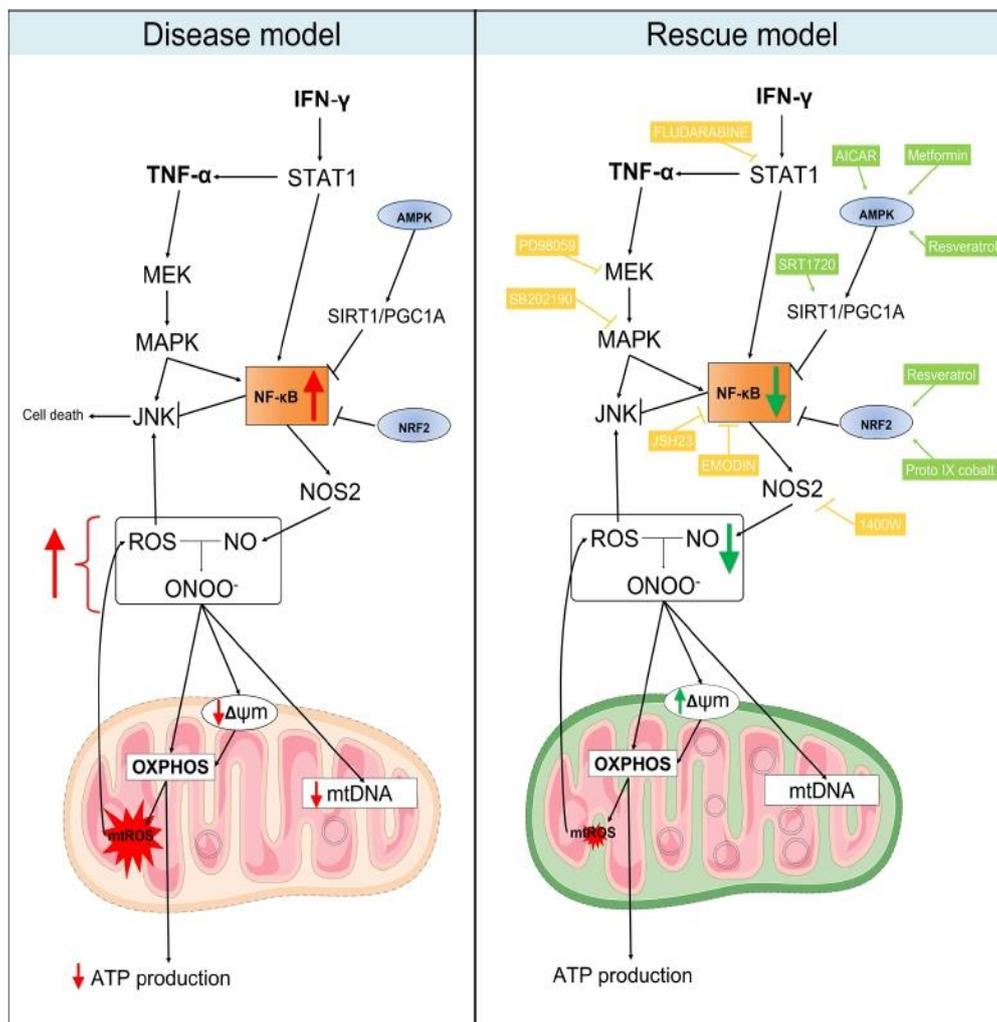


FIGURE 8 | Proposed model for the mitochondrial dysfunction in Chagas disease cardiomyopathy. Left panel: in summary, our results showed that heart tissues from CCC patients have increased production of RNS and reduced content of mitochondrial DNA in comparison with patients with DCM. Similarly, stimulation of AC-16 cardiomyocytes with IFN- γ /TNF- α increased ROS, RNS and proton leak, impaired $\Delta\Psi_m$, depleted ATP production and changed the metabolic profile of the cells. Right panel: in our rescue model, we showed that pharmacological inhibition of molecules involved in the IFN- γ /TNF- α /NF- κ B/NOS2 pathway ameliorated the $\Delta\Psi_m$ and NO production. Additionally, activation of AMPK/SIRT1 and NRF2 had beneficial impact on the $\Delta\Psi_m$. Thus, we hypothesize that mitochondrial dysfunction is driven by the excessive production of IFN- γ /TNF- α in CCC myocardium and is an essential component for the poor prognosis of Chagas disease cardiomyopathy. Mitochondria-targeted therapies might improve CCC disease progression. Compounds in yellow are inhibitors; Compounds in light green are agonists. Connecting arrows indicate activation and flat line means inhibitory interaction. Red and green arrows indicate the changes observed before and after treatment with the compounds.

Further studies with induced pluripotent stem cells derived cardiomyocytes (iPS-CM) can be employed to investigate, in a personalized, patient-specific manner, the effect of the cytokines in mitochondrial function.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

ETHICS STATEMENT

The protocol was also approved by the INSERM Internal Review Board and the Brazilian National Ethics in Research Commission (CONEP). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Study design: EC-N, CC, JN, FL, and JK. Phenotype characterization: EB, RS, FB, and PP. Experimental analysis: JN, PA, RA, EK, AH, LI, DA-S, KS, RV, DL, SB, FG, MT, and PT. Statistical analysis: HN, JN, PB, DG, and MM. Manuscript preparation: EC-N, CC, JN, and VP. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); the Aix-Marseille University (grant number: AMIDEX “International_2018” MITOMUTCHAGAS); the French Agency for Research (Agence Nationale de la Recherche-ANR (grant numbers: “Br-Fr-Chagas”, “landscardio”); the CNPq (Brazilian Council for Scientific and Technological Development); and the FAPESP (São Paulo State Research Funding Agency Brazil (grant numbers: 2013/50302-3, 2014/50890-5); the National Institutes of Health/USA (grant numbers: 2P50AI098461-02 and 2U19AI098461-06). This work was founded by the Inserm Cross-Cutting Project GOLD. This project has received funding from the Excellence Initiative of Aix-Marseille University - A*Midex a French “Investissements d’Avenir programme”- Institute MarMaRa AMX-19-IET-007. JN was a recipient of a MarMaRa fellowship. ECN and JK are recipients of productivity awards by CNPq. The funders did not play any role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Andréia Kuramoto Takara (Laboratory of Immunology, InCor) and Victor Debbas (Laboratory of Vascular Biology, InCor) for their always helpful technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.755862/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Stratification of mitochondria area and membrane potential after stimulation with IFN- γ and TNF- α in human cardiomyocytes AC-16 cells. Cells were stimulated with 10 ng/ml of IFN- γ + 5 ng/ml of TNF- α for 48 hours and then multi-labelled with TMRM, Mitotracker DeepRed, NucGreen and DAPI. TMRM fluorescence was measured when colocalized with the fluorescence of Mitotracker Deep Red in live cells (NucGreen-negative). Mitochondria were stratified based on their area in: lower than 5 (**A**), between 5-10 (**B**), between 10-25 (**C**), between 25-50 (**D**) and (**E**) higher than 50 μm^2 . (**F**) average (\pm SEM) value obtained from the mitochondrial membrane potential of each stratification of mitochondrial size. **** $p < 0.0001$; Mann Whitney test.

Supplementary Figure 2 | Compound screening in AC-16 mitochondrial membrane potential. AC-16 cells were treated with serially diluted agonists of AMPK (**A**), NRF2 (**B**), SIRT1 (**C**) or inhibitors of NF- κ B (**D**), IKK β (**E**), STAT1 (**F**), NOS2 (**G**), MEK1 and MEK2 (**H**), JNK (**I**) and MAPK (**J**) alone (blue line) or in combination with 10 ng/ml IFN- γ (red line) or 10 ng/ml of IFN- γ plus 5 ng/ml TNF- α (green line) for 48 hours. Specific doses were selected based on the highest effect on mitochondrial $\Delta\Psi\text{m}$ and less than 10% loss on cell number. The first dot of the titration (to the left) is without compounds. Grey arrows indicate concentrations selected for. All data are shown as percentage to not-stimulated cells. Standard error of the mean is from 3 independent experiments.

Supplementary Figure 3 | Compound screening in the cell number of AC-16. AC-16 cells were treated with serially diluted agonists of AMPK (**A**), NRF2 (**B**), SIRT1 (**C**) or inhibitors of NF- κ B (**D**), IKK β (**E**), STAT1 (**F**), NOS2 (**G**), MEK1 and MEK2 (**H**), JNK (**I**), MAPK (**J**) and DMSO (**K**) alone (blue line) or in combination with 10 ng/ml of IFN- γ (red line) or 10 ng/ml of IFN- γ plus 5 ng/ml of TNF- α (green line) for 48 hours. The first dot of each titration (to the left) is without compounds. Grey arrows indicate concentrations selected for. Standard error of the mean is from 3 independent experiments.

Supplementary Figure 4 | Schematic representation of the inhibitors and agonists and their targets in the IFN- γ and TNF- α signaling pathways. The pro-inflammatory cytokine IFN- γ interacts with its transmembrane receptor IFNGR1 and signals mainly through the signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and Interferon Regulatory Factor 1 (IRF1) intracellular transduction pathway to achieve transcriptional activation of IFN- γ -inducible genes, such as TNF- α and Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B). Activation of NF- κ B leads to an upregulation of Nitric oxide synthase 2 (NOS2) gene, which in turn increases the amount of intracellular nitric oxide (NO), reacting to reactive oxygen species (ROS) to generate peroxynitrite (ONOO \cdot). Arrows indicate activation and flat line means inhibitory interaction. While ONOO \cdot is important for pathogenic response, it causes damages to mitochondria, leading to reduction of mitochondria membrane potential and fragmentation. Proteins such AMPK and NRF2 are involved in the cellular response to oxidative stress countering the damaging effects of NF- κ B. Compounds highlighted in yellow are inhibitors and green are agonists.

Supplementary Figure 5 | Transcriptomic analysis on AC-16 cardiomyocyte cell line stimulated with IFN- γ and TNF- α . AC-16 cells were stimulated with IFN- γ and TNF- α during 1h to 48h. Gene expression analysis was done between the various time points taking as reference the T=0h time point. At each time is provided the volcano plot and the heatmap. Each stimulation was performed 4 times.

REFERENCES

- Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev* (2017) 3(1):7–11. doi: 10.15420/cfr.2016.25:2
- Bocchi EA, Bestetti RB, Scanavacca MI, Cunha Neto E, Issa VS. Chronic Chagas Heart Disease Management: From Etiology to Cardiomyopathy Treatment. *J Am Coll Cardiol* (2017) 70(12):1510–24. doi: 10.1016/j.jacc.2017.08.004
- Issa VS, Ayub-Ferreira SM, Schroyens M, Chizzola PR, Soares PR, Lage SHG, et al. The Course of Patients With Chagas Heart Disease During Episodes of Decompensated Heart Failure. *ESC Heart Fail* (2021) p. 1460–71. doi: 10.1002/ehf2.13232
- Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. *Mediators Inflamm* (2014) 2014:683230. doi: 10.1155/2014/683230
- Chevillard C, Nunes JPS, Frade AF, Almeida RR, Pandey RP, Nascimento MS, et al. Disease Tolerance and Pathogen Resistance Genes May Underlie. *Front Immunol* (2018) 9:2791. doi: 10.3389/fimmu.2018.02791
- Frade-Barros AF, Ianni BM, Cabantous S, Pissetti CW, Saba B, Lin-Wang HT, et al. Polymorphisms in Genes Affecting Interferon- γ Production and Th1 T Cell Differentiation Are Associated With Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy. *Front Immunol* (2020) 11:1386. doi: 10.3389/fimmu.2020.01386
- Reis MM, Higuchi MEL, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, et al. An *in Situ* Quantitative Immunohistochemical Study of Cytokines and IL-2R+ in Chronic Human Chagasic Myocarditis: Correlation With the Presence of Myocardial Trypanosoma Cruzi Antigens. *Clin Immunol Immunopathol* (1997) 83(2):165–72. doi: 10.1006/clin.1997.4335
- Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas' Disease Cardiomyopathy Patients Display an Increased IFN-Gamma Response to Trypanosoma Cruzi Infection. *J Autoimmun* (2001) 17(1):99–107. doi: 10.1006/jaut.2001.0523
- Laugier L, Ferreira LRP, Ferreira FM, Cabantous S, Frade AF, Nunes JP, et al. miRNAs may Play a Major Role in the Control of Gene Expression in Key Pathobiological Processes in Chagas Disease Cardiomyopathy. *PLoS Negl Trop Dis* (2020) 14(12):e0008889. doi: 10.1371/journal.pntd.0008889
- Reis DD, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, et al. Characterization of Inflammatory Infiltrates in Chronic Chagasic Myocardial Lesions: Presence of Tumor Necrosis Factor-Alpha+ Cells and Dominance of Granzyme A+, CD8+ Lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* (1993) 48(5):637–44. doi: 10.4269/ajtmh.1993.48.637
- Rocha Rodrigues DB, dos Reis MA, Romano A, Pereira SA, Teixeira VEP, Tostes S, et al. *In Situ* Expression of Regulatory Cytokines by Heart Inflammatory Cells in Chagas' Disease Patients With Heart Failure. *Clin Dev Immunol* (2012) 2012:361730. doi: 10.1155/2012/361730
- Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F. Defective Nitric Oxide Effector Functions Lead to Extreme Susceptibility of Trypanosoma Cruzi-Infected Mice Deficient in Gamma Interferon Receptor or Inducible Nitric Oxide Synthase. *Infect Immun* (1998) 66(3):1208–15. doi: 10.1128/IAI.66.3.1208-1215.1998
- Wu Y, Antony S, Juhasz A, Lu J, Ge Y, Jiang G, et al. Up-Regulation and Sustained Activation of Stat1 Are Essential for Interferon-Gamma (IFN-Gamma)-Induced Dual Oxidase 2 (Duox2) and Dual Oxidase A2 (DuoxA2) Expression in Human Pancreatic Cancer Cell Lines. *J Biol Chem* (2011) 286(14):12245–56. doi: 10.1074/jbc.M110.191031
- Kuroda J, Sadoshima J. NADPH Oxidase and Cardiac Failure. *J Cardiovasc Transl Res* (2010) 3(4):314–20. doi: 10.1007/s12265-010-9184-8
- Sirker A, Zhang M, Murdoch C, Shah AM. Involvement of NADPH Oxidases in Cardiac Remodelling and Heart Failure. *Am J Nephrol* (2007) 27(6):649–60. doi: 10.1159/000109148
- Brown DA, Perry JB, Allen ME, Sabbah HN, Stauffer BL, Shaikh SR, et al. Expert Consensus Document: Mitochondrial Function as a Therapeutic Target in Heart Failure. *Nat Rev Cardiol* (2017) 14(4):238–50. doi: 10.1038/nrcardio.2016.203
- Chen L, Knowlton AA. Mitochondria and Heart Failure: New Insights Into an Energetic Problem. *Minerva Cardioangiol* (2010) 58(2):213–29.
- Teixeira PC, Santos RH, Fiorelli AI, Bilate AM, Benvenuti LA, Stolf NA, et al. Selective Decrease of Components of the Creatine Kinase System and ATP Synthase Complex in Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *PLoS Negl Trop Dis* (2011) 5(6):e1205. doi: 10.1371/journal.pntd.0001205
- Wen JJ, Dhiman M, Whorton EB, Garg NJ. Tissue-Specific Oxidative Imbalance and Mitochondrial Dysfunction During Trypanosoma Cruzi Infection in Mice. *Microbes Infect* (2008) 10(10-11):1201–9. doi: 10.1016/j.micinf.2008.06.013
- Wan X, Gupta S, Zago MP, Davidson MM, Dousset P, Amoroso A, et al. Defects of mtDNA Replication Impaired Mitochondrial Biogenesis During Trypanosoma Cruzi Infection in Human Cardiomyocytes and Chagasic Patients: The Role of Nrf1/2 and Antioxidant Response. *J Am Heart Assoc* (2012) 1(6):e003855. doi: 10.1161/JAHA.112.003855
- Leme AM, Salemi VM, Parga JR, Ianni BM, Mady C, Weiss RG, et al. Evaluation of the Metabolism of High Energy Phosphates in Patients With Chagas' Disease. *Arq Bras Cardiol* (2010) 95(2):264–70. doi: 10.1590/S0066-782X2010005000099
- Lee HJ, Oh YK, Rhee M, Lim JY, Hwang JY, Park YS, et al. The Role of STAT1/IRF-1 on Synergistic ROS Production and Loss of Mitochondrial Transmembrane Potential During Hepatic Cell Death Induced by LPS/d-GalN. *J Mol Biol* (2007) 369(4):967–84. doi: 10.1016/j.jmb.2007.03.072
- Meyer A, Laverny G, Allenbach Y, Grelet E, Ueberschlag V, Echaniz-Laguna A, et al. IFN- β -Induced Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Damage Contribute to Muscle Impairment and Inflammation Maintenance in Dermatomyositis. *Acta Neuropathol* (2017) 134(4):655–66. doi: 10.1007/s00401-017-1731-9
- Davidson MM, Nesti C, Palenzuela L, Walker WF, Hernandez E, Protas L, et al. Novel Cell Lines Derived From Adult Human Ventricular Cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* (2005) 39(1):133–47. doi: 10.1016/j.yjmcc.2005.03.003
- Quiros PM, Goyal A, Jha P, Auwerx J. Analysis of mtDNA/nDNA Ratio in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* (2017) 7(1):47–54. doi: 10.1002/cpmo.21
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* (2014) 30(15):2114–20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner. *Bioinformatics* (2013) 29(1):15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635
- Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: Advanced Multi-Sample Quality Control for High-Throughput Sequencing Data. *Bioinformatics* (2016) 32(2):292–4. doi: 10.1093/bioinformatics/btv566
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. FeatureCounts: An Efficient General Purpose Program for Assigning Sequence Reads to Genomic Features. *Bioinformatics* (2014) 30(7):923–30. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data With Deseq2. *Genome Biol* (2014) 15(12):550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Laugier L, Frade AF, Ferreira FM, Baron MA, Teixeira PC, Cabantous S, et al. Whole Genome Cardiac DNA Methylation Fingerprint and Gene Expression Analysis Provide New Insights in the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* (2017) p. 1103–11. doi: 10.1093/cid/cix506
- Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. Phase Transfer Surfactant-Aided Trypsin Digestion for Membrane Proteome Analysis. *J Proteome Res* (2008) 7(2):731–40. doi: 10.1021/pr700658q
- Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for Micro-Purification, Enrichment, Pre-Fractionation and Storage of Peptides for Proteomics Using StageTips. *Nat Protoc* (2007) 2(8):1896–906. doi: 10.1038/nprot.2007.261
- Cox J, Mann M. MaxQuant Enables High Peptide Identification Rates, Individualized P.P.B.-Range Mass Accuracies and Proteome-Wide Protein Quantification. *Nat Biotechnol* (2008) 26(12):1367–72. doi: 10.1038/nbt.1511
- Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate Proteome-Wide Label-Free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* (2014) 13(9):2513–26. doi: 10.1074/mcp.M113.031591
- Nogueira LG, Santos RH, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, Bocchi EA, et al. Myocardial Gene Expression of T-Bet, GATA-3, Ror- γ t, FoxP3, and Hallmark Cytokines in Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy: An Essentially Unopposed TH1-Type Response. *Mediators Inflamm* (2014) 2014:914326. doi: 10.1155/2014/914326

37. Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, Abel L, Guilherme L, Bocchi E, et al. Cytokine Production Profile of Heart-Infiltrating T Cells in Chagas' Disease Cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res* (1998) 31(1):133–7. doi: 10.1590/S0100-879X1998000100018
38. Kolwicz SC, Purohit S, Tian R. Cardiac Metabolism and Its Interactions With Contraction, Growth, and Survival of Cardiomyocytes. *Circ Res* (2013) 113(5):603–16. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.302095
39. Kastl L, Sauer S, Beissbarth T, Becker M, Krammer P, Gülow K. TNF- α Stimulation Enhances ROS-Dependent Cell Migration via NF- κ B Activation in Liver Cells. *Free Radic Biol Med* (2014) 75(Suppl 1):S32. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.765
40. Doll DN, Rellick SL, Barr TL, Ren X, Simpkins JW. Rapid Mitochondrial Dysfunction Mediates TNF- α -Induced Neurotoxicity. *J Neurochem* (2015) 132(4):443–51. doi: 10.1111/jnc.13008
41. Gottlieb E, Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-X(L) Prevents the Initial Decrease in Mitochondrial Membrane Potential and Subsequent Reactive Oxygen Species Production During Tumor Necrosis Factor α -Induced Apoptosis. *Mol Cell Biol* (2000) 20(15):5680–9. doi: 10.1128/MCB.20.15.5680-5689.2000
42. Cao YY, Chen ZW, Gao YH, Wang XX, Ma JY, Chang SF, et al. Exenatide Reduces Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis in Cardiomyocytes by Alleviating Mitochondrial Dysfunction. *Chin Med J (Engl)* (2015) 128(23):3211–8. doi: 10.4103/0366-6999.170259
43. Maiti AK, Sharba S, Navabi N, Forsman H, Fernandez HR, Lindén SK. IL-4 Protects the Mitochondria Against Tnf α and Ifn γ Induced Insult During Clearance of Infection With *Citrobacter Rodentium* and *Escherichia Coli*. *Sci Rep* (2015) 5:15434. doi: 10.1038/srep15434
44. Cheshire JL, Baldwin AS. Synergistic Activation of NF- κ B by Tumor Necrosis Factor α and Gamma Interferon via Enhanced I κ B Alpha Degradation and De Novo I κ B Alpha Degradation. *Mol Cell Biol* (1997) 17(11):6746–54. doi: 10.1128/MCB.17.11.6746
45. Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, Kaarniranta K, Salminen A. Antagonistic Crosstalk Between NF- κ B and SIRT1 in the Regulation of Inflammation and Metabolic Disorders. *Cell Signal* (2013) 25(10):1939–48. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.06.007
46. Rakshit S, Chandrasekar BS, Saha B, Victor ES, Majumdar S, Nandi D. Interferon-Gamma Induced Cell Death: Regulation and Contributions of Nitric Oxide, Cjun N-Terminal Kinase, Reactive Oxygen Species and Peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* (2014) 1843(11):2645–61. doi: 10.1016/j.bbamer.2014.06.014
47. Mihm MJ, Coyle CM, Schanbacher BL, Weinstein DM, Bauer JA. Peroxynitrite Induced Nitration and Inactivation of Myofibrillar Creatine Kinase in Experimental Heart Failure. *Cardiovasc Res* (2001) 49(4):798–807. doi: 10.1016/S0008-6363(00)00307-2
48. Stavniichuk R, Shevalye H, Lupachyk S, Obrosova A, Groves JT, Obrosova IG, et al. Peroxynitrite and Protein Nitration in the Pathogenesis of Diabetic Peripheral Neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev* (2014) 30(8):669–78. doi: 10.1002/dmrr.2549
49. Wang F, Zhang S, Jeon R, Vuckovic I, Jiang X, Lerman A, et al. Interferon Gamma Induces Reversible Metabolic Reprogramming of M1 Macrophages to Sustain Cell Viability and Pro-Inflammatory Activity. *EBioMedicine* (2018) 30:303–16. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.02.009
50. Koo SJ, Chowdhury IH, Szczesny B, Wan X, Garg NJ. Macrophages Promote Oxidative Metabolism To Drive Nitric Oxide Generation in Response to *Trypanosoma Cruzi*. *Infect Immun* (2016) 84(12):3527–41. doi: 10.1128/IAI.00809-16
51. Gupta S, Bhatia V, Wen JJ, Wu Y, Huang MH, Garg NJ. *Trypanosoma Cruzi* Infection Disturbs Mitochondrial Membrane Potential and ROS Production Rate in Cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med* (2009) 47(10):1414–21. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.008
52. Estrada D, Specker G, Martínez A, Dias PP, Hissa B, Andrade LO, et al. Cardiomyocyte Diffusible Redox Mediators Control. *Biochem J* (2018) 475(7):1235–51. doi: 10.1042/BCJ20170698
53. Roberge S, Roussel J, Andersson DC, Meli AC, Vidal B, Blandel F, et al. TNF- α -Mediated Caspase-8 Activation Induces ROS Production and TRPM2 Activation in Adult Ventricular Myocytes. *Cardiovasc Res* (2014) 103(1):90–9. doi: 10.1093/cvr/cvu112
54. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, et al. Mitochondrial Electron Transport Complex I Is a Potential Source of Oxygen Free Radicals in the Failing Myocardium. *Circ Res* (1999) 85(4):357–63. doi: 10.1161/01.RES.85.4.357
55. Dutta D, Calvani R, Bernabei R, Leeuwenburgh C, Marzetti E. Contribution of Impaired Mitochondrial Autophagy to Cardiac Aging: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Circ Res* (2012) 110(8):1125–38. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.246108
56. Elorza AA, Sofia JP. mtDNA Heteroplasmy at the Core of Aging-Associated Heart Failure. An Integrative View of OXPHOS and Mitochondrial Life Cycle in Cardiac Mitochondrial Physiology. *Front Cell Dev Biol* (2021) 9:625020. doi: 10.3389/fcell.2021.625020
57. Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells* (2019) 8(4):1–15. doi: 10.3390/cells8040379
58. Lewis W, Day BJ, Kohler JJ, Hosseini SH, Chan SS, Green EC, et al. Decreased mtDNA, Oxidative Stress, Cardiomyopathy, and Death From Transgenic Cardiac Targeted Human Mutant Polymerase Gamma. *Lab Invest* (2007) 87(4):326–35. doi: 10.1038/labinvest.3700523
59. Blasco N, Cámara Y, Núñez E, Beà A, Barés G, Forné C, et al. Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by Endonuclease G Deficiency Requires Reactive Oxygen Radicals Accumulation and Is Inhibitable by the Micropeptide Humanin. *Redox Biol* (2018) 16:146–56. doi: 10.1016/j.redox.2018.02.021
60. Cunha-Neto E, Teixeira PC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Myocardial Gene and Protein Expression Profiles After Autoimmune Injury in Chagas' Disease Cardiomyopathy. *Autoimmun Rev* (2011) 10(3):163–5. doi: 10.1016/j.autrev.2010.09.019
61. Garg N, Gerstner A, Bhatia V, DeFord J, Papaconstantinou J. Gene Expression Analysis in Mitochondria From Chagasic Mice: Alterations in Specific Metabolic Pathways. *Biochem J* (2004) 381(Pt 3):743–52. doi: 10.1042/BJ20040356
62. Ouarhache M, Marquet S, Frade AF, Ferreira AM, Ianni B, Almeida RR, et al. Rare Pathogenic Variants in Mitochondrial and Inflammation-Associated Genes May Lead to Inflammatory Cardiomyopathy in Chagas Disease. *J Clin Immunol* (2021) 41(July 2021):1048–63. doi: 10.1007/s10875-021-01000-y
63. Ba X, Gupta S, Davidson M, Garg NJ. *Trypanosoma Cruzi* Induces the Reactive Oxygen Species-PARP-1-RelA Pathway for Up-Regulation of Cytokine Expression in Cardiomyocytes. *J Biol Chem* (2010) 285(15):11596–606. doi: 10.1074/jbc.M109.076984
64. Levick SP, Goldspink PH. Could Interferon-Gamma be a Therapeutic Target for Treating Heart Failure? *Heart Fail Rev* (2014) 19(2):227–36. doi: 10.1007/s10741-013-9393-8
65. Ni C, Ma P, Wang R, Lou X, Liu X, Qin Y, et al. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity Involves Ifn γ -Mediated Metabolic Reprogramming in Cardiomyocytes. *J Pathol* (2019) 247(3):320–32. doi: 10.1002/path.5192
66. Buoncervello M, Maccari S, Ascione B, Gambardella L, Marconi M, Spada M, et al. Inflammatory Cytokines Associated With Cancer Growth Induce Mitochondria and Cytoskeleton Alterations in Cardiomyocytes. *J Cell Physiol* (2019) 234(11):20453–68. doi: 10.1002/jcp.28647
67. Gupta S, Dhiman M, Wen JJ, Garg NJ. ROS Signalling of Inflammatory Cytokines During *Trypanosoma Cruzi* Infection. *Adv Parasitol* (2011) 76:153–70. doi: 10.1016/B978-0-12-385895-5.00007-4
68. Cuadrado A, Manda G, Hassan A, Alcaraz MJ, Barbas C, Daiber A, et al. Transcription Factor NRF2 as a Therapeutic Target for Chronic Diseases: A Systems Medicine Approach. *Pharmacol Rev* (2018) 70(2):348–83. doi: 10.1124/pr.117.014753
69. Sivandzade F, Prasad S, Bhalerao A, Cucullo L. NRF2 and NF- κ B Interplay in Cerebrovascular and Neurodegenerative Disorders: Molecular Mechanisms and Possible Therapeutic Approaches. *Redox Biol* (2019) 21:101059. doi: 10.1016/j.redox.2018.11.017
70. Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules* (2020) 25(22):1–31. doi: 10.3390/molecules25225474
71. Li X, Liu J, Lu Q, Ren D, Sun X, Rousselle T, et al. AMPK: A Therapeutic Target of Heart Failure-Not Only Metabolism Regulation. *Biosci Rep* (2019) 39(1):1–13. doi: 10.1042/BSR20181767
72. Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K. AMP-Activated Protein Kinase Inhibits NF- κ B Signaling and Inflammation: Impact on Healthspan and Lifespan. *J Mol Med (Berl)* (2011) 89(7):667–76. doi: 10.1007/s00109-011-0748-0

73. Sánchez-Villamil JP, Bautista-Niño PK, Serrano NC, Rincon MY, Garg NJ. Potential Role of Antioxidants as Adjunctive Therapy in Chagas Disease. *Oxid Med Cell Longev* (2020) 2020:9081813. doi: 10.1155/2020/9081813
74. Wan X, Wen JJ, Koo SJ, Liang LY, Garg NJ. SIRT1-Pgc1 α -Nfkb Pathway of Oxidative and Inflammatory Stress During Trypanosoma Cruzi Infection: Benefits of SIRT1-Targeted Therapy in Improving Heart Function in Chagas Disease. *PLoS Pathog* (2016) 12(10):e1005954. doi: 10.1371/journal.ppat.1005954
75. Nogueira LG, Santos RH, Ianni BM, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, et al. Myocardial Chemokine Expression and Intensity of Myocarditis in Chagas Cardiomyopathy Are Controlled by Polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS Negl Trop Dis* (2012) 6(10):e1867. doi: 10.1371/journal.pntd.0001867
76. Jones WK, Brown M, Ren X, He S, McGuinness M. NF-kappaB as an Integrator of Diverse Signaling Pathways: The Heart of Myocardial Signaling? *Cardiovasc Toxicol* (2003) 3(3):229–54. doi: 10.1385/CT:3:3:229
77. Karwi QG, Uddin GM, Ho KL, Lopaschuk GD. Loss of Metabolic Flexibility in the Failing Heart. *Front Cardiovasc Med* (2018) 5:68. doi: 10.3389/fcvm.2018.00068
78. Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor Necrosis Factor Alpha Mediates Resistance to Trypanosoma Cruzi Infection in Mice by Inducing Nitric Oxide Production in Infected Gamma Interferon-Activated Macrophages. *Infect Immun* (1995) 63(12):4862–7. doi: 10.1128/iai.63.12.4862-4867.1995
79. Vila-del Sol V, Punzón C, Fresno M. IFN-Gamma-Induced TNF-Alpha Expression Is Regulated by Interferon Regulatory Factors 1 and 8 in Mouse Macrophages. *J Immunol* (2008) 181(7):4461–70. doi: 10.4049/jimmunol.181.7.4461
80. Ramos GC, van den Berg A, Nunes-Silva V, Weirather J, Peters L, Burkard M, et al. Myocardial Aging as a T-Cell-Mediated Phenomenon. *Proc Natl Acad Sci USA* (2017) 114(12):E2420–9. doi: 10.1073/pnas.1621047114
81. Houssari M, Dumesnil A, Tardif V, Kivelä R, Pizzinat N, Boukhalifa I, et al. Lymphatic and Immune Cell Cross-Talk Regulates Cardiac Recovery After Experimental Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2020) 40(7):1722–37. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314370

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Nunes, Andrieux, Brochet, Almeida, Kitano, Honda, Iwai, Andrade-Silva, Goudenège, Alcântara Silva, Vieira, Levy, Bydlowski, Gallardo, Torres, Bocchi, Mano, Santos, Bacal, Pomerantzef, Laurindo, Teixeira, Nakaya, Kalil, Procaccio, Chevillard and Cunha-Neto. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

II. Le rôle de la mitochondrie dans infection et inflammation.

Article 2 : Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation.

Pauline Andrieux, Christophe Chevillard, Edecio Cunha-Neto, João Paulo Silva Nunes.

Revue publiée dans **International Journal of Molecular Sciences** en octobre 2021.

Présentation de la publication :

Dans cette revue nous avons d'abord présenté les origines endosymbiotiques de la mitochondrie puis nous avons résumé les concepts généraux sur cet organelle comme la production d'énergie, la dynamique mitochondriale, la mitophagie. En effet les mitochondries sont le centre énergétique de la cellule, elles produisent de l'ATP grâce à la chaîne respiratoire mitochondriale, chaîne composée de cinq complexes localisés au niveau de la membrane interne mitochondriale. Les mitochondries se situent dans le cytoplasme de la cellule sous forme de réseaux dynamiques où elles adaptent la production d'énergie en fonction des besoins de la cellule. De plus la mitophagie permet de garantir l'homéostasie du réseau mitochondrial en éliminant les mitochondries défectueuses.

Les mitochondries sont également au centre de la réponse pro-inflammatoire et jouent un rôle essentiel dans la réponse contre les infections pathogènes. En effet, elles sont au cœur des voies RLR, NLR et TLR. La chaîne respiratoire mitochondriale est un site majeur de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS ; ou radicaux libres), qui sont essentielles pour lutter contre les infections. Cependant, une production excessive et incontrôlée peut devenir délétère pour la cellule, entraînant des lésions mitochondriales et tissulaires.

Les agents pathogènes exploitent le rôle des mitochondries pendant l'infection en affectant le mécanisme de phosphorylation oxydative (OXPHOS), le réseau mitochondrial et en perturbant la communication entre le noyau et les mitochondries. Le rôle des mitochondries dans ces processus biologiques fait de ces organelles de bonnes cibles pour le développement de stratégies thérapeutiques. En effet, on pourrait imaginer des stratégies dans le but d'induire la mitophagie, de limiter les ROS mitochondriaux, d'inhiber la fission mitochondriale ou bien de réduire l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Dans cette revue, nous avons présenté un résumé de l'implication de la mitochondrie dans la réponse pathogène, ainsi que les cibles mitochondriales potentielles prometteuses pour la lutte contre les maladies infectieuses et les maladies inflammatoires chroniques.

Dans cette revue ma contribution réside dans la veille scientifique sur les mitochondries dans l'infection et l'inflammation et de résumer mes recherches bibliographiques. J'ai également produit tous les schémas de cet article et j'ai contribué à sa rédaction.



Review

Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation

Pauline Andrieux^{1,*}, Christophe Chevillard^{1,*} , Edecio Cunha-Neto^{2,3}  and João Paulo Silva Nunes^{1,2,3,*}

¹ Inserm, INSERM, UMR_1090, Aix Marseille Université, TAGC Theories and Approaches of Genomic Complexity, Institut MarMaRa, 13288 Marseille, France; Pauline.Andrieux@outlook.com

² Laboratory of Immunology, Heart Institute (InCor), Division of Clinical Immunology and Allergy, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo 05403-000, Brazil; edecunha@gmail.com

³ Institute for Investigation in Immunology (iii), INCT, São Paulo 05403-000, Brazil

* Correspondence: christophe.chevillard@univ-amu.fr (C.C.); jpaulo.nunes@live.com (J.P.S.N.); Tel.: +33-491828736 (C.C.); +55-31-99496-7165 (J.P.S.N.); Fax: +33-491828701 (C.C.)

Abstract: Mitochondria are the energy center of the cell. They are found in the cell cytoplasm as dynamic networks where they adapt energy production based on the cell's needs. They are also at the center of the proinflammatory response and have essential roles in the response against pathogenic infections. Mitochondria are a major site for production of Reactive Oxygen Species (ROS; or free radicals), which are essential to fight infection. However, excessive and uncontrolled production can become deleterious to the cell, leading to mitochondrial and tissue damage. Pathogens exploit the role of mitochondria during infection by affecting the oxidative phosphorylation mechanism (OXPHOS), mitochondrial network and disrupting the communication between the nucleus and the mitochondria. The role of mitochondria in these biological processes makes these organelle good targets for the development of therapeutic strategies. In this review, we presented a summary of the endosymbiotic origin of mitochondria and their involvement in the pathogen response, as well as the potential promising mitochondrial targets for the fight against infectious diseases and chronic inflammatory diseases.



Citation: Andrieux, P.; Chevillard, C.; Cunha-Neto, E.; Nunes, J.P.S. Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11338. <https://doi.org/10.3390/ijms222111338>

Academic Editor: Masashi Tanaka

Received: 8 October 2021

Accepted: 13 October 2021

Published: 20 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: mitochondria; inflammation; infection; mitochondria dysfunction; mitochondrial bioenergetics; infection disease; inflammatory disease

1. Introduction

Mitochondria are membrane-bound organelles, essential to produce energy in the form of ATP, because the phosphate is a high-energy bond and provides energy for other reactions within the cell. In addition to producing energy, mitochondria store calcium for cell signaling activities, generate heat and mediate cell growth and death. The number of mitochondria per cell varies widely according to the local energy demand. However, restricting mitochondria merely as an energy power organelle is to miss the big picture. The mitochondria's oxidative phosphorylation (OXPHOS) is a major site for the production of reactive oxygen species (ROS; or free radicals) due to the high propensity for aberrant release of free electrons. While several different antioxidant proteins within the mitochondria scavenge and neutralize these molecules, excessive ROS production may inflict damage to mtDNA. Mitochondrial dynamics and energetics play a central role in proinflammatory signaling, thus are essential organelles for the control of innate immunity and inflammatory response against infectious pathogens.

An Evolutionary Cooperation between Mitochondria and Eukaryotic Cells

The eukaryotic term includes all multicellular organisms (such as animals, fungi and plants) and unicellular organisms (e.g., protozoa) composed of eukaryotic cells. The eukaryotic cell is defined essentially by the existence of a structured nucleus and the presence of organelles in the cytoplasm such as mitochondria in contrast to prokaryotes. The mitochondria are the powerhouse of the cell, indeed, through the OXPHOS mechanism.

The first descriptions of these organelles were performed in 1890 by Richard Altmann. He observed the existence of granula inside the cells stained with osmium and called them “bioblasts”. He described them as “elementary organisms” with autonomy in terms of metabolism and genetics. The name mitochondria came only later, in 1898, when Carl Benda named it from the Greek “mitos” (thread) and “chondros” (granule). Similarities between mitochondria and prokaryotes can also be found in the composition of their membranes. Indeed, both the inner membrane of the mitochondria and prokaryotic membrane share a phospholipid essential to the organization of these membranes: cardiolipin [1]. Moreover, genetic information is stored in the form of circular DNA in prokaryotes and mitochondria [2].

These similarities raised some questions about the origin of the eukaryotic cell. Previously, it was considered that the eukaryotic cells descended from an ancestral lineage that gradually became more complex due to numerous mutations. However, in 1918, Paul Poirier talked about symbionts: “These organelles would be for me nothing other than symbiotic bacteria, what I call symbionts”. Several years later, in 1967 the endosymbiotic theory was developed by Margulis “During the course of the evolution of mitosis, photosynthetic plastids (themselves derived from prokaryotes) were symbiotically acquired by some of these protozoans to form the eukaryotic algae and the green plants.” [3]. In 1998, Martin and Müller proposed the “hydrogen hypothesis for the first eukaryote”. This hypothesis suggested the mutualist symbiosis between an Archaeal type host cell and an alphaproteobacteria. Indeed, the host cell would need to live on hydrogen in the medium and would produce methane in metabolic residues. Whereas the symbiont, alphaproteobacteria would be an optional aerobic organism that either carry out the fermentation that produces hydrogen as waste or breathe in the presence of oxygen [4]. Both the host and the symbiont benefit from this association.

After several studies to confirm the prokaryotic origin of the mitochondria, we could wonder when the evolution of the eukaryotic cell’s endosymbiosis has occurred. Several theories on the occurrence of mitochondria could explain the formation of prokaryotic cells. The first model (mito-late) is referred to by the event that the mitochondria appeared when the cell had already acquired a certain complexity. A second model suggested that mitochondria appeared before the complexification of the cell, and it would be precisely the acquisition of this organelle which allowed the cell to: the mito-early model.

Regardless of whether the mitochondria arrived early or late, we can think that their appearance led to a number of changes within the host that allowed its evolution to the eukaryotic cells we know today. Indeed, the evolution of the endomembrane system is part of the great changes brought by the endosymbiosis of an archaea and an alphaproteobacteria. Some biologists believed that the mitochondria within the archaea exerted a pressure that allowed the establishment of the endomembrane system, in particular through the secretion of vesicles [5].

The mitochondria are composed of a circular genome of 16.6 kb [1]. Unlike nuclear DNA, the mtDNA is not associated with histone proteins and is present in one or more copies per organelle. This genome encodes 13 proteins required for the OXPHOS, the 12S and 16S rRNAs and 22 tRNAs [6]. Due to the conservation of the primary structure of the different rRNA subunits, it was possible to elaborate the first phylogenetic tree between mitochondria and proteobacteria [7–9], and which made it possible to identify alphaproteobacteria as close to the mitochondria [10]. When comparing this genome with the alphaproteobacteria genome, although homologous, a large part of the mitochondrial genome was lost from its ancestral alphaproteobacteria [11,12]. The loss of these genes could be explained by the elimination of genes that were not essential for the correct functioning of this microorganism in its new environment. If genes with the same usefulness are found in the nucleus, we might think that those found in the mitochondria were lost to avoid costly energy redundancy [11–14]. This could also be explained by a gene transfer from the mitochondrial genome to the nuclear genome [15–17]. Finally, some studies suggest a suppression of redundant and non-essential genes by random mutations [18].

In addition, mitochondria also played a role in the mechanism of programmed cell death, apoptosis. Apoptosis is an essential mechanism of homeostasis [19], apoptotic signals lead to permeabilization of the mitochondrial membrane and release of cytochrome C, which activates caspases. This activation leads to chromatin condensation, nuclear fragmentation and ultimately the cells are fragmented and eliminated by macrophages without the induction of inflammation. Kroemer was the first to propose that apoptosis evolved during the domestication of ancestral mitochondria with the ancestral host cells as a defense mechanism against the host cell [20]. A more recent study, interested in reconstructing the apoptotic machinery at the level of the ancestral mitochondria, has shown that the establishment of apoptosis is the result of a co-evolution between the ancestral mitochondria and the host. In the course of evolution, the ancestral mitochondria and the host have each set up weapons to eliminate the other. It is the co-evolution of these two organisms that has allowed creating the programmed cell death mechanism as we know today [21]. The ancestral mitochondria had indeed released toxins and proteases such as caspases and meta caspases against the host. The host has evolved to protect itself by releasing protease inhibitors. These defense mechanisms have continued until it stabilized and gave rise to the programmed cell death mechanism [21].

The OXPHOS system is also an indicator of co-evolution between the ancestral mitochondria and the host cell since we found a reduction of the ancestral mitochondrial genome through the host cell genome profile. Indeed, oxidative phosphorylation protein components, which is an essential mechanism of this organelle, is encoded both by mtDNA coding factors and by the nuclear genome [22]. Knowing that the mechanism of oxidative phosphorylation is a mechanism inherited from the ancestral mitochondria, this is proof that during the domestication of the mitochondria by the cell, gene exchanges were carried out to favor the survival of the two symbionts. Moreover, the co-evolution between the ancestral mitochondria and the host was done in a very specific way for each species. Indeed, cellular hybrids made between a human nucleus and chimpanzee or gorilla mitochondria show a 20% decrease in endogenous cellular respiration [23,24]. The respiratory chain allows the generation of energy for the cell. For many, the acquisition of this mechanism has been a pillar of the evolution of eukaryotic cells. By increasing energy production [25], the ancestral cell was able to extend its genome and to allow an increase in cellular complexity [26]. Indeed, this increased energy allowed the eukaryotic cell to set up several mechanisms such as the cell cycle, endomembrane traffic [26], the nucleus compartmentalization [27] and the ability to become multicellular.

2. Mitochondria: General Concepts

2.1. Mitochondrial Respiratory Complexes

The mitochondria are composed of two lipid bilayer membranes, the outer and the inner membrane, which are separated by the intermembrane space. The inner membrane is organized in the form of invaginations called ridges. Under the inner membrane is located the mitochondrial matrix, in which the mitochondrial DNA and ribosomes are found (Figure 1).

The mitochondrial respiratory chain corresponds to a protein complex association at the level of the mitochondrial inner membrane. This respiratory oxidative phosphorylation chain is a key biological process that allows the phosphorylation of ADP to ATP through ATP synthase thanks to the energy released by the oxidation of electron donors (NADH and FADH₂) through the respiratory chain [28].

The two electron donors NADH and FADH₂ come from the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle). Acetyl-coenzyme A (Acetyl-CoA) is a metabolite derived from the degradation of glucose, fatty acids and amino acids and is the first intermediate metabolite of the TCA pathway, being later combined with oxaloacetate to generate citrate. Citrate is converted into isocitrate, which is converted by two oxidative decarboxylations in α -ketoglutarate and succinyl-CoA. This reaction generates CO₂ and two molecules of NADH. The NADH generated at this stage transfers electrons mainly to the complex I of the respiratory

chain. After succinyl-CoA is converted into succinate, the oxidation of succinate generates fumarate and the electron donor FADH₂, which will donate electrons to complex II. Later, the fumarate is converted into malate then in oxaloacetate and the cycle then restarts [29].

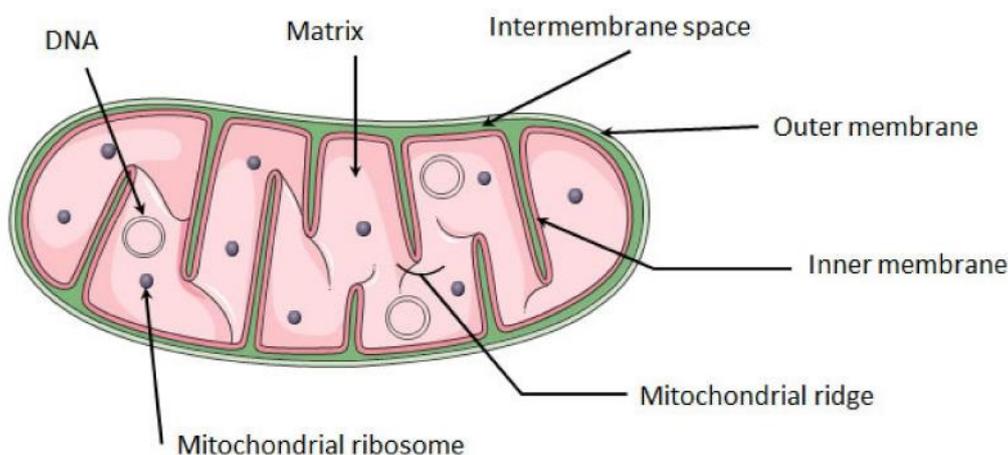


Figure 1. Structure of mitochondria. The mitochondrion is composed of a double membrane: the inner membrane and the outer membrane. Between these membranes is the intra-membrane space. The inner membrane forms invaginations called ridges where the OXPHOS complexes are located. The mitochondrial matrix contains several copies of mitochondrial circular DNA and ribosomes. Mitochondria image adapted from Smart. Available online: <https://smart.servier.com> (accessed on 10 August 2021).

The respiratory OXPHOS chain is composed of five complexes and two coenzymes. Complex I is a NADH: coenzyme Q oxidoreductase, composed of 46 subunits, 7 of these subunits are encoded by mtDNA and the others by nuclear DNA. The 14 central subunits execute the bioenergetic function of this complex. In addition to these central subunits the complex I may have accessory subunits, but these subunits are not implicated in bioenergetic function, their function is not well known, however it is possible that they could improve electron transport [30].

Complex I allows the oxidation of NADH by the quinone coenzyme Q10 (CoQ10), releasing two electrons to Complex III and pumping four protons (H⁺) from the mitochondrial matrix to the inter-membrane space.

Complex II is exclusively encoded by the nuclear DNA and has four subunits with a succinate: coenzyme Q reductase mechanism of action. Its main role in the OXPHOS is to transfer the electrons from the succinate to fumarate oxidation to CoQ10. Since this redox reaction is of low energy, complex II does not contribute to the H⁺ gradient in the mitochondria.

Complex III is a CoQ10-cytochrome C oxidoreductase composed of 10 subunits. The cytochrome B, a central protein of this complex, is encoded by mtDNA and the other subunits are encoded by nuclear DNA. The passage of electrons from CoQ10 to cytochrome C pumps four H⁺ to the intermembrane space.

Cytochrome C enables the transition of electrons between the complexes III and IV. The complex IV has a cytochrome C oxidase action which transports two protons in the opposite direction of the gradient and reduces O₂ in a H₂O molecule. This complex is composed of 20 subunits, 3 encoded by mtDNA. Finally, all the protons present in intermembrane spaces pass through the ATP synthase. The force of this proton gradient leads to the synthesis of ATP from ADP and inorganic phosphate (Figure 2) [28].

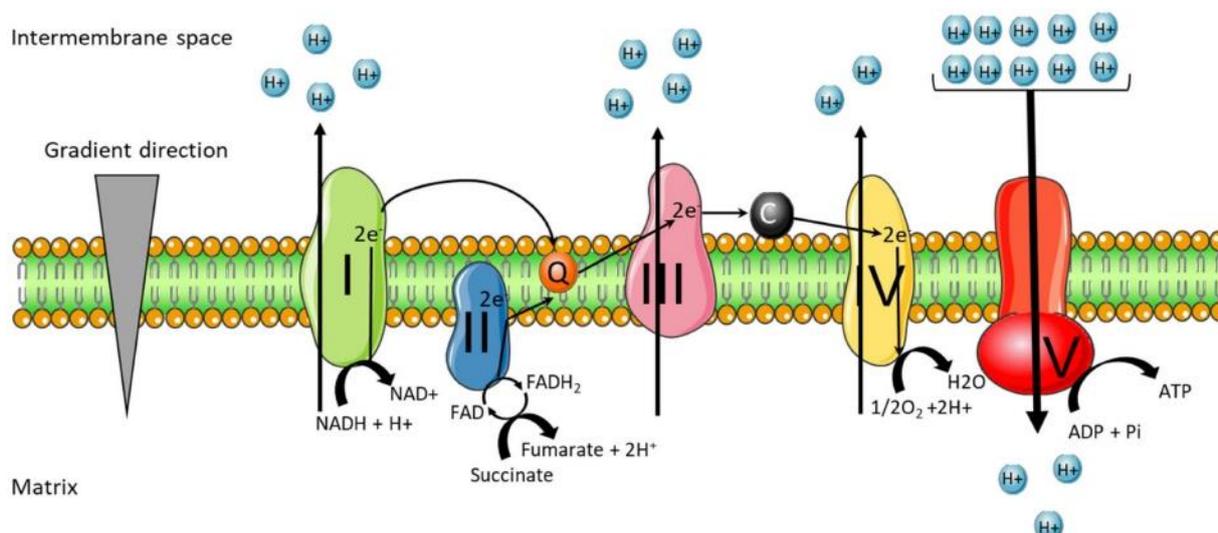


Figure 2. Mitochondrial respiratory chain complex. The mitochondrial respiratory chain is located at the inner membrane of the mitochondria. Composed of four complexes and two coenzymes, it allows the production of ATP through oxidative phosphorylation. Complex I (NADH: coenzyme Q oxidoreductase) and II (succinate dehydrogenase) will each transfer two electrons to the quinone coenzyme Q10 (CoQ10). The two electrons transferred from complex I come from the oxidation of NADH, and those from complex II come from oxidation of succinate to fumarate. CoQ10 will allow the transfer of electrons to complex III (CoQ10-cytochrome C oxidoreductase). The complex III will then pass these electrons to the cytochrome C, which makes the link with the complex IV (cytochrome C oxidase). The complex IV reduces O_2 in a H_2O molecule. Complexes I, III and IV are proton pumps, which allow the passage of protons from the matrix to the intermembrane space, in the opposite direction of the gradient. Complexes I and III allow the passage of four protons and complex IV of two protons. Once the intermembrane space is enriched with protons, the last complex of the chain, ATP synthase will allow the passage of protons in the direction of the gradient. This proton flow will allow the synthesis of ATP from ADP.

The ATP synthase is composed of 29 subunits, these subunits can be separated in two functionally regions: F_0 and F_1 . F_0 is in the intermembrane and F_1 is on the mitochondrial matrix. Throughout all major respiratory chain complexes, the passage of electrons pumps protons outwards. This flow creates an electrochemical energy inside the mitochondria, called the proton motive force [31].

The mitochondrial complexes stably interact with each other in the supercomplexes as proposed by the “Solid-state model” [32]. Two different supercomplexes were isolated from bovine heart and yeast cells using a blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) technique: $I_1III_2IV_4$ and III_2IV_4 . The association of complexes I, III and IV is called “respirasome” (Figure 3) [33,34].

In order to study the direct passage of electrons between the complexes, the metabolic flux control coefficient was calculated [35] and an association between complexes I and III was observed, while complex IV seems to be randomly distributed. In addition, the authors did not identify a direct electron channel between complex II and complexes III and IV [36]. In mammals, super complexes are most often composed of complexes I, III and IV, in the form $I + III_2 + IV_{1-4}$ and $I + III_2$. It has been shown that there is an increase in these complexes in the human skeletal muscles during effort, which shows that these super complexes are encoded according to the energy demand [37].

Another argument in favor of solid-state models is that the stability of supercomplexes depends on the complexes that constitute them. Indeed, a mutation in the assembly site in complex III leads to a deficiency of complex III as well as supercomplex I + III and a reduction of the amount of complex I. [38]. Complex IV is also necessary for the assembly or stability of complex I [39].

The organization of the mitochondrial ridges also participate in the stability of the super-complexes. The mitochondrial ridges owe their organization on one side to the mitochondrial

contact site and cristae organizing system (MICOS), this complex is found at the base of the ridges [40–42]. The MIC10 subunit of the MICOS complex is particularly important in the formation of these ridges [43,44]. ATP synthase also plays an important role in the stabilization of these ridges, being organized in dimers at the top of the ridges [45,46]. The other respiratory complexes seem to be located at the level of the flat surfaces of the ridges [47,48].

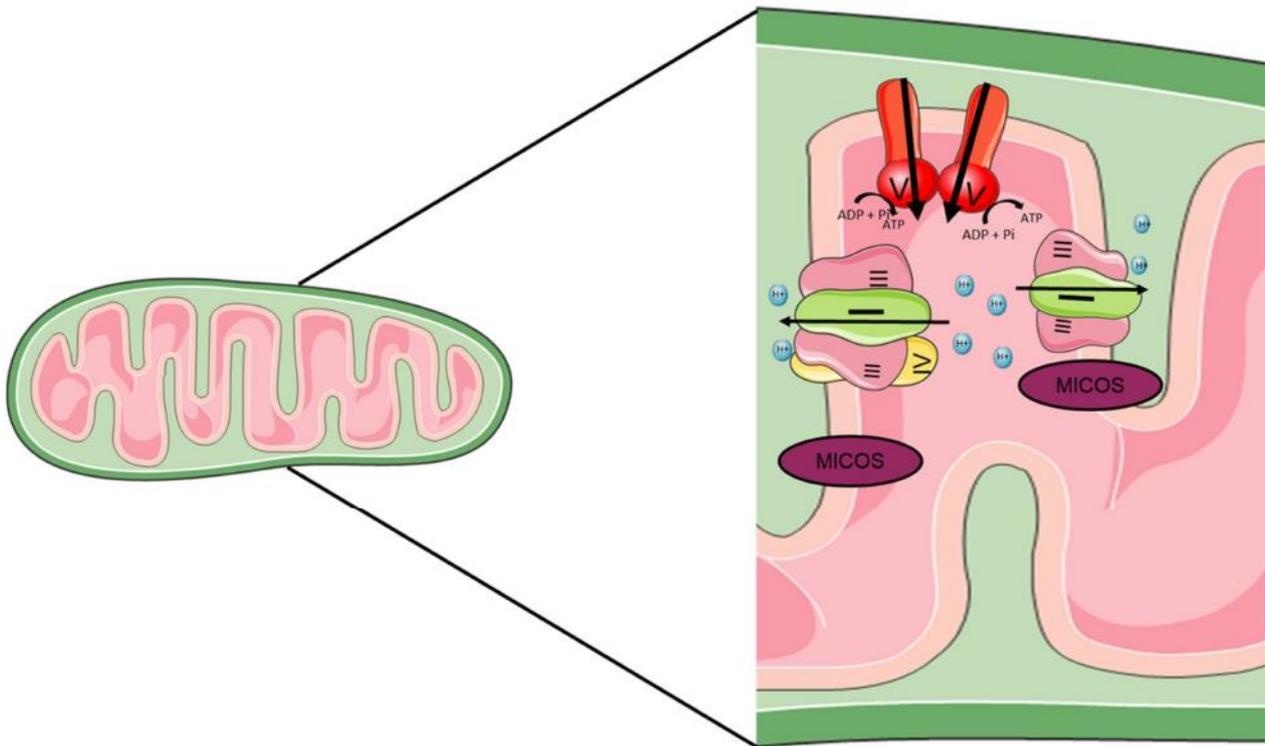


Figure 3. Structure of mitochondrial supercomplexes. The structure of the mitochondrial ridges is very important in the function of mitochondria and in particular in the stability of the super complex. Several proteins are involved in the stability of these ridges, the ATP synthase which will be at the top and the mitochondrial contact site and cristae organizing system (MICOS) which will be at the bottom. Between the two will be the super complexes. The two main super-complexes found in mammals I + III2 + IV1–4 and I + III2 are shown.

2.2. Mitochondrial Dynamics

Mitochondrial fission and fusion mechanisms maintain functional mitochondria when the cells experience metabolic or environmental stresses (Figure 4).

Fusion helps mitigate stress by mixing the contents of partially damaged with fully functional mitochondria as a form of complementation. Fission is needed to create new mitochondria, but it also contributes to quality control by enabling the removal of damaged mitochondria and can facilitate apoptosis during high levels of cellular stress. Mitochondrial fission and fusion processes are both mediated by large guanosine triphosphatases (GTPases). Fission is mediated by dynamin-related protein 1 (DRP1), which is recruited from the cytosol to form spirals around mitochondria that constrict to sever both inner and outer membranes. Fusion between mitochondrial outer membranes is mediated by membrane-anchored dynamin family members named mitofusins MFN1 and MFN2, whereas fusion between mitochondrial inner membranes is mediated by a single dynamin family member called OPA1 mitochondrial dynamin-like GTPase (OPA1) in mammals. Mitochondrial fission and fusion machineries are regulated by proteolysis and posttranslational modifications [49]. The remodeling of the ridges by the ablation of OPA1 would lead to a disturbance in the formation of super complexes and a decrease in respiration [50].

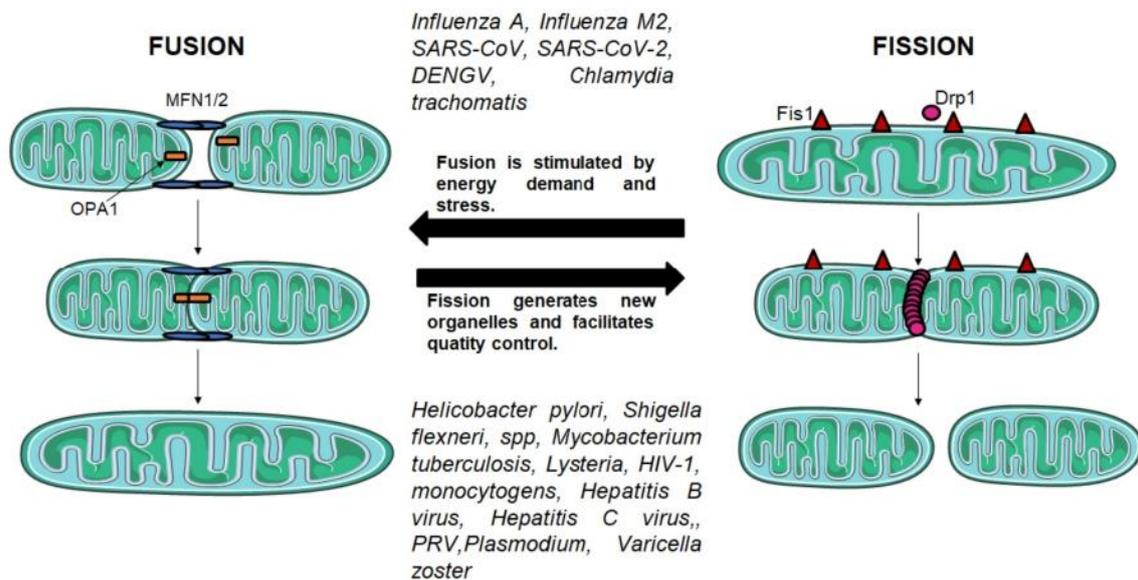


Figure 4. Fusion and fission mechanisms. Fusion and fission mechanisms are important in the regulation of mitochondrial morphology and function. Fission is mediated by DRP1, a GTPase which is recruited from the cytosol by FIS1 to form spirals around mitochondria that constrict both inner and outer membranes. Fusion between mitochondrial outer membranes is mediated by MFN1 and MFN2, whereas fusion between mitochondrial inner membranes is mediated by OPA1.

2.3. Mitophagy

Mitophagy is an essential mechanism in the homeostasis of the mitochondrial network because it mediates the removal of defective mitochondria. Two proteins are known to initiate this process: PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) and Parkin [51,52]. Under non-dysfunctional conditions, the PINK1 protein, located at the mitochondrial membrane, is degraded by two proteases, the matrix processing peptidases (MPP) and the presenilin-associated rhomboid like (PARL). However, infection or inflammatory processes can promote depolarization of the mitochondrial membrane, a process known to inhibit the cleavage of PINK1, which leads to the accumulation of PINK1 at the mitochondrial membrane. PINK1-rich membrane promotes activation of Parkin by phosphorylating SER65 in the ubiquitin-like (UBL) domain, promoting parkin-dependent ubiquitination of substrates in the mitochondria [52]. Additionally, PINK1 also phosphorylates ubiquitin monomers at SER65 in the cytosol [53–55], promoting arrangement of ubiquitin chains that will mediate ubiquitination of mitochondrial proteins. Mitochondrial proteins that have been ubiquitinated will bind to autophagy receptors such as optineurin and NDP52 recruited by PINK1 [56] that bind to the microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) protein linked to the phagophore. This will create the mitophagosome, which fuses with the lysosome to destroy the damaged mitochondria [57].

3. Role of Mitochondria in Inflammation and Infection

In different ways, mitochondria play a central role in the innate immune response. It is at the center of the inflammatory response in the case of a viral or bacterial infection or in cellular damage. Indeed, in the case of an infection by a pathogenic agent, the microorganisms will be detected by pattern-recognition receptors (PRR) that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), such as flagellins, lipopolysaccharide, mannose, nucleic acids and proteins and the danger-associated molecular motifs (DAMPs) molecules derived from damaged cells pathway (Figure 5).

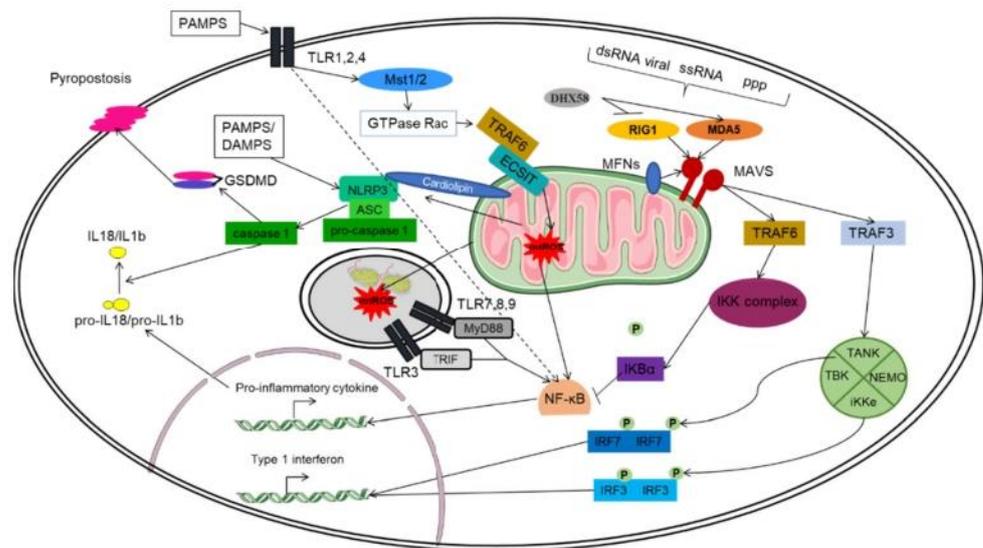


Figure 5. The mitochondria at the center of the RLR, NLR and TLR pathways. The mitochondrion plays an important role in the innate immune response, as it participates in the main pathways involved in the immune response: the TLR, RLR and NLR pathways. The TLR pathway is involved in the antimicrobial response. PAMPs will activate the TLRs. The membrane-spanning TLRs (TLR1, TLR2, TLR4) and endosome-bonded TLRs (TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9) are activated and trigger the expression of pro-inflammatory cytokines via the NF- κ B pathway. The TLRs activate the kinases Mst1 and Mst2, which activate the GTPase Rac allowing the assembly of the TRAF6-ECSIT complex. The TRAF6 translocates to the mitochondria and binds to ECSIT, forming the TRAF6-ECSIT complex, which lead to an increase in mitochondrial ROS (mtROS) production as well as the proximity of the mitochondria and the phagosome. The bacteria in the phagosome will be destroyed by the action of mtROS. The RLR pathway is involved in antiviral response. Different PAMPs such as dsRNA, ssRNA and 5'-triphosphate (ppp) will activate two cytoplasmic PRRs, RIG-1 and MDA5. These PRR are regulated by DHX58, where DHX58 positively regulates MDA5 and negatively regulates RIG-1. After the interaction with DHX58/RIG1/MDA5, MAVS is activated by recruiting different proteins, such as TRAF3 and TRAF6. The interaction between MAVS and the MFN1 and MFN2 fusion proteins (MFNs) are essential for RLR pathway signaling. TRAF3 will activate the TANK/NEMO/iKKe/TBK complex, which will phosphorylate IRF7 and IRF3 dimers, allowing their translocation into the nucleus and their binding to ISRE sequences at the promoters of type I IFN-regulated genes, while TRAF6 will activate the IKK complex. This complex activates NF- κ B by phosphorylating its inhibitor I κ B α . Once activated, NF- κ B translocates to the nucleus to induce the expression of pro-inflammatory genes. The NLR pathway is involved in a mechanism for fighting infection and cellular damage. The main complex of this pathway is the NLRP3 inflammasome. The inflammasome is a multiprotein complex containing ASC, pro-caspase 1 and NLRP3. The activation of NLRP3 inflammasome is done both on transcriptional and post translational levels. The first is related to TLR activation and production of pro-IL1 β and pro-IL18. The second signal is based on the detection of PAMPs and DAMPs that leads to NLRP3 oligomerization and interaction with ASC. Then, ASC recruits pro-caspase 1 via the CARD domain. Once caspase 1 is activated, it cleaves the pro-IL1 β and pro-IL18 which will allow the release of these inflammatory cytokines in the extracellular milieu. In addition, caspase 1 cleaves Gsdmd, which will allow pore creation at the plasma membrane and pyroptosis. In addition, MAVS is also necessary for the recruitment of NLRP3 in mitochondrial membranes. Cardiolipin and mtROS promote the activation of NLRP3 inflammasome.

There are four families of PRRs, toll-like receptors TLRs [58], (NOD)-like receptors (NLRs), C-type lectin receptors (CLRs) and retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs). Each PRR allows the secretion of type I interferon and pro-inflammatory cytokines via NF- κ B [59].

In the case of viral infection, the mitochondria play a role in the detection of the virus. Indeed, the MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein), a protein located at the outer membrane of the mitochondria, plays a central role of the RLR receptor signaling pathway, which leads to the production of pro-inflammatory cytokines and type 1 interferon (IFN) [60–63]. In fact, two cytoplasmic PRR, the retinoic-acid-inducible gene (RIG-1) and melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) recognize different PAMPs such as dsRNA viral or 5'-triphosphate (ppp) and single-stranded RNA (ssRNA) [64]. These PRR are regulated by DExH-Box Helicase 58 (DHX58) [65], where DHX58 positively regulates MDA5 and negatively regulates RIG-1 [66]. RIG-1 and MDA5 are cytosolic helicases with an ATPase activity. The C-terminal links with viral RNA and the N-terminal binds to two caspase recruitment domains (CARD) in tandem to link with MAVS protein [64–68]. After the interaction with DHX58, MAVS is activated and forms the MAVS signalosome by recruiting different proteins, such as TNF receptor associated factors TRAF3 and TRAF6 [69,70]. The recruitment of TRAF3 and TRAF6 induces expression of type I IFN and NF- κ B pathway activation. Indeed, TRAF3 activates the TANK/NEMO/iKKe/TBK complex, which will phosphorylate IRF7 and IRF3 dimers, allowing their translocation into the nucleus and their binding to ISRE sequences at the promoters of type I IFN-regulated genes. On the other hand, TRAF6 activates the IKK complex. This complex activates NF- κ B by phosphorylating its inhibitor I κ B α . Once activated, NF- κ B translocate to the nucleus to induce the expression of pro-inflammatory genes [71].

In addition, mitochondrial dynamics regulate the RLR signaling pathway. The mitochondria are a dynamic network that change in response to biological demands through fusion and fission. It was shown that interaction between MAVS and MFNs protein as well as mitochondrial fusion is necessary in the RLR signaling pathway [72]. Indeed, mitochondrial elongation and increased RLR response was observed after DRP1 and FIS1 inhibition by shRNA and siRNA in Hela cells infected by sendai virus (SeV) strain H4 [72]. Furthermore, knockout of MFN1 and MFN2 in mouse embryo fibroblasts (MEFs) reduced the RLR response against Sendai virus (SeV) and encephalomyocarditis virus (EMCV) [73]. So, disturbances of mitochondria fission and fusion affect the RLR-mediated response to virus.

The electron transport chain of the oxidative phosphorylation produces ROS, mainly in the complexes I and III, and to a lesser extent in complex II [74]. ROS are essential in antiviral signaling and antibacterial response. In the case of antiviral signaling, several observations suggest that increased cellular ROS amplifies the RLR response. It was shown that deletion of the autophagic vesicle formation gene ATG5 in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lead to an increase in ROS production and mitochondrial damage as well as increase in the RLR signaling [75,76]. In addition, authors described that production of type I interferon through RLR signaling is diminished by antioxidants the N-acetyl-L-cysteine (NAC) and propyl gallate (PG) [76]. These experiments show that constitutive levels of ROS are used by RLR for signaling. In addition, blockage of Complex I with rotenone in WT and ATG5 mutated cells increased mitochondrial ROS and RLR response against vesicular stomatitis virus infection (RIG-I stimulation) or Poly I:C transfection (MDA-5 stimulation).

The importance of ROS in the antibacterial response was shown via the ablation of regulatory protein Uncoupling Protein 2 (UCP2). Studies have shown that electron leakage during ETC produces superoxides that diffuse to the internal membrane, oxidizing phospholipids and generating 4-hydroxynonenal [4HNE]. The 4HNE activates the UCP that will uncouple the mitochondrial respiratory chain, therefore reducing the protonic force and the formation of superoxide [77]. Knockout of UCP2 in mice model was associated with higher mitochondrial ROS (mtROS) production, increased production of type I interferon and pro-inflammatory cytokines and thus increased antibacterial response [78,79]. LPS-stimulated macrophages had decreased UCP2 expression, which led to an increase in mtROS and higher production of pro-inflammatory cytokine and type I interferon [80]. Mitochondrial ROS is thought to participate in oxidative bursting in activated macrophages and these data revealed the important role of mitochondria-generated ROS in fighting infection.

Macrophages and dendritic cells eliminate microorganisms through phagocytosis. The proximity between phagosomes and mitochondria allows mtROS to cross the phagosome to eliminate the pathogen. After the activation of TLRs (TLR1, TLR2 and TLR4) by a pathogen, the increase of mtROS, as well as the approximation of mitochondria and phagosomes are done through the activation of the kinases Mst1 and Mst2. These kinases activate the GTPase Rac, which allows the assembly of the TRAF6-ECSIT complex [81]. Indeed, the TRAF6 factor translocates to the mitochondria and binds to ECSIT, playing an important role in complex I assembly. Complexing with TRAF6 will lead to an increase in mtROS production as well as the proximity of the mitochondria and the phagosome [82].

Mitochondria are also involved in an essential mechanism for fighting infection and cellular damage: the NLRP3 inflammasome. This mechanism allows the recruitment of inflammatory cells to the site of infection by allowing the secretion of IL-1b but also an induction of a TH1 response with an increase in cytotoxic activity with the secretion of IL-18 [83,84]. In addition to these two actions, the inflammasome is involved in a particular cell death: pyroptosis. This inflammatory cell death depends on the activation of the inflammasome and has the role of eliminating intracellular bacteria before they proliferate too much, as well as inducing a local inflammatory phenomenon with the recruitment of other immune cells [85–87].

The inflammasome is a multiprotein complex containing an adapter apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain (ASC), pro-caspase 1 and the specific member of the NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) [88]. The activation of NLRP3 inflammasome is done on transcriptional and post translational levels. The first is related to activation of toll-like receptors (TLR) and production of pro-IL1b and pro-IL18 [89,90]. The second signal is based on the detection of PAMPs and danger-associated molecular motifs (DAMPs) that drive NLRP3 oligomerization and interaction with the ASC adaptor through the pyrin domain (PYD). Then, ASC recruits pro-caspase1 via the CARD domain. Once caspase 1 is activated, it cleaves the pro-IL1b and pro-IL18 which releases these inflammatory cytokines in circulation [88,91–93]. In addition, caspase 1 cleaves gasdermin D (Gsdmd), allowing the formation of plasma membrane pores and pyroptosis [94].

The mitochondria are very important in NLRP3 activation. Indeed, MAVS is necessary for the recruitment of NLRP3 in mitochondrial membranes [95]. The phospholipid cardiolipin translocates from the inner to the outer membrane of the mitochondria to bind to NLRP3 and promote its activation [96]. In addition, the mitochondrial ROS also participates in NLRP3 activation [97–99].

Infection by a pathogen is not the only cause of inflammation; indeed, tissue damage activates various inflammatory mechanisms through DAMPs. Since mitochondria have prokaryotic origins [4], it can be assumed that prokaryotic and mitochondrial components have similarities that may give them a high DAMP potential [100]. Indeed, a study has demonstrated the activation of the immune system by accumulation of mtDNA in the cytosol results in an antiviral immune response [101,102] and the oxidation of mtDNA leads inflammasome activation [101,103]. The cardiolipin is also considered a mitochondrial DAMP [104]. Moreover, as mentioned above, it allows the activation of the NLRP3 inflammasome [96].

In summary, the mitochondria are important to trigger the RLR, NLR or TLR-related innate immune response against virus, bacteria, fungi or sterile tissue damage.

4. Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics in Infectious Diseases

The mitochondria play both bioenergetics and biosynthetic roles, since ATP and components of several macromolecules, such as amino acids, lipids and nucleotides, are generated in these organelle [105]. Mitochondria are also hubs for innate immune signaling against viruses and bacteria, thus involved in immunological response. Infectious pathogens have evolved mechanisms to target and modulate mitochondria to successfully replicate inside eukaryotic cells. The pathogen's ability to exploit mitochondria is under close scrutiny over the past few years [106]. Considering the pleiotropic functions of mito-

chondria, it is not surprising that pathogens exploit the mitochondrial key roles during the infection affecting the oxidative phosphorylation complex and mitochondrial network. In this section, we briefly described how some pathogens affect mitochondria dynamics and energetics (Table 1).

Table 1. Effect caused by bacteria, protozoan and viruses on mitochondria bioenergetics and dynamics.

Organism	Pathogen	Effect on Mitochondria
Virus	PRV	Fission [107]
	DENG V	Fusion [108]
	EBV	Reduced mitochondria content [109,110] Reduced $\Delta\psi_m$, reduced ATP [111] Increased ROS and MMPT opening [111]
	Hepatitis B virus	Fission, perinuclear distribution [112]
	Hepatitis C virus	Fission, perinuclear distribution [113] Increased OXPHOS [114,115] Decreased $\Delta\psi_m$ [116]
	HIV-1	Fission, perinuclear distribution [116,117]
	Influenza A	Fusion and increased ROS [118]
	Influenza M2	Fusion and increased ROS [119]
	SARS-CoV	Fusion [120]
	SARS-CoV-2	Fusion [121–123] Increased ROS [124]
	HRV	Decreased ROS [125] Reduced cristae [126]
	HPV	Reduced $\Delta\psi_m$ [127] Increased ROS [126,128]
	Varicella zoster	Fission [129] Warburg effect [129–131]
Bacteria	<i>Listeria monocytogenes</i>	Fission [132] DRP1-independent fission [133,134]
	<i>Legionella pneumophila</i>	Reduced ATP, reduced oxygen consumption [135]
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Fusion [136] ROS production [137,138]
	<i>Helicobacter pylori</i>	Fission [139]
	<i>Shigella flexneri</i>	Fission [140,141]
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Fission, perinuclear distribution [137,138] Reduced $\Delta\psi_m$ [142,143] Increased $\Delta\psi_m$ and ATP [143]
Protozoa	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Decreased OXPHOS activity [144,145] Reduced activity of GPx, GSH and MnSOD [146,147] Increased ROS [148–150] Increased oxidative stress [151,152] Increased basal respiration, proton leak and ATP production [153]
	<i>Plasmodium spp.</i>	Impaired $\Delta\psi_m$, increased ROS [154] Fission and apoptosis [155–157] Fission [158] Fusion [159]
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Increased ROS [158] Changed metabolism [160] OXPHOS [161]
	<i>Leishmania spp.</i>	Decreased OXPHOS proteins [158] Impaired $\Delta\psi_m$ [162] Metabolic shift [163]

4.1. Viruses

Viral infection is extremely dependent on the host cell machinery to successfully replicate and the mechanism by which viruses affect mitochondria is closely related to the virus type [164]. For example, infection with the alpha herpes virus Varicella zoster virus (VZV) was shown to induce persistent mitochondrial swelling and fragmentation throughout the time course of VZV infection, yet the mechanisms involved remain unknown [129]. Some studies suggest that VZV triggers the Warburg effect, i.e., metabolic shift from oxidative phosphorylation to glycolysis which regulates mitochondrial activity and thus promotes cell resistance to apoptosis and viral spread [129–131]. A similar study showed that alphaherpesviruses HSV-1 (herpes simplex virus type 1) and PRV (pseudorabies virus) also disrupt mitochondrial motility and morphology while promoting accumulation of intracellular Ca^{2+} in neurons, important mechanisms for viral growth and spread [107].

Infection with Epstein-Barr virus (EBV), an oncovirus associated with Burkitt lymphoma, reduces mitochondria content in differentiating monocytes [109], remodels B cell mitochondria by targeting the mitochondrial 1-Carbon pathway involved in the synthesis of purine, thymidylate and glutathione [110] and also induces mitochondria swelling, cyclophilin D dependent mitochondrial membrane permeabilization transition (MMPT), decreased mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and ATP, increased ROS production and mitophagy and reduced apoptosis [111]. Additionally, proteins of human papillomavirus (HPV) interact with mitochondria, promoting detachment of mitochondria from microtubules, reducing or eliminating cristae compartment, resulting in decreased $\Delta\psi_m$, increased production of mtROS, oxidative stress and DNA damage [126–128,165].

One of the most common effects in mitochondria caused by viruses is related to mitochondrial fragmentation. In order to suppress virus-induced apoptosis, hepatitis B (HBV) and hepatitis C (HCV) viruses modulate mitochondrial dynamics towards fission by the activation of dynamin-related protein 1 (DRP1) and mitochondrial fission factor (MFF), as well as increase in the expression of genes related to ubiquitin-proteasome system that mediates the targeting of proteins for degradation, such as LC3B, PARKIN and PINK1, thus activating mitophagy [112,113,166].

The infection with human immunodeficiency viruses HIV-1 also perturbs mitochondrial dynamics and bioenergetics. For example, mitochondria promote sustained calcium influx to support synaptic signaling and play an important role in the formation of the immunological synapse (IS), i.e., the nano-scale interface (gap) between T-cells [167]. The virological synapse of HIV-1 shares similar features with IS and the HIV-1 promotes mitochondria polarization and enhanced oxidative phosphorylation, thus facilitating HIV-1 replication and cell-to-cell transmission [114,115]. Moreover, the release of HIV proteins gp120 and Tat was shown to promote mitochondrial fragmentation by enhancing translocation of DRP1, decreased $\Delta\psi_m$ and perinuclear aggregation, generally followed by accumulation of ROS in the nucleus of human primary neurons [116,117].

While the aforementioned virus mediates mitochondrial fragmentation through activation of DRP1, dengue virus (DENV), on the contrary, induces mitochondria elongation and reduced mitochondrial fragmentation via membrane-associated protein NS4B and suppression of DRP1 phosphorylation [108]. Similarly, infection with SARS-CoV and the novel SARS-CoV-2 virus was reported to induce mitochondria elongation through proteasomal degradation of DRP1 or decreased expression of mitochondrial fission promoting genes SOCS6 and MTFP1 [120,122,123,168]. SARS-CoV-2 spike protein peptides interact with $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) preventing mitochondria to release cytochrome C, avoiding mitochondria-driven apoptosis in a glioblastoma-derived cell line [169]. A study showed that COVID-19 patients had elevated mitochondrial ROS associated with tissue injury [124]. Moreover, the Influenza A virus and Influenza M2 virus induced mitochondrial elongation and fusion, production of mitochondrial ROS, driving innate immune inflammation which favors viral pathogenesis [118,119]. On the other hand, infection with the human rhinoviruses (HRV), which cause common cold and lower airways diseases, suppress mitochondrial ROS during infection to induce a transitory

barrier-protective metabolic state that becomes exhausted as the infection progresses and leads to cellular damage [125]. I.e., while for some viruses, mitochondrial fragmentation and mitophagy are important mechanisms for viral replication because they favor cell survival and evasion of apoptosis, while for other viruses the maintenance of mitochondrial structure is essential to provide energetic provision to the infected cell before the virus replication cycle is complete [169].

4.2. Bacteria

In bacterial infections, host cells produce ROS as a defense mechanism to impair metabolism and growth of intracellular bacteria by inflicting damage to the pathogen's lipids, proteins, and nucleic acids. However, some bacteria can benefit from ROS and thus sustain intracellular production of ROS to grow [170]. Mitochondrial dynamics play important roles in the pathogeny of bacteria. Mitochondrial fission, for instance, is an important element to eliminate infected cells and reduce cell-to-cell-spreading, thus modulation of apoptosis can support bacterial dissemination [140,171].

Chlamydia trachomatis is the most common sexually transmitted bacterium and can cause trachoma (blindness) and pneumoniae respiratory infection. A study showed that *C. trachomatis* indeed augments production of ROS through a mechanism that involves direct NOX-dependent ROS production and translocation of NLRX1 (member of the Nod-like receptor family) to mitochondria and for optimal chlamydial growth and replication [137,138]. Moreover, *C. trachomatis* requires mitochondrial ATP for normal development and consequently authors suggest that they preserve mitochondrial integrity through the microRNA miR-30c-5p-dependent inhibition of DRP1-mediated mitochondrial fission [136].

Infection with the diarrhea-causing bacteria *Shigella flexneri* was shown to drive mitochondria into fragmentation through DRP1 which allows the bacteria to evade the intracellular entrapment in cages-like structures composed of septins assembled by mitochondria [141]. Mitochondrial fission mediated by DRP1 is also an important preceding factor for vacuolating cytotoxin A (VacA) induced cell death of *Helicobacter pylori* infection [139]. Similarly, *Legionella pneumophilla*, which causes Legionnaire's disease (an atypical pneumonia), controls mitochondrial dynamics to destabilize mitochondrial bioenergetics of infected cells via fission protein DRP1, causing mitochondrial fragmentation independent of cell death, dampening of mitochondrial respiration and promoting the Warburg-like phenotype in the infected cell that favors bacterial replication [135].

Conversely, some bacteria induce mitochondrial fragmentation independently of DRP1. Bacterial infection with *Lysteria monocytogenes* can cause severe sepsis, meningitis, or encephalitis and a study showed that this infection causes a transient Ca^{2+} -dependent fragmentation of the mitochondrial networks through the secreted toxin listeriolysin O (LLO), impairing $\Delta\psi_m$, mitochondrial respiration and decrease in intracellular content of ATP [133,134]. Moreover, *L. monocytogenes* increases the abundance of Mic10, a key component of the mitochondrial contact site and cristae organizing system (MICOS) in an LLO-dependent manner initiating mitochondrial fission and host cell infection [132].

Infection with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the causative agent of tuberculosis, has two phases, an early non-pathogenic phase and a pathogenic phase [172]. During the non-pathogenic phase, Mtb induces mitochondria fusion and robust activation of $\Delta\psi_m$ and ATP synthesis to inhibit apoptosis and sustain survival of the bacteria [143]. While the onset of the pathogenic phase is characterized by mitochondrial remodeling with induction of an irreversible MMPT following disruption of mitochondrial outer membrane (MOM), loss of $\Delta\psi_m$, cytochrome C release and consequently necrosis [142,173].

4.3. Protozoa

Different from viruses and bacteria, protozoans carry their own mitochondria, and the mitochondrial dynamics are directly linked to the parasite life cycle. A recent review has documented the aspects of protozoan's mitochondria and mitochondrion-related organelles

dynamics [174]. Here, we summarized findings of how host's mitochondria bioenergetics and dynamics are affected during protozoan infection.

Infection with the protozoan *Trypanosoma cruzi* can cause Chagas disease cardiomyopathy and megacolon [175,176]. Studies have shown that *T. cruzi* can elicit oxidative stress in host tissue by promoting increase in the production of cellular and mitochondrial ROS [148–150]. In addition, *T. cruzi* decreases the enzymatic activities of mitochondrial respiratory complexes [144,145], increased basal respiration, proton leak and ATP production [153]. Moreover, hearts of chronically *T. cruzi*-infected animals and Chagas disease patients have decreased activity of cytosolic glutathione peroxidase (GPx) and GSH and this was associated with decreased expression and activity of the mitochondrial antioxidant enzyme manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) [146,147]. The combination of increased intracellular ROS and inadequate anti-oxidative response was described as crucial for *T. cruzi* survival, since *T. cruzi* takes advantage and uses ROS as “fuel” to grow, due to disturbed iron metabolism [177]. Mitochondria-associated damage has been observed in cardiomyocytes infected by *T. cruzi*, such as defects of the respiratory chain and enhanced oxidative stress [151,152]. A recent study showed that mice deficient for the mitochondrial folding protein CyPD, which is essential for mitochondrial permeability transition pore opening, had inhibited collapse of the $\Delta\psi_m$ and reduced severity of parasite aggression and spread of *T. cruzi* [178]. Recent studies revealed that *T. cruzi* tissue tropism is controlled by key metabolic pathways, such as glycolysis, fatty acid oxidation, acylcarnitine metabolism and amino acid catabolism [179,180]. Moreover, interactions between host-parasite-microbiome regulate the intensity of infection and progression of chagasic gastrointestinal disease [179]. *T. cruzi* can benefit from these pathways to growth and/or to evade antiparasitic immune response [180].

Toxoplasma gondii, the causative agent of toxoplasmosis, is known to cause encephalitis, retinitis and miscarriage [181]. Data reported an increase of mitochondria fragmentation of human fibroblasts cells infected with the *T. gondii* and these mitochondria were recruited to the parasitophorous vacuole [158,182]. In addition, infected cells had metabolic perturbations of mitochondrial glycolysis [160] and OXPHOS complex [161], as well as increase of mitochondrial ROS, changes the amount of OXPHOS components and many other mitochondrial-related proteins [158,183]. In addition, host mitochondria fuse during *T. gondii* infection to limit fatty acids (FAs) uptake [159]. A proteomic study conducted by Blank and colleagues showed that *T. gondii* manipulation of host mitochondria requires association with key mitochondrial proteins, such as TOM70 and HSPA9 [184]. Another study showed that *T. gondii* unique dense granule antigen (GRA8) interacts with host proteins involved in mitochondria activation, ATP5A1-SIRT3 signaling pathways, thus contributing to a so-called mitochondrial metabolic resuscitation in order to maintain and regulate cellular metabolism and consequently parasite survival [166].

Plasmodium is a genus of protozoans that cause malaria, a highly inflammatory disease, being *Plasmodium falciparum* the deadliest in humans [185,186]. Shivappagowdar and co-workers provided new insights on malaria pathogenesis. They identified that the *P. falciparum* pore-forming proteins (PFPs) have damaging effects to primary vascular endothelial cells, where exposed cells had impaired $\Delta\psi_m$, increased ROS and apoptosis [154]. In a similar approach, it was shown that infection by *Plasmodium yoelii* makes host hepatocytes susceptible to mitochondria-initiated apoptosis, through a mechanism that involve increased expression of the proapoptotic Bcl-2, leading to mitochondrial fission and apoptosis [155–157].

Leishmania spp. parasites cause cutaneous or visceral leishmaniasis, a neglected tropical disease that can cause skin ulcers, swelling of the spleen and liver. The infection with *Leishmania donovani* was reported to disrupt miRNA turnover in macrophages, causing mitochondrial depolarization through induced expression of the OXPHOS uncoupler uncoupling protein 2 (UCP2) [162]. This infection also affects the ER-mitochondria tethering mediated by mitofusin 2 [162]. Another study showed that macrophages infected with *L. infantum* switched from an early glycolytic metabolism to an oxidative phosphorylation, and this metabolic deviation requires SIRT1 and LKB1/AMPK [163].

Collectively, these studies revealed an intrinsic relationship between parasites and host mitochondria. In general, the infection triggers an initial protective effect to mitochondrial dynamics and host cell bioenergetics to sustain parasite proliferation and survival. Afterwards, the infection triggers a damaging response, by eliciting cell death and parasite release. To understand the different phases of infection and develop mitochondrial-target therapies is a promising strategy to ameliorate or cure infectious diseases.

5. Mito-Nuclear Crosstalk and Infection

Infection by pathogens changes the mitochondrial metabolic and oxidative profile of infected cells. One of the outcomes on mitochondria is fragmentation and excessive ROS production, which may lead to a decreased mitochondrial mass inside the host cell. The mitochondria cannot be made de novo and they are encoded by the both mitochondrial and nuclear DNA, thus the mito-nuclear communication is essential for the proper coordination of mitochondrial biogenesis. A dynamic regulatory system able to respond to the now challenging infectious environment is crucial [187]. Several studies already reported that dysregulation of the crosstalk between the nucleus and the mitochondria has an impact in the disease progression of different etiologies, such as cancer, diabetes and heart failure.

The mitonuclear regulation signaling can be both anterograde (nucleus to mitochondria) and retrograde (mitochondria to nucleus) and it is coordinated by transcription factors and coactivators that regulate the expression of both mitochondrial and nuclear genes in response to an infectious insult [188]. Metabolic or other damages that occur within mitochondria culminate in dysregulation of several nuclear genes through the retrograde signaling. The proteins belonging to the peroxisome-proliferator activated receptor coactivator-1 family (PGC1) are reported to be the master regulators of mitochondrial biogenesis, oxidative phosphorylation and response to oxidative stress in humans [189]. The amount of PGC-1a is closely correlated with the number of mitochondria and deficiency in PGC1a has been reported to cause mitochondrial dysfunction, metabolic derangements and cell death [190–193]. A recent study showed that sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) in mice decreased the expression of Ppargc1a (encoding PGC1a), and this reduction was linked with decreased number of total mitochondria, increased in the percentage of injured mitochondria and impaired oxidative phosphorylation [194]. Pharmacological activation of PGC1a promotes defense against human rhinovirus infections (HRV) [125]. Suliman, HB and coworkers showed that nuclear accumulation of PGC-1 was a transcriptional response to lipopolysaccharide (LPS) administration in rat heart, which caused reduced mtDNA copy number and increased oxidative stress [195]. Other study showed that the *Pseudomonas aeruginosa* metabolite 2-amino acetophenone (2-AA) down-regulated the expression of PGC1b and PPAR γ and this was associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle and depletion of ATP synthesis in mice [196].

Activation of PGC1a is mediated by AMP-activated protein kinase (AMPK), which is considered a guardian of the cell metabolism and mitochondrial homeostasis [197]. Under cellular stress, AMPK phosphorylates specific enzymes such as mitofusins to control the dynamics of mitochondrial fusion and fission, autophagy-related protein 9 (ATG9) and serine/threonine-protein kinase ULK1 proteins to modulate autophagy and mitophagy, phospholipase D1 (PLD1) and thioredoxin-interacting protein (TXNIP) to control glucose uptake, acetyl-CoA carboxylases ACC1 and ACC2 of fatty-acid and sterol synthesis and lipid β -oxidation, PGC1a to regulate mitochondrial biogenesis, among others [197]. AMPK can either inhibit anabolism favoring a decrease in ATP consumption or stimulate ATP generation by catabolic mechanisms. Proper activation of AMPK-PGC1a pathway is required for antimicrobial host defense of several pathogens [198].

The PGC-1a response also included interaction with the redox-regulated nuclear respiratory factors NRF1 and NRF2. These factors mediate the coordination between nuclear and mitochondrial genomes by regulating the expression of several nuclear-encoded ETC proteins and by activating the mitochondrial transcription factor (TFAM), thus involved in the mitochondrial-encoded cytochrome C oxidase (COX) subunits and mitochondrial DNA

replication [199,200]. This communication reveals an integration of multiple transcriptional regulatory pathways to sustain homeostasis in a tissue specific way [201]. During infection, studies reported altered expression of NRF1 and/or NRF2 in viral infection with DENG V [202,203], Influenza A virus [114], HIV [204,205], HSV-1 [206], EBV [109,207–209], SARS-CoV-2 [210] and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) [211]. Similarly, bacterial infection was shown to modulate the expression of NRF1/NRF2, such as infection with *Staphylococcus aureus* [212–214] and *Escherichia coli* [215]. The expression of NRF2 was also modulated after protozoan infection with *Plasmodium* spp. [216], *Leishmania* spp. [217], *Toxoplasma gondii* [218] and *Entamoeba histolytica* [219]. *T. cruzi* infection decreased the protein expression of Nrf1 and Nrf2 in infected cardiomyocytes [220], and overexpression of Nrf2 was correlated with reduced parasitism [221].

Mitochondrial intermediate metabolites mediate epigenetic modifications, and these modifications are affected during infectious processes. For example, the mitochondrial acetyl-CoA metabolism drives histone acetylation, leading to chromatin opening and gene regulation in response to nutrient availability, metabolic reprogramming, signaling cues or stress [222]. Indeed, in vitro depletion of mtDNA caused chronic mitochondrial dysfunction, decreased enzymatic activity of histone acetyltransferases (HATs) and consequently reduced the acetylation of histones H3K9 and H3K27 [223]. A review highlighted that DNA acetylation is a crucial factor that affects the infection capacity of herpesvirus, such as human cytomegalovirus (HCMV) and Epstein–Barr virus (EBV) [224]. Bacterial infection of the human monocytic cell line THP-1 with *M. tuberculosis* infection decreased histone acetylation at the endogenous high-affinity Fc-gamma receptor (FCGR1A) promoter, which resulted in impaired response to IFN- γ [225]. *L. monocytogenes* induced deacetylation of H3K18 by mediating nuclear translocation of the deacetylase SIRT2 in vivo and in vitro [226]. Inhibition of histone deacetylase was shown to enhance mitochondrial reactive oxygen and to reduce significantly the intracellular bacterial loads of human macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Escherichia coli* [227]. Several metabolic pathways generate mitochondrial acetyl-CoA, including pyruvate conversion to acetyl-CoA by the pyruvate dehydrogenase complex (PDC), amino acid metabolism, conversion of acetate to acetyl-CoA by mitochondrial acyl-CoA synthetase short chain family member 1 (ACSS1), ketone body metabolism and fatty acid β -oxidation [226]. Mitochondria is also involved in the regulation of DNA and histone methylation. Mitochondria-TCA-generated α -Ketoglutarate (α -KG) is an important cofactor of the lysine demethylase 6B (KDM6B), histone demethylases (HDM) and TET DNA methylases, while fumarate, succinate and 2-hydroxyglutarate [2-HG] are inhibitors of TET [228]. Chromatin remodeling through a KDM6B-dependent demethylation of H3L27 within the IL-11 promoter was reported to facilitate the p65-NF- κ B interaction, which “fine-tuned” cellular response against *Streptococcus pneumoniae* [229]. Pathogen-induced metabolic disturbances can, therefore, affect the mitochondrial metabolism, misbalance the production of mitochondrial metabolites involved in chromatin remodeling culminating in improper immune response.

In general, the proper coordination between mitochondria, metabolite generation and activation of nuclear genes PGC1 α /NRF1 and NRF2 is crucial to sustain cell survival. Dysregulation in the mito-nuclear communication provoked by infectious pathogens triggers oxidative stress, mtDNA oxidation and mtDNA replication impairment. Consequently, therapeutic intervention targeting molecules involved in the mito-nuclear crosstalk might be beneficial for the treatment of infectious diseases.

6. Therapeutic Strategies Targeting Mitochondria to Fight Infection

As described during the review, the role of mitochondria plays a crucial role during infection and inflammation. The role of mitochondria in these biological processes makes this organelle a good promising candidate for the development of therapeutic strategies. Indeed, several studies already investigated mitochondria-targeted therapeutic strategies

241. Patel, K.R.; Brown, V.A.; Jones, D.; Britton, R.G.; Hemingway, D.; Miller, A.S.; West, K.P.; Booth, T.D.; Perloff, M.; Crowell, J.A.; et al. Clinical Pharmacology of Resveratrol and Its Metabolites in Colorectal Cancer Patients. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7392–7399. [\[CrossRef\]](#)
242. Ding, M.; Feng, N.; Tang, D.; Feng, J.; Li, Z.; Jia, M.; Liu, Z.; Gu, X.; Wang, Y.; Fu, F.; et al. Melatonin prevents Drp1-mediated mitochondrial fission in diabetic hearts through SIRT1-PGC1 α pathway. *J. Pineal Res.* **2018**, *65*, e12491. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
243. Haileselassie, B.; Mukherjee, R.; Joshi, A.U.; Napier, B.A.; Massis, L.M.; Ostberg, N.; Queliconi, B.B.; Monack, D.; Bernstein, D.; Mochly-Rosen, D. Drp1/Fis1 interaction mediates mitochondrial dysfunction in septic cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2019**, *130*, 160–169. [\[CrossRef\]](#)
244. Qi, X.; Qvit, N.; Su, Y.-C.; Mochly-Rosen, D. Novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. *J. Cell Sci.* **2012**, *126*, 789–802. [\[CrossRef\]](#)
245. Caicedo, A.; Fritz, V.; Brondello, J.-M.; Ayala, M.; Dennemont, I.; Abdellaoui, N.; de Fraipont, F.; Moisan, A.; Prouteau, C.A.; Boukhaddaoui, H.; et al. MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, srep09073. [\[CrossRef\]](#)
246. Court, A.C.; Le-Gatt, A.; Luz-Crawford, P.; Parra, E.; Aliaga-Tobar, V.; Batiz, L.F.; Contreras, R.; Ortúzar, M.I.; Kurte, M.; Elizondo-Vega, R.; et al. Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response. *EMBO Rep.* **2020**, *21*, e48052. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
247. Masuzawa, A.; Black, K.M.; Pacak, C.A.; Ericsson, M.; Barnett, R.J.; Drumm, C.; Seth, P.; Bloch, D.B.; Levitsky, S.; Cowan, D.B.; et al. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **2013**, *304*, H966–H982. [\[CrossRef\]](#)
248. Lin, H.-C.; Liu, S.-Y.; Lai, H.-S.; Lai, I.-R. Isolated Mitochondria Infusion Mitigates Ischemia-Reperfusion Injury of the Liver in Rats. *Shock* **2013**, *39*, 304–310. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
249. Huang, P.-J.; Kuo, C.-C.; Lee, H.-C.; Shen, C.-I.; Cheng, F.-C.; Wu, S.-F.; Chang, J.C.; Pan, H.-C.; Lin, S.-Z.; Liu, C.-S.; et al. Transferring Xenogenic Mitochondria Provides Neural Protection against Ischemic Stress in Ischemic Rat Brains. *Cell Transplant.* **2016**, *25*, 913–927. [\[CrossRef\]](#)
250. Spees, J.L.; Olson, S.; Whitney, M.J.; Prockop, D.J. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 1283–1288. [\[CrossRef\]](#)
251. Rawat, P.; Teodorof-Diedrich, C.; Spector, S.A. Human immunodeficiency virus Type-1 single-stranded RNA activates the NLRP3 inflammasome and impairs autophagic clearance of damaged mitochondria in human microglia. *Glia* **2018**, *67*, 802–824. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
252. Ojeda, D.S.; Grasso, D.; Urquiza, J.; Till, A.; Vaccaro, M.I.; Quarleri, J. Cell Death Is Counteracted by Mitophagy in HIV-Productively Infected Astrocytes but Is Promoted by Inflammasome Activation Among Non-productively Infected Cells. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2633. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
253. D'Amico, D.; Andreux, P.A.; Valdés, P.; Singh, A.; Rinsch, C.; Auwerx, J. Impact of the Natural Compound Urolithin A on Health, Disease, and Aging. *Trends Mol. Med.* **2021**, *27*, 687–699. [\[CrossRef\]](#)
254. Talvani, A.; Teixeira, M.M. Inflammation and Chagas disease some mechanisms and relevance. *Adv. Parasitol.* **2011**, *76*, 171–194. [\[PubMed\]](#)
255. Naggie, S. Hepatitis C Virus, Inflammation, and Cellular Aging: Turning Back Time. *Top. Antivir. Med.* **2017**, *25*, 3–6.
256. Cecconi, M.; Evans, L.; Levy, M.; Rhodes, A. Sepsis and septic shock. *Lancet* **2018**, *392*, 75–87. [\[CrossRef\]](#)
257. Missiroli, S.; Perrone, M.; Boncompagni, C.; Borghi, C.; Campagnaro, A.; Marchetti, F.; Anania, G.; Greco, P.; Fiorica, F.; Pinton, P.; et al. Targeting the NLRP3 Inflammasome as a New Therapeutic Option for Overcoming Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 2297. [\[CrossRef\]](#)
258. Jiang, M.; Li, R.; Lyu, J.; Li, X.; Wang, W.; Wang, Z.; Sheng, H.; Zhang, W.; Karhausen, J.; Yang, W. MCC950, a selective NLRP3 inflammasome inhibitor, improves neurologic function and survival after cardiac arrest and resuscitation. *J. Neuroinflamm.* **2020**, *17*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
259. Coll, R.C.; Hill, J.R.; Day, C.J.; Zamoshnikova, A.; Boucher, D.; Massey, N.L.; Chitty, J.L.; Fraser, J.A.; Jennings, M.P.; Robertson, A.A.; et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15*, 556–559. [\[CrossRef\]](#)
260. Coll, R.; Robertson, A.; Chae, J.J.; Higgins, S.C.; Muñoz-Planillo, R.; Inserra, M.C.; Vetter, I.; Dungan, L.S.; Monks, B.G.; Stutz, A.; et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 248–255. [\[CrossRef\]](#)
261. Dempsey, C.; Araiz, A.R.; Bryson, K.J.; Finucane, O.; Larkin, C.; Mills, E.L.; Robertson, A.A.B.; Cooper, M.A.; O'Neill, L.A.J.; Lynch, M.A. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid-beta and cognitive function in APP/PS1 mice. *Brain Behav. Immun.* **2017**, *61*, 306–616. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
262. Freeman, T.; Swartz, T.H. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1518. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
263. McCully, J.D.; Cowan, D.B.; Pacak, C.A.; Toumpoulis, I.K.; Dayalan, H.; Levitsky, S. Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2009**, *296*, H94–H105. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

III. Le rôle de l'inflammation et des mitochondries dans la maladie de Chagas.

Article 3 : Review : Inflammation and mitochondria in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy.

João Paulo Silva Nunes, Vinicius Moraes de Paiva Roda, Pauline Andrieux, Jorge Kalil, Christophe Chevillard, Edecio Cunha Neto.

Revue en cours de publication dans le journal Experimental Biology and Medicine en 2023.

Présentation de la publication :

La maladie de Chagas (MC), causée par le parasite protozoaire *Trypanosoma cruzi*, est une maladie négligée qui touche approximativement 6 millions de personnes. Environ 30 % des patients atteints de la maladie de Chagas développent une cardiomyopathie chronique de la maladie de Chagas (CCC), cardiomyopathie inflammatoire qui survient des décennies après l'infection initiale. Un sous-ensemble de patients atteints de CCC décède des suites d'une insuffisance cardiaque ou d'une arythmie. La fibrose myocardique, l'inflammation et le dysfonctionnement mitochondrial sont impliqués dans le substrat de l'arythmie et les événements déclencheurs. La survie dans la CCC est moins bonne que dans d'autres cardiomyopathies, ce qui peut être lié à une myocardite riche en cellules Th1 avec une abondance d'IFN- γ et de TNF- α , des niveaux sélectivement plus bas d'enzymes du métabolisme énergétique mitochondrial dans le cœur, et des niveaux réduits de phosphate à haute énergie, indiquant une production d'ATP médiocre. Les signaux IFN- γ et TNF- α , qui sont constitutivement régulés à la hausse chez les patients atteints de MC, affectent négativement la fonction mitochondriale dans les cardiomyocytes, récapitulant les résultats obtenus dans le tissu cardiaque de la CCC. Des études génétiques telles que le séquençage de l'exome entier (WES) dans des familles nucléaires présentant plusieurs cas de CCC/IF a révélé des variants pathogènes hétérozygotes rares dans les gènes mitochondriaux et inflammatoires qui ségréguent dans les cas de CCC. Nous avons résumé des études montrant comment l'IFN- γ et le TNF- α affectent la production d'énergie cellulaire, la santé mitochondriale et l'homéostasie redox dans les cardiomyocytes, dans la maladie de Chagas. En effet l'IFN- γ et le TNF- α ont un impact négatif sur la fonction mitochondriale par le biais de divers mécanismes. Ces cytokines induisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui perturbe l'activité de la chaîne de transport d'électrons, perturbent le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et déclenchent l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale. Ils provoquent également des lésions de l'ADN mitochondrial et altèrent la biogenèse mitochondriale. Nous émettons l'hypothèse que le dysfonctionnement mitochondrial induit par les cytokines chez les patients génétiquement prédisposés peut être la cause sous-jacente de la gravité de la CCC et nous pensons que ce mécanisme peut avoir un impact sur la santé des patients. Nous pensons que ce mécanisme peut également avoir une incidence sur d'autres cardiomyopathies inflammatoires.

Dans cette revue ma contribution a été de faire de la veille scientifique sur l'implication de l'IFN- γ et le TNF- α sur les mitochondries et dans la maladie de Chagas et de résumer mes recherches bibliographiques. J'ai produit également le schéma de cet article et j'ai contribué à sa réaction.

Review: Inflammation and mitochondria in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy

João Paulo Silva Nunes^{1,2}, Vinicius Moraes de Paiva Roda^{1,2}, Pauline Andrieux⁴, Jorge Kalil^{1,2,3}, Christophe Chevillard⁴, Edecio Cunha Neto^{1,2,3,c}

- 1 Laboratory of Immunology, Heart Institute Instituto do Coração (InCor), University of São Paulo, School of Medicine, 05403-900 São Paulo, Brazil.
- 2 Division of Clinical Immunology and Allergy, University of São Paulo, School of Medicine, 05403-900 São Paulo, Brazil.
- 3 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, INCT, III- Institute for Investigation in Immunology, 05403-900 São Paulo, Brazil
- 4 Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche (UMR) U1090, Aix Marseille Université, TAGC Theories and Approaches of Genomic Complexity, Institut MarMaRa, 13288 Marseille, France
- c Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração - InCor/HC-FMUSP Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 - Bloco II, 9º Andar CEP 05403-000 São Paulo, SP, Brazil edecunha@gmail.com

Abstract

Chagas disease (CD), caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is a neglected disease affecting around 6 million people, with no effective antiparasitic drugs or vaccines. About 30% of CD patients develop chronic Chagas disease cardiomyopathy (CCC), an inflammatory cardiomyopathy that occurs decades after the initial infection, while most infected patients (60%) remain asymptomatic in the so-called indeterminate form (IF). Death results from heart failure or arrhythmia in a subset of CCC patients. Myocardial fibrosis, inflammation and mitochondrial dysfunction are involved in the arrhythmia substrate and triggering events. Survival in CCC is worse than in other cardiomyopathies. Distinct from other cardiomyopathies, CCC displays a Th1-T cell rich myocarditis with abundant IFN- γ and TNF- α , selectively lower levels of mitochondrial energy metabolism enzymes in the heart, and reduced levels of high energy phosphate, indicating poor ATP production. IFN- γ and TNF- α signaling, which are constitutively upregulated in CD patients, negatively affect mitochondrial function in cardiomyocytes, recapitulating findings in CCC heart tissue. A genetic component in disease susceptibility was suggested by case-control studies that identified gene polymorphisms associated to CCC development. Whole exome sequencing (WES) in nuclear families with multiple CCC/IF cases has disclosed rare heterozygous pathogenic variants in mitochondrial and inflammatory genes segregating in CCC cases. In this minireview, we summarized scientific relevant studies where authors performed in vitro experiments using cardiomyocytes cells originated from human, rat and mouse models and how cell energy generation, mitochondrial health and redox homeostasis are affected by IFN- γ and TNF- α . We hypothesize that these findings suggest that cytokine-induced mitochondrial dysfunction in genetically predisposed patients may be the underlying cause of CCC severity and we believe this mechanism may have a bearing on other inflammatory cardiomyopathies.

Keywords: mitochondria dysfunction; inflammation; Chagas disease cardiomyopathy; IFN- γ ; cell metabolism; antioxidants

Impact Statement

The review paper highlights the significant impact of mitochondrial dysfunction on Chagas disease cardiomyopathy. By examining the existing body of research, it provides a comprehensive analysis of the detrimental consequences resulting from impaired mitochondrial function in this cardiac condition. We review new intricate relationship between Chagas disease cardiomyopathy, inflammatory response, mitochondrial dysfunction and energy disbalance, elucidating some molecular mechanisms and pathways involved. This review not only enhances our understanding of the disease pathogenesis but also emphasizes the crucial role of mitochondria in cardiac function and its potential as a therapeutic target for mitigating Chagas disease cardiomyopathy.

Introduction

Clinical and epidemiological features of Chagas disease

Chagas disease (American trypanosomiasis) caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is estimated to affect 6 million people in endemic areas of Latin America¹⁻³. Due to migration, *T. cruzi*-infected individuals have spread throughout the world, and it is estimated that 400,000 infected persons live in non-endemic countries, mainly in the USA and Europe⁴. One-third of the patients advance into chronic Chagas disease cardiomyopathy (CCC), an inflammatory dilated cardiomyopathy that frequently leads to heart failure and arrhythmia, resulting in fatality. Additionally, 10% of individuals develop digestive disorders such as megacolon and megaesophagus, while the remaining patients exhibit an asymptomatic condition throughout their lives referred to as the "indeterminate" form (IF)⁵. CCC is the most prevalent etiology of myocarditis in the world, and the

most important cause of nonischemic cardiomyopathy in endemic regions of Latin America. The annual mortality rate for individuals with chronic chagasic heart disease varies depending on their risk stratification, with a range of 1 to 10%. The overall mortality rate is estimated at 33%, in which approximately 35-45%, are directly linked to the advancement of heart failure. The worsening of heart failure can result in a significant decline in cardiac function, impaired circulation, fluid retention, and the development of life-threatening complications, ultimately contributing to the observed mortality rate⁶. Sudden Cardiac Death (SCD) accounts for about 50-60% of total mortality, where 80-90% are caused by ventricular tachycardia / fibrillation (VT / VF) and the remainder by bradyarrhythmia. In general, the rate and complexity of ventricular arrhythmias are higher in CCC, and prognosis is worse than in other cardiomyopathies^{7, 8}. Nonsustained VT (NSVT) is recognized as an independent predictor of SCD⁷. In common with other cardiomyopathies, CCC shows myocardial hypertrophy and fibrosis. However, inflammation is particularly important in CCC, as clinical severity in Chagas disease is closely associated with presence of myocarditis⁹. The histopathological substrate of CCC is chronic myocarditis and fibrosis, which can occur in electrical conduction tissue or in atrial or ventricular myocardium, leading to conduction system disorders and arrhythmias, or left ventricular dysfunction associated with progressive dilation leading to heart failure. Unfortunately, no vaccine or anti-parasitic drug with proven efficacy is available for chronically infected adults, when most patients are diagnosed¹⁰. Development of effective drugs for CCC is hampered by the limited knowledge of its pathogenesis. In this review, we conducted a comprehensive search in journal databases for scientific studies examining the effects

of the pro-inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α in in vitro experiments. Specifically, we focused on studies that investigated the impact of these cytokines on cardiomyocyte cell metabolism and mitochondrial dysfunction, as the cytokine-mediated disruption of redox balance and energy generation has emerged as a prominent topic in Chagas disease cardiomyopathy research. Our search encompassed papers published across all time ranges, and we utilized the following keywords: "TNF- α and/or IFN- γ and mitochondrial dysfunction"; "TNF- α and/or IFN- γ and Chagas disease cardiomyopathy"; and "TNF- α and/or IFN- γ in cardiomyocytes". We also included any additional papers that were cited in the selected studies. This review can support new studies and can shed light on novel treatment modalities that would be effective in ameliorating the morbimortality of CCC.

Pathogenesis and genetics of CCC

Immune dynamics in acute and chronic *T. cruzi* infection, central role of IFN- γ

The intracellular life cycle of *T. cruzi* is a major target of the antiparasite immune response¹¹. While extracellular *T. cruzi* components engage Toll-like receptors (TLR) TLR2, TLR4¹², *T. cruzi* RNA and DNA activate endosomal TLR7 and TLR9. TLR engagement promotes the Myd88-mediated activation of NF- κ B. The acidification of lysosomes facilitates the escape of *T. cruzi* into the cytoplasm, where it undergoes differentiation into replicative amastigote forms. Amastigote replication in the cytoplasm triggers the activation of inflammasomes, resulting in the release of inflammatory cytokines and activation of NF- κ B. This inflammatory stimulus induces expression of pro-inflammatory cytokines including IL-12 in macrophages and dendritic cells, which elicits differentiation of IFN- γ -producing Th1 cells. IFN- γ induces expression of multiple other genes involved

in resistance to *T. cruzi*, such as *TNFA* and *NOS2*^{13,14}.

Although powerful, the immune response that occurs during acute infection leads to partial parasite control. *T. cruzi* evades complete eradication, leading to the establishment of a chronic persistent infection with low parasitism. *T. cruzi*-infected individuals maintain increased production of inflammatory/Th1 cytokines like IFN- γ and TNF- α as compared to healthy individuals, as a result of persistent stimulus of innate and specific immunity¹⁵. CCC patients show an even more increased number of IFN- γ -producing Th1 T cells accompanied by elevated levels of plasma IFN- γ and TNF- α when compared to IF patients. Conversely, the numbers of IL-10-producing regulatory T cells, as well as Ebi3/IL-27p28, are lower in CCC patients as compared to IF. These observations align with a deficiency in the regulatory arm of the immune response in CCC¹⁶⁻²¹.

The increased proportion of circulating Th1 T cells is reflected in CCC myocardium. IFN- γ is the most upregulated cytokine²² and the top upstream regulator of the gene expression profile in CCC heart tissue^{23,24}. Circulating IFN- γ -producing CCR5+CXCR3+ Th1 T cells are more abundant in CCC than IF²⁵, and the same cells were identified in CCC heart tissue, along with the chemokine ligands of receptors CCR5 and CXCR3 -CCL5 and CXCL9, respectively²⁶. Together, this suggests that locally produced Th1 T cell-attracting chemokines play a role in the selective accumulation of Th1 T cells in CCC hearts. Thus, we believe the unopposed IFN- γ action in CCC myocardium is linked to the fact that factors that reduce IFN- γ production and/or Th1 T cell differentiation and regulatory T cells are downregulated in CCC patients. This lack of regulation could explain the destructiveness of the inflammatory infiltrate, most likely due to excessive collateral damage by IFN- γ -producing T cells as described in acutely *T. cruzi*-infected mice. IFN- γ is thus considered the culprit of CCC¹⁷.

Mitochondria in the pathogenesis of CCC

Evidence of mitochondrial dysfunction has been found in hearts of animal models of Chagas disease, as well as the myocardium of CCC patients. This is especially relevant for CCC pathogenesis, since mitochondrial dysfunction is a paramount feature of heart failure of diverse etiologies²⁷. Nisha Garg and her group pioneered and studied in detail mitochondrial dysfunction in hearts of murine models of acute and chronic Chagas disease and *in vitro* infection models²⁸. In addition, two studies reported that IFN- γ transgenic mice exhibit chronic active myocarditis and cardiomyopathy, which is mediated by TNF- α ^{27, 29}. Regarding mitochondrial damage in human CCC, our group described altered expression of mitochondrial genes and 16S mitochondrial rRNA in CCC heart lesions^{24, 30}. We also found a selective reduction of protein expression of ATP synthase and creatine kinase activity - key mitochondrial energy metabolism enzymes - in CCC heart lesions³¹. Six enzymes belonging to fatty acid beta-oxidation present reduced expression in CCC, as compared with one or two in non-inflammatory cardiomyopathies³². Cevey et al (2017) reported that treatment with fenofibrate, a PPAR α agonist was able to induce mitochondrial fatty acid beta-oxidation, restored left ventricular function, reduced myocarditis and fibrosis in a murine model of chronic Chagas disease cardiomyopathy, through IL-10-dependent or independent mechanisms (Rada et al. 2021). A reduction of high-energy phosphates, indicative of reduced ATP production, has been observed *in vivo* in CCC heart tissue³³. In agreement, mitochondrial DNA content was found to be reduced in CCC heart tissue as compared to healthy or DCM patients³⁴; Comparatively, CCC exhibited heightened nitro-oxidative stress in contrast to DCM, further indicating that mitochondrial function is especially disturbed in CCC. Upon performing pathways analysis of proteomic and

transcriptomic studies in CCC myocardium, our research team observed an enrichment in the pathways of mitochondrial dysfunction, mitochondrial translation and quality control. Additionally, we observed suppressed pathways associated with the tricarboxylic acid (TCA) cycle, respiratory electron transport chain, lipid oxidation and transmembrane potential of mitochondria. Notably, these findings were more pronounced in CCC compared to non-inflammatory cardiomyopathies^{24, 32}.

IFN- γ and TNF- α and energy generation

IFN- γ and TNF- α are essential pro-inflammatory cytokines in the anti-microbial response. Indeed, these cytokines allow a metabolic reprogramming essential to immune cells to activate and fight a pathogen. When innate immune cells are activated, by a molecular pattern associated with a pathogen/danger (PAMP/DAMP) or metabolism-associated danger (MADS) via pattern recognition receptors (PRR), some of these cells become antigen presenting cells (APC), such as dendritic cells and macrophages³⁵.

The APCs change their metabolism depending on whether they are anti-inflammatory or pro-inflammatory. In a pro-inflammatory role, APCs will release inflammatory cytokines including interleukin(IL)-1, TNF- α , and IL-6, among others. These cytokines contribute to the initiation and amplification of the inflammatory response, which lead to a polarization of M0 macrophages into M1 macrophages which is the form most adapted to a pro-inflammatory profile, this type of macrophage has a much stronger phagocytic capacity and pathogenic destruction activity^{36, 37}. M1 macrophages in turn, secrete high levels of pro-inflammatory cytokines such as interleukin(IL)-1 β , IL-6, IL-12 and TNF- α ^{38, 39}, which leads to macrophage self-activation but also to NK cell activation and amplification of the Th1 response⁴⁰.

To activate M0 macrophages in M1 with IFN- γ and LPS, cells switch metabolism. M0

macrophages showed a transition of metabolic pathways to produce adenosine triphosphate (ATP), between the oxidative phosphorylation (OXPHOS) pathway and the tricarboxylic acid cycle (TCA) versus energy production by the glycolytic and pentose phosphate pathways (PPP)^{41, 42}. An alteration of OXPHOS will cause a disruption of TCA, as many positive and negative allosteric regulators control the metabolic flux of this cycle. The disturbed functioning of these two pathways leads to the formation of reactive oxygen species (ROS)³⁵. Moreover, this alteration could be due to the stimulation of the cells by the TNF- α . Indeed, several studies showed that the TNF- α lead to a production of mitochondrial ROS (mtROS) by altering the complex I of the mitochondrial respiratory chain^{43, 44}. Superoxide, along with nitric oxide, plays a crucial role in the inflammatory and antimicrobial response, as demonstrated in the context of *T. cruzi* infection. This combination generates peroxynitrite (ONOO-), which effectively eradicates intracellular *T. cruzi* amastigotes^{45, 46}. In addition, it has been shown that stimulation with IFN- γ and TNF- α leads to NO production by induction of nitric oxide synthase 2 (NOS2)^{47, 48}. IFN- γ is also essential for the polarization of T cells into cytotoxic CD8+ T cells, upon activation the Th1 T cells will switch from OXPHOS to glycolysis³⁵. Although IFN- γ and TNF- α are essential for the activation and polarization of the immune system towards a pro-inflammatory action, their action in other cell types of the organism - in special, cardiomyocytes - can have a deleterious effect.

Several diseases that are due to chronic inflammation, such as Chronic inflammatory bowel disease⁴⁹, chronic Chagas disease⁵⁰, psoriasis⁵¹, non-infectious uveitis⁵² and many others, all have in common the deleterious effect of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α . During a chronic inflammation, cells belonging to the inflammatory sites, cardiac, intestinal, epithelial cells are

constantly stimulated with inflammatory cytokines. These cytokines will have the effect of switching the cellular metabolism from OXPHOS and TCA to glycolysis⁵³. A decrease in ATP is then visible, concomitant with an increase in the generation of mtROS^{31, 44, 50}. NO production was also observed in the case of stimulation with IFN- γ and TNF- α in human cell cardiomyocytes *in vitro* and in a model for Alzheimer's disease by the STAT1/NF- κ B/NOS2 pathway^{50, 54}. IFN- γ and TNF- α also mediated mitochondria depolarization, increased NO, ROS, lipid peroxidation and decreased creatine kinase activity in other cell types, such as hepatic cells⁵⁵ and skeletal muscle cells⁵⁶. The decrease in ATP, the increase in ROS and the switch between OXPHOS and glycolysis may be partly explained by the fact that TNF- α has the ability to reduce the expression of the four subunits of the complex I⁴⁴. Indeed, reduced expression of complex I may cause increase in ROS, a reduction of ATP but also an accumulation of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). NADH inhibits all enzymes in the TCA cycle, so the TCA is possibly altered in this case. In M1 pro-inflammatory macrophages it has already been said that stopping the TCA causes the modification of the metabolism with citrate which no longer participates in the TCA but joins the cycle of pentose phosphate pathway (PPP)⁵⁷. Succinate, which activates hypoxia-inducible factor- α (HIF1- α), could be one of the causes of the metabolism change, as HIF1- α promotes glycolysis and PPP⁴⁴. IFN- γ and TNF- α also cause damage to mitochondria via the reduction of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and the decrease in mitochondrial DNA^{50, 58}. Stimulation with IFN- γ and TNF- α leads to an increase in glucose and PPP metabolism by impairing the OXPHOS metabolism and the fatty acid pathway. In one study it was shown that these cytokines decrease the dependence of cardiac cells on the fatty acid pathway and the glutamine oxidation pathway⁵⁰. In addition, a study on patients with chronic chagasic cardiomyopathy, a condition in which IFN- γ and TNF- α are

locally present in large amounts, showed a decrease in enzymes of the beta oxidation pathway in cardiac biopsies ³². These elements suggest that TNF- α and IFN- γ

cause a shift in metabolism between OXPHOS/fatty acid pathway and towards glycolysis/PPP (Figure 1).

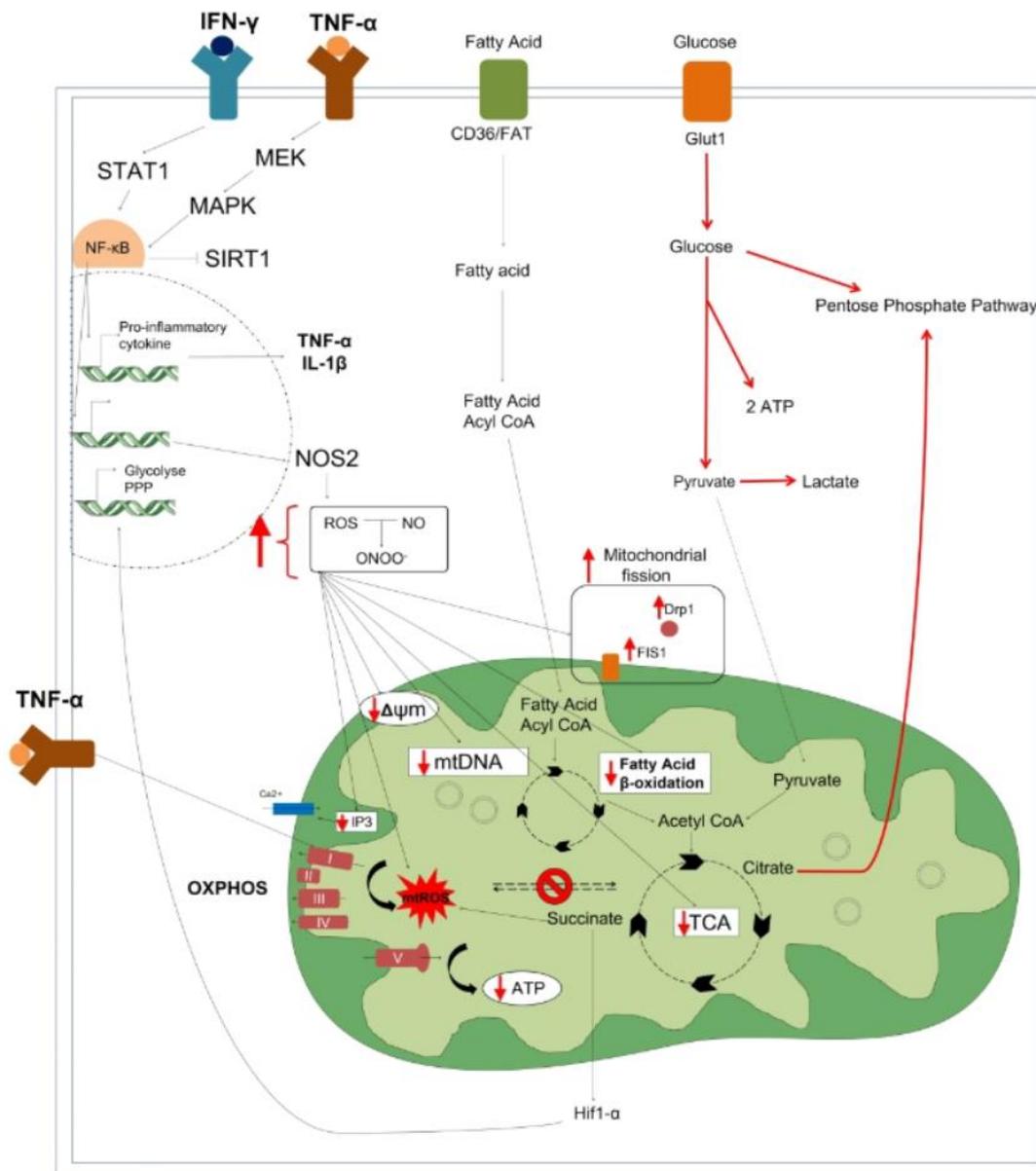


Figure 1 : IFN- γ and TNF- α dysregulate energy production in mitochondria.

Upon binding to their receptors, IFN- γ and TNF- α trigger the production of pro-inflammatory cytokines, including TNF- α and IL1- β , as well as the generation of nitric oxide (NO) by NOS2. This process occurs through the activation of the STAT1/NF- κ B and MEK/MAPK/NF- κ B pathways, respectively. Consequently, an increase in NO levels within the cells leads to alterations in mitochondrial functions such as changes in membrane potential, a decrease in mitochondrial DNA (mtDNA), a reduction in ATP production, and an elevation of mitochondrial reactive oxygen species (mtROS). Furthermore, TNF- α -induced reduction in complex I of the respiratory chain enhances mtROS production, further lowering ATP levels and causing an accumulation of NADH. This accumulation disrupts the proper functioning of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Consequently, several compounds, such as succinate, accumulate, which, in turn, activates HIF-1 and promotes glycolysis and the pentose phosphate pathway (PPP). The cytokines can also modulate mitochondrial fusion-fission mechanism by affecting the expression of FIS1 and DRP1 phosphorylation. Stimulation of cells with IFN- γ and TNF- α induces a metabolic shift, leading to alterations in the oxidative phosphorylation (OXPHOS) and TCA pathways. Additionally, it results in a decrease in the β -oxidation of fatty acids pathway and an increase in the glucose pathway of the PPP.

Role of IFN- γ and TNF- α in mitochondrial damage

Mitochondrial dysfunction is one of the main pathophysiological mechanisms of chronic disease, like cardiomyopathies and neurodegenerative diseases. Multiple studies demonstrate that inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α cause mitochondrial damage in diverse cell types. IFN- γ and TNF- α are abundantly produced in Chagas disease in response to the persistent stimulus of *T. cruzi* infection. Multiple studies have shown that these cytokines cause a reduction in oxidative metabolism, in the expression of energy metabolism enzymes, in the activity of the lipid beta-oxidation pathway and mitochondrial ATP production, by an NF- κ B dependent pathway. In our research, we have discovered that IFN- γ and TNF- α stimulation of AC16 cardiomyocytes leads to the promotion of nitro-oxidative stress and reduction of mitochondrial copy number, which closely mirror the findings in IFN- γ and TNF- α -rich CCC heart tissue⁵⁰.

OXPPOS is the process by which ATP is generated from the energy released by the transfer of electrons from NADH and flavin adenine dinucleotide (FADH₂) to molecular oxygen in the mitochondria. This process is mediated by a series of enzyme supercomplexes, called the electron transport chain (ETC), which are located in the inner mitochondrial membrane⁵⁹.

The energy released by the electron transfer is used to pump protons (H⁺) across the inner mitochondrial membrane, creating an electrochemical gradient (mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$) which drives ATP synthase for ATP synthesis. TNF- α and IFN- γ also can disrupt cardiomyocyte metabolism, decreasing basal and maximal respiration and ATP production⁶⁰. Recent results showed that IFN- γ caused a dose-dependent reduction in $\Delta\Psi_m$ and that TNF- α alone or in combination with IFN- γ decreased mitochondrial, glycolytic and total ATP in human cardiomyocyte AC16 cells⁵⁰. Furthermore, these two cytokines together

change cardiomyocytes energetic metabolism decreasing the dependency of glutamine and fatty acid oxidation and increasing the capacity of glucose oxidation^{34, 61}.

Mechanistically, TNF- α can induce glucose oxidation by downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator (PGC-1 α) and pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4)⁶². Through TNF- α stimulation, NF- κ B activation is triggered, facilitating its translocation to the nucleus and promoting the interaction between NF- κ B p65 subunit and the transcription factor E2F1. The DNA-binding capability of E2F1 is required for the expression of PDK4, which in turn inhibits the pyruvate dehydrogenase complex through phosphorylation⁶³.

A significant crosstalk occurs between NF- κ B and mitochondrion-protecting proteins. NF- κ B signaling down-regulates sirtuin-1 (SIRT1) activity through the expression of IFN- γ , ROS and NO⁶⁴. SIRT1, an antioxidant and anti-inflammatory protein, regulates the oxidative respiration and cellular survival and is highly expressed in the heart, acting as an inhibitor of NF- κ B inflammatory signals by deacetylating the p65 subunit of the NF- κ B complex⁶⁵. While NF- κ B stimulates glycolytic energy flux in acute inflammation, SIRT1 inhibits NF- κ B and enhances mitochondrial oxidative metabolism through 5' AMP-activated protein kinase (AMPK), an energy sensor that regulates the metabolism in cardiomyocytes in health and disease⁶⁴. Indeed, treatment of *T. cruzi*-infected mice with SIRT1 and/or AMPK agonists SRT1720, resveratrol and metformin reduced myocardial NF- κ B transcriptional activity, inflammation and oxidative stress, resulting in beneficial results for the amelioration of cardiac function^{66, 67}. Likewise, treatment of AC16 human cardiomyocyte cell line stimulated with IFN- γ /TNF- α with the same agents, NRF2 agonists, or antagonists of NOS2 and NF- κ B led to restoration of $\Delta\Psi_m$ ³⁴.

Dysregulated myocardial fatty acid metabolic signals were reported in some *in vitro* research using TNF- α -stimulated cardiomyocytes^{68,69}. A study depicted that TNF- α -treated cells have decreased levels of AMPK⁷⁰. The authors showed that activation of AMPK can mediate the transport of fatty acids into mitochondria through phosphorylation and inhibition of acetyl-CoA carboxylase (ACC), an important enzyme that inhibits the fatty acid oxidation, AMPK therefore enhanced the oxidation of fatty acids in HL-1 cardiomyocyte cells⁷¹. The same group reported that the expression of PPAR- α and PPAR- δ , transcription factors that regulate fatty acid oxidation, is decreased when cells are exposed to TNF- α ⁷¹. TNF- α decreased Carnitine O-palmitoyltransferase 1 (CPT-1) expression, which is required for the translocation of long-chain fatty acids into the mitochondrial matrix (a limiting step in beta-oxidation). The unphosphorylated ACC state catalyzes the carboxylation of acetyl-CoA into malonyl-CoA and, which decrease fatty acid oxidation by inhibiting CPT-1⁷². Also, the oxidation of fatty acids is deregulated in IFN- γ treated cardiomyocytes, similar to that observed in TNF- α treatment, where ACC phosphorylation is decreased⁶⁰. Impairment of these enzymes by TNF- α could have, therefore, a great implication for heart dysfunction, as fatty acid oxidation is the primary source of energy for contractile function of cardiomyocytes.

Additional pathways that can be related to energetic dysfunction could be TNF- α induction of Class I histone deacetylases that can alter mitochondrial complexes I and II activity⁷³ and a decreased inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) formation, possibly by decreased activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase enzyme that regulates some lipid synthesis⁷⁴. IP3 can induce Ca²⁺ uptake in mitochondrial matrix and increases ATP production in cardiomyocytes⁷⁵.

The cytokines can have numerous effects on cardiomyocytes, deteriorating their functions and homeostasis (Table I). TNF- α mediates changes in mitochondrial function leading to dysfunction by several mechanisms. For instance, Shen and co-workers have shown that TNF- α increases the phosphorylation of Dynamin-related peptide 1 (Drp1) and its translocation to mitochondria in H9c2 cardiomyocytes, likely through increased RhoA GTPase expression⁷⁶. In addition to increased p-Drp1, IFN- γ and TNF- α were shown to induce mitochondria fragmentation by upregulating the expression of the mitochondrial fission protein Fission 1 (FIS1)⁷⁷. Both Drp1 and FIS1 play key role in mitochondrial fission and their modulation by IFN- γ and TNF- α is reported to change the cell metabolism, to increase the $\Delta\Psi_m$ and ROS production and also to dampen basal and maximal respiration and ATP synthesis^{71,77}.

Clinical similarities between genetic mitochondrialopathies and Chagas disease: a whole-exome sequencing study

We have recently used whole exome sequencing in families to identify pathogenic variants in nuclear families with multiple CCC/IF cases, disclosing rare heterozygous pathogenic variants in mitochondrial and inflammatory genes linked to CCC cases. In each family, the identified variants were shared only by family members with CCC, which were absent from IF siblings; such mutations occurred in mitochondrial genes in 5 out of the 6 studied families⁷⁸. One of the variants identified is a complete loss of function mutation in the DHODH gene, which supplies electrons to Complex III of the ETC. Significantly, incubation with IFN- γ on the human cardiomyocyte cell line treated with an inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase brequinar markedly reduced $\Delta\Psi_M$ in synergy with IFN- γ and TNF- α , indicating increased mitochondrial dysfunction. Another variant linked to CCC in another family leads to a stopgain variant

at exon 8 of RPSUD3, involved in the assembly of the mitochondrial ribosome, creating a truncated version of the RPSUD3 protein, lacking 24% of its C-terminal sequence.

Mitochondriopathies, caused by homozygous pathogenic variants of genes encoded in the nuclear DNA, or in the mitochondrial DNA, are the most common group of monogenic syndromes. They severely damage the energy metabolism and cause mitochondrial dysfunction and functional impairment in tissues with high metabolic demand, such as cardiac and skeletal muscle, nervous tissue, liver and kidneys. They can present as syndromes affecting individual organs or tissues or combinations of them and each clinical syndrome is associated with a specific gene or gene group bearing the variant; the clinical presentation can vary between intrauterine to the adult age. Significantly, 30-40% of mitochondriopathy patients evolve with cardiomyopathy, heart conduction abnormalities and severe arrhythmia^{79,80}, and 15% to gastrointestinal motility disorders, including megaesophagus and mega-colon, with denervation of myoenteric nervous plexi, and autonomic nervous system disturbances. The similarity in the proportions of clinical outcomes with those of Chagas disease (30% CCC, 10% digestive form- motility disorders⁸¹) is impressive and made us hypothesize that heterozygous pathogenic variants, which may cause a partial reduction in mitochondrial function, may play a role in differential progression for Chagas disease in a two-hit phenomenon where cytokine-induced mitochondrial damage is the second hit. Genetic alterations with direct implications to mitochondrial function and immune response can therefore be important components for Chagas disease cardiomyopathy and megaesophagus susceptibility and progression^{78,81}.

This review has compiled all relevant scientific data concerning the interplay between genetics, inflammation, and

mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of CCC. While this review may not directly influence public policies regarding CCC therapy, it significantly improves our understanding of the disease's pathogenesis. Furthermore, it underscores the vital role of mitochondria in cardiac function and highlights their potential as a therapeutic target for mitigating Chagas disease cardiomyopathy.

Conclusions

IFN- γ and TNF- α have negative impacts on mitochondrial function through various mechanisms. These cytokines induce the production of reactive oxygen species (ROS), disrupt the activity of the electron transport chain, disturb mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), and trigger the opening of mitochondrial permeability transition pores. They also cause mitochondrial DNA damage and alter mitochondrial biogenesis, creating a cycle of mitochondrial dysfunction and cardiac injury. The specific implications of IFN- γ and TNF- α in Chagas disease cardiomyopathy have not been fully explored, underscoring the unique nature of mitochondrial dysfunction in this context.

Considering the critical role of oxidative stress in the detrimental effects of IFN- γ and TNF- α on mitochondria, therapeutic strategies aimed at enhancing antioxidant defense systems show promise for intervention. Various approaches have been investigated to boost antioxidant pathways, such as administering external antioxidants, modulating internal antioxidant enzymes, activating antioxidant signaling pathways, and utilizing AMPK and sirtuin agonists.

This review provides a summary of the significant roles played by genetic factors and IFN- γ and TNF- α in mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes, which could explain the worse prognoses for Chagas disease cardiomyopathy. The harmful effects of these cytokines together with gene polymorphisms in mitochondria genes could contribute to the progression of

cardiac dysfunction. Therefore, targeting antioxidant pathways that can mitigate cytokine-induced mitochondrial dysfunction holds great potential as a therapeutic approach to alleviate the detrimental effects of IFN- γ and TNF- α . Further research is required to explore the effectiveness and safety of antioxidant-based interventions, potentially paving the way for novel treatments that ameliorate mitochondrial dysfunction and enhance the clinical prognosis and treatment of patients with Chagas disease cardiomyopathy, as well as other conditions associated with chronic inflammation and dysregulated inflammatory cytokines.

Authors' Contributions

JPSN, VMPP, PA, JK, CC and ECN wrote and revised the manuscript.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); the Aix-Marseille University (grant number: AMIDEX "International_2018" MITOMUTCHAGAS); the French Agency for Research (Agence Nationale de la Recherche-ANR (grant numbers: "Br-Fr-Chagas", "landscardio"). This work was founded by the Inserm Cross-Cutting Project GOLD. This project has received funding from the Excellence Initiative of Aix-Marseille University - A*Mixex a French "Investissements d'Avenir programme"- Institute MarMaRa AMX-19-IET-007. This work was supported by FAPESP (São Paulo State Research Funding Agency Brazil) (grant 2022/00758-0). Brazilian National Research Council (CNPq) provided a Productivity Award for ECN and JK. This work is supported by the CAPES-COFECUB program (Me987/23). CC

is supported by the Inserm's PRI/IRP 2022 program (Me987/23). The funders did not play any role in the decision to publish or preparation of the manuscript.

References

1. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). <https://www.who.int/2021>.
2. Chagas disease (American trypanosomiasis). https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_12021.
3. Organization WH. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2021.
4. Antinori S, Galimberti L, Bianco R, Grande R, Galli M, Corbellino M. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *Eur J Intern Med* 2017;**43**:6-15
5. Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm* 2014;**2014**:683230
6. Bocchi EA, Bestetti RB, Scanavacca MI, Cunha Neto E, Issa VS. Chronic Chagas Heart Disease Management: From Etiology to Cardiomyopathy Treatment. *J Am Coll Cardiol* 2017;**70**:1510-24
7. Martinelli Filho M, De Siqueira SF, Moreira H, Fagundes A, Pedrosa A, Nishioka SD, Costa R, Scanavacca M, D'Avila A, Sosa E. Probability of occurrence of life-threatening ventricular arrhythmias in Chagas' disease versus non-Chagas' disease. *Pacing Clin Electrophysiol* 2000;**23**:1944-6
8. Pereira FT, Rocha EA, Monteiro MeP, Lima NeA, Rodrigues Sobrinho CR, Pires Neto RaJ. Clinical Course After Cardioverter-Defibrillator Implantation: Chagasic Versus Ischemic Patients. *Arq Bras Cardiol* 2016;**107**:99-100
9. Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, Pileggi F. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol* 1987;**10**:665-70

10. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Connolly SJ, Yusuf S, Investigators B. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2015;**373**:1295-306
11. da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, Silva JS. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;**4**:e604
12. Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *J Parasitol Res* 2012;**2012**:507874
13. Cummings KL, Tarleton RL. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* 2004;**72**:4081-9
14. Arantes RM, Marche HH, Bahia MT, Cunha FQ, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Am J Pathol* 2004;**164**:1361-8
15. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003;**278**:1910-4
16. Martins GA, Vieira LQ, Cunha FQ, Silva JS. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun* 1999;**67**:3864-71
17. Medina TS, Oliveira GG, Silva MC, David BA, Silva GK, Fonseca DM, Sesti-Costa R, Frade AF, Baron MA, Ianni B, Pereira AC, Chevillard C, Cunha-Neto E, Marin-Neto JA, Silva JS. Ebi3 Prevents *Trypanosoma cruzi*-Induced Myocarditis by Dampening IFN- γ -Driven Inflammation. *Front Immunol* 2017;**8**:1213
18. Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* 1995;**63**:4862-7
19. Ferreira LR, Frade AF, Baron MA, Navarro IC, Kalil J, Chevillard C, Cunha-Neto E. Interferon- γ and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. *World J Cardiol* 2014;**6**:782-90
20. Silva RR, Mariante RM, Silva AA, dos Santos AL, Roffê E, Santiago H, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. Interferon-gamma promotes infection of astrocytes by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 2015;**10**:e0118600
21. Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 2002;**39**:531-6
22. Sousa GR, Gomes JA, Damasio MP, Nunes MC, Costa HS, Medeiros NI, Fares RC, Chaves AT, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO. The role of interleukin 17-mediated immune response in Chagas disease: High level is correlated with better left ventricular function. *PLoS One* 2017;**12**:e0172833
23. Cunha-Neto E, Dzaio VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuti L, Higuchi ML, Koyama NS, Silva JS, Kalil J, Liew CC. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *American Journal of Pathology* 2005;**167**:305-13
24. Laugier L, Ferreira LRP, Ferreira FM, Cabantous S, Frade AF, Nunes JP, Ribeiro RA, Brochet P, Teixeira PC, Santos RHB, Bocchi EA, Bacal F, Cândido DDS, Maso VE, Nakaya HI, Kalil J, Cunha-Neto E, Chevillard C. miRNAs may play a major role in the control of gene expression in key pathobiological processes in Chagas disease

- cardiomyopathy. *PLoS Negl Trop Dis* 2020;**14**:e0008889
25. Higuchi MeL, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, Bellotti G, Pileggi F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;**423**:157-60
26. Nogueira LG, Santos RHB, Ianni BM, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, Frade A, Donadi E, Dias F, Saba B, Wang HTL, Fragata A, Sampaio M, Hirata MH, Buck P, Mady C, Bocchi EA, Stolf NA, Kalil J, Cunha-Neto E. Myocardial Chemokine Expression and Intensity of Myocarditis in Chagas Cardiomyopathy Are Controlled by Polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2012;**6**
27. Reifenberg K, Lehr HA, Torzewski M, Steige G, Wiese E, Küpper I, Becker C, Ott S, Nusser P, Yamamura K, Rechtsteiner G, Warger T, Pautz A, Kleinert H, Schmidt A, Pieske B, Wenzel P, Münzel T, Löhler J. Interferon-gamma induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. *Am J Pathol* 2007;**171**:463-72
28. Lopez M, Tanowitz HB, Garg NJ. Pathogenesis of Chronic Chagas Disease: Macrophages, Mitochondria, and Oxidative Stress. *Curr Clin Microbiol Rep* 2018;**5**:45-54
29. Torzewski M, Wenzel P, Kleinert H, Becker C, El-Masri J, Wiese E, Brandt M, Pautz A, Twardowski L, Schmitt E, Münzel T, Reifenberg K. Chronic inflammatory cardiomyopathy of interferon γ -overexpressing transgenic mice is mediated by tumor necrosis factor- α . *Am J Pathol* 2012;**180**:73-81
30. Benatar AF, García GA, Bua J, Cerliani JP, Postan M, Tasso LM, Scaglione J, Stupirski JC, Toscano MA, Rabinovich GA, Gómez KA. Galectin-1 Prevents Infection and Damage Induced by *Trypanosoma cruzi* on Cardiac Cells. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;**9**:e0004148
31. Teixeira PC, Santos RH, Fiorelli AI, Bilate AM, Benvenuti LA, Stolf NA, Kalil J, Cunha-Neto E. Selective decrease of components of the creatine kinase system and ATP synthase complex in chronic Chagas disease cardiomyopathy. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;**5**:e1205
32. Teixeira PC, Ducret A, Langen H, Nogoceke E, Santos RHB, Silva Nunes JP, Benvenuti L, Levy D, Bydlowski SP, Bocchi EA, Kuramoto Takara A, Fiorelli AI, Stolf NA, Pomeranzeff P, Chevillard C, Kalil J, Cunha-Neto E. Impairment of Multiple Mitochondrial Energy Metabolism Pathways in the Heart of Chagas Disease Cardiomyopathy Patients. *Front Immunol* 2021;**12**:755782
33. Leme AM, Salemi VM, Parga JR, Ianni BM, Mady C, Weiss RG, Kalil-Filho R. Evaluation of the metabolism of high energy phosphates in patients with Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol* 2010;**95**:264-70
34. Nunes JPS, Andrieux P, Brochet P, Almeida RR, Kitano E, Honda AK, Iwai LK, Andrade-Silva D, Goudenège D, Alcântara Silva KD, Vieira RS, Levy D, Bydlowski SP, Gallardo F, Torres M, Bocchi EA, Mano M, Santos RHB, Bacal F, Pomeranzeff P, Laurindo FRM, Teixeira PC, Nakaya HI, Kalil J, Procaccio V, Chevillard C, Cunha-Neto E. Co-Exposure of Cardiomyocytes to IFN- γ and TNF- α Induces Mitochondrial Dysfunction and Nitro-Oxidative Stress: Implications for the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Front Immunol* 2021;**12**:755862
35. Sun L, Yang X, Yuan Z, Wang H. Metabolic Reprogramming in Immune Response and Tissue Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020;**40**:1990-2001
36. Higuchi M, Sugimoto M, Kobayashi Y, Osawa T. Human macrophage-activating factors for cytotoxicity. I. Establishment of a human T-cell hybridoma that produces macrophage-activating factors for cytotoxicity. *Microbiol Immunol* 1987;**31**:469-79
37. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism

- and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983;**158**:670-89
38. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;**8**:958-69
39. Barrett TJ. Macrophages in Atherosclerosis Regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020;**40**:20-33
40. Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, Laskin JD. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011;**51**:267-88
41. Liu L, Lu Y, Martinez J, Bi Y, Lian G, Wang T, Milasta S, Wang J, Yang M, Liu G, Green DR, Wang R. Proinflammatory signal suppresses proliferation and shifts macrophage metabolism from Myc-dependent to HIF1 α -dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;**113**:1564-9
42. Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P, Knapp B, Haas R, Schmid JA, Jandl C, Amir S, Lubec G, Park J, Esterbauer H, Bilban M, Brizuela L, Pospisilik JA, Otterbein LE, Wagner O. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab* 2012;**15**:813-26
43. Roca FJ, Whitworth LJ, Prag HA, Murphy MP, Ramakrishnan L. Tumor necrosis factor induces pathogenic mitochondrial ROS in tuberculosis through reverse electron transport. *Science* 2022;**376**:eabh2841
44. Mariappan N, Elks CM, Fink B, Francis J. TNF-induced mitochondrial damage: a link between mitochondrial complex I activity and left ventricular dysfunction. *Free Radic Biol Med* 2009;**46**:462-70
45. Silwal P, Kim JK, Kim YJ, Jo EK. Mitochondrial Reactive Oxygen Species: Double-Edged Weapon in Host Defense and Pathological Inflammation During Infection. *Front Immunol* 2020;**11**:1649
46. Paiva CN, Medei E, Bozza MT. ROS and Trypanosoma cruzi: Fuel to infection, poison to the heart. *PLoS Pathog* 2018;**14**:e1006928
47. Salim T, Sershen CL, May EE. Investigating the Role of TNF-alpha and IFN-gamma Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. *PLoS One* 2016;**11**:e0153289
48. Cortese-Krott MM, Kulakov L, Oplander C, Kolb-Bachofen V, Kroncke KD, Suschek CV. Zinc regulates iNOS-derived nitric oxide formation in endothelial cells. *Redox Biol* 2014;**2**:945-54
49. Resta-Lenert S, Barrett KE. Probiotics and commensals reverse TNF-alpha- and IFN-gamma-induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2006;**130**:731-46
50. Nunes JPS, Andrieux P, Brochet P, Almeida RR, Kitano E, Honda AK, Iwai LK, Andrade-Silva D, Goudenege D, Alcantara Silva KD, Vieira RS, Levy D, Bydlowski SP, Gallardo F, Torres M, Bocchi EA, Mano M, Santos RHB, Bacal F, Pomerantzeff P, Laurindo FRM, Teixeira PC, Nakaya HI, Kalil J, Procaccio V, Chevillard C, Cunha-Neto E. Co-Exposure of Cardiomyocytes to IFN-gamma and TNF-alpha Induces Mitochondrial Dysfunction and Nitro-Oxidative Stress: Implications for the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Front Immunol* 2021;**12**:755862
51. Rendon A, Schakel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci* 2019;**20**
52. Hsu YR, Huang JC, Tao Y, Kaburaki T, Lee CS, Lin TC, Hsu CC, Chiou SH, Hwang DK. Noninfectious uveitis in the Asia-Pacific region. *Eye (Lond)* 2019;**33**:66-77
53. Rath E, Haller D. Intestinal epithelial cell metabolism at the interface of microbial dysbiosis and tissue injury. *Mucosal Immunol* 2022;**15**:595-604
54. Belkhefja M, Rafa H, Medjeber O, Arroul-Lammali A, Behairi N, Abada-Bendib M, Makrelouf M, Belarbi S, Masmoudi AN, Tazir M, Touil-Boukoffa C. IFN-gamma and TNF-alpha are involved during Alzheimer disease progression and correlate with nitric oxide production: a study in Algerian patients. *J Interferon Cytokine Res* 2014;**34**:839-47

55. Lee HJ, Oh YK, Rhee M, Lim JY, Hwang JY, Park YS, Kwon Y, Choi KH, Jo I, Park SI, Gao B, Kim WH. The role of STAT1/IRF-1 on synergistic ROS production and loss of mitochondrial transmembrane potential during hepatic cell death induced by LPS/d-GalN. *J Mol Biol* 2007;**369**:967-84
56. Kalovidouris AE, Plotkin Z, Graesser D. Interferon-gamma inhibits proliferation, differentiation, and creatine kinase activity of cultured human muscle cells. II. A possible role in myositis. *J Rheumatol* 1993;**20**:1718-23
57. Cezard A, Monard S, Brea-Diakite D, Guillon A, Si-Tahar M. [Metabokines reviewed: Essential mediators of anti-infectious immunity]. *Med Sci (Paris)* 2021;**37**:342-48
58. Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell Biol* 2016;**26**:249-61
59. Andrieux P, Chevillard C, Cunha-Neto E, Nunes JPS. Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation. *Int J Mol Sci* 2021;**22**
60. Ni C, Ma P, Wang R, Lou X, Liu X, Qin Y, Xue R, Blasig I, Erben U, Qin Z. Doxorubicin-induced cardiotoxicity involves IFN γ -mediated metabolic reprogramming in cardiomyocytes. *J Pathol* 2019;**247**:320-32
61. Chevillard C, Nunes JPS, Frade AF, Almeida RR, Pandey RP, Nascimento MS, Kalil J, Cunha-Neto E. Disease Tolerance and Pathogen Resistance Genes May Underlie. *Front Immunol* 2018;**9**:2791
62. Palomer X, Alvarez-Guardia D, Rodríguez-Calvo R, Coll T, Laguna JC, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, Vázquez-Carrera M. TNF- α reduces PGC-1 α expression through NF- κ B and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovasc Res* 2009;**81**:703-12
63. Palomer X, Álvarez-Guardia D, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, Vázquez-Carrera M. The interplay between NF- κ B and E2F1 coordinately regulates inflammation and metabolism in human cardiac cells. *PLoS One* 2011;**6**:e19724
64. Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, Kaarniranta K, Salminen A. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal* 2013;**25**:1939-48
65. Caruso R, Marafini I, Franzè E, Stolfi C, Zorzi F, Monteleone I, Caprioli F, Colantoni A, Sarra M, Sedda S, Biancone L, Sileri P, Sica GS, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. Defective expression of SIRT1 contributes to sustain inflammatory pathways in the gut. *Mucosal Immunol* 2014;**7**:1467-79
66. Wan X, Wen JJ, Koo SJ, Liang LY, Garg NJ. SIRT1-PGC1 α -NF κ B Pathway of Oxidative and Inflammatory Stress during Trypanosoma cruzi Infection: Benefits of SIRT1-Targeted Therapy in Improving Heart Function in Chagas Disease. *PLoS Pathog* 2016;**12**:e1005954
67. Vilar-Pereira G, Carneiro VC, Mata-Santos H, Vicentino AR, Ramos IP, Giarola NL, Feijó DF, Meyer-Fernandes JR, Paula-Neto HA, Medei E, Bozza MT, Lannes-Vieira J, Paiva CN. Resveratrol Reverses Functional Chagas Heart Disease in Mice. *PLoS Pathog* 2016;**12**:e1005947
68. Lee TI, Kao YH, Tsai WC, Chung CC, Chen YC, Chen YJ. HDAC Inhibition Modulates Cardiac PPARs and Fatty Acid Metabolism in Diabetic Cardiomyopathy. *PPAR Res* 2016;**2016**:5938740
69. Lee TI, Kao YH, Chen YC, Tsai WC, Chung CC, Chen YJ. Cardiac metabolism, inflammation, and peroxisome proliferator-activated receptors modulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in diabetic rats. *Int J Cardiol* 2014;**176**:151-7
70. Li X, Liu J, Lu Q, Ren D, Sun X, Rousselle T, Tan Y, Li J. AMPK: a therapeutic target of heart failure-not only metabolism regulation. *Biosci Rep* 2019;**39**
71. Lee TI, Kao YH, Baigalmaa L, Lee TW, Lu YY, Chen YC, Chao TF, Chen YJ. Sodium hydrosulphide restores tumour necrosis factor- α -induced mitochondrial dysfunction and metabolic dysregulation in HL-1 cells. *J Cell Mol Med* 2019;**23**:7641-50
72. Zhou W, Tu Y, Simpson PJ, Kuhajda FP. Malonyl-CoA decarboxylase inhibition is

- selectively cytotoxic to human breast cancer cells. *Oncogene* 2009;**28**:2979-87
73. Lkhagva B, Kao YH, Lee TI, Lee TW, Cheng WL, Chen YJ. Activation of Class I histone deacetylases contributes to mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes with altered complex activities. *Epigenetics* 2018;**13**:376-85
74. Reithmann C, Werdan K. Tumor necrosis factor alpha decreases inositol phosphate formation and phosphatidylinositol-bisphosphate (PIP2) synthesis in rat cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994;**349**:175-82
75. Seidlmayer LK, Kuhn J, Berbner A, Arias-Loza PA, Williams T, Kaspar M, Czolbe M, Kwong JQ, Molkenntin JD, Heinze KG, Dedkova EN, Ritter O. Inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated sarcoplasmic reticulum-mitochondrial crosstalk influences adenosine triphosphate production via mitochondrial Ca²⁺ uptake through the mitochondrial ryanodine receptor in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2016;**112**:491-501
76. Shen YL, Shi YZ, Chen GG, Wang LL, Zheng MZ, Jin HF, Chen YY. TNF- α induces Drp1-mediated mitochondrial fragmentation during inflammatory cardiomyocyte injury. *Int J Mol Med* 2018;**41**:2317-27
77. Buoncervello M, Maccari S, Ascione B, Gambardella L, Marconi M, Spada M, Macchia D, Stati T, Patrizio M, Malorni W, Matarrese P, Marano G, Gabriele L. Inflammatory cytokines associated with cancer growth induce mitochondria and cytoskeleton alterations in cardiomyocytes. *J Cell Physiol* 2019;**234**:20453-68
78. Ouarhache M, Marquet S, Frade AF, Ferreira AM, Ianni B, Almeida RR, Nunes JPS, Ferreira LRP, Rigaud VO, Cândido D, Mady C, Zaniratto RCF, Buck P, Torres M, Gallardo F, Andrieux P, Bydlowsky S, Levy D, Abel L, Cardoso CS, Santos-Junior OR, Oliveira LC, Oliveira CDL, Nunes MDC, Cobat A, Kalil J, Ribeiro AL, Sabino EC, Cunha-Neto E, Chevillard C. Rare Pathogenic Variants in Mitochondrial and Inflammation-Associated Genes May Lead to Inflammatory Cardiomyopathy in Chagas Disease. *J Clin Immunol* 2021;**41**:1048-63
79. El-Hattab AW, Scaglia F. Mitochondrial Cardiomyopathies. *Front Cardiovasc Med* 2016;**3**:25
80. Scaglia F, Towbin JA, Craigen WJ, Belmont JW, Smith EO, Neish SR, Ware SM, Hunter JV, Fernbach SD, Vladutiu GD, Wong LJ, Vogel H. Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease. *Pediatrics* 2004;**114**:925-31
81. Silva KDA, Nunes JPS, Andrieux P, Brochet P, Almeida RR, Kuramoto Takara ACK, Pereira NB, Abel L, Cobat A, Zaniratto RCF, Levy D, Bydlowski SP, Ceconello I, Seguro FCBD, Kalil J, Chevillard C, Cunha-Neto E. Chagas Disease Megaesophagus Patients Carrying Variant. *Biomedicines* 2022;**10**
82. Wang D, McMillin JB, Bick R, Buja LM. Response of the neonatal rat cardiomyocyte in culture to energy depletion: effects of cytokines, nitric oxide, and heat shock proteins. *Lab Invest* 1996;**75**:809-18

IV. La mise en évidence de variants génétiques qui amplifieraient le phénotype des patients CCC.

Article 4 : Rare Pathogenic Variants in Mitochondrial and Inflammation-Associated Genes May Lead to Inflammatory Cardiomyopathy in Chagas Disease.

Maryem Ouarhache, Sandrine Marquet, Amanda Farage Frade, Ariela Mota Ferreira, Barbara Ianni, Rafael Ribeiro Almeida, Joao Paulo Silva Nunes, Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira, Vagner Oliveira-Carvalho Rigaud, Darlan Cândido, Charles Mady, Ricardo Costa Fernandes Zaniratto, Paula Buck, Magali Torres, Frederic Gallardo, **Pauline Andrieux**, Sergio Bydlowsky, Debora Levy, Laurent Abel, Clareci Silva Cardoso, Omar Ribeiro Santos-Junior, Lea Campos Oliveira, Claudia Di Lorenzo Oliveira, Maria Do Carmo Nunes, Aurelie Cobat, Jorge Kalil, Antonio Luiz Ribeiro, Ester Cerdeira Sabino, Edecio Cunha-Neto, Christophe Chevillard

Article publié dans Journal of Clinical Immunology en mars 2021.

Présentation de la publication :

Les cardiomyopathies sont une cause importante d'insuffisance cardiaque et de mort subite d'origine cardiaque. On sait peu de choses sur le rôle des variants génétiques rares dans la cardiomyopathie inflammatoire. La cardiomyopathie chronique de la maladie de Chagas (CCC) est une cardiomyopathie inflammatoire répandue en Amérique latine, qui se développe chez 30 % des 6 millions de patients chroniquement infectés par le protozoaire *Trypanosoma cruzi*, alors que 60 % d'entre eux ne développent pas de maladie cardiaque (asymptomatique (ASY)). On sait que les cytokines dont l'interféron- γ (IFN- γ) et le Facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et le dysfonctionnement mitochondrial jouent un rôle pathogène majeur dans cette maladie. La maladie de Chagas constitue un modèle unique pour rechercher les variants génétiques impliquées dans la cardiomyopathie inflammatoire.

Afin de mettre en évidence des variants génétiques qui amplifieraient le phénotype CCC, un recrutement de 6 familles nucléaires, multi-cas, a été effectué dans la région endémique de São Paulo, au Brésil. Un séquençage d'exome a été réalisé sur ces familles, ainsi que sur 14 patients asymptomatiques et séropositifs à *T. cruzi*. Nous avons recherché des variants pathogènes rares partagés par tous les membres de la famille atteints de CCC mais absents chez les frères et sœurs ASY infectés et chez les ASY non apparentés.

Nous avons identifié des variants pathogènes hétérozygotes liés au CCC dans toutes les familles testées sur 22 gènes distincts, dont 20 étaient mitochondriaux ou liés à l'inflammation. Cette analyse a mis en évidence 7 mutations hétérozygotes présentes chez les patients CCC mais absentes chez les patients asymptomatiques d'une même famille, ainsi que chez les 14 patients asymptomatiques non apparentés. Ces 7 gènes sont impliqués dans deux processus biologiques, l'inflammation et la mitochondrie. Les gènes concernés sont DHODH, UMPS, MAP4K4, LEPR, RPUDS3, SLC11A1 et MAML1. De manière significative, l'incubation avec l'IFN- γ et le TNF- α sur une lignée de cardiomyocytes humains traitée avec un inhibiteur (brequinar) de l'enzyme dihydroorotate déshydrogénase (DHODH) (enzyme présentant un variant de perte de fonction dans une famille) a nettement réduit le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi M$), ce qui indique un dysfonctionnement mitochondrial.

Le dysfonctionnement mitochondrial et l'inflammation peuvent être génétiquement déterminés dans le CCC, sous l'effet de variantes génétiques rares. Nous émettons l'hypothèse qu'une exposition prolongée à l'IFN- γ , combinée à ces variants, participerait au développement des CCC, entraînant des dysfonctionnements mitochondriaux sévères. De ce fait, un patient ne présentant pas ces mutations, et atteint de la maladie de Chagas, serait asymptomatique. Ce mécanisme pourrait également être à l'œuvre dans d'autres cardiomyopathies inflammatoires.

Dans cet article ma contribution a été mineure. Cet article forme le socle de certains de mes travaux de thèse. Cet article a été préparé alors que je venais tout juste d'initier ma thèse. Il m'a été demandé de participer à la réponse aux reviewers tout en prenant en charge l'optimisation des illustrations.



Rare Pathogenic Variants in Mitochondrial and Inflammation-Associated Genes May Lead to Inflammatory Cardiomyopathy in Chagas Disease

Maryem Ouarhache¹ · Sandrine Marquet^{1,2} · Amanda Farage Frade^{3,4} · Ariela Mota Ferreira⁵ · Barbara Ianni⁶ · Rafael Ribeiro Almeida^{3,4} · Joao Paulo Silva Nunes^{3,4} · Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira^{3,4,7} · Vagner Oliveira-Carvalho Rigaud³ · Darlan Cândido³ · Charles Mady⁶ · Ricardo Costa Fernandes Zaniratto³ · Paula Buck⁶ · Magali Torres² · Frederic Gallardo² · Pauline Andrieux² · Sergio Bydlowsky^{3,4} · Debora Levy^{3,4} · Laurent Abel^{8,9} · Clareci Silva Cardoso¹⁰ · Omar Ribeiro Santos-Junior¹¹ · Lea Campos Oliveira¹² · Claudia Di Lorenzo Oliveira¹⁰ · Maria Do Carmo Nunes¹¹ · Aurelie Cobat^{8,9} · Jorge Kalil^{3,4} · Antonio Luiz Ribeiro¹¹ · Ester Cerdeira Sabino¹² · Edecio Cunha-Neto^{3,4,13}  · Christophe Chevillard^{1,2} 

Received: 20 November 2020 / Accepted: 15 February 2021 / Published online: 3 March 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Cardiomyopathies are an important cause of heart failure and sudden cardiac death. Little is known about the role of rare genetic variants in inflammatory cardiomyopathy. Chronic Chagas disease cardiomyopathy (CCC) is an inflammatory cardiomyopathy prevalent in Latin America, developing in 30% of the 6 million patients chronically infected by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, while 60% remain free of heart disease (asymptomatic (ASY)). The cytokine interferon- γ and mitochondrial dysfunction are known to play a major pathogenetic role. Chagas disease provides a unique model to probe for genetic variants involved in inflammatory cardiomyopathy.

Methods We used whole exome sequencing to study nuclear families containing multiple cases of Chagas disease. We searched for rare pathogenic variants shared by all family members with CCC but absent in infected ASY siblings and in unrelated ASY.

Results We identified heterozygous, pathogenic variants linked to CCC in all tested families on 22 distinct genes, from which 20 were mitochondrial or inflammation-related – most of the latter involved in proinflammatory cytokine production. Significantly,

Edecio Cunha-Neto and Christophe Chevillard contributed equally to this work.

✉ Edecio Cunha-Neto
edecunha@gmail.com

✉ Christophe Chevillard
christophe.chevillard@univ-amu.fr

¹ INSERM, Aix Marseille university, UMR_906, Marseille, France

² Theories and Approaches of Genomic Complexity (TAGC), INSERM, Aix Marseille university, UMR_1090, Parc Scientifique de Luminy, case 928, 163, avenue de Luminy, 13288 Marseille, France

³ Laboratory of Immunology, Heart Institute (InCor), Hospital das Clínicas and Department of Medicine, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, São Paulo, Brazil

⁴ Institute for Investigation in Immunology, iii-INCT, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, São Paulo, Brazil

⁵ State University of Montes Claros (Universidade Estadual de Montes Claros), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

⁶ Unidade Clínica de Miocardiopatias, Heart Institute (Incor) Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, São Paulo, Brazil

⁷ Departamento Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

⁸ Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, Necker Hospital for Sick Children, Paris, France

⁹ Imagine Institute, Paris Descartes University, Paris, France

¹⁰ School of Medicine, Federal University of São João del-Rei, Divinópolis, Brazil

¹¹ Hospital das Clínicas and School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

¹² Department of Infectious Diseases, and Division of Laboratory Medicine (LIM03) and Institute of Tropical Medicine, Faculdade de Medicina FMUSP, São Paulo, Brazil

¹³ Heart Institute, Laboratory of Clinical Immunology and Allergy-LIM60, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, SP, Brazil

incubation with IFN- γ on a human cardiomyocyte line treated with an inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase brequinar (enzyme showing a loss-of-function variant in one family) markedly reduced mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_M$), indicating mitochondrial dysfunction.

Conclusion Mitochondrial dysfunction and inflammation may be genetically determined in CCC, driven by rare genetic variants. We hypothesize that CCC-linked genetic variants increase mitochondrial susceptibility to IFN- γ -induced damage in the myocardium, leading to the cardiomyopathy phenotype in Chagas disease. This mechanism may also be operative in other inflammatory cardiomyopathies.

Keywords Variants · chagas · cardiomyopathy · pathogenic · mitochondria · inflammation

Introduction

Cardiomyopathies are an important cause of cardiovascular death by heart failure and arrhythmia. Familial cardiomyopathies are a group of Mendelian genetic disorders associated with rare high-impact gene variants altering protein structure and function, mostly involving genes encoding sarcomeric/structural and calcium handling proteins. Among the acquired causes of cardiomyopathy, an estimated 30% have an infectious etiology, associated with myocarditis [1].

Little is known about the genetic underpinnings of infectious cardiomyopathy. Chagas disease (CD), caused by infection with the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is the most common cause of nonischemic cardiomyopathy in Latin America, where 6 million people are infected, causing approximately 10,000 deaths/year due to cardiac compromise [2]. It is transmitted by the reduviid insect vector, by blood transfusion, congenitally, and by ingestion. An estimated 400,000 infected persons live in nonendemic countries, mainly the USA and Europe. Chronic CD cardiomyopathy (CCC) is a chronic inflammatory cardiomyopathy occurring decades after infection with *T. cruzi* [3] in up to 30% of CD patients. ECG abnormalities and heart conduction defects are associated with progressive inflammatory fibrotic and hypertrophic myocardial lesions including the conducting tissue [4] and precede ventricular arrhythmia/sudden cardiac death (SCD) and/or dilated cardiomyopathy with heart failure (HF), the major causes of death in CCC [5]. From the remaining CD patients, 60% persist asymptomatic form (ASY), and 10% develop gastrointestinal motility disorders [6, 7]. CD patients with ECG abnormalities typical of CCC show higher total and cardiac mortality [8]. No adequate treatment is available to prevent the development of chronic heart disease, whose prognosis is worse than dilated cardiomyopathies of other etiologies [3]. New approaches to the treatment of CCC are thus sorely needed. The pathogenesis of CCC is still incompletely understood, although myocardial inflammation and reduced mitochondrial energy metabolism are thought to play a major role in CD and cardiac remodeling and heart failure of any etiology [2, 3]. After acute infection, parasitism is partially controlled by the immune response, and low-grade parasite persistence fuels the

production of inflammatory cytokines like IFN- γ and TNF- α , which is more intense in CCC than ASY patients [9]. A T cell and monocyte-rich chronic myocarditis with fibrosis and hypertrophy is the histopathological hallmark of CCC [10, 11].

IFN- γ is the most abundant cytokine expressed in the CCC myocardium, and transcriptomic analyses of the CCC myocardium show a significant IFN- γ transcriptional signature [10, 12]. IFN- γ treatment induces reduced contractility [13] and fatty acid metabolism of cardiomyocytes [14] and profibrotic changes in fibroblasts and transgenic mice overexpressing IFN- γ develop inflammatory cardiomyopathy [15, 16]. Taken together, evidence suggests IFN- γ is the culprit of CCC. In addition, the myocardium from CCC patients with ventricular dysfunction displays decreased levels of mitochondrial metabolism enzymes [17] and ATP production [18]. IFN- γ has multiple deleterious effects on the cardiomyocyte mitochondria. It induces TNF- α and potentiates TNF- α -mediated NF- κ B signaling, leading to NOS2 production of NO [19, 20] which in the presence of IFN- γ -induced reactive oxygen species turns into peroxynitrite [21] and ensuing mitochondrial fragmentation and reduction of mitochondrial membrane potential, lipid beta-oxidation [14], and ATP generation [22].

High-impact rare gene variants altering protein structure and function underlie Mendelian disease and contribute to complex multifactorial disease. Approximately 10% of acute viral myocarditis (AVM) patients carried rare pathogenic homozygous variants in genes implicated in familial cardiomyopathy [23], suggesting an overlap between genetic and acquired forms of myocarditis and cardiomyopathy. However, the evidence for a role of such variants in the pathogenesis of AVM is circumstantial, as no genetic study has compared AVM patients with virus-infected patients that failed to develop myocarditis. In CD, however, serological tests can readily ascertain *T. cruzi* infection in patients who have developed cardiomyopathy or have remained asymptomatic, decades after the initial infection. This has allowed genetic association studies of common gene polymorphisms between the two *T. cruzi*-exposed groups with divergent cardiac phenotypes, CCC and ASY [2], which have a low individual effect on phenotype. CD thus provides a unique model to probe the

effect of rare pathogenic genetic variants in the susceptibility towards developing postinfectious cardiomyopathy in humans.

We hypothesize here that rare genetic variants may lead to progression towards CCC by increasing cardiomyocyte susceptibility to inflammatory damage. Whole exome sequencing (WES) studies in families with multiple disease cases are an unbiased approach that has been used to identify rare pathogenic variants in Mendelian genetic disorders and complex multifactorial diseases. We used WES to search for rare, high-impact gene variants linked to CCC in nuclear families containing multiple cases of CD and involved in pathobiological processes involved in inflammatory cardiomyopathy. Our analysis disclosed rare heterozygous pathogenic variants in inflammation-related and mitochondrial genes linked to CCC cases. Functional testing indicated that IFN- γ caused significant mitochondrial dysfunction on a human cardiomyocyte line treated with an inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase brequinar (enzyme showing a loss-of-function variant in one family).

Patients, Materials, and Methods

Ethical Issues

This protocol was approved by the INSERM Internal Review Board and by the Brazilian National Ethics in Research Commission (CONEP), and written informed consent was obtained from the patients. All patients enrolled in this study were over 21 years old. Investigations were conformed to the principles outlined in the declaration of Helsinki.

Patients

Probands and their nuclear family members were recruited from the Sami-Trop CD cohort, in rural Minas Gerais state [24], and the CD outpatient clinic at the Heart Institute/HCFMUSP.

Nuclear families typically center on a married couple which may have any number of children. Figure 1 shows the pedigrees of the 6 selected nuclear families with multiple CD cases ($n=25$), and Table 1 depicts the clinical and demographic parameters of the studied subjects. Families 1 and 6 came from the Heart Institute, while families 2–5 came from the Sami-Trop CD cohort.

Blood DNA Preparation and Whole Exome Sequencing

On EDTA vacutainer tubes, 10 ml of blood was collected. The genomic DNA of 25 CCC and ASY patients belonging to the 6 families, plus 14 genetically unrelated ASY controls, was

isolated with the QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Exome sequencing was performed using the Ion Proton platform (Life Technologies, Villebon sur Yvette, France) according to a protocol previously described [25].

Variant Prioritization

We excluded synonymous, non-exonic polymorphisms, keeping polymorphisms with a minor allele frequency (MAF) of <1% in at least one public database using the VARAFT filtering and annotation tool (<https://varaft.eu>) on vcf files. Variant calls with variant quality (QUAL) ≤ 60 , depth of coverage (DP) <20, and mapping quality (MQ) ≤ 40 were filtered out. Only exonic nonsynonymous damaging variants were kept for downstream genetic analyses. We searched for variants, independently, in each family, under an autosomal dominant or under autosomal recessive models. In order to identify gene variants associated with CCC in each family, we selected variants that were shared by all CCC patients and absent in any and all ASY patients in a given nuclear family, as well as in 14 unrelated ASY controls. We assessed the pathogenic potential of missense variants using 4 algorithms embedded in VarAft. Only rare variants tagged as pathogenic (or damaging) were retained for downstream genetic analyses.

Polymerase Chain Reaction and Sanger Sequencing

For validation, we designed specific primers for each mutation of interest with Primer3 software (V4.0.0) to amplify genomic DNAs (online Table 3). PCR amplifications were carried out with GoTaq polymerase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and 1 μ M of each primer. On Eppendorf thermocycler, 50 μ l reactions were carried out. The PCR products were visualized on agarose gel (1.5% agarose TBE0.5X) and purified with QIAEXII gel extraction kit (Qiagen) before Sanger sequencing.

Mitochondrial Membrane Potential Assay

Total mitochondria were stained with MitoTracker green, and mitochondrial membrane potential (MMP) was evaluated using the TMRE dye that accumulates in fully polarized, but not in depolarized mitochondria [26]. We measured TMRE fluorescence on MitoTracker green-labeled mitochondria. Cell viability was assessed using LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit. All fluorescent dyes were from Thermo Fisher Scientific, and assays were performed using live microscopy with the ImageXpress Micro instrument (Molecular Devices).

Table 1 Description of the study phenotypes

Family	ID	Phenotype	Chagas serology	Age	Sex	LVEF	
A. Chagas disease families							
Family 1	IC250E	CCC	Seropositive	42	F	0.56	
	IC252E	ASY	Seropositive	50	F	0.68	
	IC253E	ASY	Seropositive	54	F	0.61	
	IC254E	CCC	Seropositive	49	M	0.30	
Family 2	6151	ASY	Seropositive	63	F	0.69	
	6152	CCC	Seropositive	37	F	0.63	
	6153	ASY	Seropositive	36	F	0.66	
	6154	ASY	Seropositive	39	F	0.65	
	6155	CCC	Seropositive	45	F	0.60	
	6156	CCC	Seropositive	79	F	0.62	
	6157	CCC	Seropositive	49	F	0.56	
Family 3	6086	ASY	Seropositive	71	F	0.70	
	6087	CCC	Seropositive	68	F	0.69	
	6088	ASY	Seropositive	69	F	0.69	
Family 4	6075	CCC	Seropositive	67	F	0.69	
	6076	CCC	Seropositive	57	M	0.69	
	6078	CCC	Seropositive	52	F	0.67	
Family 5	6131	CCC	Seropositive	24	F	0.65	
	6133	ASY	Seropositive	69	F	0.63	
	6134	CCC	Seropositive	42	F	0.50	
	6135	CCC	Seropositive	38	F	0.65	
	6136	CCC	Seropositive	68	M	0.62	
Family 6	IC174EC	CCC	Seropositive	41	F	0.38	
	IC190EC	CCC	Seropositive	50	F	0.37	
	IC191EC	CCC	Seropositive	69	F	0.45	
				53.6±14.6		0.59±0.11	
Seronegative siblings in family 5							
	6132	Healthy	Seronegative	32	M	0.59	
	6137	Healthy	Seronegative	30	M	0.7	
B. Unrelated ASY controls							
Unrelated	IC33EI	ASY	Seropositive	65	M	0.69	
	IC45EI	ASY	Seropositive	51	F	0.61	
	IC49EI	ASY	Seropositive	57	F	0.70	
	IC69EI	ASY	Seropositive	90	F	0.68	
	IC92EI	ASY	Seropositive	62	M	0.66	
	IC95EI	ASY	Seropositive	57	F	0.70	
	IC106EI	ASY	Seropositive	44	F	0.55	
	IC111EI	ASY	Seropositive	42	F	0.63	
	6083	ASY	Seropositive	41	F	0.65	
	6091	ASY	Seropositive	50	F	0.62	
	6097	ASY	Seropositive	47	F	0.56	
	6102	ASY	Seropositive	45	M	0.66	
	6129	ASY	Seropositive	71	F	0.74	
	6143	ASY	Seropositive	39	F	0.66	
					54.3±14		0.65±0.05

LVEF, left ventricular ejection fraction; ASY, asymptomatic form

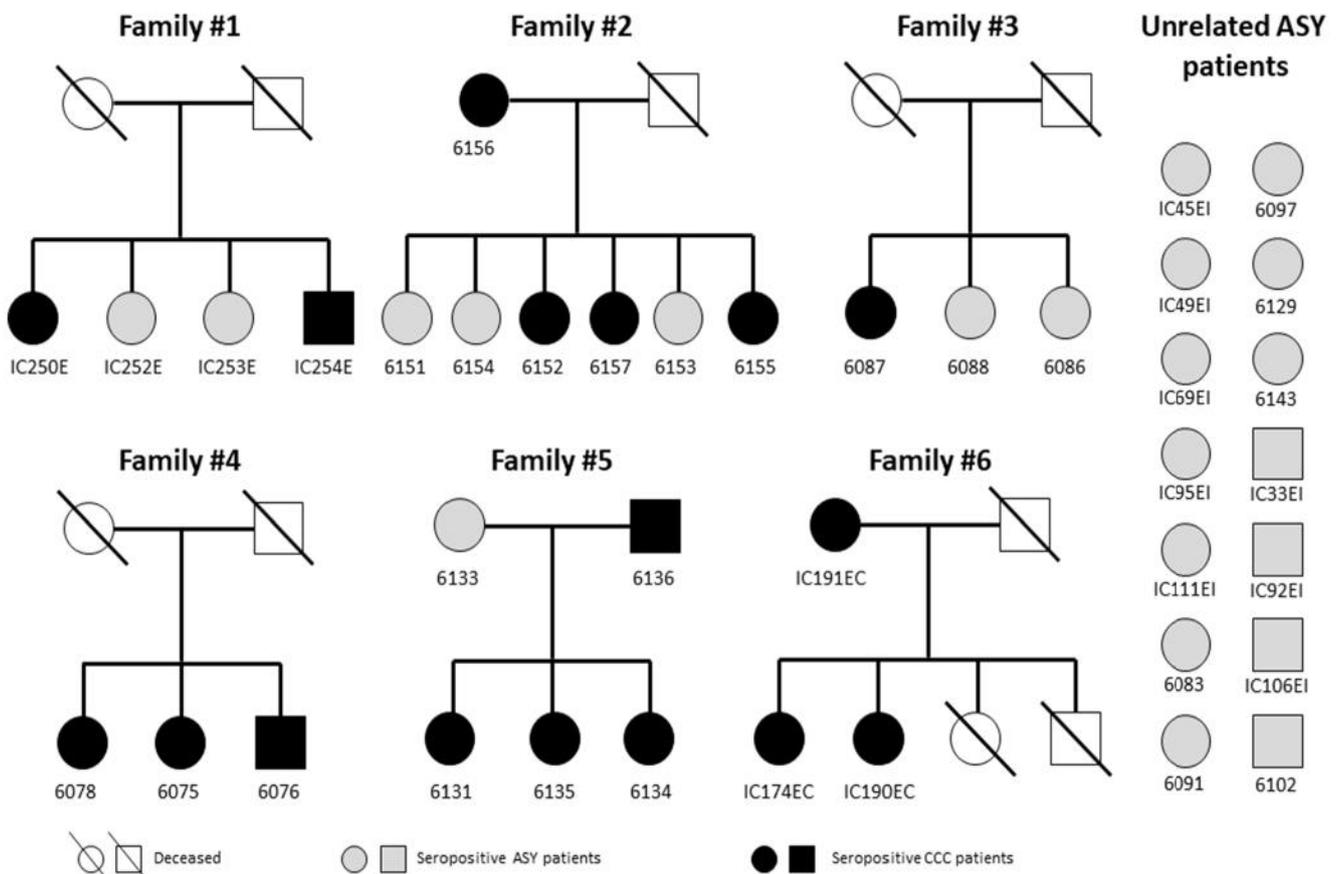


Fig. 1 Pedigrees of the six nuclear families included in this study. All patients underwent detailed clinical interview and *T. cruzi* serological tests. *T. cruzi*-seropositive individuals were considered as CCC patients when presenting major ECG abnormalities according to the Minnesota Code classification, modified by Ribeiro et al. [8]. Major ECG abnormalities are cited in online Table 1. The presence of any one of these major ECG changes was associated with a twofold increase in

mortality [8]. *T. cruzi*-seropositive individuals presenting major ECG abnormalities, according to the Minnesota Code classification, modified by Ribeiro et al. [8] were considered as CCC patients. *T. cruzi*-seropositive patients without such ECG findings, with normal echocardiography, and no clinical signs were considered indeterminate forms of CD (ASY) cases

Results

We performed whole exome sequencing and assessed rare pathogenic gene variants associated with CCC in six nuclear families containing multiple cases of CD families (25 patients) and in a group of unrelated ASY patients ($n = 14$) who came from CD-endemic rural areas in Brazil. The average age in the CCC and ASY patients in the family groups and the ASY unrelated control were similar, around 54 ± 14 years (Table 1). Pedigrees are shown in Fig. 1.

Whole exome sequencing disclosed that on average, each patient sample contained 41,780 gene variants. Among them, on average, 11,651 variants were located in coding (exonic or splicing) regions and nonsynonymous. We focused on variants characterized by a minor allele frequency $< 1\%$ in the databases (ESP6500, 1000G, and ExAC). Under a hypothesis of complete penetrance, for each given family, we selected nonsynonymous exonic or splicing variants shared by all family members with CCC but absent from ASY family members as well as by the unrelated ASY controls. For families 1 to 6, we found 39, 8, 108, 81, 9, and 76 variants fulfilling the above

criteria, respectively, comprising a total of 321 CCC-specific nonsynonymous exonic rare variants. We performed a Reactome (reactome.org) pathways analysis of the 321 CCC-specific variants, prior to any prioritization. We found 8 enriched pathways with a significant false discovery ratio ($FDR < 0.05$). Pathways were based on a very limited number of genes (6/8 with one or two genes) and thus of limited relevance. At any event, the 8 pathways were related either to interferon signaling or to endosomal/antigen processing/presentation pathways (HLA molecules, BTK) (online Table 4). After the application of our pathogenicity filter with multiple algorithms, we found 102 CCC-specific rare pathogenic variants. After filtering for evolutionary conservation, we found 87 variants. At this point, we prioritized the 87 gene variants in 9 pathobiological processes associated to CD. It highlighted 23 of our candidate genes (corresponding to 25 variants). From these variants, 88% (22/25, contained in 20 genes) were confirmed by Sanger sequencing (Table 2, online Fig. 1). All these 22 variants showed CADD scores above 15, consistent with pathogenicity. Indeed, for information, the CADD score of each variant is also shown in Table 2b. Two

variants have a CADD score above 15, while the other 20 variants have a CADD score above 20. Markers with a CADD score over 20 are usually included in the top 1% deleterious variants in the genome. For the remaining 62 genes, we performed a second gene set enrichment analysis using Ingenuity Pathway Analysis and Reactome, but no significant pathways were identified. Each family had CCC-associated 1 to 7 pathogenic variants in 1 to 6 genes. Each of the 22 CCC-specific variants only appeared in a single nuclear family. However, for the APOB gene, two variants were detected in two different families. Figure 2 shows the number of genes containing associated variants in each pathophysiological process. Some genes may be common to several pathways. Table 2 shows the detailed information on the 22 gene variants (2A), pathogenicity and conservation scores (2B), participation in pathobiological processes relevant for inflammatory cardiomyopathy (2C), and their frequency in the databases (2D). The frequencies of our variants of interest in Latino reference subpopulations is described in online Table 6. We found a striking accumulation of CCC-associated variants in inflammation-related and mitochondrial genes (17 out of the 20 genes). All families carried at least one variant in mitochondrial or inflammation-associated genes; five families carried variants in mitochondrial genes and 5 in inflammation-related genes. A total of 10 pathogenic variants were found in 9 mitochondrial genes (ADCY10, DHODH, GIT1, MRPS18B, RPUSD3, LEPR, UMPS, MOCS1, and OBSCN). A total of 11 pathogenic variants were located in 10 inflammation-associated genes (ADGRG6, AKAP13, LEPR, LILRA2, MAML1, MAP4K4, SLC11A1, TNFRSF4, APOB, and DHODH) (Figs. 2 and 3, Table 2). This accumulation of genes was not an artifact of selection, since the number of prioritized variants in each pathway was not proportional to the total number of genes in the pathway/process. For instance, while we found 10 variants in 1532 mitochondrial genes, there were 4 variants in the 951 genes belonging to the fibrosis/extracellular matrix process.

Conversely, 3 variants were found in the 178 genes belonging to the contraction/contractility process. Figure 3 shows the participation of the variant genes in different mitochondrial and inflammation-related pathways. Eight out of 9 mitochondrial genes with CCC-specific variants are involved directly or indirectly with energy generation, in processes including mitochondrial biogenesis, mitochondrial DNA-encoded gene translation, fatty acid oxidation, and oxidative phosphorylation/electron transfer chain; interestingly, two genes are involved in pyrimidine biosynthesis. Of note, 8 out of 10 inflammation-related genes are involved in proinflammatory cytokine production via activation of NF- κ B and MAP kinase pathways. Two mitochondrial genes (DHODH and LEPR) are also involved in inflammation (Table 2, Fig. 3 in bold). On the whole, 5 of the inflammation-related genes and 5 of the mitochondrial genes also played roles in other

cardiomyopathy-related pathobiological processes. The RPUSD3 gene, involved in the assembly of the mitochondrial ribosome, displayed a stopgain variant at exon 8 in family 4, creating a truncated version lacking 24% of its C-terminal sequence.

The GIT1 gene showed two variants in family 3 that segregated together, suggesting compound heterozygosity. Only 3 variants occurred in genes that were not mitochondrial and/or inflammation-related: PKHD1 and SERPINE2, which belonged to the ECM/fibrosis process, and RNLS, belonging to the hypertrophy and contraction processes. Only one variant gene, OBSCN, had previously been described in genetic/familial cardiomyopathy. No variants were detected in arrhythmia/ion channel-related genes. Patients carrying heterozygous gene variants had a normal childhood and reported no debilitating disease before developing CCC as adults, and we inferred that the variants by themselves alone were not able to induce childhood-onset mitochondriopathy. Detailed information on the variants is described in Table 2.

We have performed Sanger sequencing in two healthy, eutrophic, seronegative siblings from family 5 searching for the CCC-associated variants in genes DHODH and MAML1. One of them (subject 6137) carried the heterozygote variant DHODH C/T (R135C) shared by the CCC family members, while the other (subject 6132) carried the “wild-type” homozygous DHODH n.403 C/C (R135). Regarding MAML1, the second variant gene in Family 5, both 6132 and 6137 carried the “wild-type” homozygous MAML1 n. 407 G/G (G136).

Since both IFN- γ and loss-of-function mitochondrial mutations cause mitochondrial dysfunction, we studied the effect of IFN- γ on cardiomyocytes made deficient in mitochondrial enzyme dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) activity with the inhibitor Brequinar. This enzyme is important for the electron transport chain and showed a loss-of-function mutation (DHODH R135C) linked with CCC in one of the studied families. We found that both IFN- γ and brequinar treatment significantly reduced mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ M) as expressed by mitochondrial TMRE fluorescence on the AC16 human cardiomyocyte cell line and that cells treated simultaneously with IFN- γ and brequinar showed an even larger decrease on $\Delta\psi$ M (Fig. 4).

Discussion

In this study of whole exome sequencing of six nuclear families with multiple cases of CD, we found 22 CCC-associated rare heterozygous nonsynonymous high-impact pathogenic variants in 20 genes belonging to pathways relevant to inflammatory cardiomyopathy. Only individuals that were both seropositive and carriers of the heterozygous pathogenic variants developed CCC, but not seropositive patients carrying the wild-type sequences, nor seronegative siblings carrying the

Table 2 Description of pathogenic variants identified on the 6 nuclear families. A. Genetic data. B. pathogenicity and conservation. C. Participation in select pathobiological processes. D. Frequency of variants in different databases

A										
Family	Gene	Chr	Start	End	Reference/mutated allele	Localization	Type of mutation	Nucleic acid change	Amino acid change	av_snp147
1	LEPR	1	66,081,791	66,081,791	C/T	Exonic	non syn	exon14 2096C>T (NM_001198687)	T699M	rs34499590
1	ADCY10	1	167,830,254	167,830,254	T/C	Exonic	non syn	exon12 1205A>G (NM_001167749)	Y402C	rs140663029
1	MOC51	6	39,877,666	39,877,666	G/A	Exonic	non syn	exon8 1015C>T (NM_005943)	R339W	rs148579886
1	ADGRG6	6	142,724,940	142,724,940	G/A	Exonic; splicing	non syn	exon13 1873G>A (NM_001032394)	A625T	rs184235213
1	AKAP13	15	86,124,694	86,124,694	T/C	Exonic	non syn	exon7 3395 T>C (NM_006738)	L1132S	rs745783128
2	OBSCN	1	228,464,267	228,464,267	G/T	Exonic	non syn	exon22 6337G>T (NM_001098623)	G2113C	rs74623201
3	APOB	2	21,247,996	21,247,996	C/A	Exonic; splicing	non syn	exon16 2245G>T (NM_000384)	D749Y	.
3	MRPS18B	6	30,590,612	30,590,612	G/A	Exonic; splicing	non syn	exon5 358G>A (NM_014046)	V120M	rs116524936
3	PKHD1	6	51,947,999	51,947,999	G/A	Exonic	non syn	exon3 107C>T (NM_138694)	T36M	rs137852944
3	RNLS	10	90,122,344	90,122,344	C/T	Exonic	non syn	exon5 665G>A (NM_001031709)	R222H	rs191733133
3	GIT1	17	27,901,773	27,901,773	C/T	Exonic	non syn	exon20 2233G>A (NM_014030)	A745T	.
3	GIT1	17	27,910,559	27,910,559	C/T	Exonic	non syn	exon2 128G>A (NM_001085454)	R43H	.
3	LILRA2	19	55,098,715	55,098,715	C/T	Exonic	non syn	exon6 1267C>T (NM_001290270)	R423C	rs149580797
4	MAP4K4	2	102,440,480	102,440,480	A/G	Exonic	non syn	exon4 271A>G (NM_001242559)	K91E	.
4	SLC11A1	2	219,257,728	219,257,728	C/T	Exonic	non syn	exon12 1189C>T (NM_000578)	R397C	rs74906275
4	RPUSD3	3	9,880,802	9,880,802	C/T	Exonic	stopgain	exon8 806G>A (NM_001351738)	W269X	rs142984515
4	UMPS	3	124,449,406	124,449,406	A/G	Exonic	non syn	exon1 88A>G (NM_000373)	S30G	rs17843776
5	MAML1	5	179,192,418	179,192,418	G/A	Exonic	non syn	exon2 407G>A (NM_014757)	G136E	rs146382198
5	DHODH	16	72,048,540	72,048,540	C/T	Exonic	non syn	exon3 403C>T (NM_001361)	R135C	rs201230446
6	TNFRSF4	1	1,147,467	1,147,467	G/C	Exonic	non syn	exon5 489C>G (NM_003327)	D163E	.
6	APOB	2	21,230,419	21,230,419	G/C	Exonic	non syn	exon26 9321C>G (NM_000384)	N3107K	rs72653101
6	SERPINE2	2	224,866,427	224,866,427	A/G	Exonic	non syn	exon2 191 T>C (NM_001136528)	M64T	rs34078713
B										
Family	Gene	Amino acid change	av_snp147	Polyphen2 HDIV prediction	Polyphen2 HVAR prediction	SIFT prediction	UMD prediction	CADD prediction score	Construf conservation score	
1	LEPR	T699M	rs34499590	Damaging	Damaging	Damaging	Prob Patho	26.5	9	
1	ADCY10	Y402C	rs140663029	Damaging	Damaging	Damaging	Poly	22.2	6	
1	MOC51	R339W	rs148579886	Damaging	Damaging	Damaging	Patho	33.0	8	
1	ADGRG6	A625T	rs184235213	Damaging	Damaging	Tolerate	Patho	26.0	9	
1	AKAP13	L1132S	rs745783128	Damaging	Prob Dam	Damaging	Prob Patho	15.6	7	
2	OBSCN	G2113C	rs74623201	Damaging	Damaging	Damaging	Prob Poly	25.0	9	

Table 2 (continued)

3	APOB MRPS18- B	D749Y V120M	r- s116524936	Damaging Damaging	Damaging Prob Dam	Damaging Damaging	Patho Prob Patho	28.5 29.4	7 3		
3	PKHD1	T36M	r- s137852944	Damaging	Damaging	Damaging	Patho	30.0	9		
3	RNLS	R222H	r- s191733133	Damaging	Damaging	Damaging	Prob Patho	33.0	7		
3	GIT1	A745T	r- s149580797	Damaging	Damaging	Damaging	Patho	33.0	9		
3	GIT1	R43H	r- s149580797	Damaging	Damaging	Damaging	Poly	35.0	9		
3	LILRA2	R423C	r- s149580797	Damaging	Damaging	Damaging	Prob Poly	24.5	8		
4	MAP4K4	K91E	r- s142984515	Damaging	Damaging	Damaging	Patho	24.4	3		
4	SLC11A1	R397C	r- s142984515	Damaging	Damaging	Damaging	Poly	33.0	6		
4	RPUSD3	W269X	r- s142984515	Damaging	Damaging	Damaging	Prob Poly	27.9	4		
4	UMPS	S30G	r- s201230446	Prob Dam	Prob Dam	Damaging	Poly	23.4	9		
5	MAML1	G136E	r- s146382198	Damaging	Prob Dam	Damaging	Patho	15.3	3		
5	DHODH	R135C	r- s201230446	Damaging	Damaging	Damaging	Patho	34.0	9		
6	TNFRSF4	D163E	r- s201230446	Damaging	Damaging	Damaging	Poly	22.3	9		
6	APOB	N3107- K	r- s201230446	Damaging	Damaging	Damaging	Prob Poly	22.9	7		
6	SERPIN- E2	M64T	r- s201230446	Prob Dam	Prob Dam	Damaging	Prob Patho	26.7	8		
C	Gene	Amino acid change	avsnp147	Inflammation	Mitochondrial genes	IFN γ modulated genes/Th1 re- sponse	Hypertrophy	Muscle contraction and contractility	Fibrosis extracellular matrix	Oxidative stress/ antioxidant re- sponse	Familial CMP genes
1	LEPR	T699M	rs34499590	X	X	X	X	X	X	X	X

Table 2 (continued)

Family	Gene	Amino acid change	rs	I ⁻	Polymorphism frequency in the ESP500 database	Polymorphism frequency in the 1000G database	Polymorphism frequency in theExAC database	Polymorphism frequency in the Brazilian genomic variant cohort (ABraOM)	X
5	DHODH	R135C		I ⁻ s146382198	X	X			X
6	TNFRSF4	D163E		I ⁻ s201230446	X				
6	APOB	N3107-K	rs72653101	X	X			X	
6	SERPIN-E2	M64T	rs34078713						X
D	Gene	Amino acid change	rs	I ⁻	Polymorphism frequency in the ESP500 database	Polymorphism frequency in the 1000G database	Polymorphism frequency in theExAC database	Polymorphism frequency in the Brazilian genomic variant cohort (ABraOM)	
1	LEPR	T699M	rs34499590	I ⁻ s140663029	1.28%	0.98%	0.32%	0.82%	
1	ADCY10	Y402C		I ⁻ s140663029	0.04%	0.080%	0.02%	0.16%	
1	MOC51	R339W		I ⁻ s148579886	0.02%	0.040%	0.04%	NA	
1	ADGRG6	A625T		I ⁻ s184235213	0.24%	0.26%	0.07%	0.08%	
1	AKAP13	L1132S		I ⁻ s745783128	NA	NA	0.0008%	NA	
2	OBSCN	G2113-C	rs74623201	I ⁻ s745783128	0.59%	0.50%	0.16%	0.08%	
3	APOB	D749Y		I ⁻ s116524936	NA	NA	NA	NA	
3	MRPS18-B	V120M		I ⁻ s116524936	NA	0.02%	0.002%	NA	
3	PKHD1	T36M		I ⁻ s116524936	0.03%	0.02%	0.05%	NA	

Table 2 (continued)

3	RNLS	R222H	NA	0.02%	0.002%	NA	NA
			rs137852944				
			rs191733133				
3	GIT1	A745T	NA	NA	NA	NA	NA
3	GIT1	R43H	NA	NA	NA	NA	NA
3	LILRA2	R423C	0.21%	0.30%	0.09%	0.33%	0.33%
			rs149580797				
4	MAP4K4	K91E	NA	NA	NA	NA	NA
4	SLC11A1	R397C	0.04%	0.04%	0.03%	NA	NA
4	RPUSD3	W269X	0.008%	NA	0.007%	NA	NA
			rs142984515				
4	UMPS	S30G	0.02%	0.36%	0.38%	NA	NA
5	MAML1	G136E	0.008%	0.08%	0.07%	0.49%	0.49%
			rs146382198				
5	DHODH	R135C	0.04%	0.04%	0.04%	0.08%	0.08%
			rs201230446				
6	TNFRSF4	D163E	NA	NA	NA	NA	NA
6	APOB	N3107-K	rs72653101	NA	0.0008%	NA	NA
6	SERPIN-E2	M64T	rs34078713	0.78%	0.75%	1.15%	1.15%

Prob, probable or probably; *Patho*, pathogenic; *Poly*=poly=polymorphism; *Dam*, damaging
CMP, cardiomyopathy

We excluded synonymous, non-exonic polymorphisms, keeping polymorphisms with a minor allele frequency (MAF) of <1% in at least one public databases (ESP6500; NHLBI GO Exome Sequencing Project (EVS), ESP6500SI-V2 release on <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>); 1000 Genomes (April 2014 data release on <http://browser.1000genomes.org>); and Exome Aggregation Consortium (ExAC, January, 2015 Version 0.3 data release on <http://exac.broadinstitute.org>) using the VARAFT filtering and annotation tool (<https://varaft.eu>) on vcf files. Variant calls with Variant quality (QUAL) ≤60, depth of coverage (DP) <20, and mapping quality (MQ) ≤40 were filtered out. We also assessed an available Brazilian exome database of 609 elderly individuals from the city of Sao Paulo [18]. Only exonic nonsynonymous damaging variants were kept for downstream genetic analyses. We searched for variants, independently, in each family, under an autosomal dominant or under autosomal recessive models. In order to identify gene variants associated with CCC in each family, we selected variants that were shared by all CCC patients and absent in any and all IF patients in a given nuclear family, as well as in 14 unrelated IF controls. We assessed the pathogenic potential of missense variants using 4 algorithms embedded in VarAft: SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), Polyphen 2 HumDiv and Polyphen 2 HumVar (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>), and UMD-Predictor (<http://umd-predictor.eu/>). Only rare variants tagged as pathogenic (or damaging) or possibly pathogenic (or probably damaging) in at least three databases and pathogenic/damaging in at least one algorithm were retained for downstream genetic analyses. We validated the abovementioned pathogenicity filter with the Combined Annotation-Dependent Depletion (CADD) tool (<http://cadd.gs.washington.edu/score>). Evolutionary conservation in the position was determined with the ConSurf server (<https://consurf.tau.ac.il>)

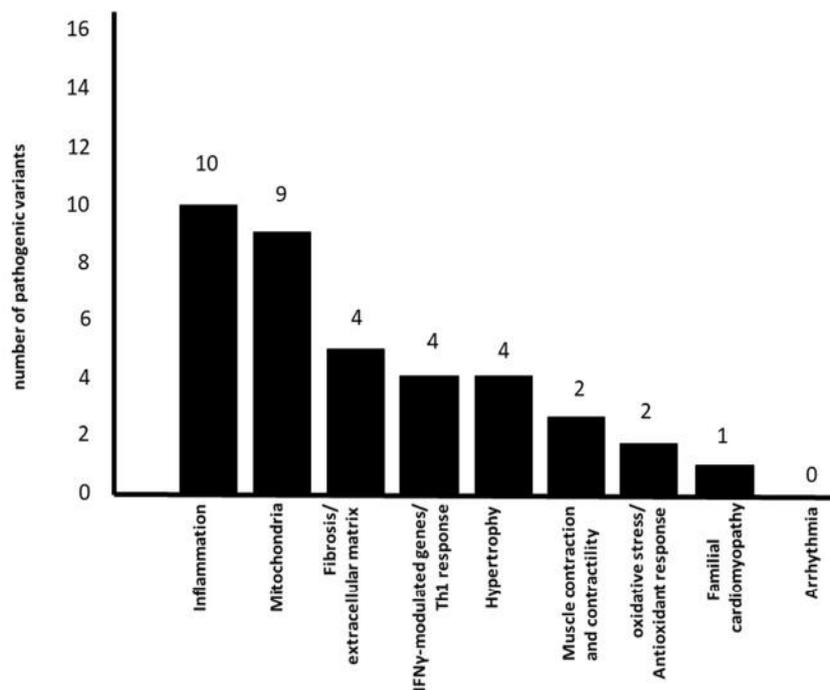


Fig. 2 Number of genes containing pathogenic variants for each biological process related to cardiomyopathy. Pathway analyses were performed with the Ingenuity Pathways Analysis (IPA®, Qiagen, Redwood City, USA) or Reactome (reactome.org); we also interrogated whether genes participated in 9 biological processes related to the pathophysiology of CCC: inflammation, IFN- γ -modulated genes/Th1 response, fibrosis/extracellular matrix, contractility of heart, hypertrophy, arrhythmia, oxidative stress/antioxidant response, familial

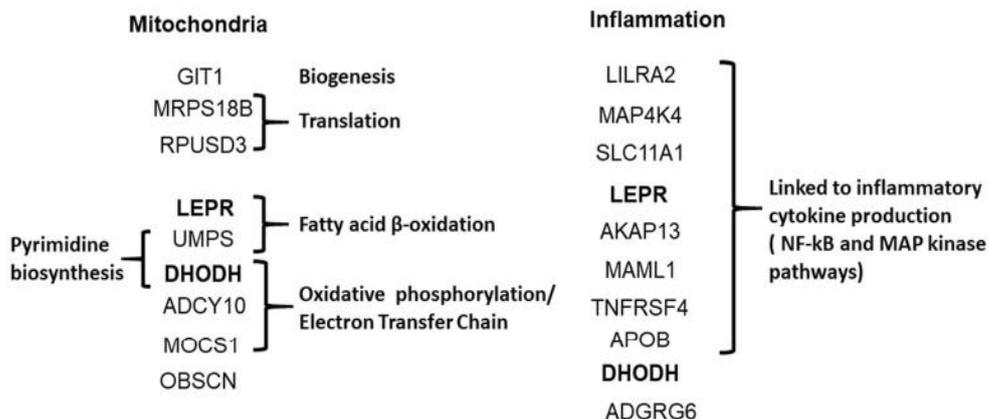
cardiomyopathy, and mitochondria-related genes. For these nine additional biological processes, we merged IPA Knowledge Base (IKB) gene lists and published gene lists including the IFN γ induced/repressed gene lists, and Nrf2-modulated genes where appropriate. Mitochondrial gene list was a combination of genes contained in the Mitochondrion Gene Ontology term and Mitocarta 2.0. The gene list for these pathways/processes in online Table 2

pathogenic variant. A striking accumulation of CCC-specific variants (86%) occurred in mitochondrial or inflammation-related genes, and all studied families displayed at least one CCC-associated variant gene belonging to these pathways. The finding that only a single family carried a variant in a gene previously associated with familial cardiomyopathy indicates the genetic landscape, and pathogenesis of CCC is distinct from that of familial cardiomyopathy. Importantly, we also found that IFN- γ potentiated mitochondrial dysfunction caused by an inhibitor of DHODH, a mitochondrial enzyme bearing a loss-of-function mutation (DHODH R135C)

linked with CCC in one of our families, indicating synergy in the induction of mitochondrial dysfunction. To our knowledge, this is the first report that rare heterozygous pathogenic variants in mitochondrial and inflammation-related genes are linked to the development of complex multifactorial inflammatory cardiomyopathy.

Among the 9 mitochondrial genes showing CCC-specific pathogenic variants, 8 are involved in processes leading to mitochondrial ATP production (biogenesis, translation, fatty acid oxidation-FAOx, and the electron transfer chain/oxidative phosphorylation (OXPHOS)). The R135C variant

Fig. 3 Features of the main mitochondrial and inflammation-related genes containing deleterious pathogenic variants associated to CCC



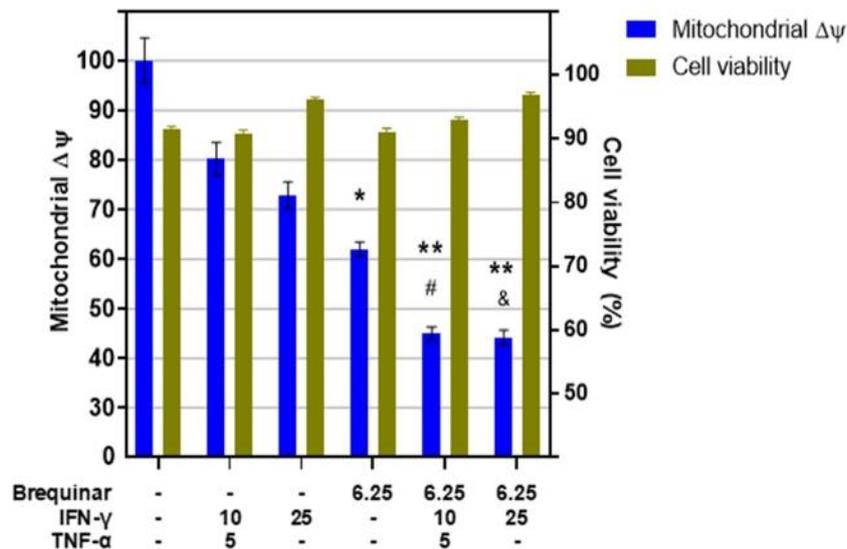


Fig. 4 IFN- γ and brequinar treatment significantly reduced mitochondrial membrane potential. AC16 human cardiomyocyte cell line was stimulated with or without IFN- γ and with or without brequinar for 48 h. Total mitochondria were stained with MitoTracker green, and mitochondrial membrane potential (MMP) was evaluated using the TMRE dye that accumulates in fully polarized, but not in depolarized

mitochondria. We measured TMRE fluorescence on MitoTracker green-labeled mitochondria. Cell viability was calculated as the ratio of the amount of live cells (propidium iodide-negative) and total cells (propidium iodide-negative plus propidium iodide-positive cells) \times 100. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$

observed in the DHODH gene was the only variant known to lead to complete loss-of-function and mitochondrial dysfunction [27]. Genetic truncation or expression of dominant-negative variants of DHODH, GIT1, RPUSD3, ADCY10, and MOCS1 in cells was shown to cause mitochondrial dysfunction, including reduced mitochondrial membrane potential, respiratory chain/oxidative phosphorylation (OXPHOS) activity, and ATP production [28–30]. Interestingly, patients carrying mutations or animals genetically deficient in 6 genes (DHODH, UMPS, MRPS18B, GIT1, OBSCN, and LEPR) developed cardiac phenotypes [27, 30–34]. Parents of patients with Miller syndrome (homozygous DHODH loss-of-function R135C or other variants; 70% with congenital cardiac abnormalities) carry one copy of the defective gene as members of family 5 but are nevertheless healthy [27]. Animals genetically deficient in MRPS18B and GIT1 showed evidence of mitochondrial dysfunction, altered mitochondrial morphology, and reduced myocardial contractility [35]. Details about the function of affected genes are shown in online Table 5.

Genetic disorders involving mitochondrial genes are the most common congenital genetic syndromes. Mitochondriopathies are caused by homozygous pathogenic rare variants in nuclear-encoded mitochondrial genes or in mitochondrial DNA. Homozygous pathogenic variants of more than 250 of the ~1500 nuclear-encoded mitochondrial genes were identified as causally related to mitochondrial disorders [35]. Each leads to drastic mitochondrial dysfunction and energetic and functional impairment in tissues of high energy demand, causing syndromes affecting single organs

or organ combinations that usually present in early childhood; each clinical syndrome is associated with variants in specific mitochondrial genes [35], and clinical penetrance is variable. The diverse clinical presentation of mitochondriopathies is related to genetic heterogeneity and the central role of mitochondria in multiple processes, including energy generation, antioxidant defenses, Ca⁺⁺ homeostasis, intracellular signaling, macromolecule and nucleotide biosynthesis, reprogramming nuclear gene expression, and cell death. Interestingly, up to 30% of mitochondriopathy patients develop cardiomyopathy, heart conduction defects, ventricular arrhythmia or sudden cardiac death, and autonomic nervous system imbalance [36], while up to 15% develop gastrointestinal motility disorders including achalasia/megaesophagus and megacolon [37]. The striking similarity between the clinical presentation and proportion of cardiac and digestive disorders in mitochondriopathies and the clinical spectrum of CCC [3] suggested the pathogenesis of CCC may be dependent on mitochondrial dysfunction. Indeed, CCC myocardium displays signs of reduced mitochondrial activity and energy production. Decreased mitochondrial rRNA [10], rDNA [38], and in vivo ATP production [18] were observed in the CCC myocardium. Myocardial levels and activity of mitochondrial energy metabolism enzymes ATP synthase and creatine kinase are even lower than in CCC than other cardiomyopathies [17], which might contribute to the worse prognosis of CCC. This is in line with Nisha Garg's group findings implicating myocardial mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of murine models of CCC (reviewed in [39]). IFN- γ and brequinar treatment significantly reduced

mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ M) on the AC16 human cardiomyocyte cell line. Significantly, cells treated simultaneously with IFN- γ , and brequinar showed an even larger decrease on $\Delta\psi$ M. This result is consistent with an increased susceptibility of cells with reduced mitochondrial enzyme activity to IFN- γ . Even though the identified genes play important roles in mitochondrial energy generation and physiology, the heterozygous mitochondrial variants did not cause childhood signs of altered development typical of mitochondrialopathies and were only associated with progression to cardiac disease in *T. cruzi*-seropositive patients, whose age group was typical from CCC patients in general. Taken together, our results suggest that *T. cruzi*-induced IFN- γ is necessary to cause clinically significant disease in patients with heterozygous variants. We propose that long-term exposure to high levels IFN- γ associated with CD – particularly high in CCC myocardium [40] – is the additional mitochondrial insult suffered by carrier of heterozygous mitochondrial variants that leads them to mitochondrial dysfunction. IFN- γ has multiple deleterious effects on cardiomyocyte mitochondria. It induces TNF-alpha and potentiates TNF-alpha-mediated NF-kB signaling, leading to NOS2 production of NO [41], which in the presence of IFN- γ -induced reactive oxygen species turns into peroxynitrite [21], and ensuing mitochondrial fragmentation and reduction of mitochondrial membrane potential, lipid beta-oxidation [14], and ATP generation [22], leading to cardiomyocyte dysfunction and apoptosis [15]. Variants in the inflammation-related genes may also lead to a mitochondrial dysfunction phenotype. Gain-of-function variants of genes linked to NF-kB or MAP kinase signaling could lead to increased proinflammatory cytokine production, which might lead to further mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes [22], and this mitochondrial damage can be further fueled by IFN- γ [42]. It is thus possible that the common final pathogenic mechanism for mitochondrial and inflammation-associated gene variants might involve enhancement of IFN- γ -induced cardiac mitochondrial damage. As mitochondrial damage and release of damage-associated molecular patterns can itself induce the production of proinflammatory cytokines, a self-perpetuating positive feedback loop between inflammation and mitochondrial damage [43] may contribute to the chronicity of inflammation in CCC heart tissue.

Our study has limitations. CCC patients included in the pedigrees mostly have major diagnostic ECG changes without left ventricular dysfunction. However, follow-up studies show that asymptomatic chagasic individuals with ECG abnormalities typical of CCC show higher total and cardiac mortality in relation to chagasic individuals with normal ECG; up to 50% of deaths in this groups are due to SCD [6, 8, 44–46]. Similarly, conduction defects and arrhythmias can be the presenting symptoms of genetic mitochondrialopathies [47]. Even though CCC has a progressive character and inflammatory

mediators and mitochondrial dysfunction are key participants of arrhythmia [48] and heart failure [43], we can only hypothesize that the genetic variants identified in our study may play a direct role in the inflammation [10, 11] and mitochondrial dysfunction [17, 38] observed in end-stage CCC.

Conclusion

Results indicate that the genetic contribution to CCC is polygenic and driven by several rare variants in genes that differ between families but are related to mitochondria and inflammation. Results imply that mitochondrial dysfunction and inflammation, key processes in the pathophysiology of CCC, are at least in part genetically determined. To our knowledge, this is the first report that rare variants in mitochondrial and inflammation-related genes are linked to complex multifactorial cardiomyopathy. Our results also support the notion of a two-hit mechanism where IFN- γ and proinflammatory cytokines induced by chronic infection trigger mitochondrial dysfunction and clinical disease in carriers of heterozygous mitochondrial gene variants. Indeed, modulation of mitochondrial damage induced by IFN- γ and other cytokines could perhaps be a suitable therapeutic target in CCC. Treatment with mitochondria-protective agents such as antioxidants or agonists of sirtuin-1 and AMP-activated protein kinase (AMPK) was found to attenuate or even reverse cardiac damage in mouse models of CCC, by reducing NF-kB activation and the intensity of chronic myocarditis (reviewed in [38]). To conclude, it is possible that a similar two-hit mechanism, whereby genetic variants may increase mitochondrial susceptibility to inflammatory cytokine-induced dysfunction, may be relevant for the pathogenesis of other inflammatory cardiomyopathies and degenerative diseases associated with mitochondrial dysfunction.

Abbreviations *T. cruzi*, *Trypanosoma cruzi*; CCC, Chronic Chagas cardiomyopathy; CD, Chagas disease; ASY, Asymptomatic form; DCM, Dilated cardiomyopathy; ECG, Electrocardiography; IFN, Interferon; TNF, Tumor necrosis factor; NO, Nitrite oxide; ATP, Adenosine triphosphate; AVM, Acute viral myocarditis; WES, Whole exome sequencing; SCD, Sudden cardiac death; HF, Heart failure; LEPR, Leptin receptor; ADCY10, Adenylate cyclase 10; MOCS1, Molybdenum cofactor synthesis 1; ADGRG6, Adhesion G protein-coupled receptor G6; AKAP13, AKinase-anchoring protein 13; OBSCN, Obscurin; APOB, Apolipoprotein B; MRPS18B, Mitochondrial ribosomal protein S18B; PKHD1, Polycystic kidney and hepatic disease 1; RNLS, Renalase, FAD-dependent amine oxidase; GIT1, G protein-coupled receptor kinase interactor 1; LILRA2, Leukocyte immunoglobulin-like receptor A2; MAP4K4, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4; SLC11A1, Solute carrier family 11 member 1; RPUSD3, RNA pseudouridine synthase D3; UMPS, Uridine monophosphate synthetase; MAML1, Mastermind like transcriptional coactivator 1; DHODH, Dihydroorotate dehydrogenase; TNFRSF4, TNF receptor superfamily member 1; SERPINE2, Serpin family E member 2

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01000-y>.

Acknowledgments We thank all the patients and their relatives.

Availability of Data and Material Raw data will be available on request.

Authors' Contribution Designed the study: JK, LAR, ECS, ECN, and CC.

Supervised the study as a whole: ECN and CC.

Participated in the recruitment of patients and sample collection: AFF, BI, AMF, CM, PB,

CIC, ORSJ, LCO, CDLO, MDCN, and LAR.

Performed experiments: MO, SM, RRA, JPN, LRPF, SB, DL, VOGR, DC, RCFZ, MT, FG, and PA.

Performed and supervised computational studies: LA, AC, ECN, and CC.

Wrote the manuscript: ECN and CC.

All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Funding This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); the Aix-Marseille University (grant number: AMIDEX “International_2018” MITOMUTCHAGAS); the French Agency for Research (Agence Nationale de la Recherche-ANR (grant numbers: “Br-Fr-Chagas,” “landscardio”); the CNPq (Brazilian Council for Scientific and Technological Development); the FAPESP (São Paulo State Research Funding Agency Brazil (grant numbers: 2013/50302–3, 2014/50890–5); and the National Institutes of Health/USA (grant numbers: 2 P50 AI098461–02 and 2U19AI098461–06). This project has received funding from the Excellence Initiative of Aix-Marseille University (A*Midex) a French “Investissements d’Avenir programme”- Institute MarMaRa AMX-19-IET-007. ECN, JK, ALR, and ECS are recipients of productivity awards by CNPq. The funders do not play any role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Declarations

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Schultheiss HP, Fairweather D, Caforio ALP, Escher F, Hershberger RE, Lipshultz SE, et al. Dilated cardiomyopathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):32.
- Chevillard C, Nunes JPS, Frade AF, Almeida RR, Pandey RP, Nascimento MS, et al. Disease tolerance and pathogen resistance genes may underlie trypanosoma cruzi persistence and differential progression to Chagas disease cardiomyopathy. *Front Immunol*. 2018;9:2791.
- Bocchi EA, Bestetti RB, Scanavacca MI, Cunha Neto E, Issa VS. Chronic Chagas heart disease management: from etiology to cardiomyopathy treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(12):1510–24.
- Casado J, Davila DF, Donis JH, Torres A, Payares A, Colmenares R, et al. Electrocardiographic abnormalities and left ventricular systolic function in Chagas' heart disease. *Int J Cardiol*. 1990;27(1):55–62.
- Barbosa MP, da Costa Rocha MO, de Oliveira AB, Lombardi F, Ribeiro AL. Efficacy and safety of implantable cardioverter-defibrillators in patients with Chagas disease. *Europace*. 2013;15(7):957–62.
- Baroldi G, Oliveira SJ, Silver MD. Sudden and unexpected death in clinically ‘silent’ Chagas’ disease. A hypothesis. *Int J Cardiol*. 1997;58(3):263–8.
- Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas’ disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol*. 1987;10(11):665–70.
- Ribeiro AL, Marcolino MS, Prineas RJ, Lima-Costa MF. Electrocardiographic abnormalities in elderly Chagas disease patients: 10-year follow-up of the Bambui cohort study of aging. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(1):e000632.
- Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas’ disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to trypanosoma cruzi infection. *J Autoimmun*. 2001;17(1):99–107.
- Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatou D, Benvenuti L, Higuchi ML, et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas’ disease cardiomyopathy. *Am J Pathol*. 2005;167(2):305–13.
- Nogueira LG, Santos RH, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, Bocchi EA, et al. Myocardial gene expression of T-bet, GATA-3, Ror-gamma, FoxP3, and hallmark cytokines in chronic Chagas disease cardiomyopathy: an essentially unopposed TH1-type response. *Mediat Inflamm*. 2014;2014:914326.
- Laugier L, Rodrigues Pinto Ferreira L, Moraes Ferreira F, Cabantous S, Farage Frade A, Ribeiro Almeida R, et al. miRNAs may play a major role in the control of gene expression in key pathobiological processes in Chagas disease cardiomyopathy. *Plos Negl Trop Dis*. 2020; In press.
- Patten M, Kramer E, Bunemann J, Wenck C, Thoenes M, Wieland T, et al. Endotoxin and cytokines alter contractile protein expression in cardiac myocytes in vivo. *Pflugers Arch*. 2001;442(6):920–7.
- Ni C, Ma P, Wang R, Lou X, Liu X, Qin Y, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity involves IFN-gamma-mediated metabolic reprogramming in cardiomyocytes. *J Pathol*. 2019;247(3):320–32.
- Levick SP, Goldspink PH. Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? *Heart Fail Rev*. 2014;19(2):227–36.
- Soares MP, Gozzelino R, Weis S. Tissue damage control in disease tolerance. *Trends Immunol*. 2014;35(10):483–94.
- Teixeira PC, Santos RH, Fiorelli AI, Bilate AM, Benvenuti LA, Stolf NA, et al. Selective decrease of components of the creatine kinase system and ATP synthase complex in chronic Chagas disease cardiomyopathy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e1205.
- Leme AM, Salemi VM, Parga JR, Ianni BM, Mady C, Weiss RG, et al. Evaluation of the metabolism of high energy phosphates in patients with Chagas’ disease. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(2):264–70.
- Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to trypanosoma cruzi

- infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun*. 1995;63(12):4862–7.
20. Vila-del Sol V, Punzon C, Fresno M. IFN-gamma-induced TNF-alpha expression is regulated by interferon regulatory factors 1 and 8 in mouse macrophages. *J Immunol*. 2008;181(7):4461–70.
 21. Rakshit S, Chandrasekar BS, Saha B, Victor ES, Majumdar S, Nandi D. Interferon-gamma induced cell death: regulation and contributions of nitric oxide, cJun N-terminal kinase, reactive oxygen species and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(11):2645–61.
 22. Buoncervello M, Maccari S, Ascione B, Gambardella L, Marconi M, Spada M, et al. Inflammatory cytokines associated with cancer growth induce mitochondria and cytoskeleton alterations in cardiomyocytes. *J Cell Physiol*. 2019;234(11):20453–68.
 23. Belkaya S, Kontorovich AR, Byun M, Mulero-Navarro S, Bajolle F, Cobat A, et al. Autosomal recessive cardiomyopathy presenting as acute myocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(13):1653–65.
 24. Cardoso CS, Sabino EC, Oliveira CD, de Oliveira LC, Ferreira AM, Cunha-Neto E, et al. Longitudinal study of patients with chronic Chagas cardiomyopathy in Brazil (SaMi-trop project): a cohort profile. *BMJ Open*. 2016;6(5):e011181.
 25. Marquet S, Bucheton B, Reymond C, Argiro L, El-Safi SH, Kheir MM, et al. Exome sequencing identifies two variants of the alkylglycerol monooxygenase gene as a cause of relapses in visceral leishmaniasis in children, in Sudan. *J Infect Dis*. 2017;216(1):22–8.
 26. Khan R, Lee JE, Yang YM, Liang FX, Sehgal PB. Live-cell imaging of the association of STAT6-GFP with mitochondria. *PLoS One*. 2013;8(1):e55426.
 27. Fang J, Uchiumi T, Yagi M, Matsumoto S, Amamoto R, Takazaki S, et al. Dihydro-orotate dehydrogenase is physically associated with the respiratory complex and its loss leads to mitochondrial dysfunction. *Biosci Rep*. 2013;33(2):e00021.
 28. Arroyo JD, Jourdain AA, Calvo SE, Ballarano CA, Doench JG, Root DE, et al. A genome-wide CRISPR death screen identifies genes essential for oxidative phosphorylation. *Cell Metab*. 2016;24(6):875–85.
 29. Grings M, Seminotti B, Karunanidhi A, Ghaloul-Gonzalez L, Mohsen AW, Wipf P, et al. ETHE1 and MOCS1 deficiencies: disruption of mitochondrial bioenergetics, dynamics, redox homeostasis and endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk in patient fibroblasts. *Sci Rep*. 2019;9(1):12651.
 30. Pang J, Xu X, Getman MR, Shi X, Belmonte SL, Michaloski H, et al. G protein coupled receptor kinase 2 interacting protein 1 (GIT1) is a novel regulator of mitochondrial biogenesis in heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51(5):769–76.
 31. Abella V, Scotece M, Conde J, Pino J, Gonzalez-Gay MA, Gomez-Reino JJ, et al. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(2):100–9.
 32. Ding Y, Liu W, Deng Y, Jomok B, Yang J, Huang W, et al. Trapping cardiac recessive mutants via expression-based insertional mutagenesis screening. *Circ Res*. 2013;112(4):606–17.
 33. Marston S. Obscurin variants and inherited cardiomyopathies. *Biophys Rev*. 2017;9(3):239–43.
 34. Miyazawa S, Furuta S, Hashimoto T. Reduction of beta-oxidation capacity of rat liver mitochondria by feeding orotic acid. *Biochim Biophys Acta*. 1982;711(3):494–502.
 35. Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, Mizuno Y, et al. A comprehensive genomic analysis reveals the genetic landscape of mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. *PLoS Genet*. 2016;12(1):e1005679.
 36. Finsterer J, Kothari S. Cardiac manifestations of primary mitochondrial disorders. *Int J Cardiol*. 2014;177(3):754–63.
 37. Finsterer J, Frank M. Gastrointestinal manifestations of mitochondrial disorders: a systematic review. *Ther Adv Gastroenterol*. 2017;10(1):142–54.
 38. Wan X, Gupta S, Zago MP, Davidson MM, Dousset P, Amoroso A, et al. Defects of mtDNA replication impaired mitochondrial biogenesis during trypanosoma cruzi infection in human cardiomyocytes and chagasic patients: the role of Nrf1/2 and antioxidant response. *J Am Heart Assoc*. 2012;1(6):e003855.
 39. Lopez M, Tanowitz HB, Garg NJ. Pathogenesis of chronic Chagas disease: macrophages, mitochondria, and oxidative stress. *Curr Clin Microbiol Rep*. 2018;5(1):45–54.
 40. Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial trypanosoma cruzi antigens. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;83(2):165–72.
 41. Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, Kaamiranta K, Salminen A. Antagonistic crosstalk between NF-kappaB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal*. 2013;25(10):1939–48.
 42. Lee HJ, Oh YK, Rhee M, Lim JY, Hwang JY, Park YS, et al. The role of STAT1/IRF-1 on synergistic ROS production and loss of mitochondrial transmembrane potential during hepatic cell death induced by LPS/d-GalN. *J Mol Biol*. 2007;369(4):967–84.
 43. Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest*. 2018;128(9):3716–26.
 44. Manzullo EC, Chuit R. Risk of death due to chronic chagasic cardiopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(Suppl 1):317–20.
 45. Pimenta J, Valente N, Miranda M. Long-term follow up of asymptomatic chagasic individuals with intraventricular conduction disturbances, correlating with non-chagasic patients. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(6):621–31.
 46. Rodriguez-Salas LA, Klein E, Acquatella H, Cataliotti F, Davalos VV, Gomez-Mancebo JR, et al. Echocardiographic and clinical predictors of mortality in chronic Chagas' disease. *Echocardiography*. 1998;15(3):271–8.
 47. Bonnet D, Martin D, Pascale De L, Villain E, Jouvet P, Rabier D, et al. Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. *Circulation*. 1999;100(22):2248–53.
 48. Montaigne D, Marechal X, Lacroix D, Staels B. From cardiac mitochondrial dysfunction to clinical arrhythmias. *Int J Cardiol*. 2015;184:597–9.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

V. Etudes fonctionnelles des variants pathogéniques situés dans la chaîne respiratoire mitochondriale et associés aux cardiomyopathies chagasiques.

Article 5: Functional characterization of mitochondria related pathogenic variants associated to an increase risk to develop severe chronic Chagas cardiomyopathy.

Andrieux P*, Nunes JP*,, Cunha-Neto E† and Chevillard C†.

*These authors are sharing the first position.

†These authors are sharing the last position and act as corresponding authors.

Cette version n'est qu'un draft d'une publication à venir.

Présentation de la publication :

La maladie de Chagas reste à l'heure actuelle un problème de santé publique, car aucun vaccin n'est disponible, ni aucun traitement pour la phase chronique de la maladie. Le développement de la cardiomyopathie chronique chagastique (CCC) survient dans 30% des cas. En effet, la maladie de Chagas est la cause majeure des maladies cardiaques dans les zones endémiques d'Amérique du sud, et la CCC a un pronostic plus défavorable que les cardiomyopathies d'étiologie non inflammatoire, comme la cardiomyopathie dilatée ischémique ou idiopathique. La CCC est une cardiomyopathie inflammatoire avec une réponse Th1 exacerbée et une surproduction l'IFN- γ et le TNF- α dans le cœur des patients. Ces cytokines inflammatoires entraînent des dysfonctionnements mitochondriaux.

Dans une précédente étude élaborée sur des familles brésiliennes, nous avons mis en évidence 7 variants à l'état hétérozygote présents chez les patients CCC mais absents chez les patients asymptomatiques d'une même famille, ainsi que chez les 14 patients asymptomatiques non apparentés. Ces 7 variants étaient impliqués dans l'inflammation et la mitochondrie. Dans cet article, nous nous sommes intéressés aux variants mitochondriaux (DHODHrs201230446 R135C, RPUSD3rs142984515 W269X, UMPSrs17843776 S30G), nous les avons insérés dans des cardiomyocytes humains (la lignée AC16) par la technique Crispr/Cas9 et nous les avons caractérisés fonctionnellement. Notre hypothèse était qu'une exposition prolongée aux IFN- γ et le TNF- α , combinée à ces variants, entraînait des dysfonctionnements mitochondriaux sévères et participerait donc au développement des CCC.

Ces variants sont tous les trois impliqués dans des processus mitochondriaux. La protéine DHODH est une enzyme qui est impliquée à la fois dans les chaînes respiratoires et dans la voie de biosynthèse des pyrimidines. Cette enzyme va avoir la capacité de transformer de dihydroorotate en orotate et de transférer des électrons du complexe I à la quinone. La protéine UMPS, quant à elle, fait partie de la voie de biosynthèse des pyrimidines et transforme l'orotate en UMP. Et la protéine RPUSD3 est une pseudouridine synthase qui catalyse l'isomérisation de l'uridine en pseudouridine d'ARNm mitochondriaux spécifiques. Il s'agit d'une modification post transcriptionnelle nécessaire à la traduction.

Nous avons mis en évidence que les trois variants stimulés avec du IFN- γ et le TNF- α entraînaient une diminution de l'ATP. Ainsi les cellules possédant le variant DHODH, une fois stimulées, montraient une diminution du potentiel de membrane des mitochondries et une augmentation du stress oxydatif. Nous avons également mis en évidence, une augmentation de l'activité enzymatique et une augmentation de la quantité orotate lorsque les cellules sont mutées et stimulées. Nous avons aussi observé une augmentation de la quantité de lysosome. Pour les cellules possédant le variant dans le gène UMPS, nous avons observé une diminution de la production UMP, quelle que soit le génotype et la stimulation. De plus, pour le variant RPUSD3, nous avons mis en évidence une diminution de la quantité de complexe I, III et IV de la chaîne respiratoire. Les trois variants entraînent une diminution des ADNmt, afin d'aller plus loin, nous avons confirmé nos résultats sur des mitochondries isolées de cellule possédant chaque variant.

Nous pouvons dire que le variant DHODH semble avoir un effet sur le transfert d'électron de la chaîne mitochondriale mais ne semble peu ou pas avoir d'effet sur l'activité enzymatique et que les variants UMPS et RPUSD3 semble avoir un effet sur l'activité de leurs protéines. Les trois variants ayant un effet délétère sur la mitochondrie, on pourrait penser que cela va entraîner une augmentation de la mitophagie, augmentation confirmée pour le variant DHODH avec une augmentation des lysosomes, et que cela entraîne une diminution des mitochondries et donc de l'ADN mitochondrial.

Nos résultats suggèrent que ces variants, trouvés dans des processus mitochondriaux à l'état hétérozygote, combinés à une exposition prolongée à l'IFN- γ et le TNF- α , ont un effet délétère sur la mitochondrie, ce qui pourrait expliquer le développement de la CCC.

Dans cet article, je suis co-premier auteur, j'ai généré tous les clones par Crispr/cas9. J'ai réalisé les manipulations de mesure d'ATP avec et sans les inhibiteurs. J'ai réalisé tous les tests fonctionnels sur cellules entières : Quantification de l'UMP, quantification de l'orotate, mesure de l'activité de la protéine DHODH et les Westerns blot sur les clones RPUSD3 et DHODH. J'ai stimulé les cellules pour réaliser la quantification de l'ADNmt. Et J'ai mis en place et optimisé les manipulations sur les mitochondries isolées. J'ai également participé à la rédaction du papier.

Functional characterization of mitochondria related pathogenic variants associated to an increase risk to develop severe chronic Chagas cardiomyopathy.

Andrieux P*, Nunes JP*,....., Cunha-Neto E† and Chevillard C†.

*These authors are sharing the first position

†These authors are sharing the last position and act as corresponding authors

INTRODUCTION

Chagas disease (American trypanosomiasis) is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and transmitted by the reduviid bug (called “barbeiro” in Brazil) in the poor, rural endemic areas of Latin America. Chagas disease remains a neglected disease and a contemporary public health concern, with no vaccines available so far and only few antiparasitic drugs only proven efficient for treating the acute phase of the disease—but none has yet been shown to be effective in chronically infected adults, the stage when the great majority of patients are diagnosed. The only available treatment for end-stage CCC patients is heart transplantation, a high-cost, high complexity intervention.

Chagas disease is a major cause of heart disease and cardiovascular-related deaths in endemic areas located in Latin America and causes significant economical burden in affected countries. Approximately 12,000 deaths attributable to Chagas disease occur annually, typically due to severe chronic Chagas disease cardiomyopathy (CCC) ¹, which develops in ca. 30% of infected individuals decades after infection. The World Health Organization estimates that 56 thousand new cases of Chagas disease occur every year. CCC has a worse prognosis than cardiomyopathies of non-inflammatory etiology, like ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM) ².

The CCC myocardium displays a diffuse myocarditis with signs of inflammatory infiltrate and heart fiber damage, including significant fibrosis. The inflammatory infiltrate of CCC heart lesions is mainly composed of T cells displaying a Th1-like cytokine profile ³. This exacerbated Th1 response is characterized by a high expression of interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis alpha (TNF- α) and TBX21 (T-bet) ⁴. These IFN- γ

producing Th1 cells are accumulated in the myocardium of CCC patients ^{3,5,6} in response to locally produced chemokine ligands CXCL9 and CCL5 ⁷.

This exacerbated Th1 response is inducing reduced contractility ⁸ and fatty acid metabolism of cardiomyocytes ⁹. It is also inducing TNF-alpha and potentiates TNF-alpha-mediated NF-kB signaling, leading to NOS2 production of NO ^{10,11} which in the presence of IFN- γ -induced reactive oxygen species turns into peroxynitrite ¹² and ensuing mitochondrial fragmentation and reduction of mitochondrial membrane potential, lipid beta-oxidation ⁹ and ATP generation ¹³.

Mechanisms underlying differential progression to CCC are still incompletely understood. Familial aggregation of CCC has been described ¹⁴, suggesting that there might be a genetic component to disease susceptibility ¹⁴. This is also supported by the fact that only one-third of *T. cruzi*-infected individuals develop CCC. A number of case-control genetic studies have found signs of association between gene polymorphisms and disease progression ^{15,16}.

Moreover, three Genome Wide Association Study (GWAS) were done. An initial study of 600 Brazilian patients failed to achieve the desired statistical power, as no SNP was found to be strongly associated with CCC ¹⁷. The second study which is including more patients and cohorts recruited in Colombia, Argentina and Bolivia found a susceptibility locus ¹⁸. This locus was identified on chromosome 11 (rs2458298). The rs2458298 marker is located near the SAC3D1/SHD1 gene, a transcriptional regulator of the STAT5 gene ¹⁹. The STAT5 gene is known to be a cardioprotector in humans ²⁰. rs2458298 is also in eQTL with two genes (SNX15 and BATF2). So, the rs2458298 locus may influence the transcription of these

neighboring genes. The BATF2 gene encodes a transcription factor that has been associated with Chagas disease and regulates the Il-23-Th17 pathway, suggesting an immunoregulatory function during *T. cruzi* infection in a mouse model²¹. The SNX15 gene encodes a member of the nexin family of proteins, which has been associated with cardiovascular disease²².

The last genome-wide study and meta-analysis was carried out in two Brazilian cohorts to identify genetic susceptibilities for the development of CCC²³. A new susceptibility locus was identified the locus (rs34238187) is located on chromosome 18 near the C18orf42 gene. Using haplotype analysis studies, the authors were able to restrict this locus to a 30Kb haplotype. Unfortunately, the authors were unable to identify the causal genetic variant responsible for the association, or the specific genes modulated by the susceptibility haplotype²³.

We used whole exome sequencing to study nuclear families containing multiple cases of Chagas disease. We searched for rare pathogenic variants shared by all family members with CCC but absent in infected asymptomatic siblings and in unrelated asymptomatic subjects' subset²⁴. We had identified 22 pathogenic gene variants exclusively found in severe patients. We found a striking accumulation of these CCC-associated variants in inflammation-related and mitochondrial genes. Among the mitochondrial genes (ADCY10, DHODH, GIT1, MRPS18B, RPUSD3, LEPR, UMPS, MOCS1, and OBSCN), three of them (DHODH, RPUSD3, UMPS) were associated to respiratory chain/oxidative phosphorylation (OXPHOS) activity, and ATP production.

Here, we are reporting functional characterization of these three variants associated to respiratory chain/oxidative phosphorylation (DHODHrs201230446 R135C, RPUSD3rs142984515 W269X, UMPSrs17843776 S30G).

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Human adult ventricular cardiomyocytes cell line AC-16 was kindly

provided by Dr. Mercy Davidson (Columbia University, USA)²⁵. The cell line was propagated using Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 medium with 12.5% fetal bovine serum (FBS) without antibiotics for no longer than 8 passages. AC-16 cells were screened monthly for mycoplasma contamination (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit, Lonza) and were authenticated by PCR-based DNA Profiling (Eurofins Genomics, France).

CRISPR/Cas9 gene editing methods

We inserted guide RNA, Cas9 protein and Ultramer into the AC16 cells lines by transfection using the AMAXA technique. At the time of transfection, cells should be 80% confluent. The cells are detached from their support by 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco 25300-062) for 4 min at 37°C and 5% CO₂. The guide RNA and Cas9 protein complex will be formed prior to transfection, composed of crRNA, trRNA (IDT 1073189) and Cas9 protein Hifi V3 (IDT 1081060). Transfection is by electroporation, using the AMAXA technique and the Amaxa[®] Rat Cardiomyocyte Neonatal Nucleofector[®] Kit (Lonza VPE-1002). For each condition, 2,000,000 AC16 cells are combined with 12.5 µg guide RNA/Cas9 protein/Ultramer complex and 100 µl Rat Cardiomyocyte Nucleofector[®] Solution, then placed in the cuvette and electroporated with program G 009. For each transfection we used two ultramers (forward and reverse). 24h after transfection is complete; a limit dilution is performed to isolate the transfected clones. 200 to 400 clones will be isolated for each transfection. Once isolated, the clones are amplified in order to be frozen or to extract DNA used for sequencing. Guide and ultramers sequences are provided in **table 1**.

Polymerase Chain Reaction and Sanger Sequencing

For CRISPR/Cas9 clone screening, we designed specific primers for each mutation of interest with Primer3 software (V4.0.0) to amplify genomic DNAs. Sequences of the primers are described in **supplementary table**

I. PCR amplifications were carried out with GoTaq polymerase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and 1 μ M of each primer. On Eppendorf thermocycler, 50 μ l reactions were carried out. The PCR products were visualized on agarose gel (1.5% agarose TBE0.5X) and purified with QIAEXII gel extraction kit (Qiagen) before Sanger sequencing.

Cell stimulation

Interferon-gamma (IFN- γ) (130-096-484) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (130-094-014) were purchased from Miltenyi Biotec. Stimulation was performed with cytokines IFN- γ (10 ng/ml) and TNF- α (5 ng/ml) added to a medium composed of DMEM-12% and 12.5% fetal calf serum for 48h.

Cell treatment

The cells were treated with Etomoxir (Sigma-Aldrich E1905) at 10 μ M and 2-Désoxy-D-glucose (2DG) (Sigma-Aldrich D8375) at 0.5 mM for 2h each.

Western Blot Analysis

500 000 clone cells are lysed by a mix of RIPA pierce buffer (Thermo scientific 89900), Halt protease N phosphatase inhibitor cocktail (Thermo scientific 1861281) et 0,5M EDTA solution (Thermo scientific 1861274). Proteins are measured using the Bradford technique, and 12 μ g of proteins are charged to NuPAGE gel with 4-12% Bis Tris (invoctrogen NPO322BOX) with LDS blue loading sample Buffer 4x (NuPAGE NP0007). Migration is performed for 1 hour 45 minutes at 150mV. At the end of the migration, the gels are transferred to an iBlot 2NC Mini stacks (invoctrogen IB23002) using the iBlot 2 Dry Blotting system. All washes were performed using TBS-Tween (1x). The primary antibodies used were total OXPHOS Human western blot Antibody Cocktail 1/750 (Abcam ab110411), monoclonal anti-beta actin body mouse monoclonal (1/1000; sigma A1978) and Anti-CAD antibody (1/2000; Abcam ab99312). The secondary antibodies used is goat anti-mouse

HRP conjugate antibody (1/2500; Thermo Fisher Scientific, cat#G-21040; RRID:AB2536527) and Goat Anti-Rabbit IgG H&L HRP (1/2000; Abcam, ab97051). A stripping step is performed using restore plus western blot stripping buffer (Thermo scientific 46430). Revelation is carried out using the Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo scientific 32132) and iBright Imaging Systems 750 imaging. Gel analysis was performed using Imagej software.

Isolation of mitochondria

Reagents must be kept at 4°C during the experiment and use sectioned cones to avoid mitochondria damage. Make dry pellets of 7 million cells. Resuspending the pellet with 250 μ L IBM1 and mix in pilon for 40 secondes and transfert in 8 ml IBM1. Clarifie the cell lysat by centrifugation at 1,200g for 10 minutes at 4°C. Recover the supernatant and centrifugate at 8,000g for 10 minutes at 4°C. Resuspending the pellet with 5 ml of IBM2 and clarifie by centrifugation at 8,000g for 10 minutes at 4°C. Resuspending the pellet with 2x25 μ L of IBM2.

IBM1 (Isolation Buffer for Mitochondria 1) : Add 67 mM of sucrose, 50 mM of Tris/HCl, pH 7,4, 50 mM of KCl, 10 mM of EDTA/Tris Base pH 8 and 0.2% of Essentially Fatty acid Free BSA. Adjust to 500 mL and pH 7,4. Storage at -20 °C.

IBM2 (Isolation Buffer for Mitochondria 2) : 200 mM D-Mannitol, 70 mM Sucrose, 5 mM EGTA/Tris Base, and 10 mM Tris/HCl pH 7.4. Adjust to 300 mL and pH 7.4. Storage at -20 °C.

ATP production quantification

Whole cell : 1000 cells were seeded per well in a 96-well plate and had adhered in the following 2-3 hours. Then, stimulation was done with IFN- γ (10 ng/ml) + TNF- α (5 ng/ml) for 48h. Lyse each well using 50 μ L of Triton-X (0.05%) diluted in PBS 1x. Incubate the plate for 10 minutes on a plate shaker at 700 RPM and 37°C. For ATP quantification, add 25 μ L of CellTiter-Glo Luminescent Cell

viability (Promega G7571) to 25 μ L of the cell lysate in the white 96-well plate (Lumitrac Greiner Bio-One 655075). Incubate the plate for 10 minutes with 2 minutes of shaking. Luminescence is measured in white plates at a wavelength of 700 nm using the VICTOR Nivo™ PerkinElmer

Isolated mitochondria: Recover mitochondria previously isolated and centrifuge 10 minutes 8000 g at 4°C. Add 70 μ L of sterile cold ultra-pure water and sonicate cells at water bath at 4°C for 10 minutes (3 x 10 secondes with pause intervals of 15 secondes). Centrifuge 20 minutes, 16000g at 4°C and keep the supernatant. ATP production has been measured with a luciferase-based assay kit ATP Determination Kit (Invitrogen A22066), according to manufacturer's instructions. Luminescence is measured in white plates (Lumitrac Greiner Bio-One 655075) at a wavelength of 700 nm using the VICTOR Nivo™ PerkinElmer.

DHODH activity

Whole cell : 500 000 clone cells are lysed by 220 μ L of sterile cold ultra-pure water and sonicate cells at water bath at 4°C for 10 minutes (3 x 10 secondes with pause intervals of 15 secondes). Centrifuge 20 minutes, 16000g at 4°C and keep the supernatant. Prepare a first reaction by mix per assay to contain 100 μ L Lysat, 500 μ M of DHO (8mM), 0.2% of Triton (100%), 100 μ M of Coenzyme Q10 (11,58 mM), 200 mM of K₂CO₃ – HCL (400 mM) and adjust with water at 250 μ L. Incubate 60 minutes at 37 °C. For the second reaction keep 100 μ L to first reaction, 0.1 μ M of Orotic acid (1mM), 1 mM of TFMBAO (4mM), 2 mM of K₃Fe(CN)₆ (8mM), and 16 mM K₂CO₃ (pH 8, 1mM) and adjust with water at 500 μ L. Incubate at 80°C for 4 minutes. Stop reaction putting in ice. Distribute 150 μ L in triplicat in black 96-well plate (ThermoFisher 437111) and fluorescence were mesured at Ex/Em 340/460 nm with VICTOR Nivo™ PerkinElmer.

Isolated mitochondria: Recover mitochondria previously isolated and

centrifuge 10 minutes 8000 g at 4°C. Add 70 μ L of sterile cold ultra-pure water and sonicate cells at water bath at 4°C for 10 minutes (3 x 10 secondes with pause intervals of 15 secondes). Centrifuge 20 minutes, 16000g at 4°C and keep the supernatant. Prepare a first reaction by mix per assay to contain 70 μ L Lysat, 500 μ M of DHO (8mM), 0.2% of Triton (100%), 100 μ M of Coenzyme Q10 (11,58 mM), 200 mM of K₂CO₃ – HCL (400 mM) and adjust with water at 250 μ L. Incubate 60 minutes at 37 °C. For the second reaction keep 100 μ L to first reaction, 0.1 μ M of Orotic acid (1mM), 1 mM of TFMBAO (4mM), 2 mM of K₃Fe(CN)₆ (8mM), and 16 mM K₂CO₃ (pH 8, 1mM) and adjust with water at 450 μ L. Incubate at 80°C for 4 minutes. Stop reaction putting in ice. Distribute 150 μ L in triplicat in black 96-well plate (ThermoFisher 437111) and fluorecence were mesured at Ex/Em 340/460 nm with VICTOR Nivo™ PerkinElmer.

Orotate activity

Whole cell : 500 000 clone cells are lysed by 220 μ L of sterile cold ultra-pure water and sonicate cells at water bath at 4°C for 10 minutes (3 x 10 secondes with pause intervals of 15 secondes). Centrifuge 20 minutes, 16000g at 4°C and keep the supernatant. Prepare a reaction to contain 70 μ L Lysat, 30 μ L water, 0.1 μ M of Orotic acid (1mM), 1 mM of TFMBAO (4mM), 2 mM of K₃Fe(CN)₆ (8mM), and 16 mM K₂CO₃ (pH 8, 1mM) and adjust with water at 500 μ L. Incubate at 80°C for 4 minutes. Stop reaction putting in ice. Distribute 150 μ L in triplicat in black 96-well plate (ThermoFisher 437111) and fluorescence were mesured at Ex/Em 340/460 nm with VICTOR Nivo™ PerkinElmer.

Isolated mitochondria: Recover mitochondria previously isolated and centrifuge 10 minutes 8000 g at 4°C. Add 70 μ L of sterile cold ultra-pure water and sonicate cells at water bath at 4°C for 10 minutes (3 x 10 secondes with pause intervals of 15 secondes). Centrifuge 20 minutes, 16000g at 4°C and keep the supernatant.

Prepare a reaction to contain 30 μ L of lysat, 20 μ L of water, 0.1 μ M of Orotic acid (1mM), 1 mM of TFMBAO (4mM), 2 mM of K₃Fe(CN)₆ (8mM), and 16 mM K₂CO₃ (pH 8, 1mM) and adjust with water at 450 μ L. Incubate at 80°C for 4 minutes. Stop reaction putting in ice. Distribute 150 μ L in triplicat in black 96-well plate (ThermoFisher 437111) and fluorescence were mesured at Ex/Em 340/460 nm with VICTOR Nivo™ PerkinElmer.

UMP/CMP-Glo Glycosyltransferase activity

Whole cell : 500 000 clone cells are lysed by 220 μ L of sterile cold ultra-pure water and sonicate cells at water bath at 4°C for 10 minutes (3 x 10 secondes with pause intervals of 15 secondes). Centrifuge 20 minutes, 16000g at 4°C and keep the supernatant. Lysis was diluted 1/12.5. UMP concentration has been measured by luminescence with UMP/CMP-Glo Glycosyltransferase Assay (Promega VA 1130), according to the manufacturer's instructions. Each assay has been realized in triplicates.

Isolated mitochondria: Recover mitochondria previously isolated and centrifuge 10 minutes 8000 g at 4°C. Add 70 μ L of sterile cold ultra-pure water and sonicate cells at water bath at 4°C for 10 minutes (3 x 10 secondes with pause intervals of 15 secondes). Centrifuge 20 minutes, 16000g at 4°C and keep the supernatant. UMP concentration has been measured by luminescence with UMP/CMP-Glo Glycosyltransferase Assay (Promega VA 1130), according to the manufacturer's instructions. Each assay has been realized in triplicates.

Mitochondrial DNA copy number quantification

The Quantitative PCR (qPCR) was conducted using SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific), 1 ng of template DNA and primers for mitochondrial-encoded genes NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit 1 (MT-ND1) and Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the endogenous control.

The qPCR reactions were done in QuantStudio 12K (Applied Biosystem) with the following cycling program, 1 cycle of 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 50°C for 2 min, 95°C for 15s, and 60°C for 1 min. The ratio of mtDNA/nDNA was calculated using the formula $2^{2\Delta\Delta CT}$ (44). The primer sequences were: MT-ND1forward: 5' ATACCCATGGCCAACCTCT 3', MT-ND1 reverse: 5' GGGCCTTTGCGTAGTTGTAT 3'; GAPDH forward: 5' CCCTGTCCAGTTAATTTC 3', GAPDH reverse: 5' CACCCTTTAGGGAGAAAA 3'.

Mitochondrial Membrane Potential measurement

In order to evaluate mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), AC-16 cells were plated in 96-well plates (1000 cells per well). After 2 hours the cells were stimulated with IFN- γ (10 ng/ml) and TNF- α (5ng/ml). The cells were kept stimulated for 48 hours. After this period cells were incubated with tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM) 500 nM for 1 hour at 37°C. The TMRM was previously prepared in DPBS, calcium, magnesium 1x (DPBS ++). Post incubation period the cells were washed twice with DPBS, calcium, magnesium (1x) using the Biotek 50ts microplate washer. Then, the cells were loaded with 100 μ L of DPBS ++ and fluorescence were acquired (540 nm excitation; 590 nm emission) on a spectrofluorometer (Spectramax Paradigm™) for a period of 10 minutes, to get basal signal, and for another 10 minutes after the addition of fluorocarbonyl cyanide phenylhydrazone (FCCP) (5 μ M), a mitochondrial protonophore used as an internal experimental control to obtain maximum fluorescence and the delta value (Δ) (Rosenstock et al., 2004; Carvalho et al., 2004; Rosenstock et al., 2010; Naia et al., 2014; E Silva et al., 2019; E Silva et al., 2023). The baseline fluorescence was calculated from the mean of the last 10 reading points before FCCP, while the delta (Δ) was calculated by the difference between the maximum

fluorescence after FCCP and the basal fluorescence intensity²⁶⁻³¹.

After the readings the DPBS ++ was removed and was added 25 μ L of triton 0.05% to lyse the cells and expose the proteins. Then, the Pierce™ BCA Protein Assay Kit was used to evaluate the protein content. The Δ of fluorescence was normalized by the protein content in each well.

Mitochondrial mass measurement

To evaluate the mitochondrial content AC-16 cells were plated in 96-well plates (1000 cells per well). After 2 hours the cells were stimulated with IFN- γ (10 ng/ml) and TNF- α (5ng/ml). The cells were kept stimulated for 48 hours. After this period cells were incubated with Mitotracker DeepRed (MTR) 200 nM for 30 minutes at 37°C. Post incubation period the cells were washed twice with DPBS 1x using the Biotek 50ts microplate washer and loaded with 100 μ L of DPBS ++ and fluorescence were acquired (644 nm excitation; 664 nm emission) on a spectrofluorometer (Spectramax Paradigm™).

Lysosomal mass measurement

To investigate the lysosomal content the AC-16 cells were plated in 96-well plates (1000 cells per well). After 2 hours the cells were stimulated with IFN- γ (10 ng/ml) and TNF- α (5ng/ml). The cells were kept stimulated for 48 hours. After this the medium was removed and the cells washed once with DPBS++ using the Biotek 50ts microplate washer and loaded with LysoTracker DND-26 75 nM that was incubated for 1 hour at 37°C. After incubation period the fluorescence (504 nm excitation; 511 nm emission) were acquired on a spectrofluorometer (Spectramax Paradigm™). After the readings the DPBS ++ was removed and was added 25 μ L of triton 0.05% to lyse the cells and expose the proteins. Then, the Pierce™ BCA Protein Assay Kit was used to evaluate the protein content. The fluorescence was normalized by the protein content in each well.

ROS quantification

In order to evaluate the levels of ROS generated by the cytokines stimulus, the AC-16 cells were incubated with DCFDA / H2DCFDA - Cellular ROS Assay Kit (ab113851). To do this assay, the AC-16 cells were plated in 96-well plates (1000 cells per well). After 2 hours the cells were stimulated with IFN- γ (10 ng/ml) and TNF- α (5ng/ml). The cells were kept stimulated for 48 hours. After this the medium was removed and the cells washed once with DPBS ++ 1x using the Biotek 50ts microplate washer and incubated with 20 μ M of DCFDA in DPBS ++ for 1 hour at 37°C. After the incubation the cells were washed again with DPBS ++ 1x using the Biotek 50ts microplate, loaded with 100 μ L of DPBS ++ 1x. The fluorescence was immediately acquired on a spectrofluorometer (Spectramax Paradigm™) at Ex/Em = 485/535 nm in end point mode following the kit specifications.

After the readings the DPBS ++ was removed and was added 25 μ L of triton 0.05% to lyse the cells and expose the proteins. Then, the Pierce™ BCA Protein Assay Kit was used to evaluate the protein content. The fluorescence was normalized by the protein content in each well.

Protein quantification

Measure proteins with 20% of Bradford (Bio Rad 5000006) in colorimetry with VICTOR Nivo™ PerkinElmer.

RESULTS

We decided to focus our efforts on families which display highly promising rare pathogenic gene variants associated to respiratory chain/oxidative phosphorylation. Of note, the identified DHODH R135C variant is a total loss-of-function variant. Mitochondrial DHODH contributes electrons to the OXPHOS; the R135C variant leads to OXPHOS malfunction, reduced ATP production and mitochondrial dysfunction³². A truncation at exon 8 of RPUSD3 is likely to impair its

function; the RPUSD3 protein is involved in the assembly of the mitochondrial ribosome and the truncation is likely to impair translation of mitochondrial DNA-encoded genes, with disruption of OXPHOS³³. The UMPS is part of the pyrimidine synthesis pathway, and its substrate orotate is provided by DHODH.

First of all, we introduced these variants in a Human adult ventricular cardiomyocytes cell line (AC16) by CRISPR/Cas9 gene editing. The insertion of the mutation in the genome was verified by sanger sequencing (as shown in **Supplementary figure 1**). The success rate was between 3-25%, depending on the gene of interest.

The three variants had a significant effect on ATP production.

The UMPS CRISPR/Cas9 clones were or were not stimulated with IFN- γ and TNF- α . After 48h of stimulation, cells were lysed and we quantified the total ATP production (**Figure 1**). The IFN- γ and TNF- α stimulation was inducing a decrease in ATP production compared to the non-stimulated. The percentage of decrease in ATP production is depending of mutation. In detail, for DHODH rs201230446C/C clone, the ATP production decrease reaches 34.5% whereas this decrease reaches 52.25% for the DHODH rs201230446C/T (**Figure 1A**). This difference is significant ($p=0.0473$). For UMPS rs17843776A/A clone, the ATP production decrease reaches 30.0% whereas this decrease reaches 42.77% for the UMPS rs17843776A/G (**Figure 1B**). This difference is significant ($p=0.0260$). At least, for RPUSD3 rs142984515A/A clone, the ATP production decrease reaches 45.0% whereas this decrease reaches only 12.47% for the RPUSD3 rs142984515A/G (**Figure 1C**). This difference is significant ($p=0.0041$).

Cytokine stimulation and the mutations under study induce variation in the sources of ATP production.

We had repeated the same experiments but during the stimulation we used two main inhibitors (**Figure 2**). First of all, 2-Deoxy-d-glucose is a glucose molecule (2-DG) which has the 2-hydroxyl group replaced by hydrogen, so that it cannot undergo further glycolysis. As such; it acts to competitively inhibit the production of glucose-6-phosphate from glucose at the phosphoglucosomerase level. So, the glycolysis is inhibited by 2-DG. The second inhibitor that we used (Etomoxir) or 2[6(4-chlorophenoxy)hexyl]oxirane-2-carboxylate, is an irreversible inhibitor of carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) on the inner face of the outer mitochondrial membrane 10.1016/0006-2952(87)90458-8. This prevents the formation of acyl carnitines, a step that is necessary for the transport of fatty acyl chains from the cytosol into the intermembrane space of the mitochondria. This step is essential to the production of ATP from fatty acid oxidation. The use of Etomoxir has a limited effect on the ATP production whatever the clones and the mutation under study (**Figure 2**). The two main sources of ATP remain the mitochondria respiratory chain and the glycolysis. No clear evidence was obtained for a switch from mitochondria to glycolysis in relationship to stimulation and mutation except for UMPS and RPUSD3 variants (**Supplementary figure 2**).

The DHODH mutation is associated to a decrease of the mitochondrial membrane potential, of the DHODH activity to an increase oxydative stress.

To investigate the role of IFN- γ and TNF- α on the DHODH CRISPR/cas9-edited clones, we stimulated the clone cells with IFN- γ and TNF- α and we measured the mitochondrial $\Delta\Psi_m$ in a high content screening platform. We observed that cytokine stimulation impaired the $\Delta\Psi_m$ (**Figure 3A**).

We also measured reactive oxygen species (ROS) production the DHODH CRISPR/cas9-edited clones stained with the fluorogenic dye H2DCFDA and we found a 43%

increase in ROS after stimulation with IFN- γ and TNF- α and 23% with TNF- α (**Figure 3B**).

Effect of the cytokine stimulation and the DHODH rs201230446 variant on the DHODH activity.

The DHODH protein encoded by this gene catalyzes the ubiquinone-mediated oxidation of dihydroorotate to orotate. Moreover, DHODH acts as an enzyme associated with the electron transport chain. The DHODH's substrate is provided by the CAD multifunctional protein (Carbamoyl-phosphate synthetase 2, Aspartate transcarbamoylase, and Dihydroorotase) which catalyse the transformation of glutamine to dihydroorotate. First, we performed Western blots on the DHODH CRISPR/cas9-edited clones to quantify the upstream enzyme (**Figure 4A**). The quantification has detected no significant difference between the clones with or without cytokine stimulation (**Figure 4B**). We also performed Western blots on the DHODH CRISPR/cas9-edited clones to quantify the DHODH enzyme itself (**Figure 4C, 4D**). Finally, we studied the DHODH enzyme activity and we quantify the DHODH enzyme's product (orotate) (**Figure 4E, 4F**). On the clone DHODH rs201230446C/C clone, cytokine stimulation has no effect either on enzymatic activity as such or on the production of the final product (orotate) (**Figure 4E, 4F**). On the clone DHODH rs201230446C/T clone, without cytokine stimulation the enzyme activity is similar to the wild type clone. However, under cytokine stimulation, for this heterozygous clone, we had detected an increase of the enzymatic activity (**Figure 4E**). This increase in enzymatic activity is also reflected in a rise in orotate production (**Figure 4F**).

Increased lysosomal and mitochondrial mass in AC16 cells after cytokine stimulation.

In our previous experiments, we observed that a 48-hour exposure to cytokines

IFN- γ (10 ng/mL) and TNF- α (5 ng/mL) resulted in mitochondrial depolarization (**Figure 3A**), reduction of ATP production (**Figure 1A**), and increase in ROS levels (**Figure 3B**). These effects appear to be correlated with the establishment of autophagic processes, specifically mitophagy. In this context, we investigated whether these cytokines could impact the amount of lysosomal mass using the LysoTracker probe, which prominently labels acidified organelles such as lysosomes. **Figure 5A** demonstrates that cytokine stimulation significantly increased the fluorescent signal of LysoTracker, indicating increased lysosomal mass on the clone carrying the DHODH enzyme loss of function mutation 1.27 (C/T, +51.7% $p < 0.01$), as well as on the non-mutated clone 1.184 (C/C, +32.2%, $p < 0.05$) compared to not-stimulated cells **Figure 5B**. Moreover, the fluorescence of LysoTracker in the C/T clone was 19.5% higher compared to C/C clone ($p = 0.0571$). Despite being not statistically significant, this data might indicate that the cytokines further enhance mitophagy in heterozygous C/T DHODH.

When we assessed mitochondrial mass using the Mitotracker probe, which specifically labels mitochondria, we identified a significant increase in the fluorescent signal in both 1.184 (C/C, +43.4% $p < 0.05$) and 1.27 (C/T, +48.8% $p < 0.01$) cells. These results suggest increased mitochondria content. However, mitochondria are dynamic organelles, altering their shape and function depending on metabolic flux and stressors such as the cytokines. In this case, the observed effect might be associated with increased mitochondrial fission that potentially increases the Mitotracker fluorescence. However, further images analyses are necessary to conclude this feature.

UMPSrs17843776A/G variant is associated to a basal UMP titration.

The pyrimidine orotate (orotic acid) is synthesized in a sequence of four reactions,

deriving its atoms from glutamine, bicarbonate, and aspartate. A single multifunctional cytosolic enzyme catalyzes the first three of these reactions, while the last one is catalyzed by a mitochondrial enzyme. In two further reactions, catalyzed by a bifunctional cytosolic enzyme, orotate reacts with 1-phosphoribosyl 5-pyrophosphate (PRPP) to yield orotidine 5'-monophosphate, which is decarboxylated to yield uridine 5'-monophosphate (UMP). We performed a titration of UMP on our CRISPR/cas9-edited clones with or without stimulation. On the clone 1.8 rs17843776A/A, the IFN- γ and TNF- α stimulation is inducing a significant decrease of the production of UMP (48%). For the clone 1.23 rs17843776A/G, with or without a cytokine stimulation, the UMP level remains low indicating that the enzymatic reaction, catalyzed by UMPS, is impaired (**Figure 6**).

The RPUSD3rs142984515G/A variant is acting on the mitochondrial respiratory chain complexes' assembly.

The RPUSD3 CRISPR/Cas9 clones were or were not stimulated with IFN- γ and TNF- α . After 48h of stimulation, cells were lysed and analyzed by Western blot using an OXPHOS Human Antibody Cocktail (**Figure 7A**). This cocktail is suitable for Western Blotting analysis of the relative levels of the 5 OXPHOS complexes in mitochondrial preparations from human sources. As the cocktail was containing contains 5 mAbs, one each against each complex we were able to quantify the relative levels of the 5 OXPHOS complexes. The RPUSD3 rs142984515A/G genotype was associated with a lower relative expression of OXPHOS Complexes I, III and IV (**Figure 7B, 7D, 7E**). The cytokine stimulation had an effect on the relative expression of OXPHOS complexes I and III and this effect was clearly visible on the RPUSD3 rs142984515G/G genotype (**Figure 7B, 7D**). The RPUSD3 rs142984515 variant and stimulation had no effect on OXPHOS complexes II and V (**Figure 7C, 7F**).

The cytokine stimulation and the variants under study induce a decrease of the total number of mitochondria.

In the past, we had shown that cytokine treatment of AC-16 cardiomyocytes with IFN- γ and TNF- α for 48h reduced the amount of MT-ND1 as compared to non-stimulated cells. Here, the quantification of mtDNA copy number was evaluated on each clone with or without cytokine stimulation (**Figure 8A, 8B, 8C**). MtDNA copy number using (MT-ND1) was significantly lower in muted clones. It also confirms that cytokine stimulation amplifies this decrease in mitochondrial copy number.

However, for the RPUSD3 mutation, it is interesting to note that the CRISPR/cas9-edited clone 1.33 carrying the RPUSD3rs142984515A/G genotype is characterized by an increase mtDNA copy number under stimulation (**Figure 8C**). This result is consistent with the result present on **figure 1**. Under cytokine stimulation, the production of ATP was higher in CRISPR/cas9-edited clone A/G than in clone carrying the CRISPR/cas9-edited clone G/G genotype (**Figure 1C**).

Functional assays on isolated mitochondria largely confirmed the previous results.

Based on the previous results, for each CRISPR/cas9-edited clone, we purified the mitochondria and repeated the functional characterization. For the three pathogenic variants their effect on ATP production was confirmed (**supplementary figure 3**). The impact of the variant UMPSrs17843776 on the UMP concentration was also confirmed (**supplementary figure 3**). For the DHODH rs201230446 variant, the enzyme activity test and the orotate concentration determination suggest an impact on the enzymatic activity (**supplementary figure 3**).

DISCUSSION

Our study revealed several intriguing findings regarding the impact of the cytokines on cellular processes, specifically the mitochondrial function. The DHODH protein not only converts dihydroorotate to orotate, but also allows the transfer of an electron from complex I to complex III. The mutation of interest (rs201230446), located on chromosome 10, replaces cytosine (C) with thymine (T) at 72048540. More specifically, this mutation is located in the coding region of the DHODH gene and replaces amino acid 135 of the protein, arginine, with cysteine. Analysis of crystallography databases has shown that the amino acid arginine 135 is located at the catalytic site. We can therefore assume that this point mutation, which changes an amino acid, alters the biological function of the DHODH protein, and this is what our results show. The stimulation with IFN- γ and TNF- α in the clone 1.184 (C/C) and clone 1.27 (C/T) cells induced a series of interconnected cellular responses. The changes observed in mitochondrial depolarization, ATP production and increased ROS levels is an indicative of mitochondrial dysfunction, which can have significant implications for overall cellular energy production and redox balance, that can have downstream effects on several cellular pathways.

Indeed, at the level of the respiratory chain, it means that with mutation and stimulation, the protein no longer transfers electrons to the quinone, thereby reducing the membrane potential and ATP production. This decrease may be due to the alteration of the DHODH enzyme alone, as the five respiratory chain complexes (data not shown) and the CAD protein (**Figure 4A**) upstream of DHODH have the same amount of protein as in non-mutated cells. Surprisingly, however, we observed an increase in the enzymatic activity of the DHODH protein and a higher level of orotate in both mutant and stimulated cells. This could mean that the mutation has little or no effect on DHODH enzymatic activity

and the conversion of dihydroorotate to orotate, but does affect specifically electron transfer. We also found that there was a decrease in the amount of mtDNA in mutant cells and an increase in lysosomes. The cumulative effect of the cytokines in different mitochondrial processes in AC16 might be linked to the stimulation of autophagic processes, particularly mitophagy. As mitophagy is a critical cellular mechanism for maintaining mitochondrial quality, it involves the selective degradation of damaged or dysfunctional mitochondria by preventing their accumulation and preserving overall cellular homeostasis³⁴⁻³⁶. In our analyses, the cytokine-induced mitochondrial dysfunction may serve as a trigger for mitochondrial degradation through mitophagy³⁴⁻³⁶.

In fact, cytokine stimulation and mitophagy are strongly correlated^{13,37,38}. In 2011, Kanamori using mice cardiomyocytes post chronic infarction, a condition strongly related to increased cytokines and inflammation, observed an increase in several proteins related to autophagy³⁹. In 2021, Qiao et al using primary cultured neonatal rat cardiomyocytes exposed to LPS observed a significant increase in TNF α and other inflammatory cytokines that caused mitochondrial dysfunction and increased autophagy⁴⁰.

The UMPS gene codes for a protein that forms part of the pyrimidine biosynthesis pathway. This enzyme catalyzes the reaction of orotate to UMP, and follows the DHODH protein in the pathway. The mutation found in the families is rs17843776; it is a mutation on chromosome three3, in the coding sequence of the UMPS gene where an A>G and a serine are transformed into glycine at protein level. Our results confirm that the mutation has a deleterious effect on the protein, with a significant decrease in the amount of UMP in mutated cells. Moreover, stimulation with TNF- α and IFN- γ also appears to decrease the amount of UMP in non-mutated cells. Both stimulation and mutation appear to have an impact on the activity of this protein. Here

again, the mutation and the stimulation are inducing mitophagy as indicates the decrease in the amount of mtDNA in mutant cells. A significant decrease in UMP is also inducing of UTP and CTP. Interestingly, in patients with left ventricular hypertrophy, the endocardial content of ATP, GTP, UTP, CTP, and creatine phosphate were reduced compared to the content of subjects without left ventricular hypertrophy⁴¹. Several reports had shown that extracellular tri/di-phosphates may have cardio protective effect against hypoxic damage, by preventing free radicals formation⁴².

The protein RPUSD3 is a pseudouridine synthase. It catalyzes the isomerization of uridine to pseudouridine in specific mitochondrial mRNAs. It is a post-transcriptional modification necessary for translation. RPUSD3 acts on the mRNA of the COXI and COXIII subunits. These are the subunits of Complex IV. RPUSD3 also interacts with a subunit of complex I (NUDFB1) and of complex III (UQCRC2). The mutation found in patients for this gene is a stop codon. So, the protein will be truncated and we can easily hypothesize that this will alter its function. We also found that the amount of respiratory chain complexes I, III and IV were under expressed in cells with the variant. This variant is spatial organisation of the respiratory chain. This is accompanied by a lower reduction in ATP production. It is understandable, as the patients or our clones are in the heterozygous state. However, this mutation is not accompanied by a reduction in the number of mitochondria, as with the two previous mutations. We can hypothesize that this mutation concomitantly induces a drop in ATP production while stimulating the fission process. The aim of the latter would be to increase the number of mitochondria in order to compensate for their inability to produce sufficient ATP. Arroyo JD *et al.* performed a genome-wide CRISPR "death screen" to reveal human genes required for OXPHOS. They revealed a functional module consisting of NGRN, WBSCR16, RPUSD3, RPUSD4, TRUB2,

and FASTKD2 that regulates the mitochondrial 16S rRNA and intra-mitochondrial translation⁴³.

The use of the two inhibitors 2DG and etomoxir has provided interesting results. In cells carrying the UMPSrs17843776 A/A genotype, glycolysis provided 63% of the total ATP production under stimulation. On the other hand, in cells carrying the UMPS rs17843776 A/G genotype, the proportion of ATP supplied by glycolysis becomes ultra-majoritarian (86%). In both cases, all measurements made in the presence of etomoxir showed that ATP production associated with lipid beta-oxidation was negligible. Similarly, RPUSD3 rs142984515G/G genotype, glycolysis provided 56% of the total ATP production under stimulation. In opposite, RPUSD3 rs142984515A/G genotype, glycolysis provided 67% of the total ATP production. This phenomenon is similar to the Warburg effect already described in several cancers⁴⁴. Cancer cells produce energy predominantly not through the oxidative phosphorylation in the mitochondria as observed in normal cells, but through a less efficient process of glycolysis even in the presence of abundant oxygen. In order to explain the process that cancer cells did not undergo oxidative phosphorylation, Warburg hypothesized that cancer cells develop a defect in mitochondria that leads to impaired aerobic respiration and a subsequent reliance on glycolytic metabolism. The same strategy could be shifted to cardiac diseases. The regulation of this effect is complex. Among the regulators, pathways such as phosphoinositide 3-kinase (PI3K/Akt/mTOR) as well as hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) are central regulators of glycolysis, cancer metabolism and cancer cell proliferation⁴⁵. PI3K signaling pathways have a role in many cellular processes such as metabolism, inflammation, cell survival, motility and cancer progression. PI3K pathway regulate glucose transporter expression (GLUT1), enhance glucose capture. Silva MC *et al.* had shown that the canonical PI3K γ pathway is upregulated in both human

chagasic hearts and hearts of acutely infected mice. Indeed, they have shown that Human heart tissue transcriptome revealed that the expression of *PIK3CG* gene was upregulated in the samples from patients with CCC when compared to heart samples from healthy control individuals and there was a positive correlation in heart tissue of CCC patients between the expression of the *PIK3CG* gene and the pro inflammatory genes *TNF* and *IFNG*

⁴⁶

The characterization of the physiological effect of these pathogenic variants found exclusively in the Chagas patients help to decipher the pathogenic process associated to severe Chagas dilated cardiomyopathy.

REFERENCE

1. Salvatella, R., Irabedra, P., Sánchez, D., Castellanos, L. G. & Espinal, M. South-south cooperation for Chagas disease. *The Lancet* **382**, 395–396 (2013).
2. Cunha-Neto, E. & Chevillard, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm.* **2014**, 683230 (2014).
3. Abel, L. C. J. *et al.* Chronic Chagas' Disease Cardiomyopathy Patients Display an Increased IFN- γ Response to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Autoimmun.* **17**, 99–107 (2001).
4. Cunha-Neto, E. *et al.* Cardiac Gene Expression Profiling Provides Evidence for Cytokinopathy as a Molecular Mechanism in Chagas' Disease Cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.* **167**, 305–313 (2005).
5. Reis, M. M. *et al.* Anin SituQuantitative Immunohistochemical Study of Cytokines and IL-2R α in Chronic Human Chagasic Myocarditis: Correlation with the Presence of Myocardial *Trypanosoma cruzi* Antigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **83**, 165–172 (1997).
6. Rodrigues, D. B. R. *et al.* In Situ Expression of Regulatory Cytokines by Heart Inflammatory Cells in Chagas' Disease Patients with Heart Failure. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 1–7 (2012).
7. Nogueira, L. G. *et al.* Myocardial Chemokine Expression and Intensity of Myocarditis in Chagas Cardiomyopathy Are Controlled by Polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1867 (2012).
8. M., P. *et al.* Endotoxin and cytokines alter contractile protein expression in cardiac myocytes in vivo. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **442**, 920–927 (2001).
9. Ni, C. *et al.* Doxorubicin-induced cardiotoxicity involves IFN γ -mediated metabolic reprogramming in cardiomyocytes. *J. Pathol.* **247**, 320–332 (2019).
10. Silva, J. S., Vespa, G. N., Cardoso, M. A., Aliberti, J. C. & Cunha, F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect. Immun.* **63**, 4862–4867 (1995).
11. Vila-del Sol, V., Punzón, C. & Fresno, M. IFN- γ -Induced TNF- α Expression Is Regulated by Interferon Regulatory Factors 1 and 8 in Mouse Macrophages. *J. Immunol.* **181**, 4461–4470 (2008).
12. Rakshit, S. *et al.* Interferon-gamma induced cell death: Regulation and contributions of nitric oxide, cJun N-terminal kinase, reactive oxygen species and peroxynitrite. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1843**, 2645–2661 (2014).
13. Buoncervello, M. *et al.* Inflammatory cytokines associated with cancer growth induce mitochondria and cytoskeleton alterations in cardiomyocytes. *J. Cell. Physiol.* **234**, 20453–20468 (2019).
14. Oliveira, R. M., Smith, P. G., Netto, J. C. A., Zicker, E. M. S. & Zicker, F. Physical Activity, Opportunity for Reinfection, and Sibling History of Heart Disease as Risk Factors for Chagas' Cardiopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **43**, 498–505 (1990).
15. Cunha-Neto, E. & Chevillard, C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. *Mediators Inflamm.* **2014**, 1–11 (2014).
16. Acosta-Herrera, M., Strauss, M., Casares-Marfil, D. & Martín, J. Genomic medicine

- in Chagas disease. *Acta Trop.* **197**, 105062 (2019).
17. Deng, X. *et al.* Genome Wide Association Study (GWAS) of Chagas Cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* Seropositive Subjects. *PLoS ONE* **8**, e79629 (2013).
 18. Casares-Marfil, D. *et al.* A Genome-Wide Association Study Identifies Novel Susceptibility *loci* in Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Clin. Infect. Dis.* **73**, 672–679 (2021).
 19. Albareda, M. C. *et al.* Perturbed T Cell IL-7 Receptor Signaling in Chronic Chagas Disease. *J. Immunol.* **194**, 3883–3889 (2015).
 20. Heusch, G. *et al.* STAT5 Activation and Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning in Humans. *Circ. Res.* **110**, 111–115 (2012).
 21. Kitada, S. *et al.* BATF2 inhibits immunopathological Th17 responses by suppressing *Il23a* expression during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* **214**, 1313–1331 (2017).
 22. Yang, J., Villar, V. A. M., Rozyyev, S., Jose, P. A. & Zeng, C. The emerging role of sorting nexins in cardiovascular diseases. *Clin. Sci.* **133**, 723–737 (2019).
 23. Sabino, E. C. *et al.* Genome-wide association study for Chagas Cardiomyopathy identify a new risk locus on chromosome 18 associated with an immune-related protein and transcriptional signature. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **16**, e0010725 (2022).
 24. Ouarhache, M. *et al.* Rare Pathogenic Variants in Mitochondrial and Inflammation-Associated Genes May Lead to Inflammatory Cardiomyopathy in Chagas Disease. *J. Clin. Immunol.* **41**, 1048–1063 (2021).
 25. Davidson, M. *et al.* Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **39**, 133–147 (2005).
 26. Rosenstock, T. R., Carvalho, A. C. P., Jurkiewicz, A., Frussa-Filho, R. & Smaili, S. S. Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.* **88**, 1220–1228 (2004).
 27. Carvalho, A. C. P. *et al.* Bax affects intracellular Ca²⁺ stores and induces Ca²⁺ wave propagation. *Cell Death Differ.* **11**, 1265–1276 (2004).
 28. Naia, L. *et al.* Activation of IGF-1 and Insulin Signaling Pathways Ameliorate Mitochondrial Function and Energy Metabolism in Huntington's Disease Human Lymphoblasts. *Mol. Neurobiol.* **51**, 331–348 (2015).
 29. E Silva, L. F. S., Brito, M. D., Yuzawa, J. M. C. & Rosenstock, T. R. Mitochondrial Dysfunction and Changes in High-Energy Compounds in Different Cellular Models Associated to Hypoxia: Implication to Schizophrenia. *Sci. Rep.* **9**, 18049 (2019).
 30. E Silva, L. F. S. *et al.* Sirtuins Modulators Counteract Mitochondrial Dysfunction in Cellular Models of Hypoxia: Relevance to Schizophrenia. *Neuroscience* **524**, 269–284 (2023).
 31. Rosenstock, T. R. *et al.* Glutamate-induced alterations in Ca²⁺ signaling are modulated by mitochondrial Ca²⁺ handling capacity in brain slices of R6/1 transgenic mice: Calcium and mitochondrial dysfunction in R6/1 mice. *Eur. J. Neurosci.* **32**, 60–70 (2010).
 32. Fang, J. *et al.* Protein instability and functional defects caused by mutations of dihydro-orotate dehydrogenase in Miller syndrome patients. *Biosci. Rep.* **32**, 631–639 (2012).
 33. Toivonen, J. M. *et al.* *technical knockout*, a *Drosophila* Model of Mitochondrial Deafness. *Genetics* **159**, 241–254 (2001).
 34. Lyamzaev, K. G. *et al.* Induction of autophagy by depolarization of mitochondria. *Autophagy* **14**, 921–924 (2018).
 35. Kobayashi, S. *et al.* Mitochondrial Fission and Mitophagy Coordinately Restrict High Glucose Toxicity in Cardiomyocytes. *Front. Physiol.* **11**, 604069 (2020).
 36. Fu, T. *et al.* Mitophagy as a mitochondrial quality control mechanism in myocardial ischemic stress: from bench to bedside. *Cell Stress Chaperones* **28**, 239–251 (2023).
 37. Liu, C. *et al.* Myocardial injury: where inflammation and autophagy meet. *Burns Trauma* **11**, tkac062 (2023).

38. Wang, X., Guo, Z., Ding, Z. & Mehta, J. L. Inflammation, Autophagy, and Apoptosis After Myocardial Infarction. *J. Am. Heart Assoc.* **7**, e008024 (2018).
39. Kanamori, H. *et al.* The role of autophagy emerging in postinfarction cardiac remodelling. *Cardiovasc. Res.* **91**, 330–339 (2011).
40. Qiao, Y. *et al.* Capsaicin protects cardiomyocytes against lipopolysaccharide-induced damage via 14-3-3 γ -mediated autophagy augmentation. *Front. Pharmacol.* **12**, 659015 (2021).
41. Swain, J. L. *et al.* Derangements in myocardial purine and pyrimidine nucleotide metabolism in patients with coronary artery disease and left ventricular hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 655–659 (1982).
42. Golan, O. *et al.* Extracellular nucleotide derivatives protect cardiomyocytes against hypoxic stress. *Biochem. Pharmacol.* **81**, 1219–1227 (2011).
43. Arroyo, J. D. *et al.* A Genome-wide CRISPR Death Screen Identifies Genes Essential for Oxidative Phosphorylation. *Cell Metab.* **24**, 875–885 (2016).
44. Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **41**, 211–218 (2016).
45. Courtney, R. *et al.* Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol. Biol. Rep.* **42**, 841–851 (2015).
46. Silva, M. C. *et al.* Canonical PI3K γ signaling in myeloid cells restricts *Trypanosoma cruzi* infection and dampens chagasic myocarditis. *Nat. Commun.* **9**, 1513 (2018).

Table 1: Description of the guide RNA and ultramer sequences that we used for CRISPR/Cas9 gene editing.

Variants	Guide RNA	PAM sequence	Ultramer 1	Ultramer 2
DHODH rs201230446	CAGAGTCTTCGCCTCCCTG	AGG	AAGTGTGACTCCAAAACCTCAGGA AGGAAACCCTAGACCCAGAGTCTT CTGCCTCCCTGAGAACCAAGCTGT CATT AACAGGTAGGTGAGCGGCC AGAG	CTCTGGCCGCTCACCTACCTGTT AATGACAGCTTGGTTCAGGGA GGCAGAAGACTCTGGGTCTAGG GTTTCCTCCTGAGGTTTTGGAGT CACACTT
RPUSD3 rs142984515	TACATGTGGTCCCAAGCAC	AGG	TCTCCAGTCAACTACAGGTGCACA TGGTACTACAGCTCTGCCTTGCT TAGGGACCACATGTA CTCTGCCCG TGTGGCACTGCCTGGGCCAGCG ATT	AATCGCTGGCCAGGACAGTGCC CACACGGGCAGAGTACATGTGGT CCCTAAGCACAAGGCAGAGCTGT AGTACCATGTGCACCTGTAGTTG ACTGGAGA
UMPS rs17843776	GGAGCGGGTGAGGAGGACAC	GGG	CGGGTCTGTACGACGTGCAGGCTT TCAAGTTTGGGGACTTCGTGCTGA AGGGCGGGCTTCTCCCCATCT ACATCGATCTGCGGGGCATCGTGT CTCGA	TCGAGACACGATGCCCCGAGAT CGATGTAGATGGGGAGGAAAG CCCCCCTT CAGCACGAAGTCCCC AAACTTGA AAGCCTGCACGTCGT ACAGACCCG

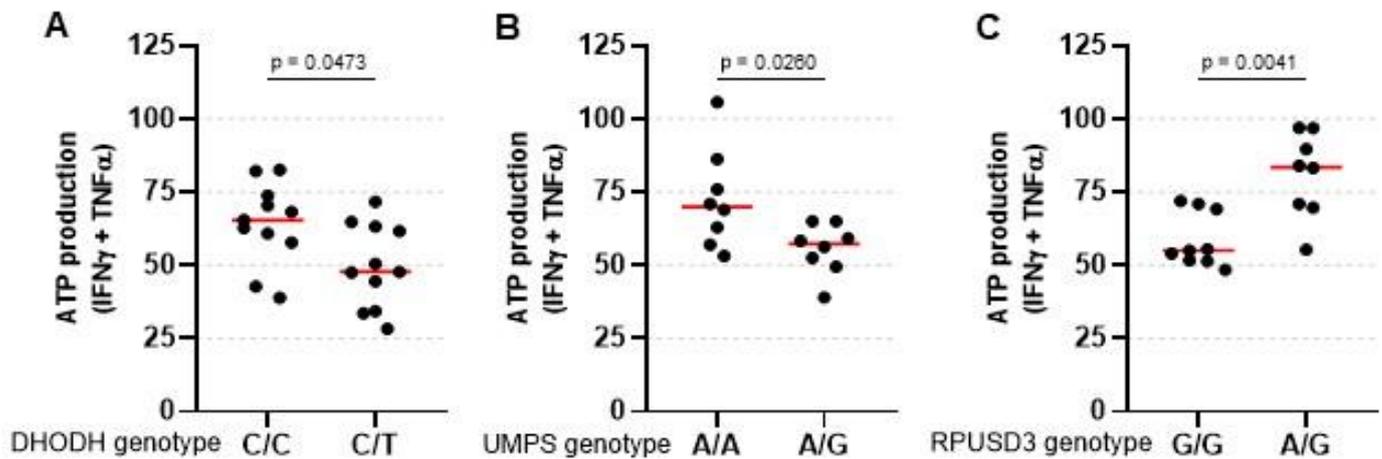


Figure 1. Effect of IFN- γ and TNF- α on ATP production of CRISPR/cas9-edited AC16 clones. The AC16 clones were generated by CRISPR/cas9 using specific guide RNAs for the introduction of the heterozygous single nucleotide polymorphisms in **(A)** DHODH rs201230446C/T, **(B)** UMPS rs17843776A/G and **(C)** RPUSD3 rs142984515A/G. Then, both wild-type and heterozygous clones were co-stimulated for 48 hours with 10 ng/ml of IFN- γ and 5 ng/ml of TNF- α to assess the impact of the cytokines and the genotype in ATP production. The total ATP was quantified using the CellTiter-Glo 2.0 luciferase-based assay by luminescence and the amount of ATP in μ M was normalized by μ g of protein. Each dot represents an independent experiment.

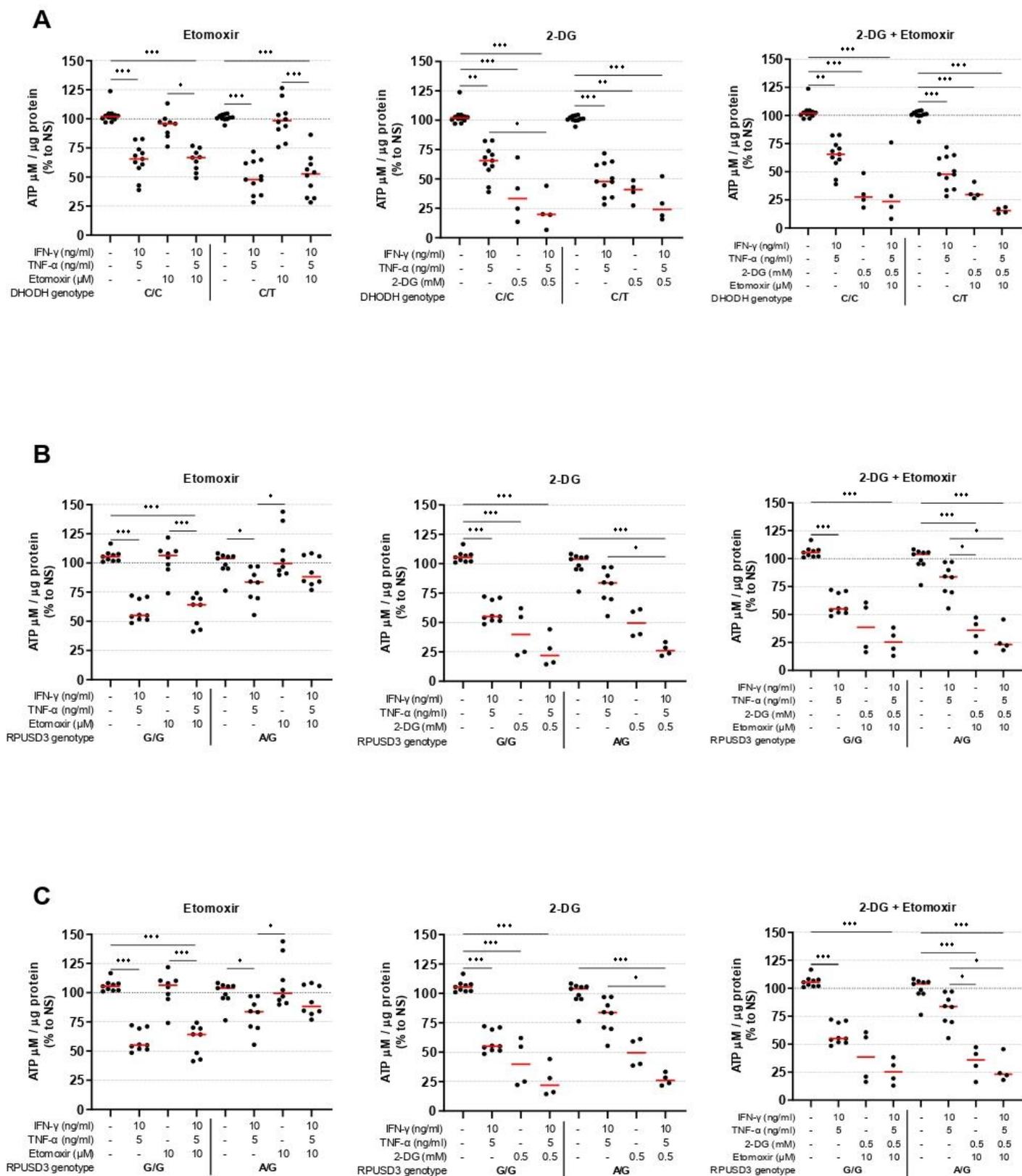
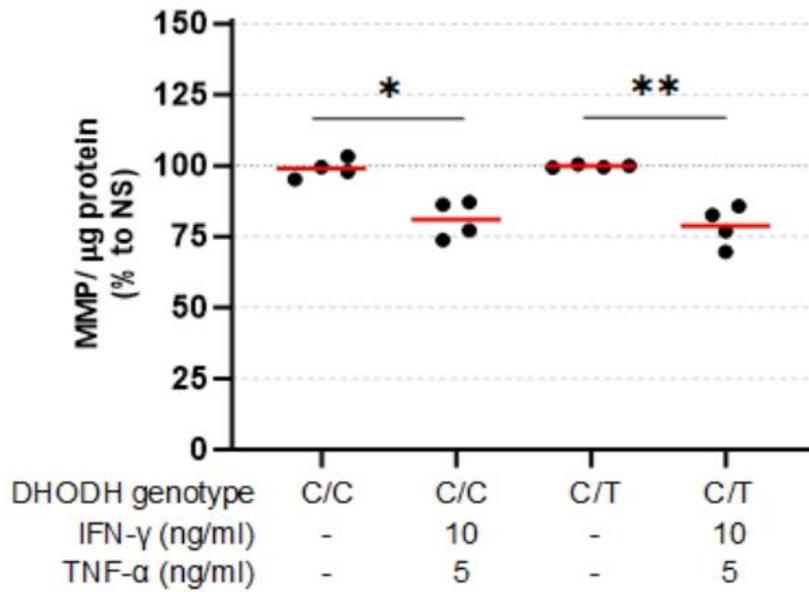


Figure 2. Quantification of ATP in CRISPR/cas9-edited AC16 cardiomyocytes with inhibitors of fatty-acid oxidation and glycolysis. AC16 clones for (A) DHODH, (B) UMPS and (C) RPUSD3 were co-stimulated for 48 hours with 10 ng/ml of IFN-γ and 5 ng/ml of TNF-α with or without 10 mM of etomoxir (inhibitor of fatty acid oxidation) and/or 500 μM of 2-DG (inhibitor of glycolysis). The total ATP was quantified using the CellTiter-Glo 2.0 luciferase-based assay by luminescence and the amount of ATP in μM was normalized by μg of protein. Each dot represents an independent experiment. For Kruskal-Wallis tests, we are reporting uncorrected Dunn's multiple comparisons test *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

A



B

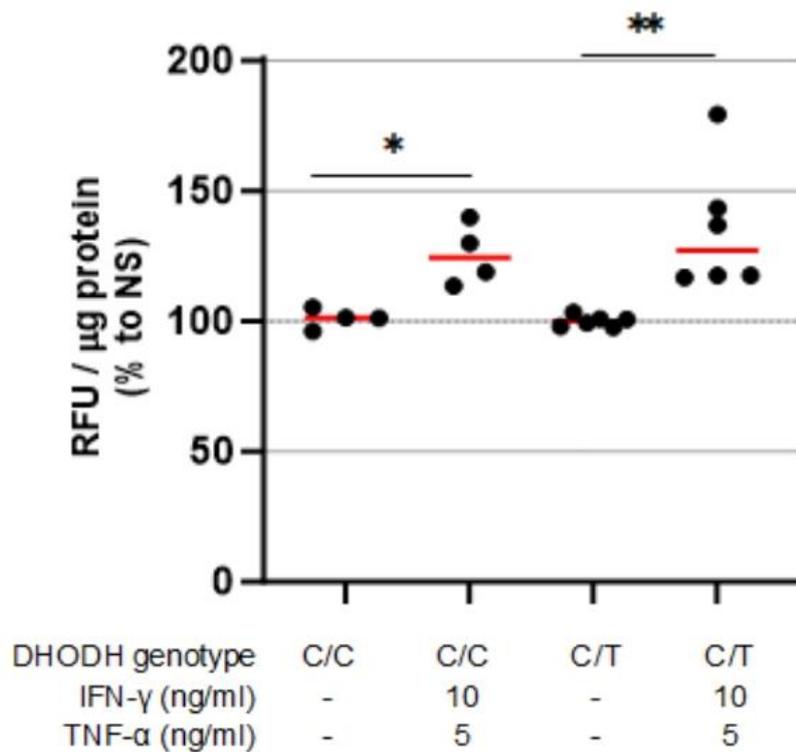
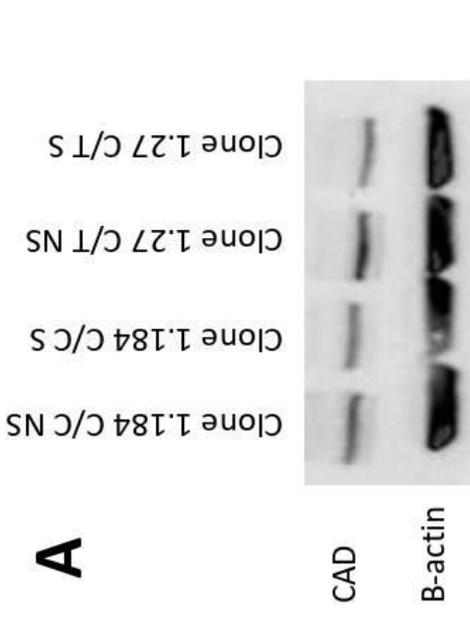
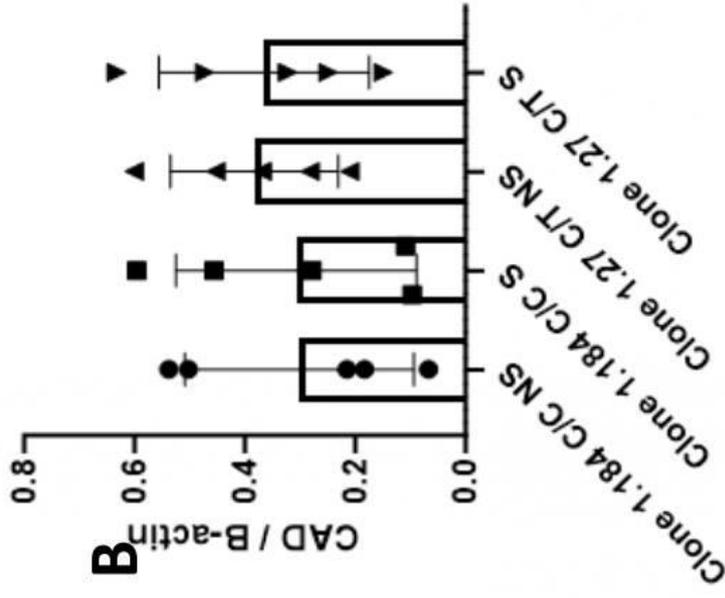
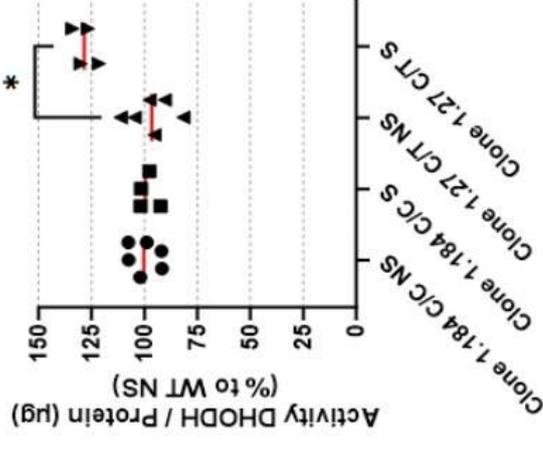


Figure 3. Effect of IFN- γ and TNF- α stimulation on mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species (ROS) production in DHODH CRISPR/cas9-edited AC16 clones. The AC16 clones were generated by CRISPR/cas9 using specific guide RNAs for the introduction of the DHODH heterozygous single nucleotide polymorphism. Then, both wild-type and heterozygous clones were co-stimulated for 48 hours with 10 ng/ml of IFN- γ and 5 ng/ml of TNF- α to assess the impact of the cytokines and the genotype on mitochondrial membrane potential (A), reactive oxygen species (ROS) production (B). Each dot represents an independent experiment. For Kruskal-Wallis tests, we are reporting uncorrected Dunn's multiple comparisons test * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.



C DHODH western blot
(In progres)



D DHODH enzyme quantification
(In progres)

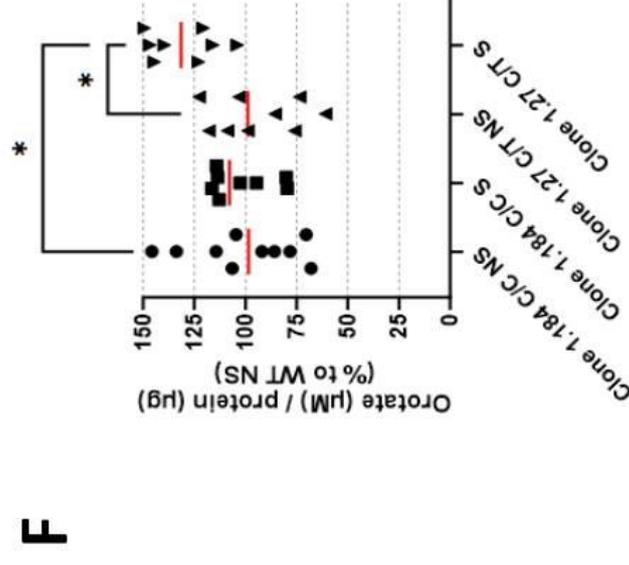
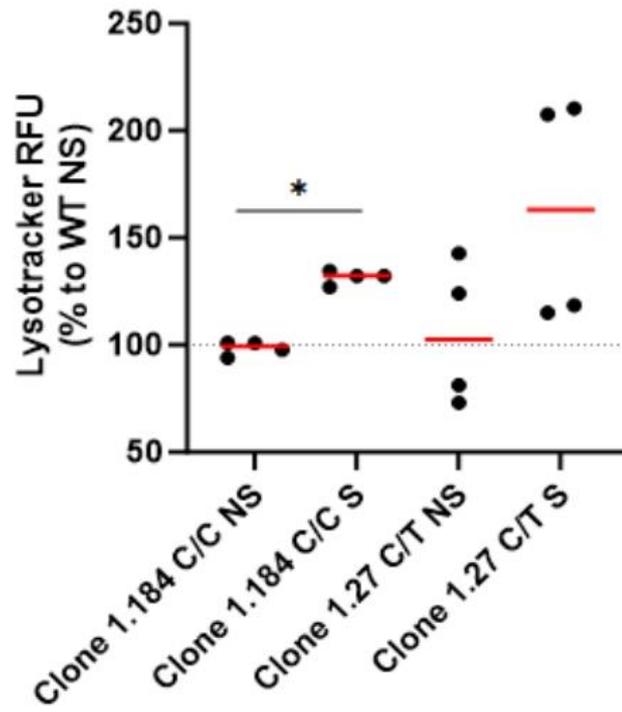


Figure 4. Effect of IFN- γ and TNF- α stimulation on the DHODH CRISPR/cas9-edited AC16 clones. On DHODH CRISPR/cas9-edited AC16 clones clones a quantification of the Carbamoyl phosphate synthase–aspartate transcarbamoylase-dihydroorotate (CAD) (**A**, **B**) and DHODH enzymes were done (**C**, **D**). With or without cytokine stimulation, we also quantify the DHODH enzyme activity (**E**) and the orotate production (**F**). Each dot represents an independent experiment. For Kruskal-Wallis tests, we are reporting uncorrected Dunn's multiple comparisons test * $p < 0.05$.

A



B

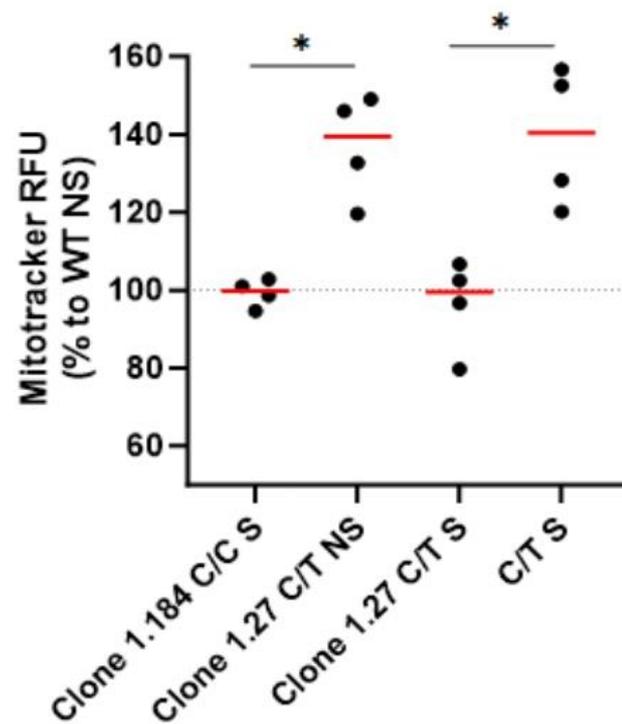


Figure 5. Effect of IFN- γ and TNF- α stimulation on mitochondrial and lysosomal mass in DHODH CRISPR/cas9-edited AC16 clones. Both wild-type and heterozygous clones were co-stimulated for 48 hours with 10 ng/ml of IFN- γ and 5 ng/ml of TNF- α to observe the effect of genotype and stimulation on lysosome mass (A) and mitochondrial mass (B). Each dot represents an independent experiment. For Kruskal-Wallis tests, we are reporting uncorrected Dunn's multiple comparisons test * $p < 0.05$.

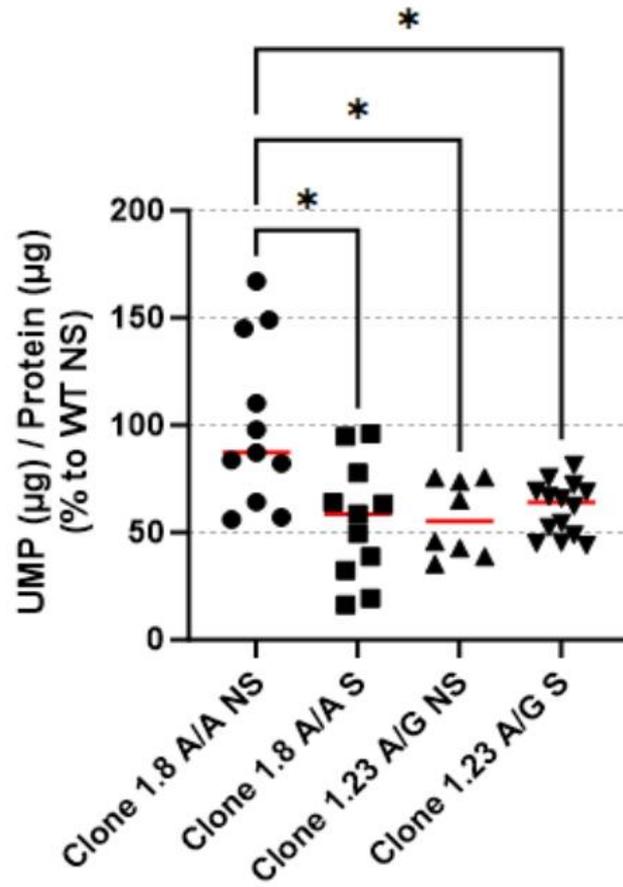
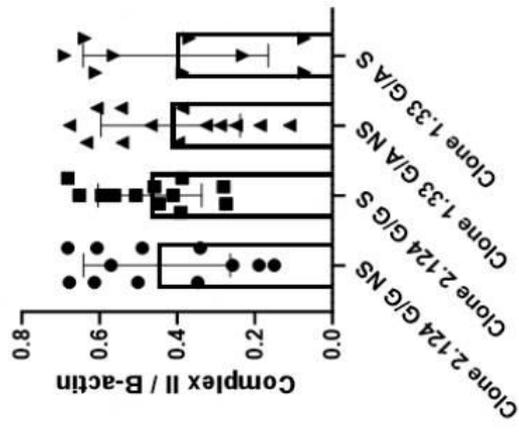
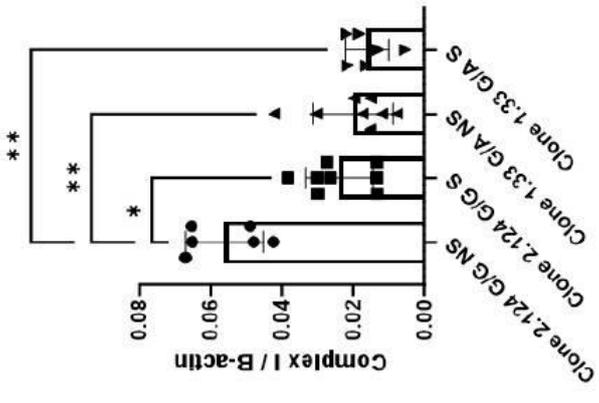
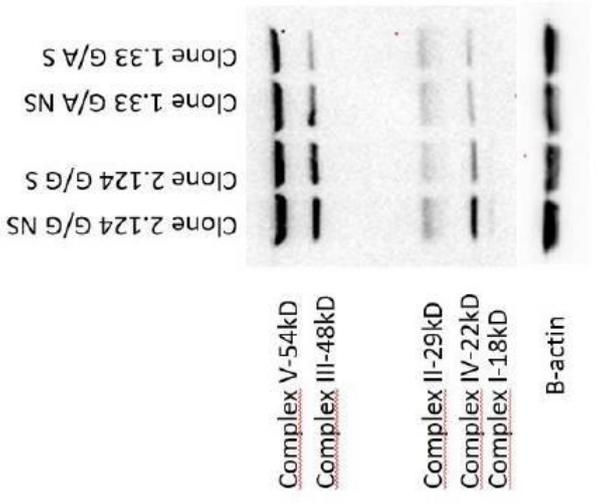


Figure 6. UMP quantification on UMPS CRISPR/cas9-edited AC16 clones. UMP concentration has been measured by luminescence with UMP/CMP-Glo Glycosyltransferase Assay on each clone with or without cytokine stimulation. Each dot represents an independent experiment. Statistical test: Kruskal-Wallis test * $p < 0.05$.

A Western Blot **B** OXPHOS complex I **C** OXPHOS complex II



D OXPHOS complex III **E** OXPHOS complex IV **F** OXPHOS complex V

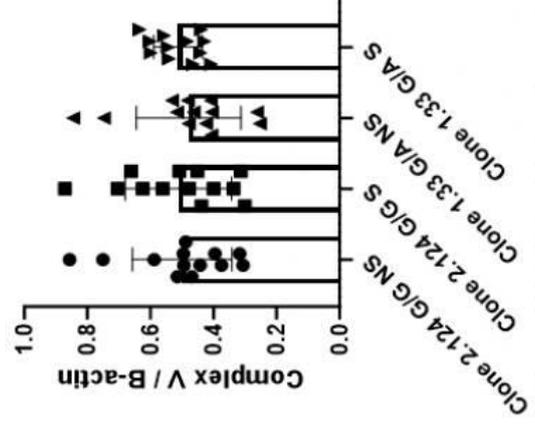
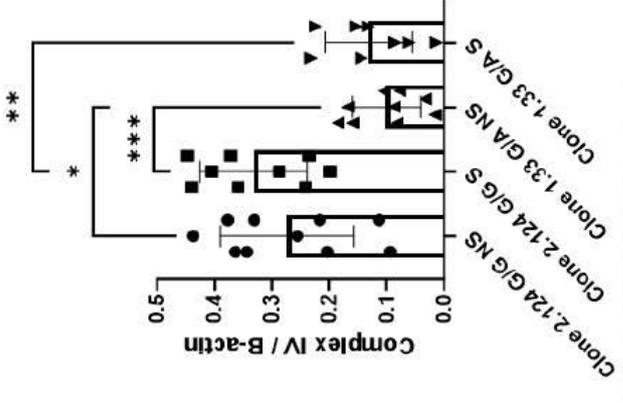
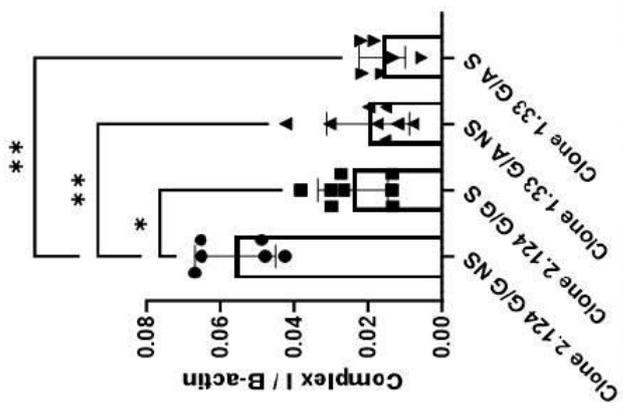


Figure 7: OXPHOS Complex quantification on the RPUSD3 CRISPR/Cas9 clones with or without stimulation. Western blot using an OXPHOS Human Antibody Cocktail (A). Relative quantification of the OXPHOS complexes: B) complex I, C) complex II, D) complex III, E) complex IV and F) complex V. Statistical test: Kruskal-Wallis test *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

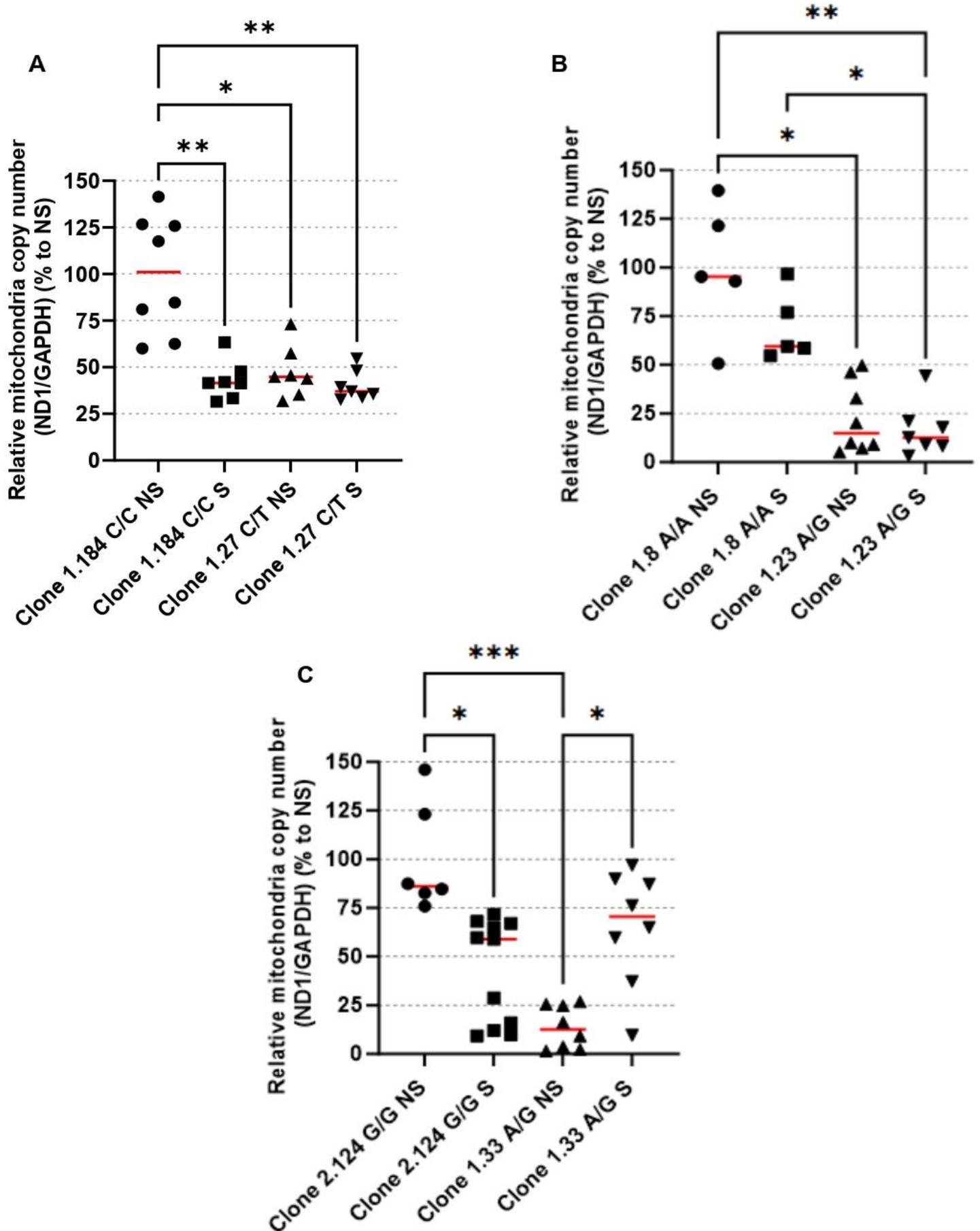
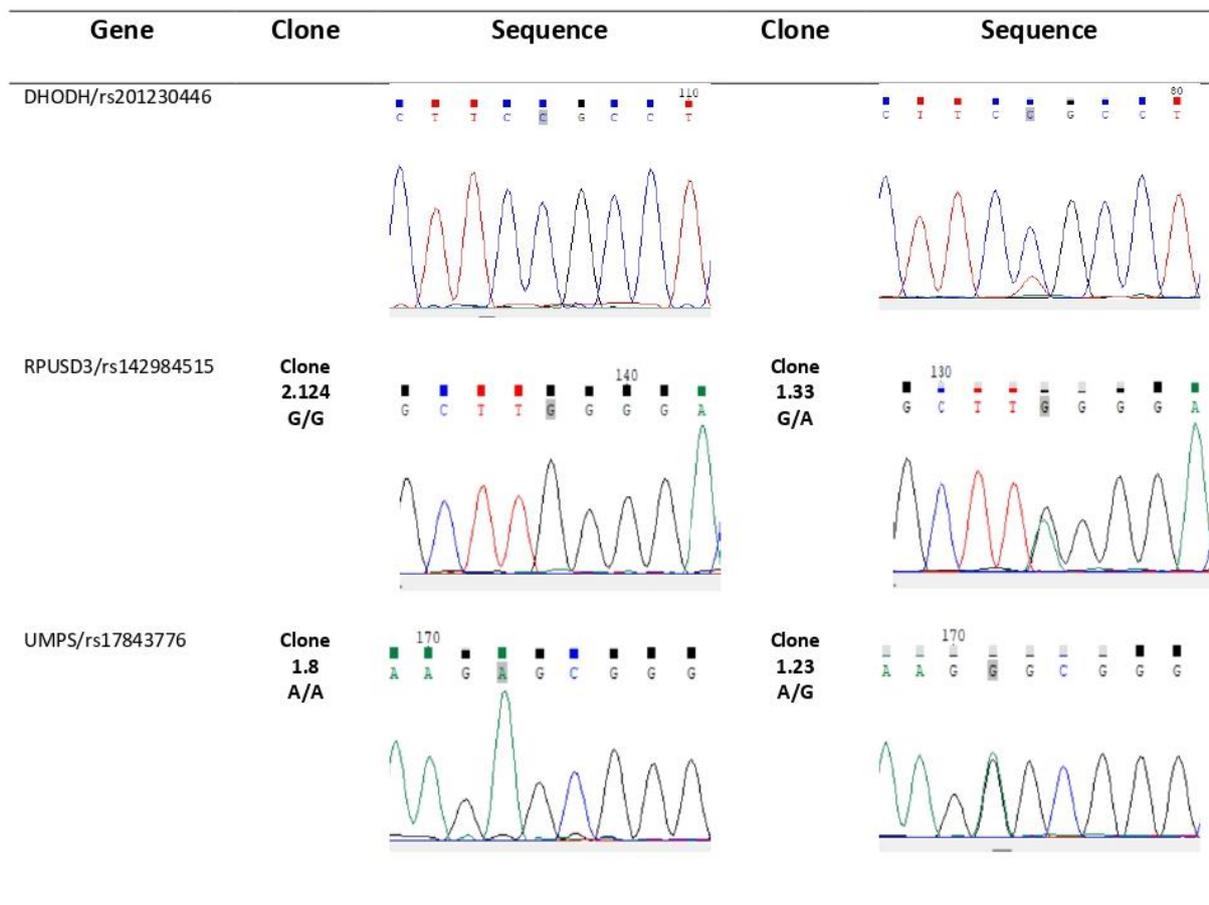


Figure 8. Mitochondrial DNA quantification in CRISPR/cas9-edited clones. We performed qPCR with primers for mitochondrial encoded genes NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit 1 (MT-ND1) and endogenous nuclear-encoded control gene Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The relative quantification of mitochondrial DNA was calculated by determining the $\Delta C_t = C_t(\text{endogenous nuclear-encoded control gene}) - C_t(\text{mitochondrial encoded genes})$ and then using the formula $2^{2\Delta C_t}$. AC16 clones for **(A)** DHODH, **(B)** UMPS and **(C)** RPUSD3 were co-stimulated for 48 hours with 10 ng/ml of IFN- γ and 5 ng/ml of TNF- α . For Kruskal-Wallis tests, we are reporting uncorrected Dunn's multiple comparisons test * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Supplementary table I: Sequences of the primers used for CRISPR/Cas9 clone screening.

Gene / variants	Primers	Sequences
DHODH / rs201230446	DHODH-F DHODH-R	TTGCTGCAGGATTTGACAAG ATGCCTGGGGCACATAGTAG
RPUSD3 / rs142984515	RPUSD3-F RPUSD3-R	GATCTGAGAAAGGGGGTGGT ACAGATAAGGTCTGGAGATGCTG
UMPS / rs17843776	UMPS-F UMPS-R	GGGAAAGCTGCAGACGAG ACTCCTGTCACCCTCTCCAT

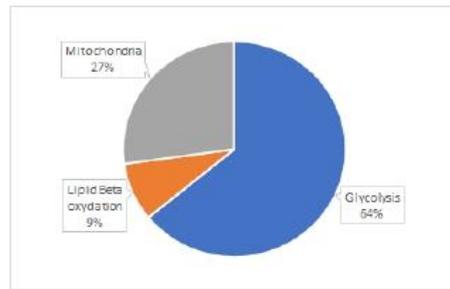


Supplementary figure 1: Results of the Sanger sequencing on CRISPR/Cas9 clones.

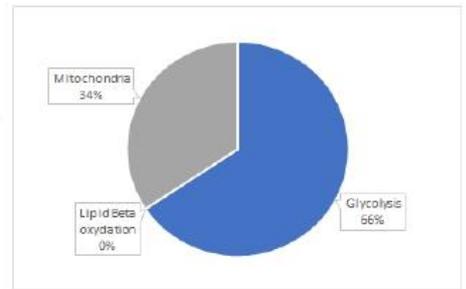
Without stimulation

With stimulation

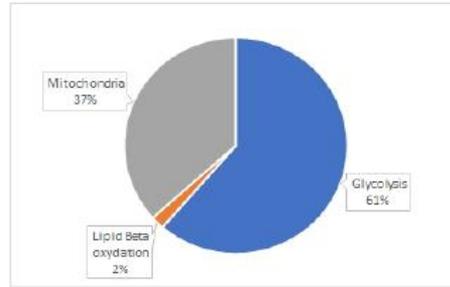
DHODH
rs201230446C/C clone



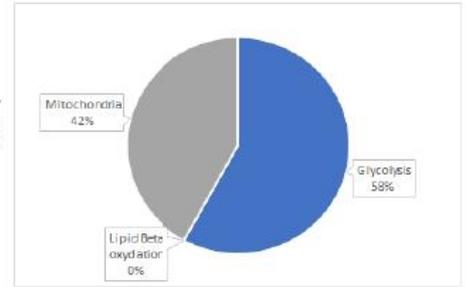
→
-34,5%



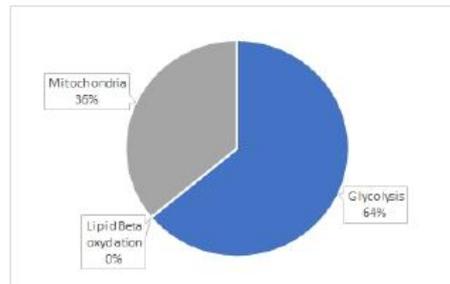
DHODH
rs201230446C/T clone



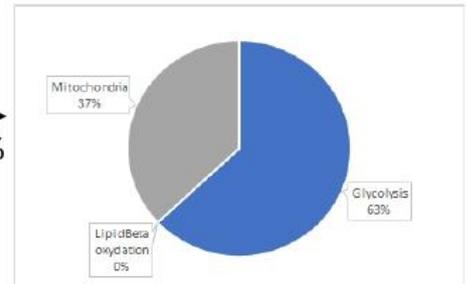
→
-52,3%



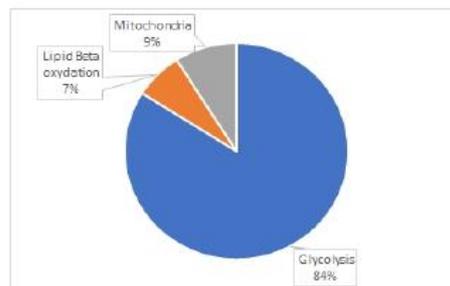
UMPS
rs17843776A/A clone



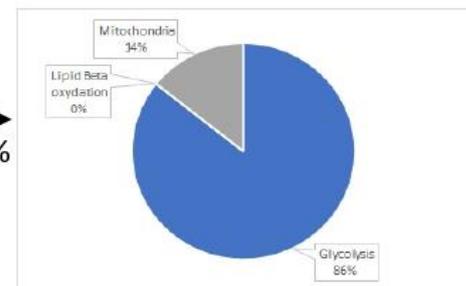
→
-30,0%



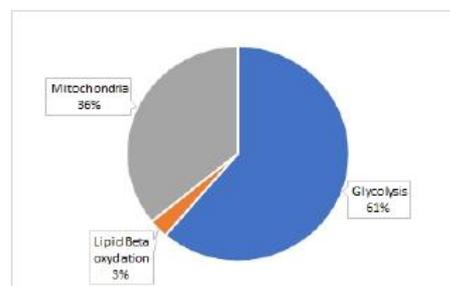
UMPS
rs17843776A/G clone



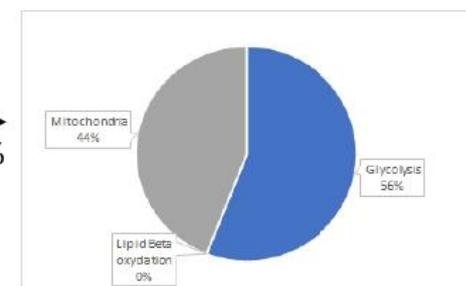
→
-42,8%



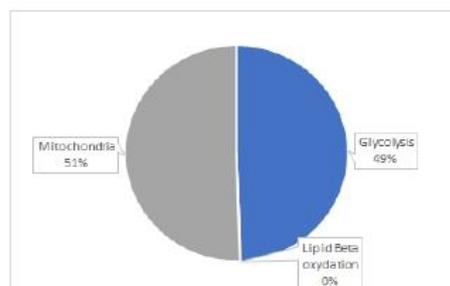
RPUSD3
rs142984515G/G clone



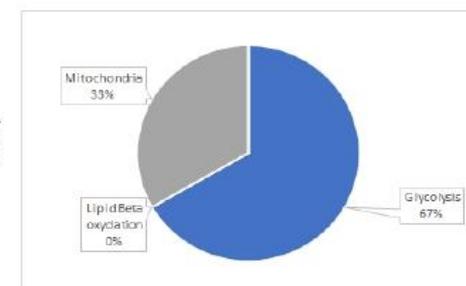
→
-45,0%



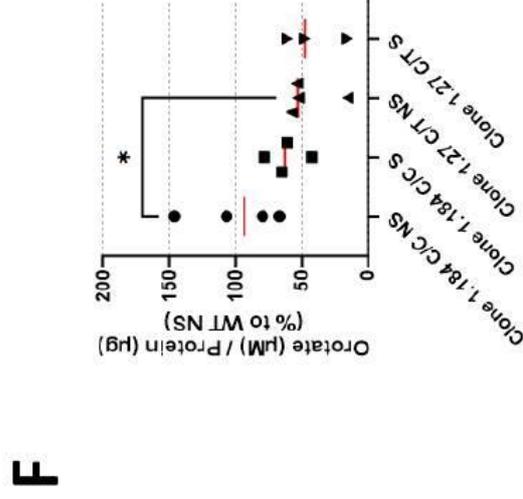
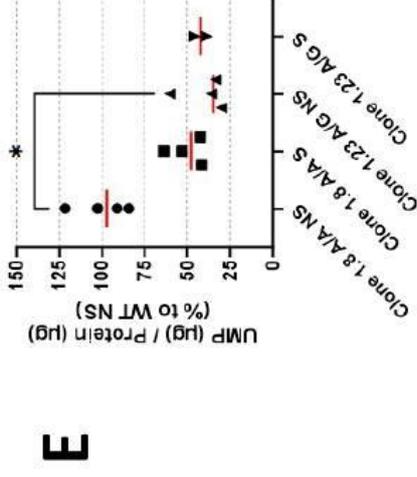
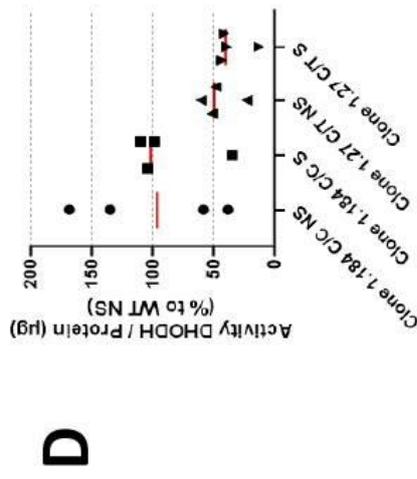
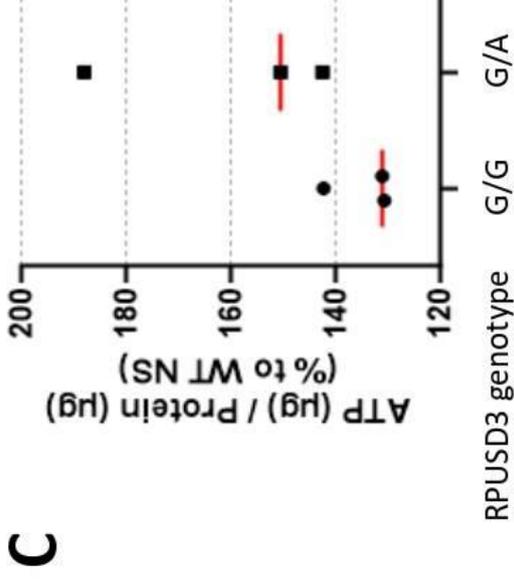
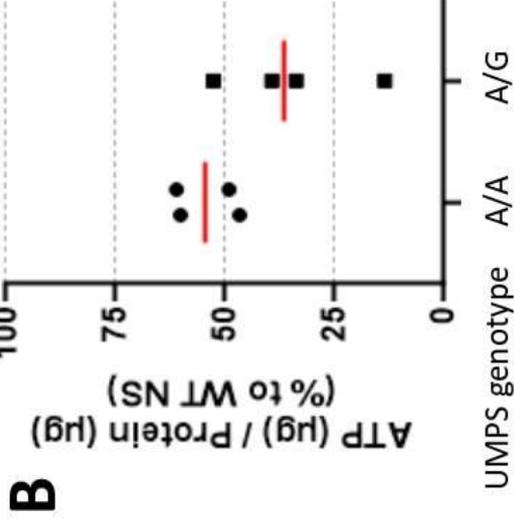
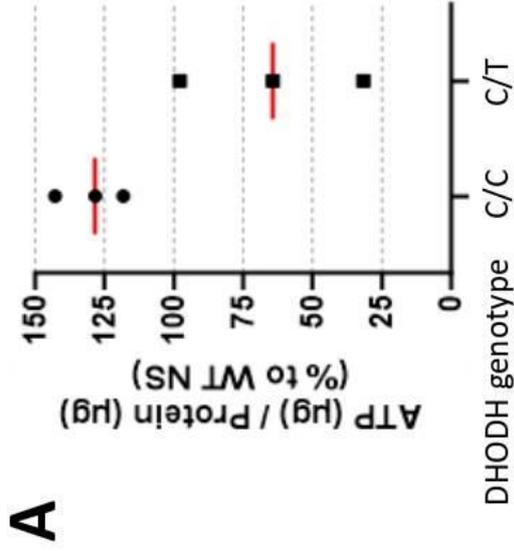
RPUSD3
rs142984515A/G clone



→
-12,5%



Supplementary figure 2: Determination of ATP source as a function of stimulation, mutation of interest and genotype.



Supplementary figure 3. Functional Assays performed on isolated mitochondria obtained from CRISPR/cas9-edited AC16 clones. Mitochondria were isolated from our CRISPR/cas9 edited AC16 clones maintained with or without cytokine stimulation. The total ATP was quantified using the CellTiter-Glo 2.0 luciferase-based assay by luminescence and the amount of ATP in μM was normalized by μg of protein on stimulated clones **A)** DHODH rs201230446C/T clones, **B)** UMPS rs17843776A/G clones and **C)** RPUSD3 rs142984515A/G clones. On DHODH rs201230446C/T clones, we also quantify the DHODH enzyme activity **(D)** and the orotate production **(F)**. On UMPS rs17843776A/G clones, we quantify the UMP concentration by luminescence with UMP/CMP-Glo Glycosyltransferase Assay **(E)**.

VI. La mise en évidence de variants génétiques associées aux formes digestives graves de la maladie de Chagas.

Article 6: Chagas Disease Megaesophagus Patients Carrying Variant MRPS18B P260A Display Nitro-Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Response to IFN- γ Stimulus.

Karla Deysiree Alcântara Silva, João Paulo Silva Nunes, **Pauline Andrieux**, Pauline Brochet, Rafael Ribeiro Almeida, Andréia Cristina Kazue Kuramoto Takara, Natalia Bueno Pereira, Laurent Abel, Aurelie Cobat, Ricardo Costa Fernandes Zaniratto, Débora Levy, Sergio Paulo Bydlowski, Ivan Ceconello, Francisco Carlos Bernal da Costa Seguro, Jorge Kalil, Christophe Chevillard, Edecio Cunha-Neto

Article publié dans Biomedicines en septembre 2022.

Présentation de la publication :

La maladie de Chagas (CD), causée par le parasite protozoaire *Trypanosoma cruzi*, touche 6 millions de personnes et environ 1/3 développent une maladie cardiaque chronique (CCC) ou digestive (mégaesophage/mégacolon), tandis que la majorité reste asymptomatique, sous forme indéterminée de la maladie de Chagas (ASY). La plupart des cas de CCC dans les familles avec de multiples patients atteints par la maladie de Chagas portent des mutations nocives dans les gènes mitochondriaux. Il est intéressant de noter que 30 à 40 % des cas de maladies mitochondriales progressent vers une cardiomyopathie, des troubles de la conduction cardiaque et des arythmies sévères et 15 % vers les troubles de la motilité digestive, y compris le mégacolon et le mégaesophage avec dénervation des plexus nerveux myentériques, et les troubles du système nerveux autonome. La similitude dans la nature et la prévalence de l'implication du système nerveux cardiaque, digestif et autonome dans les mitochondriopathies et celles observées dans l'évolution de la maladie de Chagas suggère que les variants génétiques pathogènes hétérozygotes, qui provoquent une réduction partielle de la fonction mitochondriale, peuvent jouer un rôle dans l'évolution différentielle de la maladie de Chagas, à la fois pour le CCC et pour les formes digestives.

Nous avons donc cherché des mutations exoniques associées au mégaesophage chagastique (CME) dans des gènes essentiels aux processus mitochondriaux. Nous avons réalisé un séquençage de l'exome entier de 13 patients atteints de CME et de 37 patients atteints d'ASY. Nous avons mis en évidence deux variants *MRPS18B* (rs34315095C/G) et *FAM185A* (rs201667800T/G) qui étaient plus fréquents chez les patients CME. Le gène *MRPS18B* code pour une protéine de la sous-unité 28S qui appartient à la petite sous-unité du ribosome mitochondrial. Nous disposons de peu d'informations fonctionnelles sur le gène *FAM185A* et c'est pour cette raison que nous avons décidé de nous concentrer sur le gène *MRPS18B*. Ce gène est présent chez cinq des 13 patients atteints de CME (l'un d'entre eux étant homozygote ; 38,4%), alors que le variant apparaissait chez un des 37 patients atteints d'ASY (2,2%).

Afin d'étudier si les patients portant le variant 688C > G *MRPS18B* sont plus sensibles aux effets nocifs de l'IFN- γ que les patients porteurs du génotype de type sauvage (C/C), nous avons réalisé des tests fonctionnels chez des cellules lymphoblastiques B immortalisées

par le virus d'Epstein-Barr (EBV-LCL) dérivés de patients atteints de CME (hétérozygotes (C/G) et homozygotes (G/G)) et des patients porteurs du génotypes sauvage (C/C).

Nous avons quantifié le mtROS, le nitrite, les protéines de nitrate et la synthèse de l'ATP dans les cellules non stimulées et stimulées par l'IFN (25 ng/mL). Nous avons découvert que les individus porteurs de la mutation présentaient une augmentation des taux de nitrite et de protéines nitrées. En outre, le patient CME homozygote (G/G) a également montré une augmentation du superoxyde mitochondrial et des niveaux réduits de production d'ATP. Les résultats suggèrent que les mutations mitochondriales pathogènes peuvent contribuer au stress nitro-oxydant induit par les cytokines et au dysfonctionnement mitochondrial. Nous émettons l'hypothèse que, chez les porteurs de mutation, l'IFN- γ produit dans le plexus myentérique de l'œsophage pourrait provoquer un stress nitro-oxydatif et un dysfonctionnement mitochondrial dans les neurones, contribuant au mégaoesophage.

Dans cet article j'ai pu mettre en forme les tableaux de résultats bruts, j'ai également annoté les variants sur leur pathogénicité grâce à des bases de données. J'ai également contribué à la rédaction de l'article.



Article

Chagas Disease Megaesophagus Patients Carrying Variant *MRPS18B* P260A Display Nitro-Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Response to IFN- γ Stimulus

Karla Deysiree Alcântara Silva ^{1,2,3,†} , João Paulo Silva Nunes ^{1,2,3,4,†} , Pauline Andrieux ⁴, Pauline Brochet ⁴ , Rafael Ribeiro Almeida ^{1,3}, Andréia Cristina Kazue Kuramoto Takara ^{1,3}, Natalia Bueno Pereira ^{1,2}, Laurent Abel ^{5,6,7}, Aurelie Cobat ^{5,6,7}, Ricardo Costa Fernandes Zaniratto ¹ , Débora Levy ¹ , Sergio Paulo Bydlowski ¹ , Ivan Ceconello ⁸, Francisco Carlos Bernal da Costa Seguro ⁸, Jorge Kalil ^{1,2,3}, Christophe Chevillard ^{4,*} and Edecio Cunha-Neto ^{1,2,3,*}

¹ Laboratory of Immunology, Heart Institute (Incor) Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 05403-900, Brazil

² Division of Clinical Immunology and Allergy, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 05403-000, Brazil

³ Institute for Investigation in Immunology/INCT, São Paulo 05403-900, Brazil

⁴ Institut MarMaRa, INSERM, UMR_1090, Aix Marseille Université, TAGC Theories and Approaches of Genomic Complexity, 13288 Marseille, France

⁵ Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, INSERM U1163, Necker Hospital for Sick Children, 75015 Paris, France

⁶ Imagine Institute, University of Paris, 75015 Paris, France

⁷ St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, The Rockefeller University, New York, NY 10065, USA

⁸ Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 05403-900, Brazil

* Correspondence: christophe.chevillard@univ-amu.fr (C.C.); edecunha@gmail.com (E.C.-N.)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Silva, K.D.A.; Nunes, J.P.S.; Andrieux, P.; Brochet, P.; Almeida, R.R.; Kuramoto Takara, A.C.K.; Pereira, N.B.; Abel, L.; Cobat, A.; Zaniratto, R.C.F.; et al. Chagas Disease Megaesophagus Patients Carrying Variant *MRPS18B* P260A Display Nitro-Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Response to IFN- γ Stimulus. *Biomedicines* **2022**, *10*, 2215. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092215>

Academic Editor: Marie-Pierre Golinelli-Cohen

Received: 1 August 2022

Accepted: 1 September 2022

Published: 7 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Chagas disease (CD), caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affects 8 million people, and around 1/3 develop chronic cardiac (CCC) or digestive disease (megaesophagus/megacolon), while the majority remain asymptomatic, in the indeterminate form of Chagas disease (ASY). Most CCC cases in families with multiple Chagas disease patients carry damaging mutations in mitochondrial genes. We searched for exonic mutations associated to chagasic megaesophagus (CME) in genes essential to mitochondrial processes. We performed whole exome sequencing of 13 CME and 45 ASY patients. We found the damaging variant *MRPS18B* 688C > G P230A, in five out of the 13 CME patients (one of them being homozygous; 38.4%), while the variant appeared in one out of 45 ASY patients (2.2%). We analyzed the interferon (IFN)- γ -induced nitro-oxidative stress and mitochondrial function of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. We found the CME carriers of the mutation displayed increased levels of nitrite and nitrated proteins; in addition, the homozygous (G/G) CME patient also showed increased mitochondrial superoxide and reduced levels of ATP production. The results suggest that pathogenic mitochondrial mutations may contribute to cytokine-induced nitro-oxidative stress and mitochondrial dysfunction. We hypothesize that, in mutation carriers, IFN- γ produced in the esophageal myenteric plexus might cause nitro-oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons, contributing to megaesophagus.

Keywords: chagasic megaesophagus; mitochondria; mitochondrial mutation; mitochondrial dysfunction; interferon-gamma; *MRPS18B*; Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*

1. Introduction

Chagas disease is caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* and the transmission occurs through the bite of triatomine vectors [1]. Patients infected with *T. cruzi*

develop acute and chronic forms of the disease. The acute phase is characterized by high parasitemia and increased production of the pro-inflammatory cytokine interferon-gamma (IFN- γ) [2]. In the chronic phase, a proportion of the infected patients remain asymptomatic, without cardiac or digestive damage—in the so-called indeterminate form of Chagas disease (ASY)—while 30% of patients end up developing serious damage to the heart—chronic Chagas cardiomyopathy (CCC)—associated with heart failure, cardiac electrical conduction disorders and cardiac arrhythmias [3]. About 10% of patients develop digestive tract motility disorders, most often dilatations in the esophagus and colon (megaesophagus and megacolon, respectively). The digestive forms of Chagas disease cause a considerable decrease in quality of life, often requiring surgical intervention [4,5]. In both cases, there is degeneration of the myenteric plexuses and destruction of neurons that control the motility of that segment of the digestive tract [6].

The differential susceptibility of 30% of those infected by *T. cruzi* to evolution to CCC and 10% to digestive disease, while most patients remain in the indeterminate form, suggests the participation of host genetics. This possibility was reinforced by the finding of family aggregation of CCC cases [7]. More than 150 case–control studies on CCC have been published, studying common genetic polymorphisms in over 70 candidate genes, mainly related to the immune response [8]. Only two studies, however, evaluated genetic polymorphisms associated with digestive forms of Chagas disease, ficolin-2 [9] and HLA-G [10].

The scarcity of data highlights the importance of studying the genetic aspects of the digestive form of Chagas disease. Recent results from our group pioneered the use of the whole exome sequencing (WES) methodology to investigate rare genetic variants associated with CCC in families with multiple cases of Chagas disease [11]. We observed that, in each family, patients with CCC shared rare heterozygous, non-synonymous and pathogenic variants among them. Such genetic variants were absent from family members with ASY, without cardiac involvement. Of the 25 CCC specific pathogenic variants observed, 11 occurred in mitochondrial genes and 14 in inflammatory genes; CCC-specific mitochondrial gene variants were found in five out of the six families studied.

Mitochondria play a central role in energy supply, metabolic regulation and cell death in response to harmful stimuli [12]. Mitochondriopathies, caused by homozygous pathogenic variants in genes encoded in the nucleus and mitochondrial DNA, are the most common monogenic syndromes. They severely impair energy metabolism and cause mitochondrial dysfunction and functional deterioration in tissues with high metabolic demand, such as cardiac, skeletal muscle, nervous tissue and liver [13,14]. It is interesting to notice that 30–40% of cases of mitochondrial diseases progress to cardiomyopathy, cardiac conduction disorders and severe arrhythmias [15,16] and 15% for digestive motility disorders, including megacolon and megaesophagus with denervation of the myenteric nervous plexuses, and autonomic nervous system disorders [17,18]. The similarity in the nature and prevalence of cardiac, digestive and autonomic nervous system involvement in mitochondriopathies and those observed in the evolution of Chagas disease suggests that heterozygous pathogenic genetic variants, which cause a partial reduction in mitochondrial function, may play a role in the differential evolution of Chagas disease, both for CCC and for the digestive forms.

Studies show that inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α cause mitochondrial damage in several cell types [19,20]. IFN- γ and TNF- α , which are abundantly produced in Chagas disease in response to the perennial stimulus of *T. cruzi* [2,21,22], cause a reduction in oxidative metabolism, in the expression of energy metabolism enzymes, in the activity of lipid beta-oxidation and in the production of mitochondrial ATP, and reduction in the action of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) via the NF- κ B-dependent signaling pathway [3,23–29]. IFN- γ induces superoxide generation by increasing the expression of NADPH oxidases [30] and induces NO generation by upregulating nitric oxide synthase (NOS2) [31]. Superoxide reacts with NO to produce the highly reactive nitrogen species peroxynitrite, which can destroy *T. cruzi* but also can cause host cell and

mitochondrial damage. We hypothesized that pathogenic mutations in genes essential to mitochondrial processes were associated with the digestive form of Chagas disease. To evaluate our hypothesis, we performed whole exome sequencing in carriers of CME and the indeterminate form of Chagas disease. To assess whether cells from patients carrying these mutations were more likely to suffer cytokine-induced nitro-oxidative stress and mitochondrial dysfunction, we also evaluated the effect of IFN- γ in the Epstein–Barr virus-immortalized B lymphoblastoid cells (EBV-LCL) obtained from patients with CME carrying or not carrying mutations in mitochondrial genes. These cell lines have been used to study mitochondrial dysfunction in genetic mitochondrialopathies [32].

2. Methods

2.1. Patients and Blood Collection

Patients with Chagas disease megaesophagus (CME) from the Division of Digestive Tract Surgery of Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) were invited to participate in the study. An informed consent form was applied if the patient wanted to participate in the study. The study was approved by ethical committee (by the number 35658720.2.0000.0068) and all patients selected for this study had at least two serological tests for Chagas disease (ELISA and/or indirect immunofluorescence—IFI) performed by the clinical analysis laboratory of HC-FMUSP.

The control group was made up of patients with the indeterminate form of Chagas disease (ASY) recruited at the Chagas Disease Outpatient Clinic at the General Cardiomyopathies Center of the Heart Institute (InCor), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2.2. Whole Exome Sequencing (WES) of Patients with CME and ASY

DNA was extracted from whole blood of CD patients with the QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen, Redwood City, CA, USA). The exome of 13 CME patients and 45 ASY patients was sequenced by Genewiz (Paris, France). Low-quality adapter sequences and nucleotides were removed using Trimmomatic v.0.36. The contigs were aligned to the reference genome *Homo sapiens* GRCh37 using the Edico Genome Dragen's pipeline. Variant call format (VCF) files were used for the annotations and prioritization of mutations in the VarAFT software (version 2.06, Windows 10 platform) (<https://varaft.eu>; 29 April 2019) which generates a file for each individual with a list of all variants detected from several databases such as 1000 Genomes and ExAC. Pathogenic variants were performed using the following criteria based on the markers that were considered significant: maintenance of variants located in exon and splicing zones, elimination of synonymous variants, four different databases (SIFT, UMD and two PolyPhen) and the selected mutation considered pathogenic in at least 3 of them. The MRPS18B gene of CME and ASY patients was amplified by real-time PCR using the following primers: F 5'-TACCTCTCATGGGGCTGTGAGT-3' and R 5'-TTCCGCTGGTGTCTAGGGGG-3'. The resulting amplicon was subjected to Sanger sequencing (Genewiz, Leipzig, Germany). EBV-derived lymphoblastoid cell lines (EBV-LCL) from four patients carrying MRPS18B P260A (one homozygous and the other 3 heterozygous) and three wild type CME patients were generated for downstream analyses.

2.3. Variants Selection

An average of 140,677 annotated variants were detected in each CME patient whereas an average 136,177 annotated variants were detected in each asymptomatic subject. In total, 456,344 variants were detected in at least one of the 13 CME patients whereas 646,398 variants were detected in at least one of the 37 ASY subjects.

According to our hypothesis, we focused our analysis only on genes that are involved in mitochondrial functions. The mitochondrial gene list was a combination of all genes contained in the Mitochondrion Gene Ontology term and Mitocarta 2.0 (see Supplemental Table S1). This gene list contains 1531 genes which can be included either in the nuclear genome or in the specific mitochondrial circular genome. Among the CME

variants, a small fraction ($6.6\% = 30,184/456,344$) of the variants were included in our candidate genes.

Among these candidate variants, we selected the variants located in coding (exonic or splicing) regions and that were non-synonymous. For each of these variants, we looked for pathogenicity data available in four databases (Shift, PolyPhen2_HDIV_pred, PolyPhen2_HVAR_pred and UMD predictor). We selected the variants described as pathogenic (or damaging) in at least three of these databases. So, the number of candidate variants dropped to 217 pathogenic non-synonymous variants located in exonic or splicing regions of one of our candidate genes.

In 2014, the CADD score was introduced as a comprehensive tool that aims to take the results of many known prediction tools into account. Here, we focus our analysis on variants with a CADD score above 20. A scaled CADD score of 20 means that a variant is amongst the top 1% of deleterious variants in the human genome. In our statistical analysis, we compared the number of mutated chromosomes in each group. The cutoff value for statistic tests was fixed at 0.005.

2.4. Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified from 20 mL of blood collected in tubes treated with heparin from CME patients. Blood was diluted in 0.9% saline solution (1:1 dilution) and carefully superimposed on Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and submitted to centrifugation at $800 \times g$ (without braking and without acceleration) for 30 min for the separation of PBMCs from red blood cells and plasma. The PBMCs were collected from the interphase with the aid of a Pasteur pipette and washed 3 times in 0.9% saline at $300 \times g$ 8 min. Cells were counted and subjected to immortalization using Epstein–Barr virus.

2.5. Production of a Supernatant Rich in Epstein–Barr Virus Particles

To enrich the supernatant with Epstein–Barr virus (EBV) particles, approximately 2×10^6 monkey B95.8 cells purchased from Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) were grown in specific medium R15 (RPMI 1640 (Gibco®, New York, NY, USA) supplemented with 15% inactivated FBS (Life Technologies™, New York, NY, USA), 10 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 0.25 µg/mL amphotericin B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)) at a density of 0.2×10^6 cells per ml in R15 medium in a flask with 25 cm² of growth surface (T25). The cells were kept in an incubator at 37 °C with 5% CO₂ for seven days and the medium was transferred to a new 75 cm² flask pre-filled with 10 mL of R15 medium. Once a week, 10 mL of R15 was added until reaching 50 mL. Then, the flask was completely closed and kept in the incubator at 37 °C for 14 days. The medium was then collected and filtered through a 0.22 µm filter to eliminate debris. Aliquots of 1 mL of the supernatant were frozen and stored at -80 °C.

2.6. Establishment of EBV-LCL from Patients

The PBMCs isolated from all patients were infected with the EBV for transformation of B cells into EBV-LCL. EBV-LCL are continuous sources of cells for genetic and functional studies [33] and have been widely used for the study of mitochondrial function in mitochondrial diseases [32,34]. Transformation was carried out as follows: 1.0×10^6 viable PBMCs were incubated in 400 µL of R20 medium (RPMI 1640 (Gibco®, New York, NY, USA) supplemented with 20% inactivated FBS (Life Technologies™, New York, NY, USA), 10 U/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin and 0.25 µg/mL of amphotericin B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), with 200 µL of the EBV-enriched supernatant and 2.4 µL of cyclosporin A 1.0 mg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) in a 1.9 cm² surface plate (24-well plate). The cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for seven days without disturbance.

On the 7th day, 250 µL of R20 medium was added to each well and incubated for another seven days in an incubator at 37 °C with 5% CO₂ without disturbance. On the

14th day, the entire content of the three wells was transferred to a 12.5 cm² flask (T12.5) pre-filled with 1 mL of R20 and the cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂. Every two or three days, 200–500 µL of R20 was gradually added depending on the growth rate of the cells.

When the culture volume reached 4 mL, cells were centrifuged at 100× *g* for 10 min at room temperature and then the supernatant was discarded. Cells were suspended at a density of 0.4 × 10⁶ viable cells/mL in R15 medium and left to grow until 20 × 10⁶ cells. Then, cells were cryopreserved with 90% FBS (Gibco®, New York, NY, USA) and 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) in liquid nitrogen for further analyses.

2.7. Evaluation of mtROS in LCLs

Twenty-four hours before the experiment, the EBV-LCL cells from each patient were centrifuged at 100× *g* for 10 min and the counting was carried out with a Neubauer chamber and trypan blue 0.4% (Invitrogen, New York, NY, USA). The cells were kept at a concentration of 0.4 × 10⁶ viable cells per ml of R15.

On the day of the experiment, the cells were centrifuged at 100× *g* for 10 min, counted and seeded at a concentration of 15 × 10⁴/mL in 150 µL of R15 containing or not containing interferon-γ (IFN-γ, 25 ng/mL) in sterile 96-well U-bottom plates. After stimulation, cells were transferred to V-bottom 96-well plates, centrifuged at 300× *g* for 5 min and suspended in Hanks saline buffer with Ca²⁺ and Mg²⁺ pH 7.4 (HBSS++) containing 5 µM of MitoSOX™ Red (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), specific for mitochondrial superoxide. The cells were then incubated in the dark at 37 °C for 10 min.

Afterwards, the plate was centrifuged at 300× *g* for 5 min and the cells were resuspended in 150 µL of HBSS++ containing 3.5 µM of Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 1 drop per ml of NucGreen (ReadyProbes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The stained cells were transferred to 96-well black plates (Corning 3603) at 3 × 10⁴ per well in 100 µL of HBSS++ and centrifuged at 300× *g* for 2 min without acceleration and braking. Images of five fields per well were captured in a high-content screening system (HCS, ImageXpress, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 200× magnification using Hoechst 33342 (nucleus), FITC (dead cell nucleus) and Texas red (mtROS) filters.

The MitoSOX signal was measured using the software Columbus. First, we identified the total number of cells by using the nucleus probe Hoechst 33342. Then, dead cells were excluded by using a second probe that stains the nucleus green in dead cells. By excluding dead cells, we measured MitoSOX fluorescence intensity inside live cells at approximately 580 nm (Texas red). The contrast intensity (*c*) is automatically calculated by Columbus with the following function of the mean intensity in the region (*a*), and the mean intensity in the neighborhood of the region (*b*): $c = (a - b)/(a + b)$. Approximately 9000–10,000 cells were measured per patient.

2.8. Sample Preparation of EBV-LCL Stimulated with IFN-γ

For concurrent quantification of nitrite, ATP and nitrated proteins, 50 × 10⁴ cells from each patient were seeded in 2.5 mL of R15 without phenol red in 6-well plates. Cells were treated with IFN-γ (25 ng/mL) for 48 h. After treatment, cells were collected, divided into two 1.5 mL microtubes and centrifuged at 800× *g* for 5 min. Conditioned supernatant was collected in 1.5 mL microtubes and stored in a freezer at –80 °C until use for nitrite quantification.

The pellets formed in the two 1.5 mL microtubes were processed in different ways on ice: (1) the first cell pellet was lysed in 200 µL of TE buffer (100 mM Tris and 4 EDTA, pH = 7.5). Afterwards, the lysate was heated at 95 °C for 7 min and centrifuged at 20,800× *g* for 3 min and the supernatant was collected and then stored in a freezer at –80 °C until use for ATP quantification; (2) the second cell pellet was lysed in 200 µL of lysis buffer (10 mM HEPES, 0.32 M sucrose, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM dithiothreitol (DTT), 5.25 µL leupeptin, 0.3 µM aprotinin and 125 µg/mL PMSF at pH 7.4) with the aid of a cell disruptor

(VirSonic 100 (Virtis, Warminster, PA, USA)) for 3 cycles of 10 s with 15 s intervals on ice and centrifuged at $10,000\times g$ for 30 min at 4 °C and the supernatant was collected for quantification of nitrated proteins.

For both lysates, protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

2.9. Quantification of Nitrite, ATP and Nitrated Protein

The quantification of nitrite in the supernatant was performed using the Griess Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and ATP production was quantified using the ATP Determination Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) as per the manufacturer's instructions.

For the quantification of nitrated proteins, 5 μg of the protein was vacuum added to a nitrocellulose membrane 0.45 μm with the aid of a HYBRID DOT MANIFOLD dot blot apparatus (Bethesda Research Laboratories, Bethesda, MD, USA). The membrane was air dried in an Eppendorf ThermoMixer[®] thermoblock (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 60 °C for 1 h and then blocked with 5% Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) + TBS-Tween (NaCl 120 mM, Tris 20 mM, Tween20 0.05%) for 2 h at room temperature (RT), with agitation. After, membrane was washed 3 times for 5 min under agitation with TBS-T. The membrane was then incubated with 1:1000 of the primary antibody 3 free nitrotyrosine (3-NT) in BSA 0.3% + TBS-T overnight at 4 °C under agitation. After, membrane was washed three times and incubated with 1:10,000 of secondary antibody IRDye 680RD Donkey anti-mouse 700 nm (LI-COR, Lincoln, NE, USA) in 0.3% BSA + TBS-T for 2 h at RT, under agitation and protected from light. After, membrane was washed three times again and fluorescence was acquired using the Odyssey[®] Infrared Imaging System scanner (LI-COR, Lincoln, NE, USA) in the 700 nm channel. The normalization was carried out using Ponceau staining in the ImageQuant LAS-400 image reader (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

2.10. Statistical Analysis

Data and statistical analysis were performed using the program GraphPad Prism 8 (Windows 10). A Mann–Whitney test of the mean row statistics in the quantification of mtROS and a Mann–Whitney test for the quantification of nitrite, ATP and nitrate proteins for each patient were carried out. After, a second analysis was carried out per group, C/C (wild type), C/G (heterozygous) and G/G (homozygous), and the mean of each analysis was used. For this second analysis, we used an ANOVA two-way test. For exome analysis, two statistical tests were used: Fisher test and chi-squared. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Exome Sequencing Reactions for CME Patients and ASY Subjects

We performed whole exome sequencing of 13 CME patients and 37 ASY subjects to identify if CME patients display an accumulation of pathogenic polymorphisms in comparison with ASY. The workflow is described in Figure 1.

Two variants were more frequent in patients with Chagas disease megaesophagus (*MRPS18B* rs34315095C/G and *FAM185A* rs201667800T/G) (Tables 1–3). The mitochondrial ribosomal protein S18B (*MRPS18B*) gene encodes a 28S subunit protein that belongs to the small subunit of the mitochondrial ribosome. We have little functional information on the *FAM185A* gene. A *FAM185A* variant was found in a study (whole mitochondrial genome sequencing, in conjunction with high-throughput genotyping arrays) carried out to discover genetic variants associated with exercise responses. The link with mitochondria is in fact not obvious [35]. So, we decided to focus on the *MRPS18B* gene, as many homozygous mitochondrial ribosome mutations are associated with genetic mitochondrialopathies.

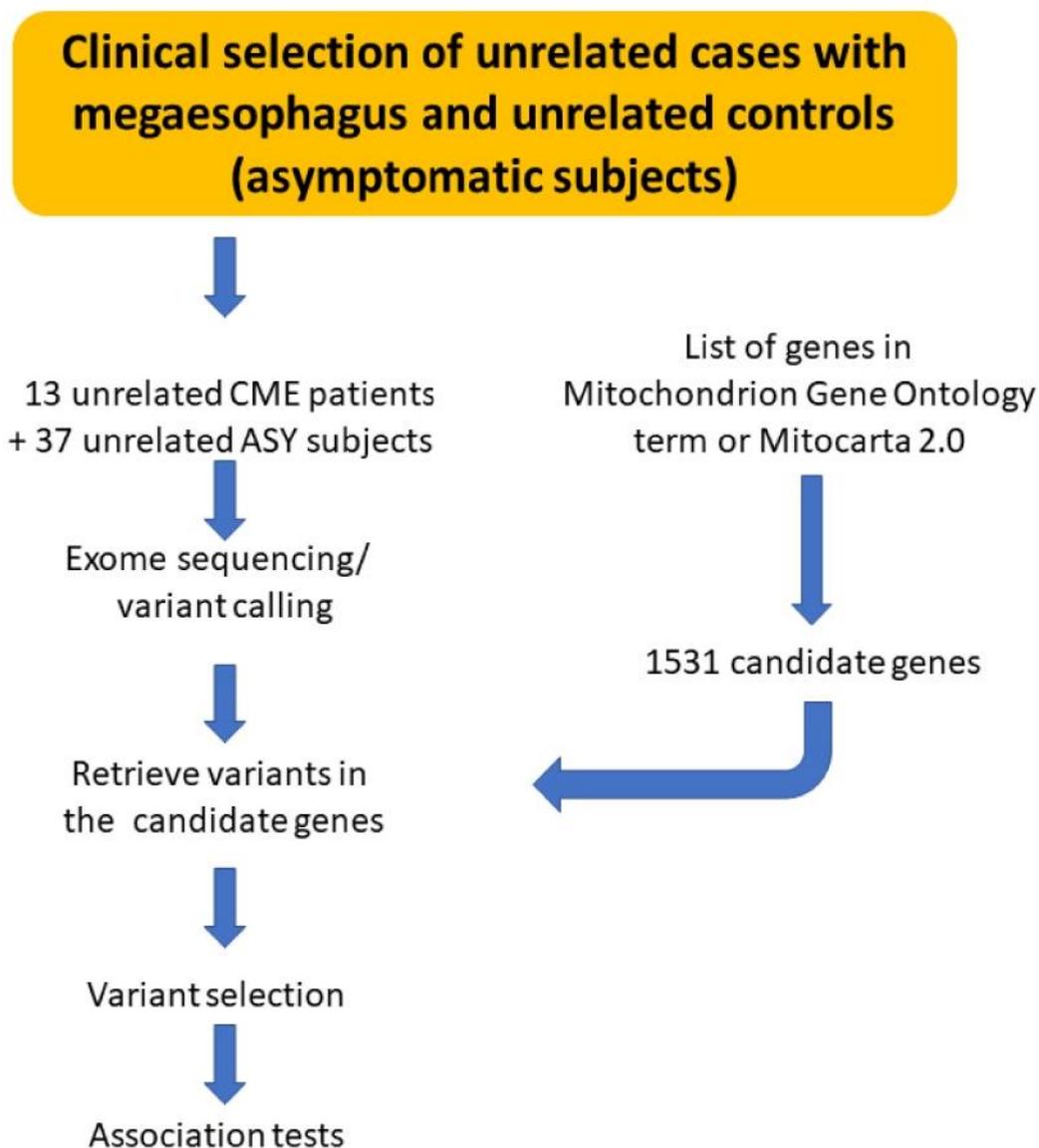


Figure 1. Schematic drawing describing the workflow of analysis.

Table 1. List of associated variants.

Gene	Ensembl Reference	Chromosome	Position	Ref Allele	Mutated Allele	rs Number	Nucleotide Change (Transcript)	Amino Acid Change (Transcript)	CADD Score
<i>MRPS18B</i>	ENSG00000204568	Chr6	30593485	C	G	rs34315095	ENST00000259873: exon7 688C > G	ENST00000259873: P230A	27.9
<i>FAM185A</i>	ENSG00000222011	Chr7	102417753	T	G	rs201667800	ENST00000409231: exon5 538T > G	ENST00000409231: Y180D	26.0

Table 2. Variants’ distribution between cases and controls.

Mutations	CME Patients			ASY Subjects		
	Heterozygote Patients	Homozygote Patients	Non-Mutated Patients	Heterozygote Subjects	Homozygote Subjects	Non-Mutated Subjects
<i>MRPS18B</i> rs34315095 C/G	4	1	8	1	0	36
<i>FAM185A</i> rs201667800 T/G	6	0	7	2	0	35

Table 3. Statistical test on mutated chromosomes.

Mutations	CME Patients		ASY Subjects		Fisher Exact Test <i>p</i> -Value
	Mutated Chromosomes	Non Mutated Chromosomes	Mutated Chromosomes	Non-Mutated Chromosomes	
<i>MRPS18B</i> rs34315095 C/G	6	20	1	73	0.001105404
<i>FAM185A</i> rs201667800 T/G	6	20	2	72	0.003611684

3.2. Pathogenic Variant of *MRPS18B* Is Accumulated in CME Patients

The *MRPS18B* variant (688C > G, P230A) was present in 38% of CME patients (five of the 13 CME patients) and 3% of ASY patients (1 of 37) (Table 2). One of the five CME patients carrying the mutation was homozygous (G/G) while the other four CME carriers and the ASY carrier were heterozygous (C/G). So, the G allele frequency in CME is 23.1%, whereas this allelic frequency reaches 1.4% in ASY subjects.

The G variant rs34315095 has a frequency of 4.6% in the 1000 Genomes database. Based on the ALFA allele frequency project, in reference populations the alternative allele (G) frequencies were 1.8% (European reference population), 5.5% (African reference population); 5.2% (African American reference population) and 3.8% (Asian reference population). Recently, the ABraOM repository was built, containing genomic variants obtained with whole exome and whole genome sequencing from SABE, a census-based sample of elderly individuals from São Paulo, Brazil [36]. In both databases (exome sequencing database: 609 individuals and whole genome sequencing: 1171 individuals), the G frequency reaches 4.7%.

The confirmatory sequencing was performed by Sanger sequencing (Genewiz). The DNA was amplified by real-time PCR using specific primers for *MRPS18B*. The resulting amplicon was subjected to Sanger sequencing and results confirmed the presence of the polymorphism 680C > G of the *MRPS18B* gene (Figure 2 shows representative chromatograms).

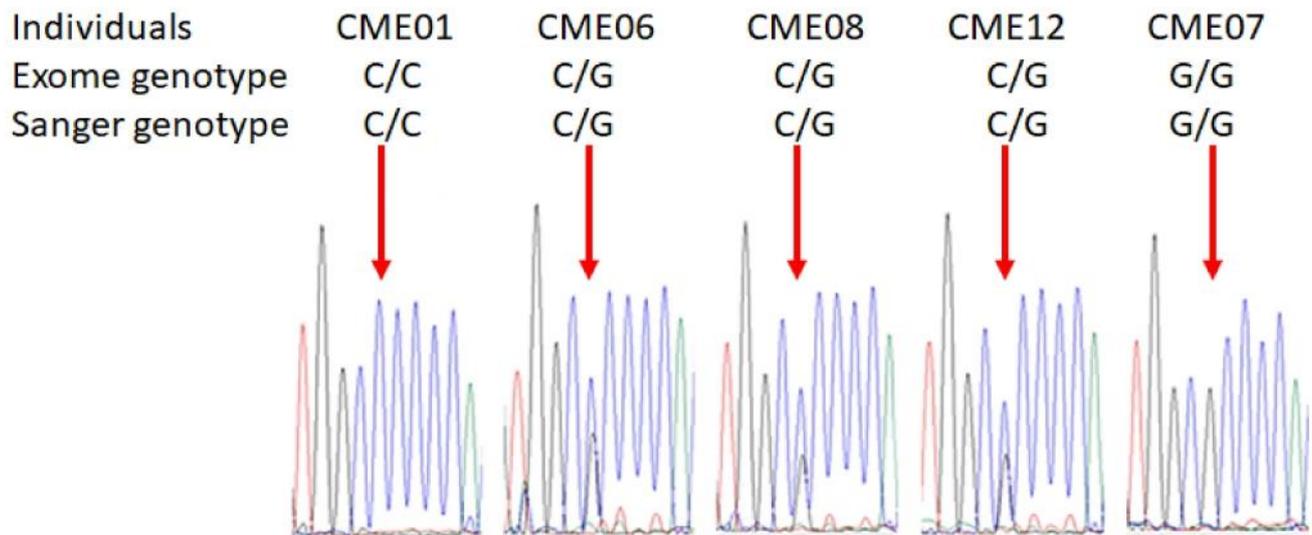


Figure 2. Sanger chromatograms of patients with or without the damaging variant *MRPS18B*. The confirmatory sequencing was performed by Sanger sequencing. The DNA of each patient was extracted using QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen, Germantown, WI, USA) and 25 ng of DNA was used for the amplification of *MRPS18B* gene. PCR quality was assessed by gel electrophoresis and all samples generated a single band corresponding to *MRPS18B*. Then, samples were sequenced by Sanger sequencing by Genewiz. Representative images of Sanger chromatograms of the 5 patients reveal the change in the nucleotide. The red arrow indicates the base change from cytosine to guanine.

Chromatograms of all CME patients are depicted in Supplemental Figure S1.

3.3. IFN- γ Causes Nitro-Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in Patients Carrying MRPS18B P260A Variation

In order to investigate if patients carrying the variant 688C > G MRPS18B are more susceptible to IFN- γ 's damaging effects compared to patients carrying the wild type genotype (C/C), we conducted functional assays in EBV-LCL derived from CME heterozygous (C/G) and homozygous (G/G) patients. We quantified mtROS, nitrite, nitrate proteins and synthesis of ATP in non-stimulated and IFN- γ -stimulated cells (25 ng/mL).

We found that C/G (CME06, CME08 and CME12) and G/G (CME07) patients are more susceptible to IFN- γ 's damaging effects compared to C/C (CME01, CME02 and CME03) patients. We identified that C/G and G/G patients had increased nitrite production (31% and 38%, respectively) as compared with the C/C group (Figure 3). Similarly, the C/G patients had a 67% increase and the G/G CME7 patients a 70% increase in nitrated proteins when compared with the C/C group (Figure 3B).

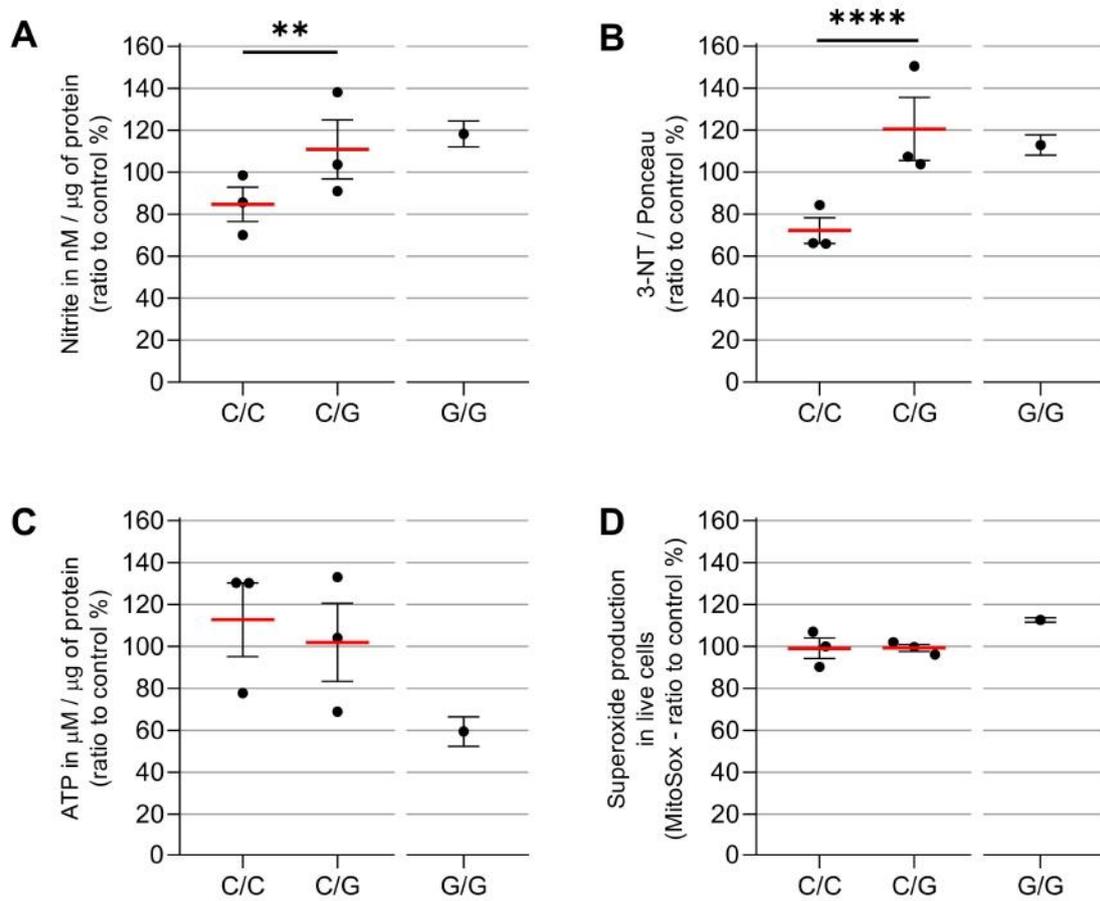


Figure 3. ATP production and nitro-oxidative stress after IFN- γ treatment in carriers or non-carriers of MRPS18B c.688 C > G MRPS18B p. P230A mitochondrial gene mutation. EBV-LCL were obtained from the PBMCs of the patients and infected with EBV for transformation. The EBV-LCL from the patients were stimulated in vitro with IFN- γ . We measured the production of nitrite (A), carried out relative quantification of nitrated proteins (B), ATP (C) and mtROS (D), after the stimulation with IFN- γ 25 ng/mL with MitoSOX™ Red, Griess Reagent Kit, Dot Blot, ATP Determination Kit and the anti-3-nitrotyrosine antibody. We here depict the average ratio between IFN- γ -treated vs. unstimulated cells. Each dot is a patient with ≥ 6 independent measurements. Experiments were repeated several times independently. As we had only one CME patient G/G, statistics were carried out only between C/C patients and C/G patients. Two-way ANOVA statistics were performed between C/C and C/G. ** = $p < 0.01$, **** = $p < 0.0001$.

We next measured ATP production by luciferase-based assay and we found that IFN- γ reduced the ATP production 3% in C/G patients compared to C/C patients, while the CME07 G/G showed a reduction of 54% (Figure 3C) as compared to baseline conditions.

We evaluated mtROS production using MitoSOXTM Red, which binds preferentially to the superoxide radical (O_2^-). Results show there is no significant increase in C/G vs. C/C patients, but homozygous patient CME7 (G/G) showed a 12% increase when compared with the other patients (Figures 3D and 4A). The p value is 0.0022 with a Mann-Whitney test of six independent measurements of IFN-gamma-stimulated cells compared to unstimulated cells. The cell viability assay indicated no cytotoxic effect of IFN- γ at the concentration of 25 ng/mL (Figure 5).

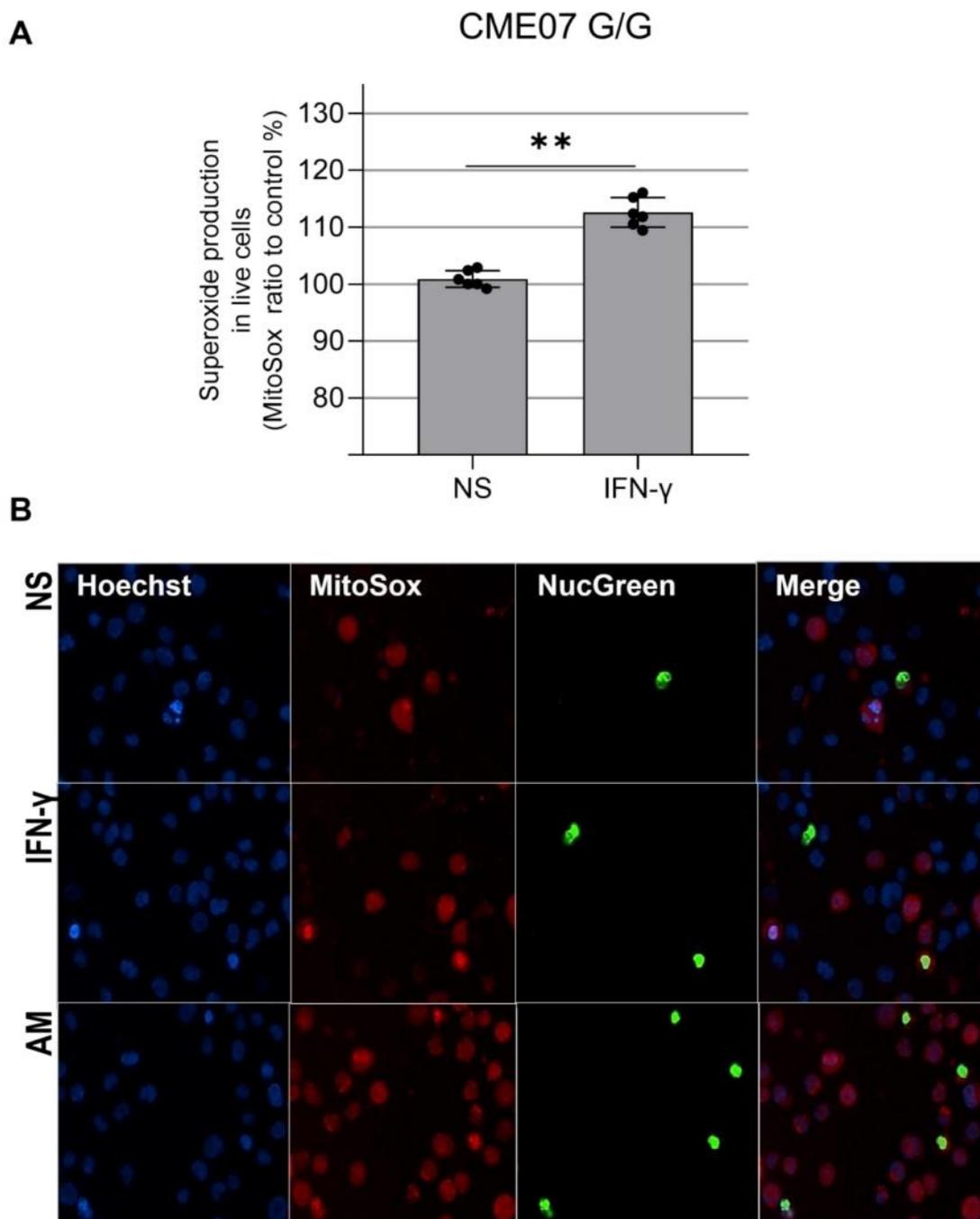


Figure 4. (A). Mitochondrial ROS increase in IFN- γ -treated EBV-LCL from CME07 (homozygous MRPS18B G/G). A total of 15×10^4 EBV-LCL cells were stimulated with IFN- γ 25 ng/mL for 24 h

and cell nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue), the nuclei of dead cells were stained with ReadyProbes™ NucGreen (green), also used to measure cell viability, and superoxide was measured with MitoSOX™ (red) (B). Positive control: 560 μ M of antimycin A. Magnification 200 \times . NS: not stimulated. Statistical analysis performed using the Mann–Whitney test. ** = $p < 0.01$.

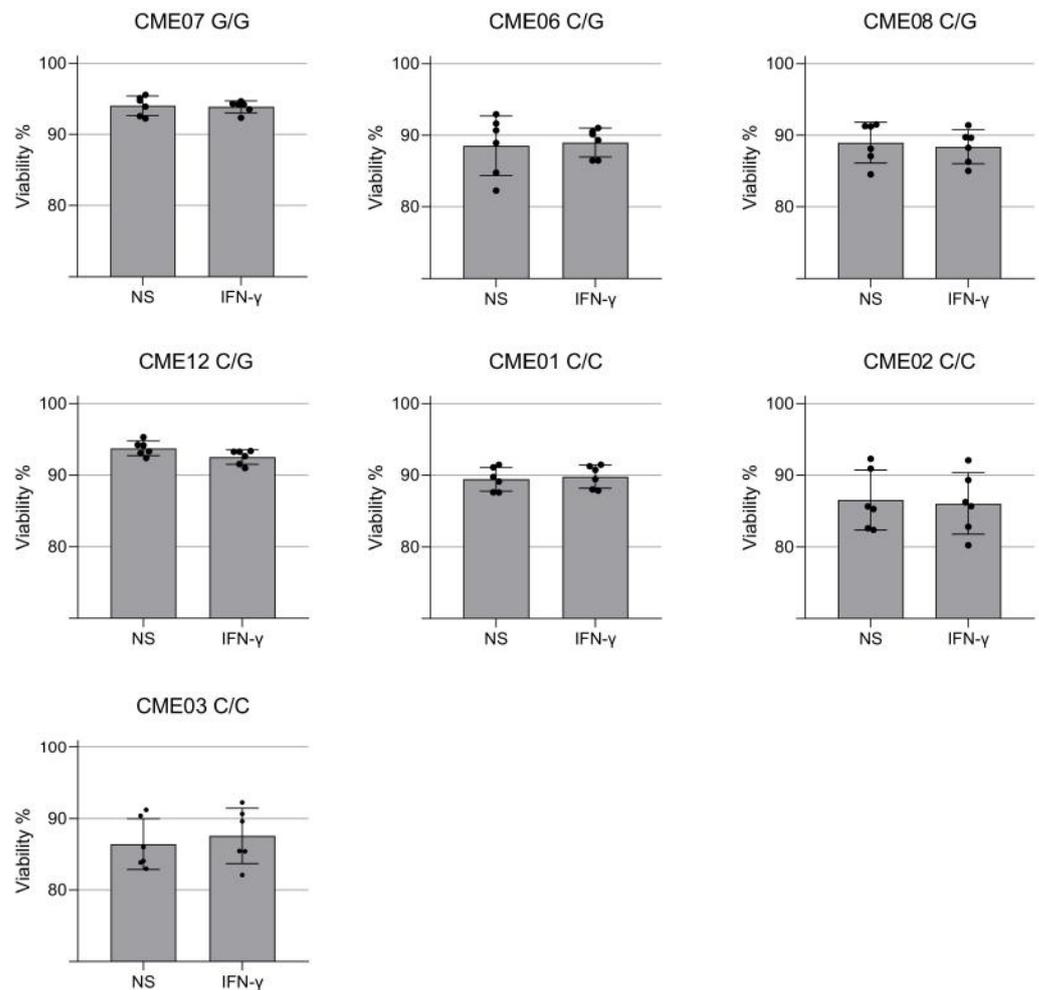


Figure 5. Viability of EBV-LCL cells after treatment with IFN- γ for 24 h. The cell viability of patient-specific EBV-LCL was quantified using the ReadyProbes™ NucGreen dye after 24 h of treatment with IFN- γ (25 ng/mL). Cell viability of EBV-LCL from patients with EMC with the mutation in HOM (G/G), HET (C/G) and non-carriers (C/C). Each dot is an independent measurement. Statistical analysis performed using the Mann–Whitney test.

4. Discussion

This study demonstrated for the first time the relevance of pathogenic variants in patients with Chagas disease megaesophagus. We demonstrate that CME patients have a higher frequency of pathogenic mutations compared to FI patients, such as the mitochondrial mutation MRPS18B 688C > G which was identified in 38% of CME patients and 2% of FI patients. The MRPS18B variant (688C > G, P230A) was characterized by a Sift score of 0.01 (damaging), a PolyPhen score of 0.996 (damaging) and a CADD score of 28. The ENST00000259873: exon7: 688C base is well conserved in the evolution (score 8/9). The proline 230 is located in an external alpha helix.

IFN- γ treatment in EBV-LCL cell lines carrying MRPS18B 688C > G was associated with increased nitro-oxidative stress compared to patients with megaesophagus without

the mutation and the homozygous patient displayed higher damaging effects as shown by decreased ATP production and superoxide production.

In this work, we focused on evaluating the impact of variants of MRPS18B, because recent studies link mitochondrial dysfunction and poor prognosis of Chagas disease. The MRPS18 proteins are encoded by nuclear genes and are involved in protein synthesis within mitochondria. The homologous proteins are zinc-binding proteins that make up the 28S small subunit (MRPS18B and C) and the 39S large subunit (MRPS18A) of the 55S mammalian mitoribosomes [37–40]. Mitochondria have their own translation system for the synthesis of thirteen proteins that build the oxidative phosphorylation complex (OXPHOS). Mutations in mitoribosomal proteins are frequent causes of metabolic and energy disturbances due to deficiencies in mitochondrial protein synthesis [41]. Mutations in the MRPS genes have been shown to have deleterious effects, especially in disorders of the mitochondrial respiratory chain. Mitochondrial disease-causing mutations were found in thirteen small ribosomal subunit mitoribosomal proteins (MRPS1, MRPS2, MRPS6, MRPS7, MRPS9, MRPS11, MRPS14, MRPS16, MRPS22, MRPS23, MRPS25, MRPS34, MRPS39) and four large ribosomal mitochondrial proteins (MRPL3, MRPL12, MRPL24, MRPL44) [41]. Several of them are associated with cardiomyopathy, as was also observed in a study by our group where the presence of a different mutation in the MRPS18B gene was identified in CCC patients [11,41]. Some proteins in this group play extraribosomal roles, such as participating in the regulation of apoptosis and a series of cell signaling cascades [38]. Mutations in the mitochondrial genes that affect mitochondrial translation, such as in mitochondrial tRNAs, have been associated with Leigh syndrome and mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy (MNGIE), two mitochondrial diseases with loss of myenteric plexus neurons and dysphagia [13,18,41,42].

Our results corroborate the role of mitochondrial gene variants in susceptibility to symptomatic forms of Chagas disease, as observed for the first time in CCC patients [11]. However, most mitochondrial diseases affect young children and newborns and often involve multiple organ systems. Interestingly, patient CME07, who carries the homozygous variant, is a 60-year-old patient with digestive and cardiac symptoms (heart failure, New York Heart Association (NYHA) functional class II). The fact that the mitochondrial phenotype in vitro only emerged after cytokine stimulation and was only clinically expressed in an adult is suggestive of a two-hit phenomenon, where the mutation increases the cells' susceptibility to nitro-oxidative stress induced by IFN- γ and mitochondrial dysfunction. Thus, the two-hit mitochondrial damage would be located only in inflammatory sites in patients with Chagas disease; for example, in myenteric plexuses in patients with Chagas disease with megaesophagus [6] and in the heart in the case of CCC [43]. The MRPS18B gene is one of the variant genes identified only in the CCC siblings of one Chagas multicase family, mentioned above [11].

We postulate that CME patients display pathology because this mutation causes mitochondrial ribosome dysfunction, which affects protein synthesis essential for adequate oxidative phosphorylation and mitochondrial homeostasis. Defective oxidative phosphorylation may first lead to increases in ROS which may in turn activate NF- κ B and NOS2, inducing increased levels of NO which under high ROS conditions can generate the powerful oxidant peroxynitrite, causing oxidative damage to the cell and mitochondria.

Chronic immune response is also a key factor associated with worse progression of patients with Chagas disease [44]. The pro-inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α are increased in patients with CCC and digestive disease compared to patients with dilated cardiomyopathy [21,45] and these stimuli are reported to be mitochondrial dysfunction inducers by causing damage to cardiac tissue [3,24,27] and, in in vitro cardiomyocytes [46], promoting an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS) [45,47–49]. Considering that the trigger shared by patients with megaesophagus and Chagas cardiomyopathy is infection with *T. cruzi*, our hypothesis is that these CME patients may also have mitochondrial/energy dysfunction associated with pathology plus mutation in the mitochondrial gene.

We identified that CME patients when exposed to IFN- γ respond differently in the production of cytoplasmic mtROS. Although we did not find differences in the production of mtROS in the group of patients heterozygous for MRPS18B, we found that the CME07 MRPS18B G/G had a significant increase of 12% in mtROS compared to all groups, showing that the homozygous mutation may contribute to a worsening in mitochondrial metabolism that culminates in increased production of mtROS.

A study carried out to evaluate the role of nitric oxide in neuronal destruction in C57BL/6 control mice and knockout for NOS2 and IFN during *T. cruzi* infection demonstrated that the myoenteric denervation observed in the acute phase of protozoan infection is due to the production of nitric oxide (NO) and IFN- γ , as it was observed that control mice produced more NO when compared to the two knockout groups [50]. Our study showed that the EBV-LCL of CME patients carrying the genetic variant in homozygosis and heterozygosis showed an increase in the production of nitrite (product of endogenous NO metabolism) after treatment with IFN- γ , thus showing that the cytokine has an essential role in the increase in nitrite production and, consequently, generating a possible mitochondrial dysfunction and the increase in agents that in large quantities become toxic for the functioning of the mitochondria.

In addition to the increase in nitrite, patients with MRPS18B 688C > G P260A increased the amount of nitrated proteins after stimulation with IFN- γ compared to non-carriers. The identification of nitrated proteins is a consequence of the increase in peroxynitrite (ONOO⁻), a product originated by the combination of superoxide and NO or by the combination of hydrogen peroxide (H₂O₂) with nitrite [51]. Excessive production of ONOO⁻ can lead to tissue damage and mitochondrial dysfunction [51,52]. A study carried out in hepatoma and fibrosarcoma strains also showed that after treatment with IFN- γ there was an increase in peroxynitrite [51].

In previous studies, our group demonstrated that patients with CCC display a reduction in mitochondrial enzymes involved in ATP production [53]. Our investigations showed that this decrease may also be present in CME patients in sites of increased IFN- γ production, where we observed a decrease in ATP synthesis in the EBV-LCL of patients with mitochondrial mutation after treatment with IFN- γ . In fact, the homozygous patient (CME07 G/G) followed this pattern, where IFN- γ stimulation increased mtROS, oxide nitric and tyrosine nitration accompanied by reduced ATP production. The heterozygous group (C/G) increased nitrite and nitrotyrosine in an mtROS-independent way. This could be explained by direct activation of NOS2 by IFN- γ itself or fast catalytic conversion of leaked mtROS into H₂O₂ by antioxidant enzymes such as superoxide dismutase [54]. The increased protein nitration observed in our model could also be explained by combinatory damaging effects between enhanced NF- κ B/NOS2 activation by IFN- γ . The employment of refined methodologies for mtROS detection, such as LC-MS and a “probe-free” electron paramagnetic resonance (EPR)/spin-trapping technique [55], could give us a better clue on mtROS production in these cells.

Our study had limitations. We focused our study on the genes which are essential for mitochondria. We cannot exclude the involvement of additional variants. The small number of analyzed CME patients may mask the identification of additional mitochondrial mutations and the reduced number of LCL used for functional assays presents only suggestive and not definitive results. However, the differences identified in the frequency of genetic variants between the CME (34 variants) and FI groups were robust, and a cellular/molecular phenotype was associated with the variant. To estimate if this pathway could indeed be influencing the EBV-LCL responses of patients, additional tests need to be carried out, such as silencing the pathways associated with genes in the strains and measuring again how the strains would respond to the IFN- γ stimulus.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10092215/s1>, Figure S1: Sanger sequencing chromatograms on CME patients. Table S1: List of the genes contained in the Mitochondrion Gene Ontology term and Mitocarta 2.0.

Author Contributions: Conceptualization, C.C. and E.C.-N.; methodology, K.D.A.S., J.P.S.N.; R.R.A., N.B.P., A.C.K.K.T., F.C.B.d.C.S., P.A., P.B., R.C.F.Z., D.L., L.A. and A.C. writing—original draft preparation, K.D.A.S. and J.P.S.N.; writing—review and editing, E.C.-N., C.C., S.P.B., I.C. and J.K.; funding acquisition, C.C. and E.C.-N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work received specific support from the funding body Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo (FAPESP 2019/22858-3). This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); Aix-Marseille University (grant number: AMIDEX “International_2018” MITOMUTCHAGAS); the French Agency for Research (Agence Nationale de la Recherche—ANR) (grant numbers: “Br-Fr-Chagas”, “landscardio”); the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq); the National Institutes of Health/USA (grant numbers: 2 P50 AI098461-02 and 2U19AI098461-06). This work was funded by the Inserm Cross-Cutting Project GOLD. This project has received funding from the Excellence Initiative of Aix-Marseille University—A*Midex a French “Investissements d’Avenir programme”—Institute MarMaRa AMX-19-IET-007. J.P.S.N. was a recipient of a MarMaRa fellowship. The funders did not play any role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Informed Consent Statement: Ethical approval for the study was obtained from the Ethics Committee of the Heart Institute, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (approval number 35658720.2.0000.0068). Informed written consent was obtained from the participants.

Data Availability Statement: All data are available in the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Thakare, R.; Dasgupta, A.; Chopra, S. An update on benzimidazole for the treatment of patients with Chagas disease. *Drugs Today* **2018**, *54*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Cunha-Neto, E.; Chevillard, C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 683230. [[CrossRef](#)]
3. Bocchi, E.A.; Bestetti, R.B.; Scanavacca, M.I.; Cunha Neto, E.; Issa, V.S. Chronic Chagas Heart Disease Management: From Etiology to Cardiomyopathy Treatment. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *70*, 1510–1524. [[CrossRef](#)]
4. Teixeira, A.R.; Nascimento, R.J.; Sturm, N.R. Evolution and pathology in chagas disease—a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2006**, *101*, 463–491. [[CrossRef](#)]
5. Teixeira, A.R.; Nitz, N.; Guimaro, M.C.; Gomes, C.; Santos-Buch, C.A. Chagas disease. *Postgrad. Med. J.* **2006**, *82*, 788–798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Matsuda, N.M.; Miller, S.M.; Evora, P.R. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics* **2009**, *64*, 1219–1224. [[CrossRef](#)]
7. Zicker, E.; Smith, P.G.; Netto, J.C.; Oliveira, R.M.; Zicker, E.M. Physical activity, opportunity for reinfection, and sibling history of heart disease as risk factors for Chagas' cardiopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1990**, *43*, 498–505. [[CrossRef](#)]
8. Chevillard, C.; Nunes, J.P.S.; Frade, A.F.; Almeida, R.R.; Pandey, R.P.; Nascimento, M.S.; Kalil, J.; Cunha-Neto, E. Disease Tolerance and Pathogen Resistance Genes May Underlie Trypanosoma cruzi Persistence and Differential Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Luz, P.R.; Boldt, A.B.; Grisbach, C.; Kun, J.F.; Velavan, T.P.; Messias-Reason, I.J. Association of L-ficolin levels and FCN2 genotypes with chronic Chagas disease. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60237. [[CrossRef](#)]
10. Dias, F.C.; Mendes-Junior, C.T.; Silva, M.C.; Tristao, F.S.; Dellalibera-Joviliano, R.; Moreau, P.; Soares, E.G.; Menezes, J.G.; Schmidt, A.; Dantas, R.O.; et al. Human leucocyte antigen-G (HLA-G) and its murine functional homolog Qa2 in the Trypanosoma cruzi Infection. *Mediat. Inflamm.* **2015**, *2015*, 595829. [[CrossRef](#)]
11. Ouarhache, M.; Marquet, S.; Frade, A.F.; Ferreira, A.M.; Ianni, B.; Almeida, R.R.; Nunes, J.P.S.; Ferreira, L.R.P.; Rigaud, V.O.; Candido, D.; et al. Rare Pathogenic Variants in Mitochondrial and Inflammation-Associated Genes May Lead to Inflammatory Cardiomyopathy in Chagas Disease. *J. Clin. Immunol.* **2021**, *41*, 1048–1063. [[CrossRef](#)]
12. Rossignol, R.; Malgat, M.; Mazat, J.P.; Letellier, T. Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33426–33432. [[CrossRef](#)]
13. Finsterer, J. Mitochondriopathies. *Eur. J. Neurol.* **2004**, *11*, 163–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Greber, B.J.; Bieri, P.; Leibundgut, M.; Leitner, A.; Aebersold, R.; Boehringer, D.; Ban, N. The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. *Science* **2015**, *348*, 303–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Mushtaq, M.; Ali, R.H.; Kashuba, V.; Klein, G.; Kashuba, E. S18 family of mitochondrial ribosomal proteins: Evolutionary history and Gly132 polymorphism in colon carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 55649–55662. [[CrossRef](#)]
41. Ferrari, A.; Del’Olio, S.; Barrientos, A. The Diseased Mitoribosome. *FEBS Lett.* **2021**, *595*, 1025–1061. [[CrossRef](#)]
42. Gorman, G.S.; Chinnery, P.F.; DiMauro, S.; Hirano, M.; Koga, Y.; McFarland, R.; Suomalainen, A.; Thorburn, D.R.; Zeviani, M.; Turnbull, D.M. Mitochondrial diseases. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2016**, *2*, 16080. [[CrossRef](#)]
43. Nogueira, L.G.; Santos, R.H.; Fiorelli, A.I.; Mairena, E.C.; Benvenuti, L.A.; Bocchi, E.A.; Stolf, N.A.; Kalil, J.; Cunha-Neto, E. Myocardial gene expression of T-bet, GATA-3, Ror-gammat, FoxP3, and hallmark cytokines in chronic Chagas disease cardiomyopathy: An essentially unopposed TH1-type response. *Mediators Inflamm.* **2014**, *2014*, 914326. [[CrossRef](#)]
44. Reis, D.D.; Jones, E.M.; Tostes, S., Jr.; Lopes, E.R.; Gazzinelli, G.; Colley, D.G.; McCurley, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: Presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1993**, *48*, 637–644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Abel, L.C.; Rizzo, L.V.; Ianni, B.; Albuquerque, F.; Bacal, F.; Carrara, D.; Bocchi, E.A.; Teixeira, H.C.; Mady, C.; Kalil, J.; et al. Chronic Chagas’ disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to Trypanosoma cruzi infection. *J. Autoimmun.* **2001**, *17*, 99–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Nunes, J.P.S.; Andrieux, P.; Brochet, P.; Almeida, R.R.; Kitano, E.; Honda, A.K.; Iwai, L.K.; Andrade-Silva, D.; Goudenege, D.; Alcantara Silva, K.D.; et al. Co-Exposure of Cardiomyocytes to IFN-gamma and TNF-alpha Induces Mitochondrial Dysfunction and Nitro-Oxidative Stress: Implications for the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 755862. [[CrossRef](#)]
47. Gupta, S.; Bhatia, V.; Wen, J.J.; Wu, Y.; Huang, M.H.; Garg, N.J. Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, 1414–1421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Pissetti, C.W.; Correia, D.; de Oliveira, R.F.; Llaguno, M.M.; Balarin, M.A.; Silva-Grecco, R.L.; Rodrigues, V., Jr. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development Trypanosoma cruzi infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Wan, X.; Gupta, S.; Zago, M.P.; Davidson, M.M.; Dousset, P.; Amoroso, A.; Garg, N.J. Defects of mtDNA replication impaired mitochondrial biogenesis during Trypanosoma cruzi infection in human cardiomyocytes and chagasic patients: The role of Nrf1/2 and antioxidant response. *J. Am. Heart Assoc.* **2012**, *1*, e003855. [[CrossRef](#)]
50. Arantes, R.M.; Marche, H.H.; Bahia, M.T.; Cunha, F.Q.; Rossi, M.A.; Silva, J.S. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in Trypanosoma cruzi-infected mice. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164*, 1361–1368. [[CrossRef](#)]
51. Rakshit, S.; Chandrasekar, B.S.; Saha, B.; Victor, E.S.; Majumdar, S.; Nandi, D. Interferon-gamma induced cell death: Regulation and contributions of nitric oxide, cJun N-terminal kinase, reactive oxygen species and peroxynitrite. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 2645–2661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kauppinen, A.; Suuronen, T.; Ojala, J.; Kaamiranta, K.; Salminen, A. Antagonistic crosstalk between NF-kappaB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 1939–1948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Teixeira, P.C.; Santos, R.H.; Fiorelli, A.I.; Bilate, A.M.; Benvenuti, L.A.; Stolf, N.A.; Kalil, J.; Cunha-Neto, E. Selective decrease of components of the creatine kinase system and ATP synthase complex in chronic Chagas disease cardiomyopathy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. MacMillan-Crow, L.A.; Crow, J.P. Does more MnSOD mean more hydrogen peroxide? *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2011**, *11*, 178–180. [[CrossRef](#)]
55. Cheng, G.; Zielonka, M.; Dranka, B.; Kumar, S.N.; Myers, C.R.; Bennett, B.; Garces, A.M.; Dias Duarte Machado, L.G.; Thiebaut, D.; Ouari, O.; et al. Detection of mitochondria-generated reactive oxygen species in cells using multiple probes and methods: Potentials, pitfalls, and the future. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 10363–10380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

VII. Analyse de variants mitochondriaux pouvant prédisposer aux cardiomyopathies chagasiques.

Article 7: Mitochondrial DNA haplogroups and variants predispose to Chagas disease cardiomyopathy.

Frederic Gallardo, Pauline Brochet, David Goudenège, João Paulo Silva Nunes, **Pauline Andrieux**, Barbara Maria Ianni, Amanda Farage Frade, Charles Mady, Ronaldo Honorato Barros Santos, Andreia Kuramoto, Samuel Steffen, Antonio Noedir Stolf, Pablo Pomerantzeff, Alfredo Inacio Fiorelli, Edimar Alcides Bocchi, Cristina Wide Pissetti, Bruno Saba, Fabrício C Dias, Marcelo Ferraz Sampaio, Fabio Antônio Gaiotto, José Antonio Marin-Neto, Abílio Fragata, Ricardo Costa Fernandes Zaniratto, Sergio Siqueira, Giselle De Lima Peixoto, Fernando Bacal, Paula Buck, Rafael Ribeiro Almeida, Hui Tzu Lin-Wang, André Schmidt, Mario Hiroyuki Hirata, Eduardo Antonio Donadi, Alexandre Costa Pereira, Virmondés Rodrigues Junior, Martino Martinelli, Michel Naslavsky, Jorge Kalil, Vincent Procaccio, Edecio Cunha-Neto, Christophe Chevillard

Article soumis.

Présentation de la publication :

Les cardiomyopathies constituent un groupe hétérogène de maladies du myocarde associées à un dysfonctionnement mécanique ou électrique qui se traduisent généralement par une hypertrophie ou une dilatation ventriculaire inappropriée. Les patients atteints de cardiomyopathie dilatée semblent généralement asymptomatiques dans les premiers temps, mais les symptômes apparaissent progressivement avec l'âge lorsque la fonction cardiaque commence à décliner en raison de la perte progressive de fonction des cardiomyocytes, ce qui nuit à la fonction cardiaque normale. Le manque d'énergie du myocarde est l'une des principales caractéristiques des cardiomyopathies et de l'insuffisance cardiaque, et de nombreuses données indiquent que ce manque d'énergie est dû à un dysfonctionnement mitochondrial. Le cœur étant un organe énergivore, la régulation du métabolisme mitochondrial joue un rôle important dans la pathogenèse des cardiomyopathies dilatées. La mitochondrie est un organe qui a son propre génome, et ce génome code pour 13 protéines mitochondriales dont font partie les acteurs de la phosphorylation oxydative. C'est pour cette raison que notre équipe s'est intéressée à l'ADN mitochondrial et que nous avons émis l'hypothèse que certains variants mitochondriaux venaient participer au contrôle du déterminisme génétique des formes graves.

Afin de répondre à notre hypothèse, nous avons quantifié le nombre de mitochondries présentes chez les patients asymptomatiques, chagasiques modérés, chagasiques sévères, et chez des individus contrôles sains. Pour cela nous avons quantifié par PCR deux gènes marqueurs mitochondriaux (ND1 et COX1) dans le tissu cardiaque et le sang du patient. On retrouve une réduction significative du nombre de mitochondries chez les patients CCC comparés aux individus sains dans les tissus cardiaques et non dans le sang, ce qui pourrait souligner une spécificité du tissu.

Nous avons ensuite recherché des variants génétiques rares présents plus fréquemment chez les patients CCC que chez les contrôles sains en se basant sur

l'hétéroplasmie. Pour cela, un séquençage direct (Hi-SNPseq) a été effectué sur des tissus cardiaques d'individus sains (n=6) et de patients atteints de CCC (n = 36) et l'ensemble des mutations nous ont permis de rechercher les haplogroupes mitochondriaux des individus (lignées ancestrales, soit les différentes populations humaines). Du fait de la faible taille de la cohorte, nous avons décidé d'ajouter deux cohortes à notre analyse pour avoir une meilleure puissance statistique. L'analyse a ainsi été réalisée sur 38 patients asymptomatiques, 74 CCC (34 modérés et 36 sévères) et 289 individus sains brésiliens obtenue Whole Genome Sequencing sur du sang. L'étude de l'haplogroupe a indiqué que les haplogroupes africains étaient surreprésentés dans les groupes de sujets atteints de la maladie de Chagas par rapport aux individus brésiliens en bonne santé. Nous avons mis en évidence que la lignée européenne est associée à une protection contre la cardiomyopathie mais que le macro-haplogroupe européen H est associé à un risque accru de CCC.

Nous avons également mis en évidence 712 variants significativement associés à une des formes de la maladie (asymptomatique, CCC modéré ou CCC sévère). On retrouve 84 variants non synonymes localisés dans 12 gènes mitochondriaux, annotés comme pathogéniques dans différentes bases de données et 4 sont déjà connus pour être impliqués dans les maladies cardiaques.

L'ensemble des résultats démontre que certains variants mitochondriaux semblent participer au déterminisme génétique des cardiomyopathies chagasiennes chroniques et que la même analyse pourrait être effectuée sur d'autres types de cardiomyopathies.

Dans cet article j'ai mis au point toutes les manipulations de qPCR et j'ai participé à la rédaction de l'article.

Mitochondrial DNA haplogroups and variants predispose to Chagas disease cardiomyopathy

Frederic Gallardo^{1,*}, Pauline Brochet^{1,*}, David Goudenège², João Paulo Silva Nunes^{1,3,4,5}, Pauline Andrieux¹, Barbara Maria Ianni³, Amanda Farage Frade^{3,4,5}, Charles Mady³, Ronaldo Honorato Barros Santos⁶, Andriela Kuramoto³, Samuel Steffen^{6,7}, Antonio Noedir Stolf⁷, Pablo Pomerantzeff⁸, Alfredo Inacio Fiorelli⁷, Edimar Alcides Bocchi⁷, Cristina Wide Pissetti⁹, Bruno Saba¹⁰, Fabrício C Dias¹¹, Marcelo Ferraz Sampaio¹⁰, Fabio Antônio Gaiotto^{6,7}, José Antonio Marin-Neto¹¹, Abílio Fragata¹⁰, Ricardo Costa Fernandes Zaniratto³, Sergio Siqueira¹², Giselle De Lima Peixoto¹², Fernando Bacal⁶, Paula Buck⁸, Rafael Ribeiro Almeida^{3,4,5}, Hui Tzu Lin-Wang¹⁰, André Schmidt¹¹, Mario Hiroyuki Hirata¹⁵, Eduardo Antonio Donadi¹¹, Alexandre Costa Pereira⁸, Virmondos Rodrigues Junior⁹, Martino Martinelli¹², Michel Naslavsky^{16,17}, Jorge Kalil^{3,4,5}, Vincent Procaccio^{2,**}, Edecio Cunha-Neto^{3,4,5,**,c} and Christophe Chevillard^{1,**,c}

1. Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche (UMR) U1090, Aix Marseille Université, TAGC Theories and Approaches of Genomic Complexity, Institut MarMaRa, Marseille, France.
2. Department of Genetics, University Hospital of Angers, 49933 Angers, France.
3. Laboratory of Immunology, Heart Institute Instituto do Coração (InCor), University of São Paulo, School of Medicine, São Paulo, Brazil.
4. Division of Clinical Immunology and Allergy, University of São Paulo, School of Medicine, São Paulo, Brazil.
5. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, INCT, III- Institute for Investigation in Immunology, São Paulo, Brazil.
6. Division of Transplantation, Heart Institute Instituto do Coração (InCor), University of São Paulo, School of Medicine, São Paulo, Brazil.
7. Division of Surgery, Heart Institute Instituto do Coração (InCor), University of São Paulo, School of Medicine, São Paulo, Brazil.
8. Heart Institute (InCor), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil.
9. Laboratory of Immunology, Universidade Federal Do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Brazil.
10. Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia, Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese (IDPC), São Paulo, Brazil.
11. School of Medicine of Ribeirão Preto Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.
12. Pacemaker Clinic, Heart Institute Instituto do Coração (InCor), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
13. Heart Failure Unit, Heart Institute Instituto do Coração (InCor) School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
14. Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.
15. Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.
16. Human Genome and Stem Cell Research Center, Biosciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
17. Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil.

Name and complete address for correspondence: Edecio Cunha Neto, MD, PhD, Laboratório de Imunologia, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 44 - Bloco II, 9º andar - 05403-000 São Paulo, SP, Brasil; Fax number: +55 11 2661-5953 / Telephone number: +55 11 2661-5914/5906 / E-mail address: edecunha@gmail.com; Christophe Chevillard, PhD, Theories and Approaches of Genomic Complexity (TAGC), INSERM, Aix Marseille University, UMR_1090, Parc Scientifique de Luminy, case 928, 163 avenue de Luminy, 13288 Marseille, France; Fax number: +33 491828701 / Telephone number: +33 491828736 / E-mail address: christophe.chevillard@univ-amu.fr

** Authors had an equal contribution.

** Authors had an equal contribution.

C Corresponding authors

Abstract

Cardiomyopathies are major causes of heart failure. Chagas disease (CD) is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, and it is endemic in Central, South America. Thirty percent of the cases evolve into chronic cardiomyopathy (CCC) with worse prognosis as compared with other cardiomyopathies. In vivo bioenergetic analysis and ex vivo proteomic analysis of myocardial tissues highlighted worse mitochondrial dysfunction in CCC, and previous studies identified nuclear-encoded mitochondrial gene variants segregating with CCC. Here, we assessed the role of the mitochondrial genome through mtDNA copy number variations and mtDNA haplotyping and sequencing from heart or blood tissues of severe, moderate CCC and asymptomatic/indeterminate Chagas disease as well as healthy controls as an attempt to help decipher mitochondrial-intrinsic genetic involvement in Chagas disease development. We have found that mtDNA copy number was significantly lower in CCC than in heart tissue from healthy individuals, while blood mtDNA content was similar among asymptomatic Chagas disease, moderate and severe CCC patients. MtDNA haplogrouping study has indicated that African haplogroups were over represented in the Chagas subject groups in comparison with Brazilian healthy individuals. The European lineage is associated to protection against cardiomyopathy and the macro haplogroup H is associated with increased risk towards CCC. By mitochondria DNA sequencing, 84 mtDNA-encoded protein sequence pathogenic variants were associated with CCC. Among them, two variants were associated to left ventricular non-compaction and two to hypertrophic cardiomyopathy. The finding that mitochondrial protein-coding SNPs and mitochondrial haplogroups associate with risk of evolving to CCC is consistent with a key role of mitochondrial DNA in the development of Chronic Chagas disease Cardiomyopathy.

Keywords: chagas; cardiomyopathy; mitochondria; haplogroups; variants; copy-number

1. Introduction

Cardiomyopathies are a heterogeneous group of myocardial diseases associated with mechanical or electrical dysfunction that usually exhibit inappropriate ventricular hypertrophy or dilation. Dilated cardiomyopathy is one of the most common causes of heart failure (1) and the most common indication for heart transplantation worldwide, with an estimated prevalence of 40 cases per 100 000 individuals and an annual incidence of 7 cases per 100 000 individuals. Dilated cardiomyopathy occurs more often among people in the third or fourth decade of life. Indeed, patients with dilated cardiomyopathy generally appear asymptomatic in the early stages, but symptoms gradually emerge with age as the heart function starts to decline due to progressive loss of function in the cardiomyocytes, impairing normal heart function (2, 3).

It is now also admitted that adult males seem to be more frequently affected than adult females (2, 3). Although most cases of dilated cardiomyopathy are considered idiopathic, approximately 20 to 35%, or potentially up to 50% of patient cases, could be attributed to the genetic basis, called familial dilated cardiomyopathy (4). More than 100 genes have been associated to dilated cardiomyopathies (5-8). Myocardial energy deprivation is a main feature of cardiomyopathies and heart failure, and multiple evidences indicate this is caused by mitochondrial dysfunction. Because the heart is an organ requiring a high energy demand, regulation of mitochondrial metabolism plays an important role in the pathogenesis of dilated cardiomyopathies. During the first stages of dilated cardiomyopathies, increased mitochondrial proliferation acts as a compensating mechanism for maintaining energy supply (9). However, the number of mitochondria declines during dilated cardiomyopathy progression

leading to a reduction in ATP, decreased contractility and increased reactive oxidative species (ROS) all of which resulting in diastolic dysfunction and heart failure (10). In many cases mitochondrial cardiomyopathies have an underlying genetic component resulting in mitochondrial respiratory chain deficiencies (11-13), including fatty acid oxidation (11) or cardiolipin synthesis defects (14-16) and alterations of mitochondrial dynamics (11). Mitochondria are under dual genome control, where a small fraction of mitochondrial proteins are encoded by mitochondrial DNA (mtDNA), while more than 99% of them are encoded by nuclear DNA (nDNA). Mutations in over 250 mitochondria-related nDNA or mtDNA genes have been associated with mitochondrial disease, resulting in mitochondrial dysfunction leading to insufficient energy production required to meet the needs for organs with high energy requirements (17).

Cardiac involvement occurs in mitochondrial diseases, with cardiomyopathies being one of the most frequent cardiac manifestations found in these disorders occurring in 20–40% of patients. Mitochondrial cardiomyopathies can vary in severity from asymptomatic status to severe manifestations including heart failure, arrhythmias, and sudden cardiac death (11). MtDNA polymorphisms that have occurred over evolutionary time have permitted a distribution of mtDNA variants into mitochondrial haplogroups inherited from the maternal lineage, and these haplotypes may influence mitochondrial function (18).

Chagas disease (CD) is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, and it is endemic in Central, South America, and Mexico. The clinical course of the disease comprises an acute phase, mostly asymptomatic, and a chronic phase, where 60% of the patients remain asymptomatic. Forty percent of the cases evolve into gastrointestinal disease and chronic cardiomyopathy with varying degrees of severity including refractory heart failure (19). Antiparasitic treatment with benznidazole or nifurtimox is most effective in the acute phase and

prevents progression to chronic phase when given to children. However, these treatments had multiple adverse effects (20). Heart failure due to Chronic Chagas Cardiomyopathy (CCC) may have a worse prognosis with 50% shorter survival when compared to other cardiomyopathies of different etiologies such as ischemic cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy (21, 22). The major histopathological feature attending dilated cardiomyopathy in CCC is the presence of a diffuse myocarditis, with intense cardiomyocyte damage and hypertrophy, and significant fibrosis, in the presence of very scarce *T. cruzi* forms. The myocardial inflammatory infiltrate is thought to play a major role in disease development and progression (23, 24). The myocardial cytokine production profile suggests an IFN γ /TNF α Th1 type response, with interferon γ -induced chemokines (25-29). Moreover, our group has previously demonstrated that CCC myocardium presents a unique gene expression profile, distinct from other noninflammatory dilated cardiomyopathies, with a large number of interferon-gamma inducible genes among differentially expressed RNA (30, 31). The proteomic analysis of myocardial tissues revealed that CCC display a specific global protein expression profile. Pathway analysis of proteins differentially expressed in CCC highlighted mitochondrial dysfunction, cardiac hypertrophy, fibrosis, mitochondrial energy metabolism, fatty acid metabolism, the involvement of Creatine Kinase System and ATP Synthase Complex, variations of the mitochondrial membrane potential (mitochondrial $\Delta\Psi_m$) (32-35). IFN- γ and TNF- α treatment of the human cardiomyocyte cell line AC16 induces a dose-dependent reduction of mitochondrial $\Delta\Psi_m$ and mtDNA copy number, suggesting a possible inflammatory origin for mitochondrial dysfunction in CCC (33). IFN- γ and TNF- α treatment of AC-16 cardiomyocytes' mitochondria also induce an increased nitro-oxidative stress profile. The inhibition of STAT1/NF- κ B/NOS2 axis and activation of AMPK, NRF2 and SIRT1 signaling pathways promoted protective effects in the IFN- γ /TNF- α -induced impairment of mitochondrial $\Delta\Psi_m$ (36).

This finding is especially crucial since the mitochondrial $\Delta\Psi_m$ is the OXPHOS proton motive force that drives ATP production through ATP synthase is an essential mechanism for contraction and survival of cardiac cells (37). Gene and protein expression analyses in cytokine-treated AC-16 cardiomyocytes confirmed decreased levels of mitochondrial proteins involved in ATP generation, ion import and mitochondrial structural maintenance proteins and the overexpression of proteins involved in ATP catabolism and mitochondrial transition pore.

About 30% of Chagas disease patients develop CCC, suggesting the participation of modifier genes in differential disease progression. This was reinforced by the discovery of familial aggregation of cases of CCC in endemic area settings (38). Genetic susceptibility to CCC may result from functionally relevant genetic variants that lead to variations in the intensity of the innate or acquired immune response and in inflammatory cytokines and chemokines involved in the pathogenesis of the disease (39-41). Based on whole exome sequencing on multiple familial cases of Chagas disease, we have previously identified heterozygous, pathogenic variants linked to CCC in all tested families on 22 distinct nuclear-encoded genes, from which 20 were mitochondrial or inflammation-related - most of the latter involved in proinflammatory cytokine production (42). So, mitochondrial dysfunction and inflammation may be genetically determined in CCC, driven by rare genetic variants which increase mitochondrial susceptibility to IFN- γ -induced damage in the myocardium. Mutations in the mitochondrial genome accumulate over time in organs suffering mitochondrial dysfunction, resulting in decreased energy production and reactive oxygen species (ROS) overproduction. Defective copies of mtDNA might accumulate over time, raising the overall heteroplasmy level of deleterious mutations. Heteroplasmy is the concurrence of both normal (wt) and abnormal (mutant) mtDNA within one cell. In general, the level of mitochondrial dysfunction is commensurate

with the mutational load of mtDNA within the tissue or cell.

In this paper, we assessed the role of the mitochondrial genome through mtDNA copy number variations and mtDNA haplotyping and sequencing from heart or blood tissues of severe, moderate CCC and asymptomatic/indeterminate Chagas disease as well as healthy controls as an attempt to help decipher mitochondrial-intrinsic genetic involvement in Chagas disease development.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Tissue Collection

Human left ventricular free wall heart tissue samples were obtained from patients with end-stage heart failure CCC at the time of heart transplantation (n = 34). These CCC patients underwent serological diagnosis of *T. cruzi* infection and standard electrocardiography and echocardiography, and tissues were subject to histopathological assessment (43). Biopsies from controls (n = 6) were obtained from healthy hearts of organ donors having no suitable recipient. The protocol was approved by the institutional review boards of the University of São Paulo School of Medicine and INSERM (French National Institute of Health and Medical Research). Written informed consent was obtained from all patients. All experimental methods comply with the Helsinki Declaration.

2.2. Heart tissue and blood DNA isolation

Heart tissue samples were crushed twice with lysis buffer. After proteinase K treatment, DNA was extracted with QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. For each subject, 5 to 15 ml of blood were collected into EDTA tube. Genomic DNA was isolated with FlexiGene DNA kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations.

2.3. Mitochondrial DNA copy number quantification

The Quantitative PCR (qPCR) was conducted using SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific), 1 ng of template DNA and primers for mitochondrial-encoded genes NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit 1 (MT-ND1), cytochrome c oxidase subunit 1 (MT-COXI). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the endogenous control. The qPCR reactions were done in QuantStudio 12K (Applied Biosystem) with the following cycling program, 1 cycle of 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 50°C for 2 min, 95°C for 15s, and 60°C for 1 min. The ratio of mtDNA/nDNA was calculated using the formula $2^{2\Delta\Delta CT}$ (44). The primer sequences were: MT-ND1 forward: 5' ATACCATGGCCAACCTCCT 3', MT-ND1 reverse: 5' GGGCCTTTGCGTAGTTGTAT 3'; MT-COXI forward: 5' TCCAC-TATGTCCTATCAATA 3', MT-COXI reverse: 5'GGTGTAGCCTGAGAATAG 3'; GAPDH forward: 5' CCCTGTCCAGTTAATTC 3', GAPDH reverse: 5' CACCCTTTAGGGAGAAAA 3'.

2.4. Mitochondrial haplogroup determination

Mitochondrial haplogroups were determined according to MITO-MASTER tool (https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITO_MASTER/WebHome) which used HaploGrep2 with Phylotree 17 for haplogroup determination. Mitochondrial DNA genotyping was assessed using four different methods:

PCR amplicon sequencing: The genomic DNA was amplified by PCR. The primer sequences were: HmtL15997: 5' CACCATTAGCACCCAAAGCT 3', HmtH112: 5' ACAGATACTGCGACATAGGG 3'. PCR amplifications were carried out with GoTaq polymerase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and 1µM of each primer. 50µl reactions were carried out on Eppendorf thermocycler. The PCR products were loaded on agarose gel and purified with QIAEXII gel extraction kit (Qiagen) before Sanger sequencing. Sanger sequencing of the PCR amplicon was done with the same primers.

Direct sequencing: Hi-SNPseq, provided by CD Genomics, combines multiplex PCR and high-throughput sequencing (CD Genomics, Shirley, USA). Multiplex PCR amplification was done with 110 site-specific primers in two single tubes. These two reactions comprise the entire library covering the whole mtDNA sequence. Then, the amplicon pooled samples were purified to remove polymerase, primers, and short by-products. Different samples were distinguished by different barcoded primers. After mixing the samples, high-throughput sequencing was performed (pair ends 150). The sequences were aligned on the reference rCRS genome.

Whole Exome sequencing: Library preparation (Agilent SureSelect Hu-man All Exon V6) and sequencing steps were commissioned to Genewiz (Leipzig, Germany). Raw BCL files generated by the sequencer were converted to fastq files for each sample using bcl2fastq v.2.19. Sequence reads were trimmed to remove possible adapter sequences and nucleotides with poor quality using Trimmomatic v.0.38. The sequences were aligned on the reference rCRS genome.

Whole genome sequencing: For the Brazilian reference population (45), high-coverage WGS data were aligned on the human reference hg38 genome. For each sample, variant calling was done using the Genome Analysis Toolkit 4 (GATK4). Based on the mitochondria variants a mitochondria specific bam file.

2.5. Variant annotations

Sequencing data analysis was performed using a homemade nextflow pipeline that integrates all the classical NGS steps for molecular diagnosis. Mapping and quality control was done using BWA (46) and FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) respectively. Base recalibration, base quality score recalibration and duplicate marking processed with elPrep (47). Variant calling combines the results of GATK Mutect2 (48) in mitochondrial mode and Strelka2 (49). Variant annotation and

prioritization were performed using an in-house tool KerMit that integrates various mitochondrial dedicated tools and databases like MITOMAP, HmtDB, ClinVar, MitoTip and HaploGrep for haplogroup prediction. Mitochondrial deletions were searched using eKLIPse (50).

2.6. Statistical analysis

All the statistical tests have been made using R 3.6.3. A first comparison on the presence/absence of genetic variants between two groups was carried out using the chi2 and fisher tests. A second analysis, based on allelic frequency, was done with a Kruskal Wallis test between all groups, and then with a Dunn test comparing phenotypes two by two using the rstatix R package. All the plots have been done with the ggplot2 R package.

Differences between groups are evaluated by statistical tests (Chi2 test with Yate's correction, Fisher's exact test, Kruskal Wallis test) using GraphPad Prism 9.3.0. Asterisk and the sharp sign (*) indicate p-value <0.05, (**p-value <0.001, (***) p-value <0.0001.

3. Results

3.1. MtDNA copy number is reduced in heart of Chagas patients

The quantification of mtDNA copy number was evaluated on heart tissue samples from end stage patient heart tissues (n=33) and on healthy hearts of organ donors having no suitable recipient (n=6) (Supplementary Table S1). MtDNA copy number using (MT-ND1) was significantly lower in CCC (MT-ND1 39%; p= 0.0034) than control samples (Figure 1A) indicating a reduction of mtDNA copy number. Mitochondrial DNA (MT-COX1) gave a similar result (37%; p= 0.0019) (Figure 1B).

The mtDNA copy number was also evaluated in DNA extracted from blood of asymptomatic subjects (n=209), moderate CCC patients (n=235) and severe CCC patients (n=168) (Supplementary Table S2). The age of the individuals which ranges from 40 to 60 years old, was similar among the three groups (Figure 2A). As shown on Figure 2B and 2C, the mtDNA content (and therefore mitochondrial mass) was similar between the three groups. So, the

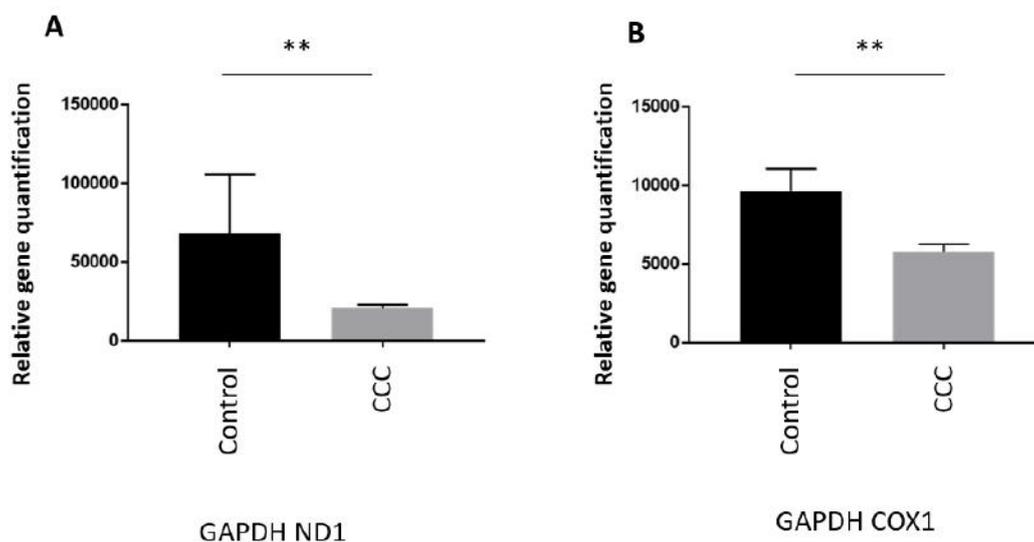


Figure 1. Mitochondrial DNA quantification in heart tissues. We performed qPCR with primers for mitochondrial encoded genes NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit 1 (MT-ND1), cytochrome c oxidase subunit 1 (MT-COXI) and endogenous nuclear-encoded control gene Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The relative quantification of mitochondrial DNA was calculated by determining the $\Delta Ct = Ct(\text{endogenous nuclear-encoded control gene}) - Ct(\text{mitochondrial encoded genes})$ and then using the formula $2^{\Delta Ct}$.

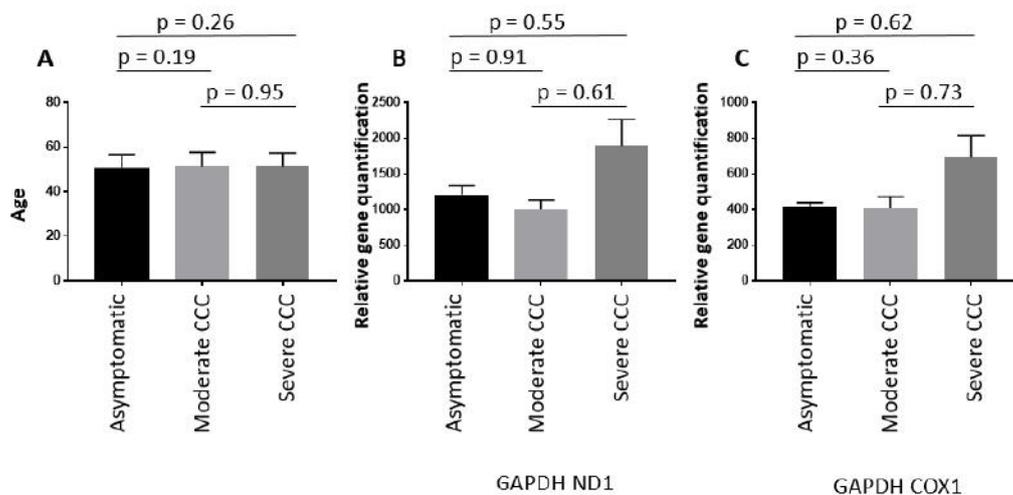


Figure 2. Mitochondrial DNA quantification in blood DNA samples.

decrease of the mitochondrial mass detected on heart biopsies seems to be tissue specific.

This quantification was done on blood DNAs from patients between 40 and 60 years old. These patients were either asymptomatic for Chagas disease, or developed chronic cardiomyopathy stratified as moderate or severe based on left ventricular ejection fraction values [moderate CCC ($0.40 < EF < 1$) and severe CCC ($0 < EF < 0.40$)].

3.2. African and European haplogroups are associated to CCC development

Human mtDNA haplogroups and their distributions have been extensively investigated across different nations and geographical regions, predominantly to define population origins and genetic structure. The rate at which mtDNA mutates is known as the mitochondrial molecular clock. The entire mtDNA was sequenced from 26 end stage heart tissue samples and 6 healthy hearts of organ donors. Table 1 describes the mitochondrial haplogroup line-age distribution between both groups.

Haplogroup lineage	End stage heart tissue samples (CCC)	Healthy hearts of organ donors (control)
African	19 (73%)	4 (67%)
European	4 (15%)	0 (0%)
Native American/Asian	2 (8%)	1 (17%)
Eurasian	1 (4%)	1 (17%)

Table 1. Haplogroup distribution in heart tissue samples.

This distribution suggests that African and European lineages may be enriched in end stage CCC patients compared to healthy controls. However, due to the limited size of our study group, the difference was not statistically significant.

In order to investigate this haplogroup distribution, a larger collection of blood DNA was then investigated. It included CCC patients ($n=321$), asymptomatic subjects ($n=38$) and we had access to a census-based sample of elderly individuals from São Paulo (Brazil) (Supplementary Table S3). This latest reference population includes 1171 healthy individuals (45). For each of them, the WGS was available and mitochondrial haplogrouping was assessed in a group of 289 individuals selected randomly from this cohort. The three main lineages were African, European and Native American/Asian (Figure 3). Chagas individuals (asymptomatic or with Chronic Chagas Cardiomyopathy) were compared to healthy controls, percentage of African lineage in healthy individuals reached 27% whereas this percentage was 55% in the Chagas patient groups. The Chi-square test with Yates' correction was significant ($p < 0.0001$) with a relative risk of 2.004. This may imply that Chagas patients have a higher African mother lineage than healthy elderly individuals from the state of São Paulo, Brazil.

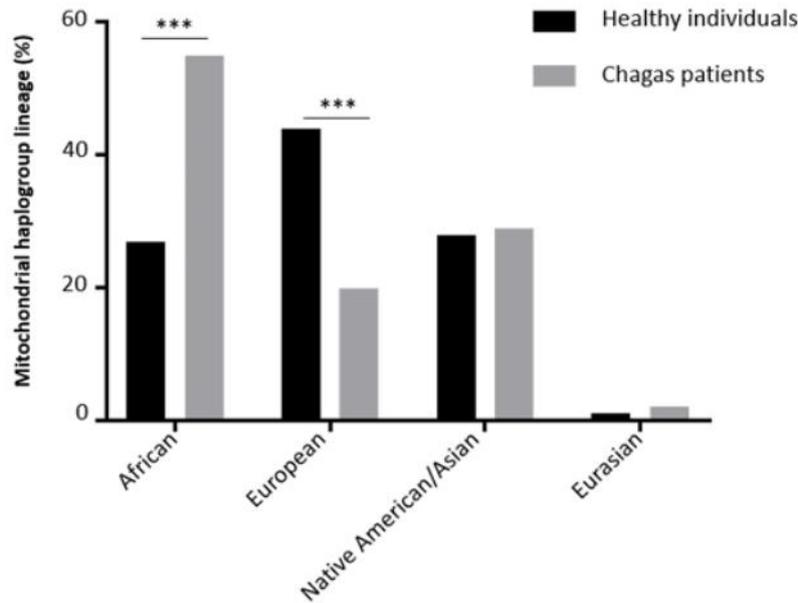


Figure 3. Mitochondrial haplogroup distribution between the healthy Brazilian reference population and the Chagas cohort.

The percentage of European lineages in healthy individuals reached 44% whereas this percentage was 18% in the Chagas subject groups. The Chi-square test with Yates' correction gave a significant p value ($p < 0.0001$) for a relative risk of 0.5292 (Figure 3).

We then stratified the Chagas subject group, in the asymptomatic/indeterminate subjects, the moderate CCC ($0.40 < EF < 1$) and severe CCC ($0 < EF < 0.40$) patients. The percentage of each lineage in each subgroup is shown on Figure 4. The African lineage was more represented in the asymptomatic sub-group than the CCC patient

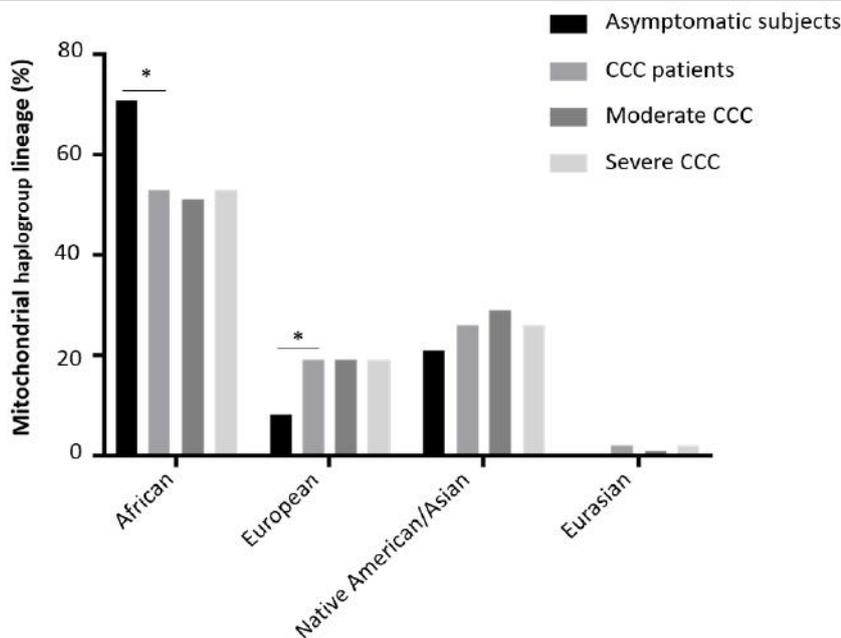


Figure 4. Mitochondrial haplogroup distribution among the Chagas cohort.

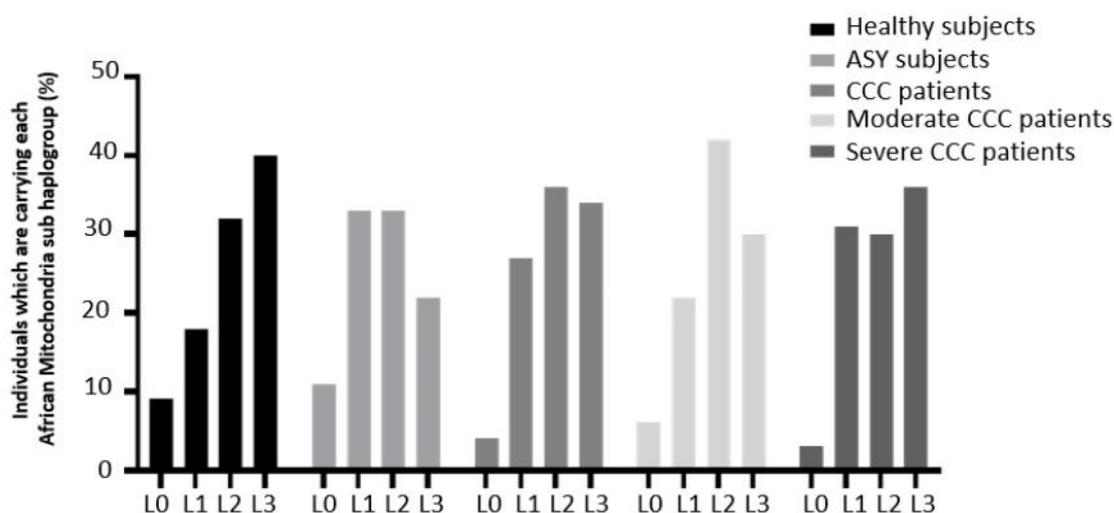


Figure 5. African mitochondrial sub-haplogroup distribution in the Chagas cohort.

subgroup (71% vs 53%) ($p=0.04$). Similarly, the European lineage was overrepresented in the CCC patient sub-group (7.9% vs 18.7%) but this difference was not significant ($p=0.12$).

Focusing on African sub-haplogroups, the distribution was compared between ASY subjects, CCC patients, moderate CCC patients and severe CCC patients (Figure 5). This African sub-haplogroup distribution was not significantly different between the study groups (Supplementary Table S4).

However, the percentage of L0 sub-haplogroup in ASY individuals reached 11% whereas this percentage was 4% in the CCC patient group. The percentage of L3 sub-haplogroup in ASY individuals reached 22% whereas this percentage was 33% in the CCC patient group. It may suggest that the L0 sub-haplogroup has a protective effect whereas the L3 sub-haplogroup may act as a disease mark. In the same way, the European sub-haplogroup distribution was similar between the CCC study groups (Figure 6). However, when we compared the

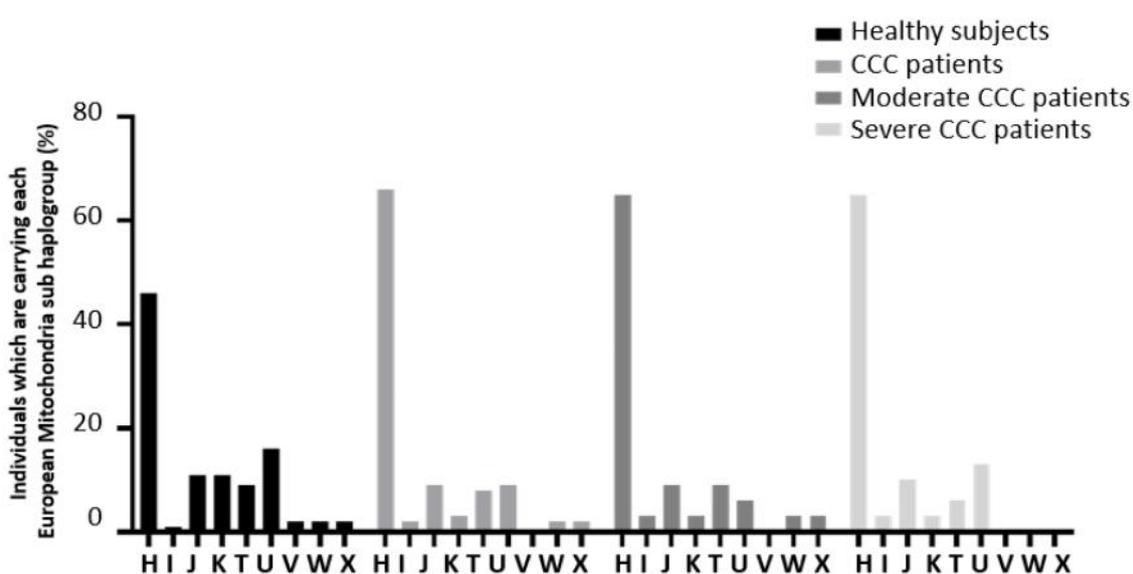


Figure 6. European mitochondrial sub-haplogroup distribution in the Chagas cohort.

frequency of the European H sub-haplogroup, we detected some trends of association Table 2.

Groups	p Value	Relative Risk
Healthy individuals versus chagas patients	0.01	0.76
Healthy individuals versus moderate chagas cardiomyopathy patients	0.06	0.85
Healthy individuals versus severe chagas cardiomyopathy patients	0.07	0.86

Table 2. European haplogroup H association study

3.1. Mitochondria variants may contribute to CCC

Whole mtDNA sequencing was performed on 112 samples (Supplementary Table S5). It included 38 asymptomatic subjects and 74 CCC patients. Among the CCC patients, 34 patients suffered from moderate cardiomyopathy whereas 36 patients had a severe cardiomyopathy.

Sequences obtained from on 112 samples were aligned according to the Cambridge Reference Sequence (rCRS). 12429 variants were detected. Three analyses were done. First of all, we compared the number of carriers of each variant between each group (ASY vs CCC; ASY vs Moderate CCC; ASY vs Severe CCC and Moderate CCC vs Severe CCC) (Supplementary Table S6). We also compared the heteroplasmy levels between the three groups (Kruskal Wallis between ASY, moderate CCC and severe CCC). Finally, we compared the heteroplasmy levels between the groups (two by two: ASY vs CCC;

ASY vs Moderate CCC; ASY vs Severe CCC and Moderate CCC vs Severe CCC) (Supplementary Table S7). All these tests were corrected for multiple testing. 712 variants showed significant results in at least one test (adjusted p value < 0.05).

We annotated the associated variants, based on available information in VEP ClinVar, MitoMap and MitImpact databases (Supplementary Table S8 and S9). These variants are either located in intergenic region (n=220; 30.8%) or in coding region (n=493; 69.2%). Among these variants, only 84 variants change the protein sequence (Table 3). These protein sequence variants are enriched in a limited number of genes (MT-ND5 (n=21), MT-CYB (n=15), MT-ATP6 (n=11), MT-CO3 (n=8), MT-CO1 (n=7), MT-ND4 (n=6), MT-ATP8 (n=5), MT-ND6 (n=4) MT-ND4L (n=2), MT-ND1 (n=2), MT-CO2 (n=2), MT-ND2 (n=1)). The pathogenicity of each variant was defined with MitImpact which aggregate 24 databases (Clinvar, PolyPhen2, SIFT, FatHmW, FatHm, PROVEAN, Mutatioessor, EFIN_SP, EFIN_HD, CADD, VEST, PANTHER, PhDSNP, SP, MutationTaster, SNPdryad, Condel, COVEC_WMV, MtoolBox, APOGEE, DEOGEN2, PolyPhen2 transf, SIFT transf, Mutatioessor transf) (51). All the 84 protein modifier variants were classified as pathogenic in at least one database. 16 protein modifier variants were classified as pathogenic in more than 10 databases.

Pos	Ref	Alt	Csq	Gene symbol	dbSNP ID	Uniprot name	Uniprot ID	AA pos	AA ref	AA alt	Described as pathogenic in the following databases.
3565	A	C	RNA	MT-ND1		NU1M	P03886	87	T	P	PolyPhen2, SIFT, PROVEAN, CADD, PhDSNP, SP, COVEC_WMV, MtoolBox
3579	A	C	RNA	MT-ND1		NU1M	P03886	91	M	I	CADD, PhDSNP, MutationTaster, SNPdryad, Condel
5262	G	A	RNA	MT-ND2		NU2M	P03891	265	A	T	CADD, PANTHER, Condel,
6571	C	T	RNA	MT-CO1		COX1	P00395	223	A	V	PROVEAN, EFIN_SP, CADD, PhDSNP, MutationTaster, Condel, PolyPhen2 transf
6873	C	T	RNA	MT-CO1		COX1	P00395	324	L	F	PolyPhen2, SIFT, Mutatioessor, EFIN_SP, EFIN_HD, CADD, PANTHER, PhDSNP, MutationTaster, COVEC_WMV, MtoolBox, Mutatioessor transf
6899	G	C	RNA	MT-CO1	rs1556423194	COX1	P00395	332	M	I	Condel, PolyPhen2 transf, SIFT transf
6909	G	T	RNA	MT-CO1		COX1	P00395	336	A	S	SIFT, CADD, PhDSNP
6915	G	A	RNA	MT-CO1	rs1603220687	COX1	P00395	338	V	M	Condel, PolyPhen2 transf, SIFT transf

7008	G	T	RNAMT-CO1		COX1	P00395	369	D	Y	PolyPhen2, SIFT, FatHmm, PROVEAN, MutatiOSSessor, EFIN_SP, EFIN_HD, CADD, PANTHER, PhDSNP, SP, MutationTaster, SNPDRyad, COVEC_WMV, MtoolBox, APOGEE, MutatiOSSessor transf	
7072	T	C	RNAMT-CO1	rs1603220760	COX1	P00395	390	M	T	PolyPhen2, SIFT, EFIN_HD, CADD, PhDSNP, SP, MutationTaster, COVEC_WMV, MtoolBox	
7868	C	T	RNAMT-CO2	rs1556423357	COX2	P00403	95	L	F	PROVEAN, CADD, PANTHER, PhDSNP, Condel, PolyPhen2 transf	
8021	A	G	RNAMT-CO2	rs1603221261	COX2	P00403	146	I	V	Condel, PolyPhen2 transf	
8401	A	C	INT	MT-ATP8	ATP8	P03928	12	M	I	Condel, SIFT transf	
8405	A	G	INT	MT-ATP8	rs1603221462	ATP8	P03928	14	T	A	Condel, PolyPhen2 transf
8527	A	G	RNA	MT-ATP6	rs878853003	ATP6	P00846	1	M	V	PolyPhen2, MtoolBox
8558	C	G	RNA	MT-ATP8	ATP8	P03928	65	P	A	PolyPhen2, FatHmm, PROVEAN, CADD, SP, COVEC_WMV, MtoolBox	
8558	C	G	RNA	MT-ATP8	ATP6	P00846	11	A	G	CADD, PANTHER, PhDSNP	
8566	A	G	RNA	MT-ATP6	rs3020563	ATP6	P00846	14	I	V	SP, Condel
8568	C	T	RNA	MT-ATP8	rs1603221589	ATP8	P03928	68	S	F	PolyPhen2, FatHmm, EFIN_HD, CADD, SP, MtoolBox
8618	T	C	RNA	MT-ATP6	rs28358885	ATP6	P00846	31	I	T	Condel
8632	T	C	RNA	MT-ATP6	rs1603221654	ATP6	P00846	36	Y	H	PANTHER, Condel, PolyPhen2 transf
8677	A	C	RNA	MT-ATP6	ATP6	P00846	51	K	Q	Condel, PolyPhen2 transf	
8714	C	T	RNA	MT-ATP6	rs1603221724	ATP6	P00846	63	T	I	FatHmm, PANTHER, Condel
8795	A	C	RNA	MT-ATP6	ATP6	P00846	90	H	P	PolyPhen2, SIFT, PROVEAN, CADD, PANTHER, PhDSNP, SP, SNPDRyad, COVEC_WMV, MtoolBox	
8854	G	A	RNA	MT-ATP6	rs386829055	ATP6	P00846	110	A	T	SIFT, CADD, PANTHER, PhDSNP, Condel
8860	A	G	RNA	MT-ATP6	rs2001031	ATP6	P00846	112	T	A	PROVEAN, PhDSNP, SP, Condel, PolyPhen2 transf
8870	T	C	RNA	MT-ATP6	rs1556423560	ATP6	P00846	115	M	T	Condel, PolyPhen2 transf
8875	T	C	RNA	MT-ATP6	rs201123510	ATP6	P00846	117	F	L	Condel, PolyPhen2 transf
9261	A	C	RNAMT-CO3		COX3	P00414	19	T	P	PolyPhen2, PROVEAN, EFIN_SP, CADD, PhDSNP, SP, SNPDRyad, MtoolBox	
9325	T	C	RNAMT-CO3	rs879000531	COX3	P00414	40	M	T	Condel, PolyPhen2 transf	
9717	C	G	RNAMT-CO3		COX3	P00414	171	L	V	Condel, PolyPhen2 transf	
9861	T	C	RNAMT-CO3	rs878853060	COX3	P00414	219	F	L	Condel, PolyPhen2 transf, SIFT transf	
9877	T	A	RNAMT-CO3		COX3	P00414	224	M	K	MutationTaster, Condel	
9880	T	A	RNAMT-CO3		COX3	P00414	225	F	Y	Condel, PolyPhen2 transf	
9896	A	C	RNAMT-CO3		COX3	P00414	230	K	N	Condel, PolyPhen2 transf	
9924	T	G	RNAMT-CO3		COX3	P00414	240	W	G	PolyPhen2, PROVEAN, MutatiOSSessor, EFIN_HD, CADD, VEST, PhDSNP, SP, SNPDRyad, COVEC_WMV, MtoolBox	
10677	G	A	RNA	MT-ND4L	rs1603222944	NU4LM	P03901	70	E	K	FatHmm, PROVEAN, MutatiOSSessor, EFIN_SP, CADD, PANTHER, PhDSNP, SP, MutationTaster, SNPDRyad, Condel, MtoolBox, MutatiOSSessor transf
10750	A	G	RNA	MT-ND4L	rs372297272	NU4LM	P03901	94	N	S	PROVEAN, PhDSNP, MutationTaster, Condel
10775	G	A	RNAMT-ND4	rs879015842	NU4M	P03905	6	V	I	Condel, PolyPhen2 transf, SIFT transf	
10808	C	T	RNAMT-ND4	rs2068723560	NU4M	P03905	17	L	F	CADD, Condel, MtoolBox	
10866	T	C	RNAMT-ND4	rs1603222994	NU4M	P03905	36	I	T	Condel	
10972	A	C	RNAMT-ND4		NU4M	P03905	71	W	C	PolyPhen2, SIFT, FatHmm, PROVEAN, MutatiOSSessor, EFIN_SP, EFIN_HD, CADD, PhDSNP, SP, SNPDRyad, COVEC_WMV, MtoolBox, APOGEE, MutatiOSSessor transf	
11129	A	G	RNAMT-ND4	rs1603223122	NU4M	P03905	124	T	A	Condel, SIFT transf	
11963	G	A	RNAMT-ND4	rs201803948	NU4M	P03905	402	V	I	Condel, PolyPhen2 transf, SIFT transf	
12341	C	A	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	2	T	N	Condel, PolyPhen2 transf	
12346	C	T	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	4	H	Y	Condel, PolyPhen2 transf, SIFT transf	
12368	C	T	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	11	T	I	FatHmm, PROVEAN, Condel, PolyPhen2 transf	
12403	C	T	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	23	L	F	Condel, PolyPhen2 transf	
12802	A	G	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	156	S	G	Condel	
13034	T	C	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	233	L	P	PolyPhen2, FatHmm, PROVEAN, MutatiOSSessor, EFIN_SP, EFIN_HD, CADD, PANTHER, PhDSNP, SP, MutationTaster, SNPDRyad, COVEC_WMV, MtoolBox, APOGEE, MutatiOSSessor transf	

13118	T	A	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	261	I	N	PolyPhen2, FatHmm, PROVEAN, MutatiOSSessor, EFIN_SP, CADD, PANTHER, PhDSNP, SP, SNPdryad, COVEC_WMV, MtoolBox, APOGEE, MutatiOSSessor transf
13145	G	A	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	270	S	N	Condel
13226	A	C	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	297	D	A	PolyPhen2, FatHmm, PROVEAN, MutatiOSSessor, EFIN_SP, CADD, PANTHER, PhDSNP, SP, MutationTaster, SNPdryad, COVEC_WMV, MtoolBox, APOGEE, MutatiOSSessor transf
13303	C	T	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	323	H	Y	PANTHER, PhDSNP, Condel, SIFT transf
13466	G	A	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	377	S	N	FatHmm, PANTHER, Condel
13476	A	T	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	380	L	F	PolyPhen2, FatHmm, PROVEAN, MutatiOSSessor, EFIN_SP, EFIN_HD, CADD, PANTHER, PhDSNP, SP, SNPdryad, COVEC_WMV, MtoolBox, APOGEE, MutatiOSSessor transf
13517	A	T	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	394	H	L	PANTHER, Condel, PolyPhen2 transf
13600	T	A	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	422	Y	N	PolyPhen2, FatHmmW, FatHmm, PROVEAN, MutatiOSSessor, EFIN_SP, CADD, PANTHER, PhDSNP, SP, SNPdryad, COVEC_WMV, MtoolBox, APOGEE, DEOGEN2, MutatiOSSessor transf
13614	A	T	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	426	M	I	Condel
13618	C	T	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	428	L	F	Condel, MtoolBox
13651	A	G	RNAMT-ND5	rs1569484594	NU5M	P03915	439	T	A	CADD, Condel, MtoolBox
13763	C	A	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	476	S	Y	PolyPhen2, PROVEAN, CADD, PANTHER, SP, Condel, MtoolBox, SIFT transf
13804	G	A	RNAMT-ND5	rs1603224360	NU5M	P03915	490	A	T	PolyPhen2, PROVEAN, CADD, PhDSNP, SP, SNPdryad, COVEC_WMV, MtoolBox
13816	A	C	RNAMT-ND5		NU5M	P03915	494	T	P	PolyPhen2, FatHmm, PROVEAN, MutatiOSSessor, CADD, PANTHER, PhDSNP, SP, SNPdryad, COVEC_WMV, MtoolBox, MutatiOSSessor transf
13886	T	C	RNAMT-ND5	rs28359182	NU5M	P03915	517	L	P	PhDSNP, Condel
14170	A	T	RNAMT-ND6		NU6M	P03923	168	I	M	PolyPhen2, MtoolBox
14172	T	G	RNAMT-ND6		NU6M	P03923	168	I	L	PolyPhen2, CADD, MtoolBox
14280	A	G	RNAMT-ND6		NU6M	P03923	132	S	P	FatHmm, PhDSNP, Condel
14562	C	T	RNAMT-ND6		NU6M	P03923	38	V	I	Condel
14757	T	C	RNAMT-CYB	rs1603224859	CYB	P00156	4	M	T	Condel, PolyPhen2 transf
14793	A	G	RNAMT-CYB	rs2853504	CYB	P00156	16	H	R	PhDSNP, SP, Condel, PolyPhen2 transf
14798	T	C	RNAMT-CYB	rs28357681	CYB	P00156	18	F	L	Condel, PolyPhen2 transf
14871	T	C	RNAMT-CYB	rs28660155	CYB	P00156	42	I	T	PROVEAN, PhDSNP, Condel, PolyPhen2 transf
14873	C	A	RNAMT-CYB		CYB	P00156	43	L	I	Condel
14881	C	G	RNAMT-CYB		CYB	P00156	45	I	M	PolyPhen2, FatHmm, PANTHER, PhDSNP, SP, MtoolBox
15077	G	A	RNAMT-CYB	rs201943501	CYB	P00156	111	E	K	PolyPhen2, PROVEAN, CADD, PhDSNP, SNPdryad, MtoolBox
15596	G	A	RNAMT-CYB	rs1603225369	CYB	P00156	284	V	I	Condel
15617	G	A	RNAMT-CYB	rs1556424625	CYB	P00156	291	V	I	PolyPhen2, CADD, PhDSNP, SP, COVEC_WMV, MtoolBox
15664	C	A	RNAMT-CYB	rs1603225414	CYB	P00156	306	I	M	CADD, Condel
15699	G	A	RNAMT-CYB		CYB	P00156	318	R	H	PolyPhen2, FatHmm, PROVEAN, MutatiOSSessor, EFIN_HD, CADD, PANTHER, PhDSNP, SNPdryad, COVEC_WMV, MtoolBox, MutatiOSSessor transf
15725	C	T	RNAMT-CYB	rs1603225438	CYB	P00156	327	L	F	PANTHER, Condel
15734	G	A	RNAMT-CYB	rs386829259	CYB	P00156	330	A	T	PhDSNP, Condel
15777	G	A	RNAMT-CYB	rs879182710	CYB	P00156	344	S	N	CADD, PhDSNP, Condel
15812	G	A	RNAMT-CYB	rs200336777	CYB	P00156	356	V	M	EFIN_SP, MutationTaster, Condel

Table 3. Annotation of the 84 protein modifier variants.

Among these 712 variants, 70 of them were associated to diseases (Supplementary Table S9). The 70 variants include 40 protein modifier variants. Among them, 2 were associated to Left Ventricular Non-Compaction disease and 2 to hypertrophic cardiomyopathy.

Discussion

We have found that mtDNA copy number in heart tissue was significantly lower in CCC than in healthy individuals, while blood mtDNA content was similar among asymptomatic Chagas disease, moderate and severe CCC patients. While mitochondrial haplogroup lineages of severe CCC patients and healthy heart donors were predominantly African, the percentage of African lineage was much higher among Chagas disease patients from the peripheral blood cohort than healthy individuals from the

census-based São Paulo reference population. Conversely, the percentage of the European lineage was under-represented among the Chagas disease cohort than the reference population. The African lineage was over represented in the asymptomatic subgroup when compared with the CCC patient subgroup. Regarding European major haplogroups, H haplogroup was more prevalent among Chagas patients than in the reference population. Whole mtDNA sequencing disclosed that 84 CCC-specific variants were non-synonymous pathogenic changes, some of them previously associated with heart disease.

Here, we have shown that heart from end stage CCC patients display lower mitochondrial DNA copy number than heart tissues from organ donors having no suitable recipient. This result was also consistent with our previous findings that CCC showed even lower mtDNA copy number than other non-inflammatory cardiomyopathies (36) and heart proteomic analysis done on myocardial tissue (32-35). The finding that mtDNA copy number in blood is comparable among Chagas disease clinical groups indicates that the mtDNA copy number variation is tissue specific, and therefore mitochondrial dysfunction detected in CCC hearts is tissue-specific. Indeed, mtDNA copy number variation is depending on cell-type (52). mtDNA copy number variations have been associated to multiple diseases including cardiovascular diseases such as Myocardial Infarction (53), cardiomyopathy, heart failure, and arrhythmias (53). However, our data indicate that blood mtDNA copy number is not a useful clinical biomarker for CCC.

Cardiac mitochondria provide the most ATP in the heart. Therefore, mitochondrial dysfunction is pivotal in heart diseases because of energy supply shortage and increased production of reactive oxidative species (ROS). So, maintaining optimal mitochondrial homeostasis is essential for cardiomyocytes. The total mitochondrial content is mainly controlled by biogenesis and mitochondria-specific autophagy for degradation (54). Damaged mitochondria are normally removed by

autophagy/lysosome machinery (55). Several studies described the importance of autophagy in parasite invasion (56). The most characterized mechanism of autophagy is the ATG5-, ATG7-, and LC3-mediated conventional autophagy pathway (57), recent studies have identified an Atg5/Atg7-independent pathway called alternative autophagy (58). In chronic Chagas patients, autophagy activity was not completely investigated. However, based on bulk RNA-seq we investigated the genetic deregulations present in the moderate and severe stages of CCC. Several genes, associated to mitophagy, are differentially expressed in CCC bulk tissues (such as ATG7, LC3, FIP200 and BECN1) (59). Severe CCC is associated to a myocardial inflammatory infiltrate and to an IFN γ /TNF α -rich Th1 type response (22-28). This exacerbated response will lead to ROS/NOS overproduction triggering mitochondrial damage and cardiomyocyte apoptosis. Defective mitophagy or autophagy may be associated to mtDNA release into the cytoplasm, outside of the cell, or into circulation. Circulating mtDNA enhances expression of type I interferons, and by NLRP3 inflammasome, which promotes the activation of pro-inflammatory cytokines Interleukin-1 β and Interleukin-18 (60). These trigger inflammatory responses in cardiomyocytes and may induce myocarditis, and dilated cardiomyopathy (61).

MtDNA haplogrouping study indicates that African haplogroups were over represented in the Chagas subject groups in compared to healthy individuals. Even if it is not statistically significant, the L0 African sub-haplogroup is more frequent in ASY individuals than in CCC patient groups. The L3 African sub-haplogroup is less frequent in ASY individuals than in the CCC patients. This sub-haplogroup distribution among the groups is consistent with the association of RNR1-921T/C which is a key marker of the L3 African sub-haplogroup. We cannot conclude that the African haplogroup is directly associated with an increased risk of developing severe chronic chagasic cardiomyopathy. It can be simply stated that individuals with African ancestry have a greater

chance of lower socioeconomic status that exposes them to parasitic diseases such as Chagas disease. Therefore, the percentage of patients with CCC in the African ethnic group increases. Conversely, the re-verse is observed for the European haplogroup. Our results suggest that Euro-pean macro haplogroup H is associated with increased risk towards CCC. This result agrees with previous work on dilated and hypertrophic cardiomyopathy (62-64). Significantly, intrinsic mitochondrial function has been re-ported in skeletal muscle myocytes from individuals carrying haplogroup H as compared to haplogroup U (18). This may imply that different haplogroups display distinct mitochondrial function profiles. In the case of Haplogroup H, it is possible to hypothesize that increased OXPHOS is associated with in-creased ROS production, which may lead to mitochondrial dysfunction and heart damage in CCC patients.

The two main types of mitochondrial DNA mutation are large deletion and point mutations, mostly maternally transmitted, with some de novo mutations have also been reported. Here, no deletion was associated to Chagas dis-ease. The finding of 84 mtDNA-encoded protein sequence pathogenic variants associated with CCC may indicate a role of mtDNA variants in CCC pathogenesis. At this level, the genetic contribution of each of them to the phenotype is undefined. It has been reported that mtDNA variants affect the expressivity of nDNA mutations, leading to experimental cardiomyopathy (65). The functional characterization is still an important bottleneck in mitochondrial dis-eases. Indeed, in the databases on mitochondrial variants, a very small pro-portion of these variants have been functionally characterized. Thus, for the vast majority of variants, indications of their functional implications remain putative. Moreover, as no clear variant is associated to disease here, may suggested an additive effet of the mt DNA variants. These studies are complicated by the fact that these variants have been shown to have incomplete penetrance (66). In addition, to complicate matters, mitochondrial

disorders are clinically heterogeneous diseases associated with germline mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) and/or nuclear DNA-encoded (nDNA) genes, with impaired mitochondrial structure and function. Therefore, mutations at the mtDNA or nDNA levels can have a variety of pathogenesis outcomes. We can thus postu-late a synergic effect between these mtDNA variants and nuclear DNA mitochondrial variants previously associated to CCC (42). The description and the characterization of these variants is essential to define a susceptibility poly-genic score analysis including all the associated variants.

When the proportion of harmful mtDNA variants reaches a critical level of heteroplasmy, the defects that can give rise to disease. The description of as-sociations of pathogenic variants to multiple diseases, raise the concept of mitochondria genome editing technology. Gene editing technologies, commonly used for nuclear variants, are not so obvious to apply to mitochondria variants. The first approach leads to decrease the amount of variant mtDNA in mitochondria by specifically targeting and cleaving the mutant mtDNA molecules. Double-strand breaks in mutated mtDNA induce the rapid degradation of the linearized molecule. The residual mtDNA, mostly wild-type, replicates and the heteroplasmy level decreases. The critical point in this approach is the efficiency of the nucleases (mitoREs, mtZFNs, mitoTALENs) (67-69). The development of mitochondria targeted CRISPR/Cas9 systems has been hampered by the lack of efficiency to import guide RNA (gRNA) into the mitochondrial matrix (70, 71). The second approach does not try to decrease the heteroplasmy level but simply to correct the mutated base (72). This concept has been recently described by Kar et al. (73).

There is no cure available for mitochondrial diseases owing to the different genes and phenotypes associated with the cause of such disorders. Nevertheless, few symptomatic treatments have been proven by clinical trials as palliative therapies in the last decade. A mitochondrial cocktail, i.e. a

combination of vitamins, cofactors, nutrients and antioxidants, may alleviate symptoms, limit disease progression, and overcome mitochondrial toxins. In the short term, specific dietary restrictions have been shown to ameliorate mitochondrial health in patients with mitochondrial disorders. Thus, high-carbohydrate diet increases oxidative stress, perhaps for individuals with im-paired oxidative phosphorylation (74). The ketogenic diet (high-fat diet) has been shown to be beneficial for patients with pyruvate dehydrogenase deficiency, but not for pyruvate carboxylase deficiency and in the treatment of fatty acid oxidation disorders (75). Individuals with disorders of the respiratory chain could be treated with agents that enhance electron transport and substrate delivery and bypass of its components. For example, CoQ10 supplementation and have been shown to reduce high lactate levels after exercise and in-crease oxygen consumption (76, 77). A diet rich in vitamins and amino acids can be used as a source of redox agents and intracellular buffers for ATP (78). For stroke-like episodes, myopathy, diabetes and lactic acidosis a treatment using natural NO precursors (e.g. arginine and citrulline) was found to restore NO production (74, 79, 80).

Our results are consistent with our previous data based on proteomic, transcriptomic and genetic analyses (27, 33, 35, 36, 42, 59, 81-83). Mitochondrial dysfunction is clearly related to the compromise of mitochondria's ability to make appropriate levels of ATP and to an enhanced formation of reactive oxygen species (ROS). This dysfunction may be the result of mtDNA or nDNA variants, but may also occur as a response to aging and various disease and environmental stresses, leading to the development of cardiomyopathies (CMs), ROS accumulation and cell death. Mitochondrial dysfunction can have a direct deleterious effect on the contractile capacity of myocardial cells. Defects in mitochondrial regulation of calcium homeostasis can alter mechanical function and electrical conduction (84). Moreover, pathogenic inflammatory responses

produced by damaged mitochondria can particularly trigger the atherosclerotic process. ROS generated in the mitochondria may lead to target-organ damage, dysfunction, hypertrophy, and inflammation. Hypertension and cardiac fibrosis are associated with depletion and inactivation of the key mitochondrial deacetylase, sirtuin 3, which is involved in the control of key metabolic steps (85-87).

The finding that pathogenic mitochondrial protein-coding SNPs and mitochondrial haplogroups associate with risk of evolving to CCC is consistent with a key role of mitochondrial DNA in the development of Chronic Chagas disease Cardiomyopathy and are in line with previous reports of nuclear DNA-encoded mitochondrial gene variants. These may interact and increase mitochondrial susceptibility to IFN- γ -induced damage in the CCC myocardium, leading to ventricular dysfunction.

Supplementary Materials:

Table S1: Heart tissue samples used for mitochondria quantification.

Table S2: Blood DNAs samples used for mitochondria quantification.

Table S3: Blood samples used for haplogroup analysis.

Table S4: Statistics on African sub-haplogroup distribution.

Table S5: Clinical information on patients for whom the whole mitochondria genome has been sequenced (n=106).

Table S6: Carrier analysis performed on 12429 Variants.

Table S7: Heteroplasmy level test between the three groups (ASY, moderate CCC and severe CCC) and heteroplasmy level analyses be-tween the groups (two by two: ASY vs CCC; ASY vs Moderate CCC; ASY vs Severe CCC and Moderate CCC vs Severe CCC).

Table S8: Variant annotation.

Table S9: List of the variants associated to diseases.

Author Contributions: Experimental work: FG, JPSN, PA; Bioinformatic analysis: PB, DG; Biological sample collect: BMI, CM, AFF, RHBS, AK, SS, ANS, PP, AIF, EAB, CWP, BS, FCD, MFS, FAG, JADLP, FB, PB, RRA, HTLW, AS, MHH, EAD,

ACP, VRJ, MM; Writing—original draft preparation: PB, PA, JPSN, ECN, CC; Writing—review and editing: MN, JK, VP, ECN, CC.

Funding: This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); the Aix-Marseille University (grant number: AMIDEX “Internation-al_2018” MITOMUTCHAGAS); the French Agency for Research (Agence Nationale de la Recherche-ANR (grant numbers: “Br-Fr-Chagas”, “land-scario”). This work was founded by the Inserm Cross-Cutting Project GOLD. This project has received funding from the Excellence Initiative of Aix-Marseille University - A*Midex a French “Investissements d’Avenir programme”- Institute MarMaRa AMX-19-IET-007. This work was supported by FAPESP (São Paulo State Research Funding Agency Brazil) (grant 2022/00758-0). Brazilian National Research Council (CNPq) provided a Productivity Award for ECN and JK. This work is supported by the CAPES-COFECUB program (Me987/23). CC is supported by the Inserm’s PRI/IRP 2022 program (Me987/23). The funders did not play any role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Data Availability Statement: The data analyzed during the current study is available upon reasonable requests to the corresponding authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O’Connell J, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93(5):841-2.
- Bozkurt B, Colvin M, Cook J, Cooper LT, Deswal A, Fonarow GC, et al. Current Diagnostic and Treatment Strategies for Specific Dilated Cardiomyopathies: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;134(23):e579-e646.
- Mestroni L, Brun F, Spezzacatene A, Sinagra G, Taylor MR. Genetic Causes of Dilated Cardiomyopathy. *Prog Pediatr Cardiol*. 2014;37(1-2):13-8.
- Bakalagos A, Ritsatos K, Anastasakis A. Current perspectives on the diagnosis and management of dilated cardiomyopathy Beyond heart failure: a Cardiomyopathy Clinic Doctor's point of view. *Hellenic J Cardiol*. 2018;59(5):254-61.
- Akhtar MM, Lorenzini M, Cicerchia M, Ochoa JP, Hey TM, Sabater Molina M, et al. Clinical Phenotypes and Prognosis of Dilated Cardiomyopathy Caused by Truncating Variants in the TTN Gene. *Circ Heart Fail*. 2020;13(10):e006832.
- Lee JH, Lee SE, Cho MC. Clinical Implication of Genetic Testing in Dilated Cardiomyopathy. *Int J Heart Fail*. 2022;4(1):1-11.
- Lu JT, Muchir A, Nagy PL, Worman HJ. LMNA cardiomyopathy: cell biology and genetics meet clinical medicine. *Dis Model Mech*. 2011;4(5):562-8.
- Tabish AM, Azzimato V, Alexiadis A, Buyandelger B, Knoll R. Genetic epidemiology of titin-truncating variants in the etiology of dilated cardiomyopathy. *Biophys Rev*. 2017;9(3):207-23.
- Zak R, Rabinowitz M, Rajamanickam C, Merten S, Kwiatkowska-Patzer B. Mitochondrial proliferation in cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol*. 1980;75(1):171-8.
- Goffart S, von Kleist-Retzow JC, Wiesner RJ. Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2004;64(2):198-207.
- El-Hattab AW, Scaglia F. Mitochondrial Cardiomyopathies. *Front Cardiovasc Med*. 2016;3:25.
- Potgieter M, Pretorius E, Pepper MS. Primary and secondary coenzyme Q10 deficiency: the role of therapeutic supplementation. *Nutr Rev*. 2013;71(3):180-8.
- Thorburn DR, Sugiana C, Salemi R, Kirby DM, Worgan L, Ohtake A, et al. Biochemical and molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1659(2-3):121-8.
- Fillmore N, Mori J, Lopaschuk GD. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *Br J Pharmacol*. 2014;171(8):2080-90.
- Nickel A, Kohlhaas M, Maack C. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;73:26-33.
- Richter-Dennerlein R, Korwitz A, Haag M, Tatsuta T, Dargazanli S, Baker M, et al. DNAJC19, a mitochondrial cochaperone associated with cardiomyopathy, forms a complex with prohibitins to regulate cardiolipin re-modeling. *Cell Metab*. 2014;20(1):158-71.
- Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, Mizuno Y, et al. A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. *PLoS Genet*. 2016;12(1):e1005679.
- Larsen S, Diez-Sanchez C, Rabol R, Ara I, Dela F, Helge JW. Increased intrinsic mitochondrial function in humans with mitochondrial haplogroup H. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1837(2):226-31.

19. Perez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2018;391(10115):82-94.
20. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Jr., Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1295-306.
21. Bestetti RB, Muccillo G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 1997;60(2):187-93.
22. Mady C, Cardoso RH, Barretto AC, da Luz PL, Bellotti G, Pileggi F. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. *Circulation*. 1994;90(6):3098-102.
23. Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol*. 1987;10(11):665-70.
24. Pereira Barretto AC, Mady C, Arteaga-Fernandez E, Stolf N, Lopes EA, Higuchi ML, et al. Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. *Am Heart J*. 1986;111(2):307-12.
25. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun*. 2001;17(1):99-107.
26. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(3):407-11.
27. Nogueira LG, Santos RH, Ianni BM, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, et al. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(10):e1867.
28. Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis*. 2004;38(7):943-50.
29. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol*. 2002;18(6):262-5.
30. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuti L, Higuchi ML, et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol*. 2005;167(2):305-13.
31. Laugier L, Ferreira LRP, Ferreira FM, Cabantous S, Frade AF, Nunes JP, et al. miRNAs may play a major role in the control of gene expression in key pathobiological processes in Chagas disease cardiomyopathy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(12):e0008889.
32. Cunha-Neto E, Teixeira PC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Myocardial gene and protein expression profiles after autoimmune injury in Chagas' disease cardiomyopathy. *Autoimmun Rev*. 2011;10(3):163-5.
33. Teixeira PC, Ducret A, Langen H, Nogoceke E, Santos RHB, Silva Nunes JP, et al. Impairment of Multiple Mito-chondrial Energy Metabolism Pathways in the Heart of Chagas Disease Cardiomyopathy Patients. *Front Immunol*. 2021;12:755782.
34. Teixeira PC, Iwai LK, Kuramoto AC, Honorato R, Fiorelli A, Stolf N, et al. Proteomic inventory of myocardial proteins from patients with chronic Chagas' cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(12):1549-62.
35. Teixeira PC, Santos RH, Fiorelli AI, Bilate AM, Benvenuti LA, Stolf NA, et al. Selective decrease of components of the creatine kinase system and ATP synthase complex in chronic Chagas disease cardiomyopathy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e1205.
36. Nunes JPS, Andrieux P, Brochet P, Almeida RR, Kitano E, Honda AK, et al. Co-Exposure of Cardiomyocytes to IFN-gamma and TNF-alpha Induces Mitochondrial Dysfunction and Nitro-Oxidative Stress: Implications for the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Front Immunol*. 2021;12:755862.
37. Kolwicz SC, Jr., Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res*. 2013;113(5):603-16.
38. Zicker F, Smith PG, Netto JC, Oliveira RM, Zicker EM. Physical activity, opportunity for reinfection, and sibling history of heart disease as risk factors for Chagas' cardiopathy. *Am J Trop Med Hyg*. 1990;43(5):498-505.
39. Acosta-Herrera M, Strauss M, Casares-Marfil D, Martin J, Chagas Genetics CN. Genomic medicine in Chagas disease. *Acta Trop*. 2019;197:105062.
40. Chevillard C, Nunes JPS, Frade AF, Almeida RR, Pandey RP, Nascimento MS, et al. Disease Tolerance and Pathogen Resistance Genes May Underlie *Trypanosoma cruzi* Persistence and Differential Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy. *Front Immunol*. 2018;9:2791.
41. Ferreira LR, Frade AF, Baron MA, Navarro IC, Kalil J, Chevillard C, et al. Interferon-gamma and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. *World J Cardiol*. 2014;6(8):782-90.
42. Ouarhache M, Marquet S, Frade AF, Ferreira AM, Ianni B, Almeida RR, et al. Rare Pathogenic Variants in Mito-chondrial and Inflammation-Associated Genes May Lead to Inflammatory Cardiomyopathy in Chagas Disease. *J Clin Immunol*. 2021;41(5):1048-63.
43. Frade AF, Teixeira PC, Ianni BM, Pissetti CW, Saba B, Wang LH, et al. Polymorphism in the alpha cardiac muscle actin 1 gene is associated to susceptibility to chronic inflammatory cardiomyopathy. *PLoS One*. 2013;8(12):e83446.

44. Quiros PM, Goyal A, Jha P, Auwerx J. Analysis of mtDNA/nDNA Ratio in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2017;7(1):47-54.
45. Naslavsky MS, Scliar MO, Yamamoto GL, Wang JYT, Zverinova S, Karp T, et al. Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from Sao Paulo, Brazil. *Nat Commun.* 2022;13(1):1004.
46. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010;26(5):589-95.
47. Herzeel C, Costanza P, Decap D, Fostier J, Verachtert W. elPrep 4: A multithreaded framework for sequence analysis. *PLoS One.* 2019;14(2):e0209523.
48. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet.* 2011;43(5):491-8.
49. Kim S, Scheffler K, Halpern AL, Bekritsky MA, Noh E, Kallberg M, et al. Strelka2: fast and accurate calling of germline and somatic variants. *Nat Methods.* 2018;15(8):591-4.
50. Goudenege D, Bris C, Hoffmann V, Desquiret-Dumas V, Jardel C, Rucheton B, et al. eKLIpSe: a sensitive tool for the detection and quantification of mitochondrial DNA deletions from next-generation sequencing data. *Genet Med.* 2019;21(6):1407-16.
51. Castellana S, Ronai J, Mazza T. MitImpact: an exhaustive collection of pre-computed pathogenicity predictions of human mitochondrial non-synonymous variants. *Hum Mutat.* 2015;36(2):E2413-22.
52. Picard M. Blood mitochondrial DNA copy number: What are we counting? *Mitochondrion.* 2021;60:1-11.
53. Sundquist K, Sundquist J, Palmer K, Memon AA. Role of mitochondrial DNA copy number in incident cardio-vascular diseases and the association between cardiovascular disease and type 2 diabetes: A follow-up study on middle-aged women. *Atherosclerosis.* 2022;341:58-62.
54. Nah J. The Role of Alternative Mitophagy in Heart Disease. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7).
55. Dutta D, Calvani R, Bernabei R, Leeuwenburgh C, Marzetti E. Contribution of impaired mitochondrial autophagy to cardiac aging: mechanisms and therapeutic opportunities. *Circ Res.* 2012;110(8):1125-38.
56. Romano PS, Cueto JA, Casassa AF, Vanrell MC, Gottlieb RA, Colombo MI. Molecular and cellular mechanisms involved in the Trypanosoma cruzi/host cell interplay. *IUBMB Life.* 2012;64(5):387-96.
57. Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell.* 2016;3(12):588-96.
58. Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature.* 2009;461(7264):654-8.
59. Brochet P, Ianni BM, Laugier L, Frade AF, Silva Nunes JP, Teixeira PC, et al. Epigenetic regulation of transcription factor binding motifs promotes Th1 response in Chagas disease cardiomyopathy. *Front Immunol.* 2022;13:958200.
60. De Gaetano A, Solodka K, Zanini G, Selleri V, Mattioli AV, Nasi M, et al. Molecular Mechanisms of mtDNA-Mediated Inflammation. *Cells.* 2021;10(11).
61. Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai T, et al. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature.* 2012;485(7397):251-5.
62. Hagen CM, Aidt FH, Hedley PL, Jensen MK, Havndrup O, Kanters JK, et al. Mitochondrial haplogroups modify the risk of developing hypertrophic cardiomyopathy in a Danish population. *PLoS One.* 2013;8(8):e71904.
63. Govindaraj P, Rani B, Sundaravadivel P, Vanniarajan A, Indumathi KP, Khan NA, et al. Mitochondrial genome variations in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Mitochondrion.* 2019;48:51-9.
64. Fernandez-Caggiano M, Barallobre-Barreiro J, Rego-Perez I, Crespo-Leiro MG, Paniagua MJ, Grille Z, et al. Mitochondrial DNA haplogroup H as a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in Spanish population. *Mitochondrion.* 2013;13(4):263-8.
65. McManus MJ, Picard M, Chen HW, De Haas HJ, Potluri P, Leipzig J, et al. Mitochondrial DNA Variation Dictates Expressivity and Progression of Nuclear DNA Mutations Causing Cardiomyopathy. *Cell Metab.* 2019;29(1):78-90 e5.
66. Garret P, Bris C, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Vabres P, Houcinat N, et al. Deciphering exome sequencing data: Bringing mitochondrial DNA variants to light. *Hum Mutat.* 2019;40(12):2430-43.
67. Yahata N, Matsumoto Y, Omi M, Yamamoto N, Hata R. TALEN-mediated shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in MELAS-iPSCs with m.13513G>A mutation. *Sci Rep.* 2017;7(1):15557.
68. Gammage PA, Minczuk M. Enhanced Manipulation of Human Mitochondrial DNA Heteroplasmy In Vitro Using Tunable mtZFN Technology. *Methods Mol Biol.* 2018;1867:43-56.
69. Srivastava S, Moraes CT. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted re-restriction endonuclease. *Hum Mol Genet.* 2001;10(26):3093-9.
70. Hussain SA, Yalvac ME, Khoo B, Eckardt S, McLaughlin KJ. Adapting CRISPR/Cas9 System for Targeting Mitochondrial Genome. *Front Genet.* 2021;12:627050.
71. Bian WP, Chen YL, Luo JJ, Wang C, Xie SL, Pei DS. Knock-In Strategy for Editing Human and Zebrafish Mitochondrial DNA Using Mito-CRISPR/Cas9 System. *ACS Synth Biol.* 2019;8(4):621-32.

72. Porto EM, Komor AC, Slaymaker IM, Yeo GW. Base editing: advances and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(12):839-59.
73. Kar B, Castillo SR, Sabharwal A, Clark KJ, Ekker SC. Mitochondrial Base Editing: Recent Advances towards Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6).
74. El-Hattab AW, Hsu JW, Emrick LT, Wong LJ, Craigen WJ, Jahoor F, et al. Restoration of impaired nitric oxide production in MELAS syndrome with citrulline and arginine supplementation. *Mol Genet Metab.* 2012;105(4):607-14.
75. Bough KJ, Wetherington J, Hassel B, Pare JF, Gawryluk JW, Greene JG, et al. Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Ann Neurol.* 2006;60(2):223-35.
76. Rotig A, Appelkvist EL, Geromel V, Chretien D, Kadhom N, Edery P, et al. Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet.* 2000;356(9227):391-5.
77. Di Giovanni S, Mirabella M, Spinazzola A, Crociani P, Silvestri G, Broccolini A, et al. Coenzyme Q10 reverses pathological phenotype and reduces apoptosis in familial CoQ10 deficiency. *Neurology.* 2001;57(3):515-8.
78. Parikh S, Saneto R, Falk MJ, Anselm I, Cohen BH, Haas R, et al. A modern approach to the treatment of mitochondrial disease. *Curr Treat Options Neurol.* 2009;11(6):414-30.
79. Pfeffer G, Majamaa K, Turnbull DM, Thorburn D, Chinnery PF. Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;2012(4):CD004426.
80. Almannai M, El-Hattab AW. Nitric Oxide Deficiency in Mitochondrial Disorders: The Utility of Arginine and Citrulline. *Front Mol Neurosci.* 2021;14:682780.
81. Andrieux P, Chevillard C, Cunha-Neto E, Nunes JPS. Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21).
82. Laugier L, Frade AF, Ferreira FM, Baron MA, Teixeira PC, Cabantous S, et al. Whole-Genome Cardiac DNA Methylation Fingerprint and Gene Expression Analysis Provide New Insights in the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Clin Infect Dis.* 2017;65(7):1103-11.
83. Nunes JPS, Moraes-Vieira PM, Chevillard C, Cunha-Neto E. Editorial: Mitochondria at the Crossroads of Immunity and Inflammatory Tissue Damage. *Front Immunol.* 2021;12:810787.
84. Lopez-Crisosto C, Pennanen C, Vasquez-Trincado C, Morales PE, Bravo-Sagua R, Quest AFG, et al. Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(6):342-60.
85. Zhang Q, Li D, Dong X, Zhang X, Liu J, Peng L, et al. LncDACH1 promotes mitochondrial oxidative stress of cardiomyocytes by interacting with sirtuin3 and aggravates diabetic cardiomyopathy. *Sci China Life Sci.* 2022;65(6):1198-212.
86. Chen WJ, Cheng Y, Li W, Dong XK, Wei JL, Yang CH, et al. Quercetin Attenuates Cardiac Hypertrophy by Inhibiting Mitochondrial Dysfunction Through SIRT3/PARP-1 Pathway. *Front Pharmacol.* 2021;12:739615.
87. Chen J, Chen S, Zhang B, Liu J. SIRT3 as a potential therapeutic target for heart failure. *Pharmacol Res.* 2021;165:105432.

Partie 3 : Discussion et perspectives

Les insuffisances cardiaques sont des pathologies affectant entre 1 et 2% de la population mondiale. Ce nombre augmentant chaque année, elles deviennent un important problème de santé publique ⁴⁵¹. Elles sont principalement causées par des cardiomyopathies ⁴⁵², des maladies qui affectent le muscle cardiaque, entraînant une perte de fonction et de la contractilité des cardiomyocytes. Les cœurs présentent alors un dysfonctionnement de l'activité électrique, une dilatation ou des hypertrophies ventriculaires.

La maladie de Chagas est une maladie parasitaire due au parasite *Trypanosoma cruzi*, endémique d'Amérique du Sud et transmise à l'homme par un insecte vecteur, le réduve. Elle affecte, à l'heure actuelle, environ 8 millions de personnes ⁴⁵³, et se divise en deux phases : une phase aiguë, la plupart du temps asymptomatique ou présentant un état fébrile; et une phase chronique, qui, dans 30% des cas, évolue en cardiomyopathie ²¹⁴. Ces cardiomyopathies chagasiennes chroniques (CCC) sont des cardiomyopathies dilatées, caractérisées par une forte réaction inflammatoire. Plus précisément, une infiltration de cellules immunitaires se produit dans les tissus du myocarde, et notamment de lymphocytes Th1, induisant une forte production de Tumor Necrosis Factors alpha (TNF- α) et d'interféron gamma (IFN- γ) ^{184,214,215}. Cette forte inflammation va entraîner, entre autres, des dysfonctionnements mitochondriaux ^{215,448,449}.

Les mitochondries sont des organelles localisées dans le cytoplasme, qui peuvent fusionner ou se diviser en fonction des besoins de la cellule. La mitochondrie se compose de deux membranes, une externe et une interne, d'un espace inter-membranaire et d'une matrice. Cette organelle est le centre énergétique de la cellule, et est à l'origine de la production d'ATP grâce à la phosphorylation oxydative se déroulant au sein de la chaîne respiratoire. Cette dernière se situe au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, et est composée de quatre complexes protéiques et de l'ATP synthase. L'association de ces deux observations, c'est-à-dire de la forte production de TNF- α et IFN- γ dans le cœur des patients, et du dysfonctionnement des mitochondries cardiaques, nous ont permis d'émettre l'hypothèse que le TNF- α et IFN- γ jouent un rôle dans les dysfonctionnements de ces mitochondries. De plus, une analyse protéomique effectuée sur des ventricules gauches de patients CCC a mis en évidence une diminution de l'activité mitochondriale et de la production d'énergie ⁴⁵⁴. L'évolution de la maladie de Chagas en CCC n'est retrouvée que dans 30% des cas. De plus, une agrégation de cas dans des familles a été observée ¹⁸⁴.

Ces deux observations nous ont permis de poser l'hypothèse qu'il doit exister des gènes de susceptibilité, qui participeraient au développement des CCCs. Nous nous sommes d'abord intéressés à l'effet du TNF- α et de l'IFN- γ sur des cardiomyocytes humains et nous avons démontré que ces cytokines avaient un effet direct sur les mitochondries. En effet, nous avons prouvé que la stimulation de ces cytokines pro-inflammatoires sur des cardiomyocytes humains, favorisait le stress oxydatif et altérait la production d'énergie. Nous avons ensuite mis en évidence des variants génétiques sur des familles nucléaires multi-cas. Ces variants étaient retrouvés dans des voies en lien avec la mitochondrie et l'inflammation. En outre, nous avons étudié fonctionnellement 3 variants dans les gènes DHODH, RPU3D3 et UMPS qui sont en lien avec la mitochondrie. Nous avons pu mettre en évidence que ces trois variants altéraient les fonctions mitochondriales en modifiant le

potentiel de membrane et la production d'ATP. De plus il semblerait que le phénotype soit augmenté dans les cellules porteuses de variants et stimulées avec du TNF- α et de l'IFN- γ .

I. L'effet du TNF- α et de l'IFN- γ sur des cardiomyocytes humains

La CCC est une cardiomyopathie caractérisée par une réponse inflammatoire excessive. En effet, le TNF- α et l'IFN- γ , cytokines pro-inflammatoires, sont connues pour être produites spécifiquement dans le cœur des patients CCC et absents dans le cœur des patients DCM (cardiomyopathie dilatée). Nous avons mis en évidence, dans les cœurs des patients CCC, une augmentation du stress nitro-oxydatif ainsi qu'une réduction de l'ADNmt. Ces phénomènes sont visibles lorsqu'on traite des cellules cardiaques humaines (AC16) avec le TNF- α et l'IFN- γ . Cela suggère que la stimulation par ces cytokines pro-inflammatoires sur des cardiomyocytes humains représente un bon modèle *in vitro* pour l'étude de la maladie de Chagas. Ce modèle nous a permis, notamment, d'aller plus loin dans la compréhension de l'impact de l'inflammation sur la mitochondrie dans les cardiomyocytes humains (Figure 53).

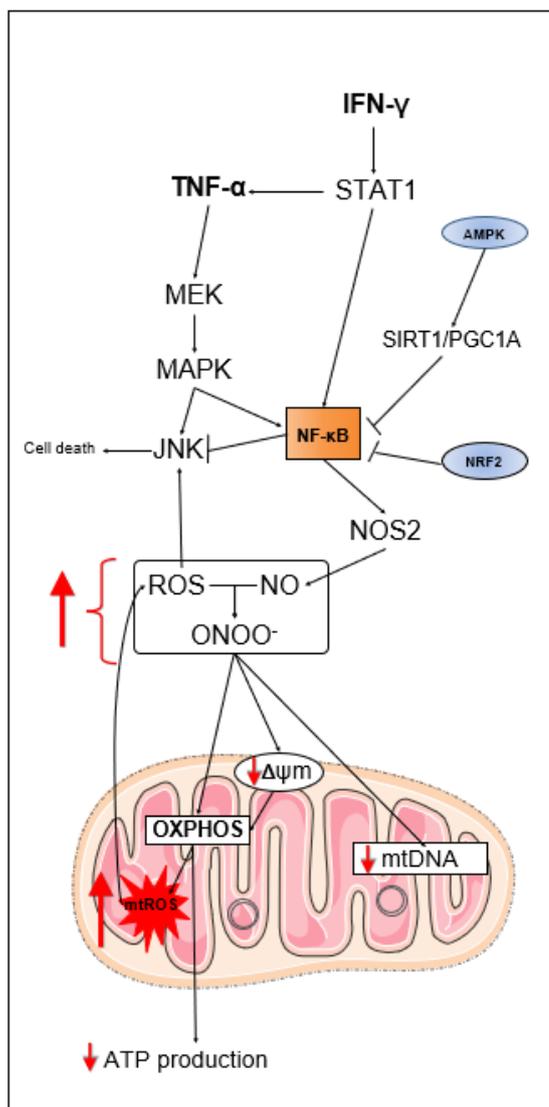


Figure 53 : Schéma de l'effet du TNF- α et de l'IFN- γ sur la mitochondrie dans la maladie de Chagas.

En effet, nous avons mis en évidence une diminution du potentiel de membrane dans les cellules lorsque celles-ci étaient stimulées par le TNF- α et l'IFN- γ . La diminution du potentiel de membrane des mitochondries est un signe de la détérioration des mitochondries. C'est ce potentiel de membrane qui est responsable de la production d'ATP, en créant une force protonique permettant à la sous-unité FO de l'ATP synthase de tourner pour créer de l'ATP. Ainsi, nous avons démontré que ces cytokines, en plus de diminuer le potentiel de membrane, diminuent la production d'ATP. La synthèse d'ATP est essentielle à la survie des cardiomyocytes, ces cellules étant très énergivores du fait de leur contraction⁴⁵⁵. Des études antérieures ont décrit l'affaiblissement des enzymes du métabolisme énergétique dans le tissu cardiaque de la CCC, comme l'ATP synthase α et l'activité de la créatine kinase chez les patients^{454,456-458} et des études récentes sur des modèles animaux ont corroboré ce résultat⁴⁵⁹. Une diminution de la production d'ATP *in vivo* a également été observée dans le myocarde CCC⁴⁶⁰.

La diminution du potentiel de membrane mitochondrial peut aussi avoir pour conséquence l'activation de la mitophagie correspondant à l'élimination sélective des mitochondries défectueuses. En supposant qu'une mitochondrie avec une défaillance en production d'ATP pourrait être éliminée par mitophagie, il pourrait être intéressant d'observer si les cardiomyocytes humains stimulés au TNF- α et à l'IFN- γ présenteraient une plus grande activation de la mitophagie. Dans ce sens, la baisse de l'ADNmt pourrait être, également, le résultat d'une trop grande activité mitophagique. La détérioration des mitochondries dans notre modèle a été également observée, concomitante à un changement de la respiration mitochondrie. Ainsi, on remarque une augmentation de cette respiration (respiration basale, respiration maximale, capacité respiratoire libre, ainsi que le pourcentage de respiration basale utilisé pour produire de l'ATP) et une augmentation de la fuite de protons.

L'IFN- γ exerce ses effets délétères sur les mitochondries, en potentialisant la signalisation NF- κ B et la voie STAT1/ NF- κ B /NOS2⁴⁶¹. En effet, l'activation de NF- κ B déclenche l'activité transcriptionnelle de NOS2, qui produit à son tour du monoxyde d'azote (NO) et, en présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), se transforme en peroxy-nitrite (ONOO-), l'une des espèces réactives les plus toxiques et les plus oxydantes ayant des effets substantiels sur les mitochondries^{462,463}. Selon nos observations, l'IFN- γ et/ou le TNF- α peuvent augmenter la translocation nucléaire de NF- κ B, la production de nitrites et de ROS, et l'accumulation de 3-nitrotyrosine dans les cardiomyocytes AC-16. L'augmentation des ROS par l'IFN- γ et/ou le TNF- α a également été rapportée dans plusieurs lignées cellulaires⁴⁶⁴⁻⁴⁶⁷, y compris les cardiomyocytes⁴⁶⁸⁻⁴⁷¹. Une production accrue de ROS est associée à une augmentation des niveaux de peroxydation lipidique, à une diminution du nombre de copies de l'ADNmt et à une altération de la capacité d'OXPPOS, ce qui affecte la structure et la fonction des cardiomyocytes et déclenche des voies de signalisation impliquées dans le remodelage et la défaillance du myocarde^{472,473}.

Ainsi, nos données suggèrent que la réduction de l'ADNmt observée dans le myocarde CCC pourrait aussi être liée au stress oxydatif observé dans les cardiomyocytes humains traités à l'IFN- γ et au TNF- α , ainsi que, potentiellement, à une activité accrue de la mitophagie au vu de la détérioration des mitochondries.

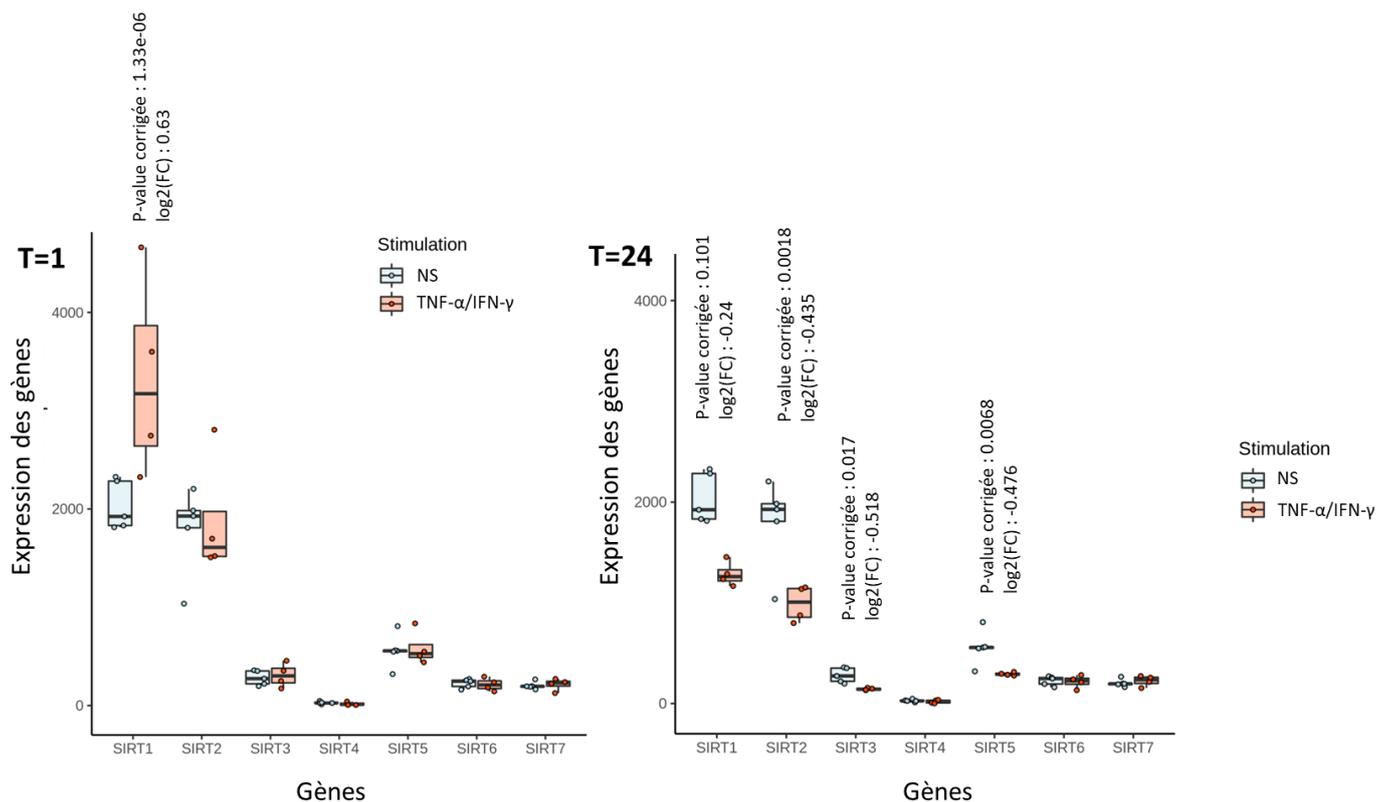


Figure 54 : Représentation graphique de l'expression des gènes de la famille sirtuine dans des cardiomyocytes humains non stimulés et stimulés pendant 24h avec du TNF- α et de l'IFN- γ .

L'analyse transcriptomique sur les cardiomyocytes AC-16 stimulés par cytokines au fil du temps (0 à 48h), a montré que plusieurs processus étaient touchés par la stimulation avec les cytokines pro-inflammatoires, comme la réponse immunitaire, l'inflammation, les mécanismes de défenses intracellulaires, à la fibrose et aux maladies cardiaques. Il est intéressant d'observer qu'1h après la stimulation, on retrouvait une augmentation de nombreuses cytokines et de chimiokines, indiquant la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire. A 12h, on observait aussi l'activation de la signalisation des récepteurs d'aryl hydrocarboné, de la signalisation de l'interféron et du dysfonctionnement mitochondrial avec une diminution du potentiel de membrane ainsi que la diminution du métabolisme des acides gras. On observait aussi, de manière très intéressante, l'inhibition de la voie de signalisation de la Sirtuine. En effet, à 24h, on remarque une baisse de l'expression de *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3* et *SIRT5* (Figure 54).

La famille des sirtuines (SIRT) comprend sept membres protéiques (SIRT de 1 à 7), ces protéines sont des histones désacétylases de classe III nicotinamide adénacétontide (NAD)-dépendante. Leur principale fonction est la désacétylation qui est une altération épigénétique importante. Les protéines SIRT1 et SIRT2 sont localisées dans le noyau et le cytoplasme, les SIRT3, SIRT4 et SIRT5 sont situées dans la mitochondrie et les SIRT6 et SIRT7 uniquement dans le noyau. Cette famille joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques tels que la réponse immunitaire, le stress oxydatif et la fonction mitochondriale⁴⁷⁴.

Dans la réponse immunitaire, SIRT1 va avoir pour fonction d'inhiber la voie de signalisation NF-κB ainsi que de bloquer la voie de signalisation AP-1, ce qui va inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Ainsi, SIRT1 inhibe la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes TH1 tout en favorisant la différenciation en Treg⁴⁷⁵. La protéine SIRT1 va aussi, via la protéine PGC-1A, intensifier la biogenèse mitochondriale et induire via FoxO une réponse antioxydante⁴⁷⁵.

Dans la réponse immunitaire, SIRT2 a des effets anti-inflammatoires. En effet, la protéine a pour fonction de réinitialiser la réponse NF-κB⁴⁷⁶, réduisant ainsi l'expression des gènes dépendants de NF-κB ayant donc un effet anti-inflammatoire. Dans un modèle d'arthrite, chez des souris KO SIRT2, une équipe a démontré que la réexpression de SIRT2 réduisait la réponse inflammatoire et diminuait la sévérité de l'arthrite chez des souris KO SIRT2⁴⁷⁷.

La protéine SIRT3, dans les lymphocytes T, favorise leur survie et le développement des cellules T mémoire médiées par la protéine kinase AMPK⁴⁷⁸. La protéine SIRT3 participe à l'oxydation des acides gras, et permet la désacytilation des complexes I et II de la chaîne respiratoire permettant ainsi la phosphorylation oxydative⁴⁷⁹.

La protéine SIRT5 est impliquée dans la régulation des ROS. En effet, SIRT5 va activer SOD1, une enzyme antioxydante qui va diminuer la quantité de ROS⁴⁸⁰. Cette protéine est aussi impliquée dans la régulation de la respiration cellulaire en inhibant la succinate déshydrogénase (SDH) empêchant ainsi cette respiration⁴⁸⁰. Le déficit en SIRT5 induit une augmentation de l'activation des lymphocytes T, ce qui entraîne un déséquilibre entre les lymphocytes TH1 et les lymphocytes Treg⁴⁸¹.

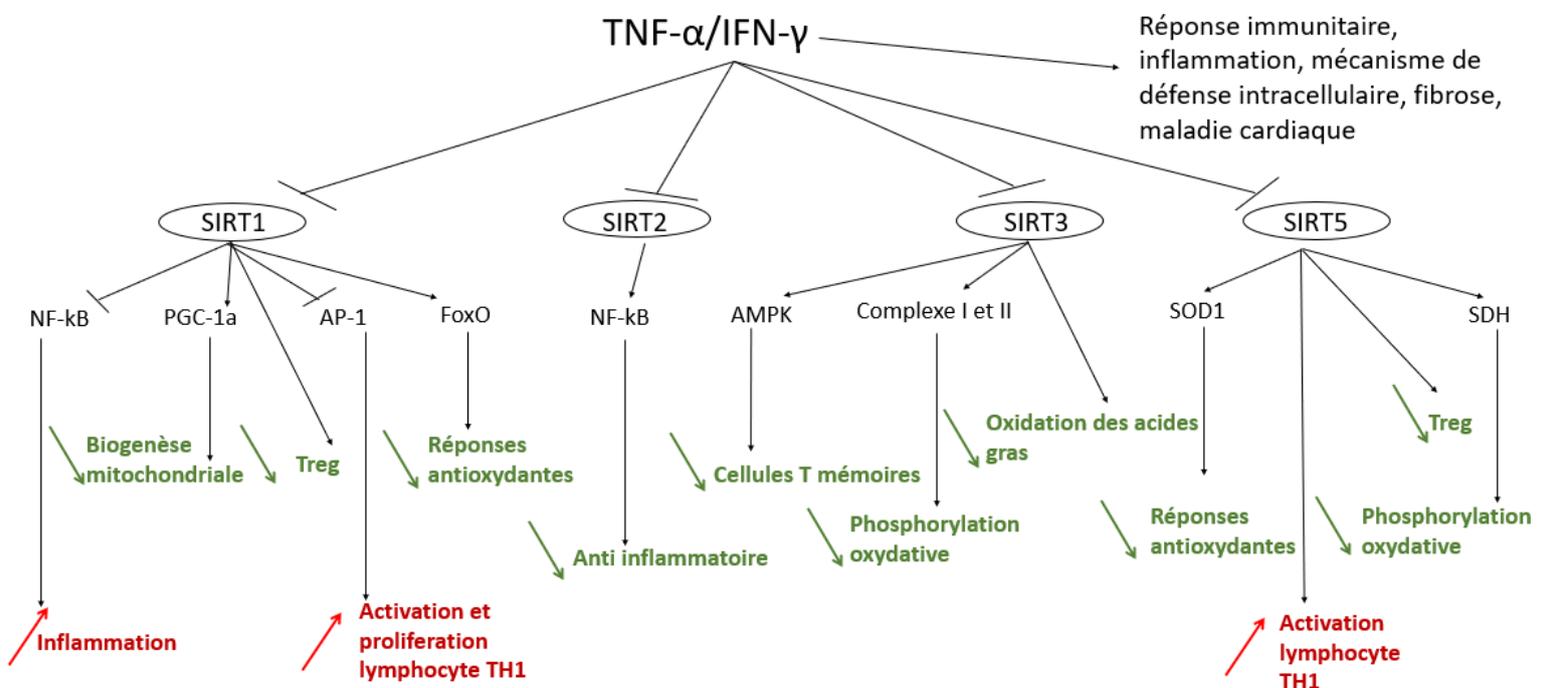


Figure 55 : Schéma de l'effet du TNF-α et de l'IFN-γ sur les protéines SIRT1, SIRT2, SIRT3 et SIRT5.

Pour résumer, nos résultats montrent une baisse de l'expression de *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3* et *SIRT5* ce qui va entraîner une augmentation de la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes Th1 au détriment des lymphocytes Treg liés à l'absence de *SIRT1* et *SIRT5*. De plus, l'absence des *SIRT1*, *SIRT2* et *SIRT5* entraîne une baisse de la réponse antioxydante. Nous avons également retrouvé une diminution de la biogenèse mitochondriale en absence de *SIRT1* ainsi qu'une diminution de l'oxydation des acides gras et de la phosphorylation oxydative en absence de *SIRT3* (Figure 55). Ces fonctions de la famille SIRT sont en adéquation avec les résultats expérimentaux discutés précédemment, rendant ainsi plus robuste le modèle de la maladie de Chagas que nous avons proposé. La régulation des gènes SIRT n'est pas le seul produit de l'effet du TNF- α et de l'IFN- γ sur les cellules mais l'on peut dire que cette régulation est une bonne piste pour mieux comprendre l'effet de ces deux cytokines pro-inflammatoires. Nous avons observé une diminution de l'expression des gènes de *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3* et *SIRT5* lorsque l'on stimule les cellules avec du TNF- α et de l'IFN- γ mais il serait intéressant de regarder au niveau des protéines par Western blot pour confirmer la diminution de la quantité de ces protéines.

Nos résultats suggèrent que les perturbations induites par les cytokines dans la fonction mitochondriale et le métabolisme énergétique pourraient jouer un rôle dans le pire pronostic de la cardiomyopathie de la maladie de Chagas.

En précisant le modèle de la maladie de Chagas, nous pourrions encore mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. Effectivement, la mise en évidence de l'implication des voies STAT1/ NF- κ B/NOS2 ou MAPK/ NF- κ B/NOS2 et de la famille des SIRT dans l'effet du l'IFN- γ et du TNF- α offre différentes possibilités pour sauver le phénotype et instaurer de nouvelles cibles thérapeutiques. Plusieurs molécules ont déjà été testées afin de restaurer le phénotype engendré par les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IFN- γ , c'est-à-dire de restaurer le potentiel de membrane mitochondriale. Le traitement avec des agonistes des voies de signalisation liées à la réponse au stress et à la protection des mitochondries, tels que l'AMPK (metformine, AICAR, resvératrol), le NRF2 (Resvératrol et Protoporphyrine XI) et la restauration de *SIRT1* (SRT1720) permet de restaurer le potentiel de membrane. De plus, l'inhibition des molécules en aval de l'IFN- γ avec des antagonistes sélectionnés tels que la fludarabine (inhibiteur de la fludarabine), l'emodin (NF- κ B activation) JSH23 (translocation nucléaire NF- κ B), l'IKK16 (I-B kinase) et le NOS2 (1400W) restaure également le potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules AC16. Enfin, l'inhibition de molécules en aval de TNF- α telles que MEK (PD98059), JNK (SP600125) et MAPK (SB202190) sauve également le phénotype (Figure 56).

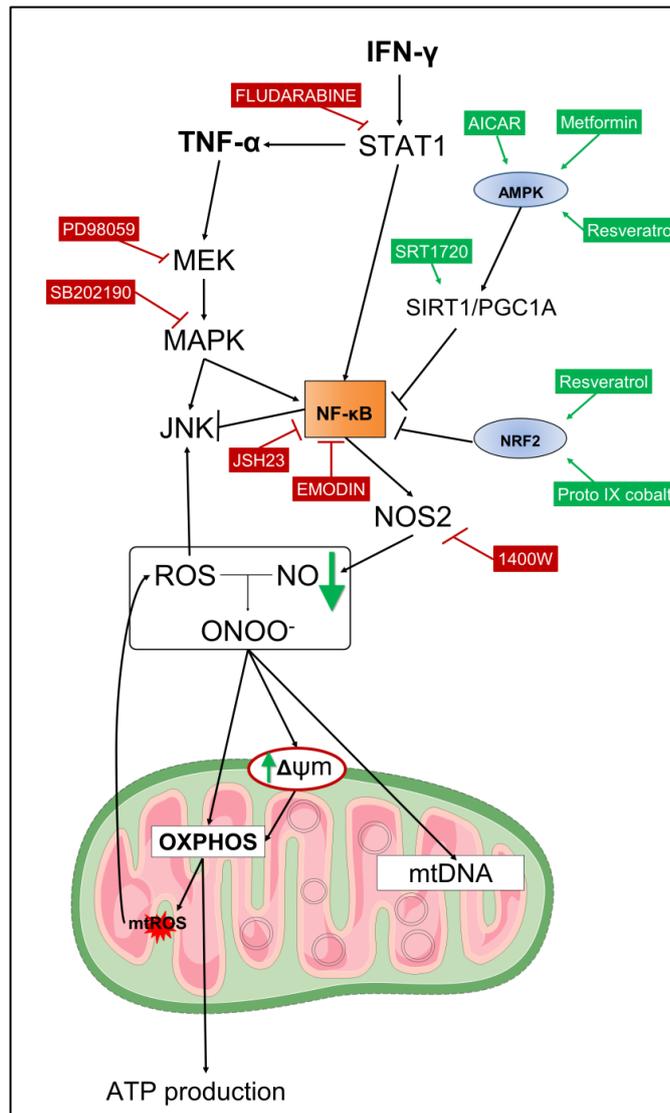


Figure 56 : Modèle de sauvetage des dysfonctionnements mitochondriaux dans la cardiomyopathie de la maladie de Chagas grâce à des molécules pharmacologiques impliquées dans les voies STAT1/ NF- κ B/NOS2 ou MAPK/ NF- κ B/NOS2.

Ces molécules sauvent le phénotype sur des cellules AC16 stimulées avec du TNF- α et de l'IFN- γ , ce qui pourrait être une approche pour ralentir la progression de la CCC. Bien que ces molécules soient de potentiels traitements prometteurs, il faudrait aller plus loin et tester ces molécules ainsi que d'autres sur différents modèles comme des cardiomyocytes dérivés cellules souches pluripotentes induites (iPS) et chez des souris transgéniques IFN- γ qui développent une cardiomyopathie inflammatoire. Le modèle des cardiomyocytes dérivés d'iPS est un modèle porteur qui permettrait de tester ces molécules sur des cardiomyocytes de patients avec leur génotype propre. De plus, contrairement aux lignées de cardiomyocytes humains comme les AC16, ces cellules ont la capacité de se mettre en réseau et de battre ce qui est un phénotype essentiel dans les maladies cardiaques. Il serait aussi intéressant de passer sur un modèle animal comme des souris transgéniques IFN- γ afin de voir si un des traitements ralentit la progression de la cardiomyopathie.

Dans une approche thérapeutique et pragmatique, il serait pertinent de tester des médicaments cliniquement approuvés pour d'autres pathologies et visant le dysfonctionnement mitochondrial induit par les cytokines comme cible. Malheureusement, dans la maladie de Chagas, aucun vaccin ou médicament antiparasitaire à l'efficacité prouvée n'est disponible pour les adultes CCC⁴⁸². Ces médicaments repositionnés pourraient avoir un rôle thérapeutique dans la CCC et cette nouvelle thérapie pourrait également être étendue à d'autres pathologies cardiaques où les cytokines inflammatoires jouent un rôle pathogène, telles que d'autres étiologies de cardiomyopathies inflammatoires, la myocardite virale, l'inflammation myocardique liée à l'âge, le déclin fonctionnel⁴⁸³, l'infarctus du myocarde⁴⁸⁴ et la cardiotoxicité des agents antitumoraux anthracyclines⁴⁸⁵.

II. Variants génétiques qui amplifieraient le phénotype des patients atteints de la maladie de Chagas.

1. Variants génétiques rares famille spécifique trouvée dans les patients CCC.

Le deuxième axe de recherche de ma thèse est la mise en évidence de variants génétiques qui amplifieraient le phénotype CCC. Afin de répondre à cette problématique, un recrutement de 6 familles nucléaires, multi-cas, a été effectué dans la région endémique de São Paulo, au Brésil. Un séquençage d'exome a été réalisé sur ces familles, ainsi que sur 14 patients asymptomatiques mais séropositifs à *T. cruzi*. Cette analyse a mis en évidence 7 mutations hétérozygotes présentes chez les patients CCC mais absentes chez les patients asymptomatiques d'une même famille, ainsi que chez les 14 patients asymptomatiques non apparentés. Ces 7 gènes sont impliqués dans deux processus biologiques, l'inflammation et la mitochondrie. Les gènes sont *DHODH*, *UMPS*, *MAP4K4*, *LEPR*, *RPUDS3*, *SLC11A1* et *MAML1*. Ces variants sont des variants codants non synonymes pathogéniques rares, et sont «famille-spécifique». Même si leur analyse est primordiale pour comprendre la pathogenèse de la maladie, il serait pertinent et complémentaire d'effectuer une étude afin d'identifier des variants plus fréquents. On pourrait par exemple, effectuer un séquençage d'exome sur des individus non apparentés afin de mettre en évidence des variants codants non synonymes pathogéniques, des variants synonymes régulateurs ou des variants d'épissage. Et pour aller encore plus loin, il serait intéressant de faire une étude pangénomique (GWAS) sur une large population de cas chagasiques afin d'identifier les marqueurs génétiques associés aux développements de CCC. D'ailleurs, une étude pangénomique sur un total de 2 200 patients est en cours dans l'équipe. Le GWAS permet d'identifier des variants génétiques intergéniques ou introniques alors que le séquençage d'exome permet d'identifier des variants dans le codant ; ces deux approches sont complémentaires et apportent toutes deux des éléments essentiels à la compréhension de la génétique de la CCC.

2. Variants génétiques sur des individus non apparentés trouvés chez des patients CME.

Nous avons également mis en évidence deux variants, *MRPS18B* (rs34315095C/G) et *FAM185A* (rs201667800T/G), associés au mégaoesophage chagasique (CME) par séquençage d'exome. En effet, 13 patients atteints de CME et 37 patients atteints d'ASY ont été séquencés et ces deux variants ont été trouvés plus fréquemment chez les patients CME que chez les patients ASY. Le variant du gène *MRPS18B* est d'autant plus intéressant qu'il code pour une protéine de la sous-unité 28S qui appartient à la petite sous-unité du ribosome mitochondrial.

En effet, les mitochondries ont leur propre système de traduction pour la synthèse de treize protéines dont les protéines participant à la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Les mutations dans les protéines mito-ribosomales sont des causes fréquentes de troubles métaboliques et énergétiques dus à des carences en protéines mitochondriales⁴⁸⁶. Il a été démontré que les mutations dans les gènes *MRPS* ont des effets délétères, en particulier dans les troubles de la chaîne respiratoire mitochondriale⁴⁸⁶. Afin d'étudier si les patients portant le variant *MRPS18B* (rs34315095C/G) sont plus sensibles aux effets nocifs de l'IFN- γ que les patients porteurs du génotype de type sauvage (C/C), nous avons réalisé des tests fonctionnels sur des cellules lymphoblastiques B immortalisées par le virus d'Epstein-Barr (EBV-LCL) dérivés de patients atteints de CME (hétérozygotes (C/G) et homozygotes (G/G)) et des patients porteurs du génotype sauvage (C/C). Nous avons mis en évidence que les porteurs de la mutation présentaient une augmentation des taux de nitrite et de protéines nitrées et que le patient homozygote (G/G) a également montré une augmentation du superoxyde mitochondrial et des niveaux réduits de production d'ATP. De manière intéressante le patient avec le génotype homozygote (G/G) est un patient de 60 ans présentant à la fois une cardiomyopathie et des troubles digestifs, et *in vitro*, sur ses cellules, le phénotype mitochondrial n'est apparu qu'après stimulation avec la cytokine pro-inflammatoire IFN- γ . Ce résultat semble indiquer que lorsque les cellules sont en présence de l'IFN- γ , les cellules mutées sont plus sensibles aux dysfonctionnements mitochondriaux. Ainsi, les lésions mitochondriales seraient localisées uniquement dans des sites inflammatoires chez les patients atteints de la maladie de Chagas; par exemple, dans les plexus myentériques chez les patients atteints de la maladie de Chagas avec le mégaoesophages¹²⁸ et dans le cœur chez les patients CCC⁴⁸⁷. Dans l'étude des variants sur les familles multi-cas mentionnée ci-dessus, il est intéressant de noter qu'un autre variant du gène *MRPS18B* (rs116524936) a été identifié, ce qui semblerait indiquer que les variants de ce gène pourraient être associés à la fois au CME et au CCC.

Cette étude a été réalisée chez 13 patients CME et 37 patients ASY ce qui est un petit nombre ; il serait intéressant d'augmenter le nombre de patients afin d'obtenir des variants supplémentaires. De plus, dans cette étude nous nous sommes focalisés sur les variants mitochondriaux. Sachant que pour l'étude effectuée sur des familles CCC, deux voies ont été mises en évidence : la voie de l'inflammation et la voie de la mitochondrie, il sera intéressant de voir si des variants inflammatoires pourraient également être mis en évidence sur ses patients CME.

3. Variants génétiques mitochondriaux chez des individus non apparentés trouvés dans les patients CCC.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une diminution du nombre de copies de l'ADNmt dans les tissus cardiaques de patients CCC en phase terminale comparé aux tissus cardiaques de donneurs d'organes. Ce résultat est en adéquation avec les résultats trouvés dans une autre de nos études où nous avons mis en évidence une diminution de ADNmt dans les tissus cardiaques de patients CCC comparés aux tissus cardiaques de patients ayant une cardiomyopathie non inflammatoire⁴⁸⁸. Nous avons également observé qu'il n'y a aucune différence dans le nombre de copies d'ADNmt dans le sang des patients CCC comparé au sang des donneurs. On peut dire que cette variation est tissu-spécifique, et que le dysfonctionnement mitochondrial n'est observé que dans le cœur des patients CCC. Il a été démontré que chez les CCC, un infiltrat de cellules inflammatoires de type Th1 et une réponse IFN γ /TNF α sont présents dans le cœur^{245,489-494}. Dans notre équipe, nous avons mis en évidence que la stimulation de l'IFN- γ et TNF- α dans des cardiomyocytes humains entraîne des dommages mitochondriaux en surproduisant des ROS et des NOS⁴⁸⁸. Les mitochondries endommagées vont être éliminées par mitophagie, on peut penser que plus il y a des mitochondries altérées, plus la mitophagie est importante et moins il y a de copies d'ADNmt. De plus, il serait intéressant de quantifier le nombre de copies de l'ADNmt dans les tissus de l'appareil digestif chez des patients CME, autre organe touché en phase chronique par la maladie de Chagas, afin de voir si l'inflammation des tissus entraîne la diminution de l'ADNmt dans tous les organes touchés par la maladie de Chagas.

L'étude de l'haplogroupe de l'ADNmt indique que les haplogroupes africains étaient surreprésentés dans les groupes de sujets atteints de la maladie de Chagas par rapport aux individus sains. Par ailleurs une minorité d'individus européens est atteinte de la maladie de Chagas, mais nos résultats suggèrent que le macro-haplogroupe H est associé à un risque accru de CCC. Ce résultat est en accord avec des travaux antérieurs sur les cardiomyopathies dilatées et hypertrophiques⁴⁹⁵⁻⁴⁹⁷.

Nous avons mis en évidence 84 variants non synonymes localisés dans 12 gènes mitochondriaux, annotés comme pathogéniques dans différentes bases de données. Ces variants dans l'ADNmt suggèrent qu'il existe un rôle de l'ADNmt dans la pathogenèse de CCC.

III. Etude fonctionnelle des variants

Plusieurs variants ont été identifiés dans l'étude sur des familles brésiliennes. Notre hypothèse est qu'une exposition prolongée au TNF- α et à l'IFN- γ , combinée à ces variants, participerait au développement des CCCs, entraînant des dysfonctionnements mitochondriaux sévères. De ce fait, un patient ne présentant pas ces mutations, et atteint de la maladie de Chagas, serait asymptomatique. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons décidé d'utiliser un modèle cellulaire, la lignée de cardiomyocytes humains AC16, et d'y insérer ces mutations, grâce à la technique de CRISPR/CAS9. Chaque mutation d'intérêt va être insérée, indépendamment, afin d'évaluer l'effet de chacune d'elles. Nous nous sommes intéressés à trois variants présents dans les gènes *DHODH*, *UMPS* et *RPUSD3*. Ces gènes participent au bon fonctionnement mitochondrial.

En effet, le gène *DHODH* code pour une protéine présente à la membrane interne de la mitochondrie et participe à la voie de biosynthèse des pyrimidines ainsi qu'à la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 57). La protéine DHODH va, à la fois, transformer le dihydroorotate en orotate mais aussi permettre le passage d'un électron du complexe I au complexe III. La mutation d'intérêt (rs201230446), située sur le chromosome 10, remplace la cytosine (C), en position 72048540, en thymine (T). Plus précisément, cette mutation se situe dans la région codante du gène *DHODH* et remplace l'acide aminé 135 de la protéine, l'arginine, en cystéine. En analysant les bases de données de cristallographie, il a été montré que l'acide aminé Arginine 135 se situe au niveau du site catalytique. Ainsi, nous pouvons supposer que cette mutation ponctuelle, changeant un acide aminé, altère la fonction biologique de la protéine DHODH, et c'est ce que montrent nos résultats. Effectivement, son activité va être altérée au niveau de la chaîne respiratoire, nous avons observé une diminution de l'ATP et une diminution du potentiel de membrane dans les cellules mutées et stimulées au TNF- α et à l'IFN- γ . Cela signifie qu'avec la mutation et la stimulation la protéine ne transfère plus d'électrons à la quinone ce qui diminue le potentiel de membrane et la production d'ATP. Cette diminution peut être due uniquement à l'altération de l'enzyme DHODH car nous avons mis en évidence que les cinq complexes de la chaîne respiratoire et la protéine CAD en amont de la protéine DHODH ont la même quantité de protéines que dans les cellules non mutées. Nous observons également une augmentation de l'activité enzymatique de la protéine DHODH et une quantité plus élevée de l'orotate dans les cellules mutées et stimulées. Cela pourrait signifier que la mutation n'aurait pas ou peu d'effet sur l'activité enzymatique de la protéine DHODH, la transformation du dihydroorotate en orotate mais qu'elle aurait un impact sur le transfert d'électrons. Nous avons également mis en évidence qu'il y avait une diminution de la quantité d'ADNmt dans les cellules mutées et une augmentation des lysosomes. On pourrait penser que les mitochondries ne produisant pas assez d'ATP sont détruite par mitophagie, ce qui expliquerait la diminution du nombre de copies de l'ADNmt et l'augmentation des lysosomes.

Le gène *UMPS* code pour une protéine qui fait partie de la voie de biosynthèse de la pyrimidine (Figure 57). Cette enzyme va catalyser la réaction de l'orotate en UMP, elle se situe à la suite de la protéine DHODH dans la voie. La mutation retrouvée dans les familles est rs17843776; il s'agit d'une mutation au niveau du chromosome 3, dans la séquence codante du gène *UMPS* où un A>G et où une serine se transforme en glycine au niveau protéique. Nos résultats confirment que la mutation a un effet délétère sur la protéine, ainsi on observe une diminution significative de la quantité d'UMP dans les cellules mutées. De plus, la stimulation au TNF- α et à l'IFN- γ semble aussi diminuer la quantité d'UMP dans les cellules non mutées. La stimulation et la mutation semblent avoir un impact sur l'activité de cette protéine.

La protéine *RPUSD3* est une pseudouridine synthase. Elle catalyse l'isomérisation de l'uridine en pseudouridine d'ARNm mitochondriaux spécifiques. Il s'agit d'une modification post transcriptionnelle nécessaire à la traduction. *RPUSD3* agit sur l'ARNm des sous unités COXI et COXIII. Ce sont des sous unités du complexe IV. *RPUSD3* est également en interaction avec une sous unité du complexe I (*NUDFB1*) et du complexe III (*UQCRC2*)⁴⁹⁸. La mutation retrouvée chez les patients pour ce gène, est un codon stop, la protéine va donc être tronquée et on peut aisément émettre l'hypothèse que cela va altérer sa fonction. Nous avons aussi pu mettre en évidence que la quantité de certains complexes de la chaîne

respiratoire était sous-exprimée dans les cellules avec le variant. En effet, on retrouve une diminution significative des complexes I, III et IV.

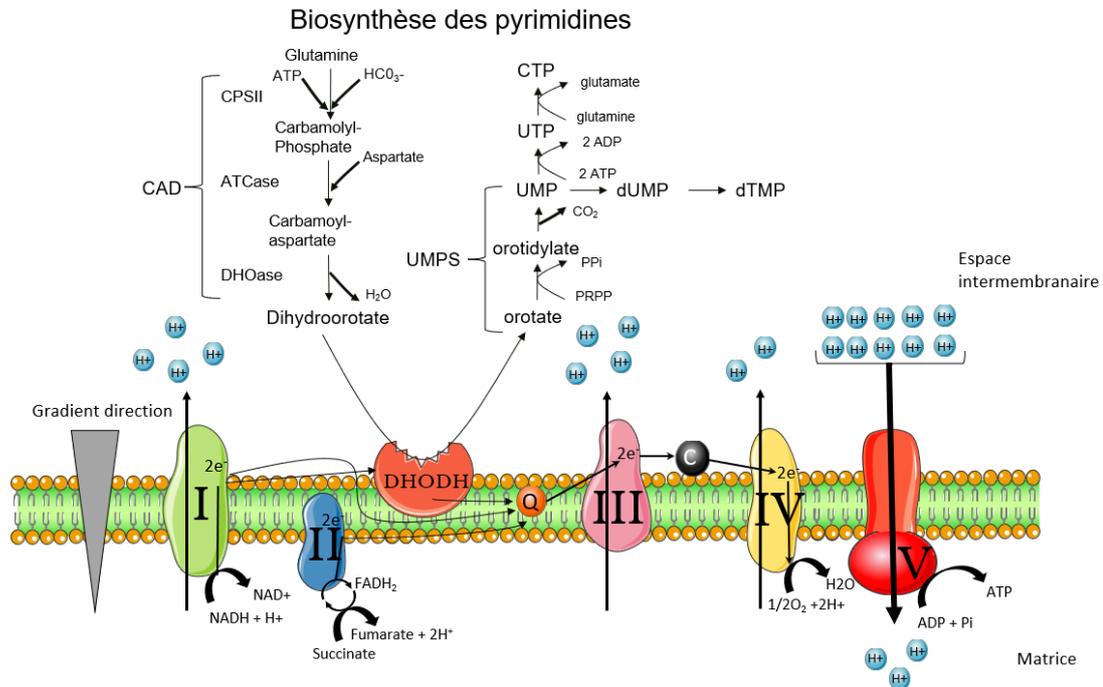


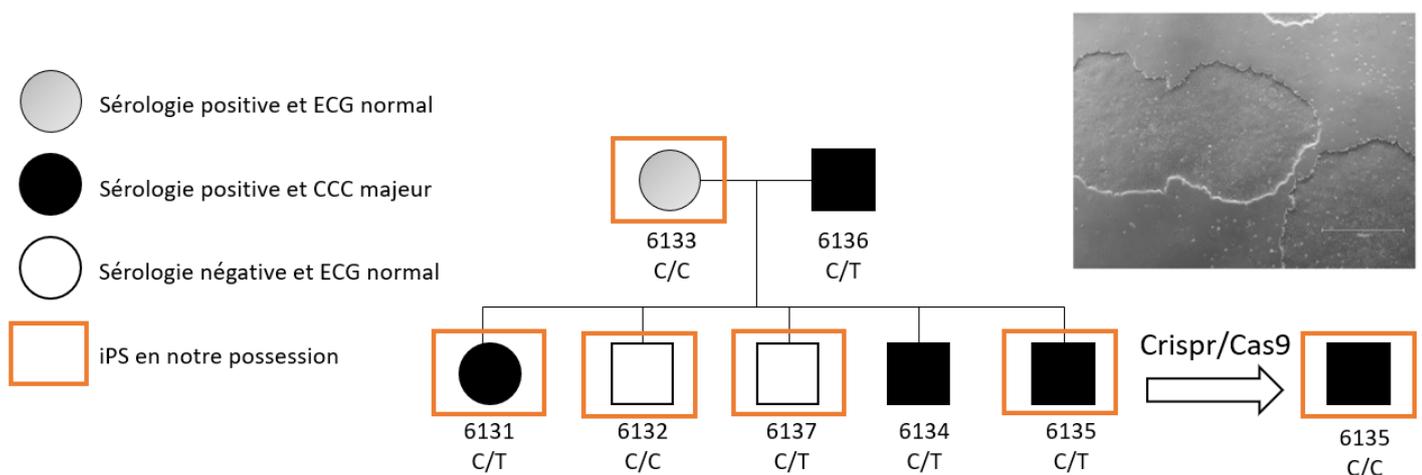
Figure 57 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale et de son lien avec la voie de biosynthèse des pyrimidines. On retrouve les cinq complexes de la chaîne respiratoire complexe I (vert), complexe II (bleu), complexe III (rose), complexe IV (jaune) et le complexe V (rouge). En orange nous retrouvons la protéine DHODH et des protéines CAD et UMPS qui font partie de la voie de biosynthèse des pyrimidines.

Dans les trois variants on retrouve, une diminution du nombre de copies de l'ADNmt, ce qui est très intéressant puisqu'on retrouve une diminution du nombre de copies de l'ADNmt dans plusieurs types de cardiomyopathies. Nous l'avons mis en évidence dans des biopsies de cœur de patients CCC mais que l'on retrouve également dans d'autres cardiomyopathies^{417,420,441}. De plus, l'épuisement de l'ADNmt va engendrer un cycle délétère car moins d'ADNmt, signifie de protéines mitochondriales essentielles et moins de mitochondrie saine⁴⁴¹. Avec les variants DHODH et UMPS on retrouve une diminution similaire que les cellules mutées soient stimulées ou pas. Mais dans les cellules avec la mutation du gène RPUSD3 on retrouve de manière surprenante une augmentation des copies de l'ADNmt lors de la stimulation, et une augmentation de l'ATP alors qu'on a observé une baisse de la quantité des complexes I, III et IV. Cela pourrait signifier que, pour pallier au manque des complexes, il y a une augmentation des copies de l'ADNmt, c'est-à-dire une augmentation du nombre de mitochondries. Il sera intéressant de regarder la dynamique mitochondriale par microscopie sur le clone RPUSD3 avec et sans stimulation afin de voir si la mutation et la stimulation n'affecteront pas la dynamique mitochondriale.

Nos résultats suggèrent que ces trois variants ont un effet délétère sur la mitochondrie, et une stimulation par du TNF- α et de l'IFN- γ des cellules empire le

phénotype. On pourrait donc penser que ces variants, ajoutés à la stimulation prolongée par des cytokines inflammatoires pourraient expliquer, en partie, la mise en place des CCC. Il serait donc pertinent de s'intéresser également aux autres variants identifiés, dans notre étude tels que MAP4K4, SLC11A1 et MAML1 qui sont importants pour l'activation du NF- κ B induite par le TNF- α /TLR et la production de cytokines inflammatoires, qui peuvent, à leur tour, induire un dysfonctionnement mitochondrial et inflammatoire. Il serait judicieux de déterminer si ces variants auraient une signalisation de NF- κ B plus importante et un dysfonctionnement mitochondrial secondaire dépendant du NF- κ B, conformément aux résultats obtenus dans d'autres modèles⁴⁹⁹. Pour évaluer l'activation du NF- κ B, il serait possible de faire des tests de translocation nucléaire par fluorescence confocale et étudier l'expression des gènes et des protéines des cytokines dépendantes du NF- κ B. Pendant ma thèse, je n'ai pas eu le temps de la tester fonctionnellement mais des cellules mutées pour le gène *SLC11A1* ont également été générées.

Des iPS ont été générées à partir d'une famille recrutée au Brésil, famille dans laquelle le variant du gène *DHODH* a été retrouvé. Ces iPS présentent ou ne présentent pas la mutation d'intérêt. En effet nous avons des iPS générés à partir de patients qui n'ont pas la mutation (6133, 6132), ou qui ont la mutation (6131, 6137 et 6135) (Figure 58). Il est important de noter que trois des iPS (6133, 6131, 6135) ont été générés à partir de patients infectés par *T. cruzi* et que deux autres (6132, 6137) sont naïfs au parasite. Les deux patients naïfs au parasite n'ont pas de problème cardiaque, il serait captivant de voir si la lignée iPS 6137 qui possède la mutation et qui est naïf pour le parasite, stimulée avec du TNF- α et d'IFN- γ développe des dysfonctionnements mitochondriaux. Sans compter que nous avons modifié par Crispr/Cas9 l'iPS généré à partir du patient 6135 muté, afin d'avoir des cellules avec le même génotype mais sans la mutation (Figure 58). Il serait enfin intéressant de faire des tests fonctionnels afin de voir si la modification du variant par un génotype sauvage restaure le phénotype. Avec toutes ces lignées d'iPS, il serait alors très adéquat de différencier ces cellules en cardiomyocytes et de tester fonctionnellement les différents phénotypes observés sur les cellules AC16. On pourrait même aller plus loin en essayant de tester le repositionnement de médicaments sur ces cardiomyocytes dérivés d'iPS de patients



pour élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Figure 58 : Les iPS générés à partir de la famille nucléaire où la mutation du gène *DHODH* a été trouvée.

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis de mieux comprendre la physiopathologie liée au développement de CCC dans la maladie de Chagas mais aussi liée aux cardiomyopathies de manière générale. Ils ont mis en évidence que la stimulation avec des cytokines pro-inflammatoires était à l'origine d'altérations mitochondriales et que des variants génétiques couplées à la stimulation, pourraient être une explication à la mise en place de la CCC. En effet, les cytokines produites lors d'une réaction inflammatoire excessive dans des organes spécifiques tels que le cœur ou l'appareil digestif seraient à l'origine de l'épuisement des mitochondries dans ces tissus, amplifié par des variants génétiques touchant la mitochondrie. Dans ces organes la mitochondrie serait altérée, menant à la phase chronique de la maladie de Chagas. La CCC est une maladie multifactorielle encore mal comprise, ce travail de recherche est un pas dans la compréhension de la maladie et donc dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Bibliographies

1. Chagas, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1**, 159–218 (1909).
2. Kropf, S. P. & Sá, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *Hist. cienc. saude-Manguinhos* **16**, 13–34 (2009).
3. Kropf, S. P. & Sá, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *Hist. cienc. saude-Manguinhos* **16**, 13–34 (2009).
4. World Health Organization [cited 2021 Dec 2];Chagas disease (American trypanosomiasis). <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease>.
5. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
6. Gascon, J., Bern, C. & Pinazo, M.-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica* **115**, 22–27 (2010).
7. Strasen, J. *et al.* Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clin Res Cardiol* **103**, 1–10 (2014).
8. Basile, L. *et al.* Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Eurosurveillance* **16**, (2011).
9. Martins-Melo, F. R., Castro, M. C. & Werneck, G. L. Levels and trends in Chagas disease-related mortality in Brazil, 2000–2019. *Acta Tropica* **220**, 105948 (2021).
10. Ramsey, J. M., Elizondo-Cano, M., Sanchez-González, G., Peña-Nieves, A. & Figueroa-Lara, A. Opportunity Cost for Early Treatment of Chagas Disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2776 (2014).
11. Bayona-i-Carrasco, J. & Avila-Tàpies, R. Latin Americans and Caribbeans in Europe: A Cross-Country Analysis. *International Migration* **58**, 198–218 (2020).

12. Pinazo, M.-J. & Gascon, J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Tropica* **151**, 16–20 (2015).
13. Romay-Barja, M. *et al.* Chagas screening and treatment among Bolivians living in Madrid, Spain: The need for an official protocol. *PLoS ONE* **14**, e0213577 (2019).
14. Liu, Q. & Zhou, X.-N. Preventing the transmission of American trypanosomiasis and its spread into non-endemic countries. *Infect Dis Poverty* **4**, 60 (2015).
15. Requena-Méndez, A. *et al.* Health Policies to Control Chagas Disease Transmission in European Countries. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e3245 (2014).
16. Chagas, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **1**, 159–218 (1909).
17. Souza, W. D. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94**, 17–36 (1999).
18. Cavalcanti, D. P. & De Souza, W. The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. *Scanning* **2018**, 1–10 (2018).
19. Madrigal, A. G. Diagnosis of Chagas Disease by Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA Fragments from Filtered Urine Samples.
20. Souza, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *CPD* **8**, 269–285 (2002).
21. Souza, W. D. Electron microscopy of trypanosomes: a historical view. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **103**, 313–325 (2008).
22. Tyler, K. M. & Engman, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology* **31**, 472–481 (2001).
23. Zingales, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**, 1051–1054 (2009).

24. Pinto, C. M., Kalko, E. K. V., Cottontail, I., Wellinghausen, N. & Cottontail, V. M. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infection, Genetics and Evolution* **12**, 1328–1332 (2012).
25. Ramírez, J. D. *et al.* Trypanosome species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infection, Genetics and Evolution* **22**, 250–256 (2014).
26. Guhl, F., Auderheide, A. & Ramírez, J. D. From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. *International Journal for Parasitology* **44**, 605–612 (2014).
27. Ramírez, J. D. *et al.* First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. *Zoonoses and Public Health* **61**, 477–479 (2014).
28. Marcili, A. *et al.* A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* **136**, 641–655 (2009).
29. Zingales, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution* **12**, 240–253 (2012).
30. Lima, L. *et al.* Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting TcBat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Tropica* **151**, 166–177 (2015).
31. El-Sayed, N. M. *et al.* The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi* , Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science* **309**, 409–415 (2005).
32. Tian, Y. *et al.* The Silica-Like Extended Polymorphism of Cobalt(II) Imidazolate Three-Dimensional Frameworks: X-ray Single-Crystal Structures and Magnetic Properties. *Chemistry A European J* **9**, 5673–5685 (2003).

33. Sturm, N. R. & Campbell, D. A. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* **115**, 35–43 (2010).
34. Westenberger, S. J., Barnabé, C., Campbell, D. A. & Sturm, N. R. Two Hybridization Events Define the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* **171**, 527–543 (2005).
35. De Freitas, J. M. *et al.* Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* **2**, e24 (2006).
36. Magalhães, L. M. D., Gollob, K. J., Zingales, B. & Dutra, W. O. Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human–host interactions. *The Lancet Microbe* **3**, e711–e722 (2022).
37. Brenière, S. F., Waleckx, E. & Barnabé, C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004792 (2016).
38. Da Rosa, J. A. *et al.* A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZK* **675**, 1–25 (2017).
39. De Oliveira, A. B. B., Alevi, K. C. C., Imperador, C. H. L., Madeira, F. F. & Azeredo-Oliveira, M. T. V. D. Parasite–Vector Interaction of Chagas Disease: A Mini-Review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **98**, 653–655 (2018).
40. Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha, D. D. S. & Jurberg, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* **202**, 1 (2003).
41. Jurberg, J. & Galvão, C. Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health. (2006).
42. Cruz-Pacheco, G., Esteva, L. & Vargas, C. Control measures for Chagas disease. *Mathematical Biosciences* **237**, 49–60 (2012).
43. Rassi, A., Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *The Lancet* **375**, 1388–1402 (2010).

44. Gourbière, S., Dorn, P., Tripet, F. & Dumonteil, E. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity* **108**, 190–202 (2012).
45. Coura, J. R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **108**, 962–967 (2013).
46. Bern, C. *et al.* Congenital *Trypanosoma cruzi* Transmission in Santa Cruz, Bolivia. *CLIN INFECT DIS* **49**, 1667–1674 (2009).
47. Blanco, S. B. *et al.* Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop Med Int Health* **5**, 293–301 (2000).
48. Moretti, E. *et al.* Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **38**, 53–55 (2005).
49. Coura, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**, 113–122 (2007).
50. Solana, M. E. *et al.* Reduction of parasite levels in blood improves pregnancy outcome during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology* **136**, 627–639 (2009).
51. Torrico, F. *et al.* Are maternal re-infections with *Trypanosoma cruzi* associated with higher morbidity and mortality of congenital Chagas disease? *Tropical Med Int Health* **11**, 628–635 (2006).
52. Pérez-López, F. R. & Chedraui, P. Chagas disease in pregnancy: a non-endemic problem in a globalized world. *Arch Gynecol Obstet* **282**, 595–599 (2010).
53. Gomes, Y. M., Lorena, V. M. & Luquetti, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**, 115–121 (2009).
54. Sosa-Estani, S. *et al.* Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras, and Mexico. *Am J Trop Med Hyg* **79**, 755–759 (2008).

55. Abras, A. *et al.* Towards a New Strategy for Diagnosis of Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Clin Microbiol* **55**, 1396–1407 (2017).
56. Schmunis, G. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion* **31**, 547–557 (1991).
57. Schmunis, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**, 75–86 (2007).
58. Organization, W. H. The 2016 global status report on blood safety and availability. (2017).
59. Angheben, A. *et al.* Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfusion* (2015) doi:10.2450/2015.0040-15.
60. Mardani, A. Prevention strategies of transfusion-transmitted parasitic infections (TTPIs): Strengths and challenges of current approaches, and evaluation of the strategies implemented in Iran. *Parasite Epidemiol Control* **9**, e00141 (2020).
61. Kun, H. *et al.* Transmission of *Trypanosoma cruzi* by Heart Transplantation. *CLIN INFECT DIS* **48**, 1534–1540 (2009).
62. Chin-Hong, P. V. *et al.* Screening and Treatment of Chagas Disease in Organ Transplant Recipients in the United States: Recommendations from the Chagas in Transplant Working Group. *American Journal of Transplantation* **11**, 672–680 (2011).
63. Shikanai-Yasuda, M. A. *et al.* Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* **33**, 351–357 (1991).
64. Alarcón De Noya, B. *et al.* Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. *J INFECT DIS* **201**, 1308–1315 (2010).
65. Rios, A. *et al.* Can sexual transmission support the enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **113**, 3–8 (2018).
66. Ribeiro, M. *et al.* Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Experimental Parasitology* **162**, 1–6 (2016).

67. Martin, D. L. *et al.* Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta Tropica* **149**, 15–18 (2015).
68. Gomes, C., Almeida, A. B., Rosa, A. C., Araujo, P. F. & Teixeira, A. R. L. American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. *International Journal of Infectious Diseases* **81**, 81–84 (2019).
69. Guarner, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Seminars in Diagnostic Pathology* **36**, 164–169 (2019).
70. Echavarría, N. G., Echeverría, L. E., Stewart, M., Gallego, C. & Saldarriaga, C. Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Current Problems in Cardiology* **46**, 100507 (2021).
71. Nunes, M. C. P., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J. & Ribeiro, A. L. Chagas Disease. *Journal of the American College of Cardiology* **62**, 767–776 (2013).
72. Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases* **1**, 92–100 (2001).
73. Bern, C., Martin, D. L. & Gilman, R. H. Acute and Congenital Chagas Disease. in *Advances in Parasitology* vol. 75 19–47 (Elsevier, 2011).
74. Acquatella, H. *et al.* Recommendations for Multimodality Cardiac Imaging in Patients with Chagas Disease: A Report from the American Society of Echocardiography in Collaboration With the InterAmerican Association of Echocardiography (ECOSIAC) and the Cardiovascular Imaging Department of the Brazilian Society of Cardiology (DIC-SBC). *Journal of the American Society of Echocardiography* **31**, 3–25 (2018).
75. Prevention, C.-C. for D. C. and. CDC - Chagas Disease - Detailed Fact Sheet. https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html (2022).
76. Parker, E. R. & Sethi, A. Chagas Disease: Coming to a Place Near You. *Dermatologic Clinics* **29**, 53–62 (2011).
77. Pays, J.-F. Le diagnostic biologique de la maladie de Chagas. *Revue Francophone des Laboratoires* **2011**, 47–59 (2011).

78. Galvao, L. M., Gomes, M. L., Pena, S. D., Chiari, E. & Macedo, A. M. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **60**, 205–210 (1999).
79. World Health Organization & TDR Disease Reference Group on chagas Disease, H. A. T. and L. *Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis*. (World Health Organization, 2012).
80. Müller Kratz, J., Garcia Bournissen, F., Forsyth, C. J. & Sosa-Estani, S. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology* **11**, 943–957 (2018).
81. Marr, J. J. & Docampo, R. Chemotherapy for Chagas' Disease: A Perspective of Current Therapy and Considerations for Future Research. *Clinical Infectious Diseases* **8**, 884–903 (1986).
82. Coura, J. R. & Castro, S. L. D. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**, 3–24 (2002).
83. Kratz, J. M. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. *Acta Tropica* **198**, 105107 (2019).
84. Ribeiro, A. L., Nunes, M. P., Teixeira, M. M. & Rocha, M. O. C. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* **9**, 576–589 (2012).
85. Tanowitz, H. B. *et al.* Developments in the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* **13**, 1393–1409 (2015).
86. De Souza, A. C. J. *et al.* Development of a risk score to predict sudden death in patients with Chaga's heart disease. *International Journal of Cardiology* **187**, 700–704 (2015).
87. Manzullo, E. C. & Chuit, R. Risk of death due to chronic chagasic cardiopathy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94**, 317–320 (1999).
88. Keegan, R., Yeung, C. & Baranchuk, A. Sudden Cardiac Death Risk Stratification and Prevention in Chagas Disease: A Non-systematic Review of the Literature. *Arrhythm Electrophysiol Rev* **9**, 175–181 (2020).
89. Echeverría, L. E. *et al.* WHF IASC Roadmap on Chagas Disease. *gh* **15**, 26 (2020).

90. L'activité électrique du cœur (Schéma légèrement modifié). *FFC* <https://fedecardio.org/je-m-informe/l-activite-electrique-du-coeur/> (2016).
91. Brochet, P. *et al.* Blood DNA methylation marks discriminate Chagas cardiomyopathy disease clinical forms. *Front. Immunol.* **13**, 1020572 (2022).
92. Balaji, G. N., Subashini, T. S. & Chidambaram, N. Detection and diagnosis of dilated cardiomyopathy and hypertrophic cardiomyopathy using image processing techniques. *Engineering Science and Technology, an International Journal* **19**, 1871–1880 (2016).
93. Ribeiro, A. L. *et al.* Electrocardiographic Abnormalities in Trypanosoma cruzi Seropositive and Seronegative Former Blood Donors. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2078 (2013).
94. Bestetti, R. B., Freitas, O. C., Muccillo, G. & Oliveira, J. S. M. Clinical and morphological characteristics associated with sudden cardiac death in patients with Chagas' disease. *European Heart Journal* **14**, 1610–1614 (1993).
95. Santos, É. & Menezes Falcão, L. Chagas cardiomyopathy and heart failure: From epidemiology to treatment. *Revista Portuguesa de Cardiologia* **39**, 279–289 (2020).
96. Suescún-Carrero, S. H., Tadger, P., Sandoval Cuellar, C., Armadans-Gil, L. & Ramírez López, L. X. Rapid diagnostic tests and ELISA for diagnosing chronic Chagas disease: Systematic revision and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* **16**, e0010860 (2022).
97. Alila Medical Media | Vidéos en Français. *Alila Medical Media* <https://www.alilamedicalmedia.com/-/galleries/videos-en-francais>.
98. Lu, N. *et al.* Successful treatment of suspected early form of chronic Chagas cardiomyopathy: a case report. *European Heart Journal - Case Reports* **6**, ytac403 (2022).
99. Rassi, A., Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. Chagas Disease. in *Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean* (eds. Franco-Paredes, C. & Santos-Preciado, J. I.) 45–71 (Springer Vienna, 2015). doi:10.1007/978-3-7091-1422-3_3.
100. Andrade, J. P. D. *et al.* I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica: resumo executivo. *Arq. Bras. Cardiol.* **96**, 434–442 (2011).

101. Regueiro, A. *et al.* Myocardial involvement in Chagas disease: Insights from cardiac magnetic resonance. *International Journal of Cardiology* **165**, 107–112 (2013).
102. Benziger, C. P., Do Carmo, G. A. L. & Ribeiro, A. L. P. Chagas Cardiomyopathy. *Cardiology Clinics* **35**, 31–47 (2017).
103. Urbina, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica* **115**, 55–68 (2010).
104. Marin-Neto, J. A., Rassi Jr, A., Avezum Jr, A., Mattos, A. C. & Rassi, A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**, 319–324 (2009).
105. Tanowitz, H. B. *et al.* Perspectives on Trypanosoma cruzi–Induced Heart Disease (Chagas Disease). *Progress in Cardiovascular Diseases* **51**, 524–539 (2009).
106. Andrade, S. G., Stocker-Guerret, S., Pimentel, A. S. & Grimaud, J. A. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with Trypanosoma cruzi, under specific chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **86**, 187–200 (1991).
107. Garcia, S. *et al.* Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1521–1528 (2005).
108. Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H. & Segura, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: Clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *American Heart Journal* **127**, 151–162 (1994).
109. Viotti, R. *et al.* Long-Term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus No Treatment: A Nonrandomized Trial. *Ann Intern Med* **144**, 724 (2006).
110. Fabbro De Suasnábar, D. *et al.* Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* **42**, 99–109 (2000).

111. Marin-Neto, J. A. *et al.* Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *American Heart Journal* **156**, 37–43 (2008).
112. Lauria-Pires, L. *et al.* Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **63**, 111–118 (2000).
113. Britto, C. *et al.* Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **96**, 823–826 (2001).
114. Morillo, C. A. *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. *Cruzi* Carriers. *Journal of the American College of Cardiology* **69**, 939–947 (2017).
115. Pandey, R. P. *et al.* Drug Repurposing in Chagas Disease: Chloroquine Potentiates Benznidazole Activity against *Trypanosoma cruzi* *In Vitro* and *In Vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* **66**, e00284-22 (2022).
116. Rodríguez, A., Samoff, E., Rioult, M. G., Chung, A. & Andrews, N. W. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *The Journal of cell biology* **134**, 349–362 (1996).
117. Stecconi-Silva, R., Andreoli, W. & Mortara, R. Parameters affecting cellular invasion and escape from the parasitophorous vacuole by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **98**, 953–958 (2003).
118. Nunes, M. C. P. *et al.* Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **138**, (2018).
119. Martinez, F., Perna, E., Perrone, S. V. & Liprandi, A. S. Chagas Disease and Heart Failure: An Expanding Issue Worldwide. *Eur Cardiol* **14**, 82–88 (2019).

120. Montgomery, S. P., Jones, J. L., Schulkin, J., Verani, J. R. & Anderson, B. Survey of Obstetrician-Gynecologists in the United States About Chagas Disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **83**, 891–895 (2010).
121. Da Silva Júnior, O., Borges, M. C. C., De Melo, C. S., Nascente, G. A. N. & Correia, D. Alternative Sites for Right Ventricular Pacing in Chagas Disease: A Comparative Study of the Mid-Septum and Inflow Tract. *Pacing Clinical Electrophysiology* **37**, 1166–1173 (2014).
122. Scanavacca, M. & Sosa, E. Catheter Ablation to Treat Sustained Ventricular Tachycardia in Patients With Chagas Cardiomyopathy and Implantable Cardioverter-Defibrillator. *Journal of the American College of Cardiology* **63**, 1028–1029 (2014).
123. Bestetti, R. B. & Theodoropoulos, T. A. D. A Systematic Review of Studies on Heart Transplantation for Patients With End-Stage Chagas' Heart Disease. *Journal of Cardiac Failure* **15**, 249–255 (2009).
124. Vagelos, R. & Fowler, M. B. Selection of Patients for Cardiac Transplantation. *Cardiology Clinics* **8**, 23–38 (1990).
125. Bacal, F. *et al.* Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades: Transplantation for Chagas' disease. *Clinical Transplantation* **24**, E29–E34 (2010).
126. Fiorelli, A. I. *et al.* Heart Transplantation in 107 Cases of Chagas' Disease. *Transplantation Proceedings* **43**, 220–224 (2011).
127. Bocchi, E. A. & Fiorelli, A. The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. *The Annals of Thoracic Surgery* **71**, 1833–1838 (2001).
128. Matsuda, N. M., Miller, S. M. & Evora, P. R. B. The Chronic Gastrointestinal Manifestations of Chagas Disease. *Clinics* **64**, 1219–1224 (2009).
129. Boyce, H. W. & Bakheet, M. R. Sialorrhea: a review of a vexing, often unrecognized sign of oropharyngeal and esophageal disease. *J Clin Gastroenterol* **39**, 89–97 (2005).

130. Medina-Rincón, G. J. *et al.* Molecular and Clinical Aspects of Chronic Manifestations in Chagas Disease: A State-of-the-Art Review. *Pathogens* **10**, 1493 (2021).
131. Oliveira, R. B. *et al.* Impaired gastric accommodation to distension and rapid gastric emptying in patients with Chagas' disease. *Digest Dis Sci* **25**, 790–794 (1980).
132. Filho, J. R., De Rezende, J. M. & Melo, J. R. D. C. Electrogastrography in Patients with Chagas' Disease. *Dig Dis Sci* **50**, 1882–1888 (2005).
133. Pinotti, H. W., Felix, V. N., Zilberstein, B. & Cecconello, I. Surgical complications of Chagas' disease: Megaesophagus, achalasia of the pylorus, and cholelithiasis. *World J. Surg.* **15**, 198–204 (1991).
134. Troncon, L. E. A., Oliveira, R. B., Meneghelli, U. G., Dantas, R. O. & Godoy, R. A. Fasting and Food-Stimulated Plasma Gastrin Levels in Chronic Chagas' Disease. *Digestion* **29**, 171–176 (1984).
135. Villanova, M. G., Meneghelli, U. G. & Dantas, R. O. Gallbladder Motor Function in Chagasic Patients with Megacolon and/or Megaesophagus. *Digestion* **36**, 189–194 (1987).
136. Oliveira, R. B., Meneghelli, U. G., De Godoy, R. A., Dantas, R. O. & Padovan, W. Abnormalities of interdigestive motility of the small intestine in patients with Chagas' disease. *Digest Dis Sci* **28**, 294–299 (1983).
137. Bern, C. *et al.* Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States: A Systematic Review. *JAMA* **298**, 2171 (2007).
138. Da Silveira, A. B. M. *et al.* Neurochemical Coding of the Enteric Nervous System in Chagasic Patients with Megacolon. *Dig Dis Sci* **52**, 2877–2883 (2007).
139. Moreira, H., De Rezende, J. M., Moreira, H. & Moreira, J. P. T. Chagasic Megacolon. in *Constipation* (eds. Wexner, S. D. & Duthie, G. S.) 235–246 (Springer London, 2006). doi:10.1007/978-1-84628-275-1_25.
140. Castro, C., Hernandez, E. B., Rezende, J. & Prata, A. Estudo radiológico do megacólon em área endêmica de doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **43**, 562–566 (2010).

141. Borges Migliavaca, C. *et al.* Isosorbide and nifedipine for Chagas' megaesophagus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* **12**, e0006836 (2018).
142. Do Carmo Neto, J. R., Guerra, R. O., Rodrigues, W. F., Da Silva, M. V. & Machado, J. R. Neuroprotective Treatments for Digestive Forms of Chagas Disease in Experimental Models: A Systematic Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2022**, 1–14 (2022).
143. Garcia, R. L. S., Matos, B. M. R. D., Féres, O. & Rocha, J. J. R. D. Surgical treatment of Chagas megacolon. Critical analysis of outcome in operative methods. *Acta Cir. Bras.* **23**, 83–92 (2008).
144. Immunité innée. *Nutrixel Info* <https://nutrixel-info.fr/index/immunite-innee/>.
145. Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Seminars in Immunology* **19**, 24–32 (2007).
146. Hatada, E. N., Krappmann, D. & Scheidereit, C. NF- κ B and the innate immune response. *Current Opinion in Immunology* **12**, 52–58 (2000).
147. Andrieux, P., Chevillard, C., Cunha-Neto, E. & Nunes, J. P. S. Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation. *IJMS* **22**, 11338 (2021).
148. Lee, K. Y. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Med Biol Sci Eng* **2**, 1–5 (2019).
149. McKenna, E. *et al.* Neutrophils: Need for Standardized Nomenclature. *Front. Immunol.* **12**, 602963 (2021).
150. Neutrophil Extracellular Traps activate the immune system. <https://www.mpiib-berlin.mpg.de/2065118/neutrophil-extracellular-traps-aktivieren-das-immunsystem>.
151. Miyake, K. & Karasuyama, H. Emerging roles of basophils in allergic inflammation. *Allergology International* **66**, 382–391 (2017).
152. Miyake, K., Shibata, S., Yoshikawa, S. & Karasuyama, H. Basophils and their effector molecules in allergic disorders. *Allergy* **76**, 1693–1706 (2021).
153. Driss, V., Legrand, F., Loiseau, S. & Capron, M. L'éosinophile : nouvel acteur de la réponse immunitaire innée ? *Med Sci (Paris)* **26**, 621–626 (2010).

154. Alam, R. A BRIEF REVIEW OF THE IMMUNE SYSTEM. *Primary Care: Clinics in Office Practice* **25**, 727–738 (1998).
155. Narni-Mancinelli, É., Ugolini, S. & Vivier, É. Les cellules *natural killer*: Adaptation et mémoire dans le système immunitaire inné. *Med Sci (Paris)* **29**, 389–395 (2013).
156. Marshall, J. S. & Jawdat, D. M. Mast cells in innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **114**, 21–27 (2004).
157. Schmidlin, F. *et al.* Protease-Activated Receptor 2 Mediates Eosinophil Infiltration and Hyperreactivity in Allergic Inflammation of the Airway. *The Journal of Immunology* **169**, 5315–5321 (2002).
158. Adapté de : Le système du complément. <https://slideplayer.fr/slide/9173079/>.
159. Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *The Lancet* **357**, 1777–1789 (2001).
160. Liu, C. *et al.* Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advanced Science* **8**, 2004433 (2021).
161. Van Roon, J. A. G. Interleukin 7 stimulates tumour necrosis factor alpha and Th1 cytokine production in joints of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **62**, 113–119 (2003).
162. Jang, D. *et al.* The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *IJMS* **22**, 2719 (2021).
163. Kak, G., Raza, M. & Tiwari, B. K. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular Concepts* **9**, 64–79 (2018).
164. Lin, W.-W. & Karin, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* **117**, 1175–1183 (2007).
165. Pickup, J. C., Chusney, G. D., Thomas, S. M. & Burt, D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor α and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sciences* **67**, 291–300 (2000).
166. Kofler, S., Nickel, T. & Weis, M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clinical Science* **108**, 205–213 (2005).

167. Mendes, V., Galvão, I. & Vieira, A. T. Mechanisms by Which the Gut Microbiota Influences Cytokine Production and Modulates Host Inflammatory Responses. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **39**, 393–409 (2019).
168. Zlotnik, A., Yoshie, O. & Nomiya, H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* **7**, 243 (2006).
169. Fajgenbaum, D. C. & June, C. H. Cytokine Storm. *N Engl J Med* **383**, 2255–2273 (2020).
170. Borish, L. C. & Steinke, J. W. 2. Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111**, S460–S475 (2003).
171. Simões, M. V., Romano, M. M. D., Schmidt, A., Martins, K. S. M. & Marin-Neto, J. A. Chagas Disease Cardiomyopathy. *International Journal of Cardiovascular Sciences* (2018) doi:10.5935/2359-4802.20180011.
172. Burke, S. *et al.* Adipocytes in both brown and white adipose tissue of adult mice are functionally connected via gap junctions: implications for Chagas disease. *Microbes and Infection* **16**, 893–901 (2014).
173. Montalvo-Ocototxle, I. G. *et al.* Chagas Heart Disease: Beyond a Single Complication, from Asymptomatic Disease to Heart Failure. *JCM* **11**, 7262 (2022).
174. Dos-Santos, A. L. A., Carvalho-Kelly, L. F., Dick, C. F. & Meyer-Fernandes, J. R. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. *Experimental Parasitology* **167**, 67–75 (2016).
175. Powell, M. R., Morgan, J., Guarner, J. & Colley, D. G. Cytokine mRNA levels in the hearts of inbred mice that develop different degrees of cardiomyopathy during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology* **20**, 463–471 (1998).
176. Kayama, H. & Takeda, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and Infection* **12**, 511–517 (2010).
177. Schulz, E. G., Mariani, L., Radbruch, A. & Höfer, T. Sequential Polarization and Imprinting of Type 1 T Helper Lymphocytes by Interferon- γ and Interleukin-12. *Immunity* **30**, 673–683 (2009).

178. Maraskovsky, E., Chen, W. F. & Shortman, K. IL-2 and IFN-gamma are two necessary lymphokines in the development of cytolytic T cells. *The Journal of Immunology* **143**, 1210–1214 (1989).
179. Curtsinger, J. M., Agarwal, P., Lins, D. C. & Mescher, M. F. Autocrine IFN- γ Promotes Naive CD8 T Cell Differentiation and Synergizes with IFN- α To Stimulate Strong Function. *The Journal of Immunology* **189**, 659–668 (2012).
180. Cortese-Krott, M. M. *et al.* Zinc regulates iNOS-derived nitric oxide formation in endothelial cells. *Redox Biology* **2**, 945–954 (2014).
181. Salim, T., Sershen, C. L. & May, E. E. Investigating the Role of TNF- α and IFN- γ Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. *PLoS ONE* **11**, e0153289 (2016).
182. FUENMAYOR, Carmen *et al.* Acute Chagas' disease. *Acta Cardiologica* 33–37 (2005) doi:10.2143/AC.60.1.2005046.
183. Lewis, M. D. *et al.* Bioluminescence imaging of chronic *T. rypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. *Cell Microbiol* **16**, 1285–1300 (2014).
184. Cunha-Neto, E. & Chevillard, C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. *Mediators of Inflammation* **2014**, 1–11 (2014).
185. Chaves, A. T. *et al.* Galectin-3 and fibrosis intensity in Chronic Chagas Cardiomyopathy: a systematic review. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* **64**, e45 (2022).
186. Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C. & Simões, M. V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *Circulation* **115**, 1109–1123 (2007).
187. Cunha-Neto, E. *et al.* Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 Trypanosoma cruzi protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J. Clin. Invest.* **98**, 1709–1712 (1996).

188. Jackson, M., Marks, L., May, G. H. W. & Wilson, J. B. The genetic basis of disease. *Essays in Biochemistry* **62**, 643–723 (2018).
189. Frazer, K. A., Murray, S. S., Schork, N. J. & Topol, E. J. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* **10**, 241–251 (2009).
190. Steffann, J., Monnot, S., Rotig, A., Munnich, A. & Bonnefont, J.-P. Prévenir la transmission des mutations de l'ADN mitochondrial : mythe ou réalité ? *Med Sci (Paris)* **26**, 897–899 (2010).
191. McCarthy, M. I. *et al.* Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* **9**, 356–369 (2008).
192. Elliott, P. *et al.* Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal* **29**, 270–276 (2007).
193. Hershberger, R. E., Hedges, D. J. & Morales, A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol* **10**, 531–547 (2013).
194. Weintraub, R. G., Semsarian, C. & Macdonald, P. Dilated cardiomyopathy. *The Lancet* **390**, 400–414 (2017).
195. McKenna, W. J., Maron, B. J. & Thiene, G. Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies. *Circ Res* **121**, 722–730 (2017).
196. Abelmann, W. H. & Lorell, B. H. The challenge of cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* **13**, 1219–1239 (1989).
197. Yamada, T. & Nomura, S. Recent Findings Related to Cardiomyopathy and Genetics. *IJMS* **22**, 12522 (2021).
198. Pugh, T. J. *et al.* The landscape of genetic variation in dilated cardiomyopathy as surveyed by clinical DNA sequencing. *Genetics in Medicine* **16**, 601–608 (2014).
199. Tobita, T. *et al.* Genetic basis of cardiomyopathy and the genotypes involved in prognosis and left ventricular reverse remodeling. *Sci Rep* **8**, 1998 (2018).

200. Greaser, M. L. & Pleitner, J. M. Titin isoform size is not correlated with thin filament length in rat skeletal muscle. *Front. Physiol.* **5**, (2014).
201. Kepten, E. & Miné-Hattab, J. Sans lamine A, la chromatine s'emballe. *Med Sci (Paris)* **33**, 126–130 (2017).
202. Priori, S. G. *et al.* 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J* **36**, 2793–2867 (2015).
203. Teekakirikul, P., Kelly, M. A., Rehm, H. L., Lakdawala, N. K. & Funke, B. H. Inherited Cardiomyopathies. *The Journal of Molecular Diagnostics* **15**, 158–170 (2013).
204. Marian, A. J. Molecular Genetic Basis of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Res* **128**, 1533–1553 (2021).
205. Corrado, D. *et al.* Spectrum of Clinicopathologic Manifestations of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: A Multicenter Study. *Journal of the American College of Cardiology* **30**, 1512–1520 (1997).
206. Ohno, S. The genetic background of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Journal of Arrhythmia* **32**, 398–403 (2016).
207. Merner, N. D. *et al.* Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Type 5 Is a Fully Penetrant, Lethal Arrhythmic Disorder Caused by a Missense Mutation in the TMEM43 Gene. *The American Journal of Human Genetics* **82**, 809–821 (2008).
208. Taylor, M. *et al.* Genetic Variation in Titin in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy–Overlap Syndromes. *Circulation* **124**, 876–885 (2011).
209. Muchtar, E., Blauwet, L. A. & Gertz, M. A. Restrictive Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. *Circ Res* **121**, 819–837 (2017).

210. Arbustini, E. *et al.* Desmin accumulation restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene defects. *European Journal of Heart Failure* **8**, 477–483 (2006).
211. Klaassen, S. *et al.* Mutations in Sarcomere Protein Genes in Left Ventricular Noncompaction. *Circulation* **117**, 2893–2901 (2008).
212. Tang, S., Batra, A., Zhang, Y., Ebenroth, E. S. & Huang, T. Left ventricular noncompaction is associated with mutations in the mitochondrial genome. *Mitochondrion* **10**, 350–357 (2010).
213. Oliveira, R. M., Smith, P. G., Netto, J. C. A., Zicker, E. M. S. & Zicker, F. Physical Activity, Opportunity for Reinfection, and Sibling History of Heart Disease as Risk Factors for Chagas' Cardiopathy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **43**, 498–505 (1990).
214. Bocchi, E. A., Bestetti, R. B., Scanavacca, M. I., Cunha Neto, E. & Issa, V. S. Chronic Chagas Heart Disease Management. *Journal of the American College of Cardiology* **70**, 1510–1524 (2017).
215. Chevillard, C. *et al.* Disease Tolerance and Pathogen Resistance Genes May Underlie *Trypanosoma cruzi* Persistence and Differential Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy. *Front. Immunol.* **9**, 2791 (2018).
216. Acosta-Herrera, M., Strauss, M., Casares-Marfil, D. & Martín, J. Genomic medicine in Chagas disease. *Acta Tropica* **197**, 105062 (2019).
217. Pissetti, C. W. *et al.* Genetic and Functional Role of TNF-alpha in the Development *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e976 (2011).
218. Criado, L., Flórez, O., Martín, J. & González, C. I. Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. *Cytokine* **57**, 398–401 (2012).
219. Rodríguez-Pérez, J. M. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunology Letters* **98**, 97–102 (2005).
220. Drigo, S. A. *et al.* TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Microbes and Infection* **8**, 598–603 (2006).
221. Campelo, V. *et al.* TNF Microsatellite Alleles in Brazilian Chagasic Patients. *Dig Dis Sci* **52**, 3334–3339 (2007).

222. Drigo, S. A. *et al.* Lack of association of tumor necrosis factor- α polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. *Immunology Letters* **108**, 109–111 (2007).
223. Beraún, Y., Nieto, A., Collado, M. D., González, A. & Martín, J. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. *Tissue Antigens* **52**, 81–83 (1998).
224. Alvarado-Arnez, L. E. *et al.* Single nucleotide polymorphisms of cytokine-related genes and association with clinical outcome in a Chagas disease case-control study from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **113**, (2018).
225. Lima, A. P. B. *et al.* Evaluation of parasite and host genetics in two generations of a family with Chagas disease. *Parasitol Res* **117**, 3009–3013 (2018).
226. Deghaide, N. H., Dantas, R. O. & Donadi, E. A. HLA class I and II profiles of patients presenting with Chagas' disease. *Dig Dis Sci* **43**, 246–252 (1998).
227. Cruz-Robles, D., Reyes, P. A., Monteón-Padilla, V. M., Ortiz-Muñiz, A. R. & Vargas-Alarcón, G. MHC class I and class II genes in mexican patients with Chagas disease. *Human Immunology* **65**, 60–65 (2004).
228. Llop, E., Rothhammer, F., Acuña, M. & Apt, W. HLA antigens in cardiomyopathic Chilean chagasics. *Am J Hum Genet* **43**, 770–773 (1988).
229. Del Puerto, F. *et al.* Protective Human Leucocyte Antigen Haplotype, HLA-DRB1*01-B*14, against Chronic Chagas Disease in Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1587 (2012).
230. Layrisse, Z. *et al.* HLA-C*03 is a risk factor for cardiomyopathy in chagas disease. *Human Immunology* **61**, 925–929 (2000).
231. Ayo, C. M. *et al.* Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors and Their HLA Ligands are Related with the Immunopathology of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* **9**, e0003753 (2015).
232. Nieto, A. *et al.* HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection: HLA haplotypes and *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Antigens* **55**, 195–198 (2000).

233. Borrás, S. G. *et al.* Distribution of *HLA-DRB1* Alleles in Argentinean Patients with Chagas' Disease Cardiomyopathy. *Immunological Investigations* **38**, 268–275 (2009).
234. García Borrás, S. *et al.* HLA class II DRB1 polymorphism in Argentinians undergoing chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Ann Clin Biochem* **43**, 214–216 (2006).
235. Fernandez-Mestre, M. T. *et al.* Influence of the HLA class II polymorphism in chronic Chagas' disease. *Parasite Immunol* **20**, 197–203 (1998).
236. Colorado, I. A., Acquatella, H., Catalioti, F., Fernandez, M. T. & Layrisse, Z. HLA class II DRB1, DQB1, DPB1 polymorphism and cardiomyopathy due to *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Human Immunology* **61**, 320–325 (2000).
237. Dias, F. C. *et al.* Human Leucocyte Antigen-G (HLA-G) and Its Murine Functional Homolog Qa2 in the *Trypanosoma cruzi* Infection. *Mediators of Inflammation* **2015**, 1–16 (2015).
238. Ramasawmy, R. *et al.* Polymorphisms in the Gene for Lymphotoxin- α Predispose to Chronic Chagas Cardiomyopathy. *J INFECT DIS* **196**, 1836–1843 (2007).
239. Pissetti, C. W. *et al.* Association Between the Lymphotoxin-Alpha Gene Polymorphism and Chagasic Cardiopathy. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **33**, 130–135 (2013).
240. Ramasawmy, R. *et al.* The Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Polymorphism Is Associated with Cardiomyopathy in Human Chagas Disease. *CLIN INFECT DIS* **43**, 305–311 (2006).
241. Ramasawmy, R. *et al.* *BAT1*, a Putative Anti-Inflammatory Gene, Is Associated with Chronic Chagas Cardiomyopathy. *J INFECT DIS* **193**, 1394–1399 (2006).
242. Del Puerto, F. *et al.* 21-Hydroxylase gene mutant allele CYP21A2*15 strongly linked to the resistant HLA haplotype B*14:02-DRB1*01:02 in chronic Chagas disease. *Human Immunology* **74**, 783–786 (2013).
243. Ramasawmy, R. *et al.* Variants in the promoter region of *IKBL/NFKBIL1* gene may mark susceptibility to the development of chronic Chagas' cardiomyopathy among *Trypanosoma cruzi*-infected individuals. *Molecular Immunology* **45**, 283–288 (2008).

244. Ramasawmy, R. *et al.* Heterozygosity for the S180L Variant of *MAL/TIRAP*, a Gene Expressing an Adaptor Protein in the Toll-Like Receptor Pathway, Is Associated with Lower Risk of Developing Chronic Chagas Cardiomyopathy. *J INFECT DIS* **199**, 1838–1845 (2009).
245. Nogueira, L. G. *et al.* Myocardial Chemokine Expression and Intensity of Myocarditis in Chagas Cardiomyopathy Are Controlled by Polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1867 (2012).
246. Calzada, J. E., Nieto, A., Beraún, Y. & Martín, J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens* **58**, 154–158 (2001).
247. Flórez, O., Martín, J. & González, C. I. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. *Human Immunology* **73**, 852–858 (2012).
248. Machuca, M. A., Suárez, E. U., Echeverría, L. E., Martín, J. & González, C. I. SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy. *Human Immunology* **75**, 1210–1215 (2014).
249. Fernández-Mestre, M. T., Montagnani, S. & Layrisse, Z. Is the CCR5-59029-G/G genotype a protective factor for cardiomyopathy in Chagas disease? *Human Immunology* **65**, 725–728 (2004).
250. Juiz, N. A. *et al.* Association study between CCR2-CCR5 genes polymorphisms and chronic Chagas heart disease in Wichi and in admixed populations from Argentina. *PLoS Negl Trop Dis* **13**, e0007033 (2019).
251. Frade, A. F. *et al.* Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. *BMC Infect Dis* **13**, 587 (2013).
252. De Oliveira, A. P. *et al.* Genetic Susceptibility to Cardiac and Digestive Clinical Forms of Chronic Chagas Disease: Involvement of the CCR5 59029 A/G Polymorphism. *PLoS ONE* **10**, e0141847 (2015).

253. Flórez, O., Zafra, G., Morillo, C., Martín, J. & González, C. I. Interleukin-1 Gene Cluster Polymorphism in Chagas Disease in a Colombian Case-Control Study. *Human Immunology* **67**, 741–748 (2006).
254. Cruz-Robles, D. *et al.* Association Between *IL-1B* and *IL-1RN* Gene Polymorphisms and Chagas' Disease Development Susceptibility. *Immunological Investigations* **38**, 231–239 (2009).
255. Alvarado Arnez, L. E., Venegas, E. N., Ober, C. & Thompson, E. E. Sequence variation in the *IL4* gene and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivians. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **127**, 279-282.e3 (2011).
256. Flórez, O., Martín, J. & González, C. I. Interleukin 4, interleukin 4 receptor- α and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease: *IL4*, *IL4RA* and *IL10* gene polymorphisms in Chagas disease. *Parasite Immunology* **33**, 506–511 (2011).
257. Torres, O. A. *et al.* Lack of association between *IL-6* -174G/C gene polymorphism and Chagas disease. *Tissue Antigens* (2010) doi:10.1111/j.1399-0039.2010.01478.x.
258. Zafra, G., Morillo, C., Martín, J., González, A. & González, C. I. Polymorphism in the 3' UTR of the *IL12B* gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes and Infection* **9**, 1049–1052 (2007).
259. Leon Rodriguez, D. A., Echeverría, L. E., González, C. I. & Martin, J. Investigation of the role of *IL17A* gene variants in Chagas disease. *Genes Immun* **16**, 536–540 (2015).
260. Leon Rodriguez, D. A., Carmona, F. D., Echeverría, L. E., González, C. I. & Martin, J. *IL18* Gene Variants Influence the Susceptibility to Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004583 (2016).
261. Nogueira, L. G. *et al.* Functional *IL18* polymorphism and susceptibility to Chronic Chagas Disease. *Cytokine* **73**, 79–83 (2015).
262. Torres, O. A. *et al.* Role of the *IFNG* +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infection, Genetics and Evolution* **10**, 682–685 (2010).

263. Calzada, J. E., Beraún, Y., González, C. I. & Martín, J. Transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. *Cytokine* **45**, 149–153 (2009).
264. Torres, O. A. *et al.* Association of the macrophage migration inhibitory factor –173G/C polymorphism with Chagas disease. *Human Immunology* **70**, 543–546 (2009).
265. Jorge, S. E. D. C., Abreu, C. F., Guariento, M. E. & Sonati, M. D. F. Haptoglobin genotypes in Chagas' disease. *Clinical Biochemistry* **43**, 314–316 (2010).
266. Mundaray Fernández, N. & Fernández-Mestre, M. The Role of Haptoglobin Genotypes in Chagas Disease. *Disease Markers* **2014**, 1–6 (2014).
267. Luz, P. R. *et al.* Genetically Determined MBL Deficiency Is Associated with Protection against Chronic Cardiomyopathy in Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004257 (2016).
268. Danquah, I. *et al.* Mannose-Binding Lectin and Toll-Like Receptor Polymorphisms and Chagas Disease in Chile. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **86**, 229–232 (2012).
269. Boldt, A. B. W., Luz, P. R. & Messias-Reason, I. J. T. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. *Clinical Immunology* **140**, 63–70 (2011).
270. Luz, P. R. *et al.* Association of L-Ficolin Levels and FCN2 Genotypes with Chronic Chagas Disease. *PLoS ONE* **8**, e60237 (2013).
271. Dias, F. C. *et al.* Polymorphic Sites at the Immunoregulatory CTLA-4 Gene Are Associated with Chronic Chagas Disease and Its Clinical Manifestations. *PLoS ONE* **8**, e78367 (2013).
272. Uffelmann, E. *et al.* Genome-wide association studies. *Nat Rev Methods Primers* **1**, 59 (2021).
273. Deng, X. *et al.* Genome Wide Association Study (GWAS) of Chagas Cardiomyopathy in Trypanosoma cruzi Seropositive Subjects. *PLoS ONE* **8**, e79629 (2013).
274. Casares-Marfil, D. *et al.* A Genome-Wide Association Study Identifies Novel Susceptibility *loci* in Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Clinical Infectious Diseases* **73**, 672–679 (2021).
275. Albareda, M. C. *et al.* Perturbed T Cell IL-7 Receptor Signaling in Chronic Chagas Disease. *The Journal of Immunology* **194**, 3883–3889 (2015).

276. Heusch, G. *et al.* STAT5 Activation and Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning in Humans. *Circ Res* **110**, 111–115 (2012).
277. Kitada, S. *et al.* BATF2 inhibits immunopathological Th17 responses by suppressing *Il23a* expression during *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine* **214**, 1313–1331 (2017).
278. Yang, J., Villar, V. A. M., Rozyyev, S., Jose, P. A. & Zeng, C. The emerging role of sorting nexins in cardiovascular diseases. *Clinical Science* **133**, 723–737 (2019).
279. Sabino, E. C. *et al.* Genome-wide association study for Chagas Cardiomyopathy identify a new risk locus on chromosome 18 associated with an immune-related protein and transcriptional signature. *PLoS Negl Trop Dis* **16**, e0010725 (2022).
280. Mileykovskaya, E. & Dowhan, W. Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1788**, 2084–2091 (2009).
281. Nass, S. & Nass, M. M. K. INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. *The Journal of Cell Biology* **19**, 613–629 (1963).
282. Sagan, L. On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology* **14**, 225–IN6 (1967).
283. Martin, W. & Müller, M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**, 37–41 (1998).
284. Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A. & Kamikawa, R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology* **27**, R1177–R1192 (2017).
285. Gould, S. B., Garg, S. G. & Martin, W. F. Bacterial Vesicle Secretion and the Evolutionary Origin of the Eukaryotic Endomembrane System. *Trends in Microbiology* **24**, 525–534 (2016).
286. Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457–465 (1981).
287. Nissanka, N. & Moraes, C. T. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *FEBS Letters* **592**, 728–742 (2018).

288. Cedergren, R., Gray, M. W., Abel, Y. & Sankoff, D. The evolutionary relationships among known life forms. *J Mol Evol* **28**, 98–112 (1988).
289. Gray, M. W., Sankoff, D. & Cedergren, R. J. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucl Acids Res* **12**, 5837–5852 (1984).
290. Gray, M. W., Cedergren, R., Abel, Y. & Sankoff, D. On the evolutionary origin of the plant mitochondrion and its genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2267–2271 (1989).
291. Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G. J. & Woese, C. R. Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 4443–4447 (1985).
292. Andersson, S. G. E. & Kurland, C. G. Ancient and recent horizontal transfer events: The origins of Mitochondria. *APMIS* **106**, 5–14 (1998).
293. Andersson, S. G. E. & Kurland, C. G. Reductive evolution of resident genomes. *Trends in Microbiology* **6**, 263–268 (1998).
294. Andersson, D. I. & Hughes, D. Muller's ratchet decreases fitness of a DNA-based microbe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 906–907 (1996).
295. An extreme codon preference strategy: codon reassignment. *Molecular Biology and Evolution* (1991) doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040666.
296. Andersson, S. G. & Kurland, C. G. Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 535–541 (1999).
297. Berg, O. G. & Kurland, C. G. Why Mitochondrial Genes are Most Often Found in Nuclei. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 951–961 (2000).
298. Karlberg, O., Canbäck, B., Kurland, C. G. & Andersson, S. G. E. The Dual Origin of the Yeast Mitochondrial Proteome. *Yeast* **1**, 170–187 (2000).
299. Rare variant alleles in the light of the neutral theory. *Mol Biol Evol* (1984) doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040305.

300. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239–257 (1972).
301. Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M. & Wesselborg, S. Clearance of Apoptotic Cells. *Molecular Cell* **14**, 277–287 (2004).
302. Kroemer, G. Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ* **4**, 443–456 (1997).
303. Klim, J., Gładki, A., Kucharczyk, R., Zielenkiewicz, U. & Kaczanowski, S. Ancestral State Reconstruction of the Apoptosis Machinery in the Common Ancestor of Eukaryotes. *G3 Genes/Genomes/Genetics* **8**, 2121–2134 (2018).
304. Bar-Yaacov, D., Blumberg, A. & Mishmar, D. Mitochondrial-nuclear co-evolution and its effects on OXPHOS activity and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1819**, 1107–1111 (2012).
305. Barrientos, A., Kenyon, L. & Moraes, C. T. Human Xenomitochondrial Cybrids. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 14210–14217 (1998).
306. Kenyon, L. & Moraes, C. T. Expanding the functional human mitochondrial DNA database by the establishment of primate xenomitochondrial cybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 9131–9135 (1997).
307. Friedman, J. R. & Nunnari, J. Mitochondrial form and function. *Nature* **505**, 335–343 (2014).
308. Lane, N. & Martin, W. The energetics of genome complexity. *Nature* **467**, 929–934 (2010).
309. Martin, W. & Koonin, E. V. Introns and the origin of nucleus–cytosol compartmentalization. *Nature* **440**, 41–45 (2006).
310. Mitchell, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* **191**, 144–148 (1961).
311. Martínez-Reyes, I. & Chandel, N. S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun* **11**, 102 (2020).

312. Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C. & Zickermann, V. Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1857**, 902–914 (2016).
313. Kriegel, S. Transformation of a membrane protein from the respiratory chain into a sensor for the analysis of substrates, inhibitors and lipids. (2013).
314. Fullerton, M., McFarland, R., Taylor, R. W. & Alston, C. L. The genetic basis of isolated mitochondrial complex II deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* **131**, 53–65 (2020).
315. Meunier, B., Fisher, N., Ransac, S., Mazat, J.-P. & Brasseur, G. Respiratory complex III dysfunction in humans and the use of yeast as a model organism to study mitochondrial myopathy and associated diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1827**, 1346–1361 (2013).
316. Beck, E. A., Thompson, A. C., Sharbrough, J., Brud, E. & Llopart, A. Gene flow between *Drosophila yakuba* and *Drosophila santomea* in subunit V of cytochrome c oxidase: A potential case of cytonuclear cointrogression. *Evolution* **69**, 1973–1986 (2015).
317. Neupane, P., Bhujju, S., Thapa, N. & Bhattarai, H. K. ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biomolecular Concepts* **10**, 1–10 (2019).
318. Gao, Y. Q., Yang, W. & Karplus, M. A Structure-Based Model for the Synthesis and Hydrolysis of ATP by F1-ATPase. *Cell* **123**, 195–205 (2005).
319. Hatefi, Y. THE MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION SYSTEM. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 1015–1069 (1985).
320. Schagger, H. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal* **19**, 1777–1783 (2000).
321. Shinzawa-Itoh, K. *et al.* Purification of Active Respiratory Supercomplex from Bovine Heart Mitochondria Enables Functional Studies. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 4178–4184 (2016).
322. Moreno-Sánchez, R., Bravo, C. & Westerhoff, H. V. Determining and understanding the control of flux: An illustration in submitochondrial particles of how to validate schemes of metabolic control. *European Journal of Biochemistry* **264**, 427–433 (1999).

323. Bianchi, C., Genova, M. L., Parenti Castelli, G. & Lenaz, G. The Mitochondrial Respiratory Chain Is Partially Organized in a Supercomplex Assembly. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 36562–36569 (2004).
324. Greggio, C. *et al.* Enhanced Respiratory Chain Supercomplex Formation in Response to Exercise in Human Skeletal Muscle. *Cell Metabolism* **25**, 301–311 (2017).
325. Acín-Pérez, R. *et al.* Respiratory Complex III Is Required to Maintain Complex I in Mammalian Mitochondria. *Molecular Cell* **13**, 805–815 (2004).
326. Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S. & Moraes, C. T. Cytochrome *c* Oxidase Is Required for the Assembly/Stability of Respiratory Complex I in Mouse Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 4872–4881 (2006).
327. Alkhaja, A. K. *et al.* MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. *MBoC* **23**, 247–257 (2012).
328. Hoppins, S. *et al.* A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *Journal of Cell Biology* **195**, 323–340 (2011).
329. von der Malsburg, K. *et al.* Dual Role of Mitofilin in Mitochondrial Membrane Organization and Protein Biogenesis. *Developmental Cell* **21**, 694–707 (2011).
330. Barbot, M. *et al.* Mic10 Oligomerizes to Bend Mitochondrial Inner Membranes at Cristae Junctions. *Cell Metabolism* **21**, 756–763 (2015).
331. Bohnert, M. *et al.* Central Role of Mic10 in the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System. *Cell Metabolism* **21**, 747–755 (2015).
332. Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gómez, J. D. & Kühlbrandt, W. Structure of the yeast F₁F_o-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 13602–13607 (2012).
333. Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R. R. & Kühlbrandt, W. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* **27**, 1154–1160 (2008).

334. Davies, K. M. *et al.* Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 14121–14126 (2011).
335. Wilkens, V., Kohl, W. & Busch, K. Restricted diffusion of OXPHOS complexes in dynamic mitochondria delays their exchange between cristae and engenders a transitory mosaic distribution. *Journal of Cell Science* **126**, 103–116 (2013).
336. Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C. & Chan, D. C. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *The Journal of Cell Biology* **178**, 749–755 (2007).
337. Cogliati, S. *et al.* Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency. *Cell* **155**, 160–171 (2013).
338. Korobova, F., Ramabhadran, V. & Higgs, H. N. An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2. *Science* **339**, 464–467 (2013).
339. Chakrabarti, R. *et al.* INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division. *Journal of Cell Biology* **217**, 251–268 (2018).
340. Francy, C. A., Alvarez, F. J. D., Zhou, L., Ramachandran, R. & Mears, J. A. The Mechanoenzymatic Core of Dynamin-related Protein 1 Comprises the Minimal Machinery Required for Membrane Constriction. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 11692–11703 (2015).
341. Ji, W., Hatch, A. L., Merrill, R. A., Strack, S. & Higgs, H. N. Actin filaments target the oligomeric maturation of the dynamin GTPase Drp1 to mitochondrial fission sites. *eLife* **4**, e11553 (2015).
342. Hatch, A. L., Gurel, P. S. & Higgs, H. N. Novel roles for actin in mitochondrial fission. *Journal of Cell Science* jcs.153791 (2014) doi:10.1242/jcs.153791.
343. Losón, O. C., Song, Z., Chen, H. & Chan, D. C. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *MBoC* **24**, 659–667 (2013).
344. La dynamique des mitochondries. *Planet-Vie* <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/cellules-et-molecules/physiologie-cellulaire/la-dynamique-des-mitochondries>.

345. Matsuda, N. *et al.* PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *Journal of Cell Biology* **189**, 211–221 (2010).
346. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F. & Youle, R. J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of Cell Biology* **183**, 795–803 (2008).
347. Tanaka, A. *et al.* Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *Journal of Cell Biology* **191**, 1367–1380 (2010).
348. Chan, N. C. *et al.* Broad activation of the ubiquitin–proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Human Molecular Genetics* **20**, 1726–1737 (2011).
349. Shiba-Fukushima, K. *et al.* Phosphorylation of Mitochondrial Polyubiquitin by PINK1 Promotes Parkin Mitochondrial Tethering. *PLoS Genet* **10**, e1004861 (2014).
350. Kane, L. A. *et al.* PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *Journal of Cell Biology* **205**, 143–153 (2014).
351. Koyano, F. *et al.* Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* **510**, 162–166 (2014).
352. Lazarou, M. *et al.* The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* **524**, 309–314 (2015).
353. Johansen, T. & Lamark, T. Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *Journal of Molecular Biology* **432**, 80–103 (2020).
354. Rossi, A., Pizzo, P. & Filadi, R. Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1866**, 1068–1078 (2019).
355. Modesti, L. *et al.* Mitochondrial Ca²⁺ Signaling in Health, Disease and Therapy. *Cells* **10**, 1317 (2021).

356. Vance, J. E. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1841**, 595–609 (2014).
357. Szabadkai, G. *et al.* Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *The Journal of Cell Biology* **175**, 901–911 (2006).
358. Baughman, J. M. *et al.* Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 341–345 (2011).
359. De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I. & Rizzuto, R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 336–340 (2011).
360. Mammucari, C. *et al.* Mitochondrial calcium uptake in organ physiology: from molecular mechanism to animal models. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **470**, 1165–1179 (2018).
361. Giorgi, C. *et al.* Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion* **12**, 77–85 (2012).
362. Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. & Mammucari, C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 566–578 (2012).
363. Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W. & Sheu, S.-S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **287**, C817–C833 (2004).
364. Iwasawa, R., Mahul-Mellier, A.-L., Datler, C., Pazarentzos, E. & Grimm, S. Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction: Fis1 induces apoptosis via Bap31. *The EMBO Journal* **30**, 556–568 (2011).
365. Bootman, M. D., Chehab, T., Bultynck, G., Parys, J. B. & Rietdorf, K. The regulation of autophagy by calcium signals: Do we have a consensus? *Cell Calcium* **70**, 32–46 (2018).
366. Vringer, E. & Tait, S. W. G. Mitochondria and cell death-associated inflammation. *Cell Death Differ* **30**, 304–312 (2023).

367. Bock, F. J. & Tait, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 85–100 (2020).
368. Pinton, P. The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *The EMBO Journal* **20**, 2690–2701 (2001).
369. Flores-Romero, H. *et al.* BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis. *The EMBO Journal* **41**, e108690 (2022).
370. Seth, R. B., Sun, L., Ea, C.-K. & Chen, Z. J. Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- κ B and IRF3. *Cell* **122**, 669–682 (2005).
371. Xu, L.-G. *et al.* VISA Is an Adapter Protein Required for Virus-Triggered IFN- β Signaling. *Molecular Cell* **19**, 727–740 (2005).
372. Meylan, E. *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167–1172 (2005).
373. Kawai, T. *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**, 981–988 (2005).
374. Jiang, F. *et al.* Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature* **479**, 423–427 (2011).
375. Hei, L. & Zhong, J. Laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) plays an essential role in hepatitis C virus infection-induced interferon responses. *Hepatology* **65**, 1478–1491 (2017).
376. Uchikawa, E. *et al.* Structural Analysis of dsRNA Binding to Anti-viral Pattern Recognition Receptors LGP2 and MDA5. *Molecular Cell* **62**, 586–602 (2016).
377. Liu, Y., Olganier, D. & Lin, R. Host and Viral Modulation of RIG-I-Mediated Antiviral Immunity. *Front. Immunol.* **7**, (2017).
378. Tait, S. W. G. & Green, D. R. Mitochondria and cell signalling. *Journal of Cell Science* **125**, 807–815 (2012).

379. Biacchesi, S. *et al.* Mitochondrial Antiviral Signaling Protein Plays a Major Role in Induction of the Fish Innate Immune Response against RNA and DNA Viruses. *J Virol* **83**, 7815–7827 (2009).
380. Vazquez, C. & Horner, S. M. MAVS Coordination of Antiviral Innate Immunity. *J Virol* **89**, 6974–6977 (2015).
381. Belgnaoui, S. M., Paz, S. & Hiscott, J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Current Opinion in Immunology* **23**, 564–572 (2011).
382. Castanier, C., Garcin, D., Vazquez, A. & Arnoult, D. Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Reports* **11**, 133–138 (2010).
383. Koshiba, T., Yasukawa, K., Yanagi, Y. & Kawabata, S. Mitochondrial Membrane Potential Is Required for MAVS-Mediated Antiviral Signaling. *Sci. Signal.* **4**, (2011).
384. Brand, M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology* **45**, 466–472 (2010).
385. Jounai, N. *et al.* The Atg5–Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 14050–14055 (2007).
386. Tal, M. C. *et al.* Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 2770–2775 (2009).
387. Brand, M. D. & Esteves, T. C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metabolism* **2**, 85–93 (2005).
388. Arsenijevic, D. *et al.* Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* **26**, 435–439 (2000).
389. Rousset, S. *et al.* The uncoupling protein 2 modulates the cytokine balance in innate immunity☆. *Cytokine* **35**, 135–142 (2006).
390. Kizaki, T. *et al.* Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 9392–9397 (2002).

391. Geng, J. *et al.* Kinases Mst1 and Mst2 positively regulate phagocytic induction of reactive oxygen species and bactericidal activity. *Nat Immunol* **16**, 1142–1152 (2015).
392. West, A. P. *et al.* TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* **472**, 476–480 (2011).
393. Dinarello, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* **117**, 3720–3732 (2011).
394. Sahoo, M., Ceballos-Olvera, I., Del Barrio, L. & Re, F. Role of the Inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in Bacterial Infections. *The Scientific World JOURNAL* **11**, 2037–2050 (2011).
395. Liu, X. *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* **535**, 153–158 (2016).
396. Bergsbaken, T., Fink, S. L. & Cookson, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* **7**, 99–109 (2009).
397. Miao, E. A., Rajan, J. V. & Aderem, A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological Reviews* **243**, 206–214 (2011).
398. Jo, E.-K., Kim, J. K., Shin, D.-M. & Sasakawa, C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* **13**, 148–159 (2016).
399. Hornung, V. & Latz, E. Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation. *Eur. J. Immunol.* **40**, 620–623 (2010).
400. Guarda, G. *et al.* Differential Expression of NLRP3 among Hematopoietic Cells. *The Journal of Immunology* **186**, 2529–2534 (2011).
401. De Nardo, D. & Latz, E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends in Immunology* **32**, 373–379 (2011).
402. Davis, B. K., Wen, H. & Ting, J. P.-Y. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 707–735 (2011).
403. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The Inflammasome. *Molecular Cell* **10**, 417–426 (2002).

404. Shi, J. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660–665 (2015).
405. Subramanian, N., Natarajan, K., Clatworthy, M. R., Wang, Z. & Germain, R. N. The Adaptor MAVS Promotes NLRP3 Mitochondrial Localization and Inflammasome Activation. *Cell* **153**, 348–361 (2013).
406. Iyer, S. S. *et al.* Mitochondrial Cardiolipin Is Required for Nlrp3 Inflammasome Activation. *Immunity* **39**, 311–323 (2013).
407. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**, 221–225 (2011).
408. Abais, J. M., Xia, M., Zhang, Y., Boini, K. M. & Li, P.-L. Redox Regulation of NLRP3 Inflammasomes: ROS as Trigger or Effector? *Antioxidants & Redox Signaling* **22**, 1111–1129 (2015).
409. Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y. & He, Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *IJMS* **20**, 3328 (2019).
410. Dela Cruz, C. S. & Kang, M.-J. Mitochondrial dysfunction and damage associated molecular patterns (DAMPs) in chronic inflammatory diseases. *Mitochondrion* **41**, 37–44 (2018).
411. Riley, J. S. & Tait, S. W. Mitochondrial DNA in inflammation and immunity. *EMBO Reports* **21**, e49799 (2020).
412. West, A. P. *et al.* Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* **520**, 553–557 (2015).
413. Shimada, K. *et al.* Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity* **36**, 401–414 (2012).
414. Claypool, S. M. & Koehler, C. M. The complexity of cardiolipin in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences* **37**, 32–41 (2012).
415. Campos, J. C., Bozi, L. H. M., Bechara, L. R. G., Lima, V. M. & Ferreira, J. C. B. Mitochondrial Quality Control in Cardiac Diseases. *Front Physiol* **7**, 479 (2016).

416. Goffart, S., Vonkleistretzow, J. & Wiesner, R. Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy. *Cardiovascular Research* **64**, 198–207 (2004).
417. Ramaccini, D. *et al.* Mitochondrial Function and Dysfunction in Dilated Cardiomyopathy. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 624216 (2021).
418. Green, D. R. & Reed, J. C. Mitochondria and Apoptosis. *Science* **281**, 1309–1312 (1998).
419. Potgieter, M., Pretorius, E. & Pepper, M. S. Primary and secondary coenzyme Q10 deficiency: the role of therapeutic supplementation. *Nutr Rev* **71**, 180–188 (2013).
420. El-Hattab, A. W. & Scaglia, F. Mitochondrial cytopathies. *Cell Calcium* **60**, 199–206 (2016).
421. Nan, J. *et al.* Molecular regulation of mitochondrial dynamics in cardiac disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1864**, 1260–1273 (2017).
422. Hernandez-Resendiz, S. *et al.* Targeting mitochondrial fusion and fission proteins for cardioprotection. *J Cellular Molecular Medi* **24**, 6571–6585 (2020).
423. Ikeda, Y. *et al.* Endogenous Drp1 Mediates Mitochondrial Autophagy and Protects the Heart Against Energy Stress. *Circ Res* **116**, 264–278 (2015).
424. Weiss, R. G., Gerstenblith, G. & Bottomley, P. A. ATP flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 808–813 (2005).
425. Merritt li, J. L., Norris, M. & Kanungo, S. Fatty acid oxidation disorders. *Ann. Transl. Med* **6**, 473–473 (2018).
426. Pfeiffer, K. *et al.* Cardiolipin Stabilizes Respiratory Chain Supercomplexes. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 52873–52880 (2003).
427. Letts, J. A., Fiedorczuk, K. & Sazanov, L. A. The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature* **537**, 644–648 (2016).
428. Dudek, J. *et al.* Cardiolipin deficiency affects respiratory chain function and organization in an induced pluripotent stem cell model of Barth syndrome. *Stem Cell Research* **11**, 806–819 (2013).

429. Zak, R., Rabinowitz, M., Rajamanickam, C., Merten, S. & Kwiatkowska-Patzer, B. Mitochondrial proliferation in cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* **75**, 171–178 (1980).
430. Chistiakov, D. A., Shkurat, T. P., Melnichenko, A. A., Grechko, A. V. & Orekhov, A. N. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. *Annals of Medicine* **50**, 121–127 (2018).
431. Facundo, H. D. T. F., Brainard, R. E., Caldas, F. R. D. L. & Lucas, A. M. B. Mitochondria and Cardiac Hypertrophy. in *Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine* (ed. Santulli, G.) vol. 982 203–226 (Springer International Publishing, 2017).
432. Griffiths, E. R. *et al.* Electron transport chain dysfunction in neonatal pressure-overload hypertrophy precedes cardiomyocyte apoptosis independent of oxidative stress. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **139**, 1609–1617 (2010).
433. Bishop, S. & Altschuld, R. Increased glycolytic metabolism in cardiac hypertrophy and congestive failure. *American Journal of Physiology-Legacy Content* **218**, 153–159 (1970).
434. Nascimben, L. *et al.* Mechanisms for Increased Glycolysis in the Hypertrophied Rat Heart. *Hypertension* **44**, 662–667 (2004).
435. Izem-Meziane, M. *et al.* Catecholamine-induced cardiac mitochondrial dysfunction and mPTP opening: protective effect of curcumin. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **302**, H665–H674 (2012).
436. Casademont, J. & Miró, O. Electron transport chain defects in heart failure. *Heart Fail Rev* **7**, 131–139 (2002).
437. Karamanlidis, G. *et al.* Defective DNA Replication Impairs Mitochondrial Biogenesis In Human Failing Hearts. *Circulation Research* **106**, 1541–1548 (2010).
438. Ide, T. *et al.* Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction Associated With Oxidative Stress in Failing Hearts After Myocardial Infarction. *Circulation Research* **88**, 529–535 (2001).
439. Arbustini, E. *et al.* Mitochondrial DNA Mutations and Mitochondrial Abnormalities in Dilated Cardiomyopathy. *The American Journal of Pathology* **153**, 1501–1510 (1998).

440. Sheeran, F. L. & Pepe, S. Mitochondrial Bioenergetics and Dysfunction in Failing Heart. in *Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine* (ed. Santulli, G.) vol. 982 65–80 (Springer International Publishing, 2017).
441. Karamanlidis, G., Garcia-Menendez, L., Kolwicz, S. C., Lee, C. F. & Tian, R. Promoting PGC-1 α -driven mitochondrial biogenesis is detrimental in pressure-overloaded mouse hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **307**, H1307–H1316 (2014).
442. Chiribao, M. L., Libisch, G., Parodi-Talice, A. & Robello, C. Early *Trypanosoma cruzi* Infection Reprograms Human Epithelial Cells. *BioMed Research International* **2014**, 1–12 (2014).
443. Machado, F. S. *et al.* Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. *Front Biosci (Elite Ed)* **4**, 1743–1758 (2012).
444. Bafica, A. *et al.* Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology* **177**, 3515–3519 (2006).
445. Tanowitz, H. B. *et al.* *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease: Innate Immunity, ROS, and Cardiovascular System. in *Vascular Responses to Pathogens* 183–193 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-801078-5.00014-5.
446. Gonçalves, V. M. *et al.* NLRP3 Controls *Trypanosoma cruzi* Infection through a Caspase-1-Dependent IL-1R-Independent NO Production. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2469 (2013).
447. Dey, N. *et al.* Caspase-1/ASC Inflammasome-Mediated Activation of IL-1 β –ROS–NF- κ B Pathway for Control of *Trypanosoma cruzi* Replication and Survival Is Dispensable in NLRP3–/– Macrophages. *PLoS ONE* **9**, e111539 (2014).
448. Lee, H. J. *et al.* The Role of STAT1/IRF-1 on Synergistic ROS Production and Loss of Mitochondrial Transmembrane Potential during Hepatic Cell Death Induced by LPS/d-GalN. *Journal of Molecular Biology* **369**, 967–984 (2007).

449. Meyer, A. *et al.* IFN- β -induced reactive oxygen species and mitochondrial damage contribute to muscle impairment and inflammation maintenance in dermatomyositis. *Acta Neuropathol* **134**, 655–666 (2017).
450. Teixeira, P. C. *et al.* Impairment of Multiple Mitochondrial Energy Metabolism Pathways in the Heart of Chagas Disease Cardiomyopathy Patients. *Front. Immunol.* **12**, 755782 (2021).
451. Savarese, G. *et al.* Global Public Health Burden of Heart Failure. *Cardiac Failure Review* **03**, 7 (2017).
452. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* **93**, 841–842 (1996).
453. Schofield, C. J., Jannin, J. & Salvatella, R. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology* **22**, 583–588 (2006).
454. Teixeira, P. C. *et al.* Selective Decrease of Components of the Creatine Kinase System and ATP Synthase Complex in Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e1205 (2011).
455. Kolwicz, S. C., Purohit, S. & Tian, R. Cardiac Metabolism and its Interactions With Contraction, Growth, and Survival of Cardiomyocytes. *Circ Res* **113**, 603–616 (2013).
456. Wen, J., Dhiman, M., Whorton, E. & Garg, N. Tissue-specific oxidative imbalance and mitochondrial dysfunction during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Microbes and Infection* **10**, 1201–1209 (2008).
457. Wan, X. *et al.* Defects of mtDNA Replication Impaired Mitochondrial Biogenesis During *Trypanosoma cruzi* Infection in Human Cardiomyocytes and Chagasic Patients: The Role of Nrf1/2 and Antioxidant Response. *JAHA* **1**, e003855 (2012).
458. Cunha-Neto, E., Teixeira, P. C., Fonseca, S. G., Bilate, A. M. & Kalil, J. Myocardial gene and protein expression profiles after autoimmune injury in Chagas' disease cardiomyopathy. *Autoimmunity Reviews* **10**, 163–165 (2011).

459. Garg, N., Gerstner, A., Bhatia, V., DeFORD, J. & Papaconstantinou, J. Gene expression analysis in mitochondria from chagasic mice: alterations in specific metabolic pathways. *Biochemical Journal* **381**, 743–752 (2004).
460. Leme, A. M. B. P. *et al.* Avaliação do metabolismo dos fosfatos de alta energia em pacientes com doença de Chagas. *Arq. Bras. Cardiol.* **95**, 264–273 (2010).
461. Cheshire, J. L. & Baldwin, A. S. Synergistic Activation of NF- κ B by Tumor Necrosis Factor Alpha and Gamma Interferon via Enhanced I κ B α Degradation and De Novo I κ B β Degradation. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 6746–6754 (1997).
462. Rakshit, S. *et al.* Interferon-gamma induced cell death: Regulation and contributions of nitric oxide, cJun N-terminal kinase, reactive oxygen species and peroxynitrite. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**, 2645–2661 (2014).
463. Kauppinen, A., Suuronen, T., Ojala, J., Kaarniranta, K. & Salminen, A. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cellular Signalling* **25**, 1939–1948 (2013).
464. Kastl, L. *et al.* TNF- α stimulation enhances ROS-dependent cell migration via NF- κ B activation in liver cells. *Free Radical Biology and Medicine* **75**, S32 (2014).
465. Gottlieb, E., Vander Heiden, M. G. & Thompson, C. B. Bcl-x L Prevents the Initial Decrease in Mitochondrial Membrane Potential and Subsequent Reactive Oxygen Species Production during Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 5680–5689 (2000).
466. Wang, F. *et al.* Interferon Gamma Induces Reversible Metabolic Reprogramming of M1 Macrophages to Sustain Cell Viability and Pro-Inflammatory Activity. *EBioMedicine* **30**, 303–316 (2018).
467. Koo, S., Chowdhury, I. H., Szczesny, B., Wan, X. & Garg, N. J. Macrophages Promote Oxidative Metabolism To Drive Nitric Oxide Generation in Response to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **84**, 3527–3541 (2016).

468. Cao, Y.-Y. *et al.* Exenatide Reduces Tumor Necrosis Factor- α -induced Apoptosis in Cardiomyocytes by Alleviating Mitochondrial Dysfunction. *Chinese Medical Journal* **128**, 3211–3218 (2015).
469. Gupta, S. *et al.* Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radical Biology and Medicine* **47**, 1414–1421 (2009).
470. Estrada, D. *et al.* Cardiomyocyte diffusible redox mediators control *Trypanosoma cruzi* infection: role of parasite mitochondrial iron superoxide dismutase. *Biochemical Journal* **475**, 1235–1251 (2018).
471. Roberge, S. *et al.* TNF- α -mediated caspase-8 activation induces ROS production and TRPM2 activation in adult ventricular myocytes. *Cardiovascular Research* **103**, 90–99 (2014).
472. Ide, T. *et al.* Mitochondrial Electron Transport Complex I Is a Potential Source of Oxygen Free Radicals in the Failing Myocardium. *Circulation Research* **85**, 357–363 (1999).
473. Dutta, D., Calvani, R., Bernabei, R., Leeuwenburgh, C. & Marzetti, E. Contribution of Impaired Mitochondrial Autophagy to Cardiac Aging: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Circ Res* **110**, 1125–1138 (2012).
474. Tao, Z., Jin, Z., Wu, J., Cai, G. & Yu, X. Sirtuin family in autoimmune diseases. *Front. Immunol.* **14**, 1186231 (2023).
475. Liu, G. *et al.* Dendritic cell SIRT1–HIF1 α axis programs the differentiation of CD4⁺ T cells through IL-12 and TGF- β 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, (2015).
476. Rothgiesser, K. M., Erener, S., Waibel, S., Lüscher, B. & Hottiger, M. O. SIRT2 regulates NF- κ B-dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *Journal of Cell Science* **123**, 4251–4258 (2010).
477. Lin, J., Sun, B., Jiang, C., Hong, H. & Zheng, Y. Sirt2 suppresses inflammatory responses in collagen-induced arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* **441**, 897–903 (2013).
478. He, J. *et al.* Glucose limitation activates AMPK coupled SENP1-Sirt3 signalling in mitochondria for T cell memory development. *Nat Commun* **12**, 4371 (2021).

479. Zhang, J., Ren, D., Fedorova, J., He, Z. & Li, J. SIRT1/SIRT3 Modulates Redox Homeostasis during Ischemia/Reperfusion in the Aging Heart. *Antioxidants* **9**, 858 (2020).
480. Kumar, S. & Lombard, D. B. Mitochondrial Sirtuins and Their Relationships with Metabolic Disease and Cancer. *Antioxidants & Redox Signaling* **22**, 1060–1077 (2015).
481. Tao, Z., Jin, Z., Wu, J., Cai, G. & Yu, X. Sirtuin family in autoimmune diseases. *Front Immunol* **14**, 1186231 (2023).
482. Morillo, C. A. *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med* **373**, 1295–1306 (2015).
483. Ramos, G. C. *et al.* Myocardial aging as a T-cell-mediated phenomenon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, (2017).
484. Houssari, M. *et al.* Lymphatic and Immune Cell Cross-Talk Regulates Cardiac Recovery After Experimental Myocardial Infarction. *ATVB* **40**, 1722–1737 (2020).
485. Ni, C. *et al.* Doxorubicin-induced cardiotoxicity involves IFN γ -mediated metabolic reprogramming in cardiomyocytes. *The Journal of Pathology* **247**, 320–332 (2019).
486. Ferrari, A., Del'Olio, S. & Barrientos, A. The Diseased Mitochondrion. *FEBS Letters* **595**, 1025–1061 (2021).
487. Nogueira, L. G. *et al.* Myocardial Gene Expression of *T-bet*, *GATA-3*, *Ror- γ t*, *FoxP3*, and Hallmark Cytokines in Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy: An Essentially Unopposed T_H 1-Type Response. *Mediators of Inflammation* **2014**, 1–9 (2014).
488. Nunes, J. P. S. *et al.* Co-Exposure of Cardiomyocytes to IFN- γ and TNF- α Induces Mitochondrial Dysfunction and Nitro-Oxidative Stress: Implications for the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Front. Immunol.* **12**, 755862 (2021).
489. De Higuchi, M. L. *et al.* The Role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic chagas' disease: A study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol* **10**, 665–670 (1987).

490. Barretto, A. C. P. *et al.* Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. *American Heart Journal* **111**, 307–312 (1986).
491. Abel, L. C. J. *et al.* Chronic Chagas' Disease Cardiomyopathy Patients Display an Increased IFN- γ Response to *Trypanosoma cruzi* Infection. *Journal of Autoimmunity* **17**, 99–107 (2001).
492. Ferreira, R. C. *et al.* Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **98**, 407–412 (2003).
493. Talvani, A. *et al.* Elevated Concentrations of CCL2 and Tumor Necrosis Factor- α in Chagasic Cardiomyopathy. *CLIN INFECT DIS* **38**, 943–950 (2004).
494. Teixeira, M. M., Gazzinelli, R. T. & Silva, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends in Parasitology* **18**, 262–265 (2002).
495. Hagen, C. M. *et al.* Mitochondrial Haplogroups Modify the Risk of Developing Hypertrophic Cardiomyopathy in a Danish Population. *PLoS ONE* **8**, e71904 (2013).
496. Govindaraj, P. *et al.* Mitochondrial genome variations in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Mitochondrion* **48**, 51–59 (2019).
497. Fernández-Caggiano, M. *et al.* Mitochondrial DNA haplogroup H as a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in Spanish population. *Mitochondrion* **13**, 263–268 (2013).
498. Fernandez-Vizarra, E. & Zeviani, M. Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. *FEBS Letters* **595**, 1062–1106 (2021).
499. Mariappan, N. *et al.* NF- κ B-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes. *Cardiovascular Research* **85**, 473–483 (2010).