



HAL
open science

Chaîne respiratoire et pore de transition de perméabilité mitochondriale dans la cardioprotection

Bo Li

► **To cite this version:**

Bo Li. Chaîne respiratoire et pore de transition de perméabilité mitochondriale dans la cardioprotection. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10276 . tel-00609514

HAL Id: tel-00609514

<https://theses.hal.science/tel-00609514>

Submitted on 19 Jul 2011

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.

**CHAINE RESPIRATOIRE ET PORE DE TRANSITION
DE PERMEABILITE MITOCHONDRIALE DANS LA
CARDIOPROTECTION**

Thèse présentée devant l'Université Claude Bernard-Lyon 1

Pour l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT
et soutenue publiquement
le 14 Décembre 2009

par

Bo LI

Jury :

Professeur Michel OVIZE	Université de Lyon	Président
Professeur Christophe PIOT	Université de Montpellier	Rapporteur
Professeur Eric FONTAINE	Université de Grenoble	Rapporteur
Professeur Bernard GENY	Université de Strasbourg	Rapporteur
Docteur René FERRERA	Université de Lyon	Examineur
Docteur Abdallah GHARIB	Université de Lyon	Directeur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

Mes remerciements vont tout particulièrement :

- A mon directeur de thèse, le Docteur Abdallah GHARIB, qui a encadré l'intégralité de ce travail de thèse avec rigueur. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de ma fidélité malgré ses états d'humeur.

- Au Professeur Michel OVIZE, qui a accepté de me recevoir dans son Laboratoire en me donnant les moyens de la réalisation de ce travail. Il reste un véritable expert en cardioprotection. Ses conseils toujours judicieux et sa vision avant-gardiste de la thématique en font le référent incontournable de ces travaux. Qu'il trouve ici l'expression profonde de ma gratitude.

- Aux rapporteurs, les Professeurs Eric FONTAINE, Bernard GENY et Christophe PIOT, qui ont accepté de nous accorder le temps nécessaire pour juger ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

- Au Docteur René FERRERA, pour la pertinence de ses idées scientifiques qui m'ont permis de contourner de nombreux obstacles expérimentaux et aussi de surmonter les moments de découragement.

- Au Docteur Pascal CHIARI, pour ses conseils, ses encouragements et ses aides qui m'ont accompagnés au long de ce travail.

- A Murielle, pour son soutien et sa patience face à mes nombreux papiers administratifs à préparer chaque année.

- A Joseph, qui me corrige la langue française quotidiennement sans jamais réussir à me faire connaître la différence entre « gâteau » et « cadeau ».

- A Elisabeth, votre « Le Petit Paumé » m'a beaucoup aidé dans la vie quotidienne et je le garderai pour toujours comme un bon souvenir de nos séjours à Lyon.

- A l'ensemble de l'équipe U886, Cardioprotection : Yves, Odile, Fabrice, Souhila, Mélanie, Brigitte, Sophie, Hélène, Geneviève, Denis, Elise, Claire, Damien, Geoffrey, Lionel, Ludovic, Laurent, Martin... pour la franche collaboration le long de ces années passées au laboratoire, votre aide technique, vos conseils tant scientifiques qu'amicaux et votre bonne humeur au quotidien, ont permis l'aboutissement de ce travail.

- A tous mes parents et ma belle famille. Notre éloignement a conforté chaque jour ma motivation dans l'accomplissement de ce travail. Avec toutes mes pensées mon attachement profond.

- A Liangwei, mon mari qui a toujours été à mes côtés. Avec tout mon amour.

- A mon fils chéri, Jiaxuan qui est tout pour moi.

- A Carlos, qui nous a quitté depuis trois ans. L'orchidée que tu nous as laissée pousser toujours chez moi.

PUBLICATIONS

1. Ferrera R, Benhabbouche S, Bopassa JC, Li B, Ovize M. One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23:327-31.
2. Gomez L, Li B, Mewton N, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients. *Cardiovasc Res* 2009;83:226-33.
3. Gharib A, De Paulis D, Li B, Augeul L, et al. Modification of mitochondrial permeability transition susceptibility and ROS production by Coenzyme Q analogues in isolated rabbit heart mitochondria.
(Article soumis à "Am J Physiol Heart Circ Physiol" pour publication)
4. Li B, Chauvin C, De Paulis D, De Oliveira F, Gharib A, Vial G, Leverve X, Ovize M, Fontaine E. Regulation of Mitochondrial Permeability Transition by Complex 1 and Cyclophilin D
(Article en préparation pour être soumis à "Nature" 2009)

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES DANS DES CONGRES

- 27^e Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC),
Avril 2009, Nancy

Li B, De Paulis D, Couture-Lepetit E, Gharib A, Ovize M. Effets in vitro des inhibiteurs de la chaîne respiratoire sur l'inhibition du pore de transition de perméabilité mitochondriale par la cyclosporine A.

Benhabbouche S, Li B, Ovize M, Ferrera R. La basse pression de reperfusion et la cyclosporine A protègent le cœur ischémié même après le début de la reperfusion.

- 24^e Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC),
Avril 2006, Toulouse

Wang TY, Li B, Augeul L, Couture-Lepetit E, et al. Production mitochondriale d'espèces radicalaires oxygénée pendant l'ischémie et la reperfusion.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p10
I. Mitochondrie et mort cellulaire	p11
I-1. Structure et fonctionnement des mitochondries	p11
I-2. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale	p21
II. Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion cardiaque	p37
II-1. Facteurs déterminants de l'ischémie	p37
II-2. Reperfusion	p39
II-3. Conséquences de l'ischémie-reperfusion	p40
II-4. Induction de la mort cellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion	p43
III. Protection cardiaque	p48
III-1. Préconditionnement cardiaque	p49
III-2. Postconditionnement cardiaque	p57
III-3. Application du pré et du postconditionnement chez l'homme	p64
BUT DU TRAVAIL DE RECHERCHE	p67
MATERIELS ET METHODES	p69
I. Animaux	p70
II. Réactifs	p70
III. Etudes sur les cœurs isolés de rats	p70
IV. Quantification de l'infarctus	p74
V. Prélèvement des cœurs de souris et de lapins	p74
VI. Isolement des mitochondries	p75
VII. Dosage de protéines	p76
VIII. Analyse des fonctions mitochondriales	p76
IX. Analyses statistiques	p81
RESULTATS ET DISCUSSIONS	p82
Etude I. Effets de CoQ ₂ et CoQ ₁₀ sur le PTPm cardiaque et la production de ROS <i>in vitro</i>	p83
Etude II. Régulation du pore de transition de perméabilité par le complexe I de la chaîne respiratoire et la cyclophiline D	p108

Etude III. Postconditionnement pharmacologique par le périndoprilate sur un modèle de cœur isolé de rat p127

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES p147

BIBLIOGRAPHIE p149

ABBREVIATIONS

Δ pH	Différence de pH de part et d'autre de la membrane mitochondriale
$\Delta\Psi$	Différence de potentiel de part et d'autre de la membrane mitochondriale
ADP	Adénosine-5'-diphosphate
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
AN	Aire nécrosée
ANT	Transporteur de nucléotides adényliques
AR	Aire à risque
AsO	Oxyde d'arsenic
ATP	Adénosine-5'- triphosphate
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CK	Créatine kinase
CO ₂	Dioxyde de carbone
CoQ	Quinone
CRC	Capacité de rétention du calcium
CsA	Cyclosporine A
CyP-D	Cyclophiline D
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EGTA	Acide ethylène glycol bis-(amino-2 éthyl éther) N,N-tétraacétique
eNOS	Nitric oxide synthase endothéliale
FAD ⁺ /FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide oxydée / réduite
FCCP	Carbonyl-cyanide p-(triFluorométhoxy) phényl-hydrazone
GC	Guanylate cyclase
GMPc	Guanosine 3,5-monophosphate cyclique
HK	Hexokinase
I/R	Ischémie reperfusion
KATP	Canal potassique sensible à l'ATP
KH	Solution de Krebs Henseleit
KO	Knockout
LDH	Lactate déshydrogénase
MAP-kinase	Mitogen-Activated Protein kinases
Me ²⁺	Cation divalent
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé / réduit
NCE	Na ⁺ Dependant pathway for Calcium Efflux

NEM	N-éthylmaléimide
NICE	Na⁺ Independent pathway for Calcium Efflux
NIM811	N-méthyl-4-isolectine B4 cyclosporine
NO	Nitric oxide
ONOO⁻	Peroxynitrite
PC	Préconditionnement
PhAsO	Phényl-arsine-oxyde
Pi	Phosphate inorganique
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKG	Protéine kinase G
PostC	Postconditionnement
PPase	Peptidyl-propyl cis-trans isomérase
PTPm	Pore de Transition de Perméabilité mitochondriale
RaM	Rapid uptake Mode
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
SIMP	Soluble Inter Membrane mitochondrial Proteins
TIM	Translocase of the Inner Membrane
TOM	Translocase of the Outer Membrane
Tris	Tris (hydroxyméthyl) amino méthane
TspO	Protéine Translocatrice
TTC	Chlorure de triphényltétrazolium
Ub0	Ubiquinone 0
Ub10	Ubiquinone 10
UQ	Ubiquinone
VADC	Voltage Dependent Anion Channel
VG	Ventricule gauche
WT	Type sauvage

INTRODUCTION

I. Mitochondrie et mort cellulaire

I-1. Structure et fonctionnement des mitochondries

La mitochondrie est présente dans la majorité des cellules eucaryotes ¹. Elle fournit, par sa synthèse de l'ATP, l'énergie indispensable au bon fonctionnement de la cellule vivante. Au cours d'une agression cellulaire comme l'ischémie-reperfusion, la mitochondrie peut se détourner de ce rôle physiologique et orienter le destin de la cellule vers la nécrose ou l'apoptose par l'intermédiaire du phénomène de la transition de perméabilité.

I-1-1. Structure des mitochondries

La mitochondrie est un organe cellulaire d'environ 2 à 10 μm de longueur et de 0,5 à 1 μm de largeur. Elle se compose de deux membranes, une externe et une interne, qui délimitent trois milieux qui sont le milieu extramitochondrial (cytoplasme de la cellule), l'espace intermembranaire et la matrice (Figure 1).

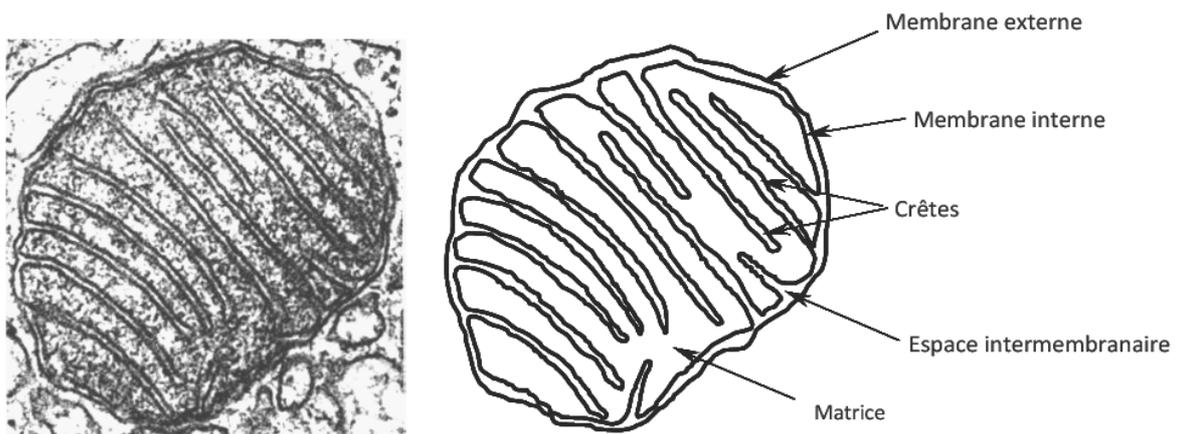


Figure 1. Structure de mitochondrie

I-1-1-1. La membrane externe

La membrane externe mitochondriale est une membrane classique, lisse, formée de 60 % de protéines et de 40 % de lipides polaires. La porine (protéine transmembranaire) laisse passer toutes les molécules hydrophiles d'une masse moléculaire inférieure à 5 kDa. Les molécules de plus haut poids moléculaires peuvent entrer par la membrane externe à condition que leurs séquences N-terminal soient capables de se lier à une protéine multi-subunité nommée « translocase of the outer membrane » (TOM), qui permet à ces molécules de traverser la membrane externe par transport actif. La rupture de la membrane externe dans certaines conditions laisse sortir les facteurs pro-apoptotiques et déclenche le processus de la mort cellulaire ². La membrane externe possède également des systèmes de transport plus spécifiques tels que l'acyl-CoA synthétase nécessaire à l'importation des acides gras.

I-1-1-2. L'espace inter-membranaire

L'espace inter-membranaire est l'espace entre les membranes externe et interne. Etant donnée la perméabilité de la membrane externe aux molécules de faibles poids moléculaires, les concentrations de celles-ci sont de même ordre de grandeur que celles dans le cytosol. Les protéines de hauts poids moléculaires, qui traversent la membrane externe par les complexes TOM, se trouvent à des concentrations différentes de leurs concentrations cytosoliques.

I-1-1-3. La membrane interne

La membrane interne est composée de 75 % de protéines et de 25 % de lipides. Elle a une perméabilité sélective. A part pour certaines petites molécules neutres telles que l'O₂, l'H₂O, le CO₂ et le NH₃ qui peuvent diffuser passivement, la plupart des ions et les molécules utilisent un transporteur spécifique pour traverser cette membrane. Ces transporteurs fournissent à la matrice les substrats et les enzymes de la chaîne respiratoire comme l'ATP-synthase ou le complexe F₀-F₁. La membrane interne forme des invaginations qui

apparaissent sous forme de crêtes ou replis au microscope électronique. Ces crêtes augmentent considérablement la surface de la membrane et favorisent l'existence supplémentaire d'unités de phosphorylation oxydative.

La membrane interne est riche en cardiolipine, un phospholipide découvert au préalable dans les cellules cardiaques bovines ³. Dans les cellules de mammifères, la cardiolipine se trouve exclusivement dans la membrane interne des mitochondries et elle est responsable de la forte imperméabilité de cette membrane. La dégradation des cardiolipines induit un dysfonctionnement mitochondrial et la mort cellulaire ⁴.

La membrane interne est le siège de la formation d'un méga canal appelé le pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm) (voir ultérieurement).

I-1-1-4. La matrice

Ce compartiment interne contient un mélange très concentré d'enzymes, dont celles qui sont nécessaires à l'oxydation du pyruvate et des acides gras et celles du cycle de Krebs. Elle contient également plusieurs copies identiques du génome mitochondrial, des ribosomes mitochondriaux, des ARNt (Acide ribonucléique de transfert) et différents enzymes nécessaires à l'expression des gènes mitochondriaux.

Cette conception schématique de la mitochondrie ne doit cependant pas nous éloigner d'une vision plus dynamique de cet organite intracellulaire. En effet, les mitochondries entretiennent d'étroites relations avec les autres constituants cellulaires ⁵ :

- le cytosquelette qui leur permet une certaine mobilité le long des microtubules.
- les protéines cytoplasmiques sous la forme d'échanges. Ces échanges sont facilités par l'existence de zones de contact entre la membrane interne et la membrane externe grâce à des pores de translocation, constitués par des protéines appartenant aux deux membranes.

- le réticulum endoplasmique dont certaines lames forment de véritables cages membranaires autour des mitochondries, avec de nombreux points de contact, pouvant ainsi participer à des échanges lipidiques et jouer un rôle dans la signalisation calcique intracellulaire.
- le noyau, avec lequel elles échangent des informations coordonnant les étapes de leur biogenèse.

I-1-2. Fonctionnement des mitochondries

I-1-2-1. Conversion énergétique

- Synthèse de l'ATP

L'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire est apportée par l'oxydation des nutriments. L'oxydation de ces combustibles par l'oxygène libère ainsi une quantité importante d'énergie qui est stockée par la mitochondrie sous la forme d'une liaison anhydride lors de la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP). Les combustibles cellulaires utilisés pour produire de l'ATP sont les produits de la glycolyse, les acides gras, les corps cétoniques, et certains acides aminés. L'ensemble de ces réactions qui conduisent à la synthèse d'ATP consomment de l'oxygène et sont ainsi assimilées à une respiration mitochondriale. On parle également de phosphorylation oxydative pour qualifier les trois étapes essentielles de ce mécanisme faisant intervenir les différents compartiments mitochondriaux ⁶. Ces trois étapes sont :

a - La constitution d'un « pool » matriciel de coenzymes réduites. L'oxydation des combustibles cellulaires fournit des coenzymes réduites (principalement la forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide ou NADH et à un moindre degré la forme réduite du flavine adénine dinucléotide ou FADH₂) ; ce sont des donneurs de protons et d'électrons.

b - Le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire. Le transfert des électrons des coenzymes réduites à l'oxygène moléculaire par différentes réactions d'oxydo-

réduction est assuré par les 4 complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, auquel est couplé le transport actif de protons vers l'espace inter membranaire, générant une différence de potentiel électrochimique (Figure 2).

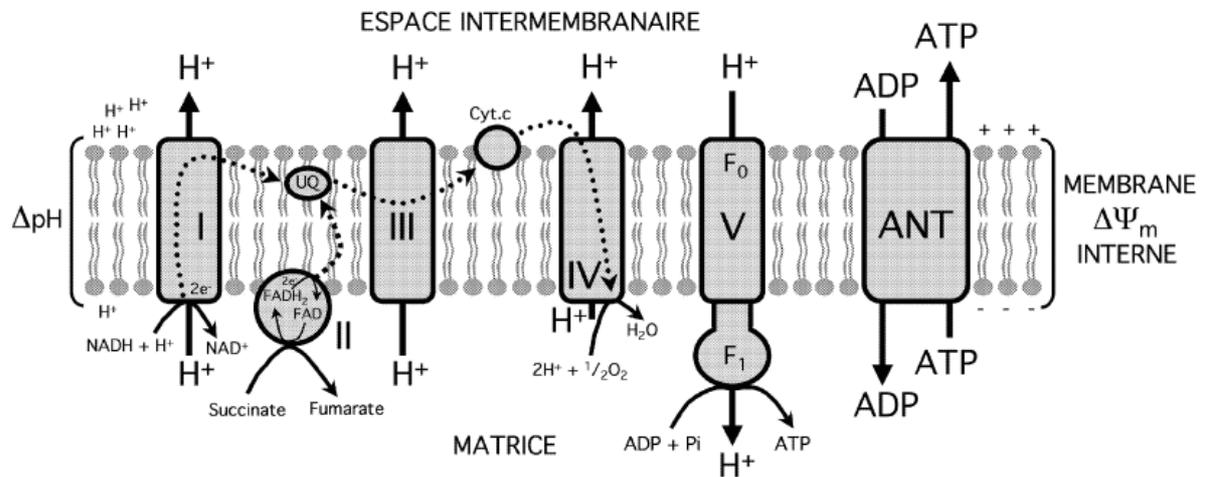


Figure 2. Fonctionnement de la chaîne respiratoire. A partir des coenzymes réduites (NADH et FADH₂) issues du métabolisme énergétique mitochondrial, un flux d'électrons (flèches en pointillés) est généré et transféré grâce à quatre complexes protéiques et deux navettes (ubiquinone UQ et cytochrome c) jusqu'à l'oxygène moléculaire. Les complexes I, III, et IV de la chaîne respiratoire, en plus d'être des transporteurs d'électrons, sont également des pompes à protons qui font sortir des H⁺ de la matrice vers l'espace inter membranaire, créant ainsi à la fois un gradient de pH (ΔpH) et un potentiel de membrane mitochondrial (ΔΨ_m). Le complexe V ou F₀/F₁-ATP synthase permet de convertir cette force protonmotrice en ATP en faisant entrer les protons dans la matrice. Le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) permet le bon fonctionnement de ces réactions de phosphorylations oxydatives en assurant en continu la sortie d'un ATP contre l'entrée d'un ADP.

Le flux d'électrons provenant du NADH matriciel est pris en charge successivement par le complexe I (NADH / ubiquinone réductase), l'ubiquinone (UQ), le complexe III (ubiquinol / cytochrome c réductase), le cytochrome c, le complexe IV (cytochrome c oxydase), et enfin l'oxygène moléculaire. Le flux d'électrons en provenance du FADH₂ suit le trajet : complexe II (succinate-ubiquinone-réductase), UQ, complexe III, cytochrome c, complexe IV, et enfin l'oxygène moléculaire. Dans les conditions physiologiques, une quantité très faible de l'oxygène réagissant avec la chaîne respiratoire est incomplètement réduit, principalement au niveau des complexes I et III, et donne ainsi naissance à des espèces radicalaires, qui ont des rôles importants de second messager intracellulaire (voir ultérieurement).

A partir des coenzymes réduites (NADH et FADH₂) issues du métabolisme énergétique mitochondrial, un flux d'électrons est généré (Figure 2, flèches en pointillés) et transféré grâce à quatre complexes protéiques et deux navettes (UQ et cytochrome *c*) jusqu'à l'oxygène moléculaire. Les complexes I, III, et IV utilisent l'énergie générée par ce transfert d'électrons pour la translocation active de protons depuis la matrice vers l'espace inter membranaire. Cette sortie de protons de la matrice va créer un gradient de concentration en proton ou gradient de pH (Δ pH) et d'un potentiel de membrane mitochondrial (Δ Ψ_m) à travers la membrane interne, la face matricielle devenant négative et l'espace inter membranaire positif.

c - La synthèse d'ATP. La dissipation du potentiel par le retour des protons dans la matrice est couplée à la synthèse d'ATP par la F₀/F₁-ATP synthase. Ce mécanisme a été pressenti dès 1961 par Mitchell. La force protomotrice d'environ 200 mV, dans les conditions normales de respiration mitochondriale, résulte d'un Δ Ψ_m de 140 mV et d'un Δ pH de -1. Elle assure le couplage entre les oxydo-réductions de la chaîne respiratoire et la formation de l'ATP ⁷. C'est elle qui assure le retour des protons vers la matrice par diffusion facilitée au travers de la membrane interne. En raison de l'imperméabilité de cette membrane, le retour se fera exclusivement par un transporteur spécifique (F₀) associé à l'enzyme de phosphorylation (F₁). Le domaine membranaire F₀ joue le rôle de canal à protons alors que le domaine extrinsèque hydrophile F₁ du côté matriciel supporte l'activité catalytique de la F₀/F₁-ATP synthase, parfois appelée complexe V. Sa structure exacte est encore hypothétique, même si la partie F₁ est relativement bien caractérisée sous la forme de 5 sous-unités lui conférant une forme sphérique. La F₀/F₁-ATP synthase pourrait avoir des mouvements de rotation au passage d'un H⁺ à travers F₀. La F₀/F₁-ATP synthase, à l'inverse de la chaîne respiratoire, permet de convertir une énergie électrochimique (force protomotrice) en une énergie chimique potentielle véhiculée par l'ATP. Cependant son fonctionnement est réversible, si bien que, lors d'une chute de la force protomotrice, une hydrolyse de l'ATP se produira.

- Transport des nucléotides adényliques

Le bon fonctionnement de la phosphorylation oxydative est conditionné par un transport satisfaisant de l'ADP et de l'ATP. L'ATP est synthétisée dans la matrice, mais utilisée en grande partie dans le cytosol. A l'inverse l'ADP est synthétisée dans l'espace intermembranaire selon la réaction : $AMP + ATP \rightarrow 2 ADP$. La continuité métabolique est assurée par le transporteur des nucléotides adényliques (ANT), qui représente environ 10 % des protéines de la membrane interne ⁸. Cette translocase, hautement spécifique a un fonctionnement stœchiométrique ATP:ADP (1 :1).

- Contrôle de l'activité de la chaîne respiratoire et de la F₀/F₁-ATP Synthase

La disponibilité en ADP et phosphate inorganique (Pi) module l'intensité respiratoire et la consommation en oxygène. La présence d'une quantité importante d'ADP augmente l'intensité respiratoire. De la même façon, la production d'ATP se solde par une inhibition de la chaîne respiratoire. Un second mécanisme de contrôle est représenté par la fixation de l'ATP ou de l'ADP sur le domaine matriciel du complexe IV. Les rapports intra mitochondriaux ATP/ADP élevés inhibent de manière allostérique le cytochrome *c* oxydase, alors que l'apport d'ADP, en diminuant ce rapport, déplace la fixation de l'ATP sur l'enzyme à sa faveur, stimulant ainsi la chaîne respiratoire.

Le taux de Ca²⁺ dans la mitochondrie intervient également dans la commande de la chaîne respiratoire. Son entrée diminue directement le $\Delta \Psi_m$ et interrompt la synthèse d'ATP. Néanmoins une élévation plus modérée du taux de Ca²⁺ libre active les déshydrogénases du cycle tricarboxylique et augmente la production de NAD(P)H et le flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et par voie de conséquence la synthèse d'ATP ⁹.

Le NO (Nitric oxide) et son dérivé ONOO⁻, deux composants du stress oxydatif, agissent sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire ¹⁰. A faible concentration (nM), le NO inhibe de façon réversible la respiration mitochondriale par compétition avec l'oxygène au niveau du

cytochrome *c* oxydase et se présente comme un régulateur physiologique de la chaîne respiratoire. A forte concentration (μM), il se comporte comme un agent toxique. Il réagit avec l'anion superoxyde O_2^- pour donner l'anion peroxyde ONOO^- qui inhibe de façon irréversible la respiration mitochondriale et endommage les complexes II, IV et V.

Le fonctionnement harmonieux des cinq complexes de la chaîne respiratoire ainsi que de l'ANT assure un certain niveau de "couplage" des phosphorylations oxydatives. Dans l'absolu, tout proton expulsé de la matrice devrait être utilisé pour faire fonctionner l'ATP synthase. Cependant, l'imperméabilité de la membrane interne aux protons n'est pas parfaite et un certain nombre d'entre eux court-circuitent l'ATP synthase. Ceci entraîne la dissipation sous la forme de chaleur, ou thermogénèse, d'une partie de l'énergie de la force protomotrice. Un certain nombre de situations pathologiques ou pharmacologiques (agents découplants), peuvent conduire au découplage des phosphorylations oxydatives, en effondrant le gradient électrochimique de protons qui diminue par voie de conséquence la force protomotrice et augmente la vitesse de la respiration mitochondriale (consommation d'oxygène).

I-1-2-2. Les espèces actives de l'oxygène (ROS)

Les ROS sont des espèces chimiques, neutres ou chargées, qui ont la particularité de porter un électron célibataire (dit « non apparié ») sur leur couche externe, ce qui les rend généralement instable et capable de réagir plus ou moins rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes. Les ROS ont des rôles importants de second messenger intracellulaire ¹¹. Leurs effets varient selon les situations où se trouvent les cellules : ils sont traditionnellement considérés comme des agents qui induisent des effets délétères, comme la stimulation de la prolifération cellulaire, la régulation des processus d'apoptose ou l'induction de la mort cellulaire. Cependant, les ROS ont également été impliqués dans les processus de pré- et postconditionnement cardiaque ^{12, 13}.

La mitochondrie représente le site majeur de production cellulaire de ROS : dans les cellules non phagocytaires, 80% de l'anion superoxyde provient du fonctionnement de la chaîne respiratoire. Les électrons sont transférés le long de la chaîne respiratoire au cours de réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène, qui est réduit complètement en H₂O. Une proportion significative de l'oxygène (2% à 6%) échappe à la réduction complète en H₂O et subit une réduction mono-électronique au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire ¹⁴, pour donner naissance à l'ion superoxyde (O₂⁻). Lorsque le fonctionnement de la chaîne respiratoire est normal et que le potentiel de membrane est faible, la production d'O₂⁻ par les complexes I et III s'effectue au cours du transfert des électrons du complexe I au cycle des quinones (forward electron transfer). Au niveau du complexe III, c'est le coenzyme Q, sous sa forme ubisemiquinone, qui est responsable de la production d'O₂⁻. Lorsque le potentiel de membrane est élevé (en l'absence d'ADP) et lorsque le FADH₂ est utilisé par le complexe II, il y a production d'O₂⁻ au sein du complexe I via le flux inverse d'électrons (reverse electron transfer) ^{15, 16}.

I-1-2-3. Signal calcique

L'ion Ca²⁺ est dans la cellule le second messager qui régule de nombreuses réactions métaboliques et des processus physiologiques complexes comme la contraction des cardiomyocytes. Sa concentration est hautement régulée, en particulier par l'intermédiaire de la mitochondrie qui a la capacité de capter et de libérer du Ca²⁺. Néanmoins, la mitochondrie est pourvue d'un certain nombre de canaux ioniques spécifiques du calcium (Figure 3) ^{17, 18}.

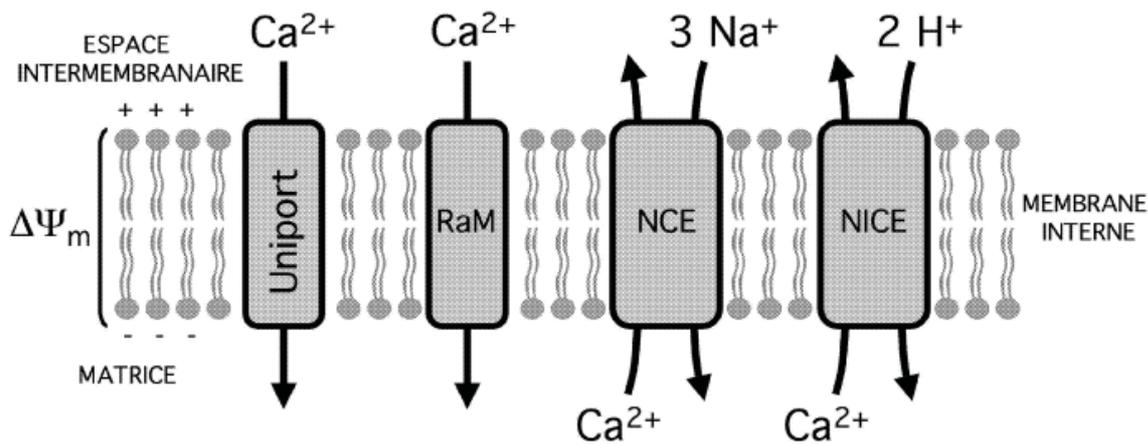


Figure 3. Transport mitochondrial du calcium. L'entrée du calcium dans la mitochondrie est assurée par l'uniport au Ca^{2+} et le RaM (Rapid uptake Mode), deux transporteurs électrogéniques, dépendant du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta \Psi_m$). Sa sortie dépend de deux transporteurs plus lents, dépendant (NCE) ou indépendant (NICE) de l'ion Na^+ ¹⁷.

L'influx de Ca^{2+} dans la mitochondrie est essentiellement sous la dépendance de l'uniport calcique. La nature de sa structure est inconnue. Il est inhibé par le rouge de ruthénium. Ce transporteur utilise l'énergie du potentiel membranaire ($\Delta \Psi_m$). Il est également inhibé de façon compétitive par d'autres cations bivalents dont il assure également le transport comme Sr^{2+} , Mn^{2+} , ou Ba^{2+} . L'ion Mg^{2+} n'utilise pas l'uniport mais il est capable de moduler négativement son affinité pour Ca^{2+} . La présence d'un autre système plus rapide et transitoire a été suggérée *in vivo*. Il a été dénommé « Rapid uptake Mode (RaM) ». Comme l'uniport, sa structure est inconnue, il est également consommateur d'énergie et le rouge de ruthénium à des concentrations plus élevées l'inhibe. En revanche, il est insensible au Mg^{2+} . L'efflux de Ca^{2+} depuis la mitochondrie est assuré par deux transporteurs individualisés en fonction de leur dépendance/indépendance vis à vis de l'ion Na^+ . Le premier, majoritaire dans le cœur et le cerveau et dépendant du Na^+ appelé NCE (Na^+ -dépendent pathway for Ca^{2+} Efflux) permet l'échange de 3 ions Na^+ pour un ion Ca^{2+} . Le second prédominerait dans le foie avec une indépendance vis à vis du Na^+ , il est nommé NICE (Na^+ -Indépendent pathway for Ca^{2+}

Efflux). Il est caractérisé par sa lenteur et sa saturation rapide. Il est électriquement neutre car il permet l'échange de 2 H⁺ contre 1 Ca²⁺.

Lorsque la surcharge calcique mitochondriale dépasse celle des transporteurs, l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale peut apparaître. Nous détaillerons plus loin les mécanismes de cette ouverture qui participe également d'une certaine façon au transport cellulaire du Ca²⁺.

I-1-2-4. Autres fonctions des mitochondries

La mitochondrie joue aussi des rôles essentiels dans d'autres fonctions métaboliques. Elle participe à la régulation du potentiel membranaire, à la synthèse des hormones stéroïdes, au cycle de Krebs, au cycle de l'urée, à l'apoptose et à la régulation de la prolifération cellulaire, etc.

I-2. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale

I-2-1. Caractéristiques

Le gonflement massif des mitochondries induit par la surcharge calcique a tout d'abord été observé dans les mitochondries isolées de foie dans les années 60^{19, 20}. Toutes les études ont montré que ce phénomène est dû à l'ouverture d'un canal non-spécifique situé dans la membrane interne de la mitochondrie²¹⁻²³, laissant passer les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1,5 kDa. L'ouverture de ce canal, nommé le pore de transition de perméabilité mitochondriale, caractérise la perte de l'imperméabilité constitutionnelle de la membrane interne. Il provoque non seulement un gonflement caractéristique de la matrice mais aussi un effondrement du potentiel de la membrane mitochondriale ($\Delta \Psi_m$). En fait, la membrane interne mitochondriale est un excellent isolateur électrique, avec une épaisseur de

10 nm environ, elle garde une différence potentiel de ~ 180 mV, équivalent à une puissance de champ électrique de 1.8×10^5 V/cm²⁴. En cas d'ouverture du PTPm, la dissipation de $\Delta \Psi_m$ induit l'arrêt de la synthèse d'ATP et même l'hydrolyse de l'ATP puisque l'ATP synthase se met à fonctionner en sens inverse. Le gonflement de la matrice induit une rupture de la membrane externe et une fuite dans le cytoplasme de molécules comme le cytochrome *c*.

On ne sait pas si le PTPm existe dans les conditions normales physiologiques. Lors d'une souffrance intense de la mitochondrie, il se forme et son ouverture représente pour la cellule un point de non-retour vers la mort, qu'elle soit de nature nécrotique ou apoptotique. Le rôle physiopathologique du PTPm a été étudié dans de nombreux domaines²⁵⁻³⁵, dont l'ischémie-reperfusion cardiaque.

I-2-2. Structure moléculaire et régulation du PTPm

L'état du PTPm influence le destin d'une cellule sous stress. Les recherches sur la structure moléculaire et les facteurs de la régulation du PTPm nous permettront de mieux comprendre ce phénomène et par conséquent de protéger le tissu ou l'organe face aux différents challenges. Cependant, la composition moléculaire exacte de PTPm reste inconnue. Les mécanismes complexes de régulation de la transition de perméabilité plaident davantage en faveur d'une nature multi-protéique du PTPm, et ce d'autant qu'il n'a jamais été possible de reproduire *in vitro* les caractéristiques de ce phénomène à partir d'un seul des composés connu de la membrane interne. Il est également difficile de faire la part entre le rôle structurel et régulateur des différentes protéines candidates.

Dans la conception traditionnelle, le PTPm est un assemblage multi-protéique qui comporte le transporteur des nucléotides adényliques (ANT), la cyclophiline D (CyP-D), la porine (voltage-dependent anion channel, VDAC), la créatine kinase (CK), l'hexokinase (HK), le récepteur des benzodiazépines (PBR), ainsi que des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L et Bax). Cependant, les études récentes basées sur des modèles animaux

génétiqumment modifiés « knockout » ont mis en doute certains éléments de l'architecture du PTPm, puisque le phénomène du PTPm persiste en leur absence (Figure 4).

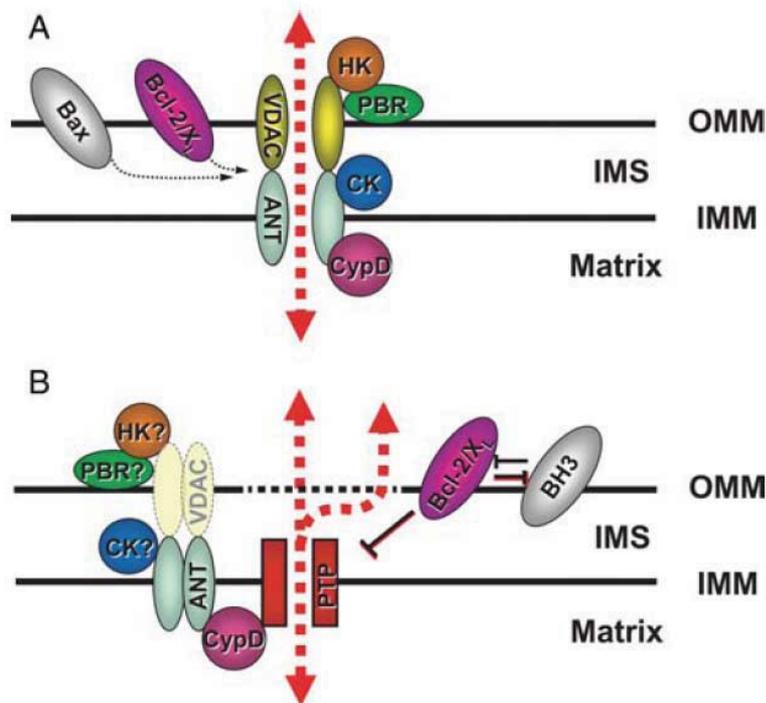


Figure 4. Architecture du pore de transition de perméabilité mitochondriale. (A) Vue classique. Le PTPm est formé par le complexe VDAC-ANT-CyP-D. L'hexokinase, la créatine kinase mitochondriale (CK), le récepteur de benzodiazépine (PBR) et les membres de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L et Bax) sont inclus dans les composants régulateurs. (B) Vue actuelle. Les composants essentiels du PTPm restent inconnus, mais ils pourraient être régulés par les molécules adjacentes comme indiqué dans le schéma. Le VDAC, représenté en ombré, n'est plus considéré comme un composant majeur ni un régulateur du PTPm sur la base des résultats acquis chez des animaux génétiquement modifiés (VDAC^{-/-}). Les points d'interrogation soulèvent des questions sur la participation de ces régulateurs dans le PTPm ³⁶.

I-2-2-1. Structure des protéines candidates du PTPm

- Le transporteur des nucléotides adényliques (ANT)

L'ANT est une protéine abondante sur la membrane interne mitochondriale. Elle catalyse sélectivement et réversiblement l'échange d'ADP contre l'ATP avec une stoechiométrie de 1 :1. La direction de transport des nucléotides dépend de la condition dans laquelle se trouve la cellule. Dans les conditions physiologiques normales, l'ATP est transporté de la

mitochondrie vers le cytoplasme contre l'ADP dans le sens inverse. Ce transport est inversé dans les conditions anoxiques/ischémiques.

L'implication de l'ANT dans la structure du PTPm a été suspecté dès la description complète du phénomène de transition de perméabilité suite aux travaux de Hunter et Haworth²¹. Ils ont observé que l'ouverture du PTPm est inhibée par l'ATP et l'ADP. Les autres nucléotides qui n'utilisent pas l'ANT comme transporteurs n'ont pas d'effet sur le PTPm^{23,37}. Basée sur ces observations, l'implication de l'ANT dans la structure du PTPm a ensuite été confirmée par des approches pharmacologiques^{38,39}. En effet, l'atractyloside, qui stabilise l'ANT dans sa conformation cytosolique « c », est capable d'induire la transition de perméabilité, alors que l'acide bongkrélique, qui maintient l'ANT en position matricielle « m », l'inhibe. Tikhonova et al. ont rapporté que l'ANT purifiée a des caractéristiques d'un canal non-spécifique dans un système reconstitué⁴⁰. Ces études ont suggéré que l'ANT est un élément constitutif du PTPm. Cependant, cette théorie a été mise en doute en 2004 par Kokoszka et al.⁴¹. Dans leur étude, l'ouverture de PTPm calcium- et CsA-sensible persiste dans les mitochondries isolées du cœur et du foie de souris génétiquement modifiées « knockout » de l'ANT1 et l'ANT2, malgré une capacité de rétention de calcium plus haute que chez la souris sauvage (WT). Ce résultat montre que l'ANT n'est pas un composant majeur du pore de transition de perméabilité mitochondriale, mais plutôt un facteur de régulation de ce canal non-spécifique.

- La cyclophiline D (CyP-D)

La CyP-D est une protéine matricielle d'un faible poids moléculaire d'environ 19-20 kDa. L'effet de la CsA sur le mouvement de Ca^{2+} dans les mitochondries a été décrit par Fournier et al. en 1987⁴². Crompton et al. en 1988 ont démontré que la CsA est un inhibiteur puissant de l'ouverture du PTPm⁴³. Halestrap et al.^{38,44} ont montré que ce phénomène se produit par l'intermédiaire de l'inhibition d'une peptidyl-propyl *cis-trans* isomérase (PPIase), qui a ensuite été identifié comme la CyP-D.

La CsA, un agent immunosuppresseur, est largement employée dans la transplantation d'organes et dans le traitement de certaines maladies auto-immunes. Il est actuellement admis que la CsA se lie à la cyclophiline des lymphocytes immunocompétents, particulièrement des lymphocytes T. Le complexe Cyclosporine-Cyclophiline inhibe la calcineurine, une protéine phosphatase qui, dans des circonstances normales, active la transcription du gène de l'interleukine 2, conduisant à une réduction d'activité des lymphocytes T effecteurs. La CsA et ses analogues non immunosuppresseurs se lient à la CyP-D et inhibent l'ouverture du PTPm. Cet effet est calcineurine indépendant^{45, 46}. La sangliféhrine A, un immunosuppresseur, qui exécute aussi son action sur la cyclophiline mais par l'intermédiaire d'un autre site que la CsA, n'inhibe pas la calcineurine. Cependant, elle a un effet inhibiteur sur le PTPm aussi puissant que la CsA⁴⁷.

Il n'existe cependant aucune certitude concernant le mécanisme de l'interaction CyP-D/PTP ou le mode d'action de la CsA sur le PTP. L'équipe d'Halestrap a suggéré que sous certaines conditions favorisant l'ouverture du PTP, la CyP-D peut se fixer à l'ANT, et que lors d'une activation par le Ca^{2+} , un changement significatif de conformation lié à l'activité PPIase transforme le transporteur spécifique ADP/ATP en un canal aspécifique de haute conductance⁴⁸. La CsA pourrait inhiber l'ouverture du PTP en empêchant la liaison de la CyP-D à l'ANT^{49, 50}.

Des études sur des souris CyP-D^{-/-} ont récemment démontré que la délétion de CyP-D rend le PTPm insensible à la CsA, une observation qui confirme que la cible pharmacologique de la CsA sur PTPm est la CyP-D. Toutefois, le pore de transition de perméabilité des mitochondries issues de souris CyP-D déficientes s'ouvre face à la surcharge en calcium bien qu'ils soient plus résistants que chez la souris WT⁵¹. Ce résultat montre que malgré son rôle régulateur sur PTPm, la CyP-D n'est pas un composant essentiel de ce canal non spécifique.

L'application thérapeutique de la CsA a été envisagée dans plusieurs essais cliniques. Dans un essai pilote fait chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde aigu, la CsA a limité la taille de la nécrose du cœur⁵². Les propriétés protectrices de la CsA dans d'autres pathologies ont été revues par Di Lisa et Bernardi en 2006⁵³. Autre que la CsA, les inhibiteurs plus spécifiques de CyP-D ont été étudiés. Les analogues non immunosuppresseurs de la CsA, la méthylAla(3)éthylVal(4)-cyclosporine (Debio 025)⁵⁴, la N-méthyl-4-isoleucine cyclosporine (NIM811)²⁷ et la Sanglifehrine A⁴⁷ ont montré leurs effets sur le PTPm avec moins d'effets secondaires que la CsA *in vivo*.

- La porine ou « voltage-dependent anion channel » (VDAC)

Le VDAC est la protéine la plus abondante de la membrane externe de la mitochondrie. C'est une protéine transmembranaire composée de 19 feuilletts β formant les canaux protéiques traversant la bicouche lipidique. Ces canaux laissent passer toutes les molécules hydrophiles d'une masse moléculaire inférieure à 5 kDa. Elle pourrait s'organiser avec l'ANT et d'autres protéines au niveau des zones de contact entre membrane interne et membrane externe pour former le PTPm. La participation d'un composant de la membrane externe à une structure telle que le PTPm, appartenant par définition à la membrane interne, permettrait d'expliquer les phénomènes de transfert à haute conductance enregistrés sous la forme des méga canaux mitochondriaux entre la matrice et le cytosol⁵⁵. En effet, il existe des similitudes entre les courants générés par l'assemblage de deux VDAC et ceux des méga canaux mitochondriaux⁵⁶. En plus de l'association ANT/VDAC, différents assemblages multi-protéiques ont été évoqués comme étant à l'origine du PTPm⁴⁹. Selon les types cellulaires, le récepteur aux benzodiazépines⁵⁷, la créatine kinase⁵⁸, l'hexokinase⁵⁹, la CyP-D⁶⁰ ou les protéines de la famille Bcl-2 telles que Bax ou Bcl-2⁵⁵ pourraient intervenir dans ces complexes situés dans les zones de contact. Basé sur ces travaux, le VDAC avait initialement été considéré comme un élément essentiel du PTPm^{59, 61, 62}. Cependant, il a été démontré récemment que les

caractéristiques principales de PTPm ont été préservées dans les mitochondries isolées chez la souris « knockout » de VDAC1-VDAC3 et dans les cellules VDAC 1/3^{-/-} en présence d'un inhibiteur de l'isoforme VDAC2⁶³. Ce travail a mis en cause le rôle de VDAC dans la composition du PTPm. En effet, les fibroblastes ne possédant aucune des 3 isoformes de VDAC montrent la même induction du PTPm sous différents stress. De plus, la mort cellulaire est identique comparée aux fibroblastes sauvages en réponse à une induction avec les membres de la famille Bcl-2^{63,64}. Les expérimentations faites avec les cellules dépourvues de VDAC1 et 3 et sans liaison détectable entre hexokinase et VDAC2 ont démontré aussi l'absence d'implication de VDAC dans l'induction de la mort cellulaire provoquée par le détachement de hexokinase de la mitochondrie⁶⁵. En conclusion, le VDAC n'est pas un composant du PTPm et il n'existe pas à ce jour de preuves directes pour démontrer son rôle régulateur.

- Récepteur des benzodiazépines

La mitochondrie possède sur sa membrane externe des récepteurs des benzodiazépines de type périphériques, connus actuellement comme des protéines translocatrices (TspO) de 18kDa⁶⁶. Il est également démontré que les TspO forment un complexe multimérique avec VDAC et ANT sur la membrane externe mitochondriale⁶⁶. De plus, des études par « patch-clamp » ont montré qu'un canal mitochondrial de multi-conductance, présumé comme PTPm, est sensible à la fois à la CsA⁶⁷ et aux ligands de TspO comme le Ro5-4846⁵⁷. Ces découvertes ont suggéré l'importance des récepteurs aux benzodiazépines sur l'intégrité, ou la régulation du PTPm. Brown et al⁶⁸ ont montré que le Ro5-4846 induit une protection du cœur contre la détérioration de contractions post-ischémiques probablement par interaction avec un site en amont de PTPm. Ce résultat suggère que TspO est plutôt un régulateur qu'un composant standard de PTPm.

- Créatine kinase mitochondriale

La créatine kinase mitochondriale se trouve dans l'espace inter-membranaire mitochondriale. On la retrouve principalement dans le cœur, le muscle et le cerveau. Elle catalyse réversiblement le transfert de groupe phosphorylé de phospho-créatine à l'ADP. Il a été démontré que la créatine kinase mitochondriale fait partie d'un complexe avec le VDAC et l'ANT et est probablement impliquée dans la régulation de PTPm⁵⁹. Dans les mitochondries isolées de souris transgéniques qui surexpriment la créatine kinase mitochondriale dans le foie, le PTPm est induit par le Ca²⁺-atractylate comme chez la souris WT. Cependant, la créatine ou la cyclocréatine, en stabilisant la créatine kinase dans une forme octamérique liée à l'ANT, n'inhibe pas l'induction du PTPm chez les souris transgéniques par rapport aux sham⁵⁸. La créatine kinase pourrait donc être impliquée dans la régulation du PTPm.

- Cardiolipine

La cardiolipine est un phospholipide situé dans la membrane interne mitochondriale. Il est responsable de son imperméabilité. La cardiolipine est sensible à l'attaque des ROS, un phénomène lié à une grande quantité des acides gras insaturés dans sa composition. En présence de Ca²⁺, les cardiolipines peroxydées induisent l'ouverture du PTPm⁶⁹. L'activité de l'ANT dans l'échange de l'ATP et l'ADP est conditionnée par ses interactions avec les cardiolipines⁷⁰. En effet, l'activité des cardiolipines peroxydées, sur l'induction du PTPm est modulée par les ligands et les inhibiteurs de l'ANT (ADP, ATP, atractyloside et acide bongkreikic, etc). Nury et al⁷¹ ont suggéré que les cardiolipines assurent l'interaction entre les deux monomères d'ANT. Elles stabilisent sa structure et contrôlent la conformation de l'ANT ; les cardiolipines induisent aussi l'ouverture du PTPm en inhibant compétitivement l'activité de l'ANT⁷².

En conclusion, les composants essentiels du PTPm ne sont pas encore identifiés. Il est vraisemblable qu'aucun des éléments mentionnés ci-dessus ne soit la structure principale du

PTPm. Ils réagissent plutôt comme régulateurs et/ou modulateurs du PTPm. Les données obtenues avec les techniques génétiques nous ont orientés vers la réévaluation de la structure « classique » du PTPm. La structure de PTPm reste un sujet de controverse. La Figure 4 présente les vues classique et actualisée de l'architecture schématisée du PTPm ⁷³.

I-2-2-2. Régulateurs du pore de transition

De très nombreux composés sont capables d'influencer l'ouverture du PTP soit par inhibition soit par activation, objectivée respectivement par une diminution et une augmentation de la probabilité d'ouverture :

- Le calcium

Le Ca^{2+} est l'inducteur de la transition de perméabilité faisant partie intégrante de la définition du phénomène depuis ses premières descriptions ⁷⁴. La surcharge calcique d'une préparation de mitochondries isolées induit ce phénomène, alors que l'utilisation d'un chélateur du calcium comme l'EGTA l'empêche. L'inhibition de l'uniport par le rouge de ruthénium prévient la surcharge de la matrice en Ca^{2+} et l'ouverture du PTPm. En réalité, le problème est plus complexe, avec des effets différents du Ca^{2+} sur le PTPm selon que l'on considère ses effets cytosoliques ou matriciels. Dans la matrice, le Ca^{2+} est inducteur de l'ouverture du PTPm. Dans le cytoplasme, il diminue sa probabilité d'ouverture ⁷⁵. De ce fait, l'uniport est primordial dans la signalisation de la transition de perméabilité : il permet la redistribution du Ca^{2+} dans la cellule et transforme un effet inhibiteur du Ca^{2+} sur le PTPm en un puissant inducteur de la transition de perméabilité ⁷⁶.

La capacité de rétention de calcium par les mitochondries est devenue un critère classique pour évaluer la vulnérabilité du PTPm. Cependant, la quantité de Ca^{2+} nécessaire pour induire l'ouverture du PTPm dans les mitochondries isolées est nettement supérieure à la quantité de Ca^{2+} existante dans les conditions physiologiques voire physiopathologiques. Il est admis que

d'autres facteurs de régulation du PTPm jouent un rôle important de coordination avec le Ca^{2+} surtout pendant le phénomène d'ischémie-reperfusion cardiaque ^{73,77}.

- Les autres cations bivalents comme Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+}

Ces cations bivalents peuvent entrer en compétition avec l'ion Ca^{2+} au niveau de ses sites de fixation dans les deux compartiments cellulaires (cytoplasmique ou matriciel). Leur mécanisme d'action diminue la probabilité d'ouverture du PTPm, que ce soit en occupant le site externe (inhibiteur), ou en entrant en compétition avec le Ca^{2+} sur ses sites de fixation dans la matrice (activateur), ce qui revient également à inhiber la transition de perméabilité ⁷⁵.

- Le potentiel membranaire

Lors de l'ouverture du PTPm, le potentiel de la membrane interne mitochondriale s'effondre. Cependant, Bernardi et al. ^{75, 78} ont montré que la dépolarisation de la membrane mitochondriale peut aussi être la cause de l'ouverture du PTPm, à condition que l'acidification de la matrice et l'uniport du calcium soient inhibés. En effet, l'effondrement du gradient de protons induit l'acidification de la matrice et l'uniport transfère le calcium en sens inverse : de la matrice mitochondriale vers le cytosol. Ces deux événements sont en faveur d'un pore fermé ^{76,78}. Halestrap et al. ⁷⁹ proposent que l'ANT soit un senseur de voltage et que le potentiel membranaire de la mitochondrie règle l'état du PTPm par l'intermédiaire d'une modification de la conformation de l'ANT.

- Le pH matriciel

Le pH matriciel est également un élément de cette régulation. Il est classiquement admis que l'acidose diminue la probabilité d'ouverture du PTPm, alors que l'alcalose l'augmente ²³. Ainsi les ions H^+ matriciels exercent un effet inhibiteur du PTPm. Lors d'une surcharge calcique, l'entrée de calcium par l'uniport, provoque une diminution du $\Delta \psi_m$, et va accélérer la chaîne respiratoire et donc l'expulsion de H^+ afin de rétablir le $\Delta \psi_m$, rajoutant ainsi un second facteur de facilitation de l'ouverture du PTPm. L'effet protecteur de l'acidose a été confirmé

dans les cœurs qui ont subi une ischémie-reperfusion ⁸⁰. Ce phénomène pourrait être utilisé comme une stratégie thérapeutique pour les patients qui ont subi un infarctus aigu du myocarde.

- Le phosphate inorganique (Pi)

Le Pi a des effets dualistes sur la régulation du PTPm. Depuis longtemps il est considéré comme un puissant inducteur de la transition de perméabilité [8, 28, 64], même si son mécanisme est incomplètement connu. En effet, l'accumulation de Pi contribue à diminuer le pH matriciel vers 7,3 et devrait donc avoir un effet inhibiteur du PTPm. Son effet inducteur pourrait passer par la diminution de concentration de Mg^{2+} , qui diminue la possibilité de l'ouverture du PTPm ⁵⁶. Une autre possibilité est que le Pi dans la matrice facilite la formation du polyphosphate qui, à son tour, favorise la transition de perméabilité mitochondriale ⁸¹. Le travail de l'équipe de Bernardi ⁸² en 2008 a souligné un autre rôle du Pi sur la régulation du PTPm. Leur observation suggère que le Pi agit sur le PTPm en relation avec la CyP-D. En présence de la CsA ou en absence de la CyP-D (CyP-D^{-/-}), le Pi désensibilise le PTPm à la surcharge du calcium. Ces auteurs concluent que la CyP-D masque l'action inhibitrice intrinsèque du Pi en bloquant son site régulateur sur le PTPm.

- Le transporteur du phosphate mitochondrial

Un nouveau modèle de PTPm a été récemment proposé par l'équipe d'Halestrap ⁸³. Ils suggèrent que le transporteur du phosphate mitochondrial initialise la modification de conformation du PTPm induit par le calcium et déclenche l'ouverture du pore de transition. Ce phénomène est favorisé par la CyP-D et les ligands de l'ANT. Basso et al. ⁸² ont tenté de faire un lien entre le Pi et le transporteur du phosphate sur la régulation du PTPm. Ils concluent qu'il y a peu de probabilité pour que le transporteur soit impliqué dans les effets complexes du Pi car le Pi, l'arsenate (Asi) et le vanadate (Vi) sont tous transportés par le transporteur du phosphate, mais seul le Pi montre un comportement de l'inhibiteur du PTPm.

- Les nucléotides adényliques

Les nucléotides adényliques exercent un rôle inhibiteur de l'ouverture du PTPm (l'ADP du côté extra-mitochondrial et l'ATP du côté matriciel). Leur diminution, en particulier la chute de la production en ATP, augmente la probabilité d'ouverture du PTPm^{49, 50}.

- Le stress oxydant

Le stress oxydant intervient également comme un facilitateur puissant de la transition de perméabilité mitochondriale^{50, 55}. Le stress oxydant induit par divers pro-oxydants tels que le t-butyl-hydroperoxide (tBH), le diamide ou le phénylarsine oxide (PhAsO), rend le PTPm plus sensible à la surcharge calcique^{79, 84-86}. De plus, l'effet de ces oxydants sur la sensibilité du pore à la dépolarisation membranaire est inhibé par le N-éthylmaléimide (NEM), le dithiothréitol (DTT) ou le monobromobimane (MBM) qui réduisent ou alkylent les groupements thiols^{87, 88}. Bernardi et al. ont proposé l'existence d'au moins deux sites de régulation du PTPm par oxydation : un site S et un site P^{89, 90}. Le site S correspond au double groupement thiol, activé par l'AsO et le PhAsO et bloqué par le NEM^{89, 90}. Halestrap et al. ont montré que les espèces radicalaires de l'oxygène augmentaient la probabilité d'ouverture du PTP en affectant la liaison de la CyP-D à l'ANT⁷⁹ et suggéré que ce site S se situe sur l'ANT⁷⁹. Le site P est un autre site de régulation redox sensible mais dépend de l'état d'oxydo-réduction du pool de nucléotides pyridiniques (NAD(P)H/NAD(P)⁺). L'oxydation de ces nucléotides entraîne une augmentation de la sensibilité du pore aux variations de potentiel membranaire^{89, 90}. Les sites S et P fonctionnent de manière indépendante puisque l'oxydation du pool nucléotidique augmente toujours la probabilité d'ouverture du pore bien que le glutathion soit maintenu sous forme réduite ou que le site S soit inhibé par le MBM ; et inversement, l'oxydation du site S par le PhAsO conserve son effet inducteur sur le PTPm lorsque les nucléotides pyridiniques sont maintenus réduits^{89, 90}.

- Le complexe I de la chaîne respiratoire

L'équipe de Fontaine a mis en évidence l'importance du flux d'électrons à travers le complexe I dans la régulation du PTPm⁹¹⁻⁹⁴. Ces auteurs ont montré que dans le muscle squelettique de rat, il existe une probabilité d'ouverture du PTPm plus grande en présence de substrats du complexe I que lorsque le flux d'électrons provient exclusivement du complexe II⁹². En présence du substrat du complexe II, la roténone, un inhibiteur direct du complexe I, protège aussi les mitochondries de l'induction de la transition de perméabilité⁹². Dans le prolongement de ces résultats, sur un modèle de cellules tumorales leucémiques, où la mort cellulaire est directement la conséquence de l'ouverture du PTPm, les mêmes auteurs ont par la suite montré que la roténone pouvait exercer un effet encore plus puissant que la CsA pour inhiber l'ouverture du PTPm, renforçant ainsi leur première hypothèse⁹¹. Néanmoins, ce mode de régulation du pore par le flux d'électrons est plus facilement observable dans certains tissus. Ainsi, la roténone seule n'a aucun effet sur le PTPm de foie de rat alors que son effet est flagrant sur celui de muscle squelettique^{91, 92}. Une partie de notre travail est consacrée à la recherche du rôle du flux d'électrons à travers le complexe I dans la régulation du PTPm de cœur.

- Les ubiquinones

L'étude de la régulation du PTPm par le flux d'électrons à travers le complexe I a orienté l'équipe de Fontaine à la découverte d'une nouvelle classe de régulateurs : les ubiquinones. Leur première observation est qu'en bloquant le flux d'électrons à travers le complexe I, l'ubiquinone 0 inhibe l'ouverture du PTPm de muscle squelettique du rat⁹². Pour élucider le mode d'action de ces ubiquinones, les effets des analogues de la famille de l'ubiquinone sur le PTPm ont été ensuite examinés sur les mitochondries isolées de foie de rat^{93, 95}. Les ubiquinones sont classés dans 3 groupes selon leur effet sur le PTPm (Figure 5): le groupe I, constitué de l'Ub0, la dUb et l'Ub10, regroupe les ubiquinones qui ont une activité inhibitrice et qui augmentent donc la quantité de calcium nécessaire à l'ouverture du pore. A l'opposé, le

groupe II comprend les quinones qui ont un effet inducteur du pore et diminuent le calcium nécessaire à l'ouverture du PTP. Enfin, un troisième groupe est caractérisé par son inefficacité à modifier la probabilité d'ouverture du pore. Malgré le nombre d'analogues de l'ubiquinone testés sur mitochondries isolées de foie de rat, aucune relation entre la structure primaire et la régulation du PTPm n'a pu être mise en évidence. Les auteurs n'ont pas pu expliquer les différents rôles régulateurs de ces molécules sur le pore par la modification de la respiration mitochondriale ou par une variation du stress oxydant. De plus, l'ubiquinone 0 conserve son effet inhibiteur du pore chez les souris CyP-D déficientes⁵¹. Ceci démontre que l'action des ubiquinones est CyP-D indépendante. Le mécanisme et le site d'action des ubiquinones restent à ce jour inconnus.

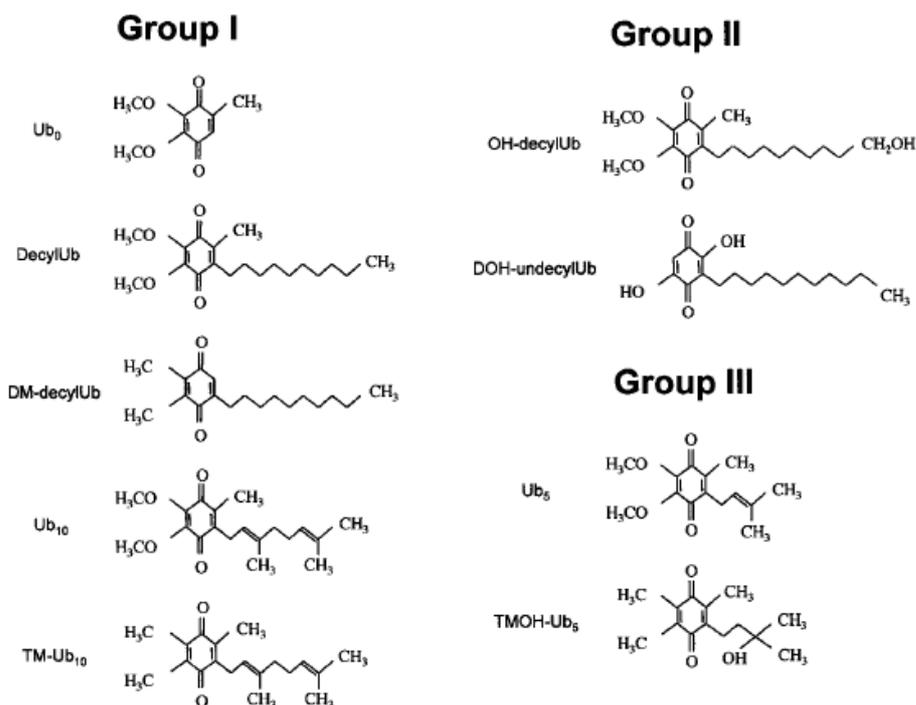


Figure 5. Structure chimique des analogues de l'ubiquinone testés dans les mitochondries isolées du foie de rat. Les groupes I, II et III correspondent respectivement aux inhibiteurs, inducteurs et analogues de l'ubiquinone sans effet direct sur le PTPm⁹⁵.

I-2-3. Rôle du PTPm dans la signalisation de la mort cellulaire

L'ouverture du PTPm est à l'origine de conséquences cellulaires délétères bien connues qui associent le gonflement matriciel, le découplage des phosphorylations oxydatives, l'efflux

massif de Ca^{2+} et l'effondrement du $\Delta \Psi_m$, autant d'anomalies qui vont conduire à la mort cellulaire ⁵⁵. Cette évolution se fera en fonction essentiellement des capacités métaboliques résiduelles de la cellule soit vers la nécrose, soit vers l'apoptose, avec très souvent cohabitation des deux types de lésions élémentaires au sein d'un même tissu ⁹⁶.

L'ouverture du PTPm au sein d'une population de mitochondries n'est certainement pas suffisante pour faire évoluer une cellule vers la mort. Cependant, il a été décrit des mécanismes d'amplification de ce signal de mort de proche en proche au sein de la population de mitochondries réalisant ainsi une véritable "vague" de signal de mort ⁹⁷. Lorsqu'une cellule emprunte une signalisation apoptotique, une étape clé est représentée par la libération des SIMP (Soluble Inter Membrane mitochondrial Proteins) dont font partie le cytochrome *c* et l'AIF (Apoptosis-Inducing Factor). La libération de ces protéines de l'espace inter-membranaire, de faibles poids moléculaires, pour la plupart pro-apoptotique, réalise un véritable point de non retour vers la mort cellulaire par apoptose, ces protéines activant alors les caspases effectrices à l'origine de la fragmentation de l'ADN.

La libération de cytochrome *c*, en plus de ses effets pro-apoptotiques, a également deux effets sur la chaîne respiratoire dont il est un composé essentiel. Sa libération est associée, d'une part, à une diminution globale de la respiration mitochondriale, et d'autre part, à une majoration du stress oxydant ⁹⁶. Deux théories, la voie directe et la voie indirecte, s'opposent pour expliquer le lien entre l'ouverture du PTPm et la libération des SIMP ^{96,98}.

(1) La voie directe. Les SIMP sortent de l'espace inter-membranaire par l'intermédiaire des partenaires multi-protéiques du PTPm. Le cytochrome *c* de poids moléculaire d'environ 12,6 kDa, ne peut franchir la membrane mitochondriale externe du fait de sa perméabilité physiologique (<5 kDa). La perméabilisation de la membrane externe ferait intervenir les protéines de la famille Bcl-2. En effet, lors d'un signal pro-apoptotique, les composés tels que Bax, habituellement localisé dans le cytosol, ou Bak, inséré dans la membrane externe,

pourraient induire des modifications conformationnelles à l'origine de la perméabilisation de la membrane externe. Il a été montré que Bax, activé par un stimulus apoptotique, peut se transloquer depuis le cytosol jusqu'à la membrane externe de la mitochondrie et former aussi des complexes oligomériques aux travers desquels les SIMP pourraient regagner le cytosol. En l'absence de signal pro-apoptotique, Bcl-2 localisé dans la membrane externe est capable d'inhiber l'activation de Bax. En dehors des canaux Bax/Bax, des canaux faisant intervenir VDAC voire l'ANT sont également suspectés pour être à l'origine de la perméabilisation de la membrane externe.

(2) La voie indirecte. Suite à la rupture de la membrane externe consécutive à l'ouverture du PTPm, le cytochrome *c* est libéré. La diffusion libre d'eau et de solutés à travers la membrane interne aboutit rapidement au gonflement caractéristique de la matrice, consécutif à la transition de perméabilité. Le déplissement de la membrane interne permet de garder une architecture de la membrane interne bien plus longtemps que celle de la membrane externe. Des ruptures parcellaires de la membrane externe, visibles en microscopie électronique, vont permettre aux SIMP d'être libérées.

Récemment, une étude réalisée avec les cellules CyP-D^{-/-} ont montré que celles-ci sont plus résistantes au stress oxydatif et à la surcharge calcique⁹⁹. Cependant, ces cellules restent très sensibles aux stimuli apoptotiques, bien qu'elles soient beaucoup plus résistantes face aux stimuli nécrotiques⁹⁹. Cette étude a conclu que la participation du PTPm pouvait être importante dans le développement de la nécrose mais pas nécessaire pour l'apoptose.

II. Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion cardiaque

Le myocarde est un organe qui requiert un apport énergétique important pour assurer sa fonction contractile. Ses réserves énergétiques étant faibles, il est dépendant des apports

sanguins. L'ischémie myocardique résulte d'un déséquilibre entre les apports et les besoins en oxygène et en nutriments du myocarde.

II-1. Facteurs déterminants de l'ischémie

Chez l'animal comme chez l'homme, plusieurs facteurs vont déterminer l'importance des lésions cellulaires et donc la taille de l'infarctus.

II-1-1. La taille de la zone à risque

La taille de la zone à risque, ou taille de l'aire myocardique qui risque de développer un infarctus (AR), également définie comme la zone de myocarde sous la dépendance de l'artère coronaire occluse, est un déterminant majeur de l'étendue des lésions. Plus la zone à risque est grande, plus l'infarctus risque d'être étendu ¹⁰⁰. Chez le chien, une zone à risque représentant moins de 20% de la masse ventriculaire gauche ne donne pas d'infarctus ¹⁰⁰.

II-1-2. La durée de l'occlusion coronaire

La durée de l'occlusion coronaire est également un déterminant majeur de la taille de l'infarctus. Dans le modèle de chien anesthésié, une ligature coronaire maintenue 15 minutes provoque une réduction importante du débit sanguin dans la zone de distribution de l'artère. Elle entraîne des modifications des paramètres métaboliques et fonctionnels, sans infarctus histologique. Si l'ischémie perdure, des lésions irréversibles apparaissent. Le sous-endocarde, qui est la région la plus sensible et reçoit le moins de perfusion collatérale, est le premier à souffrir. La nécrose s'étend progressivement de l'endocarde vers l'épicarde selon un phénomène dit de « wavefront » (Figure 6) ¹⁰¹.

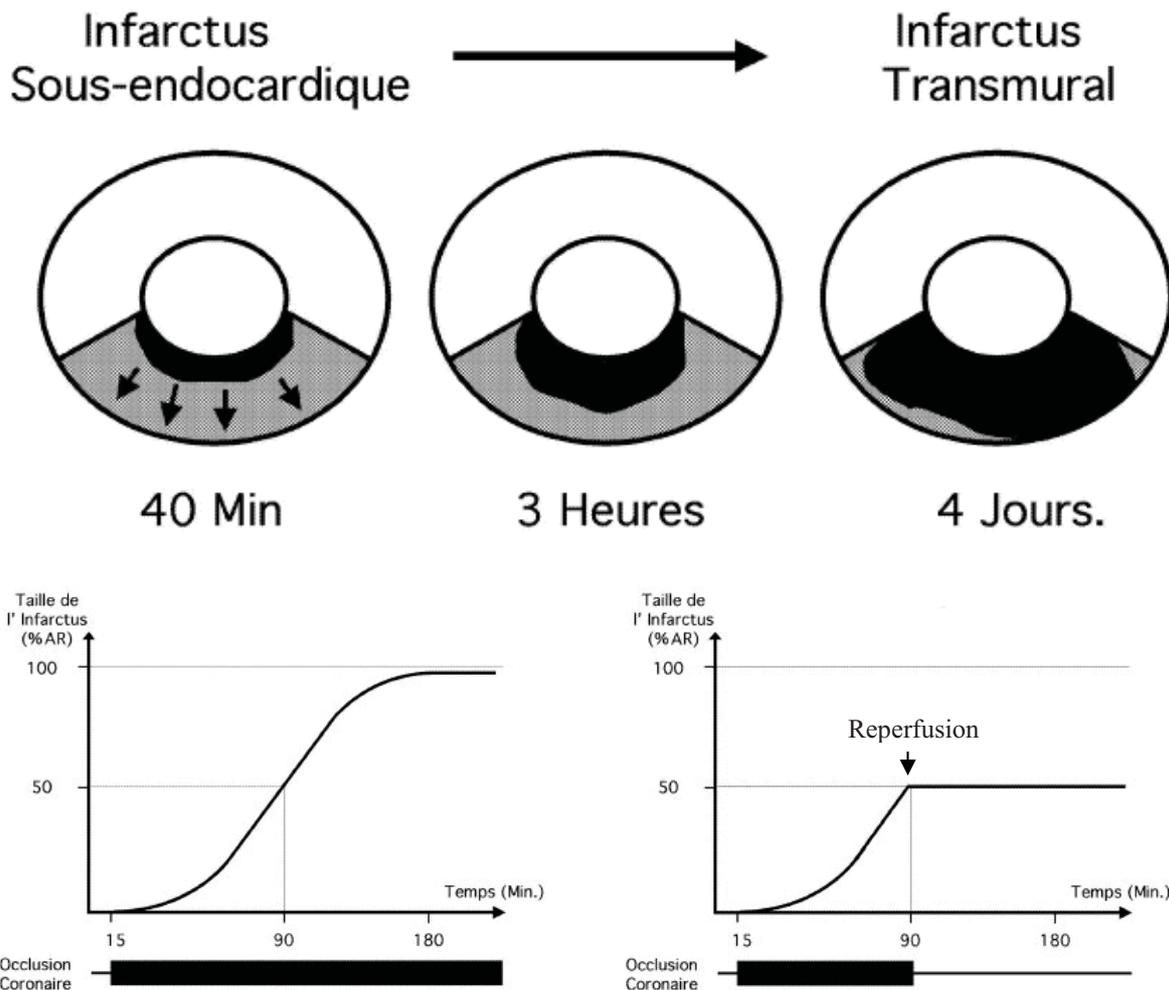


Figure 6. Facteurs influençant la taille de l'infarctus du myocarde in vivo chez le chien. L'extension de l'infarctus au sein de la zone à risque suit une onde de progression « wavefront phenomenon » depuis une lésion sous-endocardique jusqu'à une lésion transmurale. La durée de l'ischémie est un déterminant majeur. La reperfusion permet de sauver le myocarde des lésions ischémiques (d'après les travaux de l'équipe de Jennings 100-103).

II-1-3. La circulation collatérale

Le débit collatéral est un élément important capable d'influencer la taille de l'infarctus. Défini comme le débit sanguin qui persiste dans la zone myocardique ischémique après l'occlusion coronaire, ce paramètre est très variable d'une espèce à l'autre. Chez le chien, comme chez l'homme, les connexions artériolo-artériolaires épicaardiques aboutissent en moyenne à un débit collatéral de l'ordre de 20% du débit basal avec une importante variabilité inter-individuelle. Dans d'autres espèces animales comme le lapin, le porc, la circulation collatérale

est plus faible, ce qui provoque une évolution plus rapide vers la nécrose. La méthode de référence pour mesurer le débit collatéral est la méthode des microsphères radioactives, applicable en expérimentation animale. Le débit collatéral résiduel est inversement proportionnel à la taille de l'infarctus ¹⁰³.

II-1-4. La température

La température est aussi l'un des déterminants de la taille de l'infarctus. En effet, indépendamment de la fréquence cardiaque, il a été montré, en particulier dans le modèle classique d'infarctus du myocarde chez le lapin, que la taille de l'infarctus, normalisée par rapport à la taille de la zone à risque, est bien corrélée à la température centrale de l'animal ¹⁰⁴.

II-2. Reperfusion

La reperfusion coronaire est le moyen le plus puissant connu jusqu'à présent pour réduire la taille de la lésion ischémique, à condition d'intervenir suffisamment tôt. Compte tenu de la dynamique d'installation de la nécrose, qui suit une courbe sigmoïde, il existe une période de temps critique pour sauver les cardiomyocytes. Expérimentalement chez le chien, au-delà de la 3^{ème} heure d'ischémie coronaire, la reperfusion n'apporte que peu de bénéfice en termes de taille de la zone infarctée. Chez l'homme, au-delà de la 6^{ème} heure, le tissu myocardique à risque est reconnu comme définitivement perdu.

La reperfusion est néanmoins une arme à «double tranchant». En effet des lésions apparaissent spécifiquement lors de cette phase ^{103, 105}. La reperfusion s'accompagne d'une accélération du processus nécrotique commencé lors de l'ischémie. Dans un modèle de cœur de rat isolé-perfusé, la ré-oxygénation du myocarde s'accompagne de dommages cellulaires beaucoup plus importants que si l'ischémie avait été maintenue ¹⁰⁶. Les mécanismes sont probablement multiples et comportent notamment un largage massif de ROS, une surcharge

calcique intracellulaire, des altérations du métabolisme myocardique et une altération endothéliale. Il existe quatre formes de lésions de reperfusion : les arythmies, la sidération (*stunning*), les dommages vasculaires ou « no-reflow », enfin la nécrose de reperfusion.

II-3. Conséquences de l'ischémie-reperfusion

II-3-1. Sur le métabolisme énergétique du myocarde

Dans les conditions de normoxie, la source principale d'ATP provient de la bêta-oxydation des acides gras qui représentent jusqu'à 60% de la consommation d'oxygène du myocarde. Dans certaines conditions, telle qu'un apport important en glucides, l'utilisation du glucose augmente, moyennant une mobilisation des transporteurs GLUT-1 et GLUT-4 du glucose. Il existe en fait une compétition entre les différents substrats (acides gras, glucose et lactate) puisque l'oxydation des acides gras, produisant du citrate, bloque la glycolyse. Au final, en condition de normoxie, la glycolyse est inhibée par les taux élevés de citrate et d'ATP. Les substrats qui produisent de l'énergie uniquement par le métabolisme mitochondrial, tels que le lactate et les acides gras, sont donc préférés au glucose. Lors d'une ischémie modérée, l'oxydation du pyruvate et la bêta-oxydation des acides gras décroissent, tandis que la contribution de la glycolyse anaérobie dans la production d'ATP s'accroît. Cette levée de l'inhibition de l'utilisation du glucose provient de la stimulation de la phospho-fructo-kinase (PFK), enzyme clé de la glycolyse, qui est stimulée par la chute de l'ATP. Le glucose métabolisé pendant la glycolyse provient à la fois de la dégradation des réserves en glycogène du myocarde (glycogénolyse) et de la captation du glucose à partir du sang. L'ischémie entraîne une forte augmentation de la captation du glucose sanguin, ce qui reflète une meilleure capacité de transport du glucose à travers la membrane du sarcolemme. Ainsi, la baisse d'apport de glucose engendrée par l'ischémie est en partie compensée par une

meilleure conductance membranaire, du fait d'une multiplication du nombre de transporteurs GLUT-1 et GLUT-4. Dans ces conditions, la production de lactate augmente, ce qui entraîne une augmentation de la quantité de lactate intra-myocardique.

En cas d'ischémie sévère, l'oxydation du glucose et la bêta-oxydation des acides gras cessent. En effet, l'apport de glucose sanguin s'effondre du fait de la chute du débit coronaire. Le glycogène intracellulaire devient alors la source principale de production d'ATP. De même, l'oxydation du pyruvate cesse, ce qui aboutit à l'accumulation de 2 H^+ pour chaque molécule de pyruvate formé (découplage entre la glycolyse anaérobie et l'oxydation du pyruvate). De plus la baisse du débit sanguin empêche l'élimination des produits de la glycolyse anaérobie, le lactate et les protons s'accumulent et entraînent une acidose intracellulaire.

Lors de la reperfusion, le cœur est exposé à une augmentation du taux sanguin d'acides gras dont l'oxydation devient la source principale de production d'ATP, environ 80 à 90% des besoins énergétiques du myocarde ¹⁰⁷. L'utilisation préférentielle de ce substrat contribue à diminuer l'efficacité myocardique puisque la production d'ATP à partir des acides gras est plus coûteuse en oxygène qu'à partir du glucose (il faut environ 11% d'oxygène en plus pour produire la même quantité d'ATP). Si l'oxydation du glucose est stimulée durant la reperfusion, l'efficacité myocardique sera significativement accrue et aussi la fonction cardiaque améliorée ¹⁰⁷.

II-3-2. Altérations ioniques cellulaires

Dans les conditions de normoxie, les protons H^+ , les électrons et les molécules O_2 sont transformés en H_2O au niveau du complexe IV de la chaîne respiratoire. Le pH intracellulaire reste stable. Par contre, lorsque l'ATP est formée au cours de la glycolyse anaérobie, les ions H^+ produits ne sont plus consommés et seront en excès. L'organisme va alors s'employer à rétablir l'équilibre du pH intracellulaire au plus vite. Parmi les mécanismes de régulation du pH, la stimulation de l'échangeur sodium-proton (Na^+/H^+) joue un rôle très important au

moment de la reperfusion. Cet échangeur va contribuer de façon majeure à la sortie des ions H^+ de la cellule, mais au prix d'un flux entrant d'ions Na^+ . Cette accumulation d'ions Na^+ entraîne à son tour un ralentissement du fonctionnement de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} , voire même une inversion de l'échange, aboutissant à une entrée massive d'ions Ca^{2+} dans la cellule.

II-3-3. Conséquences physiologiques

Après une ischémie longue, au moins 4 types d'évènements directement liés à la reperfusion peuvent avoir des conséquences défavorables pour le myocarde ¹⁰⁸.

1- Les arythmies de reperfusion constatées dans nombreuses espèces animales étudiées, et dont le mécanisme exact reste inconnu. Il est probable qu'il soit en relation avec la surcharge calcique et les dommages membranaires provoqués par les ROS ¹⁰⁹.

2- Les dysfonctions endothéliales avec le phénomène de « no reflow » décrit pour la première fois par Kloner et al. en 1974 ¹¹⁰, et définit comme l'absence de rétablissement immédiat de la perfusion coronaire après reperfusion. Le mécanisme physiologique actuellement retenu est en relation avec un trouble de la vasomotricité artériolaire consécutif à une agression radicalaire.

3- La sidération myocardique ou « stunning ». En 1975, Heyndrickx et al ¹¹¹ observaient chez le chien que le myocarde soumis à un épisode d'ischémie de courte durée, présentait une diminution prolongée de sa fonction régionale persistant après la normalisation du flux coronaire et de la disparition des altérations électrocardiographiques. Suite aux travaux de Braunwald et Kloner, ce phénomène de récupération retardée du myocarde post-ischémique fut désigné par le terme de « stunning » ou sidération myocardique ¹¹². Il s'agit d'une anomalie de contraction transitoire du myocarde, s'appliquant à un tissu viable, avec absence de lésion cellulaire irréversible engendrée conjointement par deux mécanismes que sont la surcharge calcique induite par la reperfusion et la toxicité des ROS ¹¹³.

4- La nécrose de reperfusion. Elle serait aussi responsable de la survenue de la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose. L'existence de cette nécrose de reperfusion est aujourd'hui admise grâce à la possibilité de diminuer la taille d'infarctus du myocarde par des interventions ayant lieu uniquement à la reperfusion comme le postconditionnement ischémique ou l'utilisation d'une reperfusion contrôlée ¹¹⁴.

II-4. Induction de la mort cellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion

Jusqu'au début des années 1970, la mort cellulaire était synonyme de nécrose. Les travaux de Kerr, en 1972, ont révolutionné ce concept en individualisant une autre forme de mort cellulaire inscrite dans le programme génétique: l'apoptose ¹¹⁵. Les preuves de l'implication d'une mort cellulaire apoptotique aux côtés de la nécrose dans les phénomènes de lésions cellulaires due à l'ischémie-reperfusion myocardique se sont accumulées ¹¹⁶⁻¹²⁰.

II-4-1. Nécrose cardiomyocytaire

La nécrose myocardique est le mécanisme de mort cellulaire majoritaire au cours de l'infarctus du myocarde. Elle est directement liée à une privation d'apport en oxygène et en nutriments. Les conséquences ultrastructurales de la nécrose sont facilement visualisables ¹²¹. Des inclusions intra-mitochondriales cristallines (de calcium) s'accumulent. Les gonflements cellulaires et mitochondriaux sont constatés. La rupture des membranes cytoplasmiques, associée à celles des organites intracellulaires est précoce, responsable de la libération des enzymes comme les troponines I et T, la LDH et la créatine-kinase de type Mb. La morphologie nucléaire est toutefois conservée. Les dégâts causés à l'ADN nucléaire se font de manière aléatoire, sous l'action de nucléases et de protéases, qui dégradent les histones. La

nécrose s'accompagne, contrairement à l'apoptose, d'une forte réaction inflammatoire. Elle peut être facilement identifiée *in situ* sur des coupes de tissu grâce à des colorations histologiques standards ou par un marquage négatif des cellules nécrosées grâce au chlorure de triphényltétrazolium (TTC), qui colore en rouge brique les cellules viables, contenant les déshydrogénases et leur cofacteur le NAD(P)H¹²².

II-4-2. Apoptose cardiomyocytaire

La participation d'un processus apoptotique aux lésions cellulaires induites par l'ischémie-reperfusion est connue depuis une dizaine d'années¹¹⁶⁻¹¹⁸. Cependant sa cinétique d'apparition ainsi que les mécanismes de sa signalisation intracellulaire ne sont que partiellement élucidés.

II-4-2-1. Caractéristiques des cardiomyocytes apoptotiques

Les caractéristiques morphologiques des cardiomyocytes apoptotiques sont superposables à celles des autres types cellulaires^{115, 123}. Elles s'opposent à celles de la nécrose. Ce processus touche le plus souvent des cellules non contiguës, qui vont rapidement perdre leurs jonctions intercellulaires et subir une condensation/fragmentation cytoplasmique et nucléaire. La chromatine nucléaire apparaît condensée, à bords nets, alignée le long de la membrane nucléaire. Le cytoplasme ne change pas de volume et la membrane sarcoplasmique reste intègre, au sein de laquelle vont apparaître des invaginations ("blebs"). La morphologie et la fonctionnalité des organites intracellulaires sont conservées. Des invaginations marquées de la membrane nucléaire s'accompagnent d'une fragmentation du noyau. Par la suite, le cytoplasme se fragmente également donnant ainsi naissance à des corps apoptotiques constitués d'un fragment de membrane cytoplasmique entourant une partie du noyau et du cytoplasme, et excluant les colorants vitaux. L'élimination des cellules apoptotiques se fait grâce à une forme particulière de phagocytose, appelée "engloutissement", exercée par des macrophages myocardiques ou des cellules voisines viables, en l'absence de lyse cellulaire, de

libération enzymatique et de réaction inflammatoire ¹²⁴. Une des principales caractéristiques de l'apoptose est représentée par la fragmentation de l'ADN nucléaire. L'ADN, sous l'action d'endonucléases, va être scindée en mono ou oligonucléosomes dont la taille est un multiple de 180-200 paires de bases. L'analyse par électrophorèse montre un aspect caractéristique en "échelle" de l'ADN (DNA-ladder). La morphologie nucléosomale de l'ADN est ainsi préservée avec son fragment d'ADN entourant un octamère d'histone ¹²⁵. Cette fragmentation caractéristique de l'apoptose peut également être mise en évidence *in situ* de façon indirecte, par la technique TUNEL (TdT-Mediated dUTP Nick end-Labeling) ¹²⁶.

II-4-2-2. Cinétique de l'apoptose

Utilisant l'électrophorèse, Gottlieb et al. ¹¹⁷ ont montré sur un modèle de lapin *in vivo*, qu'un aspect de type "DNA-ladder", caractéristique de l'apoptose, n'était observé qu'après une reperfusion de longue durée (4 heures faisant suite à 30 min d'ischémie). De plus, Kajstura et al. ¹¹⁸ ainsi que Fliss et Gattinger ¹¹⁶ ont montré que l'apoptose pouvait être initiée, dans le myocarde ischémique de rat, soit après une ischémie prolongée (plusieurs heures), soit après une ischémie plus courte suivie d'une reperfusion. La possibilité d'induire l'apoptose par l'ischémie seule a également été rapportée par d'autres équipes ^{127, 128}. Plus tard Zhao et al. ¹²⁹ ont étudié l'apparition de l'apoptose dans le myocarde de chien soumis à 7 heures d'ischémie, comparativement à des animaux chez lesquels une ischémie de 1 heure était suivie de 6 heures de reperfusion. Ils ont ainsi montré que le nombre de cellules apoptotiques en zone ischémique était 100 fois plus important dans le groupe d'animaux reperfusés (évalué par la méthode TUNEL). Ces résultats par ailleurs ont été confirmés par l'analyse de l'ADN par électrophorèse. D'autres équipes rapportent également l'importance de la reperfusion dans l'induction de l'apoptose due à l'ischémie ¹³⁰. Etant donné le mécanisme actif et consommateur d'énergie de l'apoptose, il est probable que l'induction du phénomène d'apoptose se produise au cours de l'ischémie, mais que son expression ne soit possible qu'au

cours de la reperfusion; celle-ci restaurerait rapidement les taux d'ATP indispensables à la mise en jeu des voies de signalisation de l'apoptose ¹³¹.

Concernant la participation réelle de l'apoptose dans la taille de l'infarctus, Okamura et al. ¹³² ont montré que l'inhibition de plusieurs caspases peut avoir un effet dissocié sur la taille de l'infarctus et sur le nombre de cellules apoptotiques. En effet, chez le rat, cette inhibition diminue significativement le nombre de cellules marquées (TUNEL), sans diminuer la taille de l'infarctus. Zhao et al. ¹³³ ont montré dans un modèle canin que le nombre de cellules apoptotiques augmente progressivement jusqu'à 72 heures de reperfusion après l'ischémie, particulièrement dans le myocarde péri-nécrotique. Plus récemment, sur le même modèle animal, la même équipe, a utilisé un inhibiteur des endonucléases (acide aurintricarboxylique), capable de bloquer tardivement l'induction de l'apoptose et sans effet sur la nécrose. Ce produit, administré à la reperfusion, suite à 1 heure d'occlusion coronaire, est capable à la fois de limiter l'apoptose et de diminuer la taille de l'infarctus, ces deux paramètres étant évalués après 24 heures de reperfusion. Ceci suggère que l'apoptose intervient donc de façon significative dans la taille de l'infarctus ¹³⁴.

II-4-2-3. Signalisation de l'apoptose

L'apoptose est un phénomène relativement bien conservé au cours de la phylogénèse. La connaissance relativement récente de ces mécanismes repose en grande partie sur l'étude de modèles cellulaires éloignés de la physiologie myocardique tels que *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* ou des lignées cellulaires tumorales. Comparativement, peu de travaux ont été consacrés à la mécanistique de l'induction d'apoptose au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique. Quelque soit le modèle cellulaire étudié, une famille de protéines enzymatiques, les cystéines protéases ou caspases, capables de cliver un certain nombre de protéines structurales cytoplasmiques ou nucléaires, est au centre de ces mécanismes de la mort cellulaire ¹³⁵. L'administration d'inhibiteurs spécifiques d'une ou plusieurs de ces

protéases chez le rat, avant une séquence d'ischémie-reperfusion longue, diminue significativement l'apparition de l'apoptose dans les cardiomyocytes^{132, 136}. Dans les conditions physiologiques, ces enzymes sont présentes sous forme pro-caspases inactives, qui peuvent être activées cependant par d'autres protéases.

Le mécanisme d'apoptose est gouverné par deux voies principales d'activation :

- une voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor).
- une voie dite intrinsèque mettant particulièrement en jeu la mitochondrie. Cette voie est gouvernée par des protéines appartenant à la famille de Bcl-2.

Ces deux voies conduisent à l'activation des caspases, responsables des phénomènes morphologiques et biochimiques observés comme l'arrêt de la réplication, la fragmentation du noyau et du cytosquelette, l'apparition de la phosphatidylsérine à la surface de la membrane cellulaire, l'ensemble entraînant la formation de corps apoptotiques phagocytés par les cellules environnantes. Une voie impliquant le réticulum endoplasmique a récemment été mise en évidence dans les phénomènes d'apoptose^{96, 137}. D'après les auteurs, cette voie pourrait être initiée par un stress du réticulum endoplasmique lors d'une déplétion calcique ou lors de l'accumulation de protéines sous une forme dépliée, et serait responsable de l'activation de la caspase 12, elle-même capable d'activer la caspase 9.

Au cours de l'ischémie-reperfusion, le stress du réticulum endoplasmique entraîne l'apoptose des cardiomyocytes chez le rat^{138, 139}. Cependant, l'implication de cette voie d'activation de l'apoptose chez l'homme est à ce jour rendue incertaine par l'absence de preuve de l'existence d'un équivalent humain de la caspase 12⁹⁶.

III. Protection cardiaque

L'ischémie myocardique est la première cause de mortalité dans les pays industrialisés et restera certainement un enjeu de santé publique du fait de la persistance des facteurs de risque de la coronaropathie et du vieillissement de la population ^{140, 141}. Bien que la mise au point des techniques de revascularisation précoce du myocarde ait permis de réduire considérablement la morbi-mortalité post-infarctus depuis une vingtaine d'années, cette amélioration reste cependant toujours conditionnée par une réduction maximale et incompressible des délais de prise en charge des malades afin d'assurer une préservation optimale du myocarde contre sa nécrose. Une centaine d'interventions expérimentales, censées protéger le myocarde ischémique, ont été proposées depuis 30 ans, mais les résultats des essais cliniques sont plutôt décevants ¹⁴². Une grande avancée dans le domaine de la cardioprotection a eu lieu il y a 20 ans suite à la description de la capacité du myocarde à augmenter sa propre résistance à l'ischémie. Cette cardioprotection endogène a été dénommée « préconditionnement » ¹⁴³. Plus récemment, un corollaire du préconditionnement, dénommé « post-conditionnement », a été décrit ¹⁴⁴. En effet, des ischémies brèves réalisées lors de la reperfusion permettent en effet une réduction de la taille de l'infarctus. Les premiers essais cliniques de ces deux stratégies thérapeutiques semblent prometteurs.

III-1. Préconditionnement cardiaque

III-1-1. Généralités

Chez le chien, Reimer et al. ¹⁴⁵ ont montré en 1986 que 4 occlusions coronaires successives de 10 min n'entraînent aucune nécrose et/ou déplétion en ATP. Alors qu'une seule occlusion de 40 min s'accompagne à la fois d'une nécrose étendue et d'une déplétion sévère en ATP. Ce

concept a été élargi au sein de la même équipe par Murry et al. ¹⁴³ suite à une observation étonnante. En effet, ces auteurs ont montré avec 4 séquences de 5 min d'occlusion coronaire, séparées de périodes de reperfusion de 5 min réduisaient de façon considérable le dommage myocardique induit par 40 min d'occlusion coronaire sur le même modèle. Ce phénomène de tolérance endogène du myocarde à l'ischémie a été dénommé « preconditioning with ischemia », « préconditionnement ischémique (PC) ». Dans ce même travail, ils montrent en outre que ce protocole est inefficace si l'occlusion coronaire persiste 3 heures. Le PC myocardique n'empêche donc pas la mort cellulaire, il en retarde la survenue, d'où l'intérêt d'une reperfusion précoce.

Depuis ces travaux, près de 23 ans de recherches expérimentales ont été consacrés à la connaissance des déterminants et des mécanismes d'action du PC. A l'exclusion de la reperfusion, ce véritable « traitement préventif » de l'ischémie demeure à ce jour le plus puissant mécanisme capable de diminuer la taille de l'infarctus.

III-1-2. Protocoles expérimentaux d'induction du préconditionnement

La cardioprotection induite par le PC a été mise en évidence chez toutes les espèces animales étudiées au laboratoire : le chien ¹⁴³, le porc ¹⁴⁶, le lapin ¹⁴⁷, le rat ¹⁴⁸, la souris ¹⁴⁹, le poulet ¹⁵⁰ et le mouton ¹⁵¹. De même, un phénomène superposable au PC décrit dans le myocarde a été mis en évidence dans le muscle squelettique ¹⁵², le cerveau ¹⁵³, le foie ¹⁵⁴, l'intestin grêle ¹⁵⁵ et le poumon ¹⁵⁶.

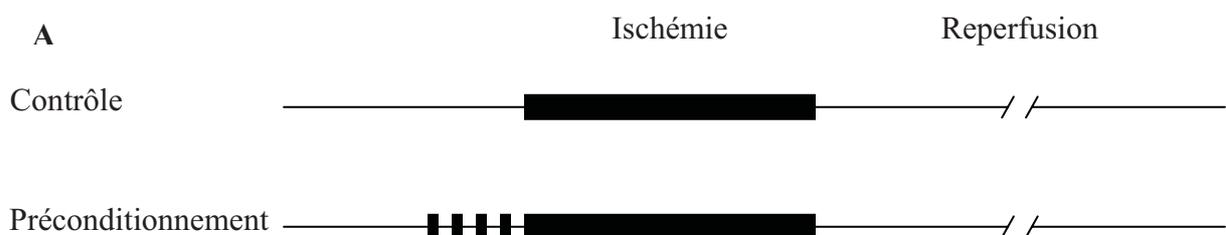
La phase d'induction du PC consiste en la succession d'un ou plusieurs épisodes brefs d'ischémie entrecoupés d'une reperfusion brève, à laquelle fait suite une ischémie prolongée suivie d'une reperfusion longue nécessaire pour créer l'infarctus, et révéler ainsi l'effet du PC. Dans la description princeps du phénomène, les auteurs ont utilisé 4 séquences inductrices du PC qui consistaient en 5 min d'ischémie suivie de 5 min de reperfusion chez le chien. Ils ont aussi observé l'effet bénéfique en terme de taille d'infarctus après 40 min d'occlusion

coronaire (Figure 7) ¹⁴³. Par la suite, différents protocoles ont été utilisés par exemple, une seule séquence d'ischémie-reperfusion suffit pour induire un effet protecteur ^{29, 147, 157, 158}. Néanmoins, de nombreuses équipes utilisent plusieurs séquences d'ischémie-reperfusion ^{143, 148, 159}.

Kuzuya et al., en 1993, ont montré que la protection induite par une séquence d'ischémie-reperfusion brève était bi-phasique ¹⁶⁰ : une première phase immédiate correspondant au PC conventionnel et une seconde phase, tardive, survenant après une période réfractaire d'environ 24 heures qui s'exprime également par une limitation de la taille de l'infarctus.

En pratique, après 6 heures entre l'épisode ischémique initial et l'occlusion coronaire prolongée, le PC est inefficace sur la taille de l'infarctus. Mais si on attend 24 heures pour réaliser une occlusion coronaire prolongée, on voit réapparaître un effet protecteur du PC sur la taille de l'infarctus. Marber et al., en 1993, ont appelé cette protection retardée "préconditionnement tardif ou seconde fenêtre de protection" ¹⁶¹.

Même si l'ischémie/reperfusion (régionale ou globale) demeure l'inducteur classique du PC, il n'en est pas moins vrai que d'autres interventions expérimentales tels que l'hypoxie ¹⁶², l'étirement myocardique ^{147, 163}, la tachycardie ¹⁶⁴, l'hyperthermie ¹⁶⁰, l'ischémie d'un autre territoire coronaire ¹⁶⁵ voire d'un autre organe (préconditionnement à distance) ¹⁶⁶, peuvent induire la même cardioprotection.



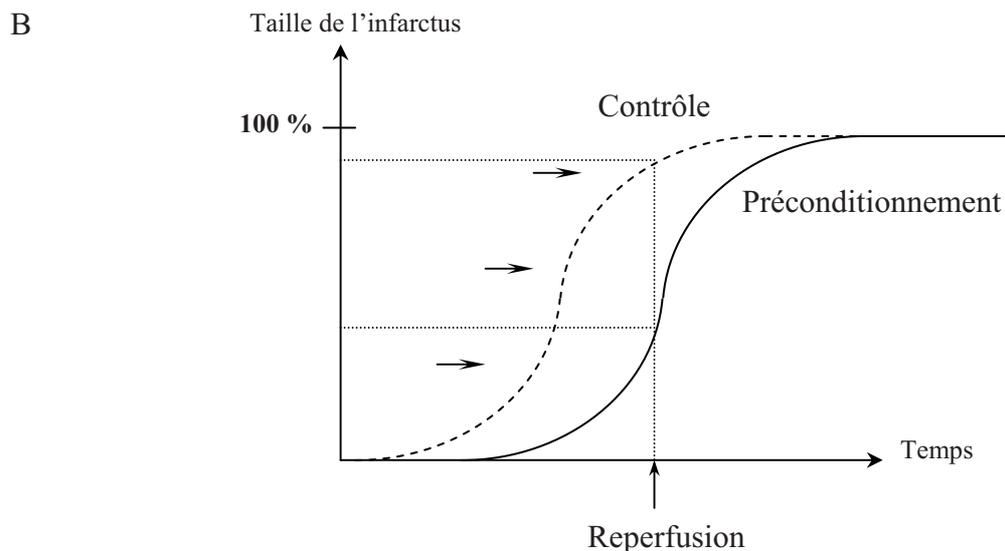


Figure 7. Le préconditionnement ischémique. (A) Le préconditionnement consiste en l'application de brèves séquences d'ischémie-reperfusion avant une occlusion coronaire prolongée suivie d'une reperfusion. (B) Il retarde la survenue de l'infarctus en décalant vers la droite la courbe de la cinétique d'apparition de la nécrose.

III-1-3. Les mécanismes du préconditionnement

Initialement, des évaluations du métabolisme énergétique ont été réalisées afin d'essayer de comprendre le mécanisme du PC ischémique. Murry et al.¹⁴³ ont observé à la fois une diminution de l'utilisation de l'ATP et un ralentissement de la glycolyse anaérobie entre la 5ème et la 15ème minute d'ischémie prolongée chez les chiens préconditionnés. Cette observation a été confirmée par Kida et al.¹⁶⁷, qui ont observé, par résonance magnétique nucléaire (RMN) chez le porc, une réduction de la dégradation de l'ATP mais aussi une limitation de l'accumulation de métabolites glycolytiques comme le lactate entre la 5ème et la 20ème minute d'ischémie prolongée. Ces auteurs concluent que la protection des cardiomyocytes au début de la période d'ischémie longue pourrait être due à une diminution de l'utilisation d'ATP et à une limitation de l'acidose intracellulaire.

De nombreuses études expérimentales pharmacologiques, ont été réalisées pour caractériser les voies de signalisation du PC ischémique. Le mécanisme d'action du PC précoce est

complexe et incomplètement élucidé à ce jour. Il est classiquement admis que des inducteurs, encore nommés « triggers », entraînent des modifications intracellulaires (médiateurs) avant d'aboutir à des cibles pharmacologiques (effecteurs) qui induisent la cardioprotection.

Inducteurs :

Des récepteurs de surface, couplés à une protéine G inhibitrice (Gi), sont impliqués dans l'initiation du signal. L'adénosine, produit de dégradation de l'ATP, libérée dans le milieu extracellulaire au cours de l'ischémie, se fixe sur les récepteurs membranaires A₁ de l'adénosine. Lui et al.¹⁶⁸, en inhibant l'effet du PC par un antagoniste des récepteurs A₁ chez le lapin, ont démontré le rôle joué par cette molécule. Ces résultats ont été confirmés chez le chien¹⁶⁹, mais pas chez le rat^{170, 171}. D'autres substances, telles que la bradykinine, la noradrénaline ou les opioïdes agissent aussi par activation de récepteurs de surface couplés à des protéines Gi¹⁷²⁻¹⁷⁴. Mais la transmission du signal protecteur peut être aussi indépendant des récepteurs comme lors de l'induction du PC par les ROS¹⁷⁵. Les pièges des ROS peuvent ainsi annuler l'effet du PC ischémique¹⁷⁶. Les ROS jouent un double rôle dans le PC ; ils peuvent induire le signal protecteur mais ils sont aussi responsables de lésions délétères lors de la reperfusion¹⁷⁷. Le PC agirait à ce niveau par une réduction du stress radicalaire durant la reperfusion.

Le Ca²⁺ peut également induire un PC chez le rat dans un modèle de Langendorff¹⁷⁸. Enfin le NO, bien que sa participation en tant que « trigger » du PC ischémique soit discutée, peut également intervenir par l'augmentation de guanosine 3,5-monophosphate cyclique (GMPc) puis activation de la protéine kinase G (PKG), pour aboutir à l'ouverture des canaux K_{ATP}¹⁷⁹⁻

¹⁸¹.

Médiateurs :

La stimulation des protéines Gi a plusieurs effets: elle provoque l'inhibition de l'influx calcique entrant durant l'ischémie, l'activation directe des canaux K_{ATP} et enfin, l'activation

des phospholipases C et D. L'activation des phospholipases stimule la production de diacylglycérol (DAG) qui active différentes isoformes de la protéine kinase C (PKC δ , ϵ , η) pour aboutir in fine à l'activation des canaux K_{ATP} ¹⁸². D'autres voies interfèrent avec ce mécanisme. En effet, l'activation de la PKC n'est pas indispensable pour déclencher le signal du préconditionnement^{183, 184}. D'autres kinases peuvent agir en parallèle de la PKC telle que les tyrosines kinases et les Mitogen-Activated Protein kinases (MAP-kinase : p38MAPK, JNK, ERK)¹⁸⁵.

La phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) est une autre kinase impliquée dans la cardioprotection. L'activation de PI3K permet la formation de phosphatidylinositol-triphosphate (PIP3) qui active, par phosphorylation, une protéine kinase de type B (Akt). Cette voie PI3K/Akt est essentielle dans les mécanismes de survie cellulaire. Tong et al.¹⁸⁶ ont montré que l'inhibition de la PI3K par la Wortmannine bloquait l'effet protecteur du PC. Enfin, la voie PI3K-Akt peut agir à plusieurs niveaux. Elle active la PKC, stimule la NO-synthase endothéliale (eNOS) et inhibe la caspase 9 et les protéines pro-apoptotiques BIM, BAX et BAD. Il existe un parallélisme d'action entre les voies PI3K/Akt et MEK/ERK parfois regroupées sous le terme de « RISK » (Reperfusion Injury Salvage Kinase)¹⁸⁷.

Effecteurs :

La dernière étape de la transduction du signal n'est pas encore identifiée précisément. Les deux candidats principaux à ce rôle sont les canaux K_{ATP} mitochondriaux et le PTPm.

Les canaux potassiques ATP dépendants (K_{ATP})

Un canal ionique est une protéine transmembranaire qui permet le passage d'ions hydrophiles, tels que les ions K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- à travers les membranes fortement hydrophobes. Lorsqu'il s'ouvre, un canal ionique crée dans la bicouche lipidique un espace hydrophile qui permet aux ions de diffuser. Les canaux K_{ATP} ont été décrits comme étant des canaux inhibés par des concentrations physiologiques d'ATP, et leur ouverture a pour conséquence un courant

potassique entrant polarisant. Ils ont été découverts il y a près de 20 ans au niveau de la membrane sarcolemmale des cardiomyocytes¹⁸⁸. Ces canaux sont des octamères, constitués au niveau myocardique de 4 sous-unités (pore) Kir6.2 (formant le canal rectifiant entrant) et de 4 sous-unités régulatrices qui sont des récepteurs aux sulfonyles (SUR2A). L'implication de ces canaux dans le PC ischémique a été initialement montrée par Gross et al.¹⁸⁹. Il existe depuis un large consensus autour de l'implication de ces canaux dans le mécanisme d'action du PC, avec de nombreuses démonstrations d'un effet de médiation du PC induit par l'ouverture de ces canaux, de même qu'une abolition par leurs inhibiteurs¹⁸⁹⁻¹⁹¹. L'hypothèse est que l'ouverture de ce canal induit une sortie de K^+ vers le milieu extracellulaire, qu'elle diminue le potentiel d'action et hyperpolarise la cellule. Ainsi, le Ca^{2+} intracellulaire diminue et le pool d'ATP est préservé.

L'existence de canaux K_{ATP} mitochondriaux (mK_{ATP}) a été soupçonnée en 1994, d'après les travaux de Yao et Gross¹⁹². Ils ont montré qu'une faible dose du bimakalim, un ouvreur du canal K_{ATP} , ne modifie pas le potentiel d'action et produit une cardioprotection aussi efficace qu'une double dose de celui-ci qui entraînait un raccourcissement du potentiel d'action. Ces auteurs ont suggéré qu'un autre site intracellulaire serait impliqué. Des canaux K_{ATP} ont été isolés pour la première fois sur la membrane interne mitochondriale de foie de rat par Inoue et al.¹⁹³. Garlid et al.¹⁹⁴ ont proposé alors que le PC ischémique agissait via l'ouverture de ces canaux mitochondriaux. Cependant, une controverse persiste quant au rôle de ces canaux dans le PC. Si la majorité des équipes s'accorde à considérer les canaux mK_{ATP} comme des éléments clés du PC, l'utilisation de souris invalidées des canaux K_{ATP} sarcolemmaux a montré que le PC n'a pas d'effet. Ainsi, Suzuki et al.¹⁹⁵ ont remis en évidence le rôle des canaux de surface dans ce processus protecteur.

Le mode d'action des canaux mK_{ATP} est encore hypothétique. Trois principaux concepts tentent d'expliquer leur fonctionnement.

- Une première hypothèse consiste à privilégier le rôle du volume matriciel^{196, 197}. Lors d'une ischémie, la baisse du potentiel de membrane mitochondrial entraîne une baisse de la pénétration intra-mitochondriale de K^+ et une baisse de l'entrée d'eau osmotiquement liée au K^+ . Il s'ensuit un déficit en eau de la matrice et une augmentation du volume de l'espace inter-membranaire. Or l'architecture de cet espace est primordiale pour le métabolisme énergétique du myocarde. Pour rétablir cette architecture, les canaux mK_{ATP} s'ouvrent et font entrer le K^+ et l'eau (osmotiquement liée) dans la matrice.

- Une seconde hypothèse est basée sur le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta \Psi_m$)^{198, 199}. L'ouverture de ces canaux, conduisant à une dépolarisation de la membrane interne mitochondriale, entraîne par voie de conséquence la diminution de la force motrice de captation du Ca^{2+} . Ceci pourrait donc atténuer l'accumulation de Ca^{2+} et prévenir l'ouverture du PTPm.

- La troisième hypothèse privilégie le rôle des ROS^{200, 201}. Il a été montré que le diazoxide est capable d'induire, tout comme le PC, un stress radicalaire transitoire sur les cardiomyocytes en culture. L'ouverture des canaux mK_{ATP} entraînerait une production radicalaire capable d'activer les voies des kinases. Cependant, l'existence des mK_{ATP} repose sur des arguments pharmacologiques et aucune étude immunocytochimique n'a établi leur présence.

Le pore de transition de perméabilité mitochondriale

Le PTPm joue un rôle important dans la mort cellulaire. Les influences du PC sur le PTPm ont été étudiées par plusieurs équipes, qui suggèrent que le PTPm pourrait être l'effecteur de la cardioprotection induite par le PC. Hausenloy et al.²⁰² ont aussi montré que le PC entraîne une limitation de l'étendue de l'infarctus identique à celle obtenue par le diazoxide ou la CsA. Le mécanisme supposé de l'effet du PC sur le PTPm est basé sur le fait que le diazoxide, qui

active les mK_{ATP} , diminue comme la CsA, l'ouverture du PTPm. Plus tard, Javadov et al.²⁰³ ont apporté la preuve que le PC *in situ* provoque une inhibition de l'ouverture du PTPm, qui peut être objectivée par la mesure de la captation de 3H -DOG par les mitochondries de cœurs préconditionnés. L'inhibition du PTPm obtenue par le PC est plus puissante que celle obtenue après un prétraitement des cœurs par la CsA ou la Sanglifehrine A. Cette observation a permis de conclure que l'effet protecteur du PC qui se manifeste à la reperfusion, est plutôt dû à une diminution des facteurs qui induisent la transition de perméabilité qu'à un effet inhibiteur direct des voies de signalisation du PC sur le PTPm. Dans notre laboratoire, Argaud et al.²⁹ ont pour la première fois montré que le PC, comme la CsA, inhibe l'ouverture du PTPm induite par la surcharge du Ca^{2+} et diminue la taille de l'infarctus du myocarde chez le lapin. Le rôle du PTPm est aussi impliqué dans le PC pharmacologique. Le PC tardif induit par l'action combinée de diéthylentriamine / NO (un donneur de NO) est aboli par l'ouverture du PTPm en présence de l'atractyloside²⁰⁴.

A côté de ce rôle d'effecteur possible du PTPm au cours du PC, Hausenloy et al. ont évoqué le fait que le PTPm peut également intervenir au moment de la phase d'induction du PC²⁰⁵. En effet, ces auteurs ont mis en évidence la possibilité d'une ouverture transitoire du PTPm au cours de cette phase qui participerait ainsi à la médiation du signal protecteur aux côtés des ROS.

III-2. Postconditionnement cardiaque

III-2-1. Généralités

Zhao et al.¹⁴⁴ ont eu l'idée de réaliser de brefs épisodes d'ischémie/reperfusion juste après l'ischémie prolongée, à l'initiation de la reperfusion. De façon très surprenante, ils ont montré que cette manœuvre permet une réduction de la taille d'infarctus comparable à celle du PC: ils

l'ont appelé «Postconditioning» ie «Postconditionnement». Le postconditionnement (PostC) a été reproduit par plusieurs laboratoires, sur les modèles *in vivo*^{27, 206-208} et *in vitro*²⁰⁹⁻²¹¹.

Comme le PC, on observe que le PostC peut agir à distance avec un effet cardioprotecteur équivalent voire plus important que le PostC classique²¹²⁻²¹⁵. Le PostC d'un rein de rat réduit la taille de l'infarctus myocardique après une occlusion de 30 minutes. Ce PostC inter-organe à distance serait dû à la libération d'adénosine par le rein induisant ainsi une activation des récepteurs de l'adénosine²¹⁴. Des études ont ensuite montré le PostC à distance chez le porc et le lapin en appliquant des ischémie brèves au moment de la reperfusion sur le membre inférieur ou sur une autre artère coronaire du cœur^{212, 213, 215, 216}.

En plus de la diminution de la taille d'infarctus, le PostC permet aussi de mieux conserver la fonction mécanique cardiaque²¹⁷⁻²¹⁹. Ainsi, des études ont montré un effet anti-apoptotique et anti-autophagique du PostC au niveau des cardiomyocytes²²⁰⁻²²². D'autres effets du PostC ont été aussi décrits, en particulier son effet anti-arythmique²²³⁻²²⁶.

III-2-2. Les limites du postconditionnement ischémique

Contrairement au PC cardiaque qui paraît être un phénomène universel chez tous les espèces testés jusqu'à maintenant, le bon fonctionnement du PostC dépend non seulement du nombre et de la durée de séquences brèves d'ischémie reperfusion (I/R) juste après l'ischémie, mais aussi de la température²²⁷, du sexe et de la durée de l'ischémie prolongée¹³, de l'espèce^{144, 228}, des pathologies associées^{229, 230} et des modèles d'expérimentation *in vivo* ou *in vitro*^{228, 231}. Cependant il convient de signaler que certaines équipes n'ont pas réussi à démontrer l'effet du PostC sur la diminution de la taille d'infarctus dans certains modèles d'expérimentation^{211, 232}, ou avec une efficacité beaucoup moins importante que le PC²³³.

Kin et al., 2004²⁰⁶ ont montré chez le rat *in vivo* que le PostC du cœur était aussi efficace avec 3 cycles d'I/R de 10 s qu'avec 6 cycles du 10 s. Ces observations ont été contredites par la même équipe qui montre que 3 cycles d'I/R de 10 secondes n'ont pas d'effet protecteur

chez la souris contrairement à 6 cycles²³⁴. De même, Yang et al. en 2004²⁰⁸ ont montré chez le lapin que 4 cycles d'I/R de 30 s protégeraient moins bien le cœur que 6 cycles de 10 s d'IR. Cependant, Hale et al.²³² n'ont pas réussi à protéger le cœur chez le lapin avec un PostC de 4 cycles de I/R de 30 ou 60 s. Schwartz et al.²³⁵ n'ont obtenu aucun effet cardioprotecteur en réalisant 3 cycles d'IR de 30 s chez le porc. Signalons que Iliodromitis et al.²³⁶ ont montré qu'il fallait prolonger le nombre de cycles d'I/R de 30 s jusqu'à 8 pour réussir à protéger le cœur du porc. Toutes ces observations suggèrent qu'il existe un algorithme optimal différent de PostC selon l'espèce étudiée. Il semble que les cœurs de gros animaux exigent des stimuli plus importants pour être protégé par le PostC.

Plusieurs facteurs influencent la réussite du PostC. Ainsi, les travaux de Piper et al.²³⁷ ont montré que la première minute de la reperfusion constituait une phase critique pour la survie des cardiomyocytes. De même, Kin et al.²⁰⁶ ont démontré qu'une minute après la reperfusion, le PostC n'avait plus d'effet chez le rat *in vivo*. Cette même équipe a confirmé ces résultats et a proposé un mécanisme mettant en jeu l'adénosine endogène qui serait responsable de l'effet du PostC²³⁴. Les résultats obtenus par Argaud et al. confirment la nécessité de réalisation du PostC une minute après la reperfusion chez le lapin²⁷. Il faut noter chez cet espèce, Yang et al.,²³⁸ ont montré que 10 min après la reperfusion, le PostC ne s'exprimait plus.

Par ailleurs, dans un modèle de cœur isolé de rat, Van Vuuren et al.²²⁷ ont observé que la réduction de taille d'infarctus par le PostC est dépendante de la température. Une baisse de la température de 0,5°C abolit l'effet protecteur du PostC obtenu à 37°C pendant ischémie et reperfusion. De même, sur ce même modèle, Penna et al.¹³ ont montré que le PostC a un effet plus important chez la femelle que chez le mâle tant sur la diminution de la taille d'infarctus que sur la préservation de la fonction mécanique du cœur. En fait, le rat reste un animal discutable pour la réponse au PostC. Tandis que des études montrent l'efficacité du PostC ischémique chez le rat *in vivo*^{206,239} et *in vitro*^{210,239-243}, d'autres n'ont pas réussi à réduire

la taille d'infarctus avec des protocoles similaires^{228, 231}. Des agents pharmacologiques connus pour leurs effets cardioprotecteurs sur le PC ont perdu leur efficacité^{211, 233} en postconditionnant le cœur du rat. Dans le même sens, Kin et al.²⁰⁶ ont démontré que l'effet cardioprotecteur de PostC était moins robuste chez le rat comparativement à celui obtenu chez le chien¹⁴⁴. Ce phénomène a été attribué au système antioxydant connu pour être moins développé chez le rat que chez les autres espèces animales.

III-2-3. Les mécanismes du postconditionnement ischémique

Les investigations pharmacologiques intensives sur la voie de signalisation du PostC cardiaque nous ont permis d'identifier les cibles essentielles dans la cardioprotection après l'ischémie-reperfusion. Plusieurs agents pharmacologiques qui diminuent la taille d'infarctus par leur administration au début de reperfusion ont été proposés^{27, 80, 207, 244-246}. Certains d'entre eux ont comme cible la voie de RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase), d'autres impliquent l'inhibition du PTPm.

La connaissance des modes d'action du PC nous éclaire largement sur le mécanisme d'action du PostC. Les premiers résultats publiés ont montré que le pré ou le postconditionnement semblent emprunter des voies de signalisations communes (Figure 8)²⁴⁷. C'est probablement la raison pour laquelle on n'observe pas un effet additionnel quand le pré et PostC sont testés sur le même animal avant et après l'ischémie²⁰⁶. Cependant, le fait que le pré- et le PostC partagent des voies de signalisations communes ne signifie pas que les mécanismes d'action de ces deux méthodes de cardioprotection soient totalement identiques. Schwanke et al.^{248, 249} ont montré que le préconditionnement perd son effet protecteur chez les souris déficientes sur connexine 43 tandis que le postconditionnement ischémique peut diminuer la taille d'infarctus chez ces mêmes souris comme chez le WT²⁵⁰.

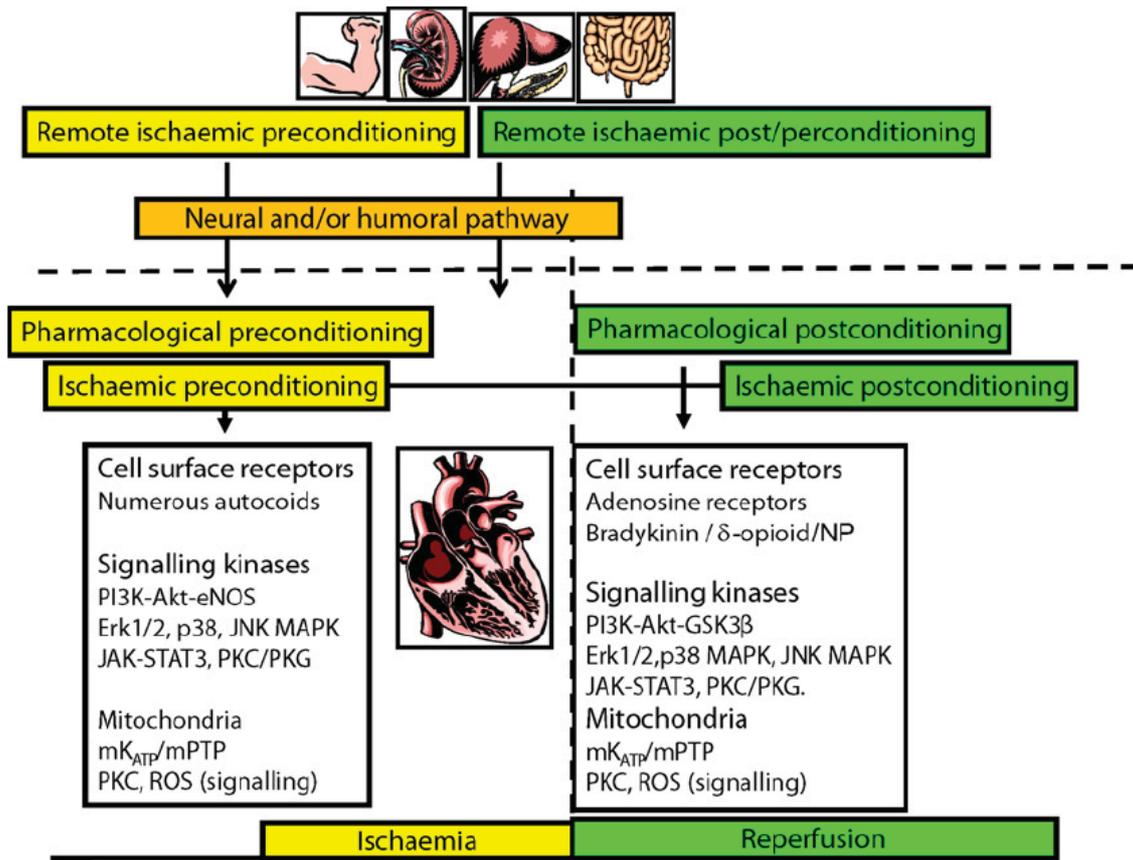


Figure 8. Vue générale de la voie de signalisation du préconditionnement et du postconditionnement cardiaque. Le préconditionnement ischémique et le préconditionnement à distance recrutent les voies de signalisation comprenant des récepteurs de surface cellulaires de nombreuses substances (l'adénosine, la bradykinine et l'opioïde), des kinases de signalisation (PI3K-Akt-eNOS, ERK1/2, p38, JNK MAPK, JAK-STAT3, PKC et PKG), des composants mitochondriaux (mK_{ATP} et PTPm), la PKC, les ROS avant l'ischémie cardiaque. Le postconditionnement ischémique et le postconditionnement à distance empruntent les voies de signalisation similaire à celles du préconditionnement au début de la reperfusion cardiaque. Les voies neurale et hormonale sont impliquées dans le pré- et le postconditionnement à distance. Les agents pharmacologiques ciblés sur les composants des voies de la signalisation peuvent être employés avant l'ischémie (préconditionnement pharmacologique) ou au début de la reperfusion (postconditionnement pharmacologique)

247

Comme pour le PC, les agents pharmacologiques sont classés en trois groupes selon leurs fonctions dans les voies de signalisation du PostC ischémique : « inducteurs », « médiateurs » et « effecteurs ».

Inducteurs :

Des récepteurs de surface cellulaire, couplés à une protéine G inhibitrice sont impliqués dans l'initiation du signal du PostC.

Les récepteurs de l'adénosine jouent leurs rôles essentiels dans le PostC. Des antagonistes de récepteur de l'adénosine bloquent l'effet protecteur du postconditionnement^{208, 234, 251}. Quand le NECA (N-ethylcarboxamido adénosine), un agoniste du récepteur de l'adénosine A_{2B}, est administré 5 minutes avant la reperfusion, l'effet de postconditionnement est imité dans un modèle de cœur isolé de lapin²⁵¹. Chez les souris KO au récepteur de l'adénosine A_{2A} ou A₁, le bénéfice du postconditionnement est perdu^{252, 253}.

Il a été démontré que le récepteur de la bradykinine B₂ joue un rôle important dans le processus de postconditionnement cardiaque. Une injection intermittente de bradykinine au début de la reperfusion imite l'effet du postconditionnement ischémique dans un modèle de cœur isolé du rat, et les antagonistes du récepteur B₂ (HOE140 ou WIN64338) suppriment cet effet protecteur²⁵⁴. De plus, les souris déficientes au B₂ ne peuvent pas être protégées contre l'ischémie-reperfusion par le postconditionnement ischémique²⁵³. Comme dans le cas du préconditionnement et du remodelage cardiaque²⁵⁵⁻²⁵⁷, les fonctions du récepteur de la bradykinine B₁ au cours du postconditionnement reste ambiguës. Une étude faite chez les souris B₁^{-/-} a montré que le postconditionnement diminue la taille de l'infarctus d'une façon très marginale²⁵³.

Des études ont aussi démontré que le récepteur opioïde participe à la signalisation du postconditionnement^{220, 239, 258}, ce qui renforce la théorie proposée par Gross et al.²⁵⁹ indiquant que l'activation pharmacologique du récepteur opioïde au début de la reperfusion protège le cœur.

Médiateurs :

« Reperfusion injury salvage kinase » (RISK)

Comme dans le mécanisme du PC, l'équipe de Yellon ¹⁸⁷ propose que le PostC exécute ses effets cardioprotecteurs au moment de la reperfusion en activant la voie RISK. Tsang et al. ²¹⁰ ont démontré que dans le cœur de rat, le PostC active les voies PI3K, Akt, eNOS et p70 Ribosomal S6 kinase (p70S6K). Il a aussi été démontré que le postconditionnement ne peut plus diminuer la taille de l'infarctus si l'inhibiteur de PI3K est administré au début de la reperfusion ²⁰⁸⁻²¹⁰. Cependant, Darling et al. ont constaté que l'inhibiteur de PI3K ne modifie pas l'effet du postconditionnement sur un modèle de cœur isolé de lapin ²⁶⁰. Schwartz et Lagranha ont montré que le postconditionnement provoque l'activation de Akt et ERK, mais ne réduit pas la taille de l'infarctus chez le porc ²³⁵.

PKC

Zatta et al. ²⁶¹ ont montré que lorsque la PKC- ϵ est inhibée, le postconditionnement ne peut plus limiter la taille de l'infarctus. Philippe et al. ²⁵¹ ont montré que la chélérythrine, un inhibiteur de PKC, abolit l'effet du postconditionnement sur la réduction de la taille de l'infarctus et que le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), un activateur de PKC, protège le cœur quand il est administré 5 minutes avant la reperfusion. Dans cette étude, la protection apportée par PMA est éliminée par le MRS 1754 ou la Wortmannine, des inhibiteurs de PI3K, ce qui montre que l'action de la PKC pendant la reperfusion est liée à l'activation de la voie PI3K.

MAP kinase

Yang et al. ²³⁸ ont démontré que l'infusion de PD98059, un inhibiteur de ERK, 5 minutes avant la reperfusion abolit l'effet protecteur du postconditionnement. Le postconditionnement active la phosphorylation de ERK qui est inhibée par le PD98059 ²⁶⁰. Le postconditionnement limite également l'apoptose des cardiomyocytes après hypoxie-réoxygénation et diminue l'activation de JNK et de p38MAP kinase ²⁶². Quand JNK et p38MAP kinase sont activées par l'anisomycine, le postconditionnement perd son effet vis-à-vis de l'apoptose ²⁶².

NO et GMPc/PKG

La PKG et le NO sont aussi impliqués dans le postconditionnement cardiaque. Parmi les facteurs autocrines produits par le cœur ischémique, la bradykinine induit la production de NO. Pendant le PostC, la voie PI3K/Akt active la phosphorylation de eNOS, qui augmente ainsi la production de NO^{187, 263}. Il a été démontré que le NO protège le cœur en activant la guanylate cyclase (GC)²⁶⁴. Quand un inhibiteur des NOS ou de la GC est administré 5 minutes avant la reperfusion, l'effet protecteur du postconditionnement est atténué^{208, 238}. Un autre effet du NO serait d'ouvrir directement les canaux mK_{ATP} ²⁶⁵. L'effet protecteur du NO peut aussi passer par sa modulation sur la respiration mitochondriale, qui favorise ensuite la signalisation transmise par les ROS²⁶⁶.

L'activation de la GC par le NO stimule la production de GMPc qui, à son tour, active la PKG et facilite la transduction de signal²⁶⁷⁻²⁶⁹. L'injection de 8-bromoguanosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate (Rp-8-Br-PET-cGMPS), un inhibiteur de PKG, abolie l'effet de PostC dans un modèle de cœur isolé de rat²⁵⁴.

mK_{ATP}

Des études ont montré que le mK_{ATP} joue un rôle important dans le PostC. Dans ces études, deux différents inhibiteurs des mK_{ATP} abolissent l'effet du PostC^{238, 270}. Penna et al.²⁷⁰ ont proposé que l'état des mK_{ATP} régule la production de ROS et l'activation de PKC, qui sont impliquées dans la transduction du signal induite par le PostC.

Effecteurs :

L'état du PTPm est un facteur fondamental qui oriente le destin des cellules entre la vie et la mort à l'issue de l'ischémie-reperfusion. Argaud et al.²⁷ ont montré que le PostC inhibe

l'ouverture du PTPm dans les mitochondries cardiaques isolées de la zone à risque. Bopassa et al.²⁰⁹ ont montré que l'inhibition de l'ouverture du PTPm due au PostC est liée à l'activation de la voie PI3K-Akt. Chez les souris CyP-D déficiente, la taille de l'infarctus est plus petite que celle des WT. Cette protection n'est pas additive avec le PostC chez ces souris CyP-D déficientes²⁷¹. Ces résultats suggèrent un rôle crucial de l'inhibition du PTPm dans le postconditionnement.

III-3. Application du pré et du postconditionnement chez l'homme

L'exécution de différentes stratégies de « conditionnement » cardiaque à la thérapie médicale dépend de la situation clinique. Quand l'épisode d'ischémie cardiaque aiguë peut être anticipé (dans le cas de processus chirurgical programmé ou d'intervention coronaire percutanée) on peut programmer une préparation du myocarde de type préconditionnement. Au contraire, chez les patients qui présentent un infarctus du myocarde aigu ou un arrêt cardiaque, l'intervention de conditionnement ne peut être appliquée qu'à la reperfusion : le postconditionnement est alors le seul choix dans ce cas-là.

III-3-1. Application du préconditionnement chez l'homme

La première application du PC en clinique est une étude faite en 1993²⁷², qui a montré que le clampage aortique avant le geste de pontage coronaire en urgence préserve l'ATP myocardique des patients et est capable de baisser le taux sanguin de la troponine²⁷³. Cependant, la nature invasive du protocole de PC ischémique chirurgical et le risque thromboembolique lié au clampage et au déclampage de l'aorte limitent son application en clinique. Les PC pharmacologique ou à distance sont, quant à eux, des interventions simples et efficaces qui induisent une protection systématique contre l'ischémie éventuelle.

L'efficacité du PC pharmacologique a été mise en évidence sur des modèles animaux par administration d'adénosine, de bradykinine, d'opioïde, d'anesthésiques gazeux montrant aussi leurs intérêts chez l'homme. Les résultats de deux méta-analyses ont montré le bénéfice de l'anesthésie gazeuse au cours de la chirurgie cardiaque chez l'homme^{274,275}. Le PC à distance a aussi montré son effet cardioprotecteur chez l'homme qui subit une intervention chirurgicale d'angioplastie coronaire²⁷⁶⁻²⁷⁹.

III-3-2. Application du postconditionnement chez l'homme

Chez les patients qui présentent un infarctus du myocarde aigu, toutes les stratégies exigent une intervention qui peut être appliquée après la survenue de l'ischémie cardiaque ou au début de la reperfusion. Le PostC ischémique permet aux cliniciens d'intervenir au moment de la reperfusion chez les patients qui bénéficient d'une angioplastie coronaire. Les premiers résultats des essais cliniques ont été décrits 2 ans après la découverte du PostC cardiaque par Zhao et al.¹⁴⁴. L'étude pilote par Laskey dans l'équipe de Michel Ovize²⁸⁰ a pu montrer l'efficacité du PostC chez les sujets coronariens. Cette étude a démontré une nette diminution des CPK (36%) chez les sujets ayant reçu un PostC au cours d'une angioplastie par ballonnet. Par ailleurs, la même équipe a observé une diminution de la taille de l'infarctus de 39,5% chez les patients, 6 mois après le PostC réalisé au cours d'une angioplastie suite à un infarctus aigu. Une amélioration de la fraction d'éjection du ventricule gauche est également observée à 1 an⁵². Chez les patients qui n'ont pas la possibilité d'avoir une intervention coronaire percutanée, le PostC pharmacologique est envisageable. Plusieurs essais cliniques ont montré l'effet cardioprotecteur de l'adénosine²²⁵, du « glucagon-like peptide-1 » (GLP-1)²⁸¹, du peptide natriuretic atrial²⁸², qui sont des activateurs de la voie RISK, et l'effet de la CsA²⁸³,²⁸⁴, qui est un puissant inhibiteur du PTPm.

BUT DU TRAVAIL DE RECHERCHE

Nous avons vu que l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale bascule le destin de la cellule de la vie vers la mort. La recherche sur les facteurs de régulation du PTPm nous permettront de mieux comprendre ce phénomène et, à long terme, de développer des agents pharmacologiques pour protéger le tissu ou l'organe face aux différents challenges. Le travail de l'équipe de Fontaine a récemment proposé le complexe I de la chaîne respiratoire comme un facteur régulateur important du PTPm^{91-93, 95, 285}. Cependant, leurs travaux ont aussi démontré que les effets des inhibiteurs du complexe I sur le PTPm peuvent varier selon les espèces, les organes ou les cellules testées. Néanmoins, ce phénomène n'a jamais été examiné dans les mitochondries cardiaques.

L'objectif de ce travail a été, dans un premier temps, d'étudier la régulation du PTPm par deux analogues de l'ubiquinone, CoQ₂ et CoQ₁₀, et par le flux d'électrons à travers le complexe I de la chaîne respiratoire dans les mitochondries isolées cardiaques. Nous avons également étudié l'effet du postconditionnement pharmacologique par le périndoprilate, un inhibiteur de l'enzyme de conversion, et précisé le rôle du pore de la transition de perméabilité dans ce processus.

MATERIELS ET METHODES

I. Animaux

Des lapins mâles New-Zealand-White (2,2 et 2,5 kg), des rats mâles Wistar (350-450g) et des souris C57BL/6 ou déficientes pour la gène de la Cyclophylène D (CyP-D^{-/-}, mutations décrite par Schinzel en 2005²⁸⁶) (25-30g) ont été utilisés dans nos études. Les expérimentations ont été réalisées en conformité avec les textes réglementaires français (décret n° 2001-464 du 29 mai 2001, et décret n° 2001-486 du 6 juin 2001) et les recommandations de l'INSERM de Septembre 2002 relatifs à l'expérimentation animale, ainsi qu'en accord avec «the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» publié par le «US National Institute of Health» (NIH Publication No.85-23, révisé en 1996).

II. Réactifs

La CsA et son analogue la NIM811 ont été gracieusement fournis par les laboratoires Novartis. Le périndoprilate a été fourni par les laboratoires Servier. Le Calcium Green®-5N, et l'Amplex Red® ont été fournis par Molecular Probes, Inc. (Cergy Pontoise, France). Sauf mention particulière, tous les autres réactifs ont été fournis par Sigma Aldrich (France).

III. Etudes sur les cœurs isolés de rats

III-1. Protocole chirurgical

Les rats sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (50 mg/kg). Ils sont ensuite disposés en décubitus dorsal. Après isolement de la veine fémorale, l'héparine est administrée par la voie intraveineuse (200 UI/Kg). Une incision abdominale puis thoracique est réalisée. Le cœur isolé de son péricarde est excisé et arrêté dans une

solution de Krebs Henseleit (KH) à 4°C (mM : glucose 11.0, NaCl 118.5, KCl 4.75, MgSO₄ 1.19, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 24.0, CaCl₂ 1.4).

III-2. Modèle *in vitro* « cœur isolé-Langendorff »

Le cœur du rat est fixé sur une canule par son aorte et perfusé à pression constante (73mmHg) avec la solution de KH à 37°C. La température est mesurée grâce à une sonde thermique insérée dans l'atrium droit. La pression de perfusion est maintenue à l'aide d'une pompe péristaltique (Minimuls® ADInstruments, UK). La solution de KH est barbotée avec 97% O₂ / 3% CO₂ pour maintenir le pH 7,4 à 37°C. Un ballonnet de pression est installé dans le ventricule gauche et relié à un capteur de pression préalablement étalonné. La pression ventriculaire gauche et l'électrocardiogramme sont enregistrés en continu à l'aide d'un système de capteur relié à un ordinateur (Chart V5, Powerlab / 4SP, ADInstruments, UK) (Figure 9). Le ballonnet est gonflé pour obtenir une pression télé diastolique de 4-10 mmHg environ.

Après une période de perfusion basale de 15 min, le cœur est soumis à une ischémie globale de 40 minutes. L'ischémie globale est réalisée par l'arrêt de la perfusion. Durant cette période, le cœur est immergé dans le tampon KH pendant l'ischémie et la température est maintenue à 37°C. En cas d'ischémie régionale, un fil de soie tressé 3/0 est placé autour du tronc gauche de l'artère coronaire. Les deux extrémités du fil sont introduites dans un manchon en silicone permettant d'occlure et de reperfuser l'artère coronaire.

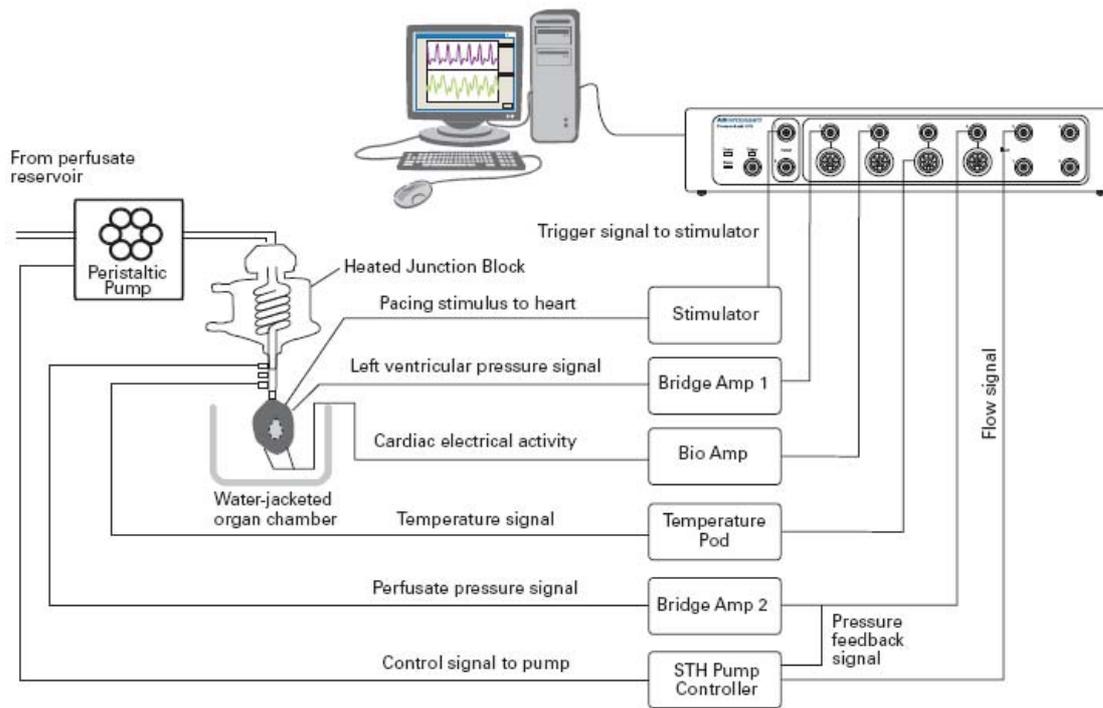


Figure 9. Dispositif du système de perfusion de cœur isolé du rat en mode Langendorff et de son système d'enregistrement (voir le texte pour les détails).

III-3. Protocoles expérimentaux

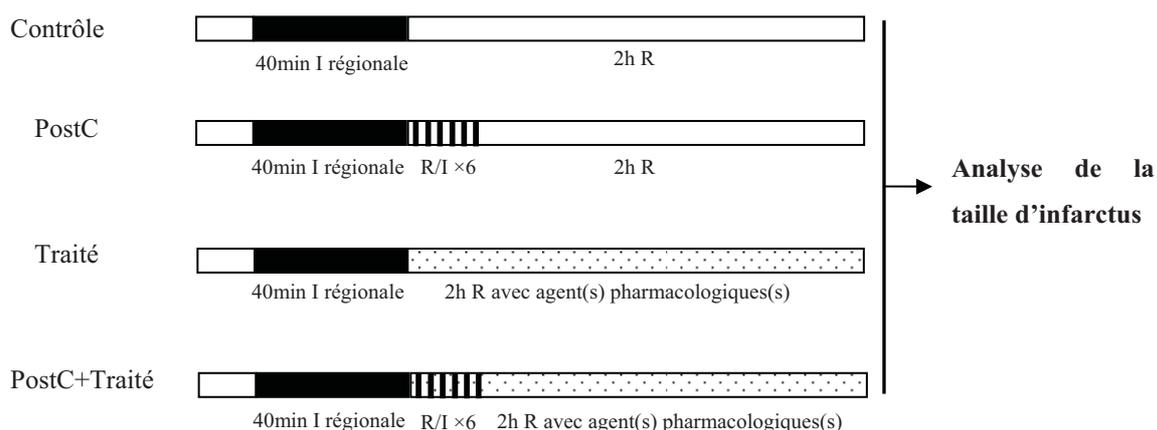
Pour étudier les effets cardioprotecteurs de diverses molécules, nous avons réalisé sur des cœurs isolés perfusés, en mode Langendorff, une ischémie régionale ou une ischémie globale. Les animaux ont été randomisés en plusieurs groupes expérimentaux (Figure 10) :

- Un groupe **contrôle** (C) : à l'issue de la période de stabilisation, une occlusion coronaire est réalisée, suivie d'une période de reperfusion. Il a été réalisé une ischémie régionale de 40 minutes suivie de 2 heures de reperfusion, permettant d'analyser les conséquences de l'ischémie sur l'apparition de la mort cellulaire par nécrose (Figure 10. A).
- Un groupe **postconditionné** (PostC) : le postconditionnement ischémique est effectué par six séquences de 10 secondes d'ischémie globale suivies de 10 secondes de reperfusion
- Des groupes **traités** : des agents pharmacologiques sont administrés dans la solution de perfusion pendant toute la durée de reperfusion.

- Un groupe **postconditionné et traité** : dans ce groupe le traitement pharmacologique est appliqué pendant et après le PostC pour toute la durée de reperfusion.

Pour les études biochimiques réalisées sur les mitochondries, les cœurs contrôles et traités subissent une ischémie globale de 40 minutes suivie par seulement 5 minutes de reperfusion (Figure 10. B).

A.



B.

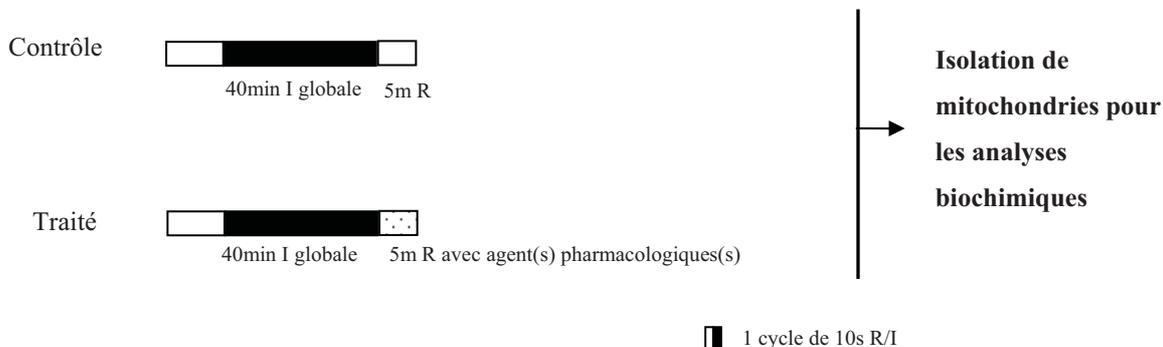


Figure 10. Description des différents groupes expérimentaux. (A) Protocole utilisé pour l'analyse de la taille d'infarctus. (B) Protocole utilisé pour la préparation des mitochondries et les analyses biochimiques. I, ischémie. R, reperfusion.

IV. Quantification de l'infarctus

A la fin de la période de reperfusion, l'artère coronaire est à nouveau occluse. Un volume de 0,3 ml d'une solution de 20% de colorant bleu Uniprise (Ciba-Geigy®, Hawthorne, NY) est injecté par l'aorte du cœur isolé du rat, afin de délimiter l'aire à risque (AR). La zone de myocarde non ischémique apparaît en bleu, alors que la partie du myocarde dépendante de l'artère coronaire occluse, n'est pas colorée. Le cœur est ensuite excisé et rincé dans une solution de KH à 4°C. Le ventricule droit, les oreillettes et l'aorte sont disséqués et éliminés. Le ventricule gauche (VG) est coupé parallèlement à la base du cœur en cinq tranches de 2 mm d'épaisseur environ. La face basale de chaque tranche est photographiée à l'aide d'un appareil photo numérique afin de déterminer ultérieurement la taille de ventricule gauche et celle de l'AR. Ensuite, chaque tranche est incubée pendant 10 minutes à 37°C dans une solution de Chlorure de Triphényltétrazolium (TTC) à 1% à pH 7,4. Le myocarde "viable" apparaît coloré en rouge brique, alors que l'aire nécrosée (AN) ou zone infarctée apparaît pâle. Les coupes de myocarde sont une nouvelle fois photographiées puis pesées. Les photographies des tranches de myocarde permettent de déterminer les limites de l'AR et de l'AN et d'en réaliser un calque. Ce calque est numérisé à l'aide du logiciel *Adobe Photoshop*®. Pour chaque coupe, la surface myocardique, ainsi que celle de l'AR et de l'AN sont déterminées. Les pourcentages de l'AR et de l'AN par rapport au VG sont calculés. Connaissant la masse de chaque coupe, les masses de l'AN et l'AR sont déterminées. Les rapports AN/AR, AN/VG et AR/VG sont déterminés pour chaque cœur.

V. Prélèvements des cœurs de souris et de lapins

Les cœurs de souris et de lapins sont prélevés chez les animaux sains pour les études sur les mitochondries sham.

La souris est anesthésiée par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (50 mg/kg). Le cœur excisé est immédiatement rincé puis conservé dans la solution de tampon A (mM : Tris 50, EDTA 1 ajusté à pH 7,4, Saccharose 70, Mannitol 210).

Le lapin est anesthésié par xylazine (5mg/kg) et kétamine (50mg/kg) par voie intramusculaire. Après trachéotomie, une ventilation mécanique est mise en place. L'animal est ventilé à l'aide d'un respirateur Servo 900 C délivrant un mélange d'air (60%) et oxygène (40%) médical. L'électrocardiogramme de la dérivation DII est surveillé. Un cathéter est mis en place dans l'artère carotide pour le recueil des paramètres hémodynamiques (pression artérielle et fréquence cardiaque) en continue. Une thoracotomie gauche est pratiquée au 4ème espace intercostal. Une période de 20 minutes de stabilisation est observée. A l'issue de cette période, le cœur est rapidement excisé, les oreillettes et le ventricule droit écartés, le ventricule gauche est rincé et placé dans le tampon A à 4°C.

VI. Isolement des mitochondries

Les cœurs « sham » ou « ischémiques » sont rincés avec le tampon A à 4°C. Les gros vaisseaux, les oreillettes et le ventricule droit sont éliminés. Le ventricule gauche est pesé puis découpé en petits morceaux dans 15 ml de tampon A à 4°C. Les morceaux sont lavés à nouveau et repris dans 10 ml de tampon par gramme de tissu. Le broyage est réalisé à l'aide d'un broyeur verre-verre Kontes®. Les mitochondries sont isolées par centrifugations différentielles²⁸⁷. Brièvement, l'homogénat est centrifugé à 1330 g (4°C) durant 3 min. Cette centrifugation permet d'éliminer les noyaux, les hématies et différents débris cellulaires. Le surnageant post-nucléaire est centrifugé une nouvelle fois à 10 000 g (4°C) durant 10 min afin de séparer la fraction mitochondriale du surnageant post-mitochondrial. Le culot de mitochondries est remis en suspension dans un tampon B dépourvu d'EDTA (10 ml de tampon B pour un g de tissu) (mM : Tris 50, Saccharose 70, Mannitol 210, pH 7,4 à 4°C).

L'homogénat est centrifugé à 6500 g durant 10 min. Le culot est suspendu dans 200 µl de tampon B et homogénéisé. La suspension de mitochondries est alors prête pour le dosage de protéines et les autres études de fonctions mitochondriales.

VII. Dosage de protéines

Sauf si indiqué autrement, la technique est adaptée de la méthode initialement décrite par Bradford²⁸⁸. Le réactif de Bradford est commercialisé par Sigma. Le dosage de protéines se fait à l'aide d'un spectrophotomètre avec un lecteur multiplaque. La longueur d'onde d'absorbance est de 550 nm. L'albumine sérique bovine à une concentration de 2 mg/ml est utilisée comme standard pour établir une gamme étalon.

VIII. Analyses des fonctions mitochondriales

VIII-1. Phosphorylation oxydative

La mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène est réalisée, immédiatement après l'isolement de mitochondries, à l'aide d'une chambre hermétique de 2 ml équipée d'une micro-électrode de Clark calibrée (Oroboros Oxygraph, Paar, Graz, Austria). Sauf si indiqué autrement, la mesure de la consommation d'oxygène est réalisée à 25°C dans 2 ml de tampon C (mM : KCl 50, succinate 5, KH₂PO₄ 2, Saccharose 150, Tris/HCl 20, pH 7,4). Les mitochondries (environ 0,2 mg de protéines) sont ajoutées. Pour la mesure du complexe I, le succinate dans le tampon C est remplacé par les substrats du complexe I (mM : glutamate 3, pyruvate 3 et malate 3). La consommation d'oxygène correspond alors à l'état 4 de la respiration mitochondriale. L'état 3 est induit par l'addition de 200 µM d'ADP. La mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale est exprimée en nmol d'oxygène / min / mg de

protéines mitochondriale. Le RCR (respiratory control ratio) est défini comme le rapport de consommation d'oxygène Etat 3 / Etat 4.

VIII-2. Capacité de rétention du calcium (CRC)

La capacité de rétention du calcium est défini ici comme la quantité du calcium nécessaire à l'induction de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale après additions successives et régulières de calcium. Les mouvements du calcium dans le milieu extramitochondrial sont visualisés à l'aide d'une sonde « calcium green-5N » qui émet de la fluorescence en présence de calcium. La libération massive du calcium par les mitochondries marque l'ouverture du PTPm.

La mesure de la CRC est réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Hitachi®, F-7000) thermostaté et muni d'un agitateur électromagnétique. Les mitochondries fraîchement isolées (0,2 mg) sont placées dans une cuve jetable contenant 2 ml de tampon C. Les mesures sont réalisées à 20°C et sous agitation pendant toute la durée de l'expérience. Les mouvements du calcium dans le milieu extramitochondrial sont visualisés grâce à la présence de calcium green-5N (0,5 µM). La longueur d'onde d'excitation est de 500 nm et celle d'émission est de 530 nm. Après 90 secondes de période de pré incubation, cette suspension reçoit chaque minute un pulse de Ca^{2+} de 20 nmol. Comme le montre la Figure 11, chaque administration de 20 nmol de CaCl_2 est associée à l'enregistrement d'un pic de fluorescence dans le milieu extramitochondrial. Le Ca^{2+} est rapidement capté par les mitochondries, et le niveau de la fluorescence retourne à l'état basal. Après une surcharge calcique suffisante, le retour à la ligne de base est de moins en moins possible, ce qui précède de peu une libération massive et irréversible de calcium par les mitochondries. Ce phénomène est interprété comme l'ouverture du PTPm. La quantité de Ca^{2+} nécessaire pour obtenir cette transition de perméabilité

mitochondriale (CRC), exprimée en nmol CaCl_2 / mg de protéines, est utilisée comme indicateur de la susceptibilité d'ouverture du PTP lors d'une surcharge calcique.

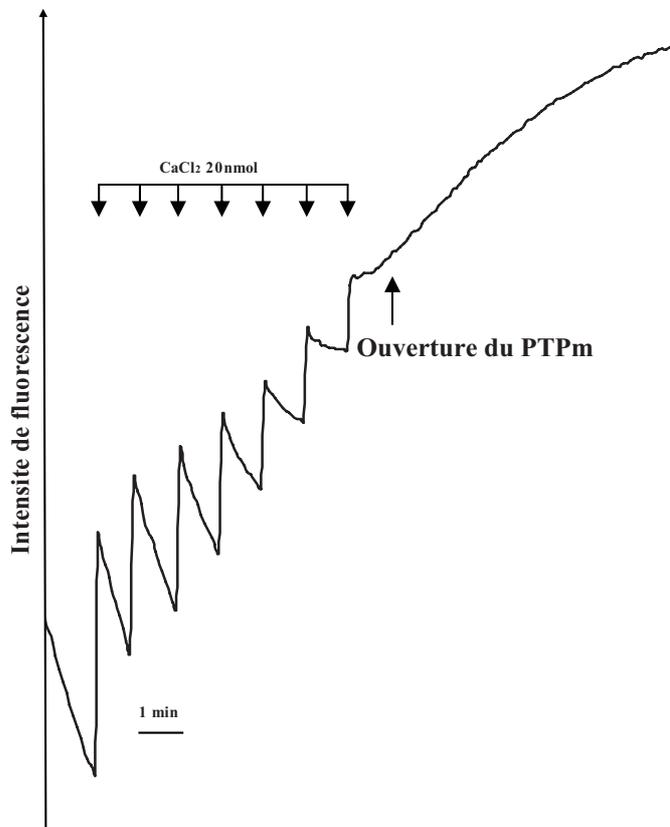


Figure 11. Courbe typique de mesure de la CRC. Une augmentation de la fluorescence est enregistrée après chaque administration de 20 nmol de CaCl_2 . Le Ca^{2+} est immédiatement capté par les mitochondries, avec un retour de la fluorescence vers la ligne de base. Après une surcharge calcique suffisante, on assiste à une libération massive de calcium par les mitochondries et une augmentation de la fluorescence correspondant à l'ouverture du pore de transition de perméabilité.

VIII-3. Gonflement mitochondrial

Le gonflement mitochondrial est induit par différents inducteurs ou inhibiteurs comme le Ca^{2+} , le P_i , le FCCP et la CsA. Il est détecté à l'aide d'un spectrophotomètre (Digilab® Hitachi U-2800). Dans le tampon C (1ml) contenant $4\mu\text{M}$ d'A23187 (un ionophore), 0,25 mg de mitochondries sont ajoutées. Le gonflement mitochondrial est déclenché par l'ajout de l'inducteur 200 nmoles de Ca^{2+} , avant l'ajout de 8 μmoles de P_i ou 3 μmoles de FCCP. Le

gonflement mitochondrial est détecté par la diminution de l'intensité optique à $\lambda=540\text{nm}$.

(Figure 12)

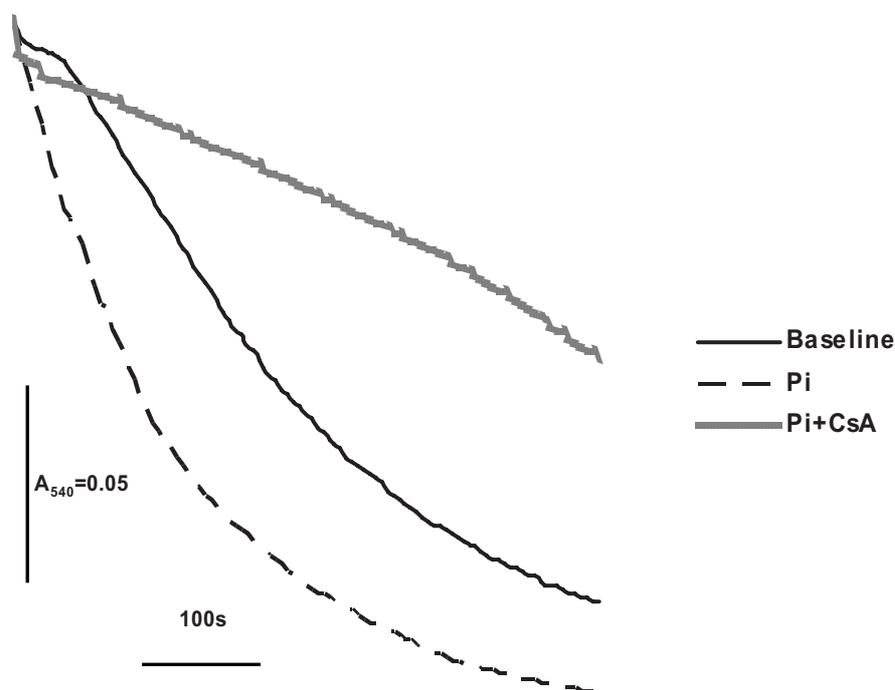


Figure 12. Exemple typique d'enregistrement de gonflement mitochondrial. Voir le texte pour les conditions d'expérimentation. 0,2mg de mitochondries sont traitées par 200nmole de CaCl_2 (baseline) et le gonflement mitochondrial est détecté par la diminution de l'intensité optique ($\lambda=540\text{nm}$). En présence de Pi (8 μ moles), la vitesse du gonflement est accélérée. La CsA, un inhibiteur du PTPm, inhibe le gonflement mitochondrial.

VIII-4. Production de H_2O_2

La mesure de H_2O_2 extramitochondrial est aujourd'hui admise comme un indicateur de la production de ROS mitochondrial. Les molécules O_2^- produites par la chaîne de transfert des électrons sont immédiatement converties en H_2O_2 sous l'effet de dismutase de superoxide mitochondrial (Mn-SOD) et deviennent rapidement indétectables²⁸⁹. Les molécules H_2O_2 ont une capacité à traverser la membrane mitochondriale²⁹⁰ et servent ainsi d'indicateur stochiométrique de la production des ROS mitochondriaux^{291,292}. La détection d' H_2O_2 par la

fluorescence du N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red) en présence de horseradish peroxidase a été décrite pour la première fois par Zhou et al.²⁹³. En pratique, cette détection d'H₂O₂ est réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre (longueur d'onde d'excitation à 530nm, longueur d'onde d'émission à 590nm). Les mitochondries (0,2 mg de protéine) sont incubées dans 2 ml de tampon C (sauf si indiqué autrement) à 25°C. La production d'H₂O₂ extramitochondrial est mesurée grâce à l'oxydation de l'indicateur fluorescent Amplex Red (10µM) en présence de horseradish peroxidase (0,6 unités). Les quantifications sont réalisées à partir de courbes étalons obtenues avec des quantités connues de H₂O₂ (Figure 13). Les résultats sont exprimés en pmol de H₂O₂ / min / mg de protéines de mitochondries. La figure 14 montre un exemple de l'enregistrement de la production de H₂O₂ par des mitochondries sham.

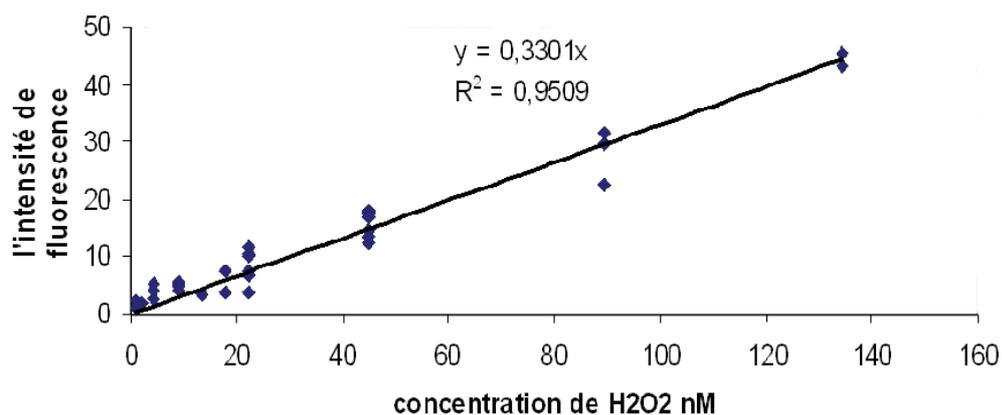


Figure 13. Gamme étalon de H₂O₂ réalisée avec des concentrations de H₂O₂ connues.

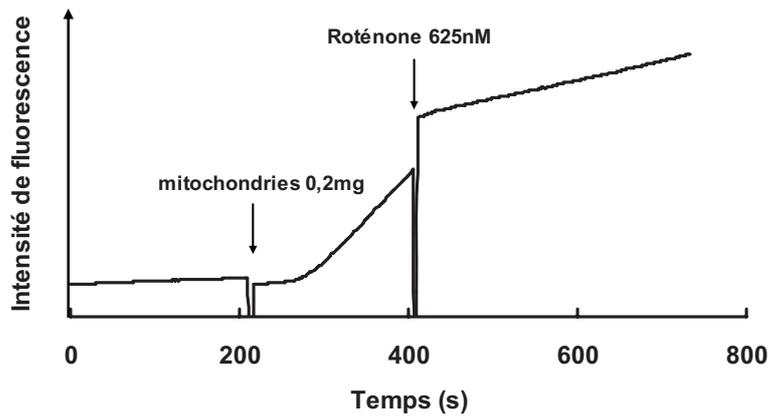


Figure 14. Exemple typique d'enregistrement de la production de H_2O_2 par les mitochondries. Voir le texte pour les conditions d'expérimentation. L'augmentation de l'intensité de fluorescence après l'ajout des mitochondries indique une production d' H_2O_2 par les mitochondries en présence de succinate. Après l'ajout de la roténone (625nM), le flux inverse d'électrons vers le complexe I de la chaîne respiratoire est inhibé. Par conséquent, la production d' H_2O_2 diminue, ce qui est détecté ici par une moindre intensité de fluorescence.

IX. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm SEM. Les comparaisons statistiques entre deux groupes sont effectuées avec un test t de Student. Au delà de 2 groupes, les comparaisons sont réalisées par une analyse de variance (ANOVA). Les valeurs sont ensuite comparées par un test de PLSD. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Etude I

Effets de CoQ₂ et CoQ₁₀ sur le pore de transition de perméabilité mitochondriale cardiaque et la production de ROS *in vitro*

Résumé

Objectif: L'objectif de cette étude est de déterminer les effets des deux analogues du coenzyme Q, le CoQ₂ et le CoQ₁₀, sur la production de ROS et le pore de transition de perméabilité de mitochondries cardiaques.

Matériels et Méthodes: Les mitochondries de cœur de lapin sham sont isolées par centrifugations différentielles. La production de ROS est mesurée en présence de CoQ₂, CoQ₁₀ et différents inhibiteurs de la chaîne respiratoire par spectrofluorimétrie grâce à la sonde fluorescente Amplex Red. La CRC est mesurée par spectrofluorimétrie en ajoutant de pulses du calcium marqués par Calcium Green jusqu'à l'ouverture du PTPm. La consommation d'oxygène par les mitochondries est mesurée par une électrode polygraphique de Clark. L'acide L-ascorbique est utilisé comme un agent antioxydant pour examiner la corrélation éventuelle entre le niveau de ROS et l'ouverture du PTPm en présence de CoQ₂ et CoQ₁₀.

Résultats: Le CoQ₁₀ et le CoQ₂ diminuent le niveau du RCI (respiratory control index) de 30% et 46% respectivement ($p < 0.01$); l'augmentation de la vitesse de consommation d'oxygène à l'état 4 contribue principalement à ce phénomène. Le CoQ₂ et le CoQ₁₀ modulent la production de H₂O₂ par la mitochondrie. Les deux analogues induisent l'ouverture du PTPm. La cyclosporine A prévient leurs effets sur le PTPm. L'acide L-ascorbique diminue dramatiquement le niveau de H₂O₂ dans le milieu en présence de CoQ₂ mais ne modifie pas son effet sur le PTPm.

Conclusion: Le CoQ₂ et le CoQ₁₀ découplent la respiration mitochondriale et favorisent l'ouverture du PTPm cardiaque d'une façon Cyclophiline-D- et ROS-indépendante.

Modification of mitochondrial permeability transition susceptibility and ROS production by Coenzyme Q analogues in isolated rabbit heart mitochondria

Abdallah Gharib ^{*(1)}, Damien De Paulis ^(1,3), Bo li ^(1,3), Lionel Augeul ^(1,3), Elisabeth Couture-Lepetit ^(1,3), Ludovic Gomez ^(1,3), Michel Ovize ^(1,2,3)

1. INSERM UMR886, Cardioprotection, F-69373 ;
2. Hospices Civils de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Service de cardiologie, F-69677, Bron ;
3. Université Lyon 1, Faculté de médecine Lyon Nord ;

Short title: CoQ₂ activates mPTP opening and ROS production

Table: 1

Fig: 3

*Corresponding author:

Dr A. Gharib

INSERM UMR886 “Cardioprotection”

Laboratoire de Physiologie, Lyon Nord, 8 av Rockefeller, 69373 Lyon, France.

Tel: (33) 4-78-78-56-10; Fax: (33) 4-78-77-71-75.

E-mail address agharib@sante.univ-lyon1.fr (A. Gharib).

Abstract

In a variety of cells, the coenzyme Q analogues are known to be implicated in regulation of mitochondrial functions, such as generation of reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. By an *in vitro* approach, we examined how CoQ₁₀ and CoQ₂ affect ROS production and modulate mPTP opening in isolated rabbit heart mitochondria.

Hearts were excised from anesthetized open-chest New Zealand White rabbits, and the mitochondria were isolated from the left ventricle myocardium by differential centrifugations. Oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type electrode. ROS production and Ca²⁺-induced mPTP opening were assessed by spectrofluorometry in the presence of Amplex Red[®] and Calcium Green[®]-5N respectively. L-ascorbic acid (L-A) was used as antioxidant to examine the relationship between the level of ROS and mPTP opening in the presence of CoQ₁₀ and CoQ₂.

CoQ₁₀ and CoQ₂ (46μM) reduced the respiratory control index by 30 % and 46 % respectively ($p < 0.01$), which was mainly caused by increased oxygen consumption in state 4. CoQ₂ and CoQ₁₀ modulated ROS production by mitochondria. Both analogues decreased calcium retention capacity (CRC), and this effect was prevented by cyclosporin A (CsA). Although L-A (150μM) scavenged H₂O₂ in the presence of CoQ₂, it did not attenuate its effect on CRC. In conclusion, CoQ₂ and CoQ₁₀ can both favor mitochondrial permeability transition pore opening in rabbit heart, independently of their effect on ROS production by the electron transport chain.

Keywords: Coenzyme Q; mitochondria; permeability transition pore; oxygen radicals; rabbit heart.

Coenzyme Q (CoQ) exists in many intracellular organelles. The chemical structure of CoQ varies among species and tissues by the number of monounsaturated *trans*-isoprenoid units. The chemical structure of CoQ₁₀ (the major form in primates) and of CoQ₂ (in microorganisms) (47), includes 10 and 2 isoprenoid units respectively. In mitochondria, CoQ₁₀ is not only a component of the respiratory electron transport chain (ETC), but also presents several other physiological or pathophysiological functions (see (27, 47) for review). The ETC contributes significantly to the production of intracellular reactive oxygen species (ROS), which were traditionally considered to be substances that cause damage to mitochondrial protein, lipid, DNA and cell membrane, while recent studies have shown that a small amount of ROS is a sensor to stimulate signal transduction pathways that feed back to protect against lethal ischemia-reperfusion injury (5, 40, 44, 46).

The opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) appears to be a pivotal event in cell death (7, 54). The opening of this mega-channel is regulated by several factors including Ca²⁺ overload, matrix pH, ATP and excessive production of ROS (4, 6, 31, 32, 39). Consequently, the selective inhibition of mPTP opening is a promising therapeutic strategy (2, 22, 41). In rat liver mitochondria, the CoQ₂ was classified as mPTP inhibitors (20, 49). The classification of CoQ₁₀ has not been determined. Moreover, several *in vivo* studies examining the effects of CoQ₁₀ on cardiovascular diseases in rabbit (8), in rat (12, 43), and more recently in humans (13) have provided limited and controversial results.

In this study, we used a rabbit heart mitochondria preparation to examine the effects of CoQ₁₀ and CoQ₂ on mitochondrial respiration, ROS production and mPTP opening. Surprisingly, we found that both CoQ₂ and CoQ₁₀ activated PTP opening but modified the ROS production differently. The antioxidant activity of L-ascorbic acid (L-A), a scavenger of ROS in mitochondria (30, 34), did not attenuate the effect of CoQ analogues on mPTP in our

study. Our results suggest that CoQ₂ and CoQ₁₀ increase the susceptibility of cardiac mPTP via some mechanisms other than ROS production.

MATERIALS AND METHODS

This investigation is conformed to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animal* published by the US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23 revised 1996). All experimental protocols were carried out in accordance with the French (87/848, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) and European Community guidelines (86609/EEC).

Materials

All reagent chemicals of the highest purity were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Calcium Green[®]-5N and Amplex Red[®] reagent were purchased from Molecular Probes, Inc. (Cergy Pontoise, France). CoQ₁₀ and CoQ₂ were dissolved in absolute ethanol (0.5 mg/ml and 1 mg/ml respectively).

Animal preparation and isolation of mitochondria

Male New Zealand White rabbits (2.2 to 2.5 kg) were anesthetized with xylazine (5 mg/kg) and ketamine (50 mg/kg) and ventilated with room air as previously described (42). A cannula was inserted into the left carotid artery for measurement of blood pressure. Limb lead II of the ECG was used to measure heart rate. Heart rate and blood pressure were monitored continuously by a Gould recorder (Gould Inc). After left thoracotomy was performed, 20min stabilization period was observed. At the end of this period, the heart was harvested and the left ventricle was rapidly excised. Mitochondria were isolated as previously described (23), re-suspended in medium containing sucrose 70 mM and mannitol 210 mM in Tris 50 mM, pH 7.4 at 4°C. Mitochondrial protein concentration was determined by Biuret method, using bovine serum albumin as standard (24). Using this method, we obtained about 16 mg mitochondrial protein / g cardiac tissue.

Measurement of mitochondrial oxygen consumption

Mitochondrial oxygen consumption was measured using a Clark-type oxygen electrode at 25°C. Mitochondria (about 800 µg protein / ml) were incubated in the respiration buffer (pH 7.4) containing KCl 60 mM, sucrose 150 mM, Tris-HCl 20 mM and KH₂PO₄ 5 mM. Glutamate/ malate (complex I substrates, 5 mM each) were used in the absence (control) or presence of CoQ₁₀ or CoQ₂ (23 or 46 µM each). State 3 (ADP-stimulated: induced by addition of 0.3 mM ADP) and state 4 respiration (ADP-limited: without ADP) were determined and expressed as nmol O₂ / min / mg protein. The respiratory control index (RCI) was calculated as the ratio of the state 3 / state 4.

Measurement of the mitochondrial calcium retention capacity (CRC)

CRC is defined here as the amount of calcium required to trigger mPTP opening *in vitro*, as previously described (2). Measurement of CRC was carried at 25°C using a spectrofluorophotometer F-2500 digi lab Hitachi[®] equipped with magnetic stirring and thermostatic control. Extra-mitochondrial free Ca²⁺ was measured in the presence of Calcium Green[®]-5N (1µM) with excitation and emission wavelengths set at 500 and 530 nm respectively. The mitochondria (400 µg protein / 2ml) were resuspended in buffer containing KCl 50 mM, KH₂PO₄ 2 mM, Tris 20 mM, sucrose 150 mM and succinate 5 mM, pH 7.4 at 25°C. Following 1 min preincubation period, 10 nmol CaCl₂ was administered every one minute. As previously reported, once added, Ca²⁺ is rapidly taken up by the mitochondria resulting in a rapid return of extra-mitochondria Ca²⁺ concentration to near baseline level (2). After sufficient CaCl₂ loading, a rapid increase of fluorescence indicates a massive release of Ca²⁺ by mitochondria due to mPTP opening. The influence of CoQ₁₀ or CoQ₂ (46µM) on CRC was tested in the presence or absence of CsA (1 µM). The CRC was expressed as nmol Ca²⁺ / mg protein.

Measurement of H₂O₂ production in mitochondria

The quantification of extramitochondrial H₂O₂ has been accepted as an indicator of ROS production by mitochondria. The superoxide radicals produced by ETC are immediately converted to H₂O₂ catalyzed by superoxide dismutase (21). H₂O₂ is ready to diffuse across mitochondrial membrane (1) and thus serves as a stoichiometric indicator of ROS production by mitochondria (9, 36). The rate of H₂O₂ production by rabbit heart mitochondria was measured at 25°C in the presence of Amplex Red[®] (10 μM) and horseradish peroxidase (0.6 units) by a spectrofluorophotometer F-2500 digi lab Hitachi[®] (excitation and emission wavelengths set at 530 and 590 nm respectively) (48). In control condition, isolated mitochondria (200 μg protein) were added to 2 ml buffer containing sucrose 250 mM, EDTA 1mM, BSA 0.15% and EGTA 1 mM in Tris / HCl 20mM, pH 7.4 at 25°C.

The rate of H₂O₂ production from mitochondria was measured in control condition, after stimulation of the ETC either by the complex I substrates glutamate plus malate (Glu+Mal) (5 mM each) or by the complex II substrate succinate (3.75 mM), and in the presence of CoQ₂ or CoQ₁₀. Since the sites of superoxide anion production within the mitochondrial ETC *in vitro* are mainly localized on complexes I and III (33, 45), two inhibitors of ETC were used in our study: rotenone (6.25 μM) that inhibits complex I, and antimycin A (1 μM) that inhibits complex III. The addition of catalase (450 U / ml) to incubations attenuated the fluorescence by 90-95 % indicating specificity for H₂O₂. The calibration curve was obtained by adding known amount of H₂O₂ to assay medium. The assay was linear from 0 to 150 nM H₂O₂. The H₂O₂ production was assessed by estimating the fluorescence variation in function of time. The results were expressed as pmol H₂O₂ / min / mg protein.

Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm standard error of mean (S.E.M). Comparisons between groups were made using one-way analysis of variance (Graph Pad InStat) followed by Tukey's post hoc test. Statistical significance was defined at $p < 0.05$.

RESULTS

Oxidative phosphorylation

In the control group, RCI averaged 4.35 ± 0.29 (Table 1). At 23 μM , CoQ₁₀ did not modify the mitochondrial respiration. At 46 μM , CoQ₁₀ significantly decreased the RCI caused by a slight reduction in state 3 combined with a marked increase in state 4 respiration. At the both concentrations, CoQ₂ resulted in a marked decrease (30 % and 46 % respectively, $*p < 0.01$) in RCI, which was caused mainly by a major increase of state 4 (30% and 90 % respectively, $*p < 0.01$). L-ascorbate did not reverse the effect of CoQ₂ on respiratory parameters (data not shown).

Calcium retention capacity

The CRC was measured in optimal concentrations of CoQ analogues tested by Fontaine et al. in liver mitochondria (49). In control mitochondria, CRC averaged 605 ± 59 nmol Ca²⁺/mg mitochondrial protein (Fig. 1). In the presence of CoQ₁₀ (46 μM) or CoQ₂ (46 μM), the CRC value was significantly reduced to 250 ± 42 and 185 ± 18 nmol Ca²⁺/ mg mitochondrial protein respectively ($p < 0.05$ vs control). Interestingly, CsA 1 μM reversed their effect on mPTP (Fig. 1). In contrast, L-ascorbic acid did not modify the reduction of CRC by CoQ₂ (Fig. 1).

H₂O₂ production in control condition

In control condition, the rate of H₂O₂ production by mitochondria was very low (4.74 ± 0.68 pmol / min / mg protein). It was not modified by CoQ₁₀ (23 μM) and slightly increased by CoQ₂ (23 μM) (12.7 ± 1.1 pmol / min / mg protein; *p*<0.05 vs control and CoQ₁₀) (Fig. 2A).

H₂O₂ production in the presence of succinate

In the presence of succinate, as expected, H₂O₂ production was increased (312 ± 37 pmol / min / mg protein (*p*<0.01 vs control) (Fig. 2A). Rotenone dramatically reduced this succinate-induced H₂O₂ production. Further addition of antimycin A did not cause additional H₂O₂ production (Fig. 2A).

CoQ₁₀ (23 μM) significantly attenuated the succinate-induced increase in H₂O₂ production, which averaged 190 ± 27 vs 312 ± 37 pmol / min / mg protein in succinate group (*p*<0.05). Rotenone reduced H₂O₂ production in the presence of CoQ₁₀. This effect was similar to that observed in the absence of CoQ₁₀. Antimycin A added on top of rotenone did not further modify H₂O₂ production (Fig. 2A).

CoQ₂ (23 mM) reduced H₂O₂ production that averaged 227 ± 29 vs 312 ± 37 pmol / min / mg protein in succinate group (*p*<0.05). In the presence of CoQ₂, neither rotenone nor further added antimycin A modified H₂O₂ production, which averaged 209 ± 23 and 229 ± 26 respectively (NS vs succinate plus CoQ₂).

L-A acid abolished this persistent H₂O₂ production in the presence of CoQ₂, rotenone and antimycin A (Fig. 3).

H₂O₂ production in the presence of Glu+Mal

In the presence of Glu + Mal, H₂O₂ production was increased (20.3 ± 2.9 pmol / min / mg protein, *p*<0.01 vs control) (Fig. 2B). Rotenone increased this (Glu+Mal)-induced H₂O₂

production to 60 ± 10 pmol / min / mg protein ($p < 0.01$). Further addition of antimycin A did not significantly increase H_2O_2 production (91 ± 15 pmol / min / mg protein) (Fig. 2B). The presence of CoQ_{10} did not modify H_2O_2 production in any groups (Fig. 2B). In contrast, CoQ_2 stimulated significantly the H_2O_2 production in each individual group (Fig. 2B). L-A acid abolished this persistent H_2O_2 production in the presence of CoQ_2 , rotenone and antimycin A (data not shown).

Discussion

In the present study, we demonstrate that CoQ_{10} and CoQ_2 uncouple mitochondrial respiration, modulate ROS production and increase mPTP susceptibility and that CsA but not L-A, prevents the effects of these analogues on mPTP. We conclude that in the mitochondria isolated from rabbit heart, exogenous CoQ_{10} and CoQ_2 favor mitochondrial permeability transition pore opening independently of their effect on ROS production.

The endogenous coenzyme Q, a constituent of the respiratory chain, is located in mitochondrial inner membrane. It acts as an electron shuttle between ubiquinone reductase and complex III. In complex I, electron transport to CoQ is coupled to proton pumping which generates membrane potential (17, 51). Due to their lipophilic properties, the exogenous CoQ_{10} and CoQ_2 can incorporate into the mitochondrial inner membrane, and modulate the respiratory complex activity and oxidative phosphorylation (17). The effects of exogenous CoQ on mitochondrial respiration have been objectives of many works. However, the results of these studies remain controversial. It is widely admitted that CoQ contributes to ATP synthesis by generating proton gradient across the membrane (37, 38). Nevertheless, Echtay et al. reported that CoQ is also an obligatory cofactor of uncoupled protein (18). Fontaine et al. showed that some analogues of CoQ inhibited the uncoupled mitochondria respiration

when the others are neuter (49). Our work observed that at 46 μ M, CoQ₂ and CoQ₁₀ uncoupled the mitochondria respiration in the sham rabbit heart mitochondria.

CoQ has been considered to be an important antioxidant (29, 35). On the other hand, a role of CoQ as an oxygen radical generator has also been explored in heart mitochondria (10, 11, 53), which was explained by auto-oxidation of CoQ (28). In our work, CoQ₁₀ did not modify H₂O₂ generation in the presence of glutamate/malate, but decreased it in the presence of succinate. CoQ₂ accentuated H₂O₂ production with either of the substrates tested. In the presence of succinate and CoQ₂, rotenone did not modify H₂O₂ production by mitochondria. In fact, the sensitivity of complex I to rotenone gets much lower in presence of CoQ₂ (15), a phenomenon which might conserve the reverse electron transport from complex II to complex I and keep H₂O₂ production at a high level in spite of the presence of rotenone. When succinate was used as substrate, antimycin A alone (result not shown) or added on top of rotenone did not modify H₂O₂ production, since the reverse electron transport is the main source of ROS generation in this condition (25).

Recent studies indicate that exogenous CoQ analogs regulate the opening of the mPTP. Although mPTP regulation exhibits a number of tissue-specific characteristics (19, 20, 50), several molecules are classified as either activator (Ca²⁺, ROS, and Bax) or inhibitor (ATP, CsA) of its opening (14, 16). From studies performed with isolated rat liver mitochondria, three functional classes of CoQ analogs have been defined in which CoQ₂ acts as a strong inhibitor of mPTP opening (49). In the present study, we found that CoQ₁₀ and CoQ₂ increased mPTP opening possibility following an *in vitro* calcium overload and that CsA (1 μ M) prevented this effect. Accumulating evidence suggests that the CsA interaction with cyclophilin D (CypD) blocks the attachment of CypD to mPTP and inhibits mPTP opening (3, 26, 52). Our data suggest that CoQ regulates the mPTP in a CypD independent manner, which is in agreement with the results obtained in mice devoid of CypD by Basso et al. (3). In

contrast to CsA, the presence of an antioxidant (L-ascorbic acid) dramatically reduced H_2O_2 produced by CoQ_2 , but could not prevent activation of mPTP opening. This strongly suggests that the modification of H_2O_2 production by CoQ analogues is not directly responsible for their effect on mitochondrial permeability transition in our study. The action mechanism of CoQ analogues on regulation of mPTP remains to be investigated. The proposition of Fontaine that the electron flux through the complex I modulate mPTP opening seems to be a good explication. The sensibility of complex I to different CoQ analogues in the absence or presence of complex I inhibitors and their effects on mPTP should be examined to further elucidate this theory.

In summary, in this work, we show for the first time the effect of CoQ_{10} and CoQ_2 on the mPTP and the production of H_2O_2 in isolated rabbit heart mitochondria; the activation of mPTP by this CoQs is independent of CypD and ROS production.

Acknowledgements

The work was supported by the Institute National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U886). D.D. was a recipient of a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France.

TABLE AND FIGURE LEGENDS

Table 1: Oxidative phosphorylation

	State 3	State 4	RCI	n
	nmol O ₂ /min/mg	nmol O ₂ /min/mg	State 3/State 4	
Control	69.50 ± 5.37	16.00 ± 1.45	4.35 ± 0.29	8
CoQ₁₀ 23μM	63.83 ± 4.57	18.33 ± 1.94	3.58 ± 0.40	6
CoQ₁₀ 46μM	58.13 ± 4.73	19.25 ± 1.77	3.04 ± 0.19*	8
CoQ₂ 23μM	63.74 ± 8.60	20.73 ± 2.46	3.07 ± 0.05*	4
CoQ₂ 46μM	67.17 ± 5.36	30.67 ± 2.82*	2.35 ± 0.09*	6

Fig. 1: Effects of CoQ₁₀ and CoQ₂ on the calcium retention capacity

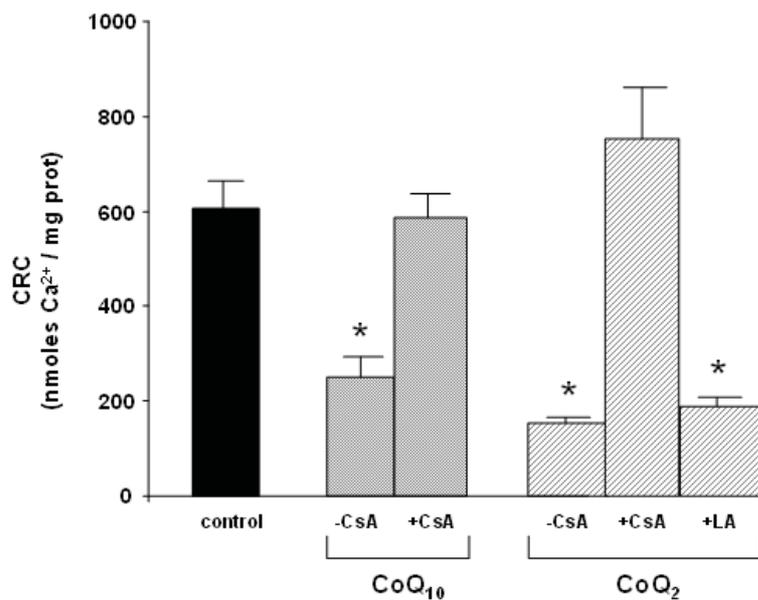


Fig. 2: Rate of H₂O₂ production in isolated mitochondria

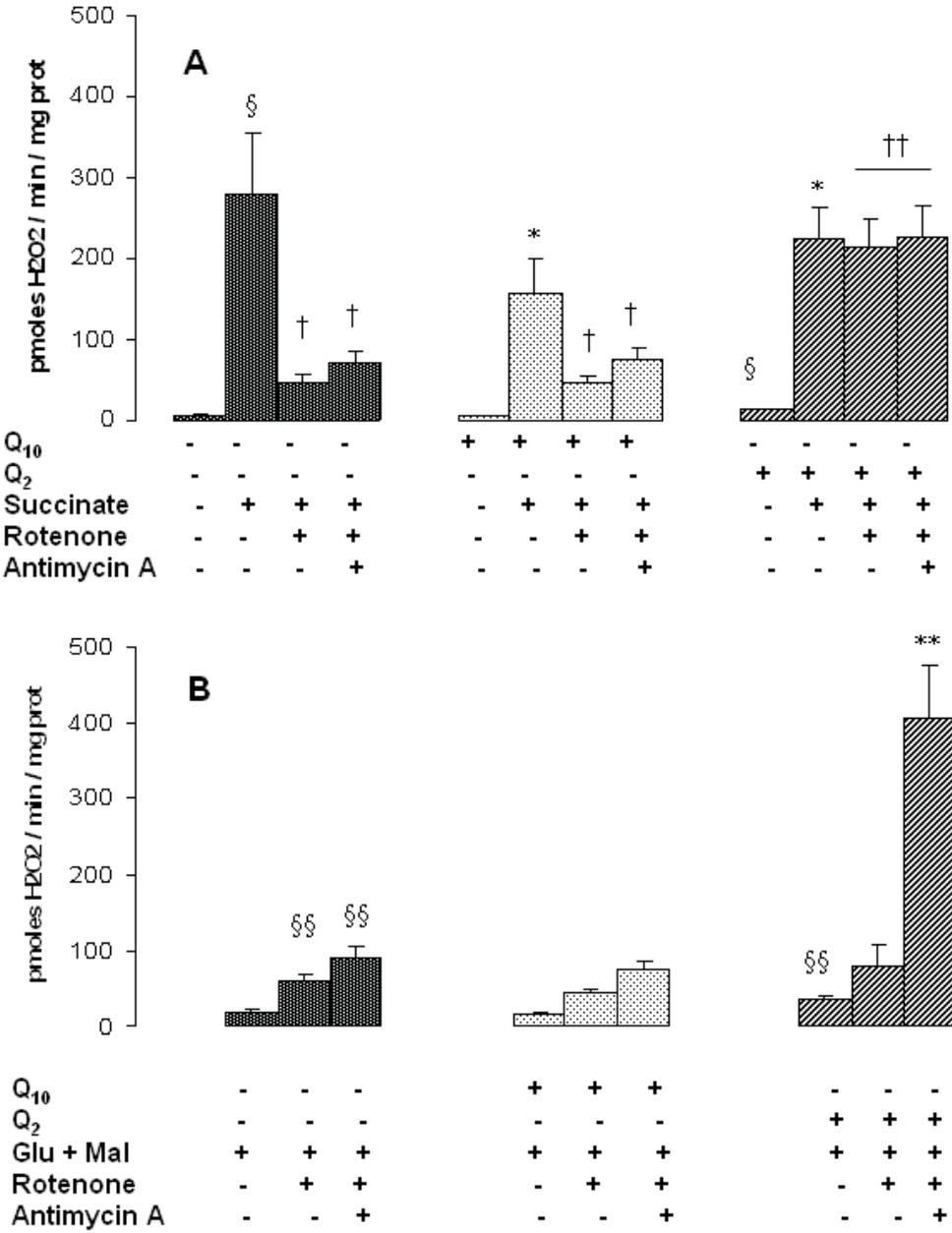


Fig. 3 : Effect of L-ascorbic acid on the rate of H₂O₂ production

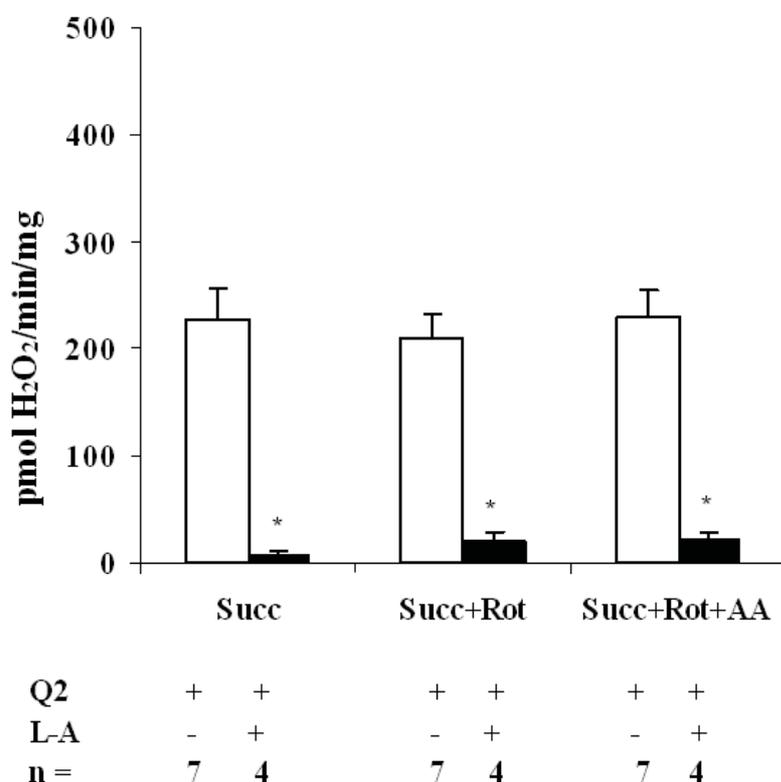


Table 1: Oxidative phosphorylation

O₂ consumption was measured at state (0.3 mM ADP-stimulated) and state 4 (ADP-limited) in control condition and in the presence of CoQ₂ or CoQ₁₀. The respiratory control index (RCI) was determined as the ratio of state 3 / state 4. Data (nmol O₂ /min /mg protein) are expressed as mean ± S.E.M. **p*<0.01 vs control.

Fig. 1: Effects of CoQ₁₀ and CoQ₂ on the calcium retention capacity.

The CRC is expressed as nmol CaCl₂/ mg protein (mean ± S.E.M. for n=8 animals in each group) and is used as indicator of susceptibility of the mPTP to Ca²⁺ overload.

**p*<0.05 vs control group.

Fig. 2: Rate of H₂O₂ production in isolated mitochondria.

H₂O₂ production was determined by the slope of the Amplex Red[®] fluorescence. Data (pmol H₂O₂ / min / mg protein) are expressed as mean ± S.E.M. n = 8 animals in each group. **(A)**: H₂O₂ production was measured at control condition or after stimulation by succinate. CoQ₁₀ and CoQ₂ were tested in the absence or presence of rotenone and rotenone plus antimycin A. **(B)**: H₂O₂ production was measured after stimulation by Glu+Mal. CoQ₁₀ and CoQ₂ were tested in the absence or presence of rotenone and rotenone plus antimycin A. §*p*<0.05 vs control group; **p*<0.05 vs presence of succinate; †*p*<0.05 vs presence of succinate in each individual group; ††*p*<0.05 vs all corresponding groups; §§*p*<0.05 vs Glu + Mal group; ***p*<0.05 vs all corresponding groups.

Fig. 3 : Effect of L-ascorbic acid on the rate of H₂O₂ production

L-ascorbic acid (L-A) nearly abolished succinate-triggered H₂O₂ release in medium by mitochondria in the presence of CoQ₂. Rotenone and rotenone plus antimycin A were tested. Data (pmol H₂O₂ / min / mg protein) are expressed as mean ± S.E.M.

**p*<0.05 vs control group.

References

1. **Antunes F and Cadenas E.** Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett* 475: 121-126, 2000.
2. **Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Bejui F, Robert D, and Ovize M.** Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 61: 115-122, 2004.
3. **Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, and Bernardi P.** Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 280: 18558-18561, 2005.
4. **Beal MF.** Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1366: 211-223, 1998.
5. **Becker LB.** New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 61: 461-470, 2004.
6. **Bernardi P, Broekemeier KM, and Pfeiffer DR.** Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 26: 509-517, 1994.
7. **Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, and Di Lisa F.** Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 264: 687-701, 1999.
8. **Birnbaum Y, Hale SL, and Kloner RA.** The effect of coenzyme Q10 on infarct size in a rabbit model of ischemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* 32: 861-868, 1996.
9. **Boveris A and Cadenas E.** Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 54: 311-314, 1975.

10. **Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, and Stoppani AO.** Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 180: 248-257, 1977.
11. **Crane FL.** Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function. *Mitochondrion* 7 Suppl: S2-7, 2007.
12. **Crestanello JA, Doliba NM, Doliba NM, Babsky AM, Niborii K, Osbakken MD, and Whitman GJ.** Effect of coenzyme Q10 supplementation on mitochondrial function after myocardial ischemia reperfusion. *J Surg Res* 102: 221-228, 2002.
13. **Damian MS, Ellenberg D, Gildemeister R, Lauermann J, Simonis G, Sauter W, and Georgi C.** Coenzyme Q10 combined with mild hypothermia after cardiac arrest: a preliminary study. *Circulation* 110: 3011-3016, 2004.
14. **De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, Remington SJ, Youle RJ, and Ichas F.** The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *Faseb J* 16: 607-609, 2002.
15. **Degli Esposti M, Ngo A, McMullen GL, Ghelli A, Sparla F, Benelli B, Ratta M, and Linnane AW.** The specificity of mitochondrial complex I for ubiquinones. *Biochem J* 313 (Pt 1): 327-334, 1996.
16. **Desagher S and Martinou JC.** Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10: 369-377, 2000.
17. **Di Virgilio F and Azzone GF.** Activation of site I redox-driven H⁺ pump by exogenous quinones in intact mitochondria. *J Biol Chem* 257: 4106-4113, 1982.
18. **Echtay KS, Winkler E, and Klingenberg M.** Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature* 408: 609-613, 2000.

19. **Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, and Bernardi P.** Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem* 273: 12662-12668, 1998.
20. **Fontaine E, Ichas F, and Bernardi P.** A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 273: 25734-25740, 1998.
21. **Forman HJ and Azzi A.** On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology. *Faseb J* 11: 374-375, 1997.
22. **Gateau-Roesch O, Argaud L, and Ovize M.** Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovasc Res* 70: 264-273, 2006.
23. **Gateau-Roesch O, Pavlov E, Lazareva AV, Limarenko EA, Levrat C, Saris NE, Louisot P, and Mironova GD.** Calcium-binding properties of the mitochondrial channel-forming hydrophobic component. *J Bioenerg Biomembr* 32: 105-110, 2000.
24. **Gornall AG, Bardawill CJ, and David MM.** Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751-766, 1949.
25. **Grivennikova VG and Vinogradov AD.** Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta* 1757: 553-561, 2006.
26. **Halestrap AP and Davidson AM.** Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* 268: 153-160, 1990.
27. **Heales SJ, Gegg ME, and Clark JB.** Oxidative phosphorylation: structure, function, and intermediary metabolism. *Int Rev Neurobiol* 53: 25-56, 2002.
28. **James AM, Smith RA, and Murphy MP.** Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch Biochem Biophys* 423: 47-56, 2004.

29. **Kagan VE, Serbinova EA, Koynova GM, Kitanova SA, Tyurin VA, Stoytchev TS, Quinn PJ, and Packer L.** Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes. *Free Radic Biol Med* 9: 117-126, 1990.
30. **Kc S, Carcamo JM, and Golde DW.** Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury. *Faseb J* 19: 1657-1667, 2005.
31. **Kirkinezos IG and Moraes CT.** Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol* 12: 449-457, 2001.
32. **Kowaltowski AJ and Vercesi AE.** Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 26: 463-471, 1999.
33. **Lambert AJ and Brand MD.** Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 279: 39414-39420, 2004.
34. **Li X, Cobb CE, Hill KE, Burk RF, and May JM.** Mitochondrial uptake and recycling of ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys* 387: 143-153, 2001.
35. **Littarru GP and Tiano L.** Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments. *Mol Biotechnol* 37: 31-37, 2007.
36. **Loschen G, Azzi A, Richter C, and Flohe L.** Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 42: 68-72, 1974.
37. **Mitchell P.** Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* 56: 1-6, 1975.
38. **Nohl H, Staniek K, Kozlov AV, and Gille L.** The biomolecule ubiquinone exerts a variety of biological functions. *Biofactors* 18: 23-31, 2003.
39. **Nulton-Persson AC and Szweda LI.** Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 276: 23357-23361, 2001.

40. **Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G, and Pagliaro P.** Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol* 101: 180-189, 2006.
41. **Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, Andre-Fouet X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, and Ovize M.** Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 359: 473-481, 2008.
42. **Piriou V, Chiari P, Gateau-Roesch O, Argaud L, Muntean D, Salles D, Loufouat J, Gueugniaud PY, Lehot JJ, and Ovize M.** Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology* 100: 581-588, 2004.
43. **Rowland MA, Nagley P, Linnane AW, and Rosenfeldt FL.** Coenzyme Q10 treatment improves the tolerance of the senescent myocardium to pacing stress in the rat. *Cardiovasc Res* 40: 165-173, 1998.
44. **Saini HK, Machackova J, and Dhalla NS.** Role of reactive oxygen species in ischemic preconditioning of subcellular organelles in the heart. *Antioxid Redox Signal* 6: 393-404, 2004.
45. **Sugioka K, Nakano M, Totsune-Nakano H, Minakami H, Tero-Kubota S, and Ikegami Y.** Mechanism of O₂⁻ generation in reduction and oxidation cycle of ubiquinones in a model of mitochondrial electron transport systems. *Biochim Biophys Acta* 936: 377-385, 1988.
46. **Tsutsumi YM, Yokoyama T, Horikawa Y, Roth DM, and Patel HH.** Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning: in vivo and in vitro characterization. *Life Sci* 81: 1223-1227, 2007.

47. **Turunen M, Olsson J, and Dallner G.** Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 1660: 171-199, 2004.
48. **Votyakova TV and Reynolds IJ.** DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79: 266-277, 2001.
49. **Walter L, Nogueira V, Leverve X, Heitz MP, Bernardi P, and Fontaine E.** Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *J Biol Chem* 275: 29521-29527, 2000.
50. **Weiss JN, Korge P, Honda HM, and Ping P.** Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res* 93: 292-301, 2003.
51. **Wikstrom M.** Two protons are pumped from the mitochondrial matrix per electron transferred between NADH and ubiquinone. *FEBS Lett* 169: 300-304, 1984.
52. **Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, and Halestrap AP.** Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J* 336 (Pt 2): 287-290, 1998.
53. **Yamamura T, Otani H, Nakao Y, Hattori R, Osako M, Imamura H, and Das DK.** Dual involvement of coenzyme Q10 in redox signaling and inhibition of death signaling in the rat heart mitochondria. *Antioxid Redox Signal* 3: 103-112, 2001.
54. **Zoratti M and Szabo I.** The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176, 1995.

Synthèse des résultats et discussion

Dans notre étude, nous montrons pour la première fois que dans les mitochondries isolées de cœurs de lapin, les deux analogues du Coenzyme Q, CoQ₁₀ et CoQ₂, découplent la respiration mitochondriale, modulent la production de ROS, et augmentent la susceptibilité du PTPm. Le PTPm des mitochondries traitées par le CoQ₁₀ et le CoQ₂ reste sensible à la CsA. L'acide L-ascorbique ne modifie pas la susceptibilité du PTPm en présence des deux analogues. Nous concluons que dans les mitochondries isolées, les effets inducteurs de ces deux analogues du CoQ sur le PTPm sont Cyclophiline-D- et ROS-indépendants.

Le CoQ₁₀ est un transporteur d'électrons essentiel entre la réductase d'ubiquinone et le complexe III de la chaîne respiratoire. Il est utilisé depuis longtemps comme un agent cardioprotecteur dans les différentes maladies cardiaques (voir la référence ²⁹⁴ pour revue). Ses mécanismes d'action ne sont pas complètement élucidés. Un meilleur couplage de la chaîne respiratoire et une amélioration de la production de l'ATP dans les conditions aérobiques sous l'effet de CoQ semblent être les mécanismes d'action pour expliquer leurs effets cardioprotecteurs ²⁹⁵. Cependant, son effet de découplage de la chaîne respiratoire a aussi été observé par Echtay et al. dû à son rôle de cofacteur avec les protéines de découplage ^{296, 297}. Fontaine et al. ont montré que les analogues de CoQ ont des effets soit neutre, soit inhibiteur sur la respiration mitochondriale non-couplée ^{93, 95}. Dans notre travail, les deux analogues du CoQ, CoQ₂ et CoQ₁₀, découplent la chaîne respiratoire à la concentration de 46µM dans les mitochondries isolées du cœur de lapin sham.

Le rôle du CoQ sur la production de ROS par les mitochondries est aussi proposé pour expliquer sa propriété cardioprotectrice. De nombreuses études ont montré que le CoQ réagit comme un agent antioxydant. Paradoxalement, son caractère pro-oxydant a été démontré par une augmentation de la production de superoxide mitochondrial ^{298, 299}, un phénomène expliqué par une auto-oxydation du CoQ ³⁰⁰. Les résultats variants sont probablement dus aux différentes conditions expérimentales, différentes espèces et différentes concentrations du CoQ testées ^{299, 301}. Dans notre étude, le CoQ₁₀ ne modifie pas la production de H₂O₂ en présence de glutamate/malate, mais diminue significativement la valeur de H₂O₂ en présence de succinate. Le CoQ₂ augmente la production de H₂O₂ quelque soit les substrats utilisés par la chaîne respiratoire. En présence de succinate et le CoQ₂, la roténone ou l'antimycine A n'ont pas d'effet sur la production de H₂O₂. Etant donnée la plus forte affinité du CoQ₂ vis-à-

vis du complexe I par rapport à la roténone³⁰², le CoQ₂ permet de préserver le flux inverse du complexe II vers le complexe I. Ainsi, la production de H₂O₂ reste élevée malgré la présence de roténone. L'ajout de l'antimycine A après la roténone ne peut plus modifier la production de H₂O₂, vu que le flux inverse est la source principale de H₂O₂ dans ces conditions³⁰³.

Les effets régulateurs des analogues de CoQ sur le PTPm sont étudiés par Fontaine et al.^{93,95}. Contrairement à ce qu'ils ont observé dans les mitochondries isolées de foie de rat, le CoQ₂ et le CoQ₁₀ montrent les effets inducteurs sur le PTPm cardiaque du lapin. Nos résultats montrent que les facteurs régulateurs du PTPm varient entre les organes et les espèces. Notre étude n'a pas comme objectif d'étudier le mécanisme d'action des analogues de Coenzyme Q sur le PTPm, mais les résultats obtenus en présence de la CsA et l'acide L-ascorbique nous permettent d'exclure les rôles de la cyclophiline D et des ROS dans ce processus. L'hypothèse proposée par Fontaine et al. comme quoi le flux d'électron à travers le complexe I régule l'ouverture du PTPm nous incite à mieux connaître la structure du PTPm et son interaction avec le complexe I. Dans un deuxième temps, nous avons étudié plus largement l'interaction entre le PTPm et le complexe I.

Etude II

Régulation du pore de transition de perméabilité par le complexe I de la chaîne respiratoire et la cyclophiline D

Contexte du travail

Nous avons réalisé ce travail en collaboration avec l'équipe d'Eric Fontaine (Grenoble). La partie concernant le tissu cardiaque a été réalisée dans notre laboratoire. La partie qui concerne le foie, le muscle squelette et les cellules cancéreuses a été réalisée à Grenoble. Etant donné la cohérence de nos résultats et leurs complémentarités, nous avons choisi de grouper ces travaux et de les soumettre à « Nature ».

Pour la clarté et la cohérence de la thèse, nous avons choisie de faire une synthèse et de discuter uniquement le travail réalisé par nous-même sur les mitochondries cardiaques.

Regulation of Mitochondrial Permeability Transition by Complex 1 and Cyclophilin D

Bo Li^{1,2*}, Christiane Chauvin^{3,4*}, Damien De Paulis^{1,2}, Frédéric De Oliveira^{3,4}, Abdallah Gharib^{1,2}, Guillaume Vial^{3,4}, Xavier Leverve^{3,4}, Michel Ovize^{1,2} & Eric Fontaine^{3,4}

¹INSERM U886

F-69373, Lyon, France

²Université Claude Bernard Lyon 1

F-69373, Lyon, France

³INSERM, U884,

F-38041, Grenoble, France

⁴Université Joseph Fourier, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée,

F-38041, Grenoble, France

Running head: PTP regulation by Complex 1.

Address correspondence to: Eric Fontaine, INSERM U884, Bioénergétique Fondamentale et Appliquée - Université Joseph Fourier - BP 53, F-38041 Grenoble Cedex, France. Tel + 33 476 63 56 01; Fax + 33 476 51 42 18; e-mail: eric.fontaine@ujf-grenoble.fr

*These authors have equally contributed to this work.

The permeability transition pore (PTP) is a mitochondrial inner membrane channel whose prolonged opening leads to the release into the cytosol of mitochondrial pro-apoptotic mediators. Inhibition of PTP opening has been proven to be an effective strategy to prevent oxidative stress-induced cell death, including ischemia-reperfusion injury in man. PTP regulation has been extensively studied in rat liver mitochondria, assuming that it is identical in every tissue. However, respiratory chain Complex 1 inhibition prevents PTP opening in some tissue only. Here we show that low levels of Cyclophilin D characterize tissues where Complex 1 regulates PTP opening, and that detachment or ablation of Cyclophilin D restores the regulation by Complex 1 in tissues with high levels of Cyclophilin D. Because Cyclophilin D is the only indisputable component of the PTP, these results suggest that Complex 1 may be a hitherto unrecognized component of the pore.

The mitochondrial permeability transition (PT) consists in a sudden increase in the permeability of the inner mitochondrial membrane, which becomes non-selectively permeable to molecules smaller than 1500 Da. It is believed that PT is due to the opening of an inner membrane channel regulated by other mitochondrial proteins. This multi proteins complex is called the Permeability Transition Pore (PTP). Despite numerous efforts, the exact molecular nature of the PTP remains elusive. The matrix protein Cyclophilin D (CyP-D) is the only indisputable component of the PTP. Although the molecular target of CyP-D has not been found yet, CyP-D favours PTP opening when it binds the PTP. The reference PTP inhibitor Cyclosporin A (CsA) indirectly inhibits PTP opening by detaching CyP-D from the other components of the pore.

We have shown that direct or indirect inhibition of respiratory chain Complex 1 inhibited PTP opening in U937, KB and HMEC cells, whereas this kind of regulation did not exist in rat liver mitochondria. We therefore started an extensive study to survey the tissues or cells in which Complex 1 inhibition prevented PTP opening.

Matrix Ca^{2+} is the single most important factor for inducing PT. The “PT-inhibitors” and the other so-called “PT-inducers” design compounds that increase and decrease the amount of Ca^{2+} required to induce PT. The Ca^{2+} retention capacity (i.e., the amount of Ca^{2+} required to induce PTP opening) was measured by loading mitochondria or digitonin permeabilized cells with train of Ca^{2+} pulses until a fast Ca^{2+} release occurred. As shown in figure 1, Complex 1 inhibitor rotenone did not inhibit PTP opening in rat liver mitochondria, permeabilized rat hepatocytes, rat heart mitochondria and mice heart mitochondria. In all the other tissues or cell lines tested, rotenone was more potent than CsA at PTP inhibition. This was particularly the case in rat hepatoma MH1C1 cells in rat glioma C6 cells and in mice liver mitochondria, suggesting that the lack of PTP regulation by Complex 1 did not characterize a particular animal species or a particular tissue.

In the presence of both CsA and rotenone, the Ca^{2+} retention capacity was always higher than in the presence of CsA alone. This was particularly the case in rat liver, rat heart and mice heart mitochondria, in which rotenone alone did not affect PTP opening, suggesting that CsA might potentiate rotenone at PTP regulation. On the other hand, rotenone did not potentiate CsA in cells in which CsA was inactive (CLTTi, NIH/3T3, HL60).

CyP-D is the molecular target of CsA, while ANT and Complex 1 have been proposed to be part of the PTP. As shown in figure 2, the CyP-D / ANT and the CyP-D / Complex 1 ratio were dramatically higher in cells in which rotenone alone did not regulate PTP opening as compared with cells in which rotenone alone regulated PTP opening, whereas the CyP-D / cytochrome oxidase ratio remained the same in all the cell tested.

CyP-D can be detached from the PTP by incubating mitochondria either in the presence of CsA, or in hyperosmotic media, or at alkaline pH (figure 3A). As shown in figure 3A, rotenone inhibited PTP opening in rat liver mitochondria once CyP-D has been detached. Rotenone also inhibited PTP opening in permeabilized rat hepatocyte when CyP-D expression was decreased by siRNA (figure 3B), or in mice heart mitochondria from genetically ablated CyP-D (figure 3C).

As shown in figure 1 (insert), rotenone inhibits Complex 1 and PTP opening in a similar concentration manner, suggesting that rotenone inhibits PTP opening because it inhibits Complex 1. As a consequence, a significant inhibition of PTP opening can be obtained when Complex 1 is partly inhibited. Indeed, the antidiabetic drug metformin, which indirectly restricts Complex 1 activity, has been shown to inhibit PTP opening and to prevent PTP opening-induced cell death.

Up to now, the molecular target of CyP-D for PTP regulation has not been found. CyP-D binds the adenine nucleotide translocator (ANT), but CsA regulates PTP opening in ANT-deleted cells, suggesting that ANT is not the molecular target of CyP-D. Whether CyP-D induces PTP opening because it binds one or several components of the PTP is not known. Note however that Complex 1 inhibition regulates PTP opening in a CyP-D-dependent manner, which suggests a direct or an indirect interaction between these two proteins. Therefore, despite the fact that the mechanism by which Complex 1 inhibition regulates PTP opening remains unknown, these results suggest that Complex 1 may be a hitherto unrecognized component of the PTP.

Methods

Liver and heart mitochondria were isolated from rat and mouse as described previously (). Liver mitochondria and permeabilized cells were incubated in a medium containing 250 mM sucrose, 1 mM Pi-Tris and 10 mM Tris-MOPS, while heart mitochondria were incubated in a medium containing 150 mM sucrose, 50 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄ and 20 mM Tris/HCl. Measurements of Ca²⁺ were performed fluorimetrically at 25 °C in the presence of 0.25 μM Calcium Green-5N (excitation :506 nm, emission : 530 nm) with a spectrofluorometer equipped with magnetic stirring and thermostatic controls.

Human fibroblast were obtained from ??? Human lymphocytes were obtained from ??? OV1 cell were a generous gift from ???. These cells were grown in a RPMI medium (Gibco), supplemented with 10% SVF and antibiotics. Mouse fibroblast NIH/3T3 (CRL-1658™), human promyeloblast HL-60 (CCL-240™), human epithelial KB (CCL-17™), human erythroleukemia K-562 (CCL-243™), human fibrosarcoma HT-1080 (CCL-121™), human hepatocellular carcinoma Hep G2 (HB-8065™), rat hepatoma MH1C1 (CCL-144™) and rat glioma C6 (CCL-107™) were obtained from ATCC and were were grown in the medium suggested by the supplier.

Freshly isolated rat hepatocytes () were grown in DMEM medium (Gibco) containing 4.5g/l glucose supplemented with 25% M199 (Sigma), 10% SVF, 0.2 mg/ml BSA, 10μg/ml insulin, 2 mM glutamine, and antibiotics (100 U /ml penicillin and streptomycin). After 24h the medium was supplemented with 1 μM Hydrocortisone, 10 ng/ml EGF and 1 mg/ml BSA.

Rat hepatocytes were transfected in a serum and antibiotics-free DMEM transfection medium by cationic liposomes, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). CyD-targeting siRNA oligonucleotides CAAGAGCCCUGAGUUAUGU (oligo n°1) and GAGGACUGUUCAGAAAUCU (for oligo n°2) were obtained from Eurogentec. Oligonucleotides (300 pmoles) were added to the transfection medium and combined to lipofectamine according to the manufacturer's protocol. After 20 minutes incubation,

complexes were added to a 100 mm culture dish containing 5 ml transfection medium. Hepatocytes were then added at a density of 1 million per dish and incubated at 37°C for 4 hours. After this period the culture medium was supplemented with SVF and antibiotics for 20 hours.

Total proteins from cells or liver lysates were separated by 10% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes and probed with antibodies against the human CyD (rabbit polyclonal antibody (affinity bioreagent PA1028)), against the human complex 1 39 KDa subunit (mouse monoclonal Molecular Probes A21344), against the human cytochrome oxydase subunit 4 (cox4) (mouse monoclonal Molecular Probes A21348), against the ANT-1 (mouse monoclonal Mitosciences MSA02) and against actin (mouse monoclonal Sigma A 3853). Detection was performed by enhanced chemiluminescence (ECL) (GE-Healthcare) and densitometry was performed with NIH image software.

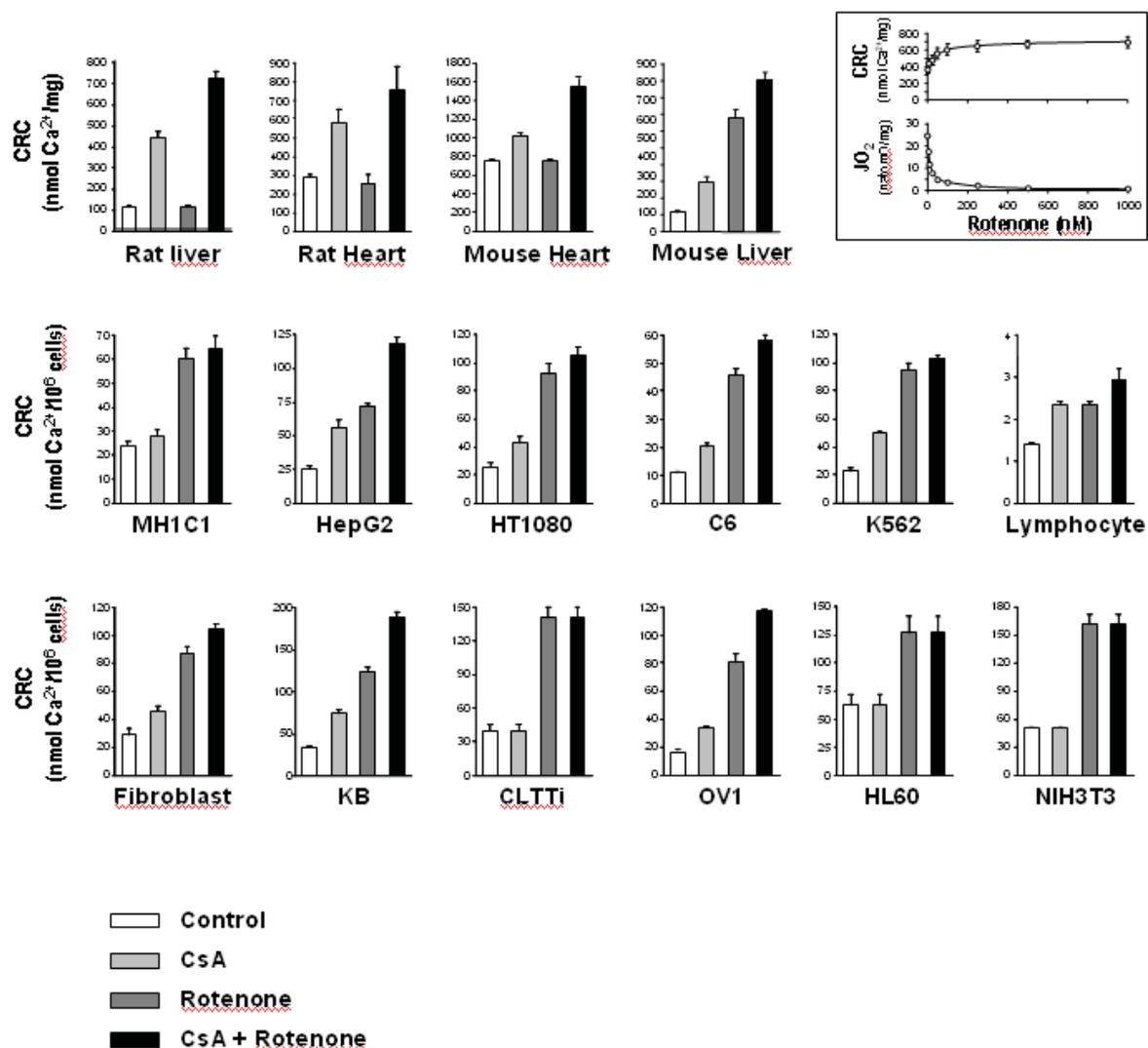


Figure 1. Rotenone inhibits PTP opening in most of the tested tissues. The incubation medium (see material and methods) was supplemented with 5 mM succinate-Tris, and 0.25 μ M Calcium Green-5N. The final volume was 2 ml, pH 7.4, 25 °C. Experiments were begun by the addition of either 2 mg isolated mitochondria or $4 \cdot 10^6$ cells plus 50 μ M digitonin, followed by the addition of either vehicle (control), 1 μ M CsA, 1 μ M rotenone or 1 μ M CsA plus 1 μ M rotenone. After 2 min of incubation, the Ca²⁺ Retention Capacity (CRC) was measured by adding Ca²⁺ pulses until PTP opening. Results are mean \pm S.D. of at least four independent experiments. **Insert:** Isolated rat liver mitochondria were incubated as indicated above in the presence of 1 μ M CsA. The oxygen consumption rate (JO_2) and the CRC were measured in parallel experiments at the indicated concentration of rotenone.

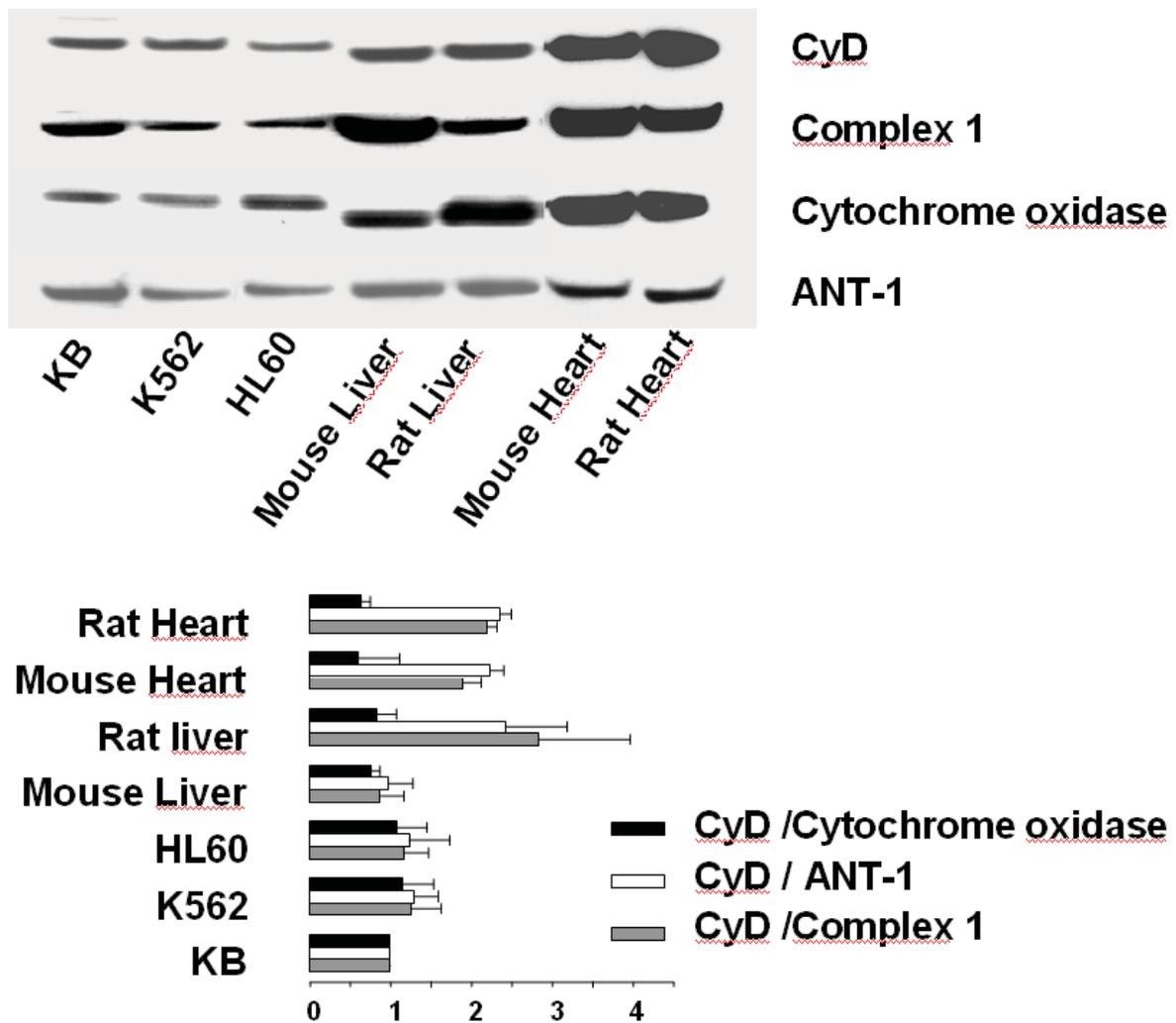


Figure 2. Cy-D is elevated in tissues in which rotenone does not inhibit PTP opening.
Upper: Representative experience with 50 μ g of total proteins from lysates separated by 10% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes and probed with antibodies against CyD, Complex 1 (39 KDa), Cytochrome oxidase (Cox4) and ANT-1. **Lower:** Each immunoblot was quantified and the ratio were calculated. For an easier comparison, the ratio were normalized (divided by the proper ratio observed in KB cells). Results are mean \pm S.D. of at least three independent immunoblots.

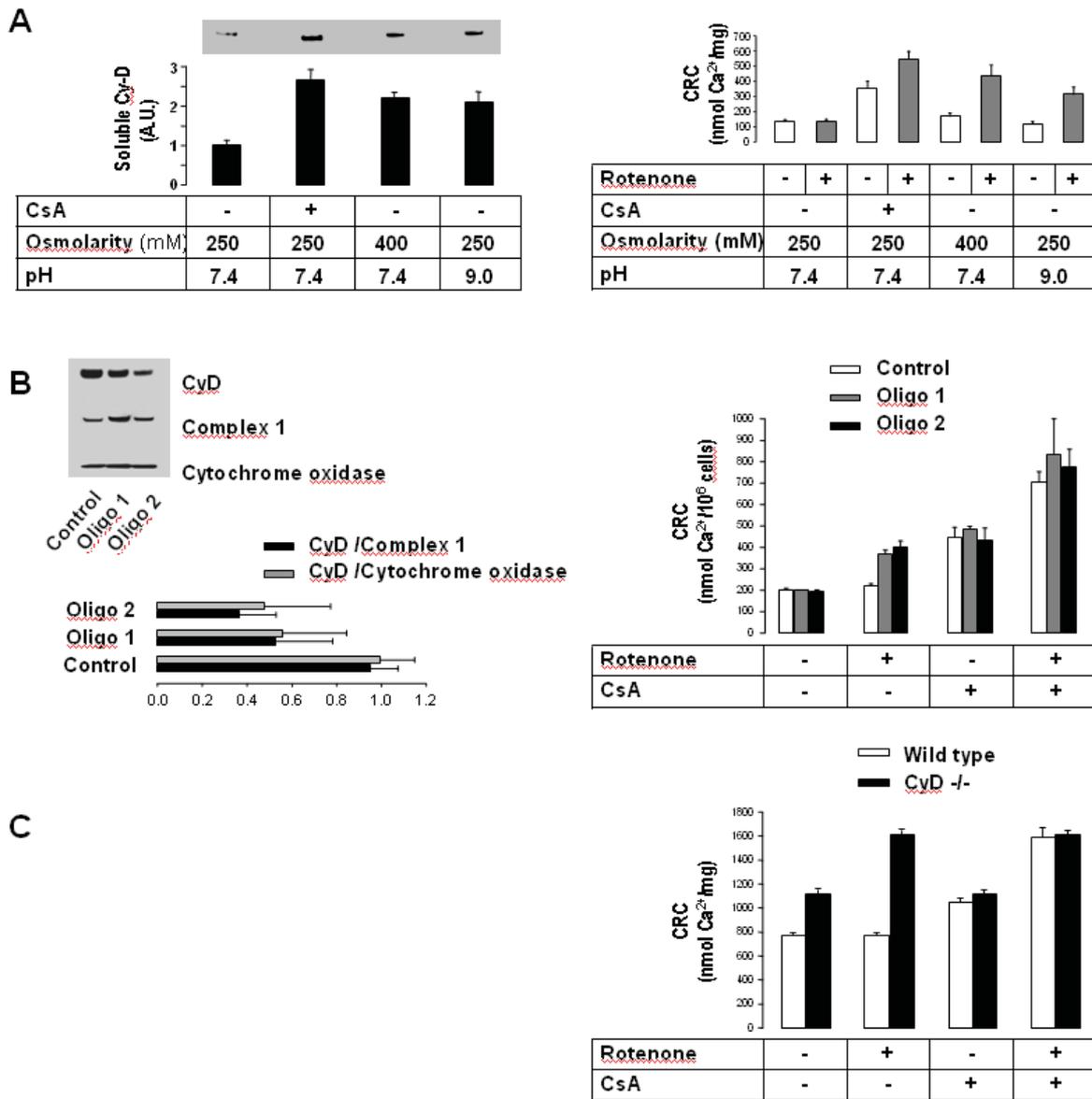


Figure 3. Detachment of CyD or decrease in CyD content allows rotenone to inhibit PTP opening. **A:** Isolated rat liver mitochondria were incubated in a medium containing 1 mM Pi-Tris, 10 mM Tris-MOPS, 5 mM succinate-Tris, 0.25 μ M Calcium Green-5N and the indicated concentration of sucrose in the presence or absence of 1 μ M CsA. The final volume was 2 ml, pH as indicated, 25 $^{\circ}$ C. The CRC was measured as in figure 1. The same mitochondria were then broken and centrifuged for 30 min at 8000g. The supernatants were run on 10 % SDS-PAGE, blotted and probed with a polyclonal antibody against CyD. Results (CRC and quantification of unbound CyD) are mean \pm S.D. of 5 different assays. **B:** Rat hepatocytes (1 million cells) were transfected with CyD siRNA oligonucleotides (50 nM) using lipofectamine 2000 in a DMEM medium, then incubated in 100 mm plates for 24h. Quantification of CyD, Complex 1 and Cytochrome oxidase were performed on hepatocyte

lysates as described in figure 2, ratio being normalized on the control condition. The CRC measurements were performed on digitonin-permeabilised rat hepatocytes as described in figure 1. Results (CRC and quantification of CyD, Complex 1 and Cytochrome oxidase) are mean \pm S.D. of 5 different assays. **C:** Heart mouse mitochondria isolated from wild type or CyD $-/-$ animal were incubated as in figure 1 in order to measure the CRC. Results are mean \pm S.D. of 3 different assays.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Un certain nombre de résultats complémentaires (non publiés) renforcent ces résultats.

1. Effets de la roténone et de la CsA sur le gonflement de la mitochondrie induit par le Pi et le FCCP.

A part la surcharge calcique, l'accumulation du Pi et la dépolarisation de la membrane mitochondriale sont aussi des facteurs importants qui favorisent l'ouverture du PTPm^{22, 78}. Les expérimentations ont pour but d'examiner si la roténone est capable d'augmenter l'inhibition du PTPm en présence de la CsA quand l'ouverture du PTPm est provoquée par le Pi et le FCCP. A l'état basal, le gonflement mitochondrial est induit par CaCl₂ (260nmol) et accentué ensuite par l'ajout du Pi (8mM) ou du FCCP (3μM). Dans les deux cas, la combinaison de la CsA et de la roténone montre des effets inhibiteurs plus puissants que la CsA seule. La roténone seule n'a pas d'effet sur le gonflement mitochondrial (Figure 15). Ces observations sont ensuite confirmées par les résultats obtenus chez les souris CyP-D^{-/-} où la roténone seule a montré son effet inhibiteur sur le gonflement quelque soit l'inducteur (Figure 16). Ces résultats démontrent que le puissant effet inhibiteur fourni par la combinaison de l'inhibition (ou l'ablation) de la CyP-D et la roténone est un phénomène général sur la susceptibilité du PTPm cardiaque.

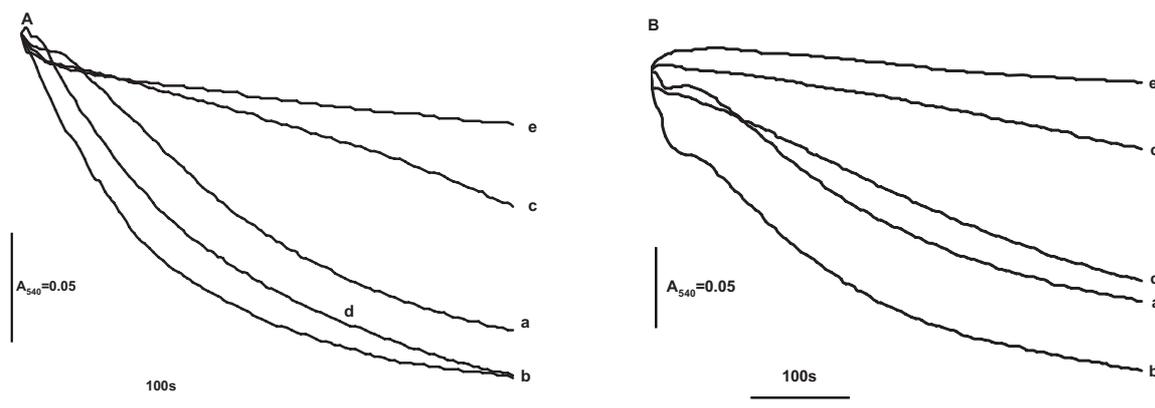


Figure 15. Effets de la roténone, de la CsA et de la roténone plus CsA sur les gonflements mitochondriaux induits par le Pi et le FCCP. Les conditions expérimentales sont décrites dans la partie « Méthodes et Matériels ». Le volume final est de 1ml, le pH est à 7,4 à température ambiante. Le gonflement mitochondrial est détecté par spectrophotométrie ($\lambda=540\text{nm}$). L'expérimentation débute par l'ajout des mitochondries (200μg de protéines) pré chargées par CaCl₂ 200nmol (tracé a). Le Pi 8mM ou le FCCP 3μM sont ajoutés dans le milieu

d'incubation, qui accentue le gonflement mitochondrial (tracé b dans la fig. A et fig. B respectivement), suivi par l'ajout de la CsA 1 μ M (tracé c), de la roténone 625 nM (tracé d) ou la combinaison de la CsA 1 μ M plus la roténone 625nM (tracé e).

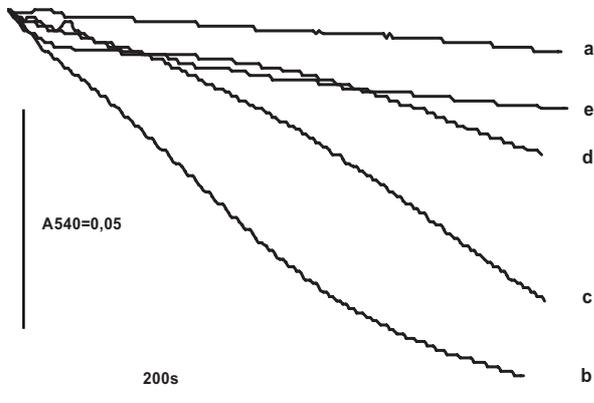


Figure 16. Effets de la roténone sur les gonflements mitochondriaux induits par le Pi et le FCCP dans les mitochondries isolées de cœur de souris CyP-D^{-/-}. Les conditions expérimentales sont celles décrites dans la Figure 15. L'expérimentation débute par l'ajout des mitochondries (200 μ g de protéines) pré chargées par CaCl₂ 500nmol (tracé a). Le Pi 8mM ou le FCCP 3 μ M sont ajoutés dans le milieu d'incubation, qui accentue le gonflement mitochondrial (tracé b et c respectivement), suivi par l'ajout de la roténone 625 nM (tracé d et e respectivement). Les mitochondries CyP-D^{-/-} ne sont plus sensibles à la CsA (résultat non montré).

2. Effets des substrats artificiels du complexe IV de la chaîne respiratoire sur l'inhibition du PTPm par la roténone et la CsA.

La CRC en présence de TMPD-Ascorbate, donneur des électrons au cytochrome *c*, est examinée afin de déterminer si l'effet potentiel de la roténone sur le PTPm dépend de son rôle inhibiteur sur le flux d'électrons par le complexe I. La figure 17 montre que, dans ces conditions, aucune différence sur la CRC n'est détectée entre les mitochondries traitées par la CsA seule et celles traitées par la CsA et la roténone. Donc c'est bien par l'inhibition du complexe I que la roténone présente son rôle inhibiteur sur le PTPm.

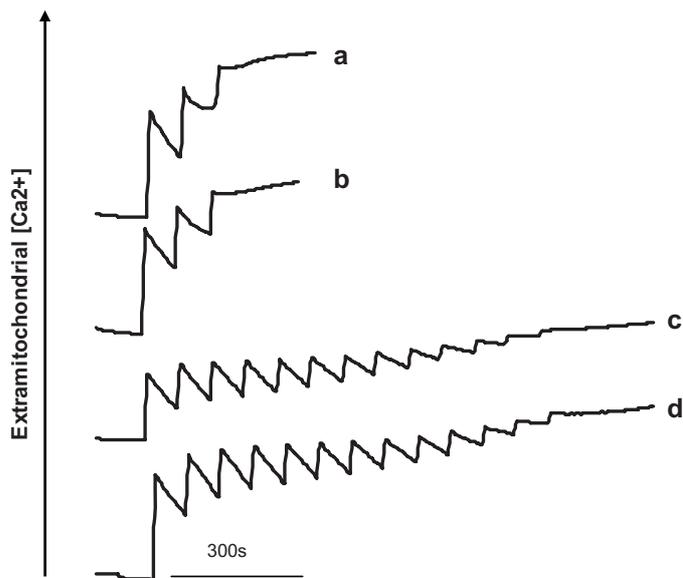


Figure 17. Détermination de la CRC avec le TMPD-Ascorbate comme substrat. Les conditions expérimentales sont décrites dans la partie « Méthodes et Matérielles » à l'exception du fait que le succinate est remplacé par le TMPD-ascorbate 1.25mM-125µM (trace a). Le milieu d'incubation est supplémenté par la roténone 625nM (trace b), la CsA 1µM (trace c) et la combinaison de la roténone 625nM avec CsA 1µM (tracé d).

3. Effets de la roténone et de la CsA sur la production de H₂O₂ par les mitochondries.

Les ROS sont des facteurs inducteurs de l'ouverture du PTPm. Il est connu que la roténone inhibe la production de ROS en présence du succinate. La figure 18 montre que, en présence de roténone, aucune différence significative sur la production de H₂O₂ n'est détectée entre les groupes avec ou sans CsA. Ces résultats sont confirmés chez la souris Cyp-D^{-/-} (résultat non montré). La modification de la production de ROS par la roténone n'est pas suffisante pour expliquer l'effet inhibiteur plus puissant obtenu par la combinaison de la roténone et la CsA que par la CsA seule.

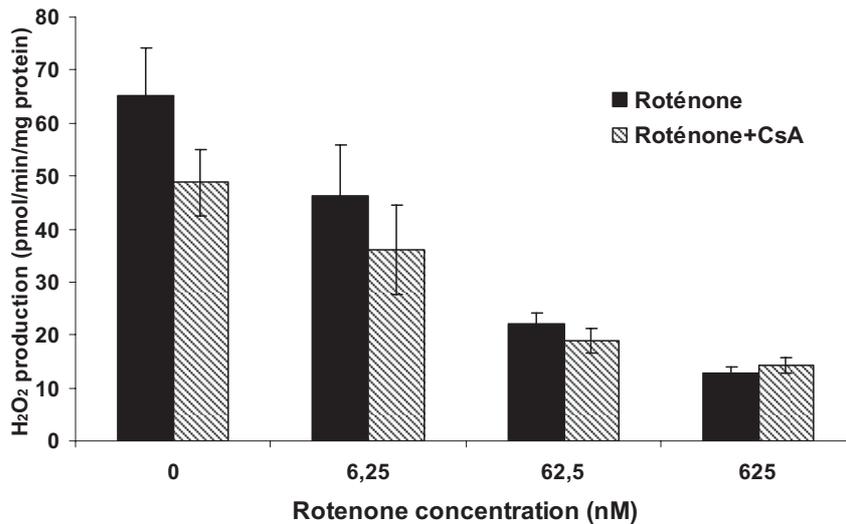


Figure 18. Production d'H₂O₂ par les mitochondries de cœur de rat. La production d'H₂O₂ par les mitochondries est mesurée dans les conditions indiquées dans « Matériel et méthodes » en présence de la rotenone à la concentration indiquée (bar solide) ou après l'ajout de la CsA 1 μM (bar hachuré). Les résultats sont présentés en moyenne ± S.E. (n=6).

4. Effets de la rotenone et de la CsA sur le PTPm du cœur ischémique.

L'ouverture du PTPm est une cause majeure de mort cellulaire suite à l'ischémie-reperfusion. La Figure 19 montre que la CRC obtenue dans les mitochondries isolées du cœur ischémique (subit 40min d'ischémie globale et 5min de reperfusion en mode Langendorff) est gravement atténuée à 31±4 nmol/mg protéine. Comme dans les mitochondries sham, la CsA augmente la CRC de 70%. Dans les mitochondries ischémiques, le traitement avec la rotenone seule peut déjà retarder significativement l'ouverture du PTPm. La combinaison de la CsA et de la rotenone peut non seulement augmenter significativement la valeur de CRC par rapport aux autres trois groupes, mais aussi améliorer la cinétique de l'accumulation de Ca²⁺ (Figure 19 A.). Ce résultat suggère que le site inhibiteur de la rotenone est démasqué par l'ischémie-reperfusion, un phénomène qui rend la rotenone seule active sur le PTPm. La combinaison de la CsA et de la rotenone montre un effet inhibiteur encore plus puissant sur le PTPm issu de cœur ischémique.

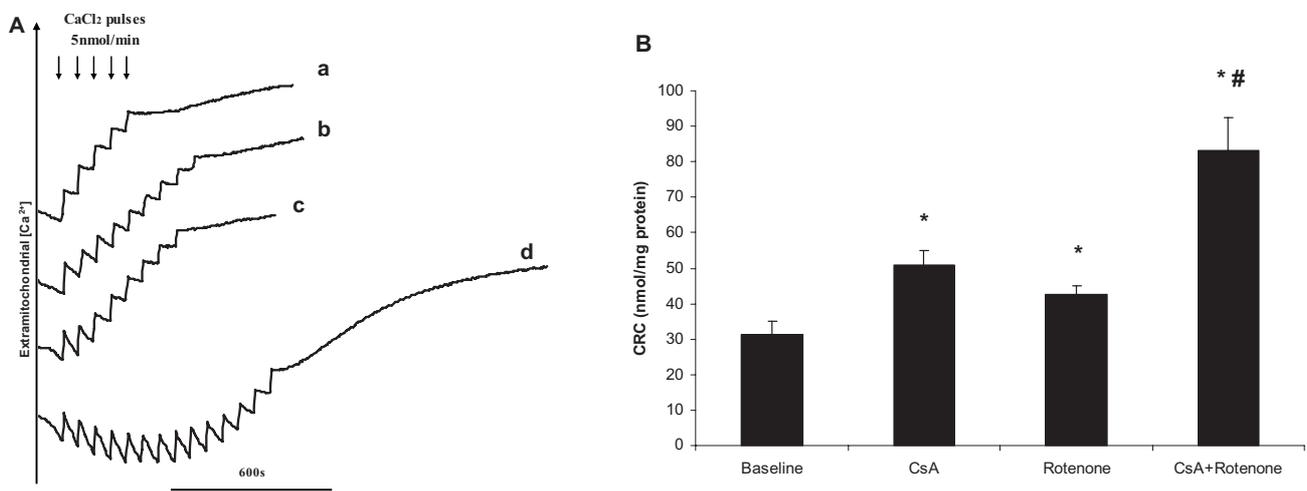


Figure 19. Effets de la CsA, de la roténone et de la roténone plus CsA sur la CRC des mitochondries isolées de cœur ischémiq ue de rat. A. Les mitochondries 1mg sont incubées dans les conditions indiquées dans « Matériel et méthodes » (tracé a), et supplémentées avec CsA 1 μ M (tracé b), la roténone 625nM (tracé c) et CsA 1 μ M+roténone 625nM (tracé d). B. Les CRC mesurées à l'état basal, en présence de la CsA 1 μ M, la roténone 625nM, la CsA1 μ M plus la roténone 625nM. Les résultats sont présentés en moyenne \pm S.E. (n=4). *P<0.01 vs l'état basal. # P<0.05 vs le groupe CsA.

Synthèse des résultats et discussion

Le rôle de flux d'électrons à travers le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale sur la régulation du PTPm a été proposé par l'équipe de Fontaine depuis 1998. Ce phénomène a été examiné sur les mitochondries isolées du foie, du muscle squelette et des cellules cancéreuses. Nous avons repris ce travail et nous l'avons élargi sur les mitochondries cardiaques de rat et de souris. La capacité de rétention de calcium est examinée dans les mitochondries isolées de cœurs de rats et de souris après stimulation du Complexe II par la succinate. L'inhibiteur du complexe I (la roténone) ne montre aucun effet sur la capacité de rétention du Ca²⁺ (CRC) par les mitochondries sham. Il inhibe légèrement l'ouverture du PTPm dans les mitochondries issues des cœurs ischémiq ues. Cependant, la combinaison de la roténone et de la CsA augmente la CRC par la mitochondrie de 200% par rapport à la CsA seule. Bien que la roténone inhibe la production de H₂O₂, aucune différence n'est détectée entre les groupes sans ou avec la présence de la CsA. Dans un modèle de souris cyclophilin D déficientes, la roténone seule inhibe l'ouverture du PTPm d'une façon comparable à celle obtenue en présence de la roténone et de la CsA chez les WT. Ce résultat démontre que le flux d'électrons à travers le complexe I peut jouer un rôle dans la régulation du mPTP cardiaque

en relation avec la Cyp-D. La modification de production de ROS sous l'effet de la roténone n'est pas suffisante pour expliquer son effet sur l'ouverture du PTPm.

Bien que dans ce travail, l'utilisation de la roténone en présence du succinate attire l'attention sur un mécanisme impliquant le flux inverse d'électrons du complexe II vers le complexe I, il semble que c'est le flux des électrons du complexe I qui soit à l'origine de cette régulation. En effet, il est connu que le PTPm montre moins de tolérance face à la charge calcique en présence de substrats de complexe I qu'en présence de succinate⁹². Ce phénomène suggère d'un côté que le complexe par où entrent les électrons dans la chaîne respiratoire joue un rôle important dans la régulation du PTPm, mais d'un autre côté, il montre indirectement que ce n'est pas le flux inverse des électrons en présence du succinate qui rend le PTPm plus vulnérable. Le deuxième argument qui exclut le rôle de flux inverse d'électrons vient du résultat de gonflement mitochondrial induit par le FCCP. Le flux inverse des électrons du complexe II vers le complexe I est un phénomène ATP-dépendant³⁰⁴. Le FCCP découple la chaîne respiratoire et abolit totalement ce flux inverse d'électrons¹⁵. Cependant, l'effet inhibiteur de la combinaison de la roténone et la CsA persiste face à la présence de FCCP. Dans nos conditions de travail, via le cycle de Krebs, le succinate peut être converti en substrats qui fournissent NADH au complexe I (le malate par exemple) et est responsable de la production de ROS par le complexe I¹⁵. Nous concluons que c'est le flux d'électrons à travers le complexe I qui régule l'ouverture du PTPm cardiaque.

Composé d'au moins 43 sous-unités, le complexe I est le plus gros complexe de la chaîne respiratoire chez les mammifères²⁸⁵. L'anomalie ou le dysfonctionnement du complexe I est impliqué dans de nombreuses maladies neurodégénératives, le vieillissement ou le diabète³⁰⁵. Dans notre travail, nous présentons son rôle sur la régulation de l'ouverture du PTPm, un facteur essentiel qui dirige les cellules cardiaques vers la vie ou la mort. Le mécanisme d'action du complexe I dans ce processus reste inconnu. Notre résultat montre qu'il est lié à l'état de cyclophiline D, un autre régulateur important du PTPm, mais indépendant de la production de ROS. Les modifications de conformation pendant l'interaction entre la cyclophiline D et le complexe I sont des facteurs majeurs pour expliquer les effets observés sur l'ouverture du PTPm. Une meilleure connaissance sur la structure du complexe I et le développement d'inhibiteurs spécifiques dirigés contre les sous-unités du complexe I nous aideront à élucider le mécanisme d'action de complexe I sur la régulation du PTPm.

La recherche sur les régulateurs du PTPm cardiaque nous permettra de développer des agents pharmacologiques nouveaux qui possèdent des activités cardioprotectrices. Dans notre étude, le résultat obtenu avec les mitochondries ischémiques sur le PTPm semble montrer que l'inhibition de complexe I soit un traitement prometteur. Par ailleurs, dans un modèle de cœur isolé-perfusé, l'équipe de Lesnefsky^{233, 306, 307} a montré l'effet protecteur d'un inhibiteur réversible du complexe I. Il sera intéressant d'examiner l'état du PTPm de mitochondries issues de ces cœurs traités.

Etude III

**Postconditionnement pharmacologique par le périndoprilate sur un
modèle de cœur isolé de rat**

Résumé

Objectif: L'objectif de cette étude est de déterminer dans un premier temps l'effet protecteur du postconditionnement induit par le périndoprilate, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Nous tenterons également de montrer l'implication de monoxyde d'azote (NO) dans cette protection.

Matériels et Méthodes : Des cœurs isolés de rats sont perfusés en mode Langendorff. Ils sont ensuite inclus dans 2 séries d'expérience. Dans une première étude, les cœurs ont été inclus dans six groupes subissant 40 minutes d'ischémie et 2 heures de reperfusion : un groupe sans aucune autre intervention (Contrôle), un groupe recevant du périndoprilate (100nM) pendant la reperfusion (Per), un groupe recevant le postconditionnement de 6 cycles de ischémie/reperfusion de 10 secondes immédiatement après l'ischémie (PostC), un groupe recevant L-NAME (100 μ M), un inhibiteur non-spécifique de NO synthase, pendant la reperfusion (L-NAME), un groupe recevant à la fois du périndoprilate et du L-NAME pendant la reperfusion (L-NAME+Per), et un groupe recevant le postconditionnement et du L-NAME pendant la reperfusion (L-NAME+PostC). A la fin de ce protocole, l'aire à risque et la zone infarctée ont été évaluées par injection de bleu Uniprise puis marquage par du TTC. Dans la seconde série d'expérience, les cœurs ont été randomisés en deux groupes : un groupe contrôle subissant 40 minutes d'ischémie et 5 minutes de reperfusion, un deuxième groupe recevant du périndoprilate pendant les 10 minutes de reperfusion. A la fin du protocole, les mitochondries ont été isolées à partir de ces cœurs. La capacité de rétention du calcium (CRC) et la production de ROS par les mitochondries ont été mesurées.

Résultats : Le PostC et le périndoprilate administrés respectivement pendant la reperfusion peuvent tous deux diminuer la taille de l'infarctus par rapport au groupe contrôle (20,4 \pm 2,6%, 24,6 \pm 2,3% versus 31,6 \pm 2,5%, $p < 0,05$). L'effet protecteur de PostC et du périndoprilate est aboli par le L-NAME. Aucune différence significative entre le groupe contrôle et le groupe périndoprilate n'est détectée sur la respiration mitochondriale, la CRC ou sur la production de ROS.

Conclusion : Le postconditionnement pharmacologique par le périndoprilate protège le cœur ischémique. La préservation du NO est un facteur essentiel dans ce processus. Cependant, cette cardioprotection pourrait s'effectuer d'une manière mitochondrie-indépendante.

Pharmacological Postconditioning by Perindoprilat

Bo LI

Abdallah GHARIB

Pascal Chiari

Professor Michel OVIZE

Collaboration with Laboratoire SERVIER

Abstract

Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor is widely used in the treatment of coronary artery disease. The mechanism of cardioprotection by ACE inhibitor is not elucidated. We tested the hypothesis that ACE inhibitor protects heart from injury by elevating nitric oxide (NO) production and inhibiting mitochondrial permeability transition pore (mPTP). Rat isolated hearts perfused at constant-pressure underwent 40 min regional ischemia and 120min reperfusion. Postconditioning (PostC, i.e. 6 episodes of 10s reperfusion followed by 10s ischemia) or reperfusion with perindoprilat (100nM), an ACE inhibitor, reduced the infarct size (expressed as a percent of risk size) compared to control group (20.4±2.6%, 24.6±2.3% versus 31.6±2.5%, $p<0.05$). The protective effect of PostC and perindoprilat was attenuated by L-NAME (100µM), a non-specific inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), administered during reperfusion. We also examined the function of mitochondria isolated from hearts harvested after 40min ischemia and 5 min reperfusion. No significant difference was found in the Ca^{2+} overload required to induce mPTP opening, in mitochondrial respiration or in reactive oxygen species (ROS) production between control and perindoprilat group. This suggests that NO preservation is a key factor in cardioprotection of ACE inhibitor. However, this protection might work in a mitochondria-independent manner.

Introduction

Recent evidence indicates that an important amount of cardiomyocytes are irreversibly injured at the time of reperfusion. Zhan et al. reported that brief episodes of ischemia-reperfusion performed at the onset of reflow decrease infarct size by 40 to 70%¹. This major cardioprotection, termed “postconditioning”, has now been reported in several animal species²⁻⁶. The mechanism of postconditioning remains unclear, yet it may involve activation of the PI3-kinase-Akt-eNOS pathway⁷. We recently demonstrated that mitochondrial permeability transition, that plays a major role in lethal ischemia-reperfusion injury, may be involved in postconditioning⁸⁻¹³. Mitochondria isolated from postconditioned rabbit hearts displayed an increased resistance to Ca^{2+} -induced mPTP opening⁸. Our group further reported that opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) might be regulated by PI3K during ischemia-reperfusion¹⁴.

Postconditioning, unlike preconditioning, may be of major clinical interest. In fact, Staat et al. recently demonstrated that postconditioning may protect the human heart¹⁵. Patients with ongoing acute myocardial infarction (AMI) that underwent four brief episodes of angioplasty balloon inflation-deflation at the onset of reperfusion as a postconditioning regimen exhibited a decreased creatin kinase (CK) release, a surrogate marker for myocardial infarction, during reperfusion. Unfortunately, postconditioning by angioplasty cannot be applied to all AMI patients, and there is a need for pharmacological agent that could mimic postconditioning, as an adjunctive treatment of thrombolysis. For the time being, such agents are missing.

Perindoprilat is a well-known ACE inhibitor used in the treatment of hypertension. The Europa trial recently demonstrated that perindoprilat is also of major interest in patients with chronic coronary artery disease¹⁶. Perindoprilat increases tissue bradykinin¹⁷ and bradykinin *per se* is a cardioprotective agent, possibly acting via an increased NO production^{17,18}. Bell et al. reported that administration of bradykinin at the time of reperfusion can decrease infarct size in the isolated rat heart¹⁹. Preliminary data by Park et al. suggest that bradykinin may prevent reperfusion injury through inhibition of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)²⁰. It was reported that GSK3 β inhibits mPTP opening^{21,22}.

The general objective of the present study is to determine whether perindoprilat, administered at the time of reperfusion following a prolonged ischemic insult, may postcondition the heart. Specifically, using the isolated rat heart model, we will determine whether administration of perindoprilat at the time of reflow could reduce infarct size in an NO-dependent manner and ameliorate mitochondrial function.

Methods

Surgical Preparation

The investigation conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institute of health (NIH Publication No.85-23, revised 1996).

Male Wistar rats, weighting 300-350g, were anesthetized with pentobarbital (50mg/kg intraperitoneally), and heparin (200 UI/kg) was injected into the femoral vein. Hearts were removed and immediately arrested in ice-cold Krebs solution. The aorta was rapidly cannulated and perfused for 15min in the Langendorff mode using Krebs-Henseleit

bicarbonate buffer (containing in mmol/L: glucose 11.0, NaCl 118.5, KCl 4.75, MgSO₄ 1.19, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 24.0, CaCl₂ 1.4) at pH 7.4. The buffer was bubbled with 97% O₂ / 3% CO₂ at 37°C. Coronary flow was adjusted to achieve a coronary perfusion pressure of 73mmHg, which was thereafter kept constant using a feedback device. Temperature was continuously monitored by a thermoprobe inserted into the right atrium. A domestic-food-wrap-made, fluid-filled, isovolumic balloon was introduced into the left ventricle through the left atrial appendage and inflated to give a preload of 4 to 10mmHg. Electrocardiogram and left ventricular pressure were recorded continuously on a computer through a data-acquisition system (Chart V5, Powerlab / 4SP, ADInstruments, UK). Heart rate was monitored simultaneously as computed inputs derived from left ventricular pressure. A surgical needle was passed under the left main coronary artery (LCA), and the ends of the thread were passed through a small plastic tube to form a snare. Regional ischemia was induced by tightening the snare, and reperfusion was started by releasing the ends of the thread.

Exclusion criteria

Any heart with a heart rate less than 250 beats/min, or a coronary flow more than 18 ml/min or less than 8 ml/min at the end of 15min stabilization was excluded from the study. Hearts failing to develop left ventricular systolic pressure of more than 85mmHg when the end-diastolic pressure was kept less than 10mmHg were also excluded.

Experimental design

The hearts underwent 40min of regional ischemia followed by 120min of reperfusion. Animals were randomly assigned into one of the following groups (n=9-14 rats/group): (Figure 1.)

- Control group (C): no additional intervention
- Perindoprilat group (Per): perindoprilat 100nM was administered throughout the reperfusion period.
- Postconditioning group (PostC): The postconditioning consisted of six cycles of 10s reperfusion / 10s global ischemia immediately after release of the prolonged ischemia.
- NOS inhibitor group (L-NAME): the hearts received an NOS inhibitor L-NAME 100μM throughout all the reperfusion period.
- Perindoprilat + NOS inhibitor group (L-NAME+Per): L-NAME and perindoprilat was administered throughout the reperfusion period.

- PostC + NOS inhibitor group (L-NAME+PostC): L-NAME was administered throughout the reperfusion period in the PostC group.

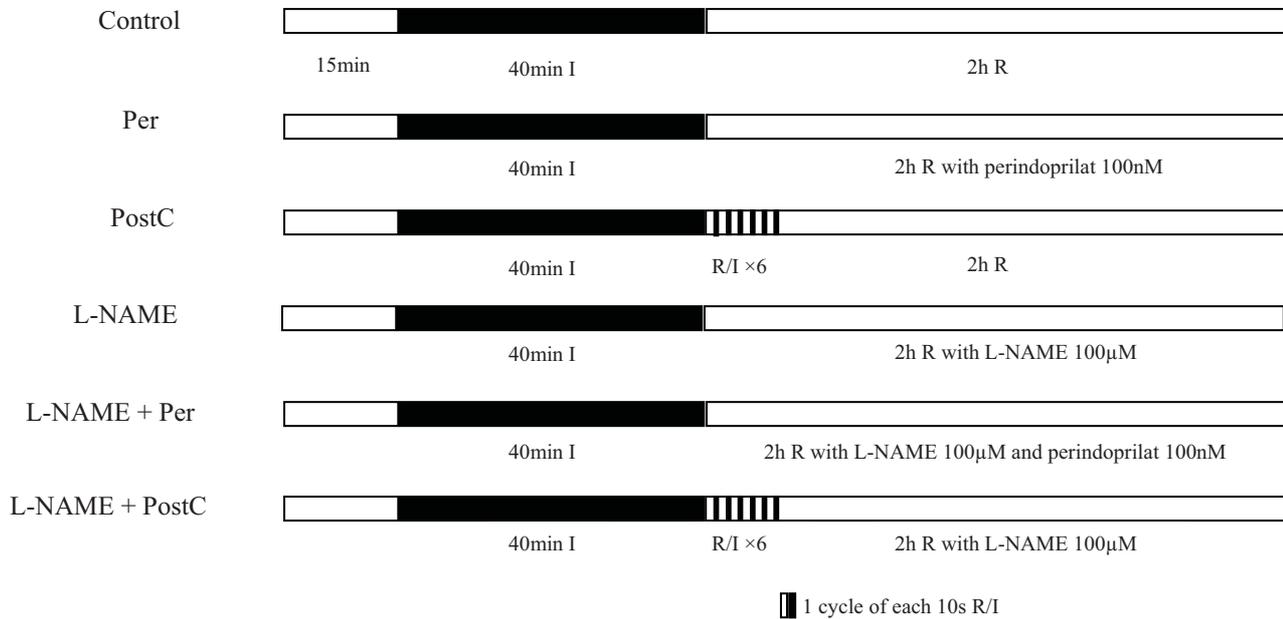


Figure 1. Experimental protocol : control, occlusion of LCA for 40min (I, dark bar), was followed by 2h of reperfusion (R, open bar); Per, the hearts received 2h of reperfusion with perindoprilat 100nM after 40min of ischemia; PostC, 10s of reperfusion and 10s of global ischemia were repeated for six cycles immediately at onset of reperfusion; L-NAME, the hearts were treated with L-NAME 100µM during all the reperfusion period; L-NAME+Per, the hearts received both L-NAME and perindoprilat during reperfusion; L-NAME+PostC, the six-cycle algorithm was applied before reperfusion with L-NAME.

Infarct size assessment

After 120min reperfusion, the left coronary artery was re-occluded and 0.3ml of 20% Uniperse blue pigment (ciba-Geigy) was infused via aorta to discriminate the ischemic risk zone. The heart was excised and extra-left ventricular tissue was removed. The left ventricle (LV) was cut into 5 transverse slices, parallel to the atrioventricular groove. Each heart slice was photographed for later measurement of the area at risk. The heart slices were then incubated for 10min in a 1% solution of triphenyltetrazolium chloride at 37°C to differentiate infarcted (pale) from viable myocardial area (brick red). Each heart slice was rephotographed and weighed. The ischemic risk area, infarcted area and total LV area

were measured using computerised planimetry and corrected for the weight of the tissue slices. Determination of area at risk and infarct size was performed in a blinded manner. Total weights of the area at risk and the area of necrosis were then calculated and expressed as percentage of total LV weight and of the area at risk weight, respectively.

Detection of mitochondrial function

The hearts destined for biochemical study (n=7 in control group, n=9 in perindoprilat group) underwent 40min global ischemia followed by 5min reperfusion. At the end of the protocol, the heart was excised and mitochondria were isolated as previously described²³. All operations were carried out in the cold (4°C). LV was placed in isolation buffer A containing 70mM sucrose, 210mM mannitol, 1mM EDTA in 50mM Tris/HCl pH 7.4. The tissue was finely minced with scissors and then homogenized in the same buffer (10ml buffer/ g tissue) using a Kontes tissue grinder. The homogenate was centrifuged at 1300g for 3min. The supernatant was poured through cheesecloth and centrifuged at 10000g for 10min. The mitochondrial pellet was resuspended in isolation buffer B containing 70mM sucrose, 210mM mannitol in 50mM Tris/HCl, pH7.4 at 4°C. Aliquots were removed for protein measurements. Protein content was routinely assayed according to Gornall's procedure using bovine serum albumin as a standard²⁴.

Mitochondrial Oxidative Phosphorylation

Oxygen consumption in freshly isolated mitochondria was measured at 25°C with a Clark-type large-diameter Orbisphere oxygen electrode controlled chamber (Oroboros Oxygraph, Paar, Graz, Austria). Mitochondria (250 µg proteins) were incubated in buffer (pH 7.4) containing 80mmol/L KCl, 50mmol/L 4-morpholinepropanesulfonic acid, 1mmol/L EGTA, 5mmol/L KH₂PO₄, and 1mg/mL defatted BSA. Pyruvate (3mmol/L), malate (3mmol/L) and glutamate (3mmol/L) were used as substrates that donate electrons to complex I. State 3 (200µmol/L ADP stimulated), state 4 (ADP limited) and respiratory control ratio were determined.

Calcium Retention Capacity

Adapted from the description by Ichas et al.²⁵, calcium retention capacity (CRC) was defined here as the amount of Ca²⁺ required to trigger a massive Ca²⁺ release by isolated cardiac mitochondria. It is used as an indicator of the resistance of the mPTP to opening after matrix Ca²⁺ accumulation and expressed as nmol CaCl₂ per mg mitochondrial

proteins. Extramitochondrial Ca^{2+} concentration was recorded fluorimetrically in the presence of 0.5 $\mu\text{mol/L}$ calcium green-5N, with excitation and emission wavelengths set at 500 and 530 nm, respectively. Isolated mitochondria (200 μg proteins) were suspended in 2 ml buffer (150 mmol/L sucrose, 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L KH_2PO_4 , and 5 mmol/L succinic acid in 20 mmol/L Tris/HCl, pH 7.4). At the end of the preincubation period (90 seconds), 5-nmol CaCl_2 pulses were performed every 60s. After sufficient calcium loading, extramitochondrial calcium concentration abruptly increased, indicating a massive release of calcium by mitochondria as a result of mPTP opening.

H₂O₂ Production

Isolated mitochondria (200 μg protein) were incubated in the same buffer as for CRC study in presence of different substrates and inhibitors of respiratory chain. The rate of H_2O_2 production in mitochondria was determined using the oxidation of the fluorogenic indicator amplex red (10 μM) in the presence of horseradish peroxidase (0,6 units) ²⁶. Excitation and emission wavelength was set at 530 and 590nm respectively. Standard curve was obtained by adding known amounts of H_2O_2 to assay medium in the presence of amplex red and horseradish peroxidase.

Drugs

Unless otherwise specified, all chemicals and reagents were purchased from Sigma Aldrich (France). Perindoprilat was obtained from Laboratoires Servier. Calcium Green[®]-5N and Amplex Red[®] reagents were purchased from Molecular Probes, Inc. (Cergy Pontoise, France).

Statistics

All results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons were performed using Student *t*-test or one-way ANOVA followed by LSD test. A *p* value less than 0.05 was considered as indicative of a statistically significant difference.

Results

Infarct size study

There were no significant differences in baseline hemodynamic index, body weight and heart weight of animals among the experimental groups. Area at risk averaged $61\pm 3\%$, $60\pm 3\%$, $62\pm 3\%$, $67\pm 4\%$, $60\pm 3\%$ and $57\pm 2\%$ of LV in the C, PostC, Per, L-NAME, L-NAME+PostC, L-NAME+Per groups, respectively ($p=NS$ among groups). Postconditioning reduced infarct size to $20\pm 3\%$ of area at risk versus $32\pm 2\%$ in controls ($p<0.01$). Perindoprilat also significantly limited infarct size to $25\pm 2\%$ of area at risk ($p<0.05$). Treatment with L-NAME at reperfusion did not influence infarct size compared to control group. However, the protective effect of PostC and Perindoprilat was abrogated by L-NAME ($25\pm 4\%$ and $31\pm 3\%$ of area at risk respectively, $p=NS$ versus C). (Figure 2)

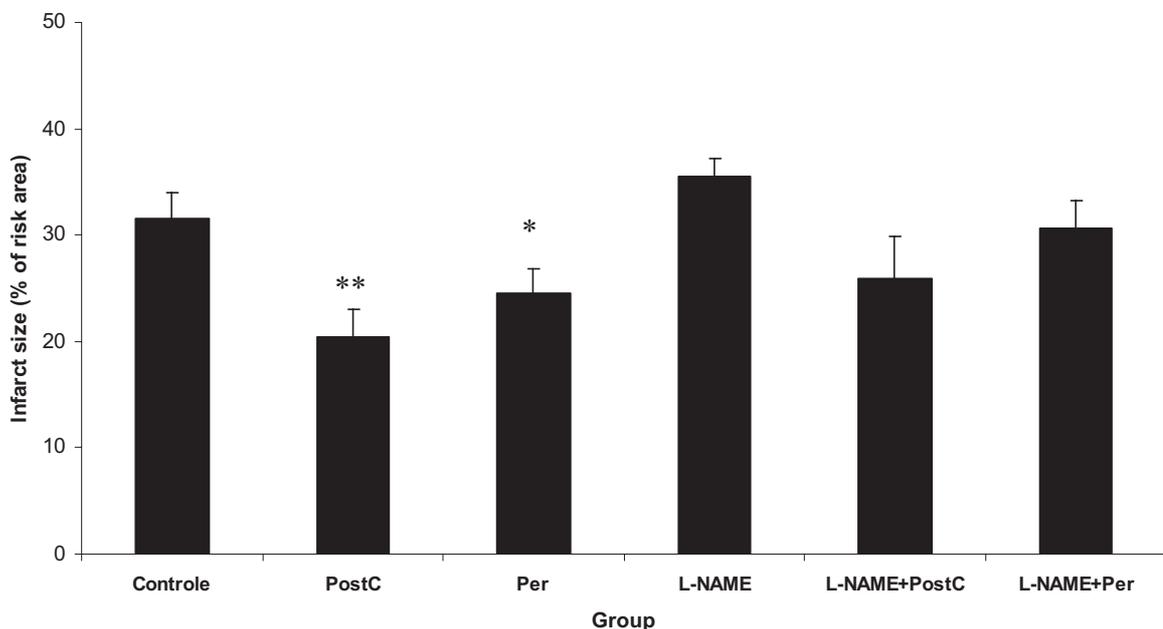


Figure 2. Postconditioning and Perindoprilat reduce infarct size. The necrosis is expressed here by percentage of infarct size /area at risk. * $p<0.05$ versus control, ** $p<0.01$ versus control. (n=8-13 in each group)

Function of mitochondria

In mitochondrial oxidative phosphorylation study, with glutamate, pyruvate and malate as substrates to donate reducing equivalents to complex I, the rate of state 3, state 4 and respiratory control index (RCI: state 3/state 4) showed no significant difference between control and perindoprilat group (Table).

Table. Mitochondrial respiration

	State 3	State 4	RCI
Groups	(nmol O ₂ /ml/min/mg prot)	(nmol O ₂ /ml/min/mg prot)	
Control	15,3±1,2	9,7±0,6	1,57±0,04
Per	16,2±0,9	9,6±0,5	1,72±0,07

Note: Data are mean ± SEM.

H₂O₂ release was detected, (1). in the presence of substrate of complex I of respiration chain (glutamate, pyruvate and malate, 3mM each) and its inhibitor (rotenone, 3μM); (2). in the presence of substrate of complex II of respiration chain (succinate 10mM), rotenone (3μM) and inhibitor of complex III (antimycine A 5μM). As supposed, when complex I energized by glutamate, pyruvate and malate was inhibited by rotenone, H₂O₂ production increased (202±16, 200±12 pmol/min/mg prot in control and Per group respectively, versus 69±3 and 76±4pmol/min/mg prot at baseline), which indicated the importance of complex I in ROS production during ischemia-reperfusion. In the presence of succinate, by hampering reverse electron transport, rotenone reduced H₂O₂ production (115±19, 112±10 pmol/min/mg prot in control and Per group respectively, versus 135±11 and 136±8 pmol/min/mg prot at baseline). Antimycine A lightly stimulated H₂O₂ production (160±19 and 141±25 pmol/min/mg prot in control and Per. group respectively). However, no significant difference was detected between control and Per group in the two conditions mentioned above. (Figure 3)

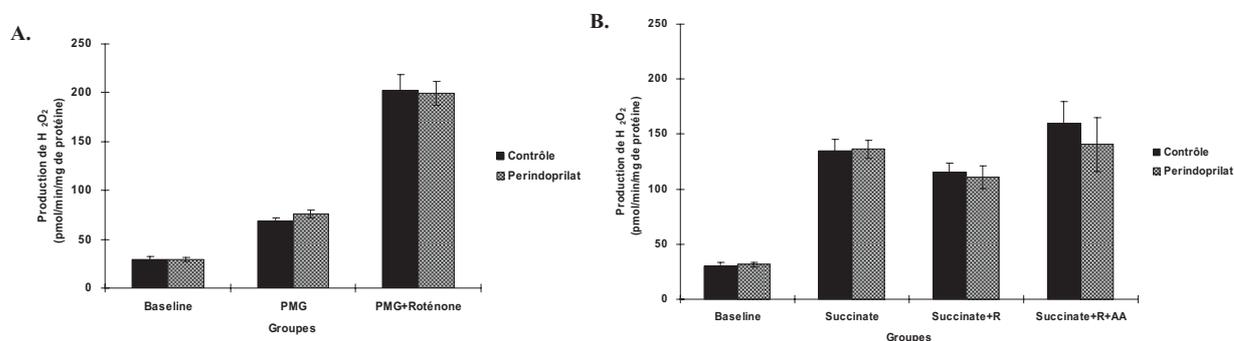


Figure 3. Production of H₂O₂ by isolated mitochondria at baseline, treated with (A) pyruvate, malate and glutamate (PMG) plus roteone; (B) succinate, rotenone (R) plus antimycine A. ROS

production was detected following the fluorescence variations in presence of amplex red and horseradish.

In CRC study, the mean amount of Ca^{2+} required to trigger mPTP opening average 54.0 ± 2.4 and 58.9 ± 2.3 nmol/mg protein in control and Perindoprilat group respectively ($p=\text{NS}$). (Figure 4)

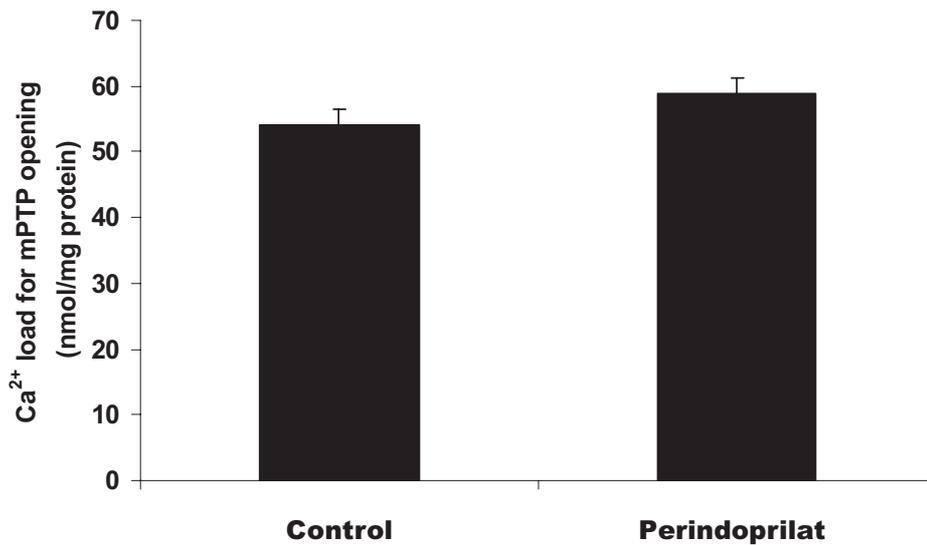


Figure 4. Ca^{2+} overload required for mPTP opening in control and perindoprilat treated hearts. No significant difference was detected between two groups.

Discussion

The present study demonstrated the cardioprotective effect of pharmacological postconditioning by perindoprilat as well as ischemic postconditioning when infarct size was used as an endpoint. Moreover, L-NAME, an NOS inhibitor, abolished the protection induced by these two types of postconditioning. However, mitochondrial function, including respiration, ROS production and CRC, remained unchanged compared to mitochondria isolated from control heart. These findings suggested that NO preservation is a key factor in cardioprotection of ACE inhibitor and this protection might work in a mitochondria-independent manner.

Previous studies by Zhao et al reported that postconditioning in a canine model of coronary occlusion-reperfusion protected the heart from ischemia-reperfusion injury by limiting infarct

size and endothelial dysfunction¹. Since then, the cardioprotection by postconditioning has been reported in different animal models before being demonstrated in human heart¹⁵. In our present study, postconditioning by 6 cycles of 10s reperfusion followed by 10s ischemia significantly reduced infarct size in isolated prepared rat hearts. This result is in accord with the observation of Tsang et al in the same animal model⁶.

ACE inhibitors prolonged the survival of patients after cardiac infarction^{16, 27}. In animal experiments, it was demonstrated that inhibition of ACE resulted in the reduction of angiotensin II generation and kinin degradation²⁸. The inhibition of angiotensin II formation may be of minor importance for cardioprotective effect of ACE inhibitor²⁹, and at least part of the beneficial effect of the ACE inhibitor is attributed to the kinins, potential stimulators of NO release from the endothelium^{30, 31}. The rat heart contains an independent kallikrein-kinin-system, thereby possibly enabling locally generated kinins to contribute to the regulation of cardiac function³². Our present study realised in a model of isolated heart of rats showed that perindoprilat, an ACE inhibitor, administered after ischemia, could limit infarct size after 40min ischemia.

The protective effect of ischemic postconditioning and perindoprilat was attenuated by L-NAME, a non-specific NOS inhibitor, suggesting that perindoprilat protects the heart from ischemia-reperfusion injury in a NO-dependant manner. Both cardioprotective and detrimental effects of NO during reperfusion have been reported (for review, see³³⁻³⁶). A reasonable explanation for these contradictory observations is that NO shows its effect in ischemia-reperfusion injury in concentration- and time-dependent manner. The role of NO in postconditioning is not well elucidated. Some studies, including the work we are reporting here, suggested that NOS may be required for protection by ischemic and pharmacological postconditioning^{5, 6, 37-43}.

In the second part of our study, we were interested in function of mitochondria obtained from control and perindoprilat treated hearts and tried to detect protection mechanism by ACE inhibitor. Mitochondria are both targets and sources of injury during cardiac ischemia and reperfusion, which result in mitochondrial dysfunction with decrease in oxidative capacity, loss of cytochrome *c* and generation of ROS. Classically, free radicals and ROS were considered injurious, however current mechanisms describe both protective and deleterious effects (for review, see⁴⁴). It has been demonstrated that ROS scavengers abolished ischemic

postconditioning and intermittent bradykinin and isoflurane-induced protection^{40, 45}. However, our study detected no difference between control and perindoprilat group in mitochondrial oxidative phosphorylation or in extra-mitochondrial ROS concentration. Thus, these two factors are probably not involved in protection of perindoprilat.

MPTP have been considered to be an end-effector in postconditioning⁴⁶ as well as in preconditioning^{11, 12, 47}. However, our study provided no proof that mPTP was attenuated in perindoprilat treated heart in spite of its protective effect in reduction in infarct size. This phenomenon is probably due to a relative short duration of reperfusion before the isolation of mitochondria. The other potential end-effectors independent of mitochondria, such as attenuated Ca²⁺-dependent hypercontracture, attenuated contracture-dependent sarcolemmal rupture or attenuated cell-to-cell propagation of necrosis and gap junction mediated effects might also exist in cardioprotection⁴⁷.

The most important bias of our study is that, for some practical reasons, the first part of study in infarct size was done in an experimental model of regional ischemia, while the second part concerning mitochondrial functions was realised with the mitochondria isolated from hearts having suffered from global ischemia. Cardioprotective effect of postconditioning has been reported with both two protocols^{6, 48-51}. No proof has been shown until now that the results obtained with these two ischemia protocols of Langendorff preparation cause contradiction when infarct size or other biochemical parameters were examined. However, studies *in vivo* realised in big animal is hoped for further research in application of perindoprilat in acute myocardial infarction.

In conclusion, our study demonstrates that pharmacological postconditioning par perindoprilat significantly reduces infarct size in isolated perfused rat hearts in an NO-dependant manner. It offers great opportunity for cardioprotection in clinical work such as at the time of thrombolysis and angioplasty.

References

1. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Aug 2003;285(2):H579-588.
2. Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, et al. Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res*. Jan 1 2004;61(1):115-122.
3. Bopassa JC, Michel P, Gateau-Roesch O, et al. Low-pressure reperfusion alters mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jun 2005;288(6):H2750-2755.
4. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*. Apr 1 2004;62(1):74-85.
5. Yang XM, Proctor JB, Cui L, et al. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol*. Sep 1 2004;44(5):1103-1110.
6. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, et al. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*. Aug 6 2004;95(3):230-232.
7. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*. Feb 15 2004;61(3):448-460.
8. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raizy O, et al. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*. Jan 18 2005;111(2):194-197.
9. Bernardi P, Petronilli V. The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr*. Apr 1996;28(2):131-138.
10. Duchon MR, McGuinness O, Brown LA, et al. On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. Oct 1993;27(10):1790-1794.
11. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, et al. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res*. Aug 15 2002;55(3):534-543.

12. Javadov SA, Clarke S, Das M, et al. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol*. Jun 1 2003;549(Pt 2):513-524.
13. Nazareth W, Yafei N, Crompton M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *J Mol Cell Cardiol*. Dec 1991;23(12):1351-1354.
14. Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, et al. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res*. Oct 6 2005.
15. Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation*. Oct 4 2005;112(14):2143-2148.
16. Fox KM. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet*. Sep 6 2003;362(9386):782-788.
17. Hartman JC. The role of bradykinin and nitric oxide in the cardioprotective action of ACE inhibitors. *Ann Thorac Surg*. Sep 1995;60(3):789-792.
18. Desta B, Vanhoutte PM, Boulanger CM. Inhibition of the angiotensin converting enzyme by perindoprilat and release of nitric oxide. *Am J Hypertens*. May 1995;8(5 Pt 2):1S-6S.
19. Bell RM, Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol*. Feb 2003;35(2):185-193.
20. Park SS, Zhao H, Mueller RA, et al. Bradykinin prevents reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through glycogen synthase kinase 3beta. *J Mol Cell Cardiol*. May 2006;40(5):708-716.
21. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, et al. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest*. Jun 2004;113(11):1535-1549.
22. Gomez L, Paillard M, Thibault H, et al. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation*. May 27 2008;117(21):2761-2768.
23. Gateau-Roesch O, Pavlov E, Lazareva AV, et al. Calcium-binding properties of the mitochondrial channel-forming hydrophobic component. *J Bioenerg Biomembr*. Feb 2000;32(1):105-110.

24. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* Feb 1949;177(2):751-766.
25. Ichas F, Jouaville LS, Sidash SS, et al. Mitochondrial calcium spiking: a transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signalling. *FEBS Lett.* Jul 11 1994;348(2):211-215.
26. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, et al. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* Sep 19 2003;278(38):36027-36031.
27. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med.* Sep 3 1992;327(10):669-677.
28. Linz W, Scholkens BA. Role of bradykinin in the cardiac effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;20 Suppl 9:S83-90.
29. Parratt JR. Cardioprotection by angiotensin converting enzyme inhibitors--the experimental evidence. *Cardiovasc Res.* Feb 1994;28(2):183-189.
30. Baumgarten CR, Linz W, Kunkel G, et al. Ramiprilat increases bradykinin outflow from isolated hearts of rat. *Br J Pharmacol.* Feb 1993;108(2):293-295.
31. Baxter GF, Ebrahim Z. Role of bradykinin in preconditioning and protection of the ischaemic myocardium. *Br J Pharmacol.* Feb 2002;135(4):843-854.
32. Nolly H, Carbini LA, Scicli G, et al. A local kallikrein-kinin system is present in rat hearts. *Hypertension.* Jun 1994;23(6 Pt 2):919-923.
33. Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* Jan 2006;40(1):16-23.
34. Dawn B, Bolli R. Role of nitric oxide in myocardial preconditioning. *Ann N Y Acad Sci.* May 2002;962:18-41.
35. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol.* Nov 2001;33(11):1897-1918.
36. Schulz R, Kelm M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* Feb 15 2004;61(3):402-413.
37. Yong QC, Lee SW, Foo CS, et al. Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Sep 2008;295(3):H1330-H1340.

38. Tessier-Vetzel D, Tissier R, Waintraub X, et al. Isoflurane inhaled at the onset of reperfusion potentiates the cardioprotective effect of ischemic postconditioning through a NO-dependent mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol*. Mar 2006;47(3):487-492.
39. Smul TM, Lange M, Redel A, et al. Desflurane-Induced Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury Depends On Timing. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. Jan 22 2009.
40. Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, et al. Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling. *Cardiovasc Res*. Jul 1 2007;75(1):168-177.
41. Manintveld OC, Te Lintel Hekkert M, van den Bos EJ, et al. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Mar 2007;292(3):H1551-1560.
42. Krolikowski JG, Weihrauch D, Bienengraeber M, et al. Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo. *Can J Anaesth*. Feb 2006;53(2):174-182.
43. Jang Y, Xi J, Wang H, et al. Postconditioning prevents reperfusion injury by activating delta-opioid receptors. *Anesthesiology*. Feb 2008;108(2):243-250.
44. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res*. Feb 15 2004;61(3):461-470.
45. Tsutsumi YM, Yokoyama T, Horikawa Y, et al. Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning: in vivo and in vitro characterization. *Life Sci*. Sep 22 2007;81(15):1223-1227.
46. Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovasc Res*. May 1 2006;70(2):264-273.
47. Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, et al. The end-effectors of preconditioning protection against myocardial cell death secondary to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res*. May 1 2006;70(2):274-285.
48. Kupai K, Csonka C, Fekete V, et al. Cholesterol Diet-Induced Hyperlipidemia Impairs the Cardioprotective Effect of Postconditioning: Role of Peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Sep 4 2009.
49. Vessey DA, Li L, Honbo N, et al. Sphingosine 1-Phosphate is an Important Endogenous Cardioprotectant Released by Ischemic Pre- and Post-Conditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jul 31 2009.

50. Tamarelle S, Ghaboura N, Treguer F, et al. Myocardial reperfusion injury management: Erythropoietin compared with postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jul 17 2009.
51. Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, et al. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res*. Jan 2006;69(1):178-185.

Synthèse des résultats et discussion

Nos résultats montrent pour la première fois que dans un modèle de cœur isolé de rats, le postconditionnement pharmacologique par le périndoprilate, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, diminue la taille d'infarctus. Cet effet cardioprotecteur est comparable à celui induit par le postconditionnement ischémique. La deuxième observation est que la préservation du NO est un facteur essentiel pour l'effet protecteur de postconditionnement induit par le périndoprilate. Cependant, nous n'avons pas retrouvé d'arguments en faveur de l'implication des mitochondries dans ce processus.

Le mécanisme d'action des IEC dans la cardioprotection reste à élucider. Il peut exister des effets indirects (induits par la baisse de pression artérielle, par exemple) mais aussi des effets directs sur le cœur lui-même. Dans notre étude, le modèle de cœur isolé nous permet d'écarter les facteurs neuro-humoraux systémiques et d'étudier l'effet direct sur le cœur. Les produits de la famille des IEC sont connus non seulement pour leur effet inhibiteur sur la conversion de l'angiotensine I à l'angiotensine II, mais aussi pour son inhibition sur la dégradation de la famille des kinines, dont la bradykinine est un membre important. La bradykinine est un stimulateur de la production de NO. Dans notre étude, nous avons démontré que le périndoprilate protège le cœur *in vivo* par une voie NO dépendante.

Nous n'avons pas observé d'amélioration des fonctions mitochondriales, notamment de l'ouverture du PTPm. Il est donc probable que d'autres effecteurs interviennent afin d'expliquer le mécanisme d'action du postconditionnement pharmacologique induit par le périndoprilate. Il est par ailleurs possible qu'un temps de reperfusion de 5 minutes soit trop court pour que l'effet de postconditionnement induit par le périndoprilate soit observé. En effet, nous avons décidé d'évaluer les fonctions de mitochondries isolées de cœurs subissant 5 minutes de reperfusion, parce que c'est le moment le plus critique pour le cœur face aux différents challenges de l'ischémie-reperfusion. Cependant, l'ouverture de PTPm est un phénomène réversible dans certaines conditions. Les autres fenêtres de temps doivent être examinées pour complètement élucider le rôle de PTPm dans le postconditionnement induit par le périndoprilate.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Malgré l'immensité des travaux de recherche effectués depuis 30 ans, la cardioprotection vis-à-vis de l'infarctus aigu du myocarde reste un défi pour la santé publique. Il est maintenant admis que l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale est un élément déterminant de la survie cellulaire. Ce travail de thèse nous a permis d'étudier la régulation du pore de transition de perméabilité mitochondriale cardiaque par la chaîne respiratoire. Sur des mitochondries isolées de cœurs de rongeurs, nous avons pu démontrer que le PTPm est désensibilisé par la cyclosporine A, un inhibiteur de la cyclophiline D (CyP-D), et que cet effet est largement amplifié en présence de roténone, un inhibiteur du complexe I. Ces résultats ont été confirmés chez la souris CyP-D déficiente. L'effet régulateur de l'inhibition du complexe I est indépendant de la production des ROS par les mitochondries. L'étude de plusieurs types cellulaires a aussi confirmé l'effet de la roténone dans la régulation du PTPm. Ainsi, nous avons pu montrer que le flux d'électrons à travers le complexe I est capable de réagir sur un site de régulation du PTPm cardiaque masqué par la CyP-D. De plus, les analogues de l'ubiquinone, élément de la chaîne respiratoire impliqué dans le transfert d'électrons entre les complexes I, II et III, modulent la susceptibilité du PTPm vis-à-vis du Ca^{2+} . Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, l'effet du postconditionnement pharmacologique par le périndoprilate, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, a été examiné. Le périndoprilate administré pendant la reperfusion diminue la taille de l'infarctus dans un modèle de cœur isolé de rat. Cependant, le PTPm ne semble pas être impliqué dans cet effet cardioprotecteur. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la cardioprotection et montre l'importance du complexe I et de la CyP-D comme cibles moléculaires incontournables dans ce processus.

BIBLIOGRAPHIE

1. Henze K, Martin W. Evolutionary biology: essence of mitochondria. *Nature*. Nov 13 2003;426(6963):127-128.
2. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ*. Aug 2006;13(8):1396-1402.
3. Pangborn M. Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart. *J. Biol. Chem* 1942;143:247–256.
4. McMillin JB, Dowhan W. Cardiolipin and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. Dec 30 2002;1585(2-3):97-107.
5. Hermann GJ, Shaw JM. Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14:265-303.
6. Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science*. Mar 5 1999;283(5407):1488-1493.
7. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. Jul 8 1961;191:144-148.
8. Fiore C, Trezeguet V, Le Saux A, et al. The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie*. Feb 1998;80(2):137-150.
9. Liu T, O'Rourke B. Regulation of mitochondrial Ca²⁺ and its effects on energetics and redox balance in normal and failing heart. *J Bioenerg Biomembr*. Apr 2009;41(2):127-132.
10. Wolin MS, Xie YW, Hintze TH. Nitric oxide as a regulator of tissue oxygen consumption. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Jan 1999;8(1):97-103.
11. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, et al. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*. May 15 2000;28(10):1456-1462.
12. Saini HK, Machackova J, Dhalla NS. Role of reactive oxygen species in ischemic preconditioning of subcellular organelles in the heart. *Antioxid Redox Signal*. Apr 2004;6(2):393-404.
13. Penna C, Tullio F, Merlino A, et al. Postconditioning cardioprotection against infarct size and post-ischemic systolic dysfunction is influenced by gender. *Basic Res Cardiol*. Jul 2009;104(4):390-402.
14. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. Oct 15 2003;552(Pt 2):335-344.
15. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*. Mar 2002;80(5):780-787.
16. Loschen G, Flohe L, Chance B. Respiratory chain linked H(2)O(2) production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett*. Nov 1 1971;18(2):261-264.
17. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*. Oct 1999;79(4):1127-1155.
18. Vandecasteele G, Szabadkai G, Rizzuto R. Mitochondrial calcium homeostasis: mechanisms and molecules. *IUBMB Life*. Sep-Nov 2001;52(3-5):213-219.
19. Chappell JB, Crofts AR. Calcium Ion Accumulation and Volume Changes of Isolated Liver Mitochondria. Calcium Ion-Induced Swelling. *Biochem J*. May 1965;95:378-386.

20. Crofts AR, Chappell JB. Calcium Ion Accumulation and Volume Changes of Isolated Liver Mitochondria. Reversal of Calcium Ion-Induced Swelling. *Biochem J.* May 1965;95:387-392.
21. Hunter DR, Haworth RA. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys.* Jul 1979;195(2):453-459.
22. Crompton M, Costi A, Hayat L. Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J.* Aug 1 1987;245(3):915-918.
23. Haworth RA, Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys.* Jul 1979;195(2):460-467.
24. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc.* Aug 1966;41(3):445-502.
25. Matsumoto S, Friberg H, Ferrand-Drake M, et al. Blockade of the mitochondrial permeability transition pore diminishes infarct size in the rat after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* Jul 1999;19(7):736-741.
26. Bopassa JC, Michel P, Gateau-Roesch O, et al. Low-pressure reperfusion alters mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Jun 2005;288(6):H2750-2755.
27. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, et al. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation.* Jan 18 2005;111(2):194-197.
28. Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovasc Res.* May 1 2006;70(2):264-273.
29. Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, et al. Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res.* Jan 1 2004;61(1):115-122.
30. Gomez L, Paillard M, Thibault H, et al. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation.* May 27 2008;117(21):2761-2768.
31. Li PA, Uchino H, Elmer E, et al. Amelioration by cyclosporin A of brain damage following 5 or 10 min of ischemia in rats subjected to preischemic hyperglycemia. *Brain Res.* Apr 4 1997;753(1):133-140.
32. Haouzi D, Cohen I, Vieira HL, et al. Mitochondrial permeability transition as a novel principle of hepatorenal toxicity in vivo. *Apoptosis.* Oct 2002;7(5):395-405.
33. Keep M, Elmer E, Fong KS, et al. Intrathecal cyclosporin prolongs survival of late-stage ALS mice. *Brain Res.* Mar 16 2001;894(2):327-331.
34. Klohn PC, Soriano ME, Irwin W, et al. Early resistance to cell death and to onset of the mitochondrial permeability transition during hepatocarcinogenesis with 2-acetylaminofluorene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 19 2003;100(17):10014-10019.
35. Crouser ED, Julian MW, Blaho DV, et al. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. *Crit Care Med.* Feb 2002;30(2):276-284.
36. Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, et al. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res.* Jun 4 2009.
37. Novgorodov SA, Gudz TI, Kushnareva YE, et al. Effect of ADP/ATP antiporter conformational state on the suppression of the nonspecific permeability of the inner mitochondrial membrane by cyclosporine A. *FEBS Lett.* Dec 17 1990;277(1-2):123-126.
38. Halestrap AP, Davidson AM. Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it

- interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J.* May 15 1990;268(1):153-160.
39. Novgorodov SA, Gudz TI, Jung DW, et al. The nonspecific inner membrane pore of liver mitochondria: modulation of cyclosporin sensitivity by ADP at carboxyatractyloside-sensitive and insensitive sites. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 15 1991;180(1):33-38.
 40. Tikhonova IM, Andreyev A, Antonenko Yu N, et al. Ion permeability induced in artificial membranes by the ATP/ADP antiporter. *FEBS Lett.* Jan 17 1994;337(3):231-234.
 41. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature.* Jan 29 2004;427(6973):461-465.
 42. Fournier N, Ducet G, Crevat A. Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr.* Jun 1987;19(3):297-303.
 43. Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J.* Oct 1 1988;255(1):357-360.
 44. Tanveer A, Virji S, Andreeva L, et al. Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. *Eur J Biochem.* May 15 1996;238(1):166-172.
 45. Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, et al. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. *Mol Pharmacol.* Jul 2002;62(1):22-29.
 46. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J.* Apr 1 1995;307 (Pt 1):93-98.
 47. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie.* Feb-Mar 2002;84(2-3):153-166.
 48. Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, et al. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J.* Dec 1 1998;336 (Pt 2):287-290.
 49. Weiss JN, Korge P, Honda HM, et al. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res.* Aug 22 2003;93(4):292-301.
 50. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* Feb 15 2004;61(3):372-385.
 51. Basso E, Fante L, Fowlkes J, et al. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem.* May 13 2005;280(19):18558-18561.
 52. Thibault H, Piot C, Staat P, et al. Long-term benefit of postconditioning. *Circulation.* Feb 26 2008;117(8):1037-1044.
 53. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc Res.* May 1 2006;70(2):191-199.
 54. Angelin A, Tiepolo T, Sabatelli P, et al. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 16 2007;104(3):991-996.
 55. Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol.* Nov 15 2000;529 Pt 1:11-21.

56. Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, et al. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem*. Feb 15 1992;267(5):2934-2939.
57. Kinnally KW, Zorov DB, Antonenko YN, et al. Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 15 1993;90(4):1374-1378.
58. O'Gorman E, Beutner G, Dolder M, et al. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett*. Sep 8 1997;414(2):253-257.
59. Beutner G, Ruck A, Riede B, et al. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta*. Jan 5 1998;1368(1):7-18.
60. Nicolli A, Basso E, Petronilli V, et al. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J Biol Chem*. Jan 26 1996;271(4):2185-2192.
61. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med*. Apr 20 1998;187(8):1261-1271.
62. Vyssokikh MY, Goncharova NY, Zhuravlyova AV, et al. Proteinaceous complexes from mitochondrial contact sites. *Biochemistry (Mosc)*. Apr 1999;64(4):390-398.
63. Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, et al. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol*. May 2007;9(5):550-555.
64. Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondrial apoptosis without VDAC. *Nat Cell Biol*. May 2007;9(5):487-489.
65. Chiara F, Castellaro D, Marin O, et al. Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels. *PLoS ONE*. 2008;3(3):e1852.
66. McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, et al. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 15 1992;89(8):3170-3174.
67. Bogнар Z, Kalai T, Palfi A, et al. A novel SOD-mimetic permeability transition inhibitor agent protects ischemic heart by inhibiting both apoptotic and necrotic cell death. *Free Radic Biol Med*. Sep 1 2006;41(5):835-848.
68. Brown DA, Aon MA, Akar FG, et al. Effects of 4'-chlorodiazepam on cellular excitation-contraction coupling and ischaemia-reperfusion injury in rabbit heart. *Cardiovasc Res*. Jul 1 2008;79(1):141-149.
69. Petrosillo G, Casanova G, Matera M, et al. Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: induction of permeability transition and cytochrome c release. *FEBS Lett*. Nov 27 2006;580(27):6311-6316.
70. Hoffmann B, Stockl A, Schlame M, et al. The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. *J Biol Chem*. Jan 21 1994;269(3):1940-1944.
71. Nury H, Dahout-Gonzalez C, Trezeguet V, et al. Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers. *FEBS Lett*. Nov 7 2005;579(27):6031-6036.
72. Imai H, Koumura T, Nakajima R, et al. Protection from inactivation of the adenine nucleotide translocator during hypoglycaemia-induced apoptosis by mitochondrial

- phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochem J*. May 1 2003;371(Pt 3):799-809.
73. Juhaszova M, Wang S, Zorov DB, et al. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown. *Ann N Y Acad Sci*. Mar 2008;1123:197-212.
 74. Hunter DR, Haworth RA, Southard JH. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem*. Aug 25 1976;251(16):5069-5077.
 75. Bernardi P, Veronese P, Petronilli V. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me^{2+} binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J Biol Chem*. Jan 15 1993;268(2):1005-1010.
 76. Petronilli V, Cola C, Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix Ca^{2+} . *J Biol Chem*. Jan 15 1993;268(2):1011-1016.
 77. Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca^{2+} overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. May 2006;290(5):H2024-2034.
 78. Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem*. May 5 1992;267(13):8834-8839.
 79. Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem*. Feb 7 1997;272(6):3346-3354.
 80. Kuno A, Solenkova NV, Solodushko V, et al. Infarct limitation by a protein kinase G activator at reperfusion in rabbit hearts is dependent on sensitizing the heart to A2b agonists by protein kinase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Sep 2008;295(3):H1288-H1295.
 81. Abramov AY, Fraley C, Diao CT, et al. Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 13 2007;104(46):18091-18096.
 82. Basso E, Petronilli V, Forte MA, et al. Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *J Biol Chem*. Sep 26 2008;283(39):26307-26311.
 83. Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem*. Sep 26 2008;283(39):26312-26323.
 84. Crompton M, Costi A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca^{2+} , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca^{2+} overload. *Eur J Biochem*. Dec 15 1988;178(2):489-501.
 85. Beatrice MC, Stiers DL, Pfeiffer DR. The role of glutathione in the retention of Ca^{2+} by liver mitochondria. *J Biol Chem*. Jan 25 1984;259(2):1279-1287.
 86. Lenartowicz E, Bernardi P, Azzone GF. Phenylarsine oxide induces the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. Aug 1991;23(4):679-688.

87. Petronilli V, Costantini P, Scorrano L, et al. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J Biol Chem.* Jun 17 1994;269(24):16638-16642.
88. Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, et al. Selective inhibition of the mitochondrial permeability transition pore at the oxidation-reduction sensitive dithiol by monobromobimane. *FEBS Lett.* Apr 3 1995;362(2):239-242.
89. Chernyak BV, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur J Biochem.* Jun 15 1996;238(3):623-630.
90. Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, et al. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J Biol Chem.* Mar 22 1996;271(12):6746-6751.
91. Chauvin C, De Oliveira F, Ronot X, et al. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem.* Nov 2 2001;276(44):41394-41398.
92. Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, et al. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem.* May 15 1998;273(20):12662-12668.
93. Fontaine E, Ichas F, Bernardi P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* Oct 2 1998;273(40):25734-25740.
94. Guigas B, Detaille D, Chauvin C, et al. Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J.* Sep 15 2004;382(Pt 3):877-884.
95. Walter L, Nogueira V, Leverve X, et al. Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *J Biol Chem.* Sep 22 2000;275(38):29521-29527.
96. Borutaite V, Brown GC. Mitochondria in apoptosis of ischemic heart. *FEBS Lett.* Apr 24 2003;541(1-3):1-5.
97. Pacher P, Hajnoczky G. Propagation of the apoptotic signal by mitochondrial waves. *Embo J.* Aug 1 2001;20(15):4107-4121.
98. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* Sep 2000;10(9):369-377.
99. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.* Mar 31 2005;434(7033):652-658.
100. Lowe JE, Reimer KA, Jennings RB. Experimental infarct size as a function of the amount of myocardium at risk. *Am J Pathol.* Feb 1978;90(2):363-379.
101. Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest.* Jun 1979;40(6):633-644.
102. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* Jul 1960;70:68-78.
103. Jennings RB, Reimer KA. Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation.* Aug 1983;68(2 Pt 2):I25-36.
104. Chien GL, Wolff RA, Davis RF, et al. "Normothermic range" temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovasc Res.* Jul 1994;28(7):1014-1017.
105. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation.* May 21 2002;105(20):2332-2336.

106. Hearse DJ. Reperfusion of the ischemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* Aug 1977;9(8):605-616.
107. Lopaschuk GD, Stanley WC. Glucose metabolism in the ischemic heart. *Circulation.* Jan 21 1997;95(2):313-315.
108. Kloner RA. Does reperfusion injury exist in humans? *J Am Coll Cardiol.* Feb 1993;21(2):537-545.
109. Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation.* Oct 1989;80(4):1049-1062.
110. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* Dec 1974;54(6):1496-1508.
111. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, et al. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest.* Oct 1975;56(4):978-985.
112. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* Dec 1982;66(6):1146-1149.
113. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* Apr 1999;79(2):609-634.
114. Schaper W. [Pathophysiology of reperfusion]. *Z Kardiol.* 1986;75 Suppl 5:73-75.
115. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* Aug 1972;26(4):239-257.
116. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res.* Nov 1996;79(5):949-956.
117. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest.* Oct 1994;94(4):1621-1628.
118. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest.* Jan 1996;74(1):86-107.
119. Kitakaze M, Node K, Takashima S, et al. Cellular mechanisms of cardioprotection afforded by inhibitors of angiotensin converting enzyme in ischemic hearts: role of bradykinin and nitric oxide. *Hypertens Res.* May 2000;23(3):253-259.
120. Zhao H. Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* May 2009;29(5):873-885.
121. Jennings RB, Ganote CE. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res.* Sep 1974;35 Suppl 3:156-172.
122. Klein HH, S. Puschmann, J. Schaper and W. Schaper. The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction *Virchows Archiv.* 1981;393(3):287-297.
123. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.* Jun 15 1998;82(11):1111-1129.
124. Alibert M, Chimini, G. L'élimination des cellules apoptotiques: une phagocytose particulière. *Med Sciences.* 2002;18:853-860.
125. Narula J, Kharbanda S, Khaw BA. Apoptosis and the heart. *Chest.* Nov 5 1997;112(5):1358-1362.
126. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* Nov 1992;119(3):493-501.
127. Black SC, Huang JQ, Rezaiefar P, et al. Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol.* Apr 1998;30(4):733-742.

128. Chakrabarti S, Hoque AN, Karmazyn M. A rapid ischemia-induced apoptosis in isolated rat hearts and its attenuation by the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE 642 (cariporide). *J Mol Cell Cardiol.* Nov 1997;29(11):3169-3174.
129. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, et al. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res.* Feb 2000;45(3):651-660.
130. Freude B, Masters TN, Robicsek F, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* Feb 2000;32(2):197-208.
131. Leist M, Single B, Castoldi AF, et al. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* Apr 21 1997;185(8):1481-1486.
132. Okamura T, Miura T, Takemura G, et al. Effect of caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart. *Cardiovasc Res.* Feb 2000;45(3):642-650.
133. Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, et al. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis.* Aug 2001;6(4):279-290.
134. Zhao ZQ, Morris CD, Budde JM, et al. Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res.* Jul 1 2003;59(1):132-142.
135. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* Aug 1997;22(8):299-306.
136. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation.* Jan 27 1998;97(3):276-281.
137. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* Jan 6 2000;403(6765):98-103.
138. Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney ME, et al. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 3 2006;349(4):1406-1411.
139. Thuerauf DJ, Marcinko M, Gude N, et al. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ Res.* Aug 4 2006;99(3):275-282.
140. Ezzati M, Hoorn SV, Rodgers A, et al. Estimates of global and regional potential health gains from reducing multiple major risk factors. *Lancet.* Jul 26 2003;362(9380):271-280.
141. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* May 24 1997;349(9064):1498-1504.
142. Bolli R, Becker L, Gross G, et al. Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circ Res.* Jul 23 2004;95(2):125-134.
143. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* Nov 1986;74(5):1124-1136.
144. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Aug 2003;285(2):H579-588.
145. Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, et al. Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol.* Dec 1986;251(6 Pt 2):H1306-1315.

146. Ovize M, Aupetit JF, Rioufol G, et al. Preconditioning reduces infarct size but accelerates time to ventricular fibrillation in ischemic pig heart. *Am J Physiol*. Jul 1995;269(1 Pt 2):H72-79.
147. Gysembergh A, Margonari H, Loufoua J, et al. Stretch-induced protection shares a common mechanism with ischemic preconditioning in rabbit heart. *Am J Physiol*. Mar 1998;274(3 Pt 2):H955-964.
148. Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation*. Oct 4 2005;112(14):2143-2148.
149. Sumeray MS, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces infarct size following global ischaemia in the murine myocardium. *Basic Res Cardiol*. Oct 1998;93(5):384-390.
150. Liang BT, Gross GJ. Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and KATP channels. *Circ Res*. Jun 25 1999;84(12):1396-1400.
151. Burns PG, Krukenkamp IB, Caldarone CA, et al. Does cardiopulmonary bypass alone elicit myoprotective preconditioning? *Circulation*. Nov 1 1995;92(9 Suppl):II447-451.
152. Mounsey RA, Pang CY, Forrest C. Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. *Otolaryngol Head Neck Surg*. Oct 1992;107(4):549-552.
153. Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, et al. Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction. *Circulation*. Feb 1992;85(2):659-665.
154. Kume M, Yamamoto Y, Saad S, et al. Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med*. Sep 1996;128(3):251-258.
155. Osborne DL, Aw TY, Cepinkas G, et al. Development of ischemia/reperfusion tolerance in the rat small intestine. An epithelium-independent event. *J Clin Invest*. Nov 1994;94(5):1910-1918.
156. Li G, Chen S, Lou W, et al. Protective effects of ischemic preconditioning on donor lung in canine lung transplantation. *Chest*. May 1998;113(5):1356-1359.
157. Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, et al. Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am J Physiol*. Mar 1991;260(3 Pt 2):H796-804.
158. Ovize M, Przyklenk K, Hale SL, et al. Preconditioning does not attenuate myocardial stunning. *Circulation*. Jun 1992;85(6):2247-2254.
159. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation*. Dec 18 2001;104(25):3158-3167.
160. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res*. Jun 1993;72(6):1293-1299.
161. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, et al. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*. Sep 1993;88(3):1264-1272.
162. Shizukuda Y, Mallet RT, Lee SC, et al. Hypoxic preconditioning of ischaemic canine myocardium. *Cardiovasc Res*. May 1992;26(5):534-542.
163. Ovize M, Kloner RA, Przyklenk K. Stretch preconditions canine myocardium. *Am J Physiol*. Jan 1994;266(1 Pt 2):H137-146.
164. Domenech RJ, Macho P, Velez D, et al. Tachycardia preconditions infarct size in dogs: role of adenosine and protein kinase C. *Circulation*. Mar 3 1998;97(8):786-794.
165. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, et al. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. Mar 1993;87(3):893-899.

166. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, et al. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. Nov 1 1996;94(9):2193-2200.
167. Kida M, Fujiwara H, Ishida M, et al. Ischemic preconditioning preserves creatine phosphate and intracellular pH. *Circulation*. Dec 1991;84(6):2495-2503.
168. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, et al. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*. Jul 1991;84(1):350-356.
169. Grover GJ, Sleph PG, Dzwonczyk S. Role of myocardial ATP-sensitive potassium channels in mediating preconditioning in the dog heart and their possible interaction with adenosine A1-receptors. *Circulation*. Oct 1992;86(4):1310-1316.
170. Li Y, Kloner RA. Adenosine deaminase inhibition is not cardioprotective in the rat. *Am Heart J*. Dec 1993;126(6):1293-1298.
171. Li Y, Kloner RA. The cardioprotective effects of ischemic 'preconditioning' are not mediated by adenosine receptors in rat hearts. *Circulation*. May 1993;87(5):1642-1648.
172. Wall TM, Sheehy R, Hartman JC. Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther*. Aug 1994;270(2):681-689.
173. Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, et al. Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism. *Circ Res*. Oct 1993;73(4):656-670.
174. Schultz JE, Rose E, Yao Z, et al. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol*. May 1995;268(5 Pt 2):H2157-2161.
175. Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, et al. Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res*. May 1997;80(5):743-748.
176. Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. Jan 1997;29(1):207-216.
177. Vanden Hoek T, Becker LB, Shao ZH, et al. Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circ Res*. Mar 17 2000;86(5):541-548.
178. Miyawaki H, Zhou X, Ashraf M. Calcium preconditioning elicits strong protection against ischemic injury via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res*. Jul 1996;79(1):137-146.
179. Nakano A, Liu GS, Heusch G, et al. Exogenous nitric oxide can trigger a preconditioned state through a free radical mechanism, but endogenous nitric oxide is not a trigger of classical ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 2000;32(7):1159-1167.
180. Lochner A, Marais E, Du Toit E, et al. Nitric oxide triggers classic ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci*. May 2002;962:402-414.
181. Novalija E, Hogg N, Kevin LG, et al. Ischemic preconditioning: triggering role of nitric oxide-derived oxidants in isolated hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*. Nov 2003;42(5):593-600.
182. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev*. Oct 2003;83(4):1113-1151.
183. Przyklenk K, Sussman MA, Simkhovich BZ, et al. Does ischemic preconditioning trigger translocation of protein kinase C in the canine model? *Circulation*. Sep 15 1995;92(6):1546-1557.
184. Vahlhaus C, Schulz R, Post H, et al. No prevention of ischemic preconditioning by the protein kinase C inhibitor staurosporine in swine. *Circ Res*. Sep 1996;79(3):407-414.

185. da Silva R, Grampp T, Pasch T, et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology*. Jan 2004;100(1):59-69.
186. Tong H, Chen W, Steenbergen C, et al. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res*. Aug 18 2000;87(4):309-315.
187. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*. Feb 15 2004;61(3):448-460.
188. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*. Sep 8-14 1983;305(5930):147-148.
189. Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res*. Feb 1992;70(2):223-233.
190. O'Rourke B. Myocardial K(ATP) channels in preconditioning. *Circ Res*. Nov 10 2000;87(10):845-855.
191. Van Winkle DM, Chien GL, Wolff RA, et al. Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the KATP channel. *Am J Physiol*. Feb 1994;266(2 Pt 2):H829-839.
192. Yao Z, Gross GJ. Effects of the KATP channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation*. Apr 1994;89(4):1769-1775.
193. Inoue I, Nagase H, Kishi K, et al. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*. Jul 18 1991;352(6332):244-247.
194. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*. Dec 1997;81(6):1072-1082.
195. Suzuki M, Sasaki N, Miki T, et al. Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest*. Feb 2002;109(4):509-516.
196. Dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, et al. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP- sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jul 2002;283(1):H284-295.
197. Laclau MN, Boudina S, Thambo JB, et al. Cardioprotection by ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and functional coupling between adenine nucleotide translocase and creatine kinase. *J Mol Cell Cardiol*. May 2001;33(5):947-956.
198. Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A. ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol*. Sep 1 1999;519 Pt 2:347-360.
199. Murata M, Akao M, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*. Nov 9 2001;89(10):891-898.
200. Pain T, Yang XM, Critz SD, et al. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res*. Sep 15 2000;87(6):460-466.
201. Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res*. Apr 27 2001;88(8):802-809.
202. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, et al. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res*. Aug 15 2002;55(3):534-543.

203. Javadov SA, Clarke S, Das M, et al. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol*. Jun 1 2003;549(Pt 2):513-524.
204. Wang G, Liem DA, Vondriska TM, et al. Nitric oxide donors protect murine myocardium against infarction via modulation of mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Mar 2005;288(3):H1290-1295.
205. Hausenloy D, Wynne A, Duchon M, et al. Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation*. Apr 13 2004;109(14):1714-1717.
206. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*. Apr 1 2004;62(1):74-85.
207. Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, et al. Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology*. Jan 2005;102(1):102-109.
208. Yang XM, Philipp S, Downey JM, et al. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol*. Jan 2005;100(1):57-63.
209. Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, et al. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res*. Oct 6 2005.
210. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, et al. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*. Aug 6 2004;95(3):230-232.
211. Lucchinetti E, da Silva R, Pasch T, et al. Anaesthetic preconditioning but not postconditioning prevents early activation of the deleterious cardiac remodelling programme: evidence of opposing genomic responses in cardioprotection by pre- and postconditioning. *Br J Anaesth*. Aug 2005;95(2):140-152.
212. Gritsopoulos G, Iliodromitis EK, Zoga A, et al. Remote postconditioning is more potent than classic postconditioning in reducing the infarct size in anesthetized rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther*. Jun 2009;23(3):193-198.
213. Andreka G, Vertesaljai M, Szantho G, et al. Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart*. Jun 2007;93(6):749-752.
214. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, et al. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol*. Sep 2005;100(5):404-412.
215. Li CM, Zhang XH, Ma XJ, et al. Limb ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Scand Cardiovasc J*. Oct 2006;40(5):312-317.
216. Liu S, Wu XF, Zhang WZ, et al. [Remote postconditioning by brief renal ischemia and reperfusion reduces acute myocardial ischemia and reperfusion induced myocardial apoptosis in rabbits]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. Aug 2007;35(8):757-760.
217. Pinheiro BB, Fiorelli AI, Gomes OM. Effects of ischemic postconditioning on left ventricular function of isolated rat hearts. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. Mar 2009;24(1):31-37.

218. Couvreur N, Lucats L, Tissier R, et al. Differential effects of postconditioning on myocardial stunning and infarction: a study in conscious dogs and anesthetized rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Sep 2006;291(3):H1345-1350.
219. Peng LY, Ma H, He JG, et al. [Ischemic postconditioning attenuates ischemia/reperfusion injury in isolated hypertrophied rat heart]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. Aug 2006;34(8):685-689.
220. Zatta AJ, Kin H, Yoshishige D, et al. Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Mar 2008;294(3):H1444-1451.
221. Fang J, Wu L, Chen L. Postconditioning attenuates cardiocyte ultrastructure injury and apoptosis by blocking mitochondrial permeability transition in rats. *Acta Cardiol*. Jun 2008;63(3):377-387.
222. Dosenko VE, Nagibin VS, Tumanovskaya LV, et al. Postconditioning prevents apoptotic necrotic and autophagic cardiomyocyte cell death in culture. *Fiziol Zh*. 2005;51(3):12-17.
223. Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, et al. Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur J Cardiothorac Surg*. Jun 2004;25(6):1006-1010.
224. Petrishchev NN, Vlasov TD, Galagudza MM, et al. [Myocardial ischemic postconditioning: a brief ischemia causes conversion of resistant reperfusion-induced ventricular fibrillation into the normal rhythm]. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova*. Sep 2004;90(9):1138-1144.
225. Kloner RA, Forman MB, Gibbons RJ, et al. Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AMISTAD-2 trial. *Eur Heart J*. Oct 2006;27(20):2400-2405.
226. Fujita M, Asanuma H, Hirata A, et al. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Apr 2007;292(4):H2004-2008.
227. van Vuuren D, Genis A, Genade S, et al. Postconditioning the isolated working rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther*. Oct 2008;22(5):391-397.
228. Stenslokken KO, Rutkovskiy A, Kaljusto ML, et al. Inadvertent phosphorylation of survival kinases in isolated perfused hearts: a word of caution. *Basic Res Cardiol*. Jul 2009;104(4):412-423.
229. Zhao JL, Yang YJ, You SJ, et al. Different effects of postconditioning on myocardial no-reflow in the normal and hypercholesterolemic mini-swines. *Microvasc Res*. Mar 2007;73(2):137-142.
230. Oikawa M, Yaoita H, Watanabe K, et al. Attenuation of cardioprotective effect by postconditioning in coronary stenosed rat heart and its restoration by carvedilol. *Circ J*. Dec 2008;72(12):2081-2086.
231. Dow J, Kloner RA. Postconditioning does not reduce myocardial infarct size in an in vivo regional ischemia rodent model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. Jun 2007;12(2):153-163.
232. Hale SL, Mehra A, Leeka J, et al. Postconditioning fails to improve no reflow or alter infarct size in an open-chest rabbit model of myocardial ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jan 2008;294(1):H421-425.
233. Stewart S, Lesnefsky EJ, Chen Q. Reversible blockade of electron transport with amobarbital at the onset of reperfusion attenuates cardiac injury. *Transl Res*. May 2009;153(5):224-231.

234. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res*. Jul 1 2005;67(1):124-133.
235. Schwartz LM, Lagranha CJ. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Mar 2006;290(3):H1011-1018.
236. Iliodromitis EK, Georgiadis M, Cohen MV, et al. Protection from postconditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs. *Basic Res Cardiol*. Nov 2006;101(6):502-507.
237. Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. Feb 15 2004;61(3):365-371.
238. Yang XM, Proctor JB, Cui L, et al. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol*. Sep 1 2004;44(5):1103-1110.
239. Jang Y, Xi J, Wang H, et al. Postconditioning prevents reperfusion injury by activating delta-opioid receptors. *Anesthesiology*. Feb 2008;108(2):243-250.
240. Penna C, Mancardi D, Raimondo S, et al. The paradigm of postconditioning to protect the heart. *J Cell Mol Med*. Apr 2008;12(2):435-458.
241. Kocsis GF, Pipis J, Fekete V, et al. Lovastatin interferes with the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning and postconditioning in rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. May 2008;294(5):H2406-2409.
242. Burley DS, Baxter GF. B-type natriuretic peptide at early reperfusion limits infarct size in the rat isolated heart. *Basic Res Cardiol*. Nov 2007;102(6):529-541.
243. Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, et al. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res*. Jan 2006;69(1):178-185.
244. Yang XM, Philipp S, Downey JM, et al. Atrial natriuretic peptide administered just prior to reperfusion limits infarction in rabbit hearts. *Basic Res Cardiol*. Jul 2006;101(4):311-318.
245. Ockaili R, Salloum F, Hawkins J, et al. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Sep 2002;283(3):H1263-1269.
246. Yellon DM, Baxter GF. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc Med*. Nov 1999;9(8):245-249.
247. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis*. Jun 2009;204(2):334-341.
248. Schwanke U, Konietzka I, Duschin A, et al. No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Oct 2002;283(4):H1740-1742.
249. Schwanke U, Li X, Schulz R, et al. No ischemic preconditioning in heterozygous connexin 43-deficient mice--a further in vivo study. *Basic Res Cardiol*. May 2003;98(3):181-182.
250. Heusch G, Buchert A, Feldhaus S, et al. No loss of cardioprotection by postconditioning in connexin 43-deficient mice. *Basic Res Cardiol*. Jul 2006;101(4):354-356.
251. Philipp S, Yang XM, Cui L, et al. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res*. May 1 2006;70(2):308-314.

252. Morrison RR, Tan XL, Ledent C, et al. Targeted deletion of A2A adenosine receptors attenuates the protective effects of myocardial postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Oct 2007;293(4):H2523-2529.
253. Xi L, Das A, Zhao ZQ, et al. Loss of myocardial ischemic postconditioning in adenosine A1 and bradykinin B2 receptors gene knockout mice. *Circulation*. Sep 30 2008;118(14 Suppl):S32-37.
254. Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, et al. Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling. *Cardiovasc Res*. Jul 1 2007;75(1):168-177.
255. Xu J, Carretero OA, Sun Y, et al. Role of the B1 kinin receptor in the regulation of cardiac function and remodeling after myocardial infarction. *Hypertension*. Apr 2005;45(4):747-753.
256. Lagneux C, Bader M, Pesquero JB, et al. Detrimental implication of B1 receptors in myocardial ischemia: evidence from pharmacological blockade and gene knockout mice. *Int Immunopharmacol*. May 2002;2(6):815-822.
257. Yin H, Chao J, Bader M, et al. Differential role of kinin B1 and B2 receptors in ischemia-induced apoptosis and ventricular remodeling. *Peptides*. Jul 2007;28(7):1383-1389.
258. Chen Z, Li T, Zhang B. Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts. *J Surg Res*. Apr 2008;145(2):287-294.
259. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res*. Apr 16 2004;94(7):960-966.
260. Darling CE, Jiang R, Maynard M, et al. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Oct 2005;289(4):H1618-1626.
261. Zatta AJ, Kin H, Lee G, et al. Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovasc Res*. May 1 2006;70(2):315-324.
262. Sun HY, Wang NP, Halkos M, et al. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis*. Sep 2006;11(9):1583-1593.
263. Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med*. Feb 2005;15(2):69-75.
264. Dawn B, Bolli R. Role of nitric oxide in myocardial preconditioning. *Ann N Y Acad Sci*. May 2002;962:18-41.
265. Sasaki N, Sato T, Ohler A, et al. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation*. Feb 1 2000;101(4):439-445.
266. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*. Mar 2002;3(3):214-220.
267. Feil R, Lohmann SM, de Jonge H, et al. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res*. Nov 14 2003;93(10):907-916.
268. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*. Sep 2000;52(3):375-414.
269. Su J, Scholz PM, Weiss HR. Differential effects of cGMP produced by soluble and particulate guanylyl cyclase on mouse ventricular myocytes. *Exp Biol Med (Maywood)*. Apr 2005;230(4):242-250.
270. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, et al. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive

- K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol*. Mar 2006;101(2):180-189.
271. Lim SY, Davidson SM, Hausenloy DJ, et al. Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res*. Aug 1 2007;75(3):530-535.
272. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet*. Jul 31 1993;342(8866):276-277.
273. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, et al. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart*. Apr 1997;77(4):314-318.
274. Yu CH, Beattie WS. The effects of volatile anesthetics on cardiac ischemic complications and mortality in CABG: a meta-analysis. *Can J Anaesth*. Sep 2006;53(9):906-918.
275. Symons JA, Myles PS. Myocardial protection with volatile anaesthetic agents during coronary artery bypass surgery: a meta-analysis. *Br J Anaesth*. Aug 2006;97(2):127-136.
276. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*. Dec 3 2002;106(23):2881-2883.
277. Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol*. Jun 6 2006;47(11):2277-2282.
278. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet*. Aug 18 2007;370(9587):575-579.
279. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation*. Sep 11 2007;116(11 Suppl):I98-105.
280. Laskey WK. Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv*. Jul 2005;65(3):361-367.
281. Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation*. Mar 2 2004;109(8):962-965.
282. Kitakaze M, Asakura M, Kim J, et al. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet*. Oct 27 2007;370(9597):1483-1493.
283. Piot C, Croisille P, Staat P, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. Jul 31 2008;359(5):473-481.
284. Hausenloy DJ, Yellon DM. Time to take myocardial reperfusion injury seriously. *N Engl J Med*. Jul 31 2008;359(5):518-520.
285. Fontaine E, Bernardi P. Progress on the mitochondrial permeability transition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs. *J Bioenerg Biomembr*. Aug 1999;31(4):335-345.
286. Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, et al. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 23 2005;102(34):12005-12010.
287. Gateau-Roesch O, Pavlov E, Lazareva AV, et al. Calcium-binding properties of the mitochondrial channel-forming hydrophobic component. *J Bioenerg Biomembr*. Feb 2000;32(1):105-110.

288. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* May 7 1976;72:248-254.
289. Forman HJ, Azzi A. On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology. *Faseb J.* Apr 1997;11(5):374-375.
290. Antunes F, Cadenas E. Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* Jun 16 2000;475(2):121-126.
291. Loschen G, Azzi A, Richter C, et al. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* May 15 1974;42(1):68-72.
292. Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* Jul 1 1975;54(3):311-314.
293. Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, et al. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem.* Nov 15 1997;253(2):162-168.
294. Kumar A, Kaur H, Devi P, et al. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. *Pharmacol Ther.* Jul 25 2009.
295. Mitchell P. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett.* Aug 1 1975;56(1):1-6.
296. Echtay KS, Winkler E, Klingenberg M. Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature.* Nov 30 2000;408(6812):609-613.
297. Swida-Barteczka A, Woyda-Ploszczyca A, Sluse FE, et al. Uncoupling protein 1 inhibition by purine nucleotides is under control of the endogenous ubiquinone redox state. *Biochem J.* Sep 11 2009.
298. Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, et al. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* Apr 30 1977;180(2):248-257.
299. Yamamura T, Otani H, Nakao Y, et al. Dual involvement of coenzyme Q10 in redox signaling and inhibition of death signaling in the rat heart mitochondria. *Antioxid Redox Signal.* Feb 2001;3(1):103-112.
300. James AM, Smith RA, Murphy MP. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch Biochem Biophys.* Mar 1 2004;423(1):47-56.
301. Linnane AW, Eastwood H. Cellular redox poise modulation; the role of coenzyme Q10, gene and metabolic regulation. *Mitochondrion.* Sep 2004;4(5-6):779-789.
302. Degli Esposti M, Ngo A, McMullen GL, et al. The specificity of mitochondrial complex I for ubiquinones. *Biochem J.* Jan 1 1996;313 (Pt 1):327-334.
303. Grivennikova VG, Vinogradov AD. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta.* May-Jun 2006;1757(5-6):553-561.
304. Hinkle PC, Butow RA, Racker E, et al. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XV. Reverse electron transfer in the flavin-cytochrome beta region of the respiratory chain of beef heart submitochondrial particles. *J Biol Chem.* Nov 25 1967;242(22):5169-5173.
305. Sharma LK, Lu J, Bai Y. Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Curr Med Chem.* 2009;16(10):1266-1277.
306. Lesnefsky EJ, Chen Q, Moghaddas S, et al. Blockade of electron transport during ischemia protects cardiac mitochondria. *J Biol Chem.* Nov 12 2004;279(46):47961-47967.

- 307.** Chen Q, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Blockade of electron transport before cardiac ischemia with the reversible inhibitor amobarbital protects rat heart mitochondria. *J Pharmacol Exp Ther.* Jan 2006;316(1):200-207.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS-----	p3
LISTE DES PUBLICATIONS-----	p5
SOMMAIRE-----	p6
LISTE DES ABREVIATIONS-----	p8
INTRODUCTION-----	p10
I. Mitochondrie et mort cellulaire-----	p11
I-1. Structure et fonctionnement des mitochondries-----	p11
I-1-1. Structure des mitochondries	p11
I-1-2. Fonctionnement des mitochondries	p14
I-2. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale-----	p21
I-2-1. Caractéristiques	p21
I-2-2. Structure moléculaire et régulation du PTPm	p22
I-2-3. Rôle du PTPm dans la signalisation de la mort cellulaire	p35
II. Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion cardiaque-----	p37
II-1. Facteurs déterminants de l'ischémie-----	p37
II-2. Reperfusion-----	p39
II-3. Conséquences de l'ischémie-reperfusion-----	p40
II-4. Induction de la mort cellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion-----	p43
III. Protection cardiaque-----	p48
III-1. Préconditionnement cardiaque-----	p49
III-2. Postconditionnement cardiaque-----	p57
III-3. Application du pré et du postconditionnement chez l'homme-----	p64
BUT DU TRAVAIL DE RECHERCHE-----	p67
MATERIELS ET METHODES-----	p69
I. Animaux-----	p70
II. Réactifs-----	p70
III. Etudes sur les cœurs isolés de rats-----	p70
III-1. Protocole chirurgical-----	p70
III-2. Modèle <i>in vitro</i> « cœur isolé-Langendorff »-----	p71
III-3. Protocoles expérimentaux-----	p72
IV. Quantification de l'infarctus-----	p74
V. Prélèvements des cœurs de souris et de lapins-----	p74
VI. Isolement des mitochondries-----	p75
VII. Dosage de protéines-----	p76
VIII. Analyses des fonctions mitochondriales-----	p76
VIII-1. Phosphorylation oxydative-----	p76
VIII-2. Capacité de rétention du calcium-----	p77
VIII-3. Gonflement mitochondrial-----	p78
VIII-4. Production de H ₂ O ₂ -----	p79
IX. Analyses statistiques-----	p81

RESULTATS ET DISCUSSIONS -----	p82
I. Effets de CoQ₂ et CoQ₁₀ sur le PTPm cardiaque et la production de ROS	p83
<i>in vitro</i> -----	
Résumé-----	p84
Publication-----	p85
Synthèse des résultats et discussion-----	p106
II. Régulation du pore de transition de perméabilité par le complexe I de la chaîne respiratoire et la cyclophiline D -----	p108
Publication-----	p110
Résultats complémentaires-----	p120
Synthèse des résultats et discussion-----	p124
III. Postconditionnement pharmacologique par le Périndoprilate sur un modèle de cœur isolé de rat -----	p127
Résumé-----	p128
Publication-----	p129
Synthèse des résultats et discussion-----	p146
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES -----	 p147
 BIBLIOGRAPHIE -----	 p149