



HAL
open science

Rôle de la cytoarchitecture dans la signalisation énergétique du cœur de souris

Jérôme Piquereau

► **To cite this version:**

Jérôme Piquereau. Rôle de la cytoarchitecture dans la signalisation énergétique du cœur de souris. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114801 . tel-00665260

HAL Id: tel-00665260

<https://theses.hal.science/tel-00665260>

Submitted on 1 Feb 2012

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.

UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

ECOLE DOCTORALE :
INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ
PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

ANNÉE : 2011

SÉRIE DOCTORAT N° : 1096

THÈSE

Présentée

À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE
FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY
UNIVERSITÉ PARIS XI

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

par

M. Jérôme PIQUEREAU

Titre de la thèse :

**Rôle de la cytoarchitecture dans la signalisation
énergétique du cœur de souris**

Soutenue le : 7 janvier 2011

JURY :

Pr Christian POÛS

Président

Dr Anne LOMBÈS

Rapporteur

Pr. Yan BURELLE

Rapporteur

Dr Catherine RÜCKER-MARTIN

Examineur

Pr Vladimir VEKSLER

REMERCIEMENTS

L'écriture des remerciements est un moment particulier dans la rédaction de la thèse puisqu'elle permet de coucher sur le papier toute sa gratitude envers les personnes qui ont contribué au succès du travail réalisé. Si la plume (ou plutôt le clavier) permet de s'affranchir de cette pudeur qui bien souvent constitue un frein à l'expression des sentiments, cette tâche n'en reste pas moins difficile dans la mesure où « tout le monde » doit être remercié, sous peine de se faire haïr par les « oubliés ». C'est donc avec fébrilité que j'amorce ces quelques lignes...

Je vais commencer en remerciant les membres du jury, à savoir M.Christian Poüs pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse, Mme Anne Lombès et M. Yan Burelle pour avoir jugé ce travail ainsi que Catherine Rücker-Martin pour avoir accepté de participer à ce jury. Je leur en suis très reconnaissant.

Une thèse ne peut bien sûr se faire sans un laboratoire d'accueil ; Rodolphe Fischmeister m'a donné la chance de pouvoir travailler dans son laboratoire où règnent qualité scientifique et bonne humeur, je n'aurais pu rêver mieux pour débiter ma carrière dans la recherche. Je le remercie chaleureusement.

Je suis heureux d'avoir fait partie de « l'équipe mito » dirigée par Renée Ventura-Clapier dont l'investissement dans la science et dans la vie du laboratoire est remarquable. Elle est une personne d'une générosité rare ; je ne la remercierai jamais assez de m'avoir fait confiance alors que je n'étais encore qu'un inconnu.

S'il y a une personne avec qui le thésard a une relation particulière, c'est bien avec son directeur de thèse. Je remercie donc l'éminent Professeur Vladimir Veksler, dit Volodia, pour ses conseils avisés, sa rigueur scientifique, sa disponibilité, son humour et ses énigmes mathématiques du vendredi soir. Ma guitare le remercie également pour ces quelques accords qui l'ont transportée en Russie.

Les gens disent souvent que les scientifiques manquent de poésie ; ces gens là n'ont pas rencontré Frédéric Joubert, mon guide lors de mes premières « manips ». Je le remercie pour tous les moments que nous avons passés à la paillasse, mais aussi pour toutes les discussions scientifiques et linguistiques que nous avons eues (même si nous n'avons pas toujours été d'accord...)

La photo de groupe des chercheurs de l'équipe ne peut être complète sans Anne Garnier, reine de la biologie moléculaire. Je la remercie pour son aide précieuse.

La qualité de ce travail n'aurait pas été la même sans la participation de Marta Novotova qui maîtrise l'art de la microscopie électronique comme personne. Je la remercie pour ces fabuleuses photos et pour son accueil à Bratislava. Pour compléter cette parenthèse concernant les collaborations étrangères, je remercie Marcel Alavi pour nous avoir fourni les « souris OPA1 » avec lesquelles j'ai travaillé durant la deuxième partie de ma thèse.

Je tiens bien sûr à remercier Dominique Fortin, « Dom » pour les intimes. Je la remercie pour tous les conseils qu'elle a pu me donner à la paillasse et également pour tous ces éclats de rires dont elle était l'artificier en chef dans le bureau. Je profite de l'occasion

pour remercier mes autres colocataires de bureau en commençant par (il faut bien commencer par quelqu'un...) le non moins comique Philippe Mateo, roi de la chirurgie et de l'échocardiographie sans qui je n'aurais jamais su canuler un cœur. Je remercie également Stéphanie (qui à sa part de responsabilité dans le fait que je sois devant cet écran à l'heure où j'écris ces mots), Matthieu (joueur de Kazou à ses heures perdues) et Julia (mon amie autrichienne avec qui j'espère avoir de nombreuses autres discussions sur les habitudes « bizarres » des français).

Je ne peux bien évidemment pas oublier de remercier Françoise Boussac (la « maman des thésards »). Son aide dans les tâches administratives m'a été très précieuse, merci aussi pour avoir tenu à jour le registre des « chansons du labo » qui m'a permis d'accompagner des dizaines de rockeurs avec ma guitare. Je remercie également Patrick Lechêne que je vois, au moment où j'écris ces mots, réparer l'ordinateur de Françoise (comment ferions-nous sans notre McGyver...). Je remercie Florence Lefebvre, que j'aperçois dans ce même bureau, pour ces conseils d'experte en dissociation permettant d'obtenir des cardiomyocytes de toute beauté.

La thèse est une expérience extraordinaire durant laquelle le moral joue aux montagnes russes, les moments difficiles se surmontent plus facilement lorsque le groupe des thésards est marqué par un esprit de solidarité et de camaraderie. Je remercie donc mes co-thésards et amis : Delphine (ma camarade de route qui a terminé le voyage un peu avant moi ; sa bonne humeur communicative, nos discussions et nos goûters me manqueront), Fabien ou plutôt Fabio (le Pete Sampras de l'humour... ; nos discussions poitevines me manqueront), Alessandra (notre amie d'Italie du NORD), Hind (l'organisatrice de bal), Zeineb (la chanteuse confirmée du groupe), Kui (le seul chinois qui mange du fromage de chèvre du Poitou), Fanny (la parleuse la plus rapide de l'ouest parisien), Alexandre (champion d'Europe de 100m par procuration) et enfin Magali (sans e) et Anne-coline (sans h) (nos amies toulousaines).

Chaque membre du laboratoire a participé à sa manière à mon travail ou à mon bien-être durant ces trois années passées à Chatenay-Malabry, c'est pourquoi je remercie également Jérôme, Grégoire, Véronique, Bertrand, Catherine, Christophe, Cristina, Eric, Audrey, Sophie, Claire, Aziz, Ossama, Cindy, Cécile, Eléonore, Grégory, Magali, Mélanie, Aniella, Nico le Petit et Nico le Grand.

Je profite de l'occasion pour dire un grand merci à mes amis ; je les ai souvent laissés sans nouvelles ces trois dernières années mais ils ne m'en ont jamais tenu rigueur. Merci à David, Thomas, Olivier, Gaëlle, Magali, Jérôme, Aurélien et Magalie.

Je ne serais pas ce que je suis sans ma famille. On prend rarement le temps d'exprimer toute la reconnaissance qu'on peut éprouver envers les personnes qui nous sont chères. Je remercie donc mes parents, Françoise et Christian, pour m'avoir soutenu dans chacun de mes choix depuis mon plus jeune âge. Je remercie ma sœur, Jennifer, et mon frère, Johnny (non, non ! ce n'est pas une blague !!) pour leur soutien à toute épreuve. Je remercie également Cédric (futur cardiologue...), Nicolas (le Bernard Pivot de la famille), Chantal, Jean-Luc et Adeline. Je ne peux m'empêcher d'avoir une pensée pour ma tante qui joue encore un rôle important dans mes choix quotidiens.

Je terminerai cette séquence émotion en remerciant Estelle pour son soutien sans faille et pour avoir été ma bouffée d'oxygène quotidienne.

RÉSUMÉ

La cellule cardiaque requiert un apport énergétique conséquent qui exige une production et un transfert énergétique efficace. Si la production de l'énergie dépend essentiellement des propriétés intrinsèques des mitochondries, il semblerait que l'efficacité du transfert d'énergie du site de production vers les sites consommateurs (ATPases) pourrait être liée à l'architecture spécifique du cardiomyocyte qui conduit à une organisation spatiale singulière des structures internes (mitochondries, réticulum sarcoplasmique, myofilaments). Pour comprendre ce qui lie la cytoarchitecture, la compartimentation cellulaire et la fonction contractile, il a été entrepris d'étudier l'architecture cellulaire et la signalisation énergétique de cardiomyocytes au cours du processus de maturation de la cytoarchitecture et dans un modèle présentant une désorganisation des structures intracellulaires.

La première partie de ce travail, réalisée durant le développement postnatal de la souris, a permis de démontrer qu'il existe une synchronisation parfaite entre la mise en place de la cytoarchitecture et la maturation fonctionnelle du transfert d'énergie par canalisation directe des nucléotides adényliques entre les mitochondries et les ATPases. Si cette étude apporte un élément qui tendrait à démontrer l'implication de l'architecture cellulaire dans l'efficacité des transferts d'énergie, elle a également mis en avant la maturation très précoce de l'énergétique cellulaire.

La mitochondrie faisant partie intégrante de cette architecture et étant modelée par des mécanismes de fusion et de fission, la deuxième étape de ce travail de thèse a consisté à étudier l'implication de la morphologie mitochondriale dans l'énergétique du cardiomyocyte. Il a ainsi été montré que, chez la souris, la diminution d'expression de la protéine OPA1, impliquée dans la fusion mitochondriale, conduit à des perturbations de la morphologie mitochondriale qui n'affectent pas la fonction intrinsèque mitochondriale mais qui altèrent le système de canalisation directe entre les mitochondries et les ATPases des myofilaments.

De manière générale, ces résultats démontrent clairement une dépendance des transferts d'énergie à l'architecture cellulaire spécifique de la cellule musculaire cardiaque.

ABSTRACT

The cardiac cell function requires a large amount of energy and therefore needs a high efficiency of energetic production and energetic transfer. While the energy production depends on the intrinsic properties of the mitochondria, it appears that the efficiency of energetic transfers from the main producers (mitochondria) to consumers (ATPases) could be related to the specific architecture of the cardiomyocyte, which ensures a unique spatial organization of internal structures (mitochondria, sarcoplasmic reticulum, myofilaments). In order to reveal the role of mitochondrial network organization in cardiac energy metabolism, we studied the cellular architecture and the energetic signalling of cardiomyocytes in the process of maturation of the cytoarchitecture and in a model which exhibits a perturbation of the mitochondrial dynamics.

The first part of this work, which was performed during postnatal development of the mouse, showed the perfect synchronisation between the establishment of the cytoarchitecture and the maturation of the transfer of energy by direct channelling of adenine nucleotides between mitochondria and ATPases. While this study provides an element which would demonstrate the involvement of cellular architecture in the efficiency of energy transfer, it also highlighted the very early maturation of the energetic system of the cell.

Knowing that the mitochondria are an integral part of the cell architecture and that the mitochondrial network is controlled by fusion and fission mechanisms, the second step of this work consisted in investigating the involvement of mitochondrial dynamics in cardiomyocyte energetics. Our work has shown that a decrease in expression of OPA1, a protein responsible for mitochondrial fusion, leads to disruption of mitochondrial morphology which does not affect intrinsic mitochondrial function but affects the direct channelling of ATP and ADP between mitochondria and ATPases of the myofilaments.

Overall, these results clearly demonstrate that energy transfer in cardiomyocytes strictly depends on specific cellular architecture.

ABRÉVIATIONS

ACR: Acceptor Control Ratio
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADN_{mt} : Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADOA : Autosomal Dominant Optic Atrophy
ADP : Adénosine Diphosphate
AIF : Apoptosis Inducible Factor
AK : Adénylate Kinase
AMP : Adénosine Monophosphate
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine Triphosphate
ANT : Adenine Nucleotide Translocase
BSA : Bovin Serum Albumin
CAMK : Protéine Kinase Ca²⁺-Calmoduline dépendante
CICR : Calcium-Induced Calcium-release
CK : Créatine Kinase
COX : Cytochrome-c Oxydase
CPT : Carnitine Palmitoyltranférase
Cr : Créatine
CS : Citrate Synthase
DHPR : Récepteur à la Dihydropyridine
DLP1: Dynamin Like Protein 1
DO : Densité Optique
DRP1 : Dynamin-Related Protein 1
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide
FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide réduit
FCCP : Carbonyl Cyanide p-(triFluoromethoxy) Phenylhydrazone
FIS1 : Fission protein 1
G6PDH : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GDP : Guanosine Diphosphate
GED : GTPase Effector Domain
GTP : Guanosine Triphosphate
HK : Hexokinase
ICEU : Intracellular Energetic Unit
LDH : Lactate Déshydrogénase
MET : Microscope Electronique à Transmission
MFN : Mitofusine
MHC : Myosin Heavy Chain
Mi-CK : Créatine Kinase Mitochondriale
MLC : Myosin Light Chain
MLP : Muscle Lim Protein
NAD : Nicotamide Adénine Dinucléotide
NADH : Nicotamide Adénine Dinucléotide réduit
OPA1 : Optic Atrophy 1
pCa : $-\log_{10} [\text{Ca}^{2+}]$

PCR : Polymerase Chain Reaction
PEP : Phosphoénolpyruvate
PGC-1 : Peroxisome-proliférateur-activé- récepteur Gamma Co-activateur-1
Pi : Phosphate inorganique
PK : Pyruvate Kinase
PKA : Protéine Kinase AMPc dépendante
PLB : Phospholamban
PTP : Pore de Transition de Perméabilité
RE : Réticulum Endoplasmique
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RS : Réticulum Sarcoplasmique
RyR : Récepteur à la ryanodine
SERCA : Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase
TIM : Translocase of Inner Membrane
TLDA : TaqMan Low Density Array
TM : Tropomyosine
TMPD : Tétraméthyl-p-PhénylèneDiamine
TOM : Translocase of Outer Membrane
V₀ : Vitesse basal de la respiration mitochondriale
VDAC : Voltage Dependent Anion Channel
V_{max} : Vitesse maximale de la respiration mitochondriale

TABLE DES MATIÈRES

PREAMBULE	13
INTRODUCTION	17
CHAPITRE I : Energétique cardiaque	18
I. Le cœur et ses besoins énergétiques	18
<i>A. Du cœur au cardiomyocyte</i>	<i>18</i>
<i>B. Du cardiomyocyte à la contraction.....</i>	<i>20</i>
1. <i>Le cardiomyocyte : une cellule à part</i>	<i>20</i>
2. <i>Du potentiel d'action à la contraction.....</i>	<i>20</i>
3. <i>Le cardiomyocyte et sa machinerie contractile</i>	<i>23</i>
<i>C. De la contraction à l'énergie.....</i>	<i>30</i>
1. <i>Myofilaments et énergie.....</i>	<i>30</i>
2. <i>Repompage calcique et énergie.....</i>	<i>32</i>
3. <i>Autres consommateurs d'énergie.....</i>	<i>33</i>
II. Synthèse énergétique du cardiomyocyte	34
<i>A. La glycolyse.....</i>	<i>35</i>
<i>B. Les phosphorylations oxydatives</i>	<i>37</i>
1. <i>La mitochondrie : généralités.....</i>	<i>37</i>
2. <i>La mitochondrie : structure</i>	<i>39</i>
3. <i>La phosphorylation oxydative.....</i>	<i>42</i>
<i>C. Régulation de la synthèse énergétique du cardiomyocyte</i>	<i>45</i>
III. Transferts d'énergie et du signal énergétique.....	48
<i>A. Créatine kinase et transfert d'énergie</i>	<i>48</i>
1. <i>Les Créatines Kinases mitochondriales.....</i>	<i>49</i>
2. <i>L'isoforme MM de la Créatine Kinase</i>	<i>50</i>
3. <i>L'ensemble du système CK.....</i>	<i>51</i>
<i>B. Adénylate kinase et transfert d'énergie</i>	<i>53</i>
<i>C. Canalisation directe des nucléotides et transferts d'énergie.....</i>	<i>54</i>
IV. Architecture cellulaire du cardiomyocyte	58

<i>A. Unité énergétique intracellulaire</i>	60
<i>B. Cytosquelette et énergétique cellulaire</i>	62
CHAPITRE II : Situations physiologiques permettant d'étudier le lien entre architecture et transferts énergétiques	64
I. Le développement postnatal	64
<i>A. Maturation systémique</i>	64
<i>B. Maturation du coeur</i>	66
<i>C. Maturation de l'architecture cellulaire</i>	67
II. La dynamique mitochondriale	69
<i>A. Régulation de la fusion mitochondriale</i>	71
1. <i>Les mitofusines</i>	71
2. <i>OPA1</i>	74
<i>B. Régulation de la fission mitochondriale</i>	75
1. <i>DRP1</i>	76
2. <i>FIS1</i>	79
MATERIELS ET METHODES.....	81
Chapitre I : Modèles animaux	82
I. Modèle de mise en place de l'architecture cellulaire	82
II. Modèle de perturbations de l'architecture cellulaire	82
III. Hébergement et sacrifices	84
Chapitre II : Etude de la fonction, de l'architecture et de l'énergétique cardiaque	85
I. Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie	85
II. Etude de l'architecture cellulaire et du réseau mitochondrial	85
<i>A. Microscopie électronique à transmission</i>	86
1. <i>Préparation et observation des échantillons</i>	86
2. <i>Analyse stéréologique des échantillons</i>	87
<i>B. Microscopie confocale</i>	87

1. Préparation et observation des cellules.....	89
2. Analyse morphologique du réseau mitochondrial.....	90
III. Etude de la fonction mitochondriale.....	90
A. Mesure des capacités oxydatives des mitochondries.....	90
1. Préparation des fibres perméabilisées.....	91
2. Mesure de la respiration mitochondriale.....	91
3. Analyse des données.....	95
B. Etude l'ouverture du PTP.....	96
C. Mesure d'activité enzymatique.....	96
1. Extraction et dosage des protéines.....	96
2. Dosages enzymatiques.....	97
IV. Etude des transferts énergétiques.....	99
A. Etude des transferts énergétiques au voisinage de SERCA.....	99
B. Etude des transferts énergétiques au voisinage de la myosine-ATPase.....	102
V. Etude moléculaire du RS et des myofilaments.....	103
A. Mesure du niveau d'expression protéique par Western Blot.....	103
B. Mesure du niveau d'expression génique par RT-PCR quantitative.....	103
1. Extraction, dosage et qualité des ARN totaux.....	104
2. PCR quantitative : SYBR Green.....	105
VI. Etude du profil métabolique.....	107
A. Dosage enzymatique.....	108
1. La Créatine Kinase totale.....	108
2. La lactate déshydrogénase.....	108
B. Mesure du niveau d'expression génique par RT-PCR quantitative.....	109
1. Transcription inverse.....	109
2. PCR quantitative en temps réel.....	109
3. Analyse des résultats.....	111
VII. Statistiques.....	111
RESULTATS.....	113
Chapitre I : Mise en évidence d'un lien entre architecture cellulaire et transfert énergétique.....	114
I. Présentation.....	114

II. Résultats et discussion	114
Chapitre II : Morphologie mitochondriale et transferts énergétiques...	119
I. Présentation	119
II. Résultats et discussion	120
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	124
I. Pertinence des modèles	125
<i>A. Architecture cellulaire des différents modèles</i>	126
1. <i>Evolution de la cytoarchitecture durant le développement postnatal</i>	126
2. <i>Conséquences d'un déficit d'expression d'OPA1 sur la cytoarchitecture</i>	128
<i>B. Fonction mitochondriale des différents modèles</i>	130
1. <i>Fonction mitochondriale et développement postnatal</i>	131
2. <i>Fonction mitochondriale et déficit d'OPA1</i>	132
II. Cardiomyocyte et transferts énergétiques	134
III. Conclusion et perspectives	137
BIBLIOGRAPHIE	140

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Les cavités et les valves cardiaques.....	19
Figure 2 : Schématisation de la circulation sanguine.....	19
Figure 3 : Le tissu conducteur cardiaque	22
Figure 4 : Mécanisme du couplage excitation-contraction.	22
Figure 5 : Le myofilament épais	25
Figure 6 : Le myofilament fin	25
Figure 7 : L'unité contractile : le sarcomère	27
Figure 8 : Ultrastructure du cardiomyocyte (microscopie électronique).	27
Figure 9 : Fixation de la myosine à l'actine.....	29
Figure 10 : Les différentes étapes du raccourcissement des sarcomères	31
Figure 11 : Voie de la glycolyse anaérobie.....	36
Figure 12 : Schématisation de l'organisation structurale mitochondriale.....	41
Figure 13 : La navette Malate/Aspartate	41
Figure 14 : La β -oxydation des acides gras.....	43
Figure 15 : Le Cycle de Krebs	43
Figure 16 : Chaîne respiratoire mitochondriale	44
Figure 17 : Interactions entre le mi-CK, la translocase (ANT) et la porine (VDAC).....	52
Figure 18 : Transfert d'énergie par le système créatine kinase (« shuttle »)	52
Figure 19 : Transfert d'énergie par le système des adénylates kinases.....	55
Figure 20 : Transfert d'énergie par canalisation directe de l'ATP et de l'ADP.....	55
Figure 21 : Microdomaine énergétique	57
Figure 22 : Ultrastructure de cardiomyocyte	59
Figure 23 : Représentation de la circulation sanguine foetale	65
Figure 24 : La dynamique mitochondriale	70
Figure 25 : Interaction des mitofusines	73
Figure 26 : La fission mitochondriale	77
Figure 27 : Analyse morphométrique des images obtenues par microscopie électronique. ...	88
Figure 28 : dispositif de mesure de la respiration mitochondriale	92
Figure 29 : Protocole de mesure des capacités oxydatives des mitochondries	94
Figure 30 : Protocole d'étude de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire	94
Figure 31 : Dispositif de mesure de tension des fibres perméabilisées.....	100
Figure 32 : Détection des produits de PCR par la méthode du SYBR green.....	106
Figure 33 : Principe de détection des produits de PCR par la méthode Taqman.....	110

Préambule

La cellule musculaire cardiaque, ou cardiomyocyte, est une cellule hautement différenciée dont l'activité requiert un apport énergétique considérable. Si le cardiomyocyte est l'une des cellules de l'organisme les plus consommatrices en énergie, il le doit essentiellement à sa fonction contractile qui, en outre, est gouvernée par une rythmicité inhérente à l'activité cardiaque. Les événements qui régissent les phénomènes de contraction et de relaxation, mécanismes indispensables à toute cellule contractile, font en effet intervenir de nombreux acteurs dont l'action est énergie-dépendante. Cette énergie se matérialise sous la forme d'adénosine triphosphate (ATP). L'hydrolyse de cette molécule, par des groupements protéiques appelés Adénosine triphosphatases (ATPases) (tels que l'ATPase de la myosine impliquée dans la contraction), permet en effet la libération d'énergie qui est alors utilisée pour effectuer une action spécifique. La fonction du cœur repose donc sur la mise à disposition d'ATP aux différentes ATPases de la cellule cardiaque et notamment celles qui participent aux mécanismes contractiles.

Dans le myocarde, la concentration intracellulaire d'ATP (de l'ordre de quelques millimolaires) est relativement faible par rapport à la demande conséquente et permanente de ce muscle. Il est donc nécessaire que cette molécule énergétique soit synthétisée de façon continue sans quoi il serait impossible pour le cœur de battre plus de quelques secondes. Le cœur est un muscle dit hautement oxydatif ; c'est-à-dire que la production d'énergie est assurée, pour la majeure partie, par le phénomène de phosphorylation oxydative réalisé par les mitochondries. Ces organites sont effectivement à l'origine de plus de 90% de la synthèse d'ATP de la cellule cardiaque. Dans une bien moindre mesure, la glycolyse représente également une voie de synthèse de la molécule énergétique. Cette énergie d'origine glycolytique peut bien sûr être utilisée pour la fonction cardiaque, mais la contribution de cette voie reste cependant négligeable par rapport à celle des mitochondries.

L'énergétique de la cellule cardiaque ne se limite pas à une production constante d'énergie. Si celle-ci s'avère nécessaire pour une fonction cardiaque normale, il est également indispensable que cette synthèse énergétique s'adapte à la vitesse d'hydrolyse de l'ATP qui dépend d'une activité cardiaque fluctuant en fonction des besoins de l'organisme. Ainsi, le cardiomyocyte passe d'une production d'ATP modérée, lorsque le cœur est au repos, à une production faisant intervenir jusqu'à 90% des capacités oxydatives totales de la cellule au cours de l'exercice (Mootha *et al.*, 1997). Ceci implique la mise en place de mécanismes permettant la coordination de l'utilisation et de la production de la molécule.

L'harmonisation de la production et de la consommation énergétique repose sur la sensibilité des producteurs et des consommateurs d'énergie à l'ATP et l'adénosine diphosphate (ADP) (produit de dégradation de l'ATP par hydrolyse). Le rapport entre la concentration d'ATP et celle d'ADP (ATP/ADP) est en effet déterminant pour l'activité des éléments intervenant dans la production et la consommation d'énergie (Saks *et al.*, 1985 ; Ventura-Clapier *et al.*, 2004). Ainsi, une diminution du rapport ATP/ADP (par hydrolyse de l'ATP par exemple) stimule la production d'énergie ; la dégradation de l'ATP a donc un effet positif sur sa propre synthèse. En revanche, ce rapport faible a une action inhibitrice sur l'activité des ATPases (comme celles impliquées dans la contraction et la relaxation). Ces deux molécules adényliques peuvent donc être considérées comme les acteurs principaux d'une signalisation énergétique qui permettent une synthèse d'énergie en adéquation avec la demande.

Si un rapport ATP/ADP élevé est favorable à l'activité ATPasique, il est en revanche défavorable à la production énergétique des mitochondries. Il semble donc qu'un transfert d'ATP du site de production (mitochondries) vers les sites consommateurs (ATPases) et un transfert d'ADP des ATPases vers les mitochondries soient nécessaires pour une fonction cardiaque optimale. Le cardiomyocyte est une cellule qui se caractérise par un réseau dense constitué de myofilaments, de réticulum sarcoplasmique et de mitochondries dans lequel le cytoplasme est perçu comme un gel plutôt qu'un « sac d'enzymes » (Ventura-Clapier *et al.*, 2004). Cette structure interne très complexe limite les phénomènes de diffusion et exige des systèmes de transfert d'ATP et d'ADP bien plus efficaces.

De l'organisation structurale spécifique de la cellule cardiaque, découle l'émergence de régions régulatrices, appelées « micro-domaines », à l'entour des entités productrices et consommatrices d'ATP. Au niveau de ces domaines de régulation, divers acteurs sont responsables du transfert des nucléotides adényliques (ATP et ADP) et contrôlent finement le rapport ATP/ADP pour que celui-ci soit adéquat à la fonction contractile. Ce système permet ainsi de créer un microenvironnement où les concentrations des molécules sont très différentes des concentrations rencontrées dans le reste du cytoplasme ; l'intérêt d'un tel fonctionnement réside également dans le fait que les distances de diffusion sont considérablement diminuées par rapport à un système homogène dilué.

La nature même de ces « micro-domaines » semble exiger une proximité entre les différents acteurs impliqués pour que les transferts énergétiques se fassent efficacement. De précédentes études (Kaasik *et al.*, 2001 ; Wilding *et al.*, 2006) ont montré une baisse ou une hausse d'efficacité de ces transferts d'énergie dans des modèles qui affichaient des modifications de l'agencement des partenaires engagés dans ces régions régulatrices. C'est pourquoi ce travail porte sur le rôle que peut jouer l'architecture cellulaire dans l'efficacité de ces régulations énergétiques locales.

Introduction

CHAPITRE I : Energétique cardiaque

I. Le cœur et ses besoins énergétiques

A. Du cœur au cardiomyocyte

Le cœur est l'organe central du système cardiovasculaire dont la fonction est d'assurer une circulation sanguine en adéquation avec les besoins en oxygène et en nutriments de l'ensemble des cellules de l'organisme. Chez les mammifères, il est composé de deux cavités supérieures (l'oreillette droite et l'oreillette gauche) et de deux cavités inférieures (le ventricule droit et le ventricule gauche) (Figure 1), qui communiquent entre-elles deux à deux. Cet organe est divisé en deux par les septums interauriculaires et interventriculaires qui séparent, de façon exclusive, la partie droite de la partie gauche. Ceci conduit à l'émergence de deux unités fonctionnelles bien distinctes appelées « cœur droit » et « cœur gauche », chacune étant composée d'une oreillette et d'un ventricule. Des jeux de valves disposés entre les oreillettes et les ventricules d'une part et à la jonction des ventricules et des artères d'autre part permettent, en raison de leur orientation, d'imposer le sens de circulation du sang des oreillettes vers les ventricules puis des ventricules vers les artères.

Cette organisation bilatérale du cœur a un réel intérêt dans le sens où elle permet de créer deux circulations sanguines parallèles dont les fonctions sont très différentes (Figure 2). Le passage du sang du « cœur droit » vers le « cœur gauche » en passant par les poumons constitue la « petite circulation » dont le but est d'oxygéner le sang. Le transport de celui-ci du « cœur gauche » vers le « cœur droit » en passant par les organes correspond, pour sa part, à la « circulation systémique » qui vise à approvisionner en oxygène et en nutriments les différents organes de l'organisme.

La mise en mouvement de la masse sanguine nécessite l'alternance d'une phase de relaxation du cœur (diastole), durant laquelle l'organe se remplit de sang, et d'une phase de contraction (systole) qui permet l'éjection du fluide vers les artères. Cette séquence d'événements appelée « révolution cardiaque », qui voit les oreillettes se contracter légèrement avant les ventricules, joue, de la même manière que l'orientation des valves, un rôle essentiel dans la détermination du sens de circulation du sang. Le cœur, de par cette

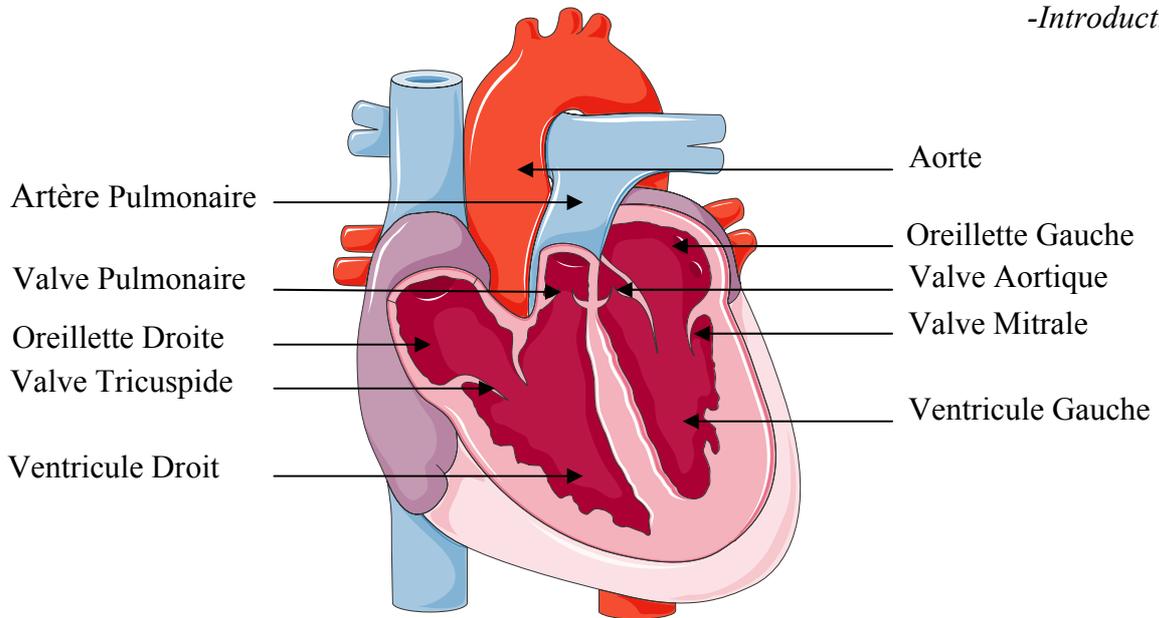


Figure 1: Les cavités et les valves cardiaques

La pompe cardiaque est divisée en deux parties distinctes : un cœur droit et un cœur gauche

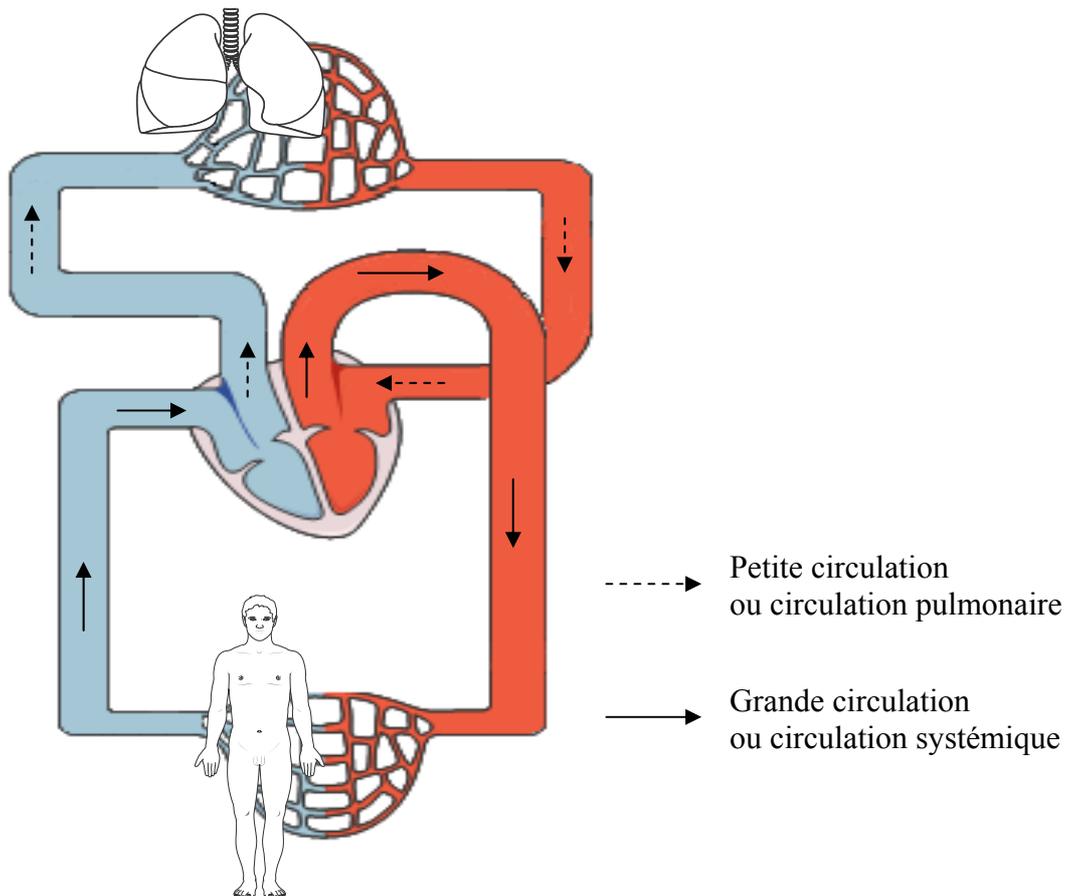


Figure 2 : Schématisation de la circulation sanguine

activité rythmique qui consiste à alterner état relaxé et état contracté, a une réelle fonction de pompe qui conduit bien souvent à qualifier cet organe de « pompe cardiaque ».

Les phénomènes impliqués dans la contraction et la relaxation du cœur sont assurés par le tissu musculaire cardiaque, ou myocarde, qui est constitué de cellules musculaires très spécialisées. L'activité mécanique coordonnée de ces cellules, également appelées cardiomyocytes, conduit à la contraction cardiaque.

B. Du cardiomyocyte à la contraction

1. Le cardiomyocyte : une cellule à part

Le cardiomyocyte est une cellule musculaire striée qui présente des caractéristiques très particulières et qui se différencie des cellules musculaires squelettiques en de nombreux points. L'archétype de la cellule musculaire cardiaque est une cellule cylindrique d'environ 15 µm de diamètre et 60 µm de longueur (Braunwald, 1971) présentant des ramifications et contenant généralement, dans sa partie centrale, un seul noyau qui est légèrement allongé (chez les rongeurs, il est fréquent de rencontrer des cardiomyocytes binucléés (Clubb & Bishop, 1984 ; Leu *et al.*, 2001). Les différentes cellules musculaires constituant le myocarde sont fortement liées entre-elles au niveau de disques intercalaires (pour revue voir Forbes & Sperelakis, 1985 ; Estigoy C. *et al.*, 2009), visibles en microscopie électronique sous forme de stries scalariformes, et communiquent les unes avec les autres par l'intermédiaire de jonctions communicantes (Gros & Jongsma, 1996 ; Delorme *et al.*, 1997 ; Alcolea *et al.*, 1999). Cette organisation spécifique permet ainsi une synchronisation de l'ensemble des cellules qui agit alors comme un syncytium fonctionnel.

2. Du potentiel d'action à la contraction

Cette cellule myocardique se distingue des cellules musculaires squelettiques dans sa structure mais également dans son mode de stimulation puisqu'à la différence de ces dernières, le cardiomyocyte ne nécessite pas de commande nerveuse pour se contracter. Si bien qu'au cours du développement embryonnaire, la contraction du cœur précède son

innervation par les systèmes nerveux orthosympathiques et parasympathiques (Navaratnam, 1965 ; Smith, 1970).

La contraction du cardiomyocyte est engendrée par des inversions transitoires de la polarisation membranaire. Ces phénomènes électrophysiologiques prennent leur origine au niveau du nœud sinusal, centre de l'automatisme cardiaque (voir revue Chen *et al.*, 2010). Le nœud sinusal ou sino-auriculaire, situé dans l'oreillette droite à la jonction du crista terminalis auriculaire et du tissu veineux, est responsable de l'émission périodique de potentiels d'action. L'émission rythmique de ces potentiels d'action de la part des cardiomyocytes du nœud sinusal est induite par la présence d'un courant particulier au niveau de ces cellules. Il s'agit du courant I_f (funny current), aussi appelé courant pacemaker (Callewaert *et al.*, 1984 ; DiFrancesco, 1991 ; DiFrancesco, 2010). Ces potentiels d'action spontanés sont ensuite véhiculés tout le long du tissu nodal (figure 3) et se propagent à l'ensemble des cardiomyocytes du cœur. Il est à noter que les autres régions du tissu conducteur, comme le nœud atrioventriculaire et les fibres de Purkinje, présentent une telle activité rythmique, mais le rythme est imposé à l'ensemble du cœur par les cellules du nœud sino-auriculaire.

Au niveau des cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires, la propagation du signal électrique depuis le nœud sinusal conduit à un influx sodique qui entraîne une dépolarisation importante et rapide de la membrane cellulaire. Cette dépolarisation membranaire induit l'ouverture des canaux calciques de type L (appelés DHPR pour récepteurs à la Dihydropyridine) qui permet alors l'entrée d'ions calciques dans le cytosol. La fixation de ce calcium sur les récepteurs à la ryanodine (RyR) du réticulum sarcoplasmique (RS), qui constitue la réserve de calcium des cellules cardiaques, conduit alors à la libération rapide et massive de calcium contenue dans le RS. Ce phénomène appelé « Calcium-induced, calcium release » (CICR) (Fabiato, 1983 ; Bers, 2002) permet d'augmenter de façon importante la concentration intracellulaire de calcium qui est à l'origine de la mise en action de la machinerie contractile du cardiomyocyte. Il est à noter que la structure très particulière de la cellule musculaire cardiaque est la base de l'efficacité du CICR. La membrane plasmique du cardiomyocyte regorge de tubules T (invagination de la membrane plasmique) qui conduisent la dépolarisation en profondeur. L'activation des RyR par le flux calcique transarcolemmal (via DHPR) s'effectue au niveau de domaines jonctionnels spécialisés des tubules T et du RS appelés diades. Il existe ainsi un réel couplage fonctionnel des DHPR et des RyR qui est nécessaire à la libération du calcium contenu dans le RS. La vidange du RS correspond à la

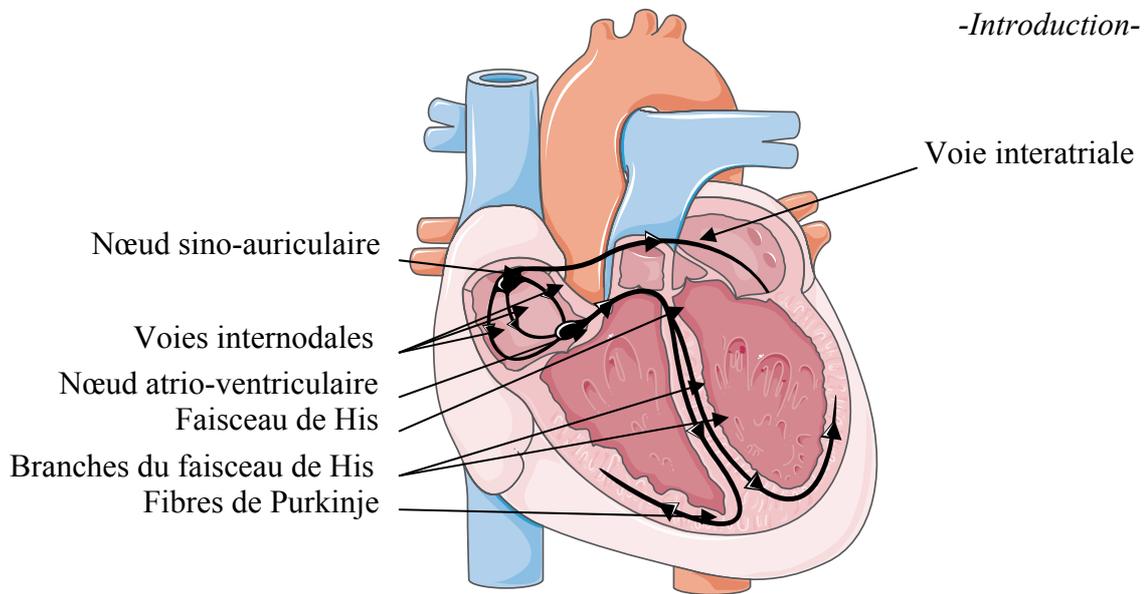


Figure 3 : Le tissu conducteur cardiaque

La contraction cardiaque est induite par une dépolarisation prenant son origine au niveau du nœud sinusal avant d'être propagée à l'ensemble du muscle cardiaque via le tissu conducteur.

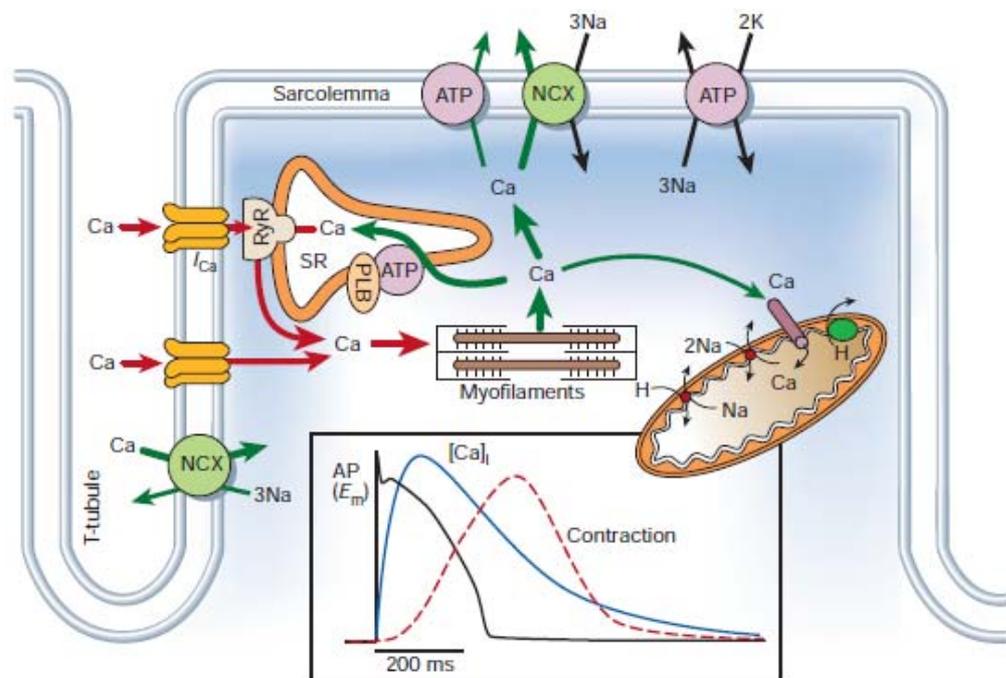


Figure 4 : Mécanisme du couplage excitation-contraction.

La dépolarisation de la membrane plasmique induit l'ouverture de canaux calciques membranaires (DHPR) permettant l'entrée de calcium qui stimule alors les récepteurs à ryanodine (RyR). Il s'en suit une libération du calcium contenu dans le RS conduisant à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire qui déclenche la contraction. L'ensemble des acteurs permettant la diminution de la concentration intracellulaire de calcium assurent enfin la relaxation. *D'après Bers et al, 2002*

sommation spatiale et temporelle de multiples flux localisés et transitoires de calcium à travers quelques RyR appelés « sparks » (Voir revue Niggli, 1999).

3. *Le cardiomyocyte et sa machinerie contractile*

La fonction contractile de la cellule musculaire cardiaque est assurée par un large panel de protéines. Celles-ci s'organisent en myofibrilles composées de myofilaments épais et fins associés à des protéines de structure et de régulation.

a. Les myofilaments épais

Les myofilaments épais, d'un diamètre d'environ 15 nm, sont édifiés à partir de nombreuses molécules de myosine ainsi que de diverses protéines liées à la myosine. Les molécules de myosine sont constituées d'une chaîne lourde (appelés MHC pour Myosin Heavy Chain) et de deux chaînes légères (MLC pour Myosin Light Chain). La MHC présente une queue C-terminale et une tête globulaire N-terminales reliées par un domaine cervical déformable. Les MLC sont combinées à la tête globulaire de la MHC. Ces molécules de myosine s'associent par deux pour former la myosine II, les queues C-terminales s'enroulant l'une autour de l'autre en hélice α et les têtes globulaires, qui possèdent un site de fixation aux myofilaments fins permettant l'interaction des deux types de myofilaments, se trouvant côte à côte (Figure 5).

Les MHC sont pourvues d'une activité ATPasique au niveau de leurs têtes globulaires. Cette activité, déterminant la vitesse de contraction, varie selon les isoformes qui sont classées en deux grandes catégories selon leur capacité d'hydrolyse de l'ATP. Il existe ainsi les isoformes lentes (MHC- β) et les isoformes rapides (MHC- α) qui caractérisent les propriétés cinétiques de contraction du cardiomyocyte (Schiaffino & Reggiani, 1996). Dans le ventricule, les isoformes MHC- α et MHC- β s'associent pour former trois types d'isomyosines : V1 (MHC- α / MHC- α), V2 (MHC- α / MHC- β) et V3 (MHC- β / MHC- β). La proportion de ces isomyosines varie selon les espèces : le profil ventriculaire de l'adulte est majoritairement de type V3 chez l'humain alors qu'il est essentiellement de type V1 chez les petits rongeurs adultes (souris, rat) (Mercadier *et al.*, 1983 ; Schwartz *et al.*, 1984). Le profil d'expression des MHC ventriculaires n'est cependant pas exclusif puisqu'il a été montré que l'isoforme MHC- α est exprimé dans le ventricule humain (Nakao *et al.*, 1997); la quantité de

la protéine reste cependant mineure puisqu'elle ne représente que 7% des MHC totales (Miyata *et al.*, 2000). Il faut donc garder à l'esprit qu'une certaine hétérogénéité règne dans l'expression des MHC.

De la même manière que les MHC, les MLC, associées à la tête globulaire N-terminale, appartiennent à une famille multigénique comprenant plusieurs isoformes. A chaque tête globulaire de myosine sont associées une chaîne légère alcaline (MLC-1) et une chaîne légère régulatrice ou phosphorylable (MLC-2), chacune présentant plusieurs isoformes. La chaîne légère alcaline ou essentielle présente cinq isoformes dont deux seulement (les isoformes lentes MLC-1s/v (slow/ventricular)) sont exprimées dans le myocarde (Barton & Buckingham, 1985). Concernant la chaîne légère régulatrice, il existe trois isoformes parmi lesquelles MLC-2s (slow) et MLC-2a (atrial) ont une expression cardiaque. Etant donné que la molécule de myosine est constituée de l'association des MHC et des MLC, il en résulte un grand nombre de myosines différentes appelées isomyosines.

Les myofilaments épais font également intervenir des protéines dites associées à la myosine. Ces protéines, parmi lesquelles peuvent être citées la titine, la protéine C et la Créatine Kinase (CK), jouent un rôle important dans le maintien de la structure des myofilaments mais également dans la régulation de la fonction myofilaientaire. La titine, qui est la plus grosse protéine connue (3,7 MDa chez l'homme), intervient dans le maintien de l'alignement des myofilaments épais, est un des principaux déterminant de la tension passive développée par l'appareil contractile (Lahmers *et al.*, 2004), et serait également un senseur de la longueur de la cellule cardiaque qui pourrait être impliqué dans la loi de Frank-Starling (Cazorla *et al.*, 2001 ; Miller *et al.*, 2004 ; Kruger & Linke, 2009). La protéine C est une molécule impliquée dans la régulation de la contraction cardiaque, sa phosphorylation modifiant les propriétés de la myosine (Winegrad, 2000). La CK, pour sa part, est un constituant structural des myofilaments qui est également responsable de l'approvisionnement en énergie de l'ATPase de la myosine (Ventura-Clapier *et al.*, 1998) ; cette notion sera développée ultérieurement.

b. Les myofilaments fins

La base structurale des myofilaments fins est constituée majoritairement d'actine, de tropomyosine et de troponine (Figure 6). De la même façon que pour les myofilaments épais,

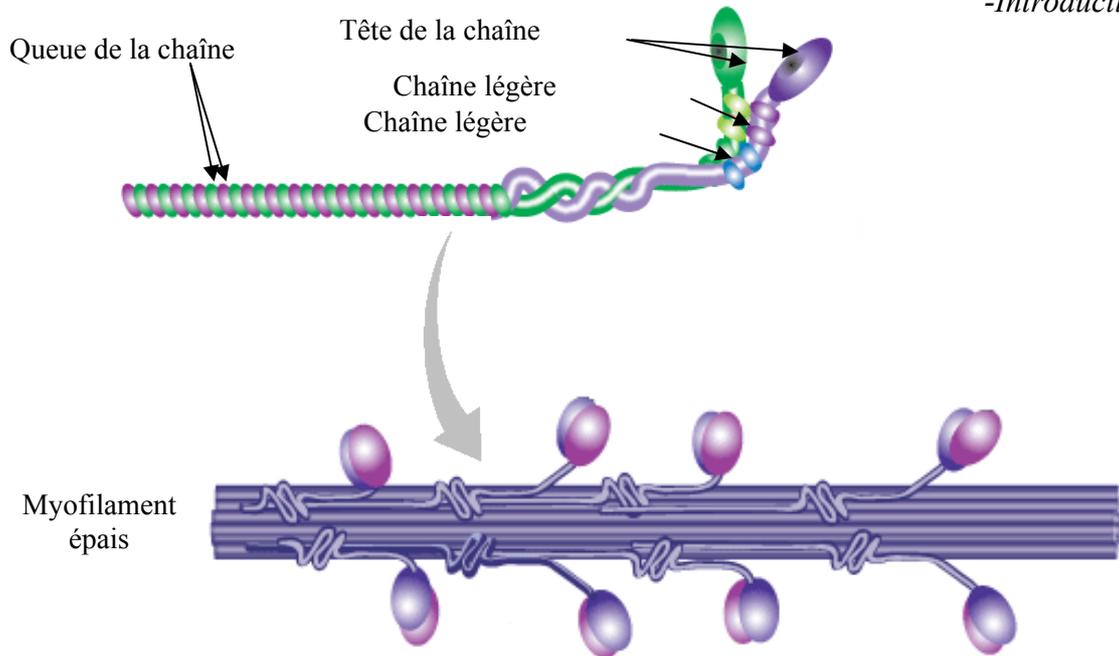


Figure 5 : Le myofilament épais

Le myofilament épais est constitué de nombreuses molécules de myosine elles-mêmes édifiées à partir de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères de myosine.

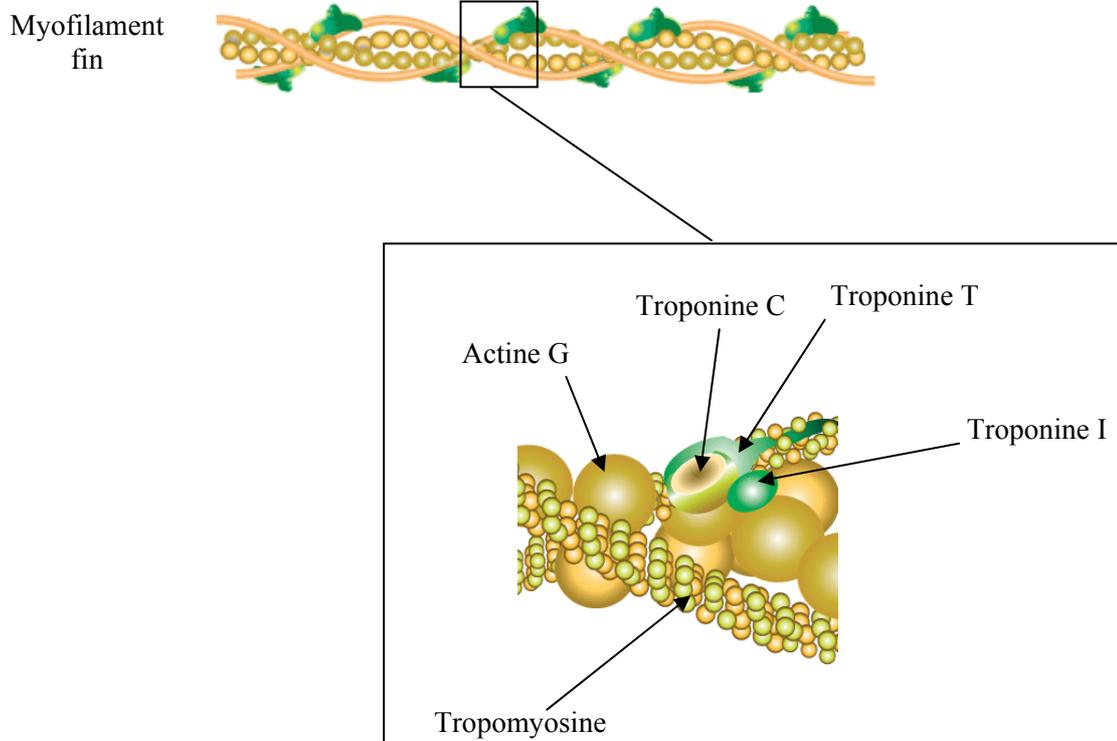


Figure 6 : Le myofilament fin

Le myofilament fin est constitué d'actine G et de protéines régulatrices.

il existe des protéines associées aux myofilaments fins (tropomoduline, nébulette, myopalladine...) qui participent au maintien et à la stabilisation de la longueur des filaments fins.

La majeure partie du myofilament fin est constituée de monomères d'actine (actine G) qui s'associent de manière à former un brin filamenteux en double hélice. Il existe deux isoformes d'actines : l'actine α -cardiaque et l'actine α -squelettique dont l'expression est variable durant le développement selon le tissu musculaire et l'espèce. Si ces deux isoformes sont co-exprimées au niveau du muscle cardiaque chez l'homme (Gunning *et al.*, 1983) et aux stades précoces du développement chez le rongeur, elles sont en revanche bien discriminées chez le rongeur adulte (Vandekerckhove *et al.*, 1986).

Le filament d'actine est lui-même entouré d'une seconde double hélice composée de dimères de tropomyosine qui confère une rigidité structurale au myofilament fin, et surtout contrôle l'interaction actine-myosine et donc la contraction via sa coopération avec le complexe des troponines. Quatre isoformes de la tropomyosine ont été décrites dont deux seulement sont exprimées dans le cœur : TM- α_{fast} et TM- β (en faible proportion). Ces isoformes s'associent en homodimères ou en hétérodimères. Elles ne sont pas spécifiques du cœur puisqu'elles sont également largement exprimées dans les muscles squelettiques.

Le complexe protéique des troponines lié aux molécules de tropomyosine constitue la partie régulatrice des myofilaments fins. Ce complexe est formé de trois sous-unités : la troponine C qui lie le calcium, la troponine I qui inhibe la fixation de la myosine à l'actine et la troponine T qui permet l'ancrage du complexe à la tropomyosine (voir revue Schiaffino & Reggiani, 1996). Pour chacune de ces protéines, plusieurs isoformes sont dénombrées ; ceci a des conséquences sur les propriétés des diverses fibres musculaires telles que la sensibilité des myofilaments au calcium ou encore la coopérativité de l'activation calcique (Gordon *et al.*, 2000).

c. Les sarcomères

Les myofilaments épais et fins se chevauchent pour former l'unité contractile également appelée sarcomère (Figure 7). Ce sarcomère se compose de la bande A et de la bande I. La bande A est délimitée par les myofilaments épais et correspond à la partie sombre

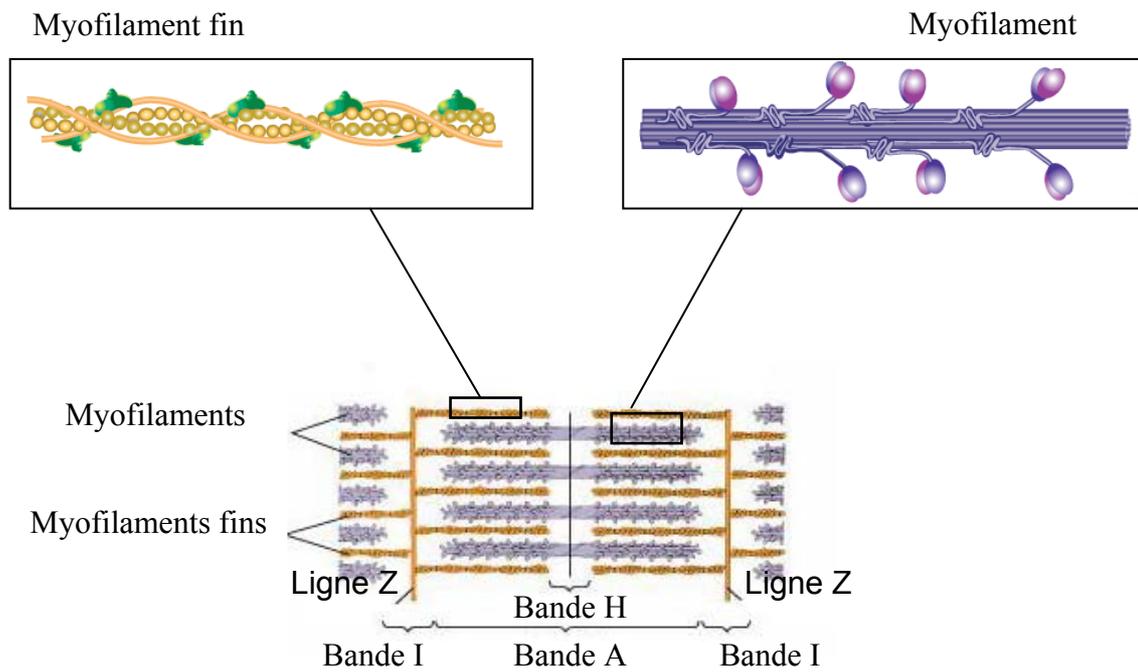


Figure 7 : L'unité contractile : le sarcomère

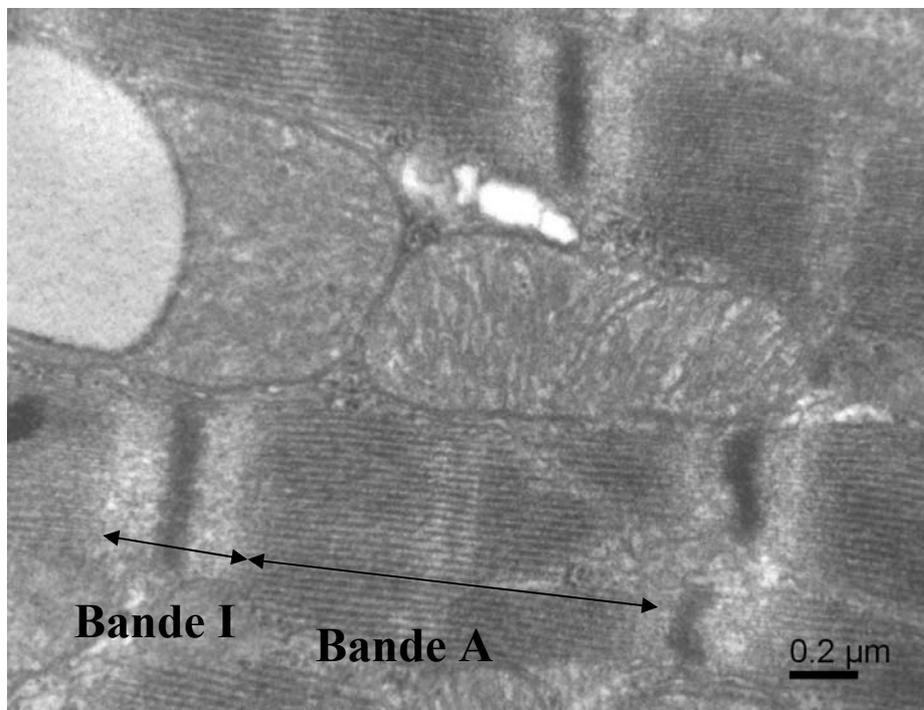


Figure 8 : Ultrastructure du cardiomyocyte (microscopie électronique).

Les bandes I et A ainsi que les stries Z sont visibles par microscopie électronique à transmission. *Cliché réalisé par M. Novotova (non publié)*

du sarcomère lorsque celui-ci est observé par microscopie électronique (Figure 8) alors que la bande I, qui apparaît en clair avec cette technique d'observation, n'est constituée que de myofilaments fins. La contraction cellulaire est la conséquence du glissement des myofilaments épais par rapport aux myofilaments fins au sein de l'unité contractile. Ce mouvement myofilamentaire, décrit par Huxley (Huxley, 1957), conduit en effet au raccourcissement des sarcomères et par conséquent au raccourcissement de la cellule musculaire cardiaque.

d. La contraction ou glissement myofilamentaire

Les travaux concernant les processus fondamentaux de contraction et de relaxation ont fait l'objet de nombreuses revues, notamment dans les années 1970 (Taylor, 1972 Weber & Murray, 1973 ; Mannherz & Goody, 1976). Pour résumer, le glissement des myofilaments les uns par rapport aux autres nécessite l'attachement des têtes globulaires de myosine à l'actine. La formation de ce complexe actomyosine est rendue possible par la présence de calcium (libéré par le RS lors du phénomène de CICR) qui se fixe sur la troponine C ; il en résulte un changement de conformation du complexe troponines-tropomyosine et notamment un décalage de la troponine I qui démasque alors le site de fixation de l'actine à la myosine (Figure 9). L'interaction des myofilaments sous forme de ponts actomyosines combinée à l'action spécifique de la tête de myosine conduit au raccourcissement des sarcomères qui est synonyme de contraction cardiaque (systole).

Dans le cœur, la phase de contraction est très brève et est immédiatement suivie d'une phase de relaxation (diastole) qui est la conséquence directe de la diminution de la concentration de calcium intracellulaire. Celle-ci devient alors insuffisante pour que le calcium se fixe à la troponine C et ne permet plus l'interaction myofilamentaire ; ceci conduit au retour des sarcomères à leur état initial.

La diminution de la concentration calcique est assurée en grande partie par le pompage du calcium par le RS et dans une moindre mesure par l'échangeur membranaire Na^+/Ca^+ , la Ca-ATPase membranaire ou encore l'uniport calcique de mitochondries (Bassani *et al.*, 1994 ; Bers, 2002) (Figure 4). Cette participation majoritaire du RS dans le mécanisme de relaxation a un réel intérêt dans la mesure où le fait de capter les ions calciques pendant le processus de relaxation permet également de reconstituer le stock de calcium qui peut servir pour la contraction suivante.

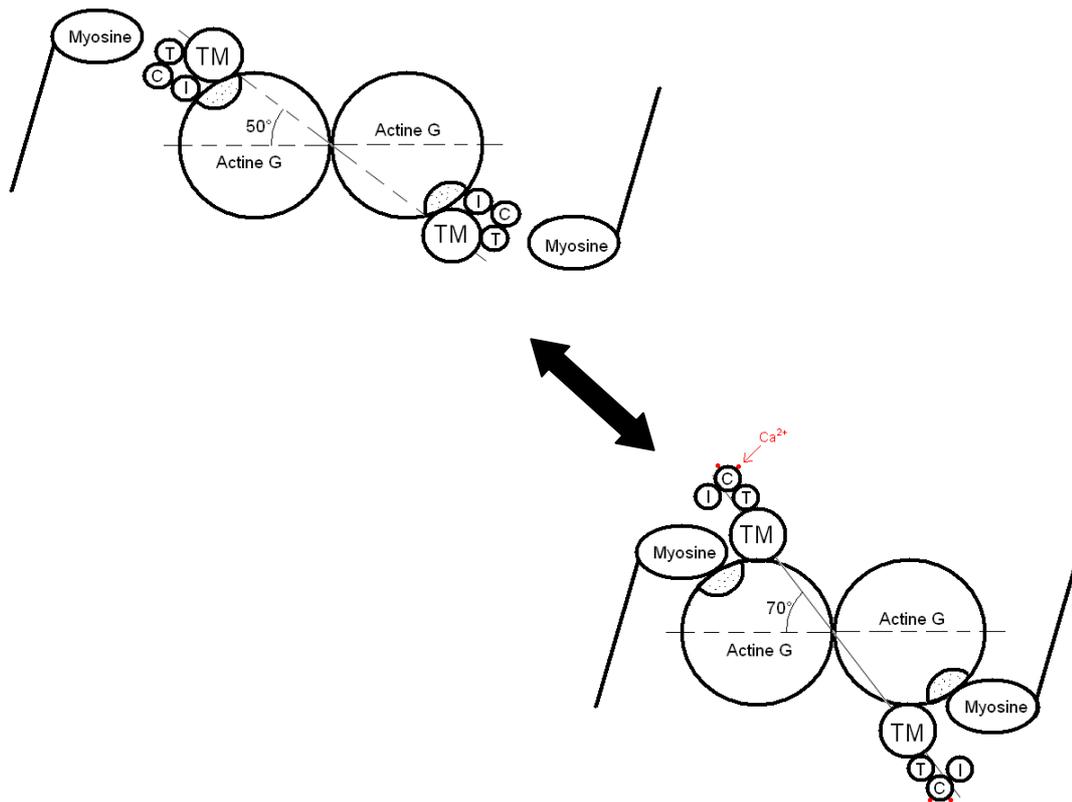


Figure 9 : Fixation de la myosine à l'actine

La fixation de calcium sur la troponine C permet un changement de conformation du complexe des troponines qui met à jour le site de fixation de la myosine à l'actine.

C. De la contraction à l'énergie

Les processus de contraction et de relaxation ne peuvent se faire sans un apport énergétique conséquent. Les mécanismes mis en jeu au cours de ces processus sont en effet très consommateurs en énergie. Cette énergie se matérialise sous la forme de molécule d'ATP qui est hydrolysée ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Phosphate inorganique (Pi)}$) par des molécules ayant une activité ATPasique. L'énergie chimique libérée par le clivage de cette liaison est ensuite utilisée pour réaliser une action particulière.

1. Myofilaments et énergie

Si le cycle contraction-relaxation est très demandeur en énergie, il le doit en grande partie à l'activité myofilamentaire, et notamment à celle des filaments de myosine, qui transforme l'énergie chimique d'hydrolyse en énergie mécanique (raccourcissement des sarcomères). La tête globulaire de myosine présente, en effet, un domaine ATPasique dont l'activité engendre des changements importants de conformation qui sont à l'origine du glissement des myofilaments épais par rapport aux myofilaments fins d'actine. Ces modifications conformationnelles consistent en la courbure de la partie cervicale de la myosine lorsque celle-ci est liée à l'actine qui, répétée cycliquement, conduit au déplacement relatif des myofilaments épais et fins (Figure 10). Ceci repose sur le fait qu'à chaque état d'hydrolyse de l'ATP correspond une conformation précise du système protéique (Sugimoto *et al.*, 1995).

Ainsi, lorsque la concentration de calcium est trop faible pour que le calcium se fixe à la troponine I et mette à jour le site d'interaction de l'actine et de la myosine, la tête de myosine, qui est liée aux produits d'hydrolyse de l'ATP (ADP et Pi), fait un angle de 90° avec la partie caudale de la protéine. Après démasquage des sites de fixation de la myosine portés par l'actine, lorsque la concentration calcique augmente de façon importante, les têtes de myosines se fixent spontanément à l'actine pour former le complexe actomyosine. L'interaction des deux types de filaments conduit aux détachements du Pi et de l'ADP qui stabilisent la liaison actine-myosine et entraînent le changement conformationnel de la myosine. L'angle formé par la tête et la queue de la myosine passe de 90° à 45° , conduisant alors au mouvement relatif des myofilaments. La dissociation de la liaison actine-myosine

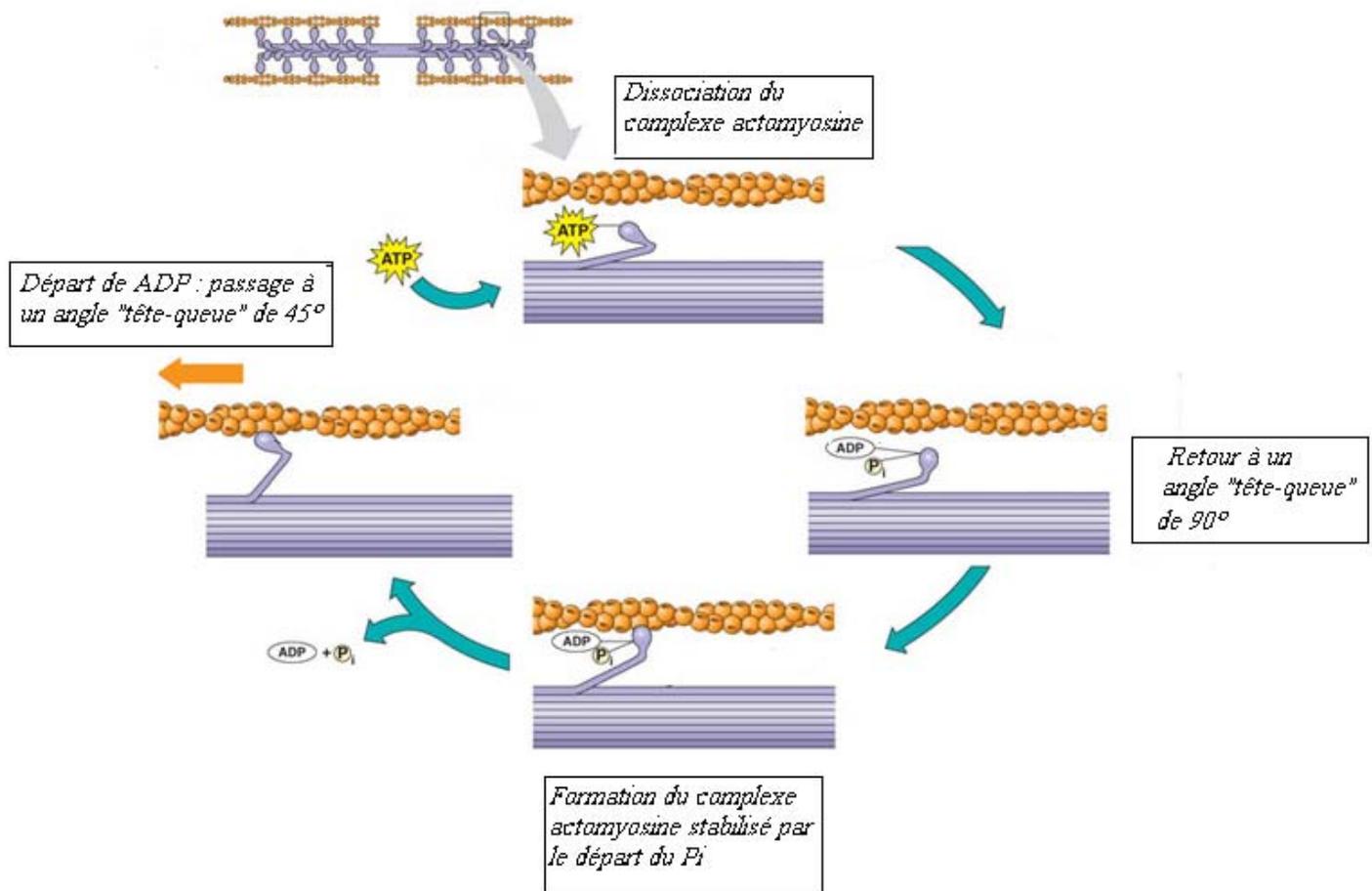


Figure 10 : Les différentes étapes du raccourcissement des sarcomères

Le changement de conformation de la tête de myosine en fonction de l'état d'hydrolyse de la molécule énergétique est à la base du raccourcissement du sarcomère.

nécessite la fixation d'une nouvelle molécule d'ATP sur la tête globulaire de myosine que celle-ci va immédiatement hydrolyser pour revenir à sa conformation initiale. Un nouveau cycle peut alors commencer pour continuer le raccourcissement des sarcomères.

Le retour à la longueur initiale du sarcomère ne se fait que lorsque la concentration de calcium n'est plus suffisante pour permettre l'interaction des myofilaments mais également lorsque toutes les liaisons actine-myosine sont dissociées. Ce mécanisme de dissociation nécessitant de l'ATP, le retour à l'état relaxé nécessite un apport énergétique non négligeable. Ce mécanisme peut être à l'origine d'une augmentation de la tension de repos développée par le myocarde. Lorsque l'ATP devient limitant, le nombre de ponts actomyosines indissociables augmente et il en résulte le développement d'une tension indépendamment de la concentration de calcium intracellulaire (Weber & Murray, 1973). Cette tension est appelée tension de rigor ; ce même phénomène peut se produire dans les muscles squelettiques où il est à l'origine de la rigidité cadavérique (rigor mortis).

Il semble évident que l'enchaînement rapide des cycles ATPasiques actomyosines est essentiel pour que le raccourcissement sarcomérique, et donc la contraction, se fassent de façon efficace. Si la fixation et l'hydrolyse de l'ATP sont des phases rapides et non limitantes (Goldman *et al.*, 1984), il en est tout autre pour l'étape de dissociation de l'ADP à la myosine qui semble être une réaction beaucoup plus lente (Siemankowski *et al.*, 1985 ; Dantzig *et al.*, 1991 ; Tian *et al.*, 1997). De plus, la constante d'inhibition de la myosine-ATPase par l'ADP est de l'ordre de la concentration physiologique de cette molécule ce qui implique une régulation très fine des concentrations d'ADP et d'ATP (du rapport ATP/ADP) au niveau de cette ATPase pour éviter toute perturbation de l'activité ATPasique et donc de la contraction musculaire cardiaque.

2. Repompage calcique et énergie

L'activité myofilamentaire est à l'évidence très friande de molécules énergétiques, elle n'est cependant pas la seule à fonctionner sur la base de l'hydrolyse de l'ATP. La fonction du RS, qui joue un rôle prépondérant à la fois dans les mécanismes initiateurs de la contraction (libération du calcium dans le sarcoplasme), mais également dans les mécanismes conduisant à la relaxation (capture du calcium), nécessite l'intervention d'une ATPase (Hasselbach & Makinose, 1961). Cette ATPase, appelée SERCA pour Sarco/Endoplasmic Reticulum

Calcium ATPase, est enchâssée dans la membrane du RS et est responsable du pompage du calcium contenu dans l'espace cytoplasmique vers la lumière du RS à raison de deux ions calciques pour l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. La protéine SERCA constitue donc le moteur de la régulation calcique qui est essentielle à la fonction contractile des cardiomyocytes. De la même façon que pour l'ATPase de la tête globulaire de myosine, l'activité de SERCA est très sensible à la concentration d'ADP et nécessite un rapport ATP/ADP élevé pour être optimale (Minajeva *et al.*, 1996).

La protéine SERCA est codée par trois gènes qui génèrent 5 isoformes par épissage alternatif : SERCA1a, SERCA1b, SERCA2a, SERCA2b et SERCA3 (pour revue voir Martonosi & Pikula, 2003). L'expression de celles-ci présente une spécificité tissulaire et varie au cours du développement. Chez l'adulte, seule SERCA2a est exprimée dans le myocarde. Toutes ces isoformes sont relativement similaires d'un point de vue structural mais peuvent différer dans leur affinité et leur dépendance au calcium. La dépendance à l'ATP semble, en revanche, être la même pour l'ensemble des isoformes.

Dans le cœur et les muscles squelettiques de type lent, SERCA est associée à une protéine régulatrice : le phospholamban (PLB) (Jorgensen & Jones, 1986, voir revue Simmerman & Jones, 1998). Cette protéine n'est codée que par un seul gène et ne présente pas d'isoforme. L'expression de cette protéine varie au cours du développement. Le PLB se présente en pentamère ou reste sous forme monomérique et est capable d'inhiber l'activité de SERCA en diminuant l'affinité de cette ATPase pour le calcium. Cette activité inhibitrice est levée dès lors que PLB est phosphorylé par la Protéine Kinase AMPc dépendante (PKA) ou par la Protéine Kinase Ca^{2+} -Calmoduline dépendante (CaM Kinase) qui conduit à la dissociation du complexe SERCA-PLB (Jackson & Colyer, 1996 ; Kuschel *et al.*, 1999).

3. Autres consommateurs d'énergie

Si la myosine-ATPase et SERCA constituent les principaux consommateurs d'énergie du cardiomyocyte, la fonction purement contractile n'est bien sûr pas la seule à nécessiter un apport énergétique. Ainsi, d'autres ATPases telles que la Na^+/K^+ -ATPase et la Ca^{2+} -ATPase situées au niveau du sarcolemme jouent un rôle important dans l'homéostasie du cardiomyocyte et le maintien du potentiel de membrane et consomment une quantité de molécules énergétiques non négligeable (Bers & Despa, 2006). Celles-ci sont soumises aux

mêmes contraintes de sensibilité aux nucléotides adényliques que les ATPases décrites précédemment.

L'équipement ATPasique du cardiomyocyte étant conséquent, la fonction myocardique nécessite 1mM d'ATP par seconde dans les conditions normales de contraction. La cellule musculaire cardiaque ne disposant que de très faibles réserves énergétiques (8 mM d'ATP et 15 mM de phosphocreatine (PCr)(Sztark et al., 1999)), il apparaît évident que l'ensemble des processus cellulaires ne peut se faire plus de quelques secondes en absence de synthèse énergétique. L'activité du cardiomyocyte fonctionne, ainsi, sur le mode de « flux tendu » et requiert une synthèse énergétique permanente.

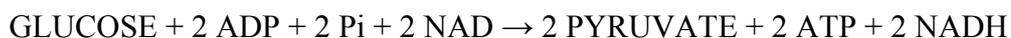
II. Synthèse énergétique du cardiomyocyte

La pompe cardiaque est qualifiée d'organe hautement oxydatif. Sa production d'énergie dépend, en effet pour l'essentiel (95%), du métabolisme oxydatif (pour revue voir Ventura-Clapier *et al.*, 2010). C'est-à-dire que la production énergétique est couplée à la consommation d'oxygène, ce qui rend l'activité cardiaque très dépendante de l'apport en oxygène. C'est pourquoi le cœur est responsable de 11% de la consommation totale d'oxygène de l'organisme quand il ne représente que 0,4% de la masse corporelle (Ventura-clapier & Veksler, 2006).

En conditions normales, la production d'ATP du myocarde est effectuée à partir de glucose et surtout d'acides gras (Bing, 1965 ; Neely *et al.*, 1972 ; Williamson *et al.*, 1976 ; Saks *et al.*, 2006b). Si ces substrats permettent la production d'énergie par la voie aérobie des phosphorylations oxydatives, la dégradation du glucose nécessite le passage par la glycolyse qui permet une première production d'énergie anaérobie avant l'entrée des produits de dégradations dans le processus des phosphorylations oxydatives. La production énergétique est ainsi assurée par deux voies reliées entre-elles : la glycolyse et les phosphorylations oxydatives.

A. La glycolyse

La glycolyse ou voie de Embden-Meyerhof-Parnas correspond à une série de réactions chimiques se produisant dans le cytoplasme de la cellule qui conduit à la transformation du glucose (molécule à 6 carbones) en deux molécules de pyruvate (molécule à 3 carbones) (Figure 11). Si les premières étapes ont tendance à consommer de l'énergie, le bilan énergétique du processus est positif car les dernières phases génèrent de l'ATP. Le bilan global de la transformation est le suivant :



Si la contribution de la glycolyse à la production d'énergie totale est relativement faible, elle n'en reste pas moins essentielle pour la fonction cardiaque. L'ATP généré par ce processus est en effet particulièrement impliqué dans le maintien de l'homéostasie ionique de la cellule et dans le couplage excitation-contraction. Les complexes glycolytiques sont associés au sarcolemme et à la membrane du RS où ils approvisionnent les ATPases engagées dans les flux ioniques (Weiss & Lamp, 1987 ; Xu *et al.*, 1995 ; Clausen & Everts, 1991 ; Boehm *et al.*, 2000). De plus, cette synthèse énergétique anaérobie qui produit bien moins de molécules énergétiques que la voie aérobie peut se révéler très utile puisque l'accélération de la glycolyse peut compenser l'arrêt du métabolisme oxydatif dans le cas d'une ischémie ou d'une hypoxie (Eberli *et al.*, 1991 ; Cave *et al.*, 2000). Cette compensation ne peut néanmoins qu'être temporaire car le rendement glycolytique n'est pas suffisant pour assurer une fonction normale à long terme.

La réaction de glycolyse anaérobie conduit à la formation du lactate qui est formé à partir de la réduction du pyruvate par la lactate déshydrogénase (LDH) :



Ceci permet la régénération du NAD^+ qui peut alors être à nouveau utilisé dans le processus de glycolyse.

La LDH est un tétramère qui résulte de l'assemblage de sous-unités de type M (Muscle) et H (Heart) conduisant ainsi à l'émergence de 5 isoformes (M4, M3H, M2H2, MH3, H4) (Cahn *et al.*, 1962). Ces isoformes diffèrent dans le sens où la sous-unité H est

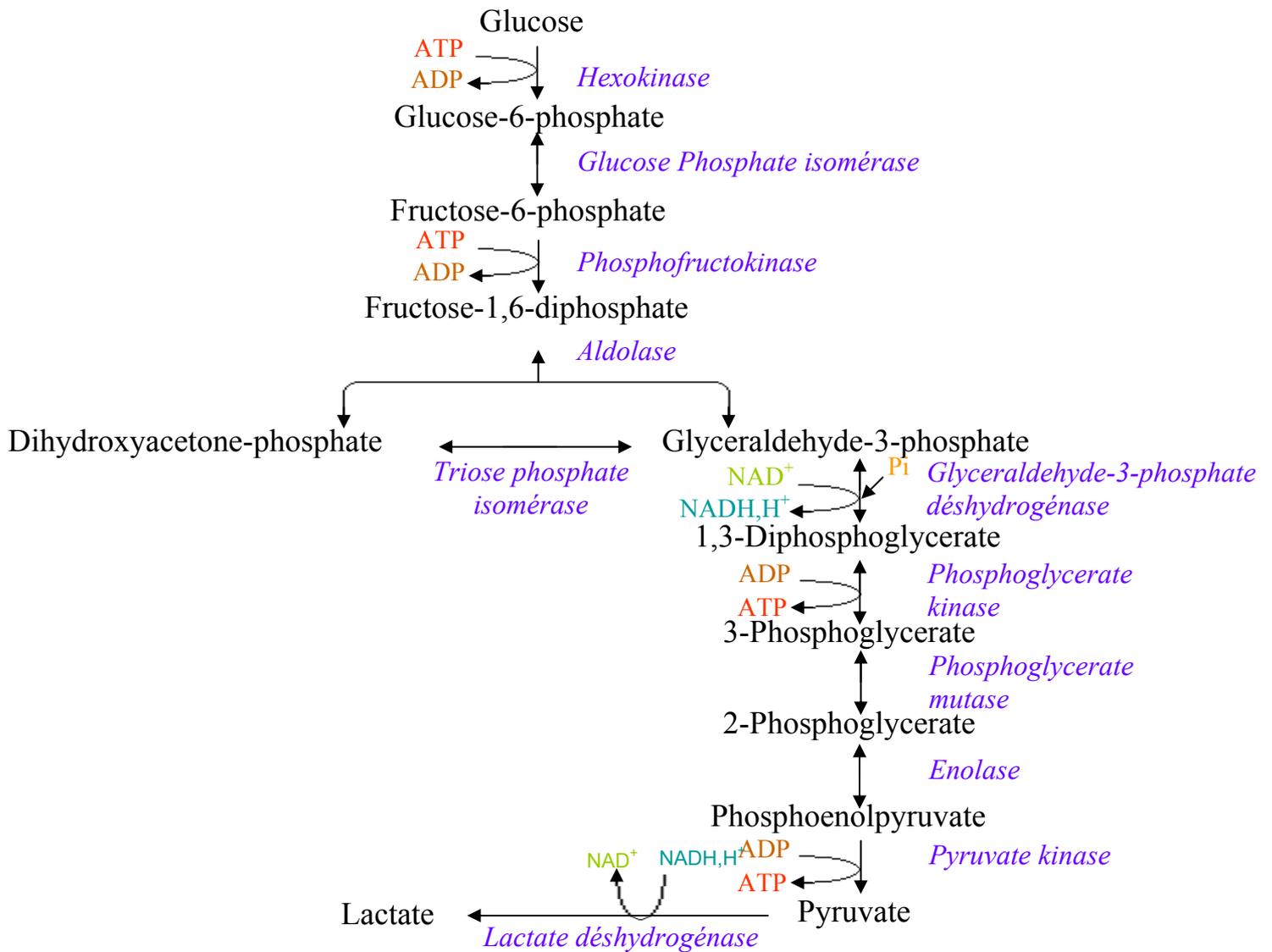


Figure 11 : Voie de la glycolyse anaérobie

La dégradation du glucose par la voie anaérobie de la glycolyse conduit à la production de deux molécules d'ATP et d'une molécule de pyruvate, elle-même transformée en une molécule de lactate.

bien plus sensible à l'inhibition par le pyruvate que la sous-unité M, ce qui oriente plutôt le pyruvate vers son oxydation dans la mitochondrie (point développé ci-après) plutôt que vers sa transformation en lactate (Dawson *et al.*, 1964). Ainsi, la proportion de sous-unités H et M au sein d'une cellule musculaire quelconque indique si celle-ci est plutôt tournée vers un métabolisme oxydatif ou vers un métabolisme glycolytique.

La régulation des flux glycolytiques est relativement complexe puisqu'elle fait intervenir de nombreux paramètres (Depre *et al.*, 1998). De manière générale, la glycolyse est régulée par les produits de réaction de sorte que la production énergétique soit en adéquation avec la demande d'énergie de la cellule. Ainsi, un rapport NAD/NADH élevé est favorable au processus de glycolyse ; ceci implique une régénération du NAD consommé à partir du NADH, soit par oxydation mitochondriale qui nécessite de l'oxygène (voir chapitre « *Les phosphorylations oxydatives* »), soit par la réaction catalysée par la LDH. De la même façon, un rapport ADP/ATP important stimule la glycolyse, en agissant directement sur la phosphofructokinase (Mansour, 1963) qui est une des enzymes impliquées dans les premières étapes de la glycolyse. La localisation des complexes glycolytiques à proximité des ATPases prend ainsi tout son sens puisque les ATPases peuvent alors consommer l'ATP à mesure qu'il est produit et participer au maintien de ce rapport élevé ; ce qui permet de coupler la production d'énergie à sa consommation.

B. Les phosphorylations oxydatives

Les mécanismes du métabolisme oxydatif s'effectuent au sein d'un organe intracellulaire spécialisé dans la production énergétique : la mitochondrie. L'intervention de la mitochondrie dans la production d'énergie a un réel intérêt puisque le rendement est supérieur à celui de la simple glycolyse anaérobie. De plus, la mitochondrie est capable de produire de l'ATP à partir d'autres substrats tels que les acides gras.

1. La mitochondrie : généralités

La mitochondrie est une structure dynamique, soumise en permanence à des phénomènes de fusion et de fission, (Bereiter-Hahn & Voth, 1994 ; Bereiter-Hahn, 1990), qui présente des formes, des tailles et une abondance (nombre de mitochondries par cellule)

dépendantes du type cellulaire. Selon la théorie de l'évolution, cette organelle serait originaire d'une protéobactérie aérobie symbiotique qui aurait fusionnée avec une archéobactérie anaérobie conduisant ainsi à la naissance d'une cellule plus ou moins organisée dont descendraient les cellules eucaryotes. La mitochondrie a d'ailleurs gardé des vestiges de cette origine bactérienne puisqu'elle dispose de son propre génome dont le code génétique est légèrement différent du code classique des cellules eucaryotes. Pour autant, elle n'est pas autonome ; la biogénèse mitochondriale ainsi que le maintien de la structure de l'organite nécessitent l'intervention du génome nucléaire qui porte l'information de nombreuses protéines mitochondriales. Ces protéines codées par le noyau sont importées dans la mitochondrie par des complexes de translocations situés dans la membrane externe (TOM, Translocase of Outer Membrane) et la membrane interne (TIM, Translocase of Inner Membrane) (pour revue voir Schatz, 1996 ; Voos *et al.*, 1999).

Le génome mitochondrial ne contient, en effet, que 37 gènes dont 13 codent pour des sous-unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire (pour revue voir Rimbaud *et al.*, 2009a; Calvo & Mootha, 2010). Malgré sa petite taille (environ 16,5 kb) et le faible nombre de protéines pour lesquelles il porte l'information, l'ADN mitochondrial (ADN_{mt}) n'en est pas moins essentiel. La grande famille des maladies mitochondriales dont une grande partie est due à des mutations de l'ADN_{mt} en est la preuve la plus flagrante (pour revue voir McKenzie *et al.*, 2004 ; Schapira, 2006). La fonction mitochondriale repose donc sur la coopération des génomes nucléaires et mitochondriaux ; ceci implique une synchronisation parfaite de ces deux génomes qui est permise par une molécule, PGC1- α (pour peroxisome-proliferator-activated- receptor gamma co-activator), qui joue le rôle de chef d'orchestre (pour revue voir Ventura-Clapier *et al.*, 2008 ; Rimbaud *et al.*, 2009a).

La mitochondrie est bien connue pour être un organite spécialisé dans la production d'énergie. Sa fonction ne se limite cependant pas à l'approvisionnement énergétique de la cellule. Cette organelle est impliquée dans de nombreuses autres fonctions cellulaires qui sont tout aussi importantes pour la survie de la cellule. Elle participe, en effet, à l'homéostasie calcique, à la thermogénèse, à la régulation du pH intracellulaire et est un intervenant majeur dans le processus de mort cellulaire programmée (apoptose) (pour revue voir Bras *et al.*, 2005).

Dans le cardiomyocyte de mammifère mature, les mitochondries occupent environ 30% du volume cellulaire (Schaper *et al.*, 1985 ; Barth *et al.*, 1992) où elles se répartissent

autour du noyau, entre les myofilaments et au niveau subsarcolemmal. Leur localisation cellulaire n'est pas anecdotique puisque les mitochondries présentent des propriétés biochimiques et des compositions protéiques et lipidiques différentes selon la région qu'elles occupent dans la cellule (Palmer *et al.*, 1977 ; Cogswell *et al.*, 1993). Ces mitochondries cardiaques s'organisent, en outre, en un réseau réticulaire ou en groupements plutôt que de façon isolée (Ogata & Yamasaki, 1985 ; Ogata & Yamasaki, 1997).

2. La mitochondrie : structure

Les mitochondries sont constituées d'une membrane externe et d'une membrane interne (Figure 12) dont les compositions, très différentes l'une de l'autre, leur confèrent des propriétés spécifiques. La membrane externe est, ainsi, perméable aux ions et aux petites molécules de poids moléculaire inférieur à 6 kDa quand la membrane interne est, pour sa part, imperméable à la plupart des ions et des molécules polaires. Ces propriétés membranaires particulières permettent de délimiter deux compartiments mitochondriaux, la matrice et l'espace intermembranaire, dont la singularité de la composition est à l'origine de la fonction mitochondriale.

Le transit bidirectionnel des molécules à travers la membrane externe est permis par une porine enchâssée dans la membrane qui est communément appelée VDAC (pour Voltage-Dependent Anion Channel). Cette porine permet, entre autres, le passage de molécules impliquées dans l'énergétique cellulaire (ADP, ATP, Pi, Créatine (Cr) et PCr) et pourrait également jouer un rôle dans la régulation de la fonction mitochondriale puisqu'elle permet l'ancrage (du côté cytoplasmique) de nombreuses enzymes impliquées dans diverses voies métaboliques telles que l'héxokinase ou l'acyl-CoA synthase (pour revue voir Brdiczka & Wallimann, 1994).

En ce qui concerne la membrane interne, elle est le lieu d'ancrage des kinases mitochondriales telles que la Créatine Kinase mitochondriale et l'Adénylate Kinase mitochondriale (dont les rôles fonctionnels seront évoqués plus loin) qui sont liées à celle-ci du côté de l'espace intermembranaire (pour revue voir Brdiczka & Wallimann, 1994). Cette membrane contient également les différents complexes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase qui sont responsables du mécanisme de phosphorylation oxydative. La composition très spécifique de cette membrane lui confère une perméabilité très limitée qui nécessite un

large panel de transporteurs transmembranaires pour les échanges ioniques et de métabolites. Le transport des substrats est assuré par des systèmes de transport plus ou moins complexes qui peuvent faire intervenir différents acteurs. Ainsi, dans les cellules musculaires cardiaques, le NADH produit dans le cytoplasme durant la glycolyse est transporté au moyen de la navette malate-aspartate (Figure 13). Les acides gras, pour leur part, sont importés dans la matrice par le système des carnitines palmitoyltransférases I et II (CPT-I et CPT-II) respectivement associés à la membrane externe et à la membrane interne et par la carnitine/acylcarnitine transférase qui est enchâssée dans la membrane interne (Murthy & Pande, 1987 ; Bonnefont *et al.*, 2004).

La membrane interne présente une organisation très particulière. Elle est en effet ponctuée de nombreuses crêtes qui ont longtemps été décrites comme étant de simples invaginations de la membrane selon le « baffle model » de Palade énoncé dans les années 1950. Cette vision a cependant évolué avec les techniques de microscopie de plus en plus performantes. Il est aujourd'hui admis que les crêtes mitochondriales sont des entités à part entière et que leur structure diffère de celle de la membrane interne proprement dite (pour revue voir Perkins & Frey, 2000). Les crêtes sont en fait reliées à la membrane interne par des jonctions tubulaires d'environ 30 nm de diamètre appelées pédicules (Daems & Wisse, 1966 ; Lea *et al.*, 1994 ; Mannella *et al.*, 1994). Celles-ci pourraient jouer un rôle de barrière de diffusion pour créer une compartimentation des protons, ou tout du moins des protéines, à l'intérieur des crêtes qui conduirait à une compartimentation de la fonction de la membrane interne de la mitochondrie. Ce concept est bien illustré par la séquestration du cytochrome c (Cytc) dans les crêtes décrite par l'équipe de L. Scorrano (Frezza *et al.*, 2006 ; Cipolat *et al.*, 2006). Cette localisation du Cytc a d'ailleurs un réel intérêt puisque cette molécule peut ainsi participer au processus de phosphorylation oxydative en coopération avec les complexes de la chaîne respiratoire qui sont préférentiellement enchâssés dans la membrane au niveau des crêtes mitochondriales.

Les deux membranes ne sont pas complètement dissociées l'une de l'autre. Il existe des régions où les membranes sont en contact sans pour autant être fusionnées. Ces régions constituent des sites privilégiés pour la mise en place de structures telles que le complexe de translocation constitué par TOM et TIM ainsi que le complexe de transport des acides gras formé par CPT-I et CPT-II. Elles sont également le lieu de formation du pore de transition de perméabilité (PTP) qui est formé de façon transitoire au moment de l'entrée de la mitochondrie dans le processus d'apoptose. Ce PTP est un complexe multi-protéique dont la

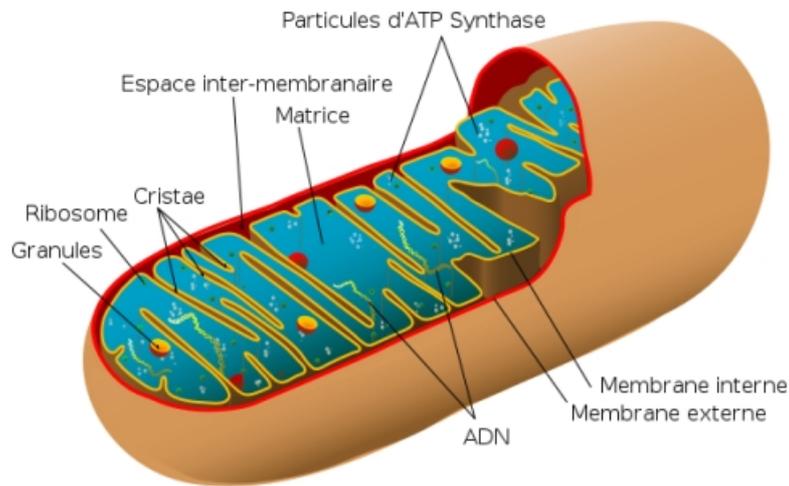


Figure 12 : Schématisation de l'organisation structurale mitochondriale

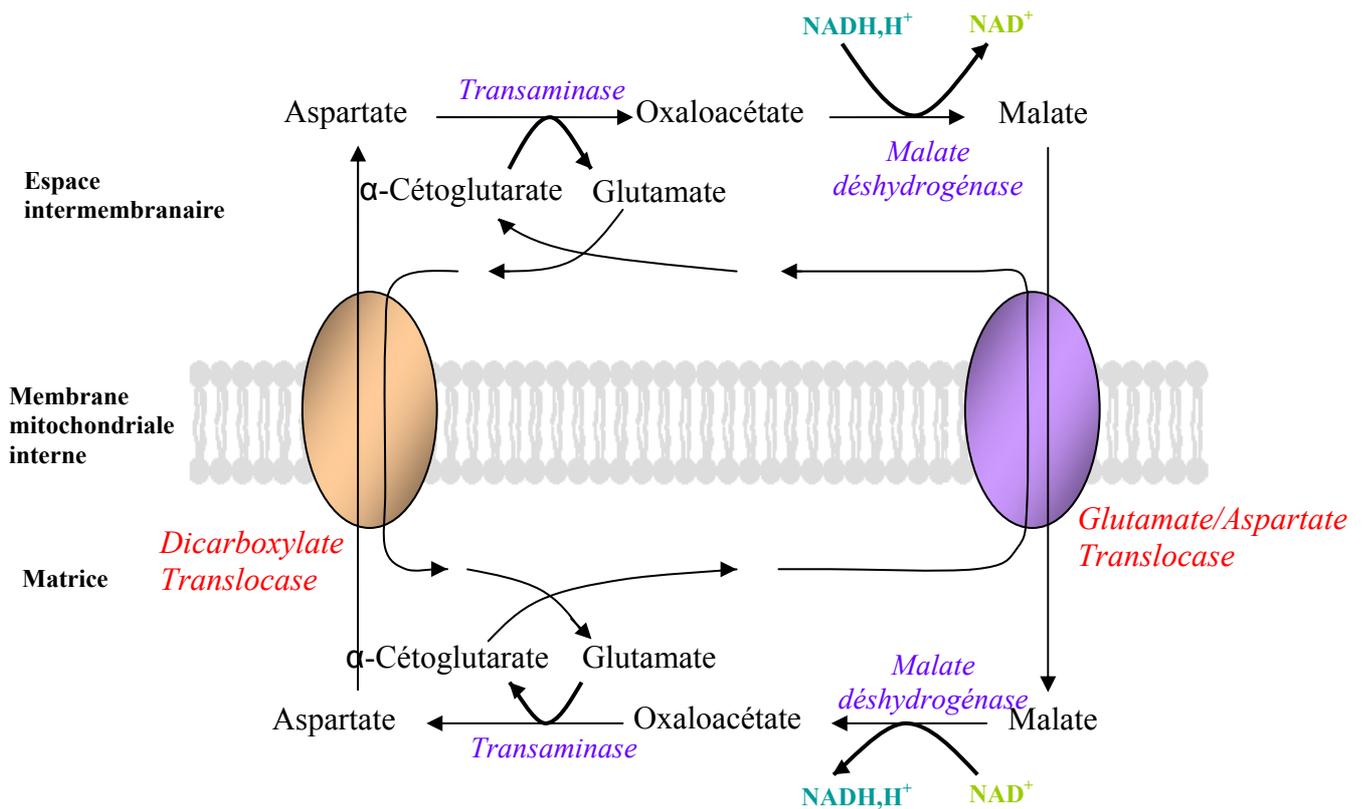


Figure 13 : La navette Malate/Aspartate

Le couplage fonctionnel de la translocase carboxylate et la translocase Glutamate/Aspartate permet le passage du $NADH$ du cytosol vers la matrice mitochondriale.

structure est encore controversée. La porine (VDAC) et l'Adénine Nucléotide Translocase (ANT) de la membrane interne sembleraient en être les principaux constituants en association avec d'autres protéines telles que la cyclophiline D située dans la matrice mitochondriale (pour revue voir Crompton, 1999 ; Kroemer *et al.*, 2007). L'ouverture de ce pore conduit au gonflement des mitochondries qui peut provoquer la rupture de la membrane mitochondriale externe. Il s'ensuit la libération dans le cytoplasme d'un facteur pro-apoptotique (AIF pour Apoptosis Inducible Factor) et du cytochrome c qui activent alors des caspases (protéases) et des endonucléases. Cette ouverture du PTP constitue un deuxième mécanisme responsable de de la libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux ; le mécanisme le plus connu étant la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie par les membres de la famille Bcl-2 (pour revue voir Bras *et al.*, 2005 ; Javadov & Karmazyn, 2007).

3. La phosphorylation oxydative

La mitochondrie est à la convergence des voies métaboliques de dégradation du glucose et des acides gras. Le pyruvate, produit de dégradation des glucides, ainsi que les acides gras, préalablement activés sous forme d'Acyl-CoA, sont importés dans la matrice mitochondriale où ils subissent des processus de dégradation (décarboxylation par la pyruvate déshydrogénase pour le pyruvate, β -oxydation (Figure 14) pour les Acyl-CoA) aboutissant à la formation d'acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA). L'acétyl-CoA, qui constitue une véritable molécule carrefour, est dégradée par une série de réactions composant le cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques (Figure 15) qui conduit à la production d'équivalents réduits (NADH et FADH₂). L'oxydation de ces derniers par les complexes I (NADH-déshydrogénase) et II (succinate ubiquinone oxydoréductase) dégage des électrons qui sont transportés au sein de la chaîne respiratoire de la membrane interne constituée des différents complexes (I, II, III et IV), de l'ubiquinone (Q), qui est un composé mobile contenu dans la membrane interne, et du Cytc (Figure 16). L'organisation spécifique de ces éléments permet d'effectuer le transfert d'électrons selon des séquences très précises (I→Q→III→Cytc→IV et II→Q→III→Cytc→IV). Le transfert d'électrons au sein de la chaîne se fait par des réactions d'oxydoréduction successives avec les constituants des différents complexes et se termine par la réduction du dioxygène en deux molécules d'eau par le complexe IV (d'où le besoin de dioxygène pour la survie des organismes aérobies). Ces réactions sont couplées, au niveau du complexe I, III et IV, à la translocation d'ions H⁺ de la matrice vers l'espace intermembranaire. La membrane interne mitochondriale étant imperméable à ces ions, il en

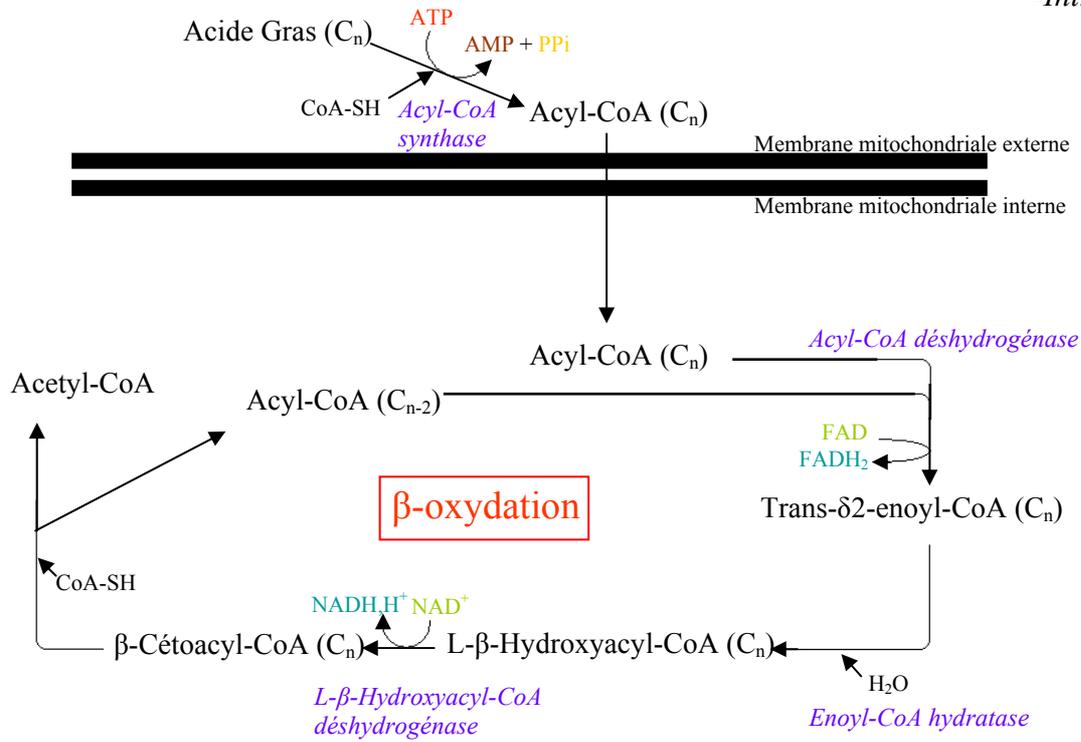


Figure 14 : La β -oxydation des acides gras

Chaque cycle de la β -oxydation produit une molécule d'acetyl-CoA et deux équivalents réduits (NADH et FADH_2).

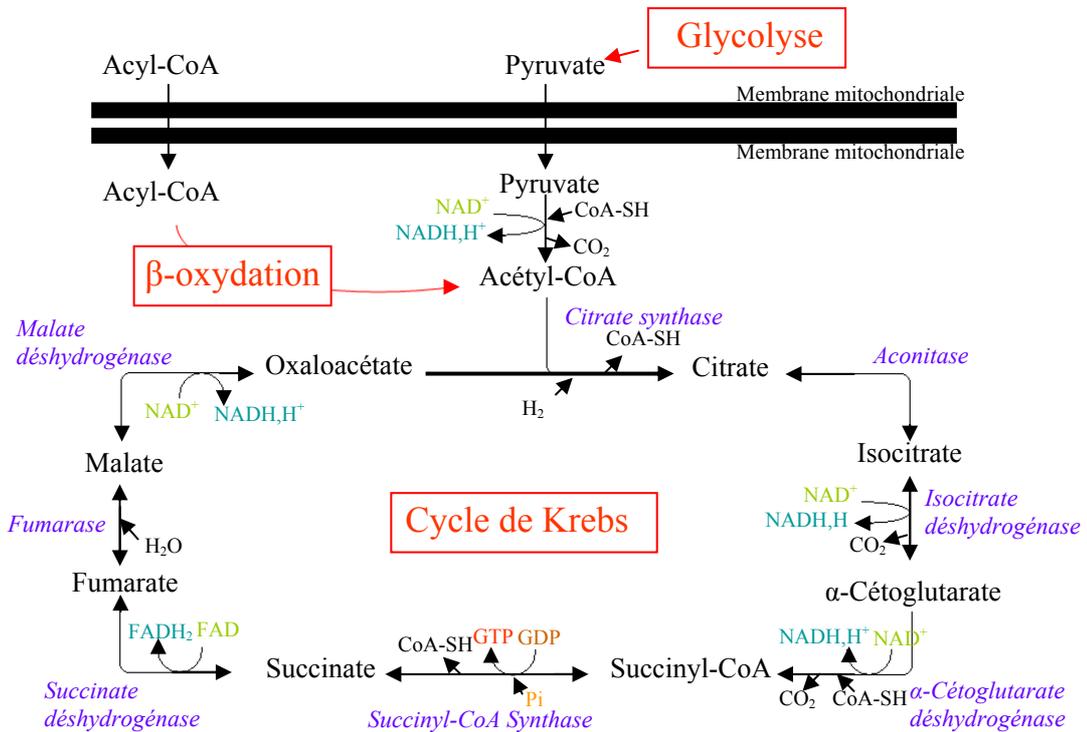


Figure 15 : Le Cycle de Krebs

L'entrée de l'acetyl-CoA, produit à partir de la β -oxydation et la déshydrogénation du pyruvate obtenu lors de la glycolyse, dans le cycle de Krebs permet la production d'une molécule de GTP et de quatre équivalents réduits (3 NADH et 1 FADH_2).

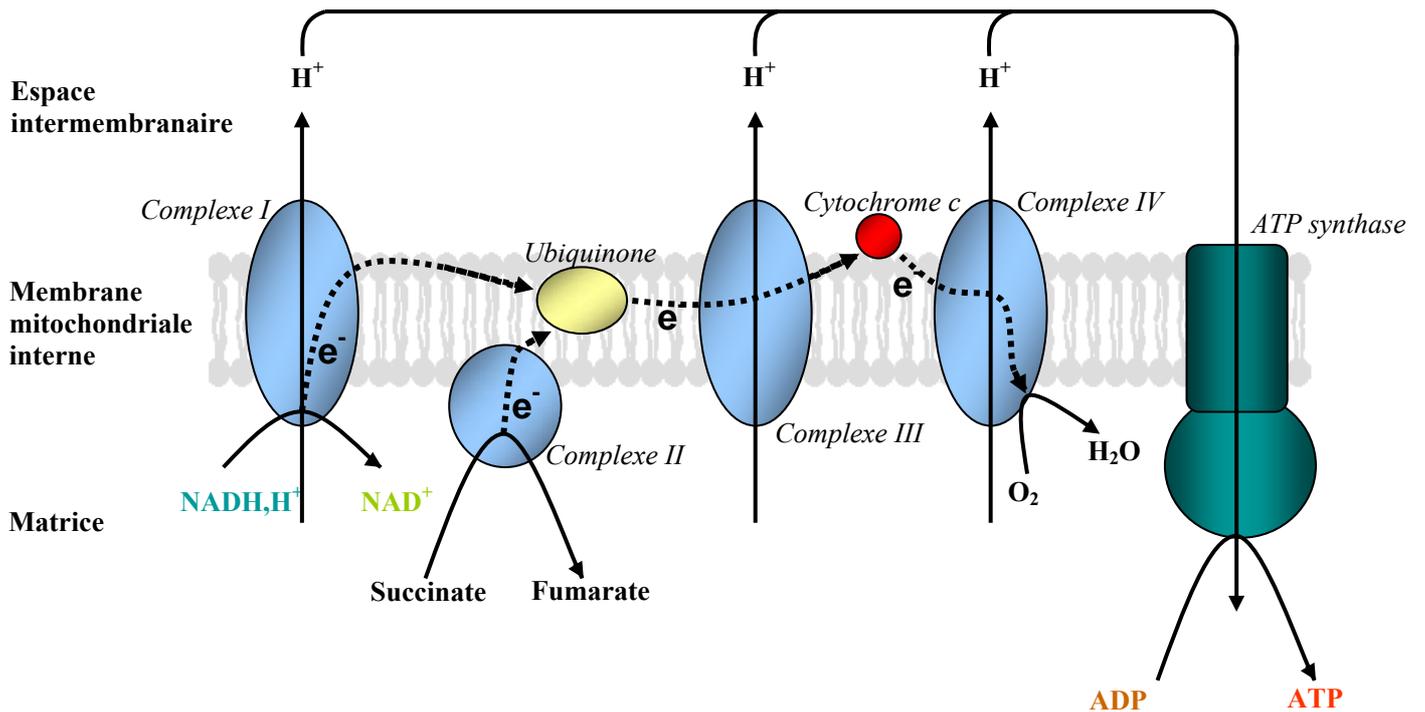


Figure 16 : Chaîne respiratoire mitochondriale

L'oxydation des équivalents réduits produits lors de la β -oxydation et du cycle de Krebs permet la constitution d'un gradient de proton dans l'espace intermembranaire qui est utilisé pour synthétiser les molécules d'ATP

résulte la constitution d'un gradient protonique qui génère une différence de potentiel de part et d'autre de celle-ci ($\Delta\Psi_m = -220 \text{ mV}$) et constitue une source d'énergie appelée force protomotrice. L'énergie libérée lors du retour des protons dans la matrice via le canal de l'ATP-synthase est alors utilisée pour réaliser la liaison du Pi à l'ADP pour produire de l'ATP (Mitchell, 1979 ; Gautheron, 1984).

L'oxydation des substrats est couplée à la phosphorylation de l'ADP, c'est la raison pour laquelle ce phénomène est qualifié de « phosphorylation oxydative ». Il est à noter que l'ATP-synthase, également appelée complexe V, possède l'activité de synthèse de l'ATP mais aussi l'activité d'hydrolyse de l'ATP. Selon l'état de la mitochondrie, cette entité est ainsi capable de consommer ou de constituer le gradient électrochimique de proton (St-Pierre *et al.*, 2000).

C. Régulation de la synthèse énergétique du cardiomyocyte

Les différents mécanismes impliqués dans la production d'énergie doivent pouvoir s'adapter à l'activité cardiaque qui fluctue en fonction des besoins nutritionnels de l'organisme. Il a été montré (Starling & Visscher, 1927 ; Neely *et al.*, 1967 ; Williamson *et al.*, 1976) que la consommation de dioxygène, et donc la production d'énergie, augmente en fonction de l'intensité de l'activité cardiaque. Cette relation étroite entre production et utilisation énergétique nécessite un (ou plusieurs) signal qui conduit à la coordination des dynamiques productrices et consommatrices. De nombreuses théories ont été avancées et font encore débat. Il semble cependant que deux facteurs régulateurs principaux semblent se dégager aujourd'hui : les nucléotides adényliques et le calcium (Saks *et al.*, 2004 ; Guzun *et al.*, 2009).

L'hypothèse classique du contrôle de la phosphorylation oxydative repose sur des études réalisées dans les années 1950 (Lardy & Wellman, 1952 ; Chance & Williams, 1956) qui ont montré que la consommation de dioxygène pouvait être stimulée par l'ajout d'ADP et de Pi dans une suspension de mitochondries isolées. Ces travaux suggèrent alors que la respiration mitochondriale est directement contrôlée par la disponibilité d'ADP et de Pi. L'aspect un peu simpliste de ce modèle n'en est pas moins séduisant puisque le rétrocontrôle positif qu'exercent les produits de l'hydrolyse de l'ATP sur la synthèse énergétique permet d'expliquer parfaitement l'équilibre entre consommation et production d'énergie. Ce

phénomène est cependant sujet à controverse. Si *in vitro*, le contrôle de la respiration mitochondriale par l'ADP est indiscutable, ce processus est bien plus difficile à appréhender *in vivo* car les concentrations intracellulaires totales d'ADP, d'ATP et de PCr (réserve énergétique) varient très peu lorsque la charge de travail du cœur augmente (Neely *et al.*, 1972 ; Williamson *et al.*, 1976 ; Balaban *et al.*, 1986). Il apparaît donc que le cœur est gouverné par une stabilité métabolique qui va à l'encontre du dogme mentionné précédemment.

Depuis une vingtaine d'années, plusieurs groupes (Hansford, 1985 ; McCormack & Denton, 1990 ; Territo *et al.*, 2001 ; Balaban, 2002 ; Maack & O'Rourke, 2007 ; Dedkova & Blatter, 2008) avancent la théorie d'une activation parallèle de la respiration mitochondriale par le calcium. Celle-ci repose sur l'entrée du calcium cytoplasmique dans la mitochondrie (via l'uniport calcique (Gunter & Pfeiffer, 1990)) au cours de l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire qui conduit à la contraction. L'entrée de calcium dans l'organite a un effet positif sur le métabolisme puisqu'il active les déshydrogénases mitochondriales impliquées dans le cycle de Krebs (Hansford, 1985) ainsi que l'ATP synthase (Territo *et al.*, 2000 ; Balaban, 2002). Il en résulte une augmentation de la production d'équivalents réduits couplée à une activation de l'entité productrice de l'ATP qui conduisent à la stimulation de la production énergétique. Cette régulation énergétique établit donc un lien direct entre mécanisme contractile et production énergétique puisque le mécanisme déclencheur de la contraction (CICR) est également activateur des systèmes de synthèse d'ATP. Si cette théorie est plutôt élégante dans le cas de l'accélération du rythme cardiaque, elle n'est cependant pas complètement satisfaisante dans le sens où elle ne permet pas d'expliquer l'importante augmentation de consommation de dioxygène constatée sous l'effet de la loi de Frank-Starling (Saks *et al.*, 2006a). Durant ce phénomène qui voit les cardiomyocytes se contracter de façon plus importante en réponse à un étirement, il a en effet été montré qu'il n'existe pas d'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium chez les cardiomyocytes étirés mais, qu'en revanche, l'augmentation de la force développée était une conséquence d'une hypersensibilisation des myofilaments au calcium (Kentish & Wrzosek, 1998 ; Shiels & White, 2008). Dans ce cas, les limites de la stimulation de la production énergétique par le calcium apparaissent puisque la stabilité de la concentration calcique est en contradiction avec l'augmentation de la charge de travail cardiaque constatée en réponse à l'étirement.

Si le phénomène décrit par la loi de Frank-Starling est en défaveur d'une régulation de la synthèse énergétique par le calcium intracellulaire, il est, en revanche, en total accord avec le contrôle par l'ADP. L'augmentation de la force de contraction en réponse à l'extension des sarcomères implique, en effet, un nombre considérablement plus important de pont actomyosine. Ceci entraîne une hausse de la production d'ADP qui stimule d'autant plus la respiration mitochondriale. Il semble donc que le mécanisme de contrôle de la synthèse énergétique par l'ADP soit au premier plan. Le calcium jouerait, pour sa part un rôle secondaire dans la stimulation de la synthèse énergétique qui n'est, néanmoins, pas à négliger puisqu'il participe à la reconstitution du stock de NADH, qui est fortement oxydé lors d'une augmentation de la contraction cardiaque (Brandes *et al.*, 1998 ; Brandes & Bers, 1997), en agissant directement sur les enzymes du cycle de Krebs.

S'il est primordial de stimuler la production énergétique au cours d'une augmentation de charge de travail, il est tout aussi important de diminuer cette synthèse lorsque l'activité cardiaque revient à la normale. Ce phénomène est assuré par le rétrocontrôle négatif qu'exerce l'ATP sur sa propre synthèse. La molécule énergétique a, en effet, une action inhibitrice sur l'activité de la citrate synthase (Harford & Weitzman, 1975) et un rapport ATP/ADP élevé est thermodynamiquement défavorable à l'activité de l'ATP synthase (Ventura-clapier, 1998). Il en résulte que le paramètre régulateur de la production énergétique est le rapport ATP/ADP.

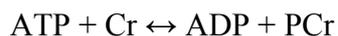
Dans la mesure où l'ADP et l'ATP se présentent comme les facteurs principaux de la régulation de la production énergétique, le mécanisme liant l'activité ATPasique et la stimulation de la respiration mitochondriale par le rapport ATP/ADP reste à comprendre dans ce système où les concentrations cytosoliques globales des molécules énergétiques ne varient pas. Le fonctionnement de ce mécanisme de régulation repose sur un système métabolique organisé qui ne nécessite pas forcément la diffusion des molécules énergétiques entre les mitochondries et les ATPases. Il s'agit d'un système ingénieux dans lequel des transferts énergétiques optimisés permettent de lier la production énergétique à la consommation sans pour autant influencer sur les concentrations cytosoliques globales des molécules énergétiques.

III. Transferts d'énergie et du signal énergétique

Les notions de rapport ATP/ADP bas au niveau des mitochondries et élevé au niveau des ATPases sont difficiles à appréhender puisqu'elles nécessitent des concentrations moléculaires différentes selon les sites cellulaires. Il est évident qu'un système de diffusion simple des molécules adényliques depuis les entités productrices d'énergie vers les entités consommatrices (et vice versa) ne permet pas de répondre aux exigences d'un tel fonctionnement. Dans le cardiomyocyte, il existe une compartimentation cellulaire qui se matérialise par la mise en place, par des acteurs protéiques, de concentrations moléculaires spécifiques dans des zones bien définies de la cellule. Ainsi, le rapport ATP/ADP est élevé au voisinage des ATPases (myosine-ATPase, SERCA...) quand celui-ci est bas au niveau des mitochondries. Ces compartiments ne sont pas indépendants les uns des autres ; ils communiquent entre eux soit par l'intermédiaire du réseau protéique des kinases (Wallimann *et al.*, 1992 ; Saks *et al.*, 1994 ; Ventura-Clapier & Veksler, 1994 ; Dzeja *et al.*, 1999) soit par interaction directe à l'interface des mitochondries et des ATPases (par le mécanisme de canalisation directe des nucléotides adényliques décrit par A. Kaasik en 2001). Ces deux mécanismes de communication permettent non seulement de transférer l'énergie produite vers les ATPases mais aussi de transférer le signal énergétique des ATPases vers les mitochondries puisque toute diminution du rapport ATP/ADP au niveau des ATPases induit également une diminution de celui-ci au niveau du compartiment mitochondrial.

A. Créatine kinase et transfert d'énergie

La réaction de la CK a été mise en évidence pour la première fois sur des extraits de muscle par Lohmann en 1934. La CK catalyse, de façon réversible, le transfert d'une liaison riche en énergie de l'ATP vers la Cr selon la réaction :



Cette réaction est qualifiée de « réaction cul-de-sac » car la PCr n'est le substrat d'aucune autre enzyme et son groupement phosphate ne peut être transféré que sur l'ADP pour produire l'ATP.

La CK est une enzyme qui intervient dans le métabolisme de nombreux organes tels que le cœur, les muscles squelettiques, les muscles lisses ou le cerveau. Quatre gènes distincts codent pour quatre monomères de CK (Stepanov *et al.*, 1997 ; Ventura-Clapier *et al.*, 1998) dont deux cytoplasmiques (M et B) qui s'associent en dimères pour donner 3 isoformes (MM, BB et MB) et deux mitochondriaux (Mi-CKu ubiquitaire et Mi-CKs exprimée dans les muscles striés (Payne & Strauss, 1994)) qui s'associent en dimère ou en octamère (Wyss *et al.*, 1992). Ces différentes isoformes ont des propriétés cinétiques assez similaires ; elles se différencient, cependant, par leur capacité à se lier à des organelles subcellulaires ou des structures protéiques, leur conférant ainsi des localisations intracellulaires spécifiques (Saks *et al.*, 1978).

1. Les Créatines Kinases mitochondriales

Les deux isoformes mitochondriales de la CK (Mi-CKu et Mi-CKs) ne sont présentes, comme leur nom l'indique, que dans les mitochondries. Elles se trouvent dans l'espace intermembranaire mitochondriale sous forme dimérique ou octamérique (assemblage de quatre dimères) et liées aux cardiolipines de la membrane interne (Muller *et al.*, 1985). Leur rôle fonctionnel a été mis en évidence pour la première fois par Bessman et Fonyo en 1966 (Bessman & Fonyo, 1966) qui ont montré que la créatine pouvait stimuler la respiration de mitochondries isolées. La fonction précise de la Mi-CK a été, par la suite, étudiée par de nombreux groupes (Jacobus & Lehninger, 1973 ; Gellerich & Saks, 1982 ; Moreadith & Jacobus, 1982 ; Saks *et al.*, 1985). L'activité de la Mi-CK est très dépendante de sa localisation puisqu'elle est située très précisément à proximité de l'Adénine Nucléotide Translocase (ANT) dont le rôle est d'assurer l'importation de l'ADP dans la matrice mitochondriale et l'exportation de l'ATP néosynthétisé vers l'espace intermembranaire (Saks *et al.*, 1994). La Mi-CK utilise préférentiellement l'ATP exporté par l'ANT pour synthétiser, à partir de la Cr, la PCr qui devient le produit final de la respiration. La PCr est exportée par la porine de la membrane externe alors que l'ADP produit par cette réaction est immédiatement importé dans la mitochondrie par l'ANT conduisant alors à une stimulation de la phosphorylation oxydative (Gellerich & Saks, 1982) (Figure 17). La proximité de l'ANT et la Mi-CK a également un intérêt du point de vue de la Mi-CK puisqu'elle conduit à une élévation locale de la concentration d'ATP au niveau de la Mi-CK qui favorise thermodynamiquement la synthèse de PCr. Ces deux enzymes sont couplées sur le plan fonctionnel ; le produit de réaction de chacune des enzymes est canalisé directement vers

l'autre enzyme en raison de leur colocalisation. Le rôle de cette isoforme mitochondriale de la CK ne se cantonne pas à la régulation de la fonction mitochondriale ; elle a, en effet, également un effet protecteur sur les propriétés d'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) qui est impliqué dans l'initiation de l'apoptose (O'Gorman *et al.*, 1997).

2. L'isoforme MM de la Créatine Kinase

Parmi les trois isoformes cytoplasmiques, la MM-CK est prédominante dans le cœur (Wallimann *et al.*, 1992). Elle se trouve sous forme libre dans le cytoplasme mais aussi fixée au sarcolemme, aux myofilaments et au RS à proximité des ATPases (Saks *et al.*, 1977 ; Wallimann & Eppenberger, 1985 ; Rossi *et al.*, 1990).

a. L'isoforme MM de la Créatine Kinase et les myofilaments

Cette isoforme fait partie intégrante des myofilaments où elle joue un double rôle. Elle est d'une part un élément structural de la bande M où elle relie les myofilaments de myosine entre eux (Wallimann & Eppenberger, 1985) et elle intervient d'autre part dans la régulation énergétique de la myosine-ATPase (pour revue voir Ventura-Clapier *et al.*, 1994). L'interaction dynamique entre la MM-CK et l'ATPase de la myosine a été mise en évidence par de nombreuses études et notamment par deux travaux (Bessman *et al.*, 1980; Saks *et al.*, 1984) qui ont montré un échange privilégié d'ATP et d'ADP entre ces entités. Ces derniers ont en effet démontré que l'ATPase de la myosine hydrolyse préférentiellement l'ATP formé par la MM-CK et qu'en retour l'ADP produit par cette réaction d'hydrolyse constitue le substrat privilégié de la MM-CK. Les nucléotides adényliques sont comme canalisés entre la MM-CK et l'ATPase myofilamentaire (Arrio-Dupont *et al.*, 1992). Il en résulte un système où la CK fixée à proximité de l'ATPase est capable de rephosphoryler, de façon très rapide, l'ADP produit par l'activité ATPasique. L'avantage d'un tel système est évident puisqu'en plus d'assurer une régénération des molécules énergétiques directement sur le site de consommation, il permet également de limiter l'accumulation locale de l'ADP qui a une action inhibitrice sur l'activité de l'ATPase myofilamentaire et donc sur l'activité contractile (Tian *et al.*, 1997).

b. L'isoforme MM de la Créatine Kinase et le RS

Si la MM-CK joue un rôle de premier plan dans le bon fonctionnement des mécanismes impliqués dans la contraction du cardiomyocyte, elle est également engagée dans sa relaxation. Il a effectivement été montré par immunohistologie que cette isoforme est fixée sur la membrane du RS à proximité de SERCA (Rossi *et al.*, 1990) qui assure la capture du calcium intracellulaire dont dépend la relaxation cardiaque. La présence de la MM-CK au voisinage de SERCA n'est pas anecdotique car, de la même façon que pour l'ATPase de la tête de myosine, elle est fonctionnellement couplée à cette ATPase. Elle contrôle le rapport ATP/ADP à proximité de SERCA pour que celui-ci soit favorable à une activité ATPasique optimale nécessaire au mécanisme de relaxation (Rossi *et al.*, 1990 ; Minajeva *et al.*, 1996 ; De Sousa *et al.*, 1999). Il a été montré que la capacité de la MM-CK à régénérer l'ATP au voisinage de SERCA est bien supérieure à celle des complexes glycolytiques associés à la membrane du RS qui peuvent aussi soutenir l'activité de cette ATPase. Ces derniers sont cependant capables d'augmenter leur capacité de production dès lors que la MM-CK perd en efficacité (Boehm *et al.*, 2000).

3. L'ensemble du système CK

L'organisation des différentes isoformes de CK permet d'imaginer un système dans lequel les transferts d'énergie sont gouvernés par les CK et leurs substrats, la PCr et la Cr, qui joueraient un rôle de navette (communément appelée « Shuttle ») entre les sites cellulaires (Figure 18) (Bessman & Geiger, 1981 ; Wallimann *et al.*, 1992 ; Saks *et al.*, 1994). Ce système repose sur la compartimentation des isoformes au niveau des sites de production et de sites de consommation d'énergie qui favorise la formation de PCr au niveau des mitochondries quand elle conduit à la production d'ATP au niveau des ATPases. La liaison riche en énergie de la PCr produite par la Mi-CK est transférée, au travers des CK cytosoliques, jusqu'à la MM-CK liée à proximité des ATPases qui peut alors rephosphoryler l'ADP produit localement pour ajuster le rapport ATP/ADP. De la même façon, l'information de la consommation d'énergie portée par la Cr est transférée jusqu'aux mitochondries par ces mêmes CK cytosoliques. La créatine agit en tant que rétrocontrôle pour indiquer, à la mitochondrie, l'état énergétique de la cellule permettant une intégration parfaite entre production et consommation de l'énergie. Du fait de la proximité de l'ensemble des enzymes qui interviennent dans ce processus, l'approvisionnement en énergie et surtout l'élimination de l'ADP se fait bien plus efficacement que s'il se faisait par diffusion simple (Jacobus, 1985).

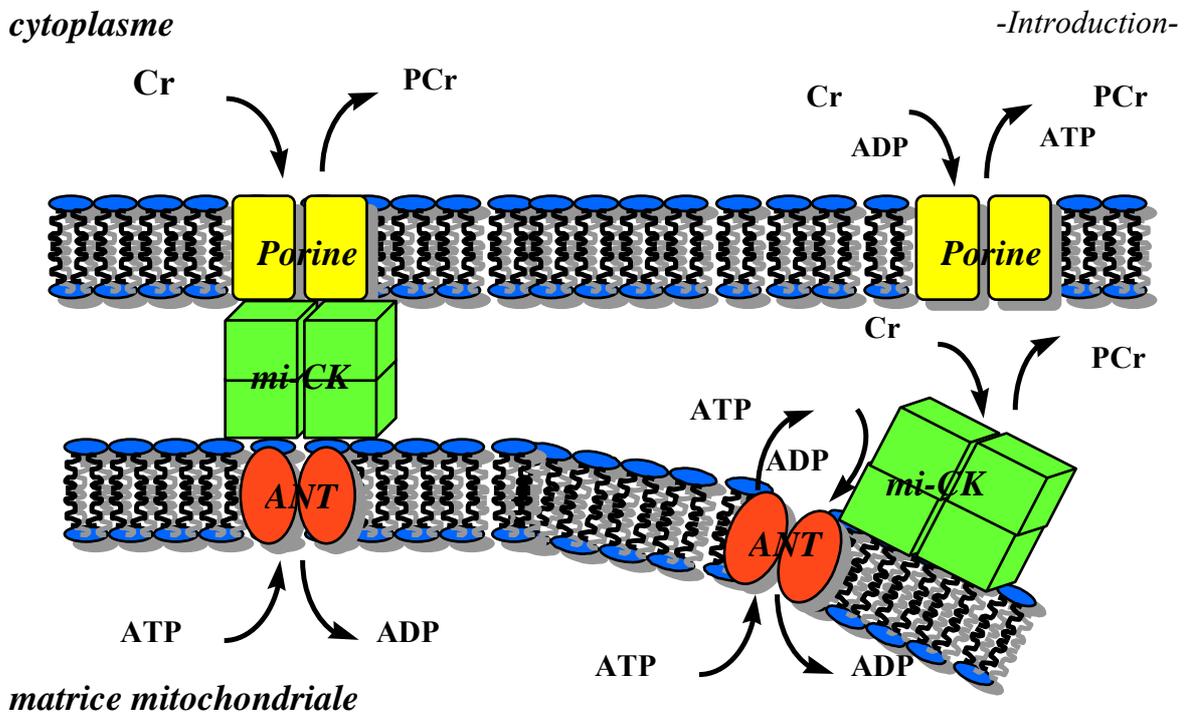


Figure 17 : Interactions entre le mi-CK, la translocase (ANT) et la porine (VDAC)

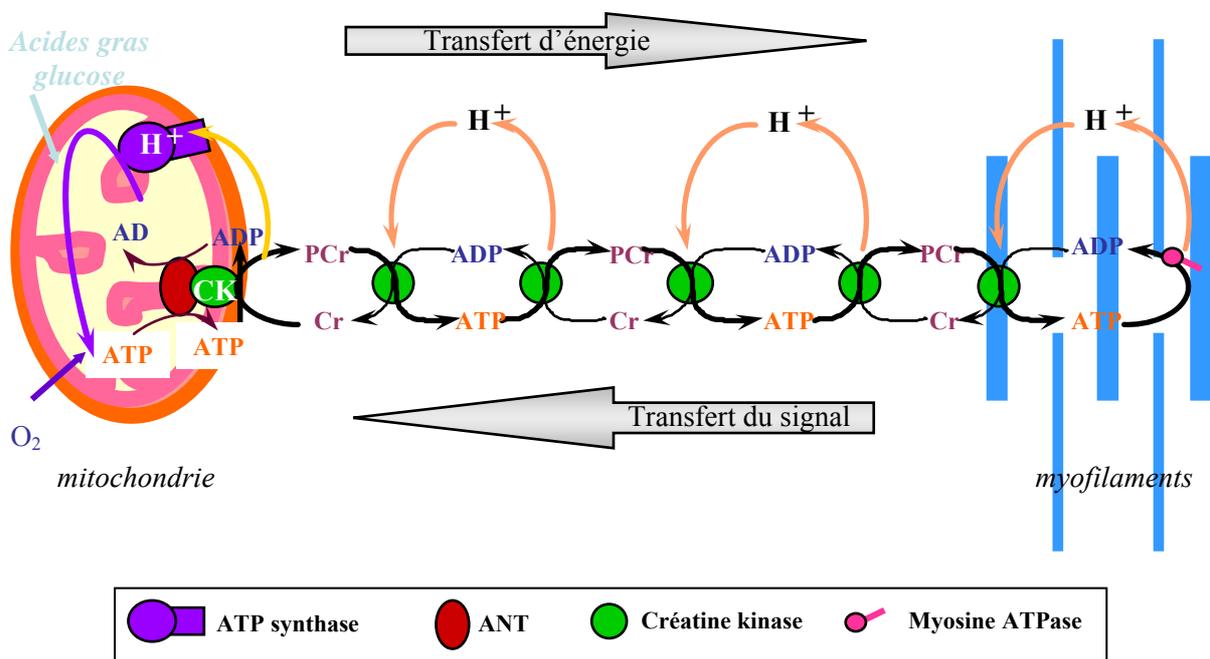


Figure 18 : Transfert d'énergie par le système créatine kinase (« shuttle »)

Les créatines kinases transfèrent une liaison phosphate depuis la mitochondrie jusqu'aux sites consommateurs (la myosine-ATPase dans ce schéma). Le fonctionnement de ce système permet, en retour, l'activation de la synthèse énergétique par la mitochondrie.

Le rôle des CK ne se limite pas à un simple transfert d'énergie. Cette enzyme peut en effet jouer le rôle de tampon spatio-temporel de l'ATP cellulaire où la PCr constitue un réservoir d'énergie rapidement mobilisable (revue Saks *et al.*, 1996). Cette réserve énergétique peut alors être utilisée lors de fluctuations énergétiques importantes et de demandes d'ATP supplémentaires. Sa présence en quantité importante dans l'ensemble des compartiments cellulaires assure de plus une distribution spatiale de l'ATP.

La CK est une enzyme qui semble être au cœur de l'énergétique du cardiomyocyte ; à tel point que le rapport PCr/ATP est utilisé comme un paramètre prédictif de mortalité dans les cardiomyopathies dilatées (Neubauer *et al.*, 1997). Pourtant, l'absence de dysfonction ventriculaire évidente lors d'une suppression de l'activité de la CK (Wallimann *et al.*, 1992) ou de mutations des gènes codant pour les isoformes cytoplasmiques et mitochondriales de la CK (van Deursen *et al.*, 1993 ; Ventura-Clapier *et al.*, 1995) suggère que d'autres mécanismes de transfert sont capables de soutenir l'activité cardiaque.

B. Adénylate kinase et transfert d'énergie

Parmi les acteurs qui pourraient tirer leur épingle du jeu, l'Adénylate Kinase (AK) est une enzyme intéressante puisqu'elle semble agir en collaboration avec la CK, l'une étant capable de suppléer l'autre en cas de perte de fonction (Dzeja & Terzic, 2003 ; Dzeja *et al.*, 2002 ; Dzeja *et al.*, 1999). Cette enzyme catalyse le transfert réversible de phosphate entre l'ATP, l'ADP et l'AMP selon la réaction :



L'AK existe sous différentes isoformes qui ont une expression tissulaire spécifique et une distribution intracellulaire particulière. Les principales isoformes retrouvées dans le myocarde sont AK1, AK2 et AK3 qui sont respectivement localisées dans le cytoplasme, dans l'espace intermembranaire mitochondrial et dans la matrice de la mitochondrie (pour revue voir Dzeja & Terzic, 2009). De la même manière que la MM-CK, une fraction de l'isoforme AK1 peut se lier à proximité des ATPases des myofilaments (Lange *et al.*, 2002) et du canal potassique sensible à l'ATP (K_{ATP}) sarcolemmal (Elvir-Mairena *et al.*, 1996; Carrasco *et al.*, 2001). Cette présence de la molécule au niveau des sites de production et de consommation

ainsi que dans le cytoplasme suggère un système de navette, similaire à celui des CK (Figure 19). Il a effectivement été montré que les AK sont capables d'assurer un flux énergétique entre les mitochondries et les myofilaments (Dzeja *et al.*, 1999). Le système AK joue cependant un rôle minoritaire (environ 10%) dans le turnover de l'ATP en condition physiologique et n'est certainement pas assez efficace pour soutenir à lui seul l'activité contractile cardiaque. P. Dzeja a en effet montré (Dzeja *et al.*, 1999) que si l'activité de l'AK augmente dans une situation où l'activité de la CK est diminuée, elle ne semble pourtant pas capable d'accroître suffisamment son activité pour compenser totalement la perte d'activité de la CK (Dzeja *et al.*, 1999). De plus, le fait qu'aucune isoforme de l'AK n'ait été identifiée à proximité de SERCA à ce jour suggère que le système AK n'est pas impliqué dans le mécanisme de repompage calcique réalisé par le RS ; il ne peut donc en aucun cas suppléer le système CK dans le processus de relaxation de la cellule musculaire cardiaque.

De toute évidence, ces travaux suggèrent l'existence d'un (ou plusieurs) autre(s) mécanisme(s) impliqué(s) dans les transferts énergétiques qui pourrai(en)t réguler l'activité énergétique avec une efficacité approchant celle du système CK. Le concept de canalisation directe des nucléotides adényliques entre les mitochondries et les ATPases, proposé par A. Kaasik en 2001, semble avoir tous les prérequis pour être le système capable de pallier à une diminution ou une disparition de l'activité CK.

C. Canalisation directe des nucléotides et transferts d'énergie

La microcompartmentation fonctionnelle des métabolites et des substrats intracellulaires mise en place par une distribution spatiale particulière des mitochondries et des complexes glycolytiques a été évoquée dès les années 1980 (Paul, 1983 ; Weiss & Hiltbrand, 1985). Les conséquences d'une telle organisation sur le transfert de nucléotides adényliques entre les mitochondries et les ATPases n'ont pourtant pas été étudiées réellement avant les années 2000. C'est en effet une étude de A. Kaasik en 2001 (Kaasik *et al.*, 2001) qui a permis de montrer pour la première fois que l'agencement spécifique des mitochondries, du RS et des myofilaments dans le cardiomyocyte mène à une situation où le transfert des nucléotides peut se faire plus librement entre les organelles qu'à travers le cytoplasme. Ce mécanisme qualifié de canalisation directe d'ATP et d'ADP entre les mitochondries et les structures consommatrices d'énergie établit une communication directe entre les organelles à

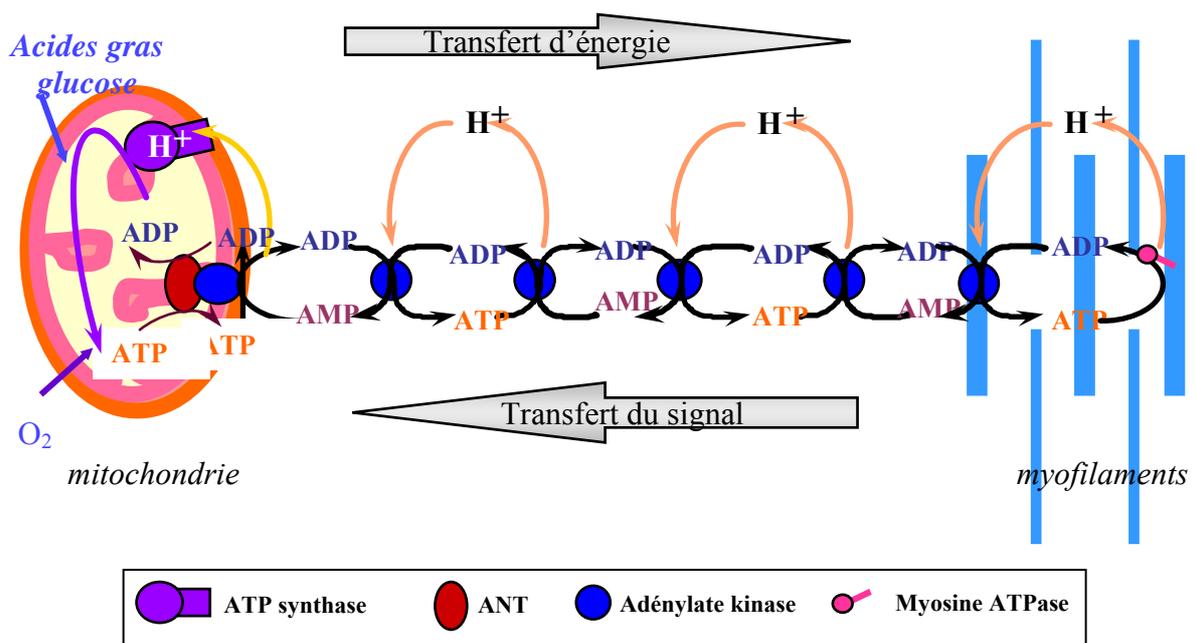


Figure 19 : Transfert d'énergie par le système des adénylates kinases

Les adénylates kinases transfèrent une liaison phosphate depuis la mitochondrie jusqu'aux sites consommateurs (la myosine-ATPase dans ce schéma). Le fonctionnement de ce système permet, en retour, l'activation de la synthèse énergétique par la mitochondrie.

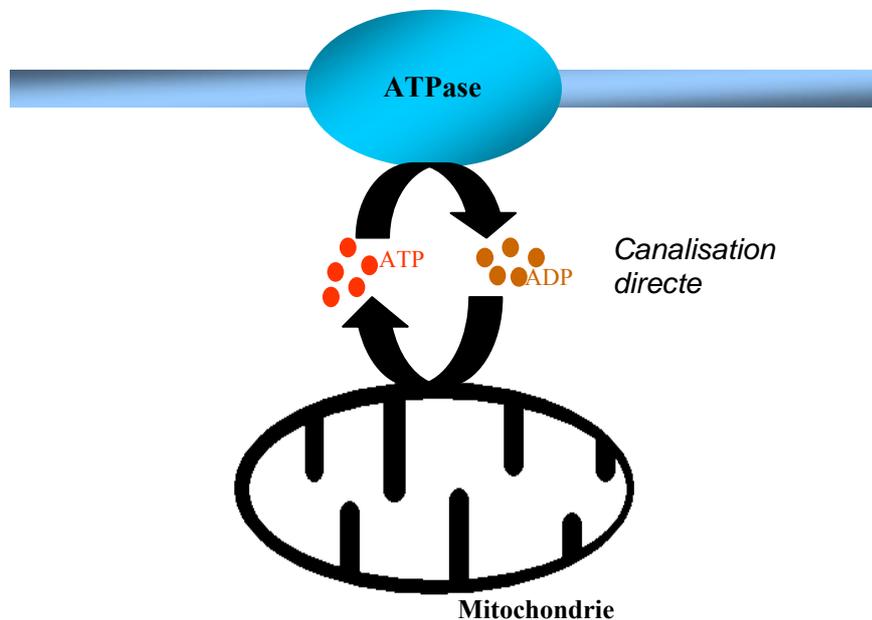


Figure 20 : Transfert d'énergie par canalisation directe de l'ATP et de l'ADP

Les molécules d'ATP et d'ADP sont directement transférées entre la mitochondrie et l'ATPase sans aucun intermédiaire.

travers la compartimentation des nucléotides adényliques (Figure 20). De la même façon que le système des kinases, cette canalisation directe permet de maintenir un rapport ATP/ADP élevé au niveau des ATPases. L'efficacité de ce processus résulterait, dans un premier temps, de l'aptitude des mitochondries à éliminer l'ADP du microenvironnement des ATPases qui est un facteur limitant pour l'activité ATPasique (le K_i des ATPases pour l'ADP étant bas) ce qui conduit également à la stimulation de la production énergétique. La description d'un tel mécanisme est en total accord avec une étude contemporaine de V. Saks (Saks *et al.*, 2001) qui montre que l'ADP endogène, c'est à dire produit par les ATPases des myofilaments et du RS, est capable d'activer la respiration mitochondriale.

Ce système très simple qui permet de s'affranchir des problèmes de diffusion des molécules énergétiques, et notamment de l'ADP (Jacobus, 1985), tient une part importante dans les systèmes de transfert énergétique. L'apport d'ATP aux ATPases des myofilaments et du RS par canalisation directe peut en effet être aussi conséquent que celui assuré par le système des CK (Kaasik *et al.*, 2001). Ces deux systèmes de transfert d'énergie sont constamment en compétition et sont capables de se compenser mutuellement lorsque l'un des deux devient déficient. Ainsi, en conditions normales, le système CK est prédominant ; il assure environ deux tiers du transfert quand la canalisation directe ne participe que pour un tiers. Chacun des systèmes augmente significativement son rendement dès lors que le mécanisme en compétition perd en efficacité ou disparaît. La stimulation plus rapide de la respiration mitochondriale lors d'une inhibition des CK (Harrison *et al.*, 1999) est révélatrice du mécanisme compensatoire qui voit la canalisation directe d'ADP et d'ATP prendre une part plus importante dans les transferts énergétiques. Cette prise de pouvoir s'explique par le fait qu'une inhibition des CK conduit à une augmentation de la concentration d'ADP locale à l'interface des mitochondries et des ATPases qui résulte en la stimulation de la production énergétique. Cette compensation est parfaitement illustrée chez les souris transgéniques n'exprimant pas la CK qui présentent une fonction cardiaque normale (dans la mesure où le cœur de ces souris ne subit pas de charge de travail trop importante) malgré le fait que le « shuttle » des CK ne puisse être assuré (Ventura-Clapier *et al.*, 1995 ; Veksler *et al.*, 1995).

Le phénomène de canalisation directe des nucléotides adényliques réunit donc tous les critères pour expliquer le fait que les souris ayant une activité CK déficiente ou absente n'aient pas de trouble cardiaque majeur (lors d'une charge de travail modérée). Ceci permet d'affirmer que ce système joue un rôle de premier plan dans les transferts énergétiques du

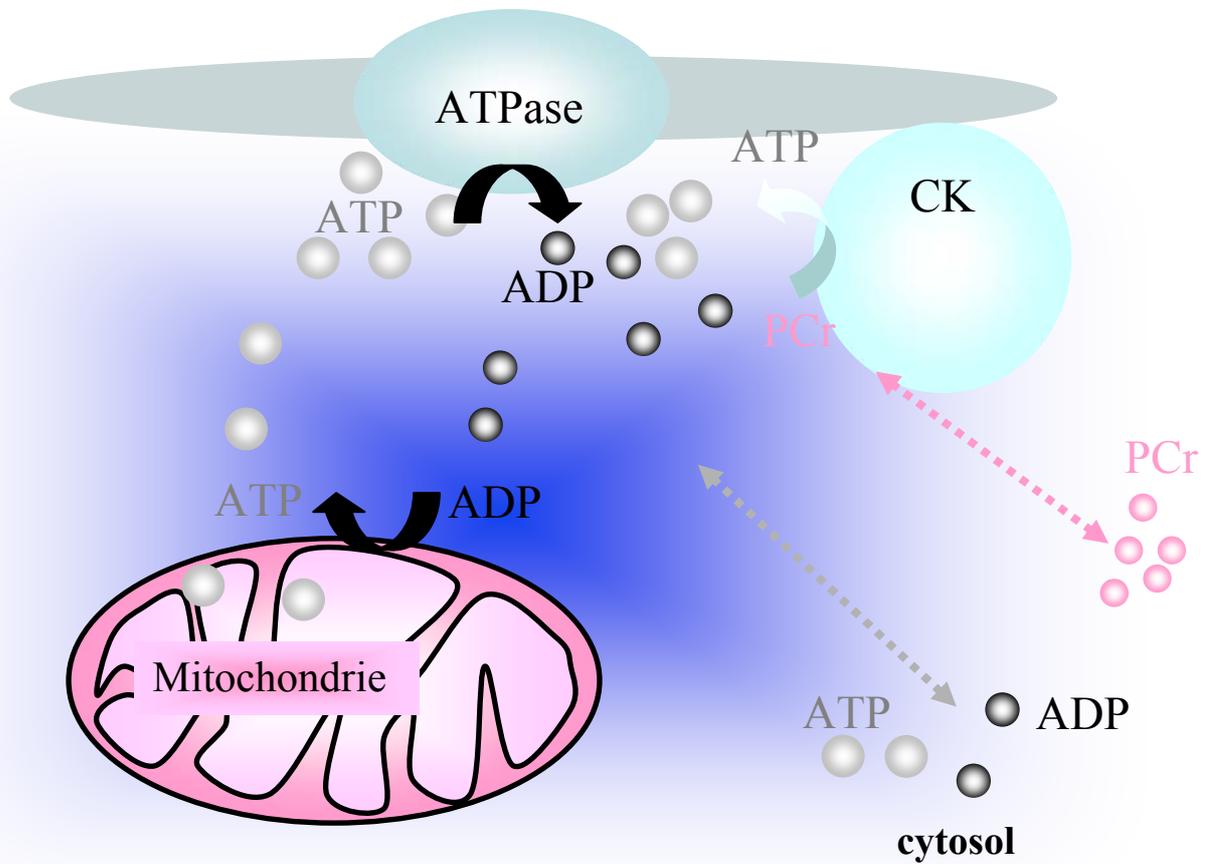


Figure 21 : Microdomaine énergétique

Un microenvironnement, dans lequel les concentrations des molécules énergétiques diffèrent de celles présentées par le cytoplasme, est créé autour des ATPases par les mitochondries et les CK.

cardiomyocyte au même titre que les CK. La fonction myocardique est ainsi dépendante de systèmes de transfert d'énergie qui reposent sur la mise en place de régions spécifiques à l'interface des mitochondries et des ATPases, appelées « micro-domaines énergétiques » (Figure 20), où les CK et les mitochondries, pour la majeure partie, établissent un rapport ATP/ADP local favorable à l'activité ATPasique.

Intuitivement, il semblerait qu'une proximité entre les différents acteurs composant les « micro-domaines énergétiques » soit nécessaire pour que les transferts directs d'énergie entre les mitochondries et les ATPases se fassent de façon efficace. La communication et la mise en place d'une compartimentation des nucléotides adényliques entre les mitochondries, le RS et les myofilaments est en effet plus difficile à concevoir dans un système où l'éloignement des acteurs pourrait confronter ce mécanisme à des problèmes de diffusion. De plus, l'organisation des organites dans la cellule musculaire cardiaque se prête tout à fait à ce genre d'hypothèse. Cet agencement particulier des organelles au sein du cardiomyocyte est permis par une architecture cellulaire singulière qui pourrait donc être la clé de voute de ce processus de transfert énergétique si particulier voire même de l'ensemble des mécanismes impliqués dans le transfert d'énergie.

IV. Architecture cellulaire du cardiomyocyte

Le cardiomyocyte présente une architecture cellulaire très particulière où les structures intracellulaires sont hautement organisées (Figure 22). L'arrangement des organelles, au sein de la cellule cardiaque, est très régulier et a conduit V. Saks (Saks *et al.*, 2001) à émettre l'hypothèse que les mitochondries, les myofilaments ainsi que le RS pourraient s'organiser en un complexe fonctionnel appelé « intracellular energetic unit » (ICEU) pour « unité énergétique intracellulaire » (Saks *et al.*, 2001; Vendelin *et al.*, 2005). Dans un tel type d'organisation structurale, l'agencement spatial des organites permettrait l'établissement de liens énergétiques privilégiés entre les différents acteurs impliqués dans la contraction musculaire. Les phosphotransferts ne seraient alors pas soumis aux lois cytoplasmiques classiques. Ceci expliquerait en outre la stabilité métabolique observée chez le cardiomyocyte lorsque la charge de travail du cœur augmente (Seppet *et al.*, 2005). Si cette notion d'ICEU donne encore moins de poids à la théorie d'une activation parallèle de la respiration mitochondriale par le calcium, elle n'en est pas moins crédible puisque de nombreuses études

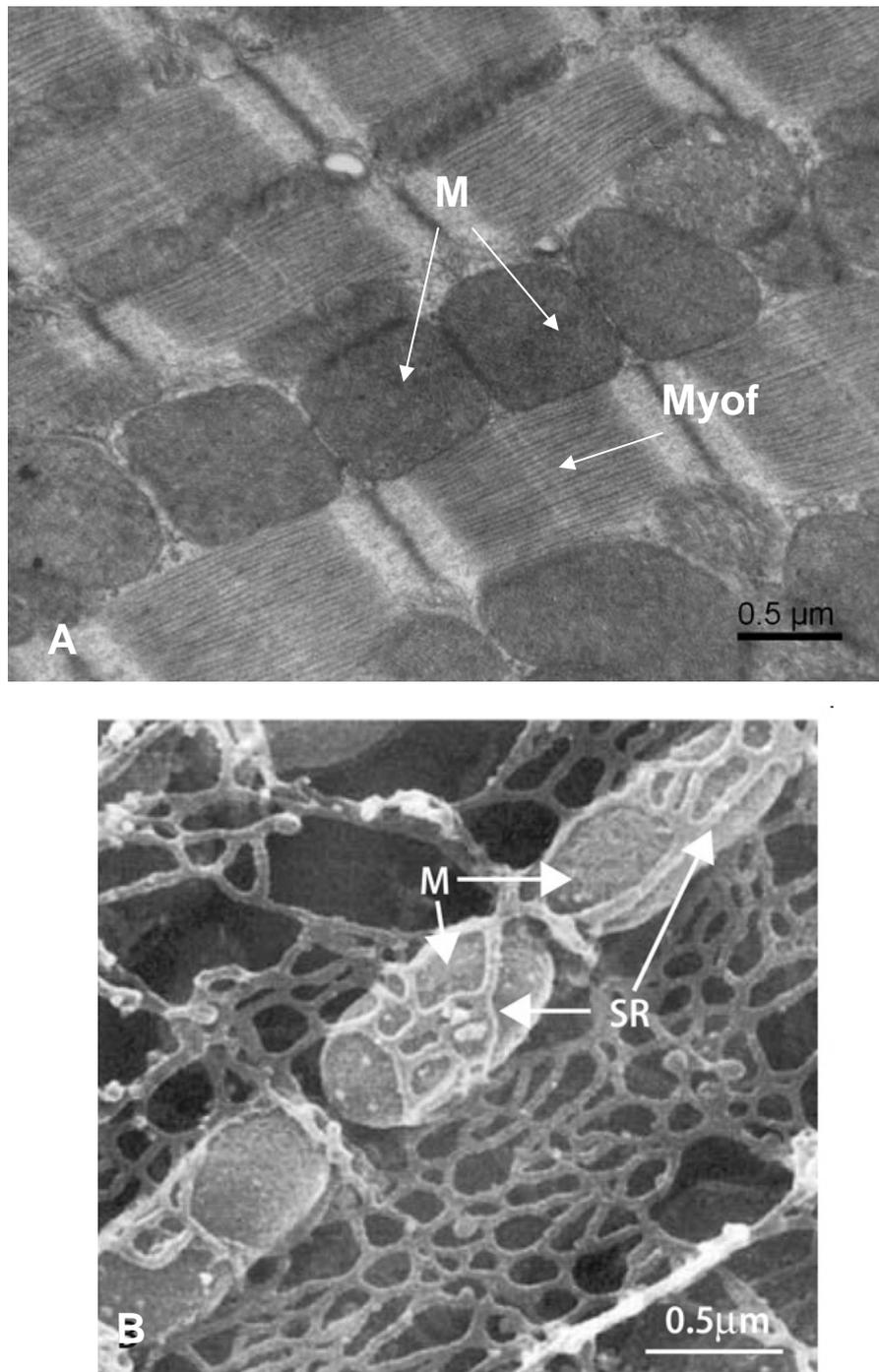


Figure 22 : Ultrastructure de cardiomyocyte

M : Mitochondries Myof : Myofilaments SR : réticulum sarcoplasmique

A. Coupe longitudinale de ventricule gauche de souris observée par microscopie électronique à transmission. *Cliché réalisé par M.Novotova (non publié)*

B. Scan 3D de cœur de chien. *D'après Yoshikane et al., Submicrosc Cytol, 1986.*

suggèrent le bien fondé de l'hypothèse des ICEU (Saks *et al.*, 2001; Appaix *et al.*, 2003; Vendelin *et al.*, 2005).

A. Unité énergétique intracellulaire

L'idée que l'environnement cellulaire dans lequel se trouvent les mitochondries puisse avoir une influence sur les régulations énergétiques est apparue vers la fin des années 1980 avec la technique des fibres perméabilisées à la saponine (Veksler *et al.*, 1987 ; Kuznetsov *et al.*, 2008). Cette approche, dont l'objectif principal est de pouvoir étudier la fonction mitochondriale *in situ*, a en effet permis de démontrer que le K_m des mitochondries pour l'ADP est bien plus élevé lorsqu'il est mesuré sur des fibres perméabilisées (de 250-400 μM) plutôt que sur une préparation de mitochondries isolées (20-25 μM) (Saks *et al.*, 1991; Kay *et al.*, 1997). Plusieurs hypothèses ont vu le jour pour expliquer ce K_m élevé dans les fibres perméabilisées. Si les potentiels problèmes de diffusion de l'ADP au travers de l'architecture dense du cardiomyocyte pourraient être une explication (Saks *et al.*, 1991 ; Saks *et al.*, 2003), ce phénomène est sans doute plus complexe et ferait également intervenir une diminution de la perméabilité de membrane externe de la mitochondrie en raison d'interactions protéiques (Kay *et al.*, 1997 ; Saks *et al.*, 1995 ; Saks *et al.*, 1994). Cet exemple n'en reste pas moins une preuve flagrante de l'implication de la mitochondrie dans un système où l'environnement alentour joue un rôle de premier plan dans les mécanismes de régulation de la production énergétique.

Le concept d'ICEU a émergé dans les années 2000 avec les études de V. Saks et de E. Seppet (Saks *et al.*, 2001 ; Seppet *et al.*, 2001) qui ont montré que l'ajout d'ATP à une préparation de fibres musculaires perméabilisées est capable d'activer la respiration mitochondriale. Ce résultat est à l'origine d'une réelle avancée dans la compréhension des régulations énergétiques puisqu'il met en évidence une régulation directe de la respiration mitochondriale et, par conséquent, de la production d'énergie par l'ADP produit par les ATPases. De manière intéressante, ces études montrent également que l'ajout de consommateurs d'ADP, comme la Pyruvate Kinase (PK) ou le Phosphoénolpyruvate (PEP), dans ces préparations inhibe complètement la respiration stimulée par de l'ADP exogène (ajouté dans le milieu) quand il n'inhibe que très partiellement la respiration mitochondriale stimulée par l'ADP endogène (produit par les ATPases). Ainsi, l'ADP produit par l'activité d'hydrolyse des ATPases ne diffuserait que très peu vers le cytoplasme et resterait

inaccessible à PK et à PEP mais serait tout de même capable de stimuler l'activité mitochondriale. Ceci nécessiterait un réel couplage fonctionnel des mitochondries et des ATPases qui a donné naissance à la notion d'ICEU. Par ailleurs, cette organisation particulière des mitochondries au sein des ICEU permettrait à ces organites d'interagir mécaniquement avec les myofilaments et d'en modifier les propriétés (Kaasik *et al.*, 2010 ; Kaasik *et al.*, 2004).

Si le fonctionnement précis de ces ICEU reste encore à être bien défini pour que ce concept soit totalement accepté, il semble que les propriétés des mitochondries soient fortement influencées par l'environnement protéique dans lequel se trouve l'organite. La diminution du K_m pour l'ADP exogène de mitochondries de fibres perméabilisées traitées à la trypsine (une protéase) (Saks *et al.*, 1996) en est la preuve irréfutable. Si l'idée d'interactions entre protéines cytoplasmiques et membrane externe de la mitochondrie qui auraient un impact sur les propriétés mitochondriales a été avancée (Saks *et al.*, 1996 ; Saks *et al.*, 1995 ; Saks *et al.*, 1994), l'action de la trypsine ne se limite pas à l'effet précédemment cité puisqu'elle conduit également à la potentialisation de l'inhibition, par la PK et la PEP, de la stimulation de la respiration mitochondriale par l'ATP (Saks *et al.*, 2001). Ceci pourrait suggérer que l'accès de l'ADP exogène aux mitochondries et que la diffusion de l'ADP endogène vers le cytoplasme soient restreints par une barrière protéique dans la cellule musculaire cardiaque (Saks *et al.*, 2003 ; Appaix *et al.*, 2003). La diffusion de l'ADP exogène vers les mitochondries et de l'ADP endogène vers le cytoplasme ne serait alors possible qu'après une lyse sélective de cette barrière protéique. L'ensemble de ces observations pourrait également être expliqué par le fait que la désorganisation de l'agencement des différents acteurs (mitochondries et ATPases) engendrée par la protéolyse (Saks *et al.*, 2003) conduirait à l'altération de la compartimentation des nucléotides adényliques. Ce deuxième point est d'ailleurs soutenu par le simple fait que les modifications structurales engendrées pendant la contraction cellulaire changent le K_m des mitochondries pour l'ADP exogène (Anmann *et al.*, 2005). Les protéines qui ont un impact sur le fonctionnement des ICEU sont en outre, pour la plupart, des protéines associées au cytosquelette.

B. Cytosquelette et énergétique cellulaire

La nature des protéines impliquées dans les phénomènes de transfert d'énergie et de diffusion des nucléotides adényliques est encore mal connue. Il est cependant fort probable qu'une grande majorité de ces protéines soit des protéines impliquées dans l'agencement des mitochondries au sein de la cellule telles que les protéines du cytosquelette.

Le cytosquelette est constitué de différentes fibres classifiées selon leur diamètre ; trois catégories sont ainsi distinguables : les microfilaments d'actine (6 nm de diamètre), les filaments intermédiaires comme les desmines ou les vimentines (10 nm de diamètre) et les microtubules (25 nm de diamètre) (Rappaport *et al.*, 1998). Plusieurs de ces protéines sont connues pour être impliquées dans le maintien de la disposition spatiale des mitochondries (Leterrier *et al.*, 1994 ; Rappaport *et al.*, 1998) ainsi que dans la morphologie et les mouvements mitochondriaux. Les microtubules jouent ainsi un rôle essentiel dans l'organisation mitochondriale ; ils forment en quelque sorte un réseau qui enveloppe les mitochondries et les maintient en place. La lyse protéique par traitement à la trypsine de fibres perméabilisées conduit à un effondrement du réseau des microtubules dont la conséquence directe est une désorganisation du réseau mitochondrial qui rend les mitochondries plus sensibles à l'ADP exogène (Appaix *et al.*, 2003). Ceci suggère que les microtubules sont directement impliqués dans l'arrangement des mitochondries au sein de la cellule musculaire cardiaque et qu'ils jouent également un rôle important dans la régulation de la fonction mitochondriale soit par interaction directe avec les mitochondries via des protéines associées aux microtubules (Saetersdal *et al.*, 1990), soit en limitant simplement la diffusion de l'ADP vers les ATPases.

Si les microtubules semblent être des acteurs importants du contrôle de l'agencement intracellulaire mitochondrial, les filaments intermédiaires et notamment la desmine ne sont pas en reste. La desmine est effectivement une protéine qui interconnecte les myofibrilles les unes entre les autres et qui participe à l'ancrage des mitochondries au disque Z des sarcomères permettant alors la disposition de l'organelle au niveau de la bande sarcomérique A (Nozaki *et al.*, 2001). Cette protéine est en outre capable de contrôler la forme des mitochondries en comprimant ou en étirant la membrane mitochondriale durant le cycle de contraction-relaxation du cardiomyocyte. Une étude réalisée chez des souris ayant un déficit d'expression de cette protéine a permis de démontrer que celle-ci a un rôle physiologique de premier plan

puisque le myocarde de ces souris présente une désintégration importante des myofibrilles ainsi qu'un réarrangement mitochondrial flagrant (Kay *et al.*, 1997 ; Wilding *et al.*, 2006). L'absence de desmine conduit en effet à une perte de connexion entre les mitochondries et les autres structures cellulaires. Cette altération est responsable de sévères conséquences fonctionnelles telles que la diminution des capacités oxydatives maximales des mitochondries et la perte du couplage fonctionnel de la mi-CK et de l'ANT (Kay *et al.*, 1997 ; Capetanaki, 2002). Les études réalisées sur les modèles de souris présentant une déficience d'expression de desmine ont également permis de montrer que cette protéine est directement impliquée dans la compartimentation de l'ADP et de l'ATP. Les mesures de respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées ont révélé une affinité mitochondriale beaucoup plus élevée pour l'ADP exogène (K_m plus faible) ainsi qu'une canalisation directe des nucléotides adényliques entre les mitochondries et SERCA beaucoup moins efficace lorsque l'expression de la protéine est altérée (Wilding *et al.*, 2006). De la même manière, la perte d'expression de la « muscle LIM protein » (MLP), qui est impliquée dans la structure des sarcomères (Arber *et al.*, 1997 ; Arber & Caroni, 1996) et qui joue un rôle dans la dynamique de l'actine (Papalouka *et al.*, 2009), a des retentissements similaires sur le réseau mitochondrial, l'affinité pour l'ADP et la canalisation directe des nucléotides (van den Bosch *et al.*, 2005 ; Wilding *et al.*, 2006). Il est à noter que ces modèles de souris développent des atteintes cardiaques graves (Hoshijima *et al.*, 2002 ; Goldfarb & Dalakas, 2009) et qu'il est fort probable que l'altération de la compartimentation nucléotidique en soit une des causes majeures.

Il semble que les protéines du cytosquelette et, de manière plus générale, l'architecture cellulaire interviennent directement dans les mécanismes de régulation de l'énergétique cellulaire et dans les transferts d'énergie. Il est clair qu'un ensemble de protéines impliquées dans la cytoarchitecture a des effets sur les propriétés mitochondriales et le fonctionnement des ICEU, mais il est cependant encore difficile de définir avec certitude le mécanisme d'action de ces acteurs protéiques. De nombreuses questions subsistent et méritent une exploration plus précise encore des liens entre l'énergétique et l'architecture du cardiomyocyte. C'est pourquoi nous avons étudié, dans ce travail, le lien entre l'arrangement spatial des mitochondries et des ATPases des myofilaments et du RS et l'efficacité de la canalisation directe des nucléotides entre ces entités.

CHAPITRE II : Situations physiologiques permettant d'étudier le lien entre architecture et transferts énergétiques

I. Le développement postnatal

Le cœur est le premier organe à devenir fonctionnel au cours du développement prénatal. Il commence à battre dès le huitième jour de vie embryonnaire chez la souris (à partir de trois semaines chez l'homme) alors qu'il n'est encore que sous la forme d'un cœur tubulaire primitif (Sissman, 1970). Cet organe rudimentaire subit de nombreux processus de remodelage au cours de la vie fœtale (pour revue voir Brand, 2003 ; Sedmera & McQuinn, 2008) conduisant à la formation d'un organe à quatre cavités qui, à la naissance, est très semblable, dans sa morphologie, au cœur adulte. Ces similitudes macroscopiques avec le cœur adulte ne font pas de la pompe cardiaque néonatale un organe mature pour autant. La période suivant la naissance correspond à un stade de transition entre la vie fœtale et la vie adulte qui est marqué par de nombreuses modifications de la cellule cardiaque qui doit s'adapter en permanence aux transformations de l'organisme inhérentes à la croissance.

A. Maturation systémique

Dès la naissance, le cœur doit faire face à la mise en place d'un nouveau mode de fonctionnement. Durant la vie fœtale, les deux ventricules fonctionnent en parallèle et participent tous les deux à la circulation systémique (pour revue voir Rudolph & Heymann, 1967). La circulation pulmonaire étant réduite (environ 10% du débit total) en raison de la forte résistance des poumons collapsés, le sang éjecté par le ventricule droit passe préférentiellement dans la grande circulation via les shunts assurés par le *ductus arteriosus* et le *foramen ovale* (Figure 23). Le débit à travers ces shunts est très important : 32% du débit total traverse le *ductus arteriosus* et 45% passe par le *foramen ovale*. A la naissance, la résistance pulmonaire chute brutalement du fait de l'expansion des alvéoles pulmonaires conduisant ainsi à l'augmentation de la pression systémique qui mène à la fermeture des shunts. Les ventricules acquièrent alors un fonctionnement en série qui est caractéristique de la physiologie cardiaque adulte. Ces modifications importantes du système cardiovasculaire

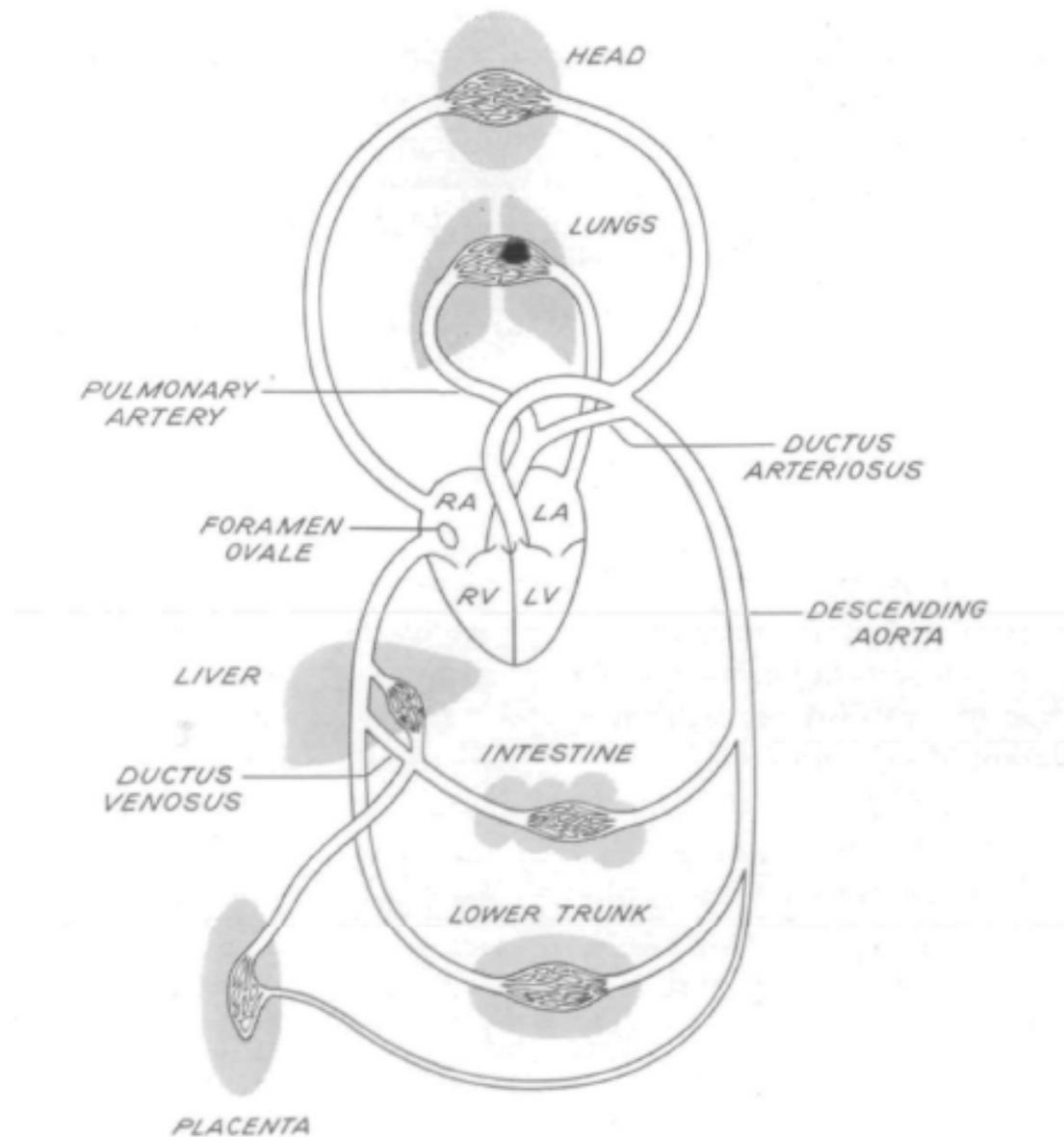


Figure 23 : Représentation de la circulation sanguine foetale

Le sang éjecté par le ventricule droit passe en majorité dans la grande circulation via les shunts assurés par le *ductus arteriosus* et le *foramen ovale*. D'après Rudolph et al, *Circulation research*, 1967.

dans les premières heures de vie du sujet (ou les premiers jours selon l'espèce) conduit à de nouvelles teneurs en oxygène des différents vaisseaux ainsi qu'à de nouvelles conditions de pression, de charge et de volume des deux ventricules qui ont des répercussions considérables sur la fonction cardiaque. Le cardiomyocyte fœtal et l'organisation générale du cœur fœtal ne sont alors plus parfaitement adaptés à leurs nouvelles fonctions et doivent subir des processus de maturations indispensables à une fonction cardiaque optimale.

B. Maturation du coeur

Si le cœur des nouveau-nés est soumis à d'importants bouleversements hémodynamiques en raison de la mise en place d'un nouveau schéma circulatoire, il est également sujet à une constante augmentation de sa charge de travail du fait de la croissance rapide de l'organisme à cette période. L'augmentation de la masse corporelle du sujet et donc du volume tissulaire à irriguer ne peut se faire sans une fonction cardiaque de plus en plus efficace impliquant des phénomènes cellulaires adaptatifs.

La réponse du cœur à ces nouvelles conditions physiologiques consiste en l'accroissement important de sa masse cardiaque globale (Hoerter *et al.*, 1991 ; Li *et al.*, 1996 ; Leu *et al.*, 2001). Les mécanismes cellulaires à la base de la croissance cardiaque ont été abordés très tôt puisque, dès 1904, Marceau montre, par observation histologique, que la cellule du cœur fœtal et néonatal est plus petite que la cellule du cœur adulte. Ces observations conduisent à l'émergence de l'hypothèse d'un arrêt de la prolifération cellulaire à la naissance. Celle-ci est cependant infirmée durant les années 60 par les travaux de Shafiq (Shafiq *et al.*, 1968) qui montrent une activité mitotique dans le cœur de jeunes rats. Il s'avère en fait que la croissance cardiaque est gouvernée par deux processus distincts hautement régulés. Elle peut en effet se faire par une prolifération cellulaire intense qui est qualifiée d'hyperplasie ou simplement par l'augmentation de la taille de chacun des cardiomyocytes communément appelée hypertrophie cellulaire (Zak, 1973 ; Clubb & Bishop, 1984 ; Leu *et al.*, 2001). La temporalité de ces processus chez le rongeur a fait l'objet de nombreuses études qui ont conclu à la division de la croissance cardiaque en trois phases : une première phase hyperplasique qui dure jusqu'à 4 jours après la naissance, une phase de transition entre 5 et 15 jours après la naissance durant laquelle l'hyperplasie et l'hypertrophie sont concomitantes (certaines études ont démontré une activité mitotique jusqu'à trois semaines après la naissance

chez le rat (Shafiq *et al.*, 1968)) et enfin une phase purement hypertrophique qui se prolonge jusqu'à l'âge adulte. Chez l'homme, les capacités prolifératives des cardiomyocytes sont perdues entre 3 et 6 mois après la naissance (Tam *et al.*, 1995). Les mécanismes responsables de la transition entre hyperplasie et hypertrophie ne sont pas encore clairement identifiés. Si l'absence totale de réplication de l'ADN a été montrée dès 15 jours après la naissance chez le rat et la souris (Li *et al.*, 1996 ; Machida *et al.*, 1997), il semblerait que celle-ci ne soit pas la cause majeure de l'arrêt de la prolifération cellulaire. Les cardiomyocytes de rongeur subissent en effet, pour la plupart, une dernière division nucléaire sans division cytoplasmique conduisant à la formation de cardiomyocytes à deux noyaux signifiant que le blocage du processus mitotique s'effectuerait plutôt au niveau de la cytokinèse (Li *et al.*, 1997a). Si l'implication dans ce processus de transition d'un acteur tel que *c-myc* (proto-oncogène) a été particulièrement étudiée (Schneider *et al.*, 1986 ; Machida *et al.*, 1997), l'importante variation du profil d'expression génique durant le développement (Chen *et al.*, 2004) suggère une grande complexité des phénomènes engagés.

C. Maturation de l'architecture cellulaire

Durant ces processus qui permettent d'augmenter la taille du cœur, la morphologie et la physiologie des cellules musculaires cardiaques sont modifiées de façon importante. Les cardiomyocytes néonataux, dont les disques intercalaires ne sont pas encore bien distinguables, ne sont pas très bien polarisés. Ces cellules subissent un allongement progressif dès les premiers jours de vie postnatale du sujet (Ehler & Perriard, 2000 ; Hirschy *et al.*, 2006) qui est concomitant à une réorganisation longitudinale des myofibrilles, permettant ainsi le passage des cardiomyocytes fœtaux plus ou moins polygonaux aux cardiomyocytes allongés observés chez l'adulte (Hirschy *et al.*, 2006). Si la forme des cardiomyocytes est très changeante au cours du développement postnatal, l'organisation interne de ces cellules subit également de nombreuses évolutions. De manière générale, l'architecture présentée par les cardiomyocytes néonataux est très différente de l'architecture définitive du cardiomyocyte adulte. L'organisation du cytosquelette est beaucoup plus lâche pendant les premiers jours de vie. La densité des microtubules, qui est en quelque sorte un index de l'organisation cytoarchitecturale, augmente jusqu'à 9 jours après la naissance (Cartwright & Goldstein, 1985). Les microtubules sont pourtant bien présents à la naissance, mais seul le réseau microtubulaire longitudinal est bien développé. En comparaison avec la cellule adulte mature,

les cardiomyocytes néonataux présentent en effet très peu des microtubules orientés transversalement (Li *et al.*, 1997a).

Les microtubules ne sont bien évidemment pas les seuls constituants du cytosquelette qui voient leur organisation se modifier au cours du développement postnatal ; il a également été montré que l' α -actinin, la vinculine et la desmine entre autres ont un comportement très changeant durant cette période (Li *et al.*, 1997a). Il est d'ailleurs suggéré que les modifications d'expression des protéines de structure pourraient jouer un rôle essentiel dans l'arrêt de la phase hyperplasique observée durant la période périnatale. L'arrêt de la cytokinèse, conduisant à la formation de myocytes cardiaques binucléés, pourrait être la conséquence de l'augmentation de la densité des myofibrilles et des structures associées. Ces myofibrilles ne pourraient alors pas être totalement démantelées au cours de la prophase et empêcheraient la division cellulaire par l'anneau contractile actine-myosine (Li *et al.*, 1997a ; Li *et al.*, 1997 b).

Etant donné que ces protéines du cytosquelette, qui voient leur organisation évoluée au cours du développement postnatal, interagissent avec les organelles, il est fort probable que l'arrangement spatial des constituants cellulaires soit également changeant pendant la maturation de la cellule musculaire cardiaque. Il a été montré par microscopie confocale (Tiivel *et al.*, 2000) que la répartition mitochondriale aléatoire observée à la naissance, qui conduit à la formation d'amas mitochondriaux, est effectivement très rapidement réorganisée puisqu'après une semaine de développement, ces organites forment un réseau presque similaire à celui de l'adulte. L'augmentation du K_m des mitochondries de fibres perméabilisées pour l'ADP au cours du développement postnatal précoce est révélatrice de la complexification de l'environnement mitochondrial et donc du degré d'organisation de la cellule cardiaque. Ceci signifierait en effet que la diffusion de l'ADP est progressivement réduite en raison d'un réarrangement structural important qui rendrait les mitochondries moins accessibles pour l'ADP exogène.

Le réarrangement structural subit par le cardiomyocyte au cours de la période postnatale est sans doute une conséquence directe de la complexification de l'organisation interne de la cellule musculaire cardiaque. Durant cette période, la cellule est la cible de nombreuses modifications physiologiques conduisant entre autres à l'augmentation de la masse mitochondriale (Tiivel *et al.*, 2000) et de la densité des myofibrilles (Smith & Page,

1977 ; Lim *et al.*, 1983) qui permettent l'accroissement de la force développée par les fibres cardiaques (Reiser *et al.*, 1994 ; Siedner *et al.*, 2003). Les mitochondries et les myofilaments étant les principaux constituants cytoplasmiques des cardiomyocytes, il en résulte des adaptations architecturales évidentes.

Il a également été montré la différenciation postnatale du RS. Chez le fœtus et à la naissance, le RS est immature et ne participe que faiblement au mécanisme de relaxation (Fisher *et al.*, 1992) et d'excitation-contraction, si bien que la contraction est principalement due au flux calcique transarcolemmal via DHPR (Chin *et al.*, 1990 ; Tanaka *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 2002). De la même façon, la mise en place des tubules transverses qui permettent le couplage fonctionnel des DHPR et des RyR, se fait tardivement et pourrait prendre entre deux et trois semaines chez le rat (Ziman *et al.*, 2009). La maturation de ces structures, que sont le RS et les tubules transverses, a probablement des conséquences importantes sur l'organisation intracellulaire du cardiomyocyte au cours de la période périnatale.

Il apparaît évident que le cardiomyocyte néonatal subit des processus de maturation importants qui ont des répercussions sur l'architecture même de cette cellule. Si un lien existe entre cette architecture cellulaire et les transferts énergétiques, notamment la canalisation directe des nucléotides adényliques entre les mitochondries et les ATPases, il est probable que ce lien puisse être mis en évidence par une étude simultanée de la maturation architecturale de la cellule cardiaque et de l'efficacité des transferts énergétiques.

II. La dynamique mitochondriale

L'hétérogénéité de la morphologie mitochondriale est connue depuis très longtemps ; le nom même de mitochondrie, évoqué la première fois par Benda en 1898, prend son origine dans la forme changeante de l'organite ; la mitochondrie peut en effet être observée sous forme de fil (*mitos* en grec) ou de grain (*chondron* en grec). Ceci provient du fait que cette organelle subit des processus de fusion (fusion de plusieurs mitochondries en une seule) et de fission (division d'une mitochondrie en plusieurs) qui modèlent en permanence le réseau mitochondrial et gouvernent la morphologie de cette organelle (pour revue voir Liesa *et al.*, 2009 ; Jazbutyte, 2010 ; Ong & Hausenloy, 2010) (Figure 24). Si les phénomènes régissant la

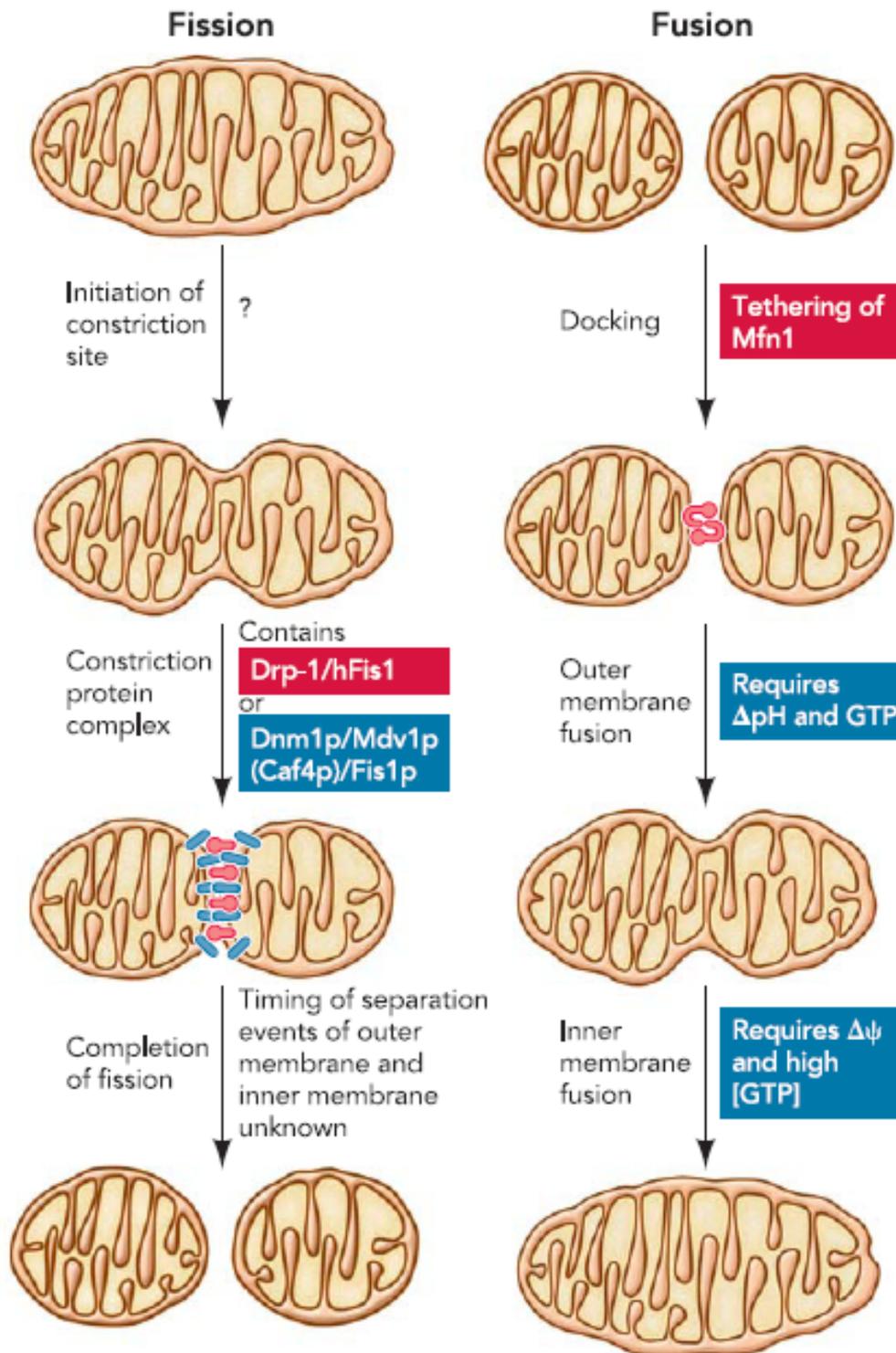


Figure 24 : La dynamique mitochondriale

Les mitochondries sont modelées par des mécanismes de fission et de fusion. *D'après*

Dimmer et al, physiology, 2006

morphologie mitochondriale ont quelque peu été laissés-pour-compte au détriment de l'étude de la fonction biochimique de la mitochondrie dans la première moitié du 20^{ème} siècle, ils suscitent un réel intérêt depuis les années 1970 durant lesquelles les premiers phénomènes de fusion ont été décrits (Kimberg & Loeb, 1972 ; Wakabayashi & Green, 1977 ; Wakabayashi *et al.*, 1975). Les connaissances mécanistiques de la dynamique mitochondriale se sont depuis bien étoffées et les principales protéines impliquées dans ces processus sont aujourd'hui bien identifiées.

A. Régulation de la fusion mitochondriale

La fusion mitochondriale est un processus durant lequel la fusion de la membrane interne et la fusion de la membrane externe se font séparément (Malka *et al.*, 2005). Ceci est la conséquence de l'implication de molécules distinctes pour chacune des membranes. La fusion de la membrane externe est ainsi régie par les mitofusines (MFN1 et MFN2) alors que celle de la membrane interne fait intervenir la protéine OPA1 (Optic Atrophy protein 1)(pour revue voir Liesa *et al.*, 2009). La spécificité d'action de ces protéines provient en partie du fait qu'elles sont enchâssées dans la membrane pour laquelle elles contrôlent le processus fusionnel. La fusion de la membrane externe et la fusion de la membrane interne ne sont pourtant pas aussi indépendantes qu'il n'y paraît. Ces deux phénomènes sont en effet parfaitement coordonnés. La fusion mitochondriale reste entourée de mystère puisque les mécanismes précis impliqués dans cette coordination ainsi que les facteurs signalant à une région particulière de la membrane mitochondriale d'initier la fusion ne sont pas encore très clairs.

1. Les mitofusines

Les gènes *Mfn1* et *Mfn2* sont les orthologues mammifères de *Drosophila Fuzzy onion* (*Fzo*) de la drosophile qui a été le premier gène dont l'implication dans la fusion mitochondriale a été rapportée (Hales & Fuller, 1997 ; Santel & Fuller, 2001). Les protéines MFN1 et MFN2, exprimées dans tous les tissus, ont une structure assez semblable ; ceci est la conséquence d'une forte homologie de séquence de leur gène respectif (60% chez l'homme (Santel & Fuller, 2001)). Elles présentent toutes les deux une partie N-terminale contenant un domaine hydrolysant le Guanosine Triphosphate (GTP) et un domaine « coiled-coil » (HR1),

ainsi qu'un segment C-terminal affichant un domaine transmembranaire permettant leur localisation à la membrane externe et un autre domaine « coiled-coil » (HR2). L'activité GTPasique du domaine N-terminal est cruciale pour la fusion des membranes. Il a en effet été montré que la mutation de ce domaine, que ce soit pour MFN1 ou MFN2 (Chen *et al.*, 2003 ; Ishihara *et al.*, 2004), conduit à un arrêt de la fusion mitochondriale. Le rôle des domaines « coiled-coil » est également de premier ordre car ils entraînent la création d'un lien physique entre les membranes externes de mitochondries voisines en permettant l'interaction des mitofusines se faisant face (Koshiba *et al.*, 2004 ; Chan, 2006). Ainsi, les mitofusines d'une mitochondrie se dimérisent avec les mitofusines d'une autre mitochondrie provoquant alors le rapprochement des deux membranes externes (Figure 25). Ces dimères peuvent être homotypiques (MFN1-MFN1 ou MFN2-MFN2) ou hétérotypiques (MFN1-MFN2) (Chen *et al.*, 2003) et leur proportion est révélatrice de l'activité fusionnelle du réseau mitochondrial de la cellule car l'activité GTPasique des mitofusines et leur affinité pour le GTP diffèrent selon la protéine (Chen *et al.*, 2003 ; Ishihara *et al.*, 2004). De plus, les dimères faisant intervenir MFN2 lient les mitochondries entre elles de façon beaucoup plus faible que lorsque l'attachement des mitochondries est réalisé par la forme homotypique MFN1-MFN1 (Ishihara *et al.*, 2004).

Ces deux mitofusines, qui ont des rôles très semblables, n'ont tout de même pas tout à fait la même fonction. Si la perte de fonction de l'une ou l'autre des deux protéines est létale, la génération de souris knock-out conditionnelles a permis de montrer que la perte d'expression de MFN1 ou MFN2 chez ces souris n'avait pas exactement les mêmes effets (Chen *et al.*, 2007). La protéine MFN2, contrairement à MFN1, est en outre impliquée dans l'interaction des mitochondries avec le réticulum endoplasmique et pourrait être à la base de la communication entre ces organelles (de Brito & Scorrano, 2008).

A ce jour, il existe peu d'informations concernant la régulation de ces deux protéines. Plusieurs protéines partenaires ayant la capacité d'interagir avec les mitofusines ont été identifiées. La mitofusin-binding protein (Mib) et Bak, une protéine régulatrice du mécanisme apoptotique, seraient ainsi capable de réprimer la fusion mitochondriale en interagissant directement avec les mitofusines (Eura *et al.*, 2006 ; Brooks *et al.*, 2007) alors que l'interaction avec MARCH-V (pour Membrane Associated RING-CH) favoriserait le mécanisme de fusion (Nakamura *et al.*, 2006). Les mitofusines interagissent également avec

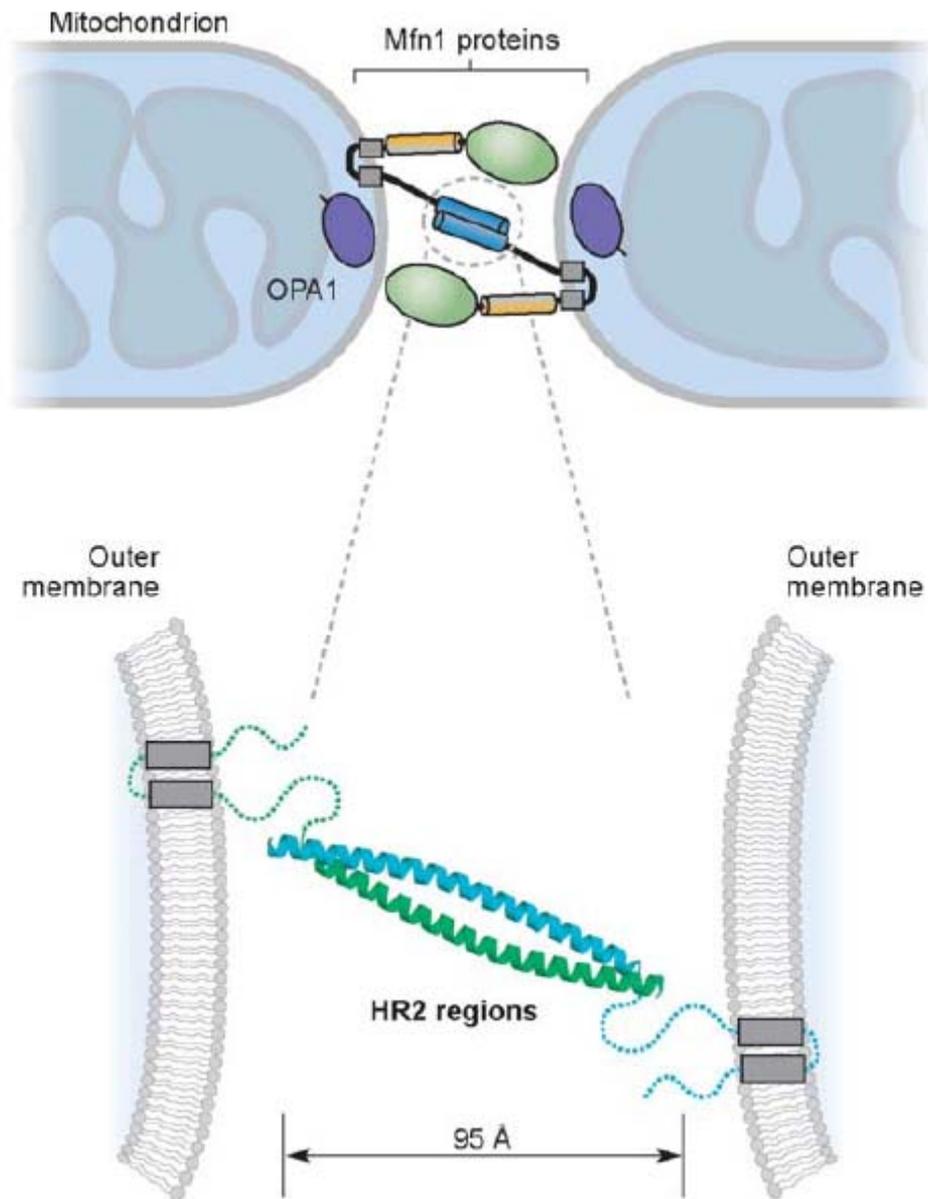


Figure 25 : Interaction des mitofusines

La dimérisation des mitofusines de deux mitochondries distinctes induit un rapprochement des deux membranes externes qui conduit à leur fusion. *D'après Chan et al, Annu Rev Cell Dev Bio, 2006.*

la protéine responsable de la fusion des membranes internes (Guillery *et al.*, 2008), OPA1, ce qui pourrait contribuer à la coordination des deux mécanismes.

2. OPA1

Le gène *Opa1*, qui a dans un premier temps été étudié pour sa responsabilité dans l'atrophie optique autosomale dominante, a été identifié comme participant à la dynamique mitochondriale par homologie avec le gène *Mgm1* gouvernant la morphologie mitochondriale chez *Saccharomyces cerevisiae* (Alexander *et al.*, 2000). Ce gène code pour la protéine OPA1, une GTPase (de 85 kDa à 100 kDa selon les isoformes), qui correspond au troisième acteur majeur de la fusion mitochondriale responsable de la fusion de la membrane interne des mitochondries. Cette protéine est présente dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie soit sous forme soluble ou sous une forme liée à la membrane interne (Akepati *et al.*, 2008). De manière intéressante, la forme soluble est détectable dans une fraction enrichie de la membrane externe de la mitochondrie, signifiant que cette forme est capable d'interagir avec les protéines de la membrane externe (Sato *et al.*, 2003). Bien que l'expression de la protéine OPA1 soit mesurable dans tous les tissus, il semble que cette expression soit plus élevée dans la rétine, le cerveau, le foie, le cœur, les muscles squelettiques et le pancréas (Alexander *et al.*, 2000 ; Delettre *et al.*, 2001).

De la même façon que les mitofusines, OPA1 est munie d'un domaine à activité GTPasique, essentiel à la fonction de fusion (Olichon *et al.*, 2007), et d'un domaine transmembranaire nécessaire à l'ancrage de la protéine à la membrane interne de la mitochondrie. Elle dispose également de deux domaines « coiled-coil » permettant l'interaction de deux protéines OPA1 qui peuvent alors former des complexes homotypiques composés de molécules OPA1 distinctes provoquant ainsi le rapprochement des membranes internes des mitochondries en fusion.

Le profil d'expression de la protéine suggère un rôle physiologique et un mécanisme d'action assez complexe. Il a été montré qu'il existe huit ARNm différents chez l'homme (Delettre *et al.*, 2001), quatre chez la souris (Akepati *et al.*, 2008), suite à un épissage alternatif du transcrit primaire. Ces modifications post-traductionnelles sont complétées par des protéolyses des différentes isoformes, qui possèdent deux sites de clivage distincts, générant ainsi des formes courtes de chacune des isoformes dépourvues du domaine transmembranaire. Ces processus de clivage impliquent des protéines spécifiques parmi

lesquelles la presilin-associated rhomboid-like protease (PARL) peut être citée (Cipolat *et al.*, 2006). Le rôle de chacune des isoformes n'est pas encore bien connu ; il est cependant clair que si les formes courtes de la protéine ne sont pas capables d'induire la fusion mitochondriale par elles-mêmes (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006), elles sont en revanche des partenaires essentiels des formes longues dans ce mécanisme (Song *et al.*, 2007) et seraient donc des acteurs de la régulation du phénomène fusionnel. La grande diversité d'isoformes d'OPA1 est en outre une des causes probables de l'aspect multifonctionnel de la protéine. La protéine est en effet impliquée dans la morphologie des crêtes mitochondriales, dans leur remodelage pendant le processus apoptotique ainsi que dans la séquestration du cytochrome c dans les crêtes indépendamment de son rôle dans la fusion mitochondriale (Arnoult *et al.*, 2005 ; Delivani & Martin, 2006 ; Frezza *et al.*, 2006 ; Yamaguchi *et al.*, 2008). Elle pourrait également intervenir dans l'élimination des mitochondries par autophagie (Twig *et al.*, 2008). Ce large panel fonctionnel permet de comprendre aisément la létalité embryonnaire d'une perte d'expression de la protéine (Alavi *et al.*, 2007 ; Davies *et al.*, 2007).

B. Régulation de la fission mitochondriale

Le processus opposé de la fusion mitochondriale qui consiste en la fragmentation d'une mitochondrie en plusieurs est communément appelé fission mitochondriale. A ce jour, les deux principales protéines ayant été identifiées comme acteur de la fission mitochondriale sont DRP1 (Dynamin-Related Protein1), encore appelée DLP1 (Dynamin Like Protein 1), et FIS1 (Fission protein 1) qui sont localisées au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. S'il existe une machinerie spécifique de la fission de la membrane interne, elle reste à être identifiée. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il a été montré que la fission de la membrane interne ferait intervenir la protéine MDM33 (Messerschmitt *et al.*, 2003); cependant aucun orthologue mammifère n'a encore été identifié. Seule une étude menée par D. Tondera (Tondera *et al.*, 2005), avance l'idée qu'une protéine mitochondriale, dénommée MTP18 (Mitochondrial Protein 18kDa), pourrait être un membre de cette machinerie méconnue de la fission de la membrane interne.

Les mécanismes gouvernant la dynamique de fragmentation, essentielle à la transmission des mitochondries aux cellules filles lors de la mitose, ont un caractère moins spécifique que ceux impliqués dans la fusion mitochondriale dans le sens où DRP1 et FIS1

sont également responsables de la fission des peroxysomes (Koch *et al.*, 2005 ; Koch *et al.*, 2003). Il semble qu'aucune étude sur la synchronisation ou la régulation conjointe de la fission de ces deux organelles n'est été réalisée. Il serait pourtant intéressant d'élucider les raisons de l'implication de ces molécules dans la fission de ces deux entités qui ne peut pas être qu'une coïncidence.

1. DRP1

Le gène Drp1 est l'orthologue mammifère de Dnm1p qui a été rapporté comme étant impliqué dans la fission mitochondriale chez la levure (Bleazard *et al.*, 1999 ; Labrousse *et al.*, 1999). L'étude de la protéine DRP1 a très rapidement bénéficié d'un grand intérêt de la part de la communauté scientifique car il a été montré que son action dans la fission mitochondriale joue un rôle essentiel dans les mécanismes apoptotiques, son inhibition diminuant la susceptibilité des cellules à entrer dans le programme de mort cellulaire (Frank *et al.*, 2001). Cette protéine, d'environ 80 kDa, présente une localisation essentiellement cytosolique (Smirnova *et al.*, 2001) et est transportée vers les mitochondries via les dynéines et les microtubules (Varadi *et al.*, 2004) ou via l'actine selon le facteur initiateur (De Vos *et al.*, 2005). Elle se localise alors spécifiquement au niveau des futurs sites de scission mitochondriaux. L'expression de la protéine est mesurable dans tous les tissus, cependant DRP1 semble être exprimée davantage dans le cerveau (Smirnova *et al.*, 1998 ; Yoon *et al.*, 1998).

DRP1 contient un domaine GTPasique, un domaine central dont la fonction n'est pas encore bien identifiée et un domaine d'assemblage, également appelé domaine GED pour GTPase Effector Domain (Smirnova *et al.*, 1998). La fonction GTPasique est essentielle au rôle de DRP1 dans la fission mitochondriale ; au cours de ce processus, la protéine DRP1 est en effet recrutée au niveau des sites de scission où l'oligomérisation de cette protéine, impliquant le domaine GED, conduit à la formation d'un anneau autour de la mitochondrie qui exerce une constriction dépendante de l'hydrolyse du GTP et divise ainsi l'organite (Yoon *et al.*, 2001; Ingerman *et al.*, 2005) (Figure 26). A la différence de l'ensemble des protéines de la dynamique mitochondriale connues, DRP1 ne présente pas de domaine permettant son intégration dans la membrane mitochondriale. Sa localisation au niveau de la membrane mitochondriale semble ainsi impliquer une interaction avec la protéine FIS1 (Yoon *et al.*, 2003). La mécanistique précise de cette interaction n'a pas encore été bien décrite. Même s'il

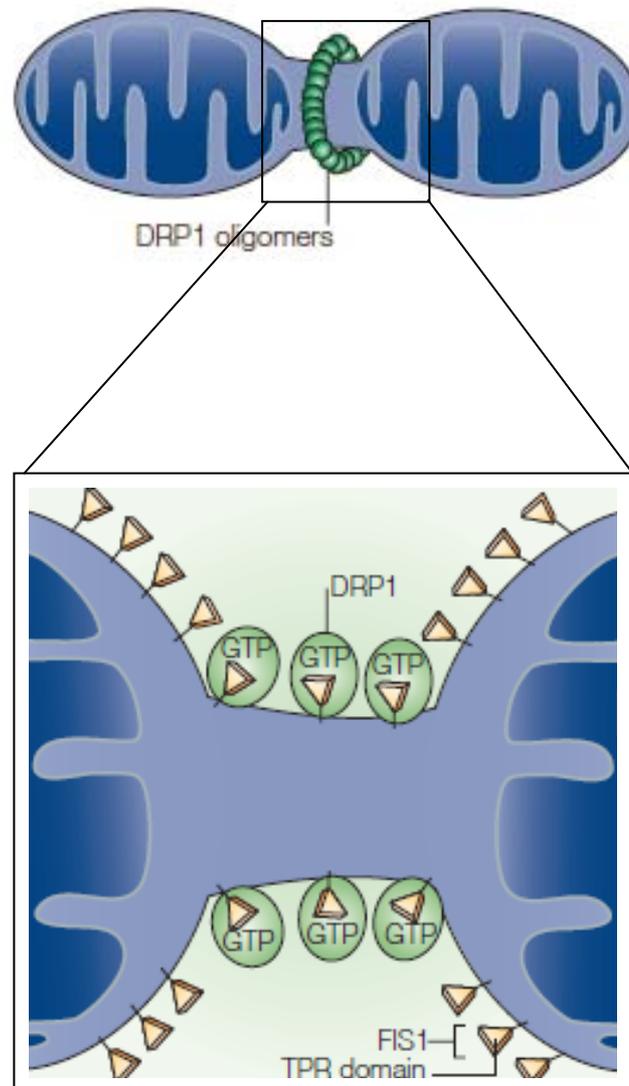


Figure 26 : La fission mitochondriale

La fission mitochondriale est régie par les molécules DRP1 et Fis1 conduisant à la formation d'un anneau qui sépare la mitochondrie mère en deux mitochondries filles. D'après *Youle & Karbowski, Nat Rev Mol Cell Biol, 2005*.

a été montré que ces deux protéines interagissent directement l'une avec l'autre (Yoon *et al.*, 2003), il se pourrait que cette interaction nécessite l'intervention de protéines adaptatrices comme c'est le cas pour leurs homologues chez la levure dont l'interaction implique plusieurs protéines telles que MDV1 et CAF4 (Tieu *et al.*, 2002 ; Griffin *et al.*, 2005) ; aucune protéine de ce genre n'a cependant été identifiée chez les mammifères à ce jour.

Des études récentes suggèrent que l'activation et la translocation de DRP1 vers la mitochondrie pourraient être régulées par des processus post-traductionnels comme la sumoylation, l'ubiquitination, la S-nitrosylation ou encore la phosphorylation de résidu sérine du domaine GED. Si la sumoylation, qui stabilise la protéine, et la S-nitrosylation sont des processus favorisant l'action fissionnelle de la protéine, il en est tout autre pour l'ubiquitination qui mène à la dégradation de la protéine (Harder *et al.*, 2004 ; Cho *et al.*, 2009). La régulation de l'activité de DRP1 par phosphorylation est plus complexe à appréhender dans la mesure où l'effet varie selon le résidu sérine phosphorylé et l'isoforme de la protéine. Il a ainsi été montré que la phosphorylation de la Ser585/616 (rat/humain) d'une isoforme longue de DRP1 par la Cyclin Dependent Kinase 1 (Cdk1/cyclinB) favorise la fission (Taguchi *et al.*, 2007) alors que la phosphorylation de la Ser656/637 par la PKA inhibe le mécanisme de fission et le processus apoptotique induits par DRP1 (Cribbs & Strack, 2007 ; Chang & Blackstone, 2007). De manière intéressante, l'activation de la PKA via la voie β -adrénergique en injectant un agoniste adrénérergique ou en faisant faire de l'exercice à des animaux conduit à une élévation de la phosphorylation de la Ser656/637 dans le cœur suggérant une régulation de DRP1 par phosphorylation dans le tissu cardiaque (Cribbs & Strack, 2007). Cette action inhibitrice de la PKA sur l'activité de la protéine peut être levée par une phosphatase particulière activée par le calcium intracellulaire, la calcineurine, qui déphosphoryle spécifiquement la Ser656/637 et entraîne la translocation de DRP1 vers la mitochondrie (Cereghetti *et al.*, 2008). Il est à noter que la phosphorylation par la Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase Ia (CAMK1 α) de la Ser600 d'une forme courte de DRP1 (correspondant à la Ser637 de la forme longue) stimule l'activité de fission de DRP1 (Han *et al.*, 2008). Outre le fait que la phosphorylation d'un résidu équivalent dans deux isoformes différentes ait des effets opposés, il est remarquable que le calcium participe à la translocation de DRP1 vers la membrane externe de la mitochondrie en activant la calcineurine et la CAMK1 α . Ceci pourrait expliquer, en partie, la fission mitochondriale observée lors de la libération de calcium contenu dans le RE au cours de l'apoptose (Breckenridge *et al.*, 2003). Cette régulation complexe de l'activité de DRP1 est intéressante

du point de vue du cardiomyocyte car le calcium et la PKA, qui semblent être au cœur de celle-ci, sont des acteurs majeurs de la signalisation de la cellule cardiaque, suggérant ainsi que l'activité fissionnelle des mitochondries est finement régulée dans le myocyte cardiaque.

2.FIS1

Le gène Fis1 a été identifié chez le mammifère en 2001 par homologie à Fis1p, son orthologue chez la levure (James *et al.*, 2003). Il code pour la protéine FIS1 (17 kDa) qui est impliquée dans la fission des mitochondries et des péroxisomes (Koch *et al.*, 2005). La localisation de cette protéine, qui est exprimée dans tous les tissus (Jofuku *et al.*, 2005 ; Stojanovski *et al.*, 2004), est très différente de celle observée pour DRP1 ; elle est principalement détectée au niveau de la mitochondrie où elle est enchâssée dans la membrane externe. L'insertion dans la membrane est rendue possible par la partie C-terminale de la protéine qui contient une hélice α , un domaine transmembranaire et une queue C-terminale exposée au milieu intermembranaire (James *et al.*, 2003 ; Yoon *et al.*, 2003 ; Stojanovski *et al.*, 2004 ; Jofuku *et al.*, 2005). Le partie N-terminale, pour sa part, est exposée au milieu intracellulaire et présente quatre régions constituées de cinq hélices α impliquées dans l'oligomérisation de FIS1 (pour la première hélice) et dans l'interaction directe ou indirecte avec DRP1 (pour l'ensemble des hélices) (Jofuku *et al.*, 2005). L'activité fissionnelle de FIS1 est complètement dépendante de ces régions puisque la perte de celles-ci conduit à une protéine non fonctionnelle.

Les mécanismes régulant la protéine FIS1 sont encore peu connus. Il semble pourtant intéressant d'approfondir les connaissances actuelles de ces régulations car il est suggéré que la protéine FIS1 pourrait être un facteur limitant de la fission mitochondriale. De plus, la protéine FIS1, tout comme DRP1, joue un rôle non négligeable dans l'initiation de l'apoptose (Lee *et al.*, 2004).

Manifestement, la morphologie des mitochondries et le profil du réseau mitochondrial sont modelés par des mécanismes mettant en jeu des acteurs protéiques hautement spécialisés et régulés. De nombreuses études ont démontré que la dérégulation d'un ou plusieurs de ces intervenants a des conséquences dommageables sur le volume individuel et l'organisation générale de l'organite. De par la forte proportion de

mitochondries dans le cardiomyocyte, il est très probable que les effets d'une telle perturbation se répercutent sur l'ensemble de la structure interne de la cellule musculaire cardiaque. Il est donc raisonnable de penser que si un lien existe entre l'architecture cellulaire et la canalisation directe des nucléotides adényliques entre les mitochondries et les ATPases, il puisse être mis à jour par une étude de l'efficacité des transferts énergétiques dans des modèles présentant une modification d'expression ou de régulation d'une protéine impliquée dans la dynamique mitochondriale.

Matériels et méthodes

Chapitre I : Modèles animaux

L'objectif de ce projet étant de mettre à jour un lien potentiel entre l'architecture hautement organisée du cardiomyocyte et l'efficacité des transferts énergétiques entre les mitochondries et les ATPases impliquées dans les mécanismes régissant la contraction cardiaque, la partie expérimentale de ce travail s'est appuyée sur plusieurs modèles susceptibles de présenter des modifications architecturales importantes. Deux types d'approche ont été privilégiés : l'une consistant à étudier conjointement l'efficacité des transferts énergétiques et la mise en place de l'architecture cellulaire, l'autre s'intéressant aux conséquences de perturbations de cette cytoarchitecture sur le transfert des molécules énergétiques entre les mitochondries et les ATPases.

I. Modèle de mise en place de l'architecture cellulaire

Chez la souris, les quelques semaines suivant la naissance correspondent à une période de transition entre la physiologie fœtale et la physiologie adulte où la cellule cardiaque subit des processus de maturation qui se caractérisent notamment par des évolutions morphologiques et architecturales. La maturation fonctionnelle des micro-domaines énergétiques ainsi que l'évolution de l'architecture cellulaire des cardiomyocytes ont été étudiées chez des souris C57BL6 de différents âges. Les âges ont été rigoureusement sélectionnés de manière à couvrir l'ensemble des phases clés du développement postnatal. Cette étude a ainsi été réalisée chez des souris de 3 jours (phase hyperplasique), 7 jours (phase intermédiaire où hyperplasie et hypertrophie coexistent), 21 jours (période où les derniers événements mitotiques sont observés), 42 jours (phases purement hypertrophiques) et enfin 63 jours (fin de croissance ou croissance du muscle cardiaque très modérée) (Shafiq *et al.*, 1968 ; Clubb & Bishop, 1984 ; Leu *et al.*, 2001).

II. Modèle de perturbations de l'architecture cellulaire

De nombreux modèles de souris présentant des perturbations importantes de l'architecture cellulaire sont actuellement disponibles ; notamment les souris ayant subi une

invalidation pour un ou plusieurs gènes codant pour des protéines associées au cytosquelette telles que la Muscle Lim Protein (MLP) ou la desmine (Wilding *et al.*, 2006). Pour la réalisation de ce travail, le choix s'est porté sur un modèle de souris ayant un déficit d'expression d'une protéine impliquée dans la dynamique mitochondriale. Cette stratégie repose sur l'hypothèse que la perte ou la diminution d'expression d'une protéine intervenant dans la dynamique mitochondriale devrait avoir des conséquences sur les mitochondries et l'organisation du réseau mitochondrial et *à fortiori* sur l'architecture globale de la cellule.

Le modèle choisi est le modèle de souris $Opa1^{enu/+}$ qui porte une mutation conduisant à la diminution d'expression de la protéine OPA1 impliquée dans la fusion de la membrane interne de la mitochondrie. Cette souris, construite par le groupe de Wissinger (Alavi *et al.*, 2007), présente une mutation conduisant au saut d'un exon (exon 10) qui résulte en la production d'un polypeptide ayant un domaine GTPasique incomplet. Cette protéine mutée est inactive et est rapidement dégradée par la voie du protéasome. Le rôle essentiel d'OPA1 dans la physiologie cellulaire n'a pas permis de développer une souris homozygote pour cette mutation puisque ce statut génotypique conduit à une mort *in utero* seulement huit jours après la fécondation. Ce modèle est donc une souris hétérozygote dont le niveau d'expression d'OPA1 est diminué d'environ 50% lorsqu'il est comparé à celui des souris non mutées provenant du même élevage. Les souris hétérozygotes présentent des atteintes du nerf optique ainsi qu'une dégénérescence progressive des cellules du ganglion rétinien qui sont symptomatiques de l'atrophie optique (ADOA) développée chez l'homme en raison de mutations du gène codant pour la protéine OPA1.

Le phénotype métabolique cardiaque de ce modèle a été caractérisé chez des animaux âgés de cinq mois. Les conséquences de la diminution d'expression de la protéine OPA1 sur la capacité de ces animaux à faire face à un stress ont été étudiées par une exploration de la fonction cardiaque de souris ayant subi la pose d'un clip aortique (stress chronique). Les souris ont ainsi été opérées à l'âge de 4 semaines pour ensuite être euthanasiées 6 semaines plus tard. Pour chacun des types de souris ($Opa1^{+/+}$ et $Opa1^{+/-}$), un groupe contrôle, appelé Sham, a été constitué avec des animaux ayant subi l'ensemble de la procédure chirurgicale à l'exception de la pose du clip aortique.

III. Hébergement et sacrifices

Tous les animaux ont été nourris *ad libitum* et hébergés dans des pièces dans lesquelles l'alternance jour/nuit de 12h/12h et une température constante de 22°C étaient imposées. Le jour du sacrifice, les animaux ont été sortis seulement quelques minutes avant le sacrifice afin d'écourter au maximum la période de stress engendrée par le changement d'environnement. Les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital (60 mg/kg) et une thoracotomie a été réalisée afin de prélever le cœur. Après un rinçage dans une solution de Krebs sans calcium à 4°C équilibrée avec un gaz composé de 95 % d'O₂ et 5 % de CO₂, l'organe a subi, en fonction de l'expérimentation postérieure, soit une canulation de l'aorte permettant une perfusion rétrograde selon la méthode de Langendorff, soit une étape de dissection. Cette dernière a consisté en l'isolement du ventricule gauche dont une partie a été immédiatement plongée dans de l'azote liquide puis conservée à -80°C pour effectuer les analyses biochimiques et moléculaires ultérieures. Le morceau de ventricule restant, pour sa part, a été immédiatement utilisé pour la préparation des fibres ventriculaires nécessaires aux études de la fonction de la mitochondrie *in situ*. Toutes les procédures d'expérimentation animale ont bien sûr été réalisées dans le respect de la réglementation relative à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire définie par la directive européenne 86/609/CEE.

Chaptire II : Etude de la fonction, de l'architecture et de l'énergétique cardiaque

Les différentes études constituant ce projet ont été réalisées en s'appuyant sur tout un panel de techniques permettant d'explorer la pompe cardiaque à différents niveaux allant de la fonction de l'organe *in vivo* à l'aspect moléculaire des processus considérés.

I. Etude de la fonction cardiaque par échocardiographie

L'exploration de la fonction cardiaque par échocardiographie a été effectuée au moyen d'une sonde spécifiquement dédiée aux petits animaux (Vivid 7, 12MHz, General Electric Healthcare). Ce genre de mesure nécessite, chez le rongeur, une anesthésie préalable de l'animal puisqu'il est très difficile, voire impossible, de manipuler correctement une souris vigile. L'anesthésie a été réalisée par inhalation d'un gaz d'isoflurane 2,5% de manière à obtenir une anesthésie très légère pour minimiser les effets, tels que la diminution de la fréquence cardiaque, que pourraient avoir le processus anesthésique sur la fonction cardiaque. Le dispositif utilisé a permis d'obtenir des images en deux dimensions à partir desquelles le diamètre de la cavité du ventricule gauche (en diastole (Dtd) et en systole(Dts)), l'épaisseur pariétale postérieure (PP) et intraventriculaire (SIV) ainsi que la fréquence cardiaque ont pu être déterminés. Ces données brutes ont également été utilisées afin de déterminer les paramètres de la contraction du myocarde, à savoir : la fraction de raccourcissement ($FR = [(Dtd-Dts)/Dtd] \times 100$), les volumes télédiastolique (Vtd) et télésystolique (Vts) (en ayant recours à la formule de Teicholz ($Vtd = 7 Dtd^3 / (2,4 + Dtd)$)) et la fraction d'éjection ($FE = [(Vtd-Vts)/Vtd] \times 100$).

II. Etude de l'architecture cellulaire et du réseau mitochondrial.

La nature même du projet a nécessité le recours à des techniques permettant de détailler l'organisation structurale intracellulaire des cardiomyocytes des différents modèles utilisés. L'architecture de la cellule musculaire cardiaque ainsi que le profil de son réseau mitochondrial ont essentiellement été étudiés par des techniques de microscopie qui

permettent une observation de la cellule cardiaque dans son intimité, de rendre compte de l'arrangement des organelles et également d'accéder à des informations telles que la morphologie, le nombre et le volume des mitochondries.

A. Microscopie électronique à transmission

L'architecture de la cellule musculaire cardiaque, c'est-à-dire l'arrangement des différentes structures internes au sein de la cellule, a été observée par microscopie électronique à transmission. Cette technique pourtant mise au point par Ruska et Knoll dans les années 1930 n'en reste pas moins l'une des méthodes les plus puissantes pour observer l'ultrastructure cellulaire. Elle est basée sur l'utilisation d'un faisceau d'électrons à haute tension qui en passant au travers d'un échantillon perd des électrons et permet alors la constitution d'une image. Un microscope électronique à transmission (MET) présente ainsi un pouvoir de résolution beaucoup plus important (de l'ordre de l'Angstrom) qu'un microscope optique et permet d'obtenir des images avec un grossissement beaucoup plus grand.

1. Préparation et observation des échantillons

L'observation des échantillons par microscopie électronique nécessite une première étape de fixation des tissus qui a été initiée par perfusion rétrograde du muscle cardiaque selon la méthode de Langendorff. Le myocarde a ainsi été perfusé pendant 5 minutes avec une solution de Krebs sans calcium à 4°C équilibrée avec un gaz composé de 95 % d'O₂ et 5 % de CO₂, puis la solution saline a été remplacée par une solution fixant les protéines (en mM : Na-Cacodylate 150, HCl 3.6, MgCl₂ 2, EGTA 1, Glutaraldéhyde 2 % ; pH : 7,3). Le myocarde a été perfusé pendant 5 minutes avec cette solution avant d'être retiré de la canule pour être plongé dans cette même solution de fixation durant 45 minutes. Les muscles papillaires ainsi qu'une partie superficielle de la paroi interne du ventricule gauche ont ensuite été isolés et traités de nouveau 45 minutes dans la solution de fixation. Après avoir été rincées une dizaine de fois dans une solution exempte de glutaraldéhyde (en mM : Na-Cacodylate 150, HCl 3.6, MgCl₂ 2, EGTA 1 ; pH : 7,3) pendant 10 minutes, ces pièces de tissus ont été traitées 45 minutes avec une solution d'Osmium permettant la fixation des lipides membranaires (en mM : Na-Cacodylate 150, HCl 3.6, MgCl₂ 2, EGTA 1, Osmium 1 % ; pH : 7,3). Consécutivement à un lavage à l'eau distillée de 10 minutes, les tissus ont été traités toute la

nuit avec une solution saturée d'acétate d'uranyle, indispensable pour obtenir un bon contraste des membranes. Les échantillons ont ensuite été déshydratés au moyen de bains d'alcool à concentration croissante puis de bains d'acétone avant d'être plongés dans un mélange d'acétone et de durcupan durant une heure. Les pièces de tissus ont enfin été disposées selon l'orientation choisie (longitudinale ou transversale) pour être inclus dans du durcupan qui polymérise pour constituer un bloc.

La réalisation des coupes ultrafines a été réalisée au moyen d'un ultramicrotome équipé d'un couteau de diamant qui, à partir des blocs, produit des tranches de tissus d'une épaisseur comprise entre 60 et 90 nm. Après avoir été préalablement traitées au citrate de plomb, les coupes ont été insérées dans la chambre du MET (JEM 1200) afin d'y être observées avec des grossissements variant de x 4000 à x 100000.

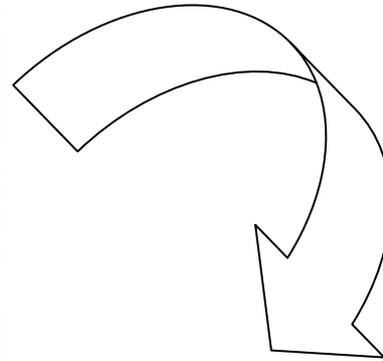
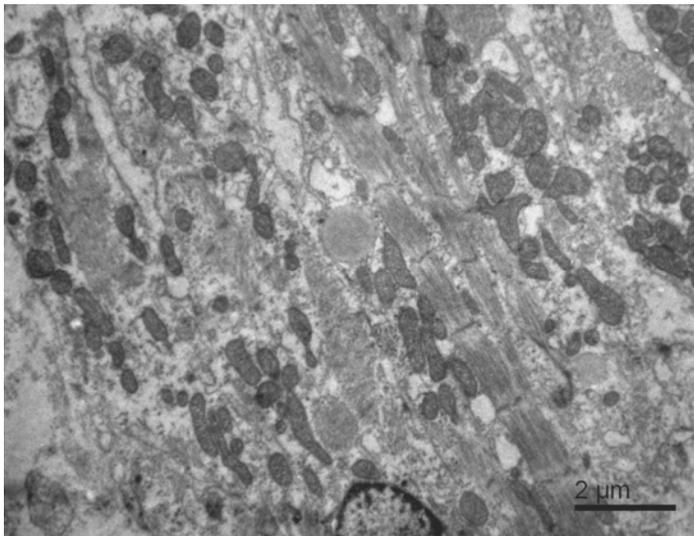
2. Analyse stéréologique des échantillons

La quantification des volumes occupés par les différents constituants cellulaires (mitochondries, myofilaments, cytoplasme et gouttelettes lipidiques) pour chacune des coupes observées a été réalisée par analyse stéréologique. La stéréologie correspond à un ensemble de techniques largement étudiées dans les années 1960-1970 (Weibel et al, 1967 ; Eisenberg et al, 1974) qui permet de faire des évaluations quantitatives des structures en trois dimensions à partir d'observations effectuées sur des sections en deux dimensions.

Pour chaque groupe d'animaux, l'estimation du volume des différentes structures a été effectuée au moyen de deux sections bien distinctes de chaque bloc de tissu à partir desquelles cinq images (grossissement 7500x) ont été analysées. L'opération ayant été faite en utilisant deux blocs (deux cœurs) pour chacun des groupes, vingt images par type de souris ont donc été analysées. L'analyse a consisté en la superposition d'une grille sur les images dans laquelle les intersections des lignes définissaient des points échantillons (Figure 27). La moyenne des pourcentages de points superposant les différentes structures a ainsi permis de déterminer les propriétés du volume tissulaire des différentes catégories d'animaux.

B. Microscopie confocale

Une caractérisation plus précise de la mitochondrie et de son organisation cellulaire a été permise par une observation des cellules cardiaques par microscopie confocale qui a



Les intersections des lignes définissent des points échantillons. Le nombre de points superposant les différentes structures est alors comptabilisé.

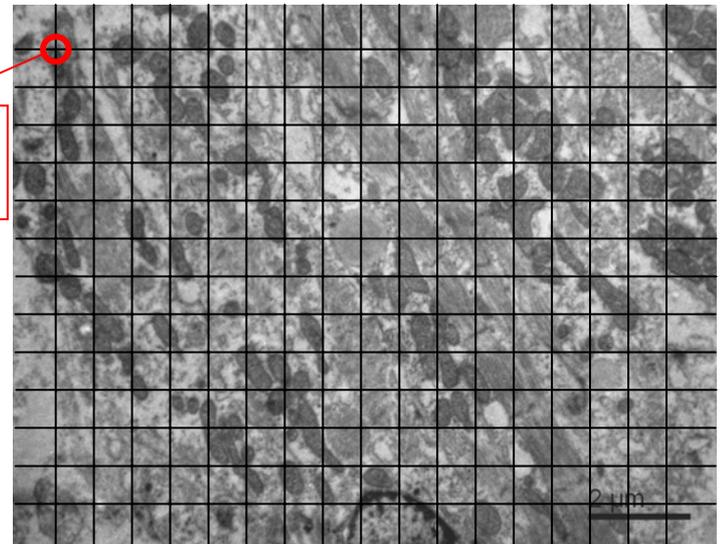


Figure 27 : Analyse morphométrique des images obtenues par microscopie électronique.

Une grille standard est superposée sur les photos de coupes de ventricule gauche de souris (souris de 3 jours dans cet exemple) de manière à quantifier les structures internes des cardiomyocytes.

donné accès à des informations telles que le volume moyen des mitochondries, le volume cellulaire total occupé par l'organite ou encore des détails sur la sphéricité de ces structures intracellulaires. Cette technique de microscopie optique, qui a connu un véritable essor depuis les années 1980, permet de réaliser des images présentant une très faible profondeur de champ. Le fait de déplacer le plan focal de l'objectif dans les différents niveaux de profondeur de l'échantillon permet l'enregistrement de toute une série d'images qui conduit à la reconstruction, par un ordinateur, d'une image en trois dimensions.

1. Préparation et observation des cellules

L'observation des structures internes par microscopie confocale, et tout particulièrement du réseau mitochondrial, nécessite l'isolation des cardiomyocytes. Celle-ci a été réalisée par perfusion rétrograde du cœur par la méthode de Langendorff avec une solution tampon à 37° C (en mM : NaCl 113, Taurine 30, Glucose 20, HEPES 10, BDM 10, KCl 4,7, Na HCO₃ 1,6, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 0,6, NaH₂PO₄ 0,6 ; pH : 7,4) pendant 5 minutes. La libérase (0,042 mg/ml ; Liberase TM Research Grade, Roche) a alors été ajoutée à cette solution pour digérer la matrice extracellulaire durant 7 à 10 minutes selon les cœurs. L'organe a ensuite été retiré de la canule de manière à pouvoir séparer les oreillettes et les ventricules. Après un découpage minutieux des ventricules en petits morceaux, les cellules ont été libérées du tissu au moyen d'une pipette rodée qui permet d'aspirer et de refouler délicatement le tissu. Les cellules libérées ont alors été filtrées et récupérées dans une solution identique à la solution tampon utilisée pour la perfusion à la différence que la concentration en calcium de cette solution de récupération est progressivement augmentée (jusqu'à 1 mM) de manière à réaliser une « remontée calcique ». Les cellules ont enfin été réparties dans des boîtes avec un fond de verre recouvert de laminine, nécessaire à l'adhésion cellulaire, et conservées à température ambiante durant 2 heures. Ces cardiomyocytes ont ensuite été mis pendant 45 minutes en présence de sondes fluorescentes : une marquant spécifiquement les mitochondries (Mito-Tracker Orange (500 nM)) et une autre se répartissant dans l'ensemble du cytoplasme et des mitochondries (calcéine (1μM)). Après un lavage avec la solution tampon, la fluorescence a été observée à l'aide d'un microscope confocal Carl Zeiss LSM-510. Mito-Tracker Orange et la calcéine ont respectivement été excitée à une longueur d'onde de 568nm et 488nm et leur fluorescence a été récupérée à une longueur d'onde de 570nm et 515-530nm.

2. Analyse morphologique du réseau mitochondrial

Après la reconstruction en trois dimensions des cellules à partir d'une série d'images de chacune des cellules, les données ont été importées et déconvolutionnées à l'aide du logiciel Autoquant X (MediaCybernetics, Bethesda, MD). Les images ainsi traitées ont alors pu être analysées par le logiciel IMARIS (Bitplane Company, Zurich) qui, grâce à une fonction qui permet la reconnaissance d'objets, est capable de reconnaître chacune des mitochondries de la cellule analysée et d'en donner les caractéristiques telles que le volume individuel de chacune des mitochondries, leur volume moyen, leur sphéricité ainsi que le volume mitochondrial global et le volume cellulaire. Les informations délivrées par ce logiciel présente un réel atout puisqu'elles permettent de faire des tests statistiques sur l'ensemble de la population mitochondriale de la cellule.

III. Etude de la fonction mitochondriale

Les études menées au cours de ce projet ont nécessité une analyse de la fonction mitochondriale des différents modèles utilisés. Cet examen approfondi des propriétés de l'organite s'est appuyé sur différentes approches, à savoir la mesure des capacités oxydatives mitochondriales, les propriétés d'ouverture du PTP ainsi que la détermination de l'activité d'enzymes spécifiques de la mitochondrie.

A. Mesure des capacités oxydatives des mitochondries

L'évaluation de la fonction de la chaîne respiratoire des mitochondries a été réalisée au moyen de la technique des fibres cardiaques perméabilisées mise au point en 1987 par Vladimir Veksler et ses collègues (Veksler *et al.*, 1987). Cette méthode repose sur le traitement des fibres cardiaques avec la saponine qui est un détergent perforant sélectivement le sarcolemme, tout en laissant les membranes des structures internes (mitochondries, RS...) intactes, en raison de sa forte affinité pour le cholestérol. Cette perméabilisation permet à des substrats exogènes de pénétrer dans la cellule et de stimuler les mitochondries dont la fonction est évaluée par la mesure de la consommation de dioxygène reflétant les capacités oxydatives de l'organite.

1. Préparation des fibres perméabilisées

Immédiatement après le sacrifice et le rinçage du cœur, le ventricule gauche a été isolé et transféré dans une solution dite relaxante ((en mM) : EGTA (10), CaCO₃ (2,77), KOH (70), imidazole (20), Mg²⁺ libre (1), taurine (20), dithiothréitol (0,5), MgATP (5,7), phosphocreatine (15), potassium-methasulfonate (50) ; pH : 7,1). Les fibres ont alors été délicatement disséquées de manière à obtenir de petits amas de fibres de 100 à 200 µm de diamètre avant d'être mises en présence de saponine (50µg/ml dans la solution relaxante) pendant 30 minutes à 4°C sous agitation pour une perméabilisation optimale des membranes plasmiques. Un lavage de 10 minutes à 4°C avec la solution relaxante exempte de saponine a permis l'élimination du détergent. Les fibres ont alors été conservées, jusqu'au moment de l'expérimentation, dans cette solution qui, de part sa composition, permet le maintien des fonctions cellulaires.

2. Mesure de la respiration mitochondriale

Dix minutes avant les protocoles de mesure de la respiration mitochondriale, les fibres ont été lavées dans une solution de respiration ((en mM) : EGTA (10), CaCO₃ (2,77), KOH (110), NaOH (10), K₂HPO₄ (3), imidazole (20), Mg²⁺ libre (1), taurine (20), dithiothréitol (0,5), glutamate (10), malate (4), phosphocreatine (15), potassium-methasulfonate (100) ; pH : 7,1..) supplémentée de 2mg/ml de BSA (Bovin Serum Albumin) pour éliminer l'ATP présent dans la solution de relaxation. Les fibres ont ensuite été déposées dans les chambres de respiration contenant 3 ml de cette même solution de respiration contenant de la BSA ainsi que du glutamate et du malate constituant une source d'équivalents réduits (NADH) capable d'initier le transfert d'électrons depuis le complexe I de la chaîne respiratoire. La consommation d'oxygène des fibres contenues dans les chambres a alors été mesurée sous agitation à 22°C par une électrode à oxygène reliée à une interface Oxygen Interface Model 928 (Strahtkelvin Instruments) qui transmet l'information à un ordinateur équipé du logiciel Strahtkelvin 928 System permettant l'enregistrement des données générées (Figure 28).

a. Mesure des capacités oxydatives

Le premier protocole utilisé a spécialement été élaboré pour évaluer les capacités oxydatives des mitochondries des différents modèles animaux ainsi que leur régulation par l'ADP. Après avoir mesuré la diminution de la concentration de dioxygène dans les chambres



Interface 928, Strathkelvin Instruments

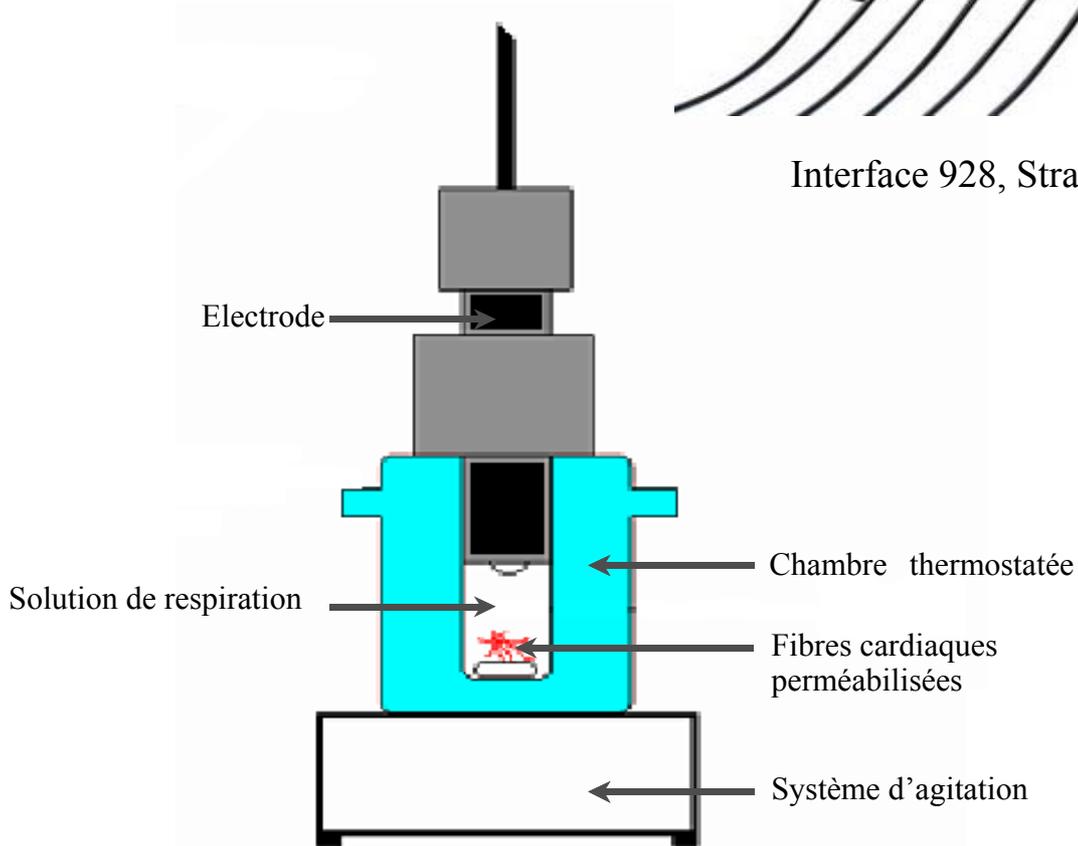


Figure 28 : dispositif de mesure de la respiration mitochondriale

en l'absence de fibres, qui reflète la consommation de dioxygène par la membrane de téflon de l'électrode (V_i), la vitesse basale de consommation du dioxygène des fibres (V_0), c'est-à-dire sans ADP exogène dans le milieu réactionnel, a été enregistrée. Cette mesure des paramètres initiaux a été suivie de l'ajout, à intervalle régulier (toutes les 5 minutes), de concentrations croissantes d'ADP jusqu'à une concentration saturante (2mM) pour laquelle la vitesse maximale (V_{max}) de la consommation de dioxygène a été observée (Figure 29).

Une variante de ce protocole consistant à ajouter 20 mM de créatine (Cr) dans le milieu réactionnel avant même de déposer les fibres dans les chambres de respiration a été utilisée (Figure 29). Si celle-ci n'apporte pas d'informations supplémentaires sur les capacités oxydatives des mitochondries, elle revêt cependant un réel intérêt dans le sens où elle permet d'explorer la fonction de la mi-CK. L'ajout de créatine stimule en effet la mi-CK qui transfère alors le groupement phosphate de l'ATP néoformé sur la créatine. Il en résulte, en retour, une production locale d'ADP au voisinage de l'ANT qui active d'autant plus la respiration mitochondriale. Cette variante expérimentale permet ainsi d'examiner l'efficacité du couplage entre la phosphorylation oxydative et l'activité de la mi-CK dans les différents modèles considérés.

b. Mesure de l'activité des différents complexes

Le second protocole utilisé au cours de l'étude des propriétés intrinsèques des mitochondries a été élaboré dans le but d'estimer l'activité des différents complexes (I, II et IV) de la chaîne respiratoire au moyen d'activateurs et d'inhibiteurs spécifiques de chacun des complexes (Figure 30).

Les conditions finales du précédent protocole répondant en tout point à l'activité maximale du complexe I (à 2mM d'ADP), le deuxième protocole a été réalisé sur les mêmes fibres et directement à la suite de celui-ci. Ainsi, un ajout de 10 mM de succinate (concentration saturante), conduisant à la production de $FADH_2$ qui est oxydé par le complexe II, a permis de mesurer l'activité simultanée du complexe I et du complexe II. Un inhibiteur spécifique du complexe I, l'amobarbital également appelé amytal (1 mM), a ensuite été utilisé pour déterminer l'activité individuelle du complexe II. Concernant le complexe IV, son activité n'ayant de commune mesure avec l'activité des autres complexes, elle peut être mesurée sans passer par l'inhibition des complexes II et III. L'activité maximale de ce complexe IV a ainsi été mesurée après l'ajout de 0,5 mM de tétraméthyl-p-phénylènediamine (TMPD) supplémenté de 0,5 mM d'acide ascorbique pour éviter l'auto-oxydation du TMPD

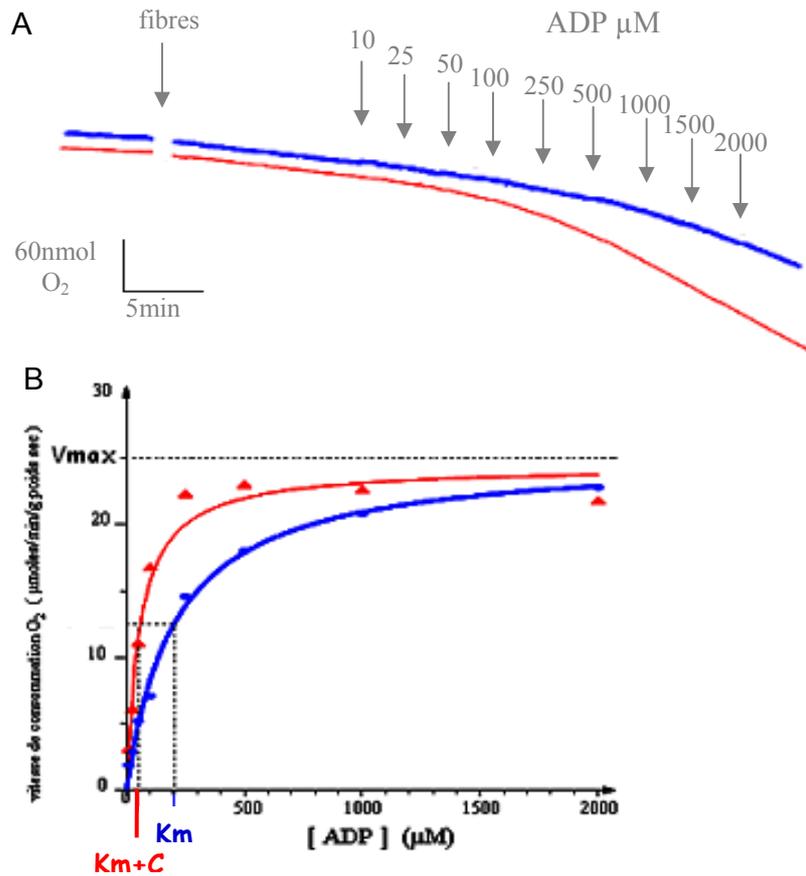


Figure 29 : Protocole de mesure des capacités oxydatives des mitochondries

Les capacités oxydatives des mitochondries sont estimées en ajoutant des concentrations croissantes d'ADP en l'absence (courbe bleue) et en la présence (courbe rouge) de créatine dans le milieu de respirations

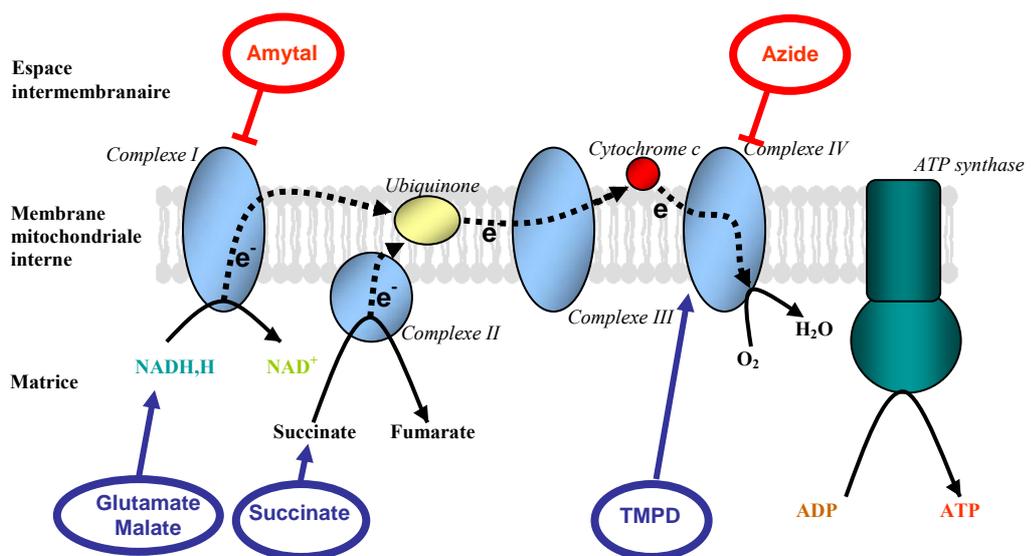


Figure 30 : Protocole d'étude de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire

ainsi que de 1 μ M de carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), un découplant, afin de pallier à tout biais pouvant être dû à une limitation de l'activité de l'ATP synthase. La fin du protocole expérimental a été signée par l'ajout d'azide de sodium dans les chambres qui inhibe sélectivement le complexe IV. L'activité réelle du complexe IV a ainsi pu être déterminée par le calcul de la différence entre les vitesses de consommation de dioxygène mesurée avant et après l'ajout de cet inhibiteur.

3. Analyse des données

A la fin du second protocole de respiration, les fibres ont été minutieusement récupérées afin d'être séchées sous vide à 75°C et pesées. Cette étape nécessaire et critique permet en effet une normalisation de toutes les vitesses mesurées (à l'aide du logiciel Strahtkelvin 928 System) au poids de tissu sec.

Si l'activité des différents complexes a directement été déduite des valeurs de vitesse de consommation de dioxygène mesurées avec le logiciel d'analyse, les données générées par le premier protocole ont subi un traitement supplémentaire avec un logiciel créé au laboratoire. Celui-ci a en effet permis de déterminer la V_0 , la V_{max} et le K_m (constante de Michaëlis) en l'absence ou présence de créatine, en faisant une extrapolation de la courbe dose-réponse de l'ADP à partir des vitesses de consommation de dioxygène mesurées et des concentrations d'ADP correspondantes.

B. Etude de l'ouverture du PTP

Concernant l'étude réalisée sur les souris présentant un déficit d'expression de la protéine OPA1, l'ouverture du PTP en réponse au calcium, étant considérée comme un index de la susceptibilité des mitochondries à engendrer l'apoptose, a été examinée.

Pour se faire, des cardiomyocytes de souris Opa1^{+/-} et Opa1^{+/+} fraîchement isolés ont été chargés avec 5 μ M Rhod-2 et 1 μ M calcéine pendant 45 minutes à température ambiante, avant d'être lavés avec la solution tampon précédemment décrite dans le protocole d'isolation des cellules. Ces cardiomyocytes ont ensuite été perméabilisées avec de la saponine (50 μ g.ml⁻¹) pendant 3 min puis lavés dans la solution relaxante décrite dans le protocole de préparation des fibres perméabilisées pendant 5 minutes. La fluorescence des sondes Rhod-2 et calcéine a alors été suivie après l'addition de Ca²⁺ (2 μ M). Les sondes Rhod-2 et calcéine ont été

respectivement excitées par un laser argon/krypton à une longueur d'onde de 568nm et 488 nm. Les émissions correspondantes ont, pour leur part, été récupérées au moyen de filtre permettant de récupérer la fluorescence aux longueurs d'onde de 570 nm et de 515-530 nm respectivement. Un troisième groupe de cellules a été perfusé avec 1µM de Cyclosporine A, un inhibiteur spécifique du PTP, pour vérifier la spécificité de l'ouverture du PTP. Les courbes de la fluorescence de Rhod-2 et de la calcéïne en fonction du temps ont été analysées dans Excel pour déterminer le temps auquel le PTP commence à s'ouvrir (t open) et le taux de diminution de fluorescence à partir de ce point (slope open). Ces deux paramètres sont révélateurs du comportement du PTP.

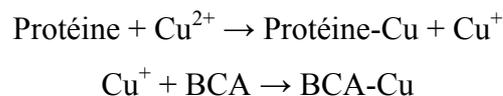
C. Mesure d'activité enzymatique

La fonction des mitochondries a également été approchée par la mesure de l'activité d'enzymes mitochondriales. Au cours de ce travail, trois enzymes ont été étudiées : le complexe I, le complexe IV et la citrate synthase (CS).

1. Extraction et dosage des protéines.

La mesure d'activité enzymatique a nécessité l'extraction des protéines contenues dans les tissus ventriculaires prélevés lors du sacrifice des animaux. Environ 30 mg de tissu pour 1 ml de tampon d'homogénéisation à 4°C (en mM : HEPES 5, EGTA 1, DTT 1, TritonX100 0,1% ; pH = 8,7) ont donc été homogénéisés au moyen d'un micro-broyeur Precellys 24 (Bertin, France).

La concentration protéique des solutions obtenues après l'étape de broyage a ensuite été mesurée par une méthode de colorimétrie utilisant la réduction, en milieu alcalin à 60°C, de l'ion Cu^{2+} en ion Cu^+ par les protéines, suivie de la formation d'un complexe avec l'acide bicinchoninique (BCA-Cu) présentant une absorbance à 560 nm.

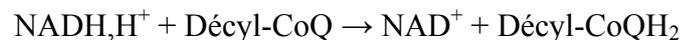


Cette mesure d'absorbance a également été faite sur une gamme connue de concentrations de BSA ayant subi les mêmes réactions colorimétriques, permettant ainsi la quantification précise de la concentration de protéines des différents échantillons.

2. Dosages enzymatiques

a. Le complexe I

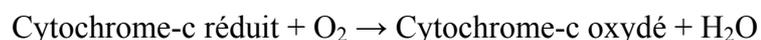
Le complexe I de la chaîne respiratoire est responsable de l'oxydation du NADH en NAD^+ . Par conséquent, son activité a été dosée en suivant, pendant 3 minutes, la disparition du NADH dont l'absorbance à 340 nm en fait un parfait rapporteur des processus réactionnels. L'accepteur d'électrons naturel du complexe I, l'ubiquinone aussi appelée Coenzyme Q_{10} , a été remplacé par la décylubiquinone (ou le décyl-Coenzyme Q_{10}) qui est beaucoup plus hydrophile et facilite ainsi le dosage qui a été réalisé en milieu aqueux dans un tampon phosphate 50 mM à 30°C contenant 3,75mg/ml de BSA, 100 μM de NADH et 100 μM de décylubiquinone (pH 7,5).



Etant donné que les extraits protéiques contiennent l'ensemble des protéines exprimées par le tissu, l'oxydation du NADH n'est pas exclusivement réalisée par le complexe I dans ces conditions expérimentales. Il existe en effet d'autres protéines, et notamment le cytochrome b_5 oxydoréductase, capable d'oxyder le NADH. C'est pourquoi une mesure de la consommation du NADH en présence de roténone (un inhibiteur spécifique du complexe I) a été réalisée en parallèle. L'activité du complexe I a ainsi pu être calculée puisqu'elle représente la partie sensible à la roténone de l'activité NADH oxydase totale.

b. Le complexe IV

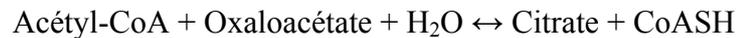
Le complexe IV, ou cytochrome-c oxydase (COX), est responsable de l'oxydation du cytochrome-c préalablement réduit par le complexe III (cytochrome-c réductase). Son activité est dosée dans un tampon phosphate 50 mM (pH 7,4) contenant 50 μM de cytochrome-c réduit à 90% (par ajout de dithionite de sodium) à 30°C.



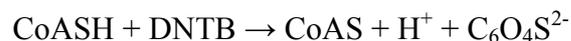
Le cytochrome-c n'ayant pas le même spectre d'absorption à l'état réduit et l'état oxydé, la disparition de la forme réduite, révélatrice de l'activité de la COX, est suivie pendant 3 minutes à 550 nm.

c. La citrate synthase

La CS est une enzyme impliquée dans le cycle de Krebs qui est traditionnellement utilisée pour estimer la masse mitochondriale car son activité est révélatrice de la quantité de mitochondries fonctionnelles dans le tissu. Elle catalyse la réaction de condensation de l'acétyl-CoA, obtenu à partir des réactions cataboliques des sucres et des acides gras, et de l'oxaloacétate pour former l'acide citrique (ou citrate).



De la même manière que pour la mesure de l'activité des complexes, le dosage a été réalisé au moyen de méthodes spectrophotométriques. La réaction précédemment décrite ne permet cependant pas de mesurer directement la disparition ou l'apparition d'un des composants engagés dans la réaction. C'est pourquoi du DNTB (5,5'-ditiobis-(2-Nitrobenzoic acid) a été ajouté dans le milieu réactionnel. L'interaction de ce composé avec le CoaSH formé par la réaction régie par CS conduit à la formation de l'ion mercaptique ($\text{C}_6\text{O}_4\text{S}^{2-}$) qui présente un spectre d'absorption à une longueur d'onde de 412 nm.



Le dosage de l'activité de la CS a ainsi été effectué en suivant l'apparition de l'ion mercaptique dans le milieu réactionnel pendant 3 minutes à 30°C.

d. Analyse des données de spectrophotométrie

La méthode de quantification par spectrophotométrie se base sur la loi de Beer Lambert selon laquelle l'absorbance d'une solution, à une longueur d'onde donnée, est proportionnelle à la concentration des substances en solution capables d'absorber les rayons lumineux à cette longueur d'onde. L'évolution de la Densité Optique (DO) de chacun des échantillons au cours d'un protocole donné est donc proportionnellement liée à l'apparition ou

la disparation de la molécule absorbante. Ceci permet ainsi le calcul de l'activité de l'enzyme (AE) considérée avec la formule suivante : $AE = ((DO_{finale} - DO_{initiale}).F)/(\epsilon.L.\Delta t)$ où F correspond au facteur de dilution de l'échantillon, ϵ à l'absorptivité molaire de la molécule absorbante ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$) ($\epsilon_{NADH} = 6220$; $\epsilon_{Cyt-c\text{ réduit}} = 18500$; $\epsilon_{C6O4S2} = 13600$), L à la longueur de la cuve (1 cm) et Δt au temps de mesure. Cette activité a enfin été rapportée à la concentration protéique des échantillons de manière à être exprimée en $\mu M.min^{-1}$ par gramme de protéines.

IV. Etude des transferts énergétiques

Le but du projet étant de corréler l'organisation architecturale et l'efficacité des transferts énergétiques, des techniques permettant de mesurer la capacité des différents acteurs à approvisionner les ATPases en énergie ont été utilisées. Ces mesures ont été réalisées à partir de fibres perméabilisées à la saponine qui ont été montées sur un dispositif capable de mesurer la tension développée par celles-ci (Figure 31). Il est à noter que les fibres perméabilisées ont été préparées, selon la méthode décrite précédemment, dans une solution relaxante contenant (en mM) : EGTA (10), BES (60), Mg^{2+} libre (1), taurine (20), acide glutamique (10), acide malique (4), K_2HPO_4 (3), dithiothréitol (0,5), MgATP (3,16), phosphocreatine (12) ainsi que du potassium-methasulfonate permettant d'ajuster la force ionique à 160 mmol.L^{-1} et 6% de dextran assurant le maintien du volume cellulaire. Deux protocoles différents ont été élaborés afin d'estimer l'efficacité des transferts d'énergie au niveau de SERCA et de l'ATPase de la myosine.

A. Etude des transferts énergétiques au voisinage de SERCA

La contribution des différents systèmes énergétiques approvisionnant SERCA a été estimée en mesurant la quantité de calcium contenu dans le RS des fibres perméabilisées après une charge induite sous différentes conditions énergétiques (Minajeva *et al.*, 1996 ; Wilding *et al.*, 2006).

La charge calcique du RS a ainsi été effectuée en plongeant les fibres, pendant 5 minutes, dans des solutions à pCa 6,5 contenant de l'ATP et capables ou non, selon les conditions, d'activer la production d'énergie par les mitochondries et/ou par les CK liées près de SERCA. L'estimation de la quantité de calcium contenu dans le RS a ensuite été réalisée

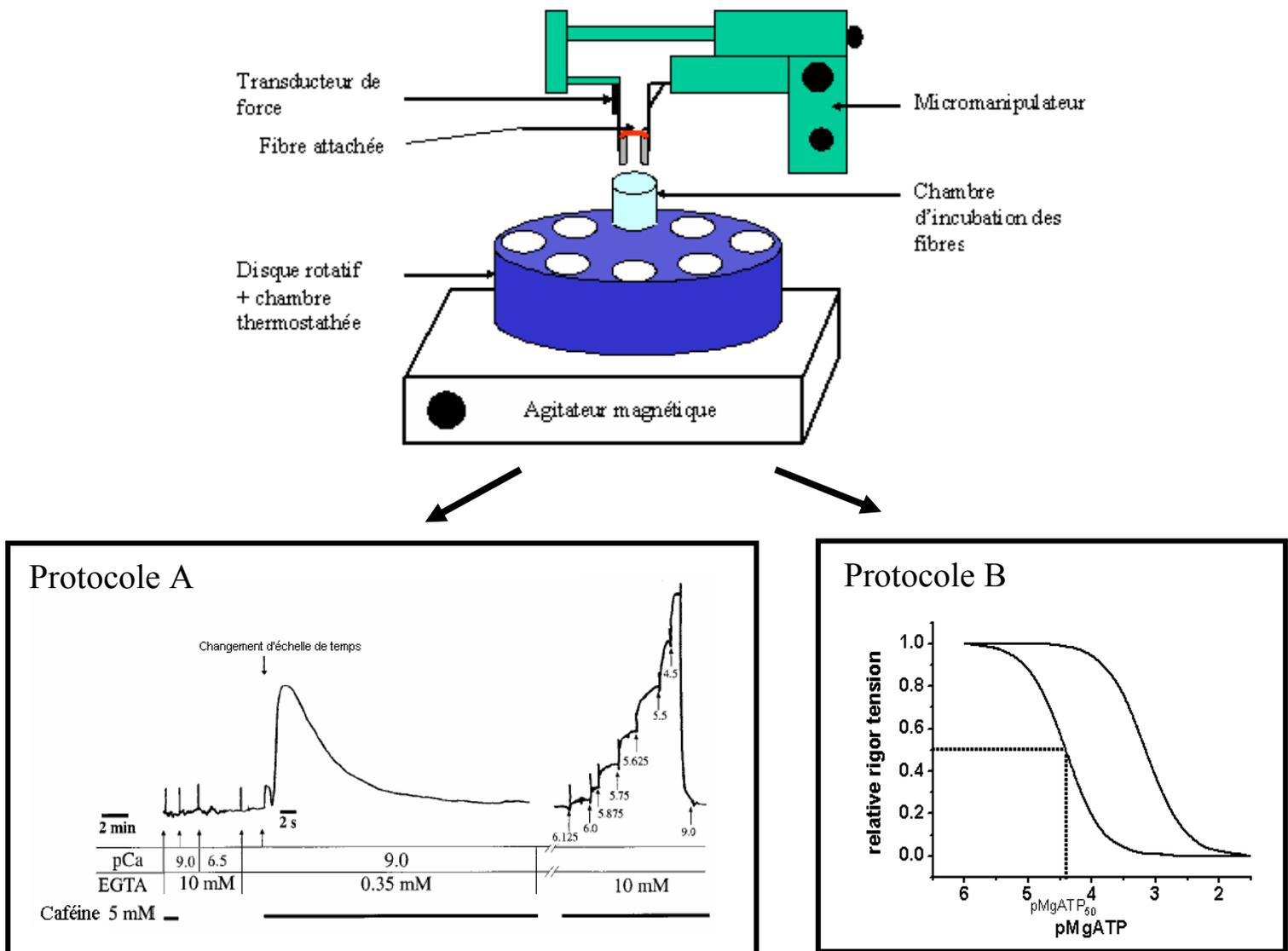


Figure 31 : Dispositif de mesure de tension des fibres perméabilisées

La fibre ventriculaire cardiaque perméabilisée est attachée à un crochet d'un côté et à un transducteur de force de l'autre côté de manière à mesurer sa tension. Ce dispositif permet de réaliser les protocoles permettant d'estimer l'approvisionnement des ATPases du RS (Protocole A) et des myofilaments (Protocole B) par les différents systèmes de transfert énergétique.

en utilisant une solution à laquelle 5 mM de caféine ont préalablement été ajoutés conduisant ainsi au développement, par les fibres, d'une force proportionnelle à la quantité de calcium libérée par le RS. En fin de protocole, la sensibilité au calcium de chacune des fibres a été déterminée en mesurant la force (ou tension) que celles-ci développent au cours d'une augmentation progressive de la concentration de calcium libre dans la solution (Figure 31, protocole A). La relation entre la force produite et la pCa ($-\log_{10} [\text{Ca}^{2+}]$) est régie par l'équation de Hill suivante $T = [\text{Ca}^{2+}]^{n_H} / (K + [\text{Ca}^{2+}]^{n_H})$, où T est la tension relative (exprimée en pourcentage de la tension maximale mesurée à pCa 4,5), K une constante et n_H le coefficient de Hill. La détermination de l'ensemble de ces paramètres a ainsi permis de définir avec précision la quantité de calcium libérée et, par conséquent, stockée dans le RS, pour l'ensemble des tensions mesurées. Celle-ci étant dépendante de l'activité de SERCA au cours de l'étape de charge, elle est révélatrice de l'efficacité du ou des systèmes impliqués dans l'approvisionnement de SERCA en énergie.

Les différentes phases de charge du RS ont été réalisées à 22°C dans une solution contenant (en mM) : EGTA (10), BES (60), Mg^{2+} libre (1), taurine (20), acide glutamique (10), acide malique (4), K_2HPO_4 (3), dithiothréitol (0,5), P^1, P^5 -diadenosine pentaphosphate (0,04) MgATP (3,16), potassium-methasulfonate et 6% de dextran. Ces conditions, dites initiales, ont permis d'évaluer la capacité combinée de l'ATP exogène (contenu dans la solution) et de l'ATP produit par les mitochondries (transféré par canalisation directe) à soutenir l'activité de SERCA. L'ajout de 12 mM de PCr à cette solution a permis de mesurer la charge calcique dans des conditions énergétiques optimales puisque cette situation permet l'activation de l'ensemble des systèmes, à savoir l'apport d'ATP par diffusion (ATP exogène), par canalisation directe (ATP produit par les mitochondries) et par les CK (ATP produit par les CK liées). L'inhibition des mitochondries par l'ajout de 2 mM d'azide de sodium dans cette dernière solution et dans la solution initiale (ne contenant pas de PCr) a été réalisée afin d'étudier la charge calcique du RS dans des situations où l'approvisionnement de SERCA en ATP était assuré soit par les CK et l'ATP exogène, soit par l'ATP exogène seul.

Les résultats obtenus lors de cette expérience ont été exprimés soit en valeurs absolues de quantité de calcium libérée (en $\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$), soit en terme d'efficacité qui a été évaluée par le rapport entre la quantité de calcium libérée pour une condition donnée et celle libérée après la charge calcique du RS supportée par l'ATP exogène seul.

B. Etude des transferts énergétiques au voisinage de la myosine-ATPase

La capacité des différents systèmes énergétiques à soutenir l'activité de l'ATPase de la myosine a été estimée en mesurant la tension de rigor développée par les fibres perméabilisées en fonction de la concentration d'ATP de la solution (exprimée en pMgATP pour $-\log_{10} [\text{MgATP}]$) (Figure 31). Cette relation « pMgATP-Tension de rigor » a ainsi été étudiée dans des solutions, permettant d'activer ou d'inhiber les différents systèmes, pour lesquelles la concentration d'ATP a progressivement été diminuée (Ventura-Clapier *et al.*, 1995). Il est à noter que la composition des solutions était la même que celles utilisées pour l'estimation de la charge du RS à l'exception de la concentration d'ATP qui variait tout au long de cette expérience.

La tension de rigor (Figure 31) est une tension développée quand la concentration de MgATP, au voisinage de l'ATPase de la myosine, est insuffisante pour assurer la dissociation du complexe actomyosine. Etant donné que cet effet est amplifié par la présence d'ADP (Ventura-Clapier & Veksler, 1994), la valeur de la tension de rigor constitue un index de choix pour estimer le rapport ATP/ADP à l'entour de la myosine-ATPase.

La relation « pMgATP-tension de rigor » est, de la même manière que pour le calcium, régie par l'équation de Hill $T = K/(K + [\text{MgATP}]^{n_H})$ où T est la tension relative (exprimée en pourcentage de la tension de rigor maximale mesurée à pMgATP 6), K une constante et n_H le coefficient de Hill. La détermination de cette relation a ainsi permis de définir le pMgATP₅₀ (pMgATP pour lequel la tension de rigor atteint la moitié de la tension de rigor maximale) des fibres pour chacune des conditions énergétiques. Le pMgATP₅₀ a donc été le paramètre considéré pour déterminer la participation des systèmes énergétiques à l'approvisionnement de la myosine-ATPase en énergie. Les résultats ont alors été exprimés soit directement en valeur de pMgATP₅₀, soit en terme d'efficacité qui a été déterminée suivant la formule $E = \text{pMgATP}_{50\text{syst}} - \text{pMgATP}_{50\text{ATP}}$, où E est l'efficacité, pMgATP_{50syst} le pMgATP₅₀ calculé pour une condition énergétique donnée et pMgATP_{50ATP} le pMgATP₅₀ calculé lorsque l'activité de l'ATPase de la myosine est soutenue seulement par l'ATP exogène.

V. Etude moléculaire du RS et des myofilaments

L'étude des transferts énergétiques s'intéressant essentiellement aux échanges d'énergie entre les mitochondries et les ATPases impliquées dans la fonction contractile (SERCA et l'ATPase de la myosine), il est apparu nécessaire de s'informer de l'état de maturation du RS et des myofilaments dans l'expérimentation menée au cours du développement postnatal de la souris. Cette démarche, pouvant s'avérer utile pour la compréhension des résultats obtenus lors des expériences visant à estimer l'efficacité des transferts énergétiques sur fibres mais pouvant également aider à comprendre la logique de maturation des micro-domaines, a consisté en la mesure d'expressions protéiques par Western Blot et d'expressions géniques par RT-PCR quantitative.

A. Mesure du niveau d'expression protéique par Western Blot

La maturation structurale du RS a été étudiée en mesurant le niveau d'expression de protéines spécifiques de cet organite (SERCA2, le Phospholamban et la Calsequestrine). Les protéines des échantillons ont été séparées selon leur taille sur un gel de polyacrylamide-SDS (8% pour SERCA, 12% pour le phospholamban, et la calsequestrine), puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Après une heure de blocage avec du lait, les membranes ont été incubées toute la nuit avec un anticorps primaire spécifique (SERCA2 : 8094, Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA), produit dans la chèvre ; Phospholamban : 05-205, Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA), produit dans la souris ; Calsequestrine : PA1-913, Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA), produit dans le lapin). La membrane a ensuite été lavée et mise en présence d'un anticorps secondaire idoïne pendant une heure avant de passer à l'étape de détection qui a été réalisée au moyen de substrat chimiluminescent (Supersignal West Dura kit, Thermo Fisher Scientific). L'émission lumineuse a été détectée par autoradiographie et quantifiée à l'aide d'un système d'analyse d'image Bio-Rad.

B. Mesure du niveau d'expression génique par RT-PCR quantitative

Le stade de maturation des myofilaments, et plus précisément l'expression génique des isoformes α et β de la chaîne lourde de myosine, a été estimé par la méthode de RT-PCR

quantitative. Cette technique, qui associe une transcription inverse à une réaction de PCR, permet d'amplifier spécifiquement un ADN complémentaire (ADNc) de manière à quantifier le niveau d'expression du gène considéré.

1. Extraction, dosage et qualité des ARN totaux

La mesure du niveau d'expression des gènes des différents modèles animaux a nécessité l'extraction des ARN totaux contenus dans les tissus ventriculaires prélevés lors du sacrifice. Environ 30 mg de tissu ont été homogénéisés dans 1 ml d'une solution de Trizol à 4°C (Gibco BRL, USA) au moyen d'un micro-broyeur Precellys 24 (Bertin, France). Cette solution d'homogénéisation contenant du phénol et de la guanidine isothiocyanate permet une lyse des membranes cellulaires tout en préservant les acides nucléiques intacts. L'homogénat obtenu a été traité avec 200 µl de chloroforme, puis centrifugé à 4°C à 10000G pendant 15 minutes de manière à séparer les ARN, alors contenus dans une phase aqueuse, des protéines présentes dans une phase organique. Après le traitement de la phase aqueuse avec 0,5 ml d'alcool isopropylique durant une nuit à -20°C permettant la précipitation des ARN, une centrifugation à 4°C à 12000G pendant 15 minutes a été effectuée pour obtenir un culot d'ARN. Celui-ci a ensuite été débarrassé de toute trace d'alcool isopropylique par élimination du surnageant et lavage à l'éthanol 75% avant d'être séché et remis en solution dans 20 µl d'eau sans ARNases et ADNases pour être conservé à -80°C.

La concentration d'ARN totaux des solutions obtenues a été déterminée en mesurant l'absorbance de celles-ci à 260 nm, sachant qu'une unité de DO correspond à une concentration en ARN de 40 µg.ml⁻¹. Une mesure additionnelle de l'absorbance de ces solutions à 280 nm a également permis de déterminer la pureté de leur contenu en ARN. Le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ est en effet un bon indicateur de la pureté des échantillons puisque toute valeur inférieure à 1,5 ou supérieure à 2 indique, respectivement, une contamination par les protéines ou par les acides nucléiques d'origine génomique.

La dernière étape de la préparation a consisté à contrôler la qualité des ARN totaux. Ce contrôle a été réalisé au moyen de cartes microfluidiques analysées par un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) qui examine l'ensemble du contenu des échantillons et calcule un « RNA Integrity Number » (RIN) qui doit être compris entre 7 et 10 pour pouvoir utiliser l'échantillon dans des expériences de RT-PCR quantitative.

2. PCR quantitative : SYBR Green

a. Transcription inverse

La technique de PCR quantitative nécessite une étape préliminaire consistant en une transcription inverse qui conduit à la production d'ADNc à partir des ARN contenus dans les différents échantillons. Cette étape a été réalisée au moyen du kit « SuperScript II Reverse Transcriptase » (Invitrogen, France) qui utilise une version modifiée de la transcriptase inverse de Moloney Murine Leukemia Virus et des amorces oligonucléotidiques poly-dT complémentaires de la queue poly-A des ARNm. Elle a été effectuée à partir de 5 µg d'ARN mis, pendant 1 heure à 42°C, dans 20 µl d'une solution contenant les différents réactifs du kit dont un inhibiteur d'ARNase.

b. PCR quantitative en temps réel

La technique de PCR quantitative en temps réel consiste à suivre la réplication d'un ADNc ciblé au cours de l'ensemble des cycles d'amplification de la réaction de PCR. Elle s'appuie sur la démarche d'une PCR classique qui consiste en l'alternance des phases de dénaturation de l'ADN double brin (ADNc), d'hybridation des amorces d'oligonucléotides de synthèse (construite pour amplifier les ADNc cibles) et d'élongation. La formation du produit d'intérêt est suivie en temps réel par la présence, dans le milieu réactionnel, d'un intercalant, le SYBR Green, qui émet une fluorescence lorsqu'il est incorporé entre les bases de l'ADN double brin au cours de la phase d'élongation (Figure 32). La mesure de la fluorescence à la fin de chaque cycle est alors utilisée pour quantifier l'ADNc cible dans l'échantillon et par conséquent déterminer le niveau d'expression du gène dans le modèle considéré.

Le succès d'une quantification d'ADNc par la méthode de PCR quantitative réside essentiellement dans la construction d'amorces spécifiques de la séquence à amplifier. Les amorces utilisées au cours de cette étude ont été désignées au moyen du logiciel Primer 3 et leur spécificité a été vérifiée par le logiciel BLAST. Les amorces « sens » et « anti-sens » ont été choisies dans deux exons différents de manière à détecter une contamination par l'ADN génomique.

Les réactions de PCR ont été effectuées dans des capillaires de verre dans un milieu réactionnel d'un volume total de 15 µl composé de 12,5 ng d'ADNc, 0,5 µM de chacune des amorces, 3 µM de MgCl₂, et 1,5 µl de MasterMix (Roche) contenant des dNTP (nucléotides),

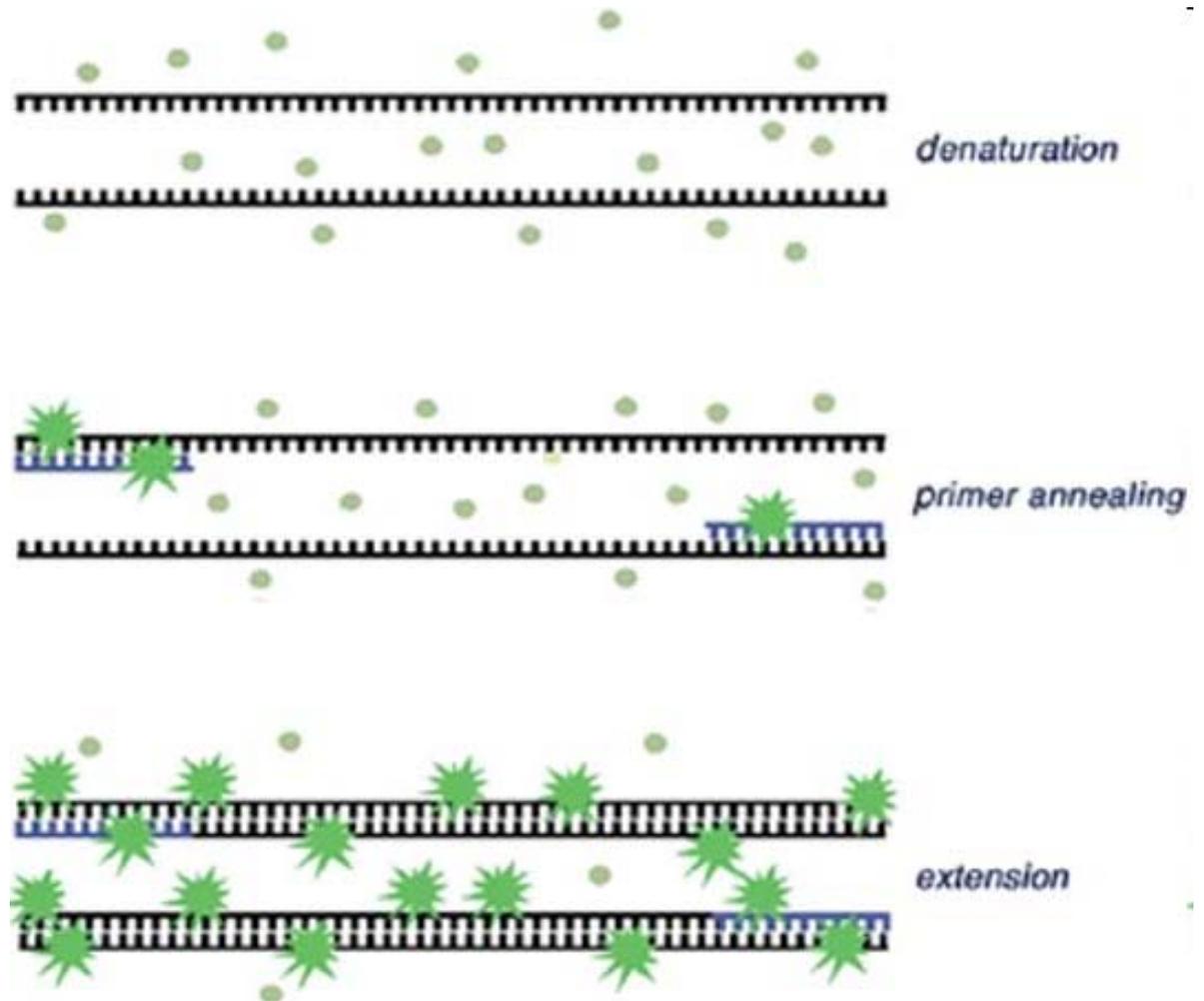


Figure 32 : Détection des produits de PCR par la méthode du SYBR green.

Le SYBR green est ajouté dans le milieu réactionnel et s'intercale dans l'ADN double brin produit lors de la phase d'élongation de la réaction de PCR. Le SYBR green intercalé émet alors une fluorescence qui peut être mesurée.

le SYBR Green et la Taq-polymérase. Les capillaires ont alors été déposés dans un thermocycleur LightCycler (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) pour être soumis à un nombre de cycles « dénaturation-hybridation-élongation » variant de 30 à 40 selon les gènes étudiés. A la fin du protocole d'amplification, la courbe de fusion du produit formé a été réalisée de manière à vérifier la spécificité de la réaction de PCR.

c. Analyse des résultats

La quantification du niveau d'expression des différents gènes a été réalisée à partir du calcul du « threshold cycle » (Ct ou cycle-seuil) qui correspond au nombre de cycles nécessaire à la détection de la fluorescence du SYBR Green. Le Ct étant inversement proportionnel au logarithme de la concentration d'ADNc contenue dans les échantillons, la concentration d'ARNm a été déterminée à partir d'une courbe linéaire standard déterminée avec une gamme de dilution (5 dilutions d'un échantillon donné pour chacun des gènes). Dans le but de s'affranchir des différences d'efficacité de la reverse transcriptase et des erreurs de manipulation entre les différents échantillons ; ces valeurs ont été normalisées à l'expression de gènes de référence (TBP et GAPDH) pour lesquelles les conditions expérimentales n'ont pas d'effet sur l'expression.

VI. Etude du profil métabolique

Le métabolisme énergétique d'un organe comme le cœur est, de manière générale, une composante difficile à appréhender. De manière à disposer d'un maximum d'éléments pour éclaircir le champ d'investigation et faciliter la compréhension de l'ensemble des données obtenues durant les différentes études, une caractérisation de nombreux paramètres concernant le profil métabolique des modèles a été réalisée. Cette partie du travail a ainsi pu recourir à des techniques de dosage d'enzymes comme la CK (impliquée dans les transferts énergétiques) ou la LDH (affichant l'orientation plus ou moins glycolytique du métabolisme de l'organe) ou encore des techniques mesurant le niveau d'expression génique des nombreux gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire.

A. Dosage enzymatique

1. La Créatine Kinase totale

La Créatine Kinase est une enzyme catalysant, de façon réversible, le transfert d'une liaison riche en énergie de la PCr vers l'ADP. Cette réaction est impliquée dans le système de transfert d'énergie (voir le système CK et le « shuttle » décrit précédemment).



Cette réaction ne pouvant être suivie par spectrophotométrie, l'apparition de l'ATP dans le milieu réactionnel a été suivie en ajoutant des enzymes (Héxokinase (HK) et Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)) et des substrats conduisant, à mesure que l'ATP apparaît dans le milieu, à la formation du NADPH qui présente une absorbance à 340 nm.



Le dosage a ainsi été effectué dans une solution contenant (en mM) : HEPES (20), Mg-acétate (5), DTT (0,5), Glucose 20 mM ; ADP 1,2 mM ; NADP⁺ 0,6 mM, HK 5 U/ml et G6PDH 3,7 U/ml. Il est à noter que ce milieu réactionnel permet aussi la formation d'ATP par l'AK. C'est pourquoi une mesure de l'activité de l'AK a été réalisée avant d'ajouter 2 mM de PCr qui a alors permis la mesure de l'activité combinée de l'AK et de la CK. L'activité spécifique de la CK, qui représente l'activité globale de toutes les CK cellulaires (Mi-CK, CK liées et cytoplasmiques), a enfin été obtenue en soustrayant l'activité de l'AK à l'activité AK+CK.

2. La lactate déshydrogénase

La LDH est responsable de la dernière étape de la glycolyse anaérobie qui conduit à la formation du lactate à partir de la réduction du pyruvate.



La mesure de l'activité enzymatique de la LDH a simplement été réalisée en suivant la disparition du NADH à 340 nm durant 3 minutes à 30°C dans un tampon contenant (en mM) : K₂HPO₄ (34,1), KH₂PO₄ (7,35), Pyruvate (0,63), NADH (12,4) et NaHCO₃ (0,12) (pH 7,5).

B. Mesure du niveau d'expression génique par RT-PCR quantitative

La mesure, chez les souris Opa1^{enu/-}, d'expression de gènes impliqués, de près ou de loin, dans la fonction de la mitochondrie a été réalisée au moyen de cartes microfluidiques TLDA (TaqMan Low Density Array, Applied Biosystems). L'avantage de cette technique réside dans le fait qu'elle permet d'interroger le niveau d'expression de nombreux gènes (48 gènes dans le cas de cette étude) simultanément sur un extrait d'ADNc unique.

1. Transcription inverse

Les ADNc ont été préparés au moyen du kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » (Applied Biosystems, France) qui utilise une version modifiée de la transcriptase inverse de Moloney Murine Leukemia Virus et des amorces oligonucléotidiques « random » s'hybridant aux ARN contenus dans l'échantillon de façon aléatoire. Elle a été effectuée à partir de 2 µg d'ARN dans une solution de 20 µl contenant les différents réactifs du kit dont un inhibiteur d'ARNase pendant 2 heures à 37°C.

2. PCR quantitative en temps réel

La technologie de quantification TaqMan repose sur la présence, dans le milieu réactionnel, d'une séquence oligonucléotidique complémentaire de l'ADNc à amplifier qui affiche un fluorochrome à son extrémité 5' dont la fluorescence est absorbée par un « quencher » présent à l'extrémité 3' de celle-ci. Au cours de la phase d'hybridation, cette séquence d'oligonucléotides s'hybride à l'ADN simple brin correspondant, de la même façon que les amorces sens et anti-sens. La phase d'élongation conduit alors à la destruction de cette séquence, de part l'activité exonucléase de la polymérase, séparant alors le fluorochrome du « quencher ». Une fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée est alors émise (Figure 33).

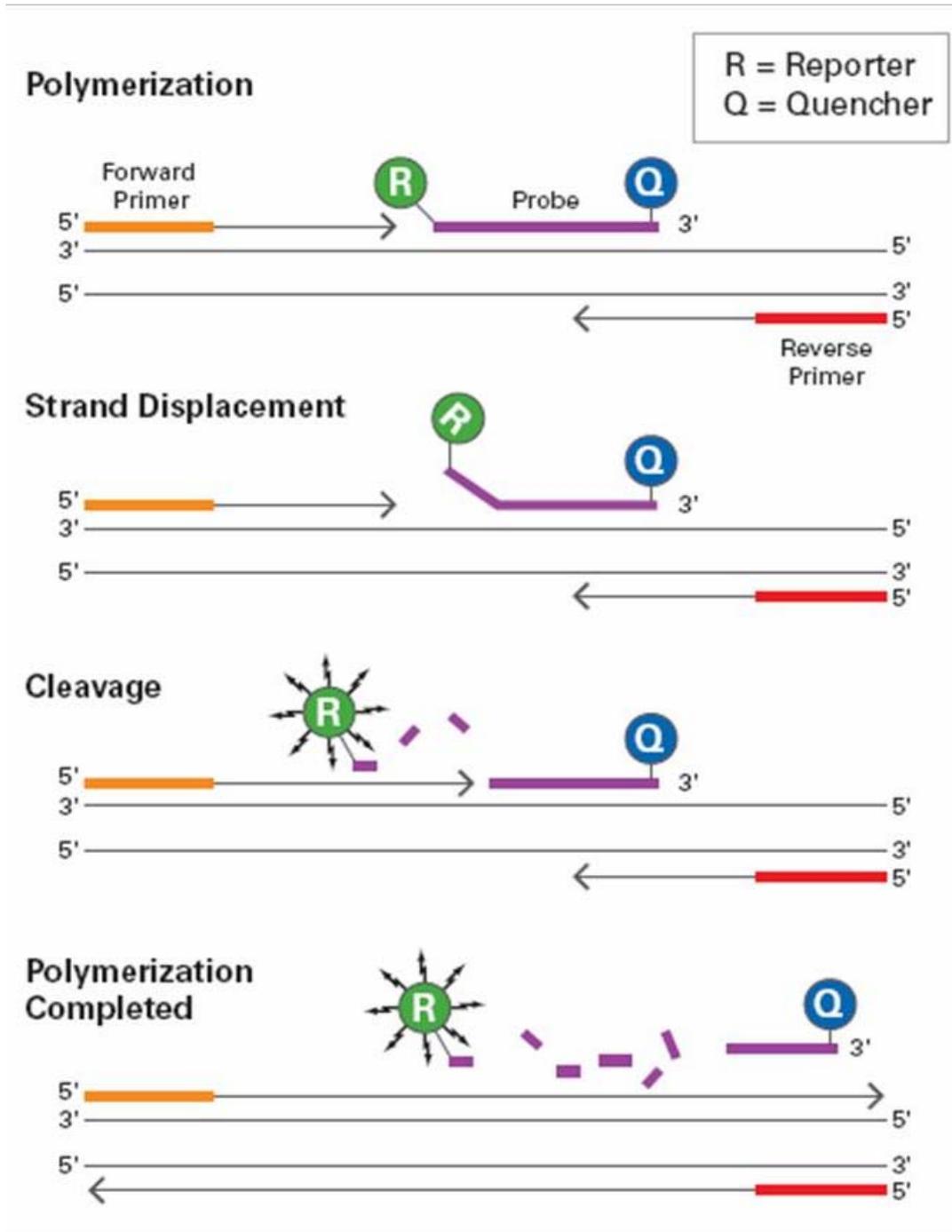


Figure 33 : Principe de détection des produits de PCR par la méthode Taqman.

La séquence oligonucléotidique complémentaire de l'ADNc à amplifier présente un fluorochrome à son extrémité 5' dont la fluorescence est absorbée par un « quencher » présent à l'extrémité 3' de celle-ci. Au cours de la phase d'hybridation, cette séquence d'oligonucléotides s'hybride à l'ADN simple brin correspondant. La phase d'élongation conduit alors à la destruction de cette séquence, de part l'activité exonucléase de la polymérase, séparant alors le fluorochrome du « quencher » qui émet alors une fluorescence mesurable.

La préparation des échantillons a consisté à mélanger 4 µl de solution d'ADNc (diluée de manière à correspondre à 400 ng d'ADNc), 46 µl d'eau (sans ADNase et ARNase) et 50 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Ces 100µl ont ensuite été déposés dans les réservoirs des cartes TLDA qui ont été centrifugées durant 1 minute à 280G dans le but de répartir, de façon homogène, la solution dans l'ensemble des 48 puits contenant les amorces et la séquence d'oligonucléotide spécifique de chacun des gènes à amplifier. Les cartes ont enfin été scellées avant d'être introduites dans un thermocycleur ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems).

3. Analyse des résultats

De même que pour la PCR utilisant le SYBR Green, la quantification de la PCR utilisant la technologie TaqMan a été réalisée à partir du calcul du Ct et plus particulièrement avec la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Les sondes TaqMan ont été mises au point de manière à garantir une efficacité de PCR de 100 % conduisant au doublement de la quantité d'ADNc cible à chacun des cycles. Le niveau d'expression des gènes étudiés répond ainsi à la formule suivante : $R_{\text{cible}} = 2^{(Ct_{\text{Calibrateur cible}} - Ct_{\text{échantillon cible}})}$ où R est le rapport d'expression et $Ct_{\text{Calibrateur}}$ est le Ct moyen du groupe contrôle pour le gène considéré. Ce rapport a ensuite été normalisé au niveau d'expression de deux gènes de références (Hprt1 et Ywhaz) sélectionnés parmi six (B2m, CycA, Ywhaz, Rplp2, ARN18S, Hprt1) par les logiciels GeNorm et Normfinder. Le facteur de normalisation a été calculé en effectuant la moyenne géométrique des Ct des deux gènes de référence pour chacun des échantillons à partir de laquelle le rapport d'expression a été déterminé : $R_{\text{ref}} = 2^{(Ct_{\text{Calibrateur ref}} - Ct_{\text{moyenne ref}})}$. Le rapport $R_{\text{cible}}/R_{\text{Ref}}$ a alors permis d'estimer le niveau d'expression de chacun des gènes.

VII. Statistiques

L'ensemble des valeurs numériques obtenues au cours des phases expérimentales ont été exprimées en moyenne \pm SEM.

La significativité statistique des différences entre les groupes de l'étude réalisée au cours du développement postnatal a été estimée en utilisant en test ANOVA à une voie suivi d'un test post-hoc non paramétrique Newman-Keuls.

Concernant l'étude menée sur les souris $Opa1^{enu/+}$, la significativité statistique entre les groupes $Opa1^{+/+}$ et $Opa1^{+/-}$ a été estimée au moyen d'un test de student. L'étude statistique comparant les groupes $Opa1^{+/+}$ -Sham, $Opa1^{+/+}$ -TAC, $Opa1^{+/-}$ -Sham et $Opa1^{+/-}$ -TAC, a revanche eu recours à un test ANOVA à deux voies suivi d'un test post-hoc non paramétrique Newman-Keuls.

Résultats

Chapitre I : Mise en évidence d'un lien entre architecture cellulaire et transfert énergétique

I. Présentation

De précédentes études réalisées au laboratoire ont montré des altérations conjointes de l'architecture du cardiomyocytes et du système de canalisation directe des nucléotides dans des modèles d'animaux présentant une déficience d'expression de protéines du cytosquelette (Wilding *et al.*, 2006) ou une pathologie cardiaque (Joubert *et al.*, 2008). Si celles-ci suggèrent une relation entre ces deux composantes, elles semblent cependant insuffisantes pour affirmer avec certitude que le transfert de molécules énergétiques par canalisation directe est régi par l'état architectural de la cellule musculaire cardiaque.

La première partie de ce projet a ainsi consisté à étudier, en parallèle, les caractéristiques architecturales de la cellule cardiaque et l'efficacité des différents systèmes énergétiques durant le développement postnatal chez la souris. Cette période étant le théâtre de profonds remaniements structuraux, elle est apparue tout à fait adéquate pour déterminer si les transferts d'énergie, et notamment la canalisation directe des nucléotides adényliques, sont dépendants d'une organisation architecturale particulière.

La phase d'expérimentation de cette étude a été réalisée de manière à déterminer les caractéristiques des compartiments générateurs (mitochondries) et consommateurs (SERCA et Myosine-ATPase) d'énergie, l'efficacité des transferts s'effectuant entre ces entités ainsi que l'état architectural des cardiomyocytes pour chacun des âges étudiés. Le panel assez large de techniques utilisées a permis d'analyser le couplage fonctionnel des mitochondries avec les ATPases du RS et des myofilaments et d'en identifier les éléments clés.

II. Résultats et discussion

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication (Piquereau *et al.*, 2010. *Journal of Physiology*, 588, 2443-2454).

Postnatal development of mouse heart: formation of energetic microdomains

Jérôme Piquereau^{1,2}, Marta Novotova³, Dominique Fortin^{1,2}, Anne Garnier^{1,2}, Renée Ventura-Clapier^{1,2}, Vladimir Veksler^{1,2} and Frédéric Joubert^{1,2}

¹INSERM, U-769, F-92296 Châtenay-Malabry, France

²Univ Paris-Sud, IFR141, F-92296 Châtenay-Malabry, France

³Institute of Molecular Physiology & Genetics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

Cardiomyocyte contractile function requires tight control of the ATP/ADP ratio in the vicinity of the myosin-ATPase and sarcoplasmic reticulum ATPase (SERCA). In these cells, the main systems that provide energy are creatine kinase (CK), which catalyses phosphotransfer from phosphocreatine to ADP, and direct adenine nucleotide channelling (DANC) from mitochondria to ATPases. However, it is not known how and when these complex energetic systems are established during postnatal development. We therefore studied the maturation of the efficacy with which DANC and CK maintain ATP/ADP-dependent SR and myofibrillar function (SR Ca²⁺ pumping and prevention of rigor tension), as well as the maturation of mitochondrial oxidative capacity. Experiments were performed on saponin-skinned fibres from left ventricles of 3-, 7-, 21-, 42- and 63-day-old mice. Cardiomyocyte and mitochondrial network morphology were characterized using electron microscopy. Our results show an early building-up of energetic microdomains in the developing mouse heart. CK efficacy for myosin-ATPase regulation was already maximal 3 days after birth, while for SERCA regulation it progressively increased until 21 days after birth. Seven days after birth, DANC for these two ATPases was as effective as in adult mice, despite a non-maximal mitochondrial respiration capacity. However, 3 days after birth, DANC between mitochondria and myosin-ATPase was not yet fully efficient. To prevent rigor tension in the presence of working mitochondria, the myosin-ATPase needed more intracellular MgATP in 3-day-old mice than in 7-day-old mice (pMgATP₅₀ 4.03 ± 0.02 and 4.36 ± 0.07, respectively, *P* < 0.05), whereas the intrinsic sensitivity of myofibrils to ATP (when mitochondria were inhibited) was similar at both ages. This may be due to the significant remodelling of the cytoarchitecture that occurs between these ages (cytosolic space reduction, formation of the mitochondrial network around the myofibrils). These results reveal a link between the maturation of intracellular energy pathways and cell architecture.

(Received 9 March 2010; accepted after revision 14 March 2010; first published online 17 May 2010)

Corresponding author F. Joubert: U-769 INSERM, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5 rue J-B Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France. Email: frederic.joubert@u-psud.fr

Abbreviations ACR, acceptor control ratio; Cr, creatine; CK, creatine kinase; DANC, direct adenine nucleotide channelling; mi-CK, mitochondrial creatine kinase; MM-CK, cytosolic muscle creatine kinase isoform; MHC, myosin heavy chain; PCr, phosphocreatine; SERCA, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase; SR, sarcoplasmic reticulum.

Introduction

Cardiomyocytes are highly specialized and organized cells. The contractile function of these cells requires a high local ATP/ADP ratio in the vicinity of the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺-ATPase (SERCA) and myosin-ATPase, in order to drive calcium loading and force development, respectively (Ventura-Clapier *et al.* 1998). Thus, the main energy consumers of the cardiac

cell are localized in the SR and myofibrillar compartments, while energy production is mainly performed by the mitochondria. Obviously, this energy must be quickly and efficiently transferred from the mitochondria to the ATPases according to demand, in order to ensure an optimal energetic microenvironment in the vicinity of these energy consumers.

There are two main intracellular energy pathways that are currently known in adult cardiomyocytes (Fig. 1). The

first is the creatine kinase (CK) system, which catalyses the reversible transfer of a high energy phosphate group from ATP to creatine (Cr). This system relies on the presence of mitochondrial CK (mi-CK) bound to the outer surface of the inner mitochondrial membrane, and the presence of a cytosolic muscle CK isoform (MM-CK) bound to myofilaments and SR close to the ATPases. mi-CK transfers the phosphate group from ATP generated in the mitochondria to Cr, thereby producing phosphocreatine (PCr), which diffuses to the energy-consuming sites. Creatine kinase bound to the myofilaments and the SR rephosphorylates locally produced ADP by using PCr (for reviews see Wallimann *et al.* 1992; Saks *et al.* 1994; Ventura-Clapier & Veksler 1994).

The second energy pathway is direct adenine nucleotide channelling (DANC) between mitochondria and ATPases, which occurs independently of cytosolic and bound CK (Kaasik *et al.* 2001; Seppet *et al.* 2001). The close proximity of mitochondria and ATPases, and the juxtaposition of mitochondria, SR and myofilaments, probably promotes efficient DANC. Indeed, adult cardiomyocytes exhibit a sophisticated subcellular architecture in which large mitochondria are strictly ordered between rows of contractile proteins (Ogata & Yamasaki 1985) and are specifically arranged with the SR and myofilaments into intracellular energetic units (Saks *et al.* 2001; Seppet *et al.* 2005). Thus, this highly specialized architecture of the cardiomyocyte, and also its cytoskeleton, which is responsible for the structural organisation, could be a key requirement for optimal energy transfer. Previous studies in our laboratory on the MLP- and desmin-null mouse heart, in which there is cytoskeletal remodelling and mitochondria disorganization, showed that direct ATP/ADP channelling between mitochondria and SERCA was altered, suggesting that cytoarchitectural perturbation could have a direct effect on this energetic system (Wilding *et al.* 2006).

It is generally accepted that perinatal development of cardiomyocytes is associated with a profound reorganization of the cell architecture involving an increase in mitochondrial and myofibrillar mass and SR maturation. Postnatal growth of the mouse heart is divided into three different phases (Leu *et al.* 2001): hyperplasia (until postnatal day 4), rapid hypertrophy (between days 5 and 15) and slow hypertrophy (from day 15 onwards). It seems likely that any major modification of the energetic signalling that may occur would therefore take place during the first two stages of development.

Thus, it is reasonable to suggest that such developmental changes in cytoarchitecture result in the formation of the energetic microdomains very early in postnatal life. However, the process of energy pathway maturation is still poorly understood. A detailed study of the evolution of energetic microdomains during postnatal development could allow us to understand their function much

better. Moreover, perinatal development of cardiac energy metabolism has been investigated mostly in the rat, rabbit and guinea pig (for review see Hoerter *et al.* 1994; Ostadal *et al.* 1999; Hew & Keller 2003), but not the mouse, the species most widely used today for studying the effects of genetic manipulation on the heart. The aim of the present study was therefore to correlate developmental changes in the efficacy of the different energetic pathways with the profound reorganisation of cellular ultrastructure that occurs during this period (Leu *et al.* 2001).

Methods

Animals

Mice (strain C57Bl6) of different ages (3, 7, 21, 42 and 63 days) were anaesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (60 mg kg⁻¹). This procedure complied with the recommendations of the institutional animal care and use committee of INSERM. After thoracotomy, hearts were excised and rinsed in ice-cold calcium free Krebs solution equilibrated with 95%O₂–5%CO₂. A part of each left ventricle was immediately frozen in liquid nitrogen for further biochemical determinations and another part was taken in order to prepare cardiac muscle fibres for the mechanical and respiration experiments. For measurements of SR and myofibrillar function, papillary muscle fibres were dissected and permeabilized for 30 min in saponin (50 µg.ml⁻¹), as described previously (De Sousa *et al.* 1999; Kaasik *et al.* 2001). For mitochondrial function measurements, muscle fibres were dissected from the endocardial surface of the left ventricle (Kaasik *et al.* 2001).

Estimation of SR calcium uptake

The contribution of the different energetic systems to the provision of ATP for SERCA function was estimated by measuring SR calcium after loading under various energetic conditions as previously described (Minajeva *et al.* 1996; Wilding *et al.* 2006). Permeabilized muscle fibres were mounted on a device equipped with a force transducer which recorded the tension developed by the muscle fibres (Ventura-Clapier *et al.* 1995). Calcium uptake for 5 min at pCa 6.5 occurred in the presence of exogenous ATP, with or without endogenous mitochondrial ATP production and/or activation of the CK system (Fig. 1). To estimate the amount of calcium pumped by the SR, calcium release was elicited with 5 mmol l⁻¹ caffeine, and was detected using the resulting contractile force transient. Although different energetic loading conditions were tested, calcium release was always measured using the same solution, which provided exogenous ATP, and mitochondrial and

CK-system activation together. By relating the subsequent contractile force elicited with caffeine to the pCa–tension relationship, which was determined for each muscle fibre, the $[Ca^{2+}]$ –time integral was calculated and used as an index of SR calcium load (Minajeva *et al.* 1996; Kaasik *et al.* 2001). The ATP channelling solution (DANC) contained (in $mmol\ l^{-1}$): EGTA 10 (0.2 during calcium release), Bes, 40 (pH 7.1), free Mg^{2+} 1, taurine 20, glutamic acid 10, malic acid 4, K_2HPO_4 3, dithiothreitol 0.5, P^1, P^5 -diadenosine pentaphosphate 0.04 (to inhibit adenylate kinase activity), and MgATP 3.16; ionic strength was adjusted to $160\ mmol\ l^{-1}$ with potassium methanesulfonate, and 6% dextran was added to maintain normal cell volume. Addition of $12\ mmol\ l^{-1}$ PCr to this solution caused SR loading supported by DANC and the bound CK system together (DANC+CK, optimal energetic conditions). Loading supported by the CK system only was achieved by adding $2\ mmol\ l^{-1}$ sodium azide, which blocked mitochondrial respiration. Addition of $2\ mmol\ l^{-1}$ azide in the absence of PCr caused SR loading supported by exogenous ATP only.

Estimation of the myofibrillar function

The pMgATP–rigor tension relation of saponin-permeabilized muscle fibres was used for studying the ability of the different energetic systems to supply ATP for myosin-ATPase function. Under each energetic condition the pMgATP–rigor tension relationship was estimated by progressively decreasing ATP concentration under isometric conditions (Ventura-Clapier *et al.* 1995). Rigor tension is a tension developed when the MgATP concentration in the vicinity of the myofibrillar ATPase is not sufficient to ensure the dissociation of myosin heads from the actin filament. This effect is enhanced by the presence of ADP (Ventura-Clapier & Veksler 1994), and thus rigor tension is a good index of the ATP/ADP ratio in the vicinity of myosin ATPase. Data were fitted using the Hill equation: $T = K/(K + [MgATP]^{n_H})$, where T is the relative rigor tension, K a constant, and n_H the Hill coefficient. This fitting procedure was used to calculate pMgATP₅₀, which is the negative logarithm of $[MgATP]$ at which half-maximum rigor tension is obtained. The solutions used were the same as the solutions used for the estimation of SR calcium uptake, except for the ATP concentration, which varied in this experiment.

Analysis of *in situ* mitochondrial function

The respiration rate of the mitochondrial population in saponin-permeabilized muscle fibres was determined using a Clark electrode (Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Scotland, UK) as previously described (Veksler *et al.* 1987; Kuznetsov *et al.* 2008). A protocol was

designed to determine the sensitivity of the mitochondrial respiration to external ADP and creatine. Bundles of muscle fibres were transferred to an oxygraphic cell at $22^\circ C$ in which there was a respiration solution containing (in $mmol\ l^{-1}$): EGTA–CaEGTA buffer 10 (free Ca^{2+} 0.1), free Mg^{2+} 1, dithiothreitol 0.5, imidazole 20, taurine 20, glutamate 10, malate 4, K_2HPO_4 3, fatty acid free bovine serum albumin ($2\ mg\ ml^{-1}$), with ionic strength adjusted to 160 by addition of potassium methanesulfonate. The basal respiration rate of mitochondria in the absence of ADP (V_0) was determined, then respiration was stimulated by the addition of a submaximal ADP concentration ($0.1\ mmol\ l^{-1}$). After a few minutes, $12\ mmol\ l^{-1}$ creatine was added to the chamber and finally the maximal respiration rate (V_{max}) was measured by adding saturating $[ADP]$ ($2\ mmol\ l^{-1}$). Given that the respiration rate depends on $[ADP]$ according to the Michaelis–Menten law, the apparent K_m values in the presence and absence of creatine were calculated using the equation $K_m = 100\ \mu M \times (V_{max}/V_{100} - 1)$, where V_{100} is the respiration rate at $100\ \mu mol\ l^{-1}$ ADP.

The acceptor control ratio (ACR) was calculated as V_{max}/V_0 . After each respiration experiment, the bundles of muscle fibres were removed from the oxygraphic cell and dried and weighed so that respiration rates could be expressed in $\mu mol\ O_2\ min^{-1}$ (g dry weight)⁻¹.

Biochemical analysis

Frozen tissues were homogenized in buffer ($50\ mg\ ml^{-1}$) containing (in $mmol\ l^{-1}$) Hepes 5, EGTA 1, DTT 1 and 0.1% Triton X-100 and incubated for 1 h at $0^\circ C$ for complete enzyme extraction. Activities of total CK, citrate synthase and mitochondrial complex I were measured

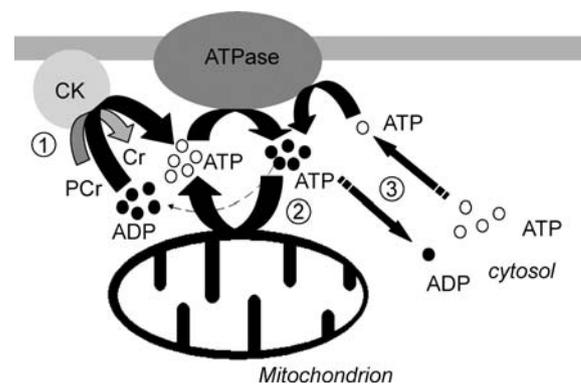


Figure 1. Pathways of energy supply for ATPases in the cardiomyocyte

1, creatine kinase (CK) bound to the myofilaments or the SR rephosphorylates locally produced ADP at the expense of PCr. 2, the juxtaposition of the mitochondrion and ATPase allows for direct adenine nucleotide channelling (DANC). 3, adenine nucleotides in the neighbourhood of ATPase exchange with those in the bulk of cytosol via diffusion.

using standard spectrophotometric assays (Wharton & Tzagoloff 1967; Estornell *et al.* 1993; Veksler *et al.* 1995; Ventura-Clapier *et al.* 1995).

Western blot

Protein extracts from hearts of mice of different ages were separated on SDS-polyacrylamide gel (8% for SERCA2, 12% for phospholamban, calsequestrin and mi-CK) and then transferred to nitrocellulose membranes. After 1 h of blocking with milk, the membranes were incubated overnight with primary antibody (SERCA2: cat no. 8094, Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA) produced in goat; phospholamban: cat no. 05-205, Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA), produced in mouse; calsequestrin: cat no. PA1-913, Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA), produced in rabbit; mi-CK: a kind gift of Drs Z. Khuchua and W. Quin, Washington University, St Louis, MO, USA, produced in rabbit). After washing, the membranes were incubated with a secondary antibody for 1 h and visualised using chemiluminescent substrate (SuperSignal West Dura kit, Thermo Fisher Scientific). Light emission was detected by autoradiography and quantified using an image-analysis system (Bio-Rad). The antibodies used were highly specific because only one band of the appropriate size (SERCA2: 110 kDa, phospholamban: 25 kDa, calsequestrin: 55 kDa, mi-CK: 43 kDa) was obtained each time.

Real-time quantitative PCR analysis

Total cardiac RNA was extracted using standard procedures. Oligo-dT first strand cDNA was synthesized from 5 μ g total RNA using superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time RT-PCR was performed using the SYBR Green method on a LightCycler rapid thermal cycler (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) as previously described (Garnier *et al.* 2003). The following primers were used: α -MHC, forward primer CCAATGAGTACCGCGTGAA, reverse primer ACAGTCATGCCGGGATGAT; β -MHC, forward primer, ATGTGCCGGACCTTGGAA, reverse primer, CCTCGG-GTTAGCTGAGAGATCA; TATA box binding protein (TBP), forward primer, GGCCTCTCAGAAGCAT-CACTA, reverse primer, GCCAAGCCCTGAGCATAA; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), forward primer, TGCACCACCAACTGCTTAG, reverse primer, GATGCAGGGATGATGTTTC. Amplification was allowed to proceed for 30–40 cycles, each consisting of denaturation (95°C, 10 s), annealing at specific temperature of 55°C for TBP, 58°C for α - and β -MHC and 60°C for GAPDH for 5 s, and extension at 72°C for 7–10 s depending on the length of the PCR product (25 bp per second). mRNA levels for all target genes were

normalized to TBP and GAPDH levels using GeNorm software (Vandesompele *et al.* 2002).

Electron microscopy and stereological experiments

Samples of mouse left ventricular papillary muscle ($n = 3–5$ for the different ages) were prepared for electron microscopy as previously described (Wilding *et al.* 2006). Ultrathin (60–65 nm) longitudinal sections were contrasted with lead citrate and studied using a JEM 1200 (JEOL, Tokyo, Japan) electron microscope. Images were recorded using a Gatan Dual Vision 300W CCD camera (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA).

Stereological analysis

The sections were cut from each tissue block at two randomly selected levels separated by more than 50 μ m. Five micrographs taken at a magnification of 7500 \times from each section were obtained. Twenty pictures were analysed from 2 hearts for each group.

The volume density of mitochondria, myofilaments, cytoplasm and lipid drops were estimated using ImageJ software. A grid in which each line intersection serves as a sample point was generated on each image. The percentage of points that overlay mitochondria (Mito), myofilaments (Myof), cytoplasm (Cyto) and lipid drops (LD) within the cells (excluding nuclei) was calculated, according to standard stereological methods.

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm S.E.M. Statistical significance of the difference between the different groups was estimated by one-way ANOVA using Newman–Keuls *post hoc* test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Anatomical characteristics and mouse heart myofibrillar function during postnatal development

Anatomical characteristics of the animals are presented in Table 1. Heart and body weight progressively increased until adulthood, whereas the heart weight to body weight ratio decreased after the age of 21 days. Maximal active tension at pCa 4.5 clearly increased during postnatal development until 21 days and then stabilized. Resting tension also increased during postnatal development. Myofibrillar calcium sensitivity was stable during development, while the Hill coefficient progressively increased.

Table 1. Anatomical parameters and myofibrillar function

Anatomical parameters	3 days	7 days	21 days	42 days	63 days
Number of animals	<i>N</i> = 11	<i>N</i> = 15	<i>N</i> = 8	<i>N</i> = 5	<i>N</i> = 8
Body weight (g)	2.0 ± 0.1***	4.6 ± 0.1***	11.1 ± 0.1***	18.1 ± 0.3***	24.4 ± 0.8
Heart weight (mg)	12.7 ± 0.3***	29.8 ± 0.7***	75.2 ± 1.2***	110 ± 3***	144 ± 4
Heart weight/body weight (mg g ⁻¹)	6.3 ± 0.1	6.5 ± 0.1*	6.8 ± 0.1***	6.1 ± 0.2	5.9 ± 0.1
Myofibrillar function	3 days	7 days	21 days	42 days	63 days
Number of fibres	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 9
Resting tension (mN mm ⁻²)	2.5 ± 0.6	3.3 ± 0.4	3.0 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.2 ± 0.4
Active tension (mN mm ⁻²)	9.4 ± 0.7***	16.8 ± 1.2**	26.3 ± 1.9	29.5 ± 2.1	27.7 ± 1.9
pCa ₅₀	5.97 ± 0.03	5.86 ± 0.03	5.91 ± 0.01	5.89 ± 0.01	5.92 ± 0.02
Hill coefficient	2.64 ± 0.5**	2.82 ± 0.3**	4.0 ± 0.3	4.3 ± 0.4	4.7 ± 0.4

Resting tension was recorded in the absence of calcium at a sarcomere length of 2.1 μm (20% stretch over the slack length). Active tension was recorded at maximal calcium concentration (pCa 4.5). pCa–tension relations were determined under isometric conditions by briefly placing each fibre into solutions of increasing calcium concentration until maximal tension was reached. Data were fitted using linearization of the Hill equation for relative tensions. pCa for half-maximal activation (pCa₅₀) and the Hill coefficient were calculated for each fibre by means of linear regression analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ versus adult (63 days).

Energetic support of sarcoplasmic reticulum ATPase

SR calcium content after 5 min of loading under the support of the different energy transfer pathways was measured in saponin-permeabilized muscle fibres (Fig. 2). The calcium content was assessed by measuring the force transient induced by SR calcium release following stimulation with caffeine. Maximal SR loading capacity was estimated under optimal energetic conditions, in the presence of exogenous ATP, PCr and working mitochondria. In 3-day-old mice, even under optimal conditions, calcium release could be detected in only a few muscle fibres (3 of 7), making the analysis of the data at this time point very difficult. This is nevertheless in line with the low level of expression of different SR proteins (SERCA, phospholamban and calsequestrin) at this stage of development (Fig. 3A). However, at 7 days after birth, significant Ca²⁺ release after loading under optimal energetic conditions (DANC+CK) could be detected (Fig. 2), indicative of SR maturation. At this age, DANC appeared to be as efficient as CK in supporting SR Ca²⁺ loading but less efficient than when both systems acted together ($P = 0.001$ for CK compared to optimal conditions) (Fig. 2). This apparent cooperation disappears later on in development. In the presence of CK and mitochondrial substrates, SR loading was significantly higher between day 7 and adulthood (Fig. 2), confirming that maturation of the SR was occurring (Fig. 3A); maximal loading was reached 21 days after birth. An increase in calcium uptake supported by creatine kinase alone matched this increase in SR loading capacity well, whereas SR Ca²⁺ loading in the presence of mitochondrial substrates did not increase further, indicating that at 7 days *post natum*, mitochondria were already maximally efficient at maintaining a high ATP/ADP ratio near SERCA. ATP alone was significantly less efficient than DANC or CK in supporting SR Ca²⁺ loading at all developmental stages,

thus revealing the importance early on in development of both the DANC and CK pathways in SR energetic support.

Energetic support of myosin-ATPase

In the next experiment, we assessed the ability of the different energetic systems to support myosin-ATPase activity. To do this, we estimated the functional activity of myosin-ATPase under each of the different energetic conditions by measuring the rigor tension developed by fibres when the MgATP concentration was progressively decreased. The ability of DANC+CK and CK alone to support myosin-ATPase activity (in delaying the onset of

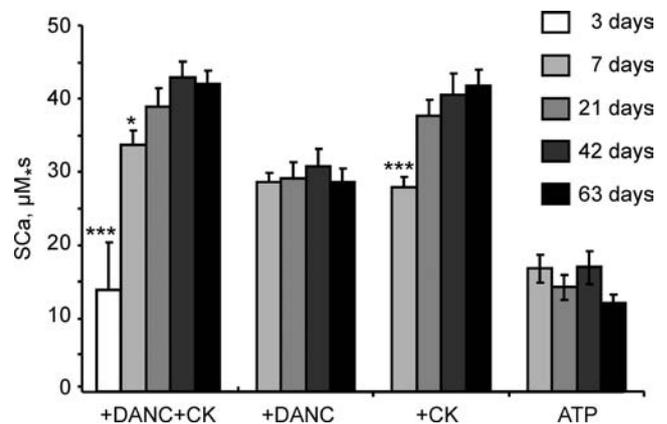


Figure 2. SR calcium loading under different energetic conditions in permeabilized cardiac fibres at different ages

Calcium uptake at pCa 6.5 in the presence of different ATP sources: external (ATP), and endogenous, namely bound CK (+CK), mitochondria (+DANC) or both (+DANC+CK). By relating the subsequent contractile force elicited with caffeine to the calcium–force curve for each fibre, the [Ca²⁺]_i–time integral (SCa) was calculated as an index of SR calcium load. $n = 7$ –10 fibres from 3–7 animals for each age. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ versus adult age (63 days).

rigor) was similar for all ages (Fig. 4). However, when energetic support was provided by DANC only, rigor tension appeared significantly earlier in 3-day-old muscle fibres than in older fibres ($pMgATP_{50}$: 4.03 ± 0.02 and 4.36 ± 0.07 in 3- and 7-day-old muscle fibres respectively, $P < 0.01$). Thus, the mitochondrial energy supply was not yet mature in 3-day-old mice. These results indicate that bound-CK could regulate the ATP/ADP ratio near myosin-ATPase as early as 3 days *post natum* whereas mitochondrial DANC support for the myofibrils matured later. Note that this period between 3 and 7 days after birth is marked by an increase in the α -MHC/ β -MHC ratio (Fig. 3B).

One possible explanation for the emergence of mature mitochondrial DANC between the ages of 3 and 7 days is that mitochondrial function perhaps increased during this short period. Another explanation may be that changes in cardiomyocyte architecture occurred which helped

improve the energetic crosstalk between mitochondria and myosin-ATPase.

Evolution of the intrinsic parameters of energy metabolism

In the next experiment, we studied whether the differences in DANC and CK efficacy are linked to differences in the intrinsic activity of mitochondria and CK during postnatal development. The rate of mitochondrial oxygen consumption was measured in saponin-permeabilized muscle fibres. Respiration rates in the absence (V_0 , basal respiration) or in the presence (V_{max} , maximal respiration) of a saturating ADP concentration increased progressively during postnatal development. A 332% increase in V_{max} was observed between 3 and 63 days of age (Fig. 5A). However, V_{max} values measured in the 3- and 7-day-old mice were not significantly different (4.5 ± 0.6 and $5.9 \pm 0.6 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{g dry weight})^{-1}$, respectively, $P = 0.33$). As the evolution of V_0 during postnatal development followed that of V_{max} , the acceptor control ratio (ACR) therefore remained constant (Fig. 5B). Mitochondrial content, estimated by measuring citrate synthase activity, a marker of the mitochondrial mass (Fig. 5C), was significantly greater in adult heart than in 3-day- or 7-day-old hearts. Similarly, Complex I activity was also considerably higher in older mice (Fig. 5D). The difference in estimated mitochondrial content between 3 and 7 days was not statistically significant (497 ± 63 and $564 \pm 39 \text{ UI (g protein)}^{-1}$, respectively, $P = 0.31$), suggesting that cardiac mitochondrial content did not increase between these ages. The only parameter that was statistically different between these two ages was Complex I activity (Fig. 5D), which had increased by 7 days of age

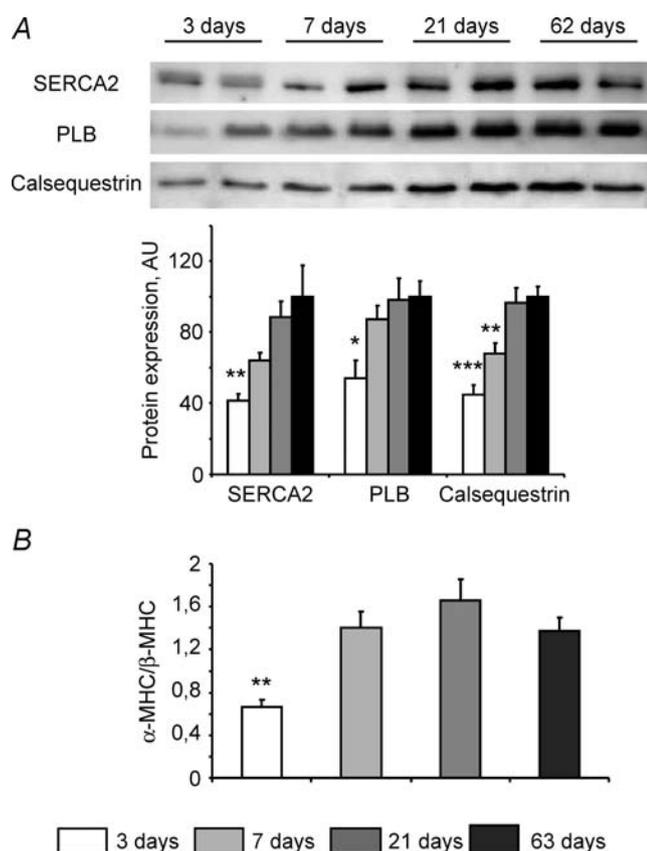


Figure 3. Molecular characterization of the heart at different ages

A, Western blot analysis of SERCA2, phospholamban (PLB) and calsequestrin expression at different ages. Upper panel: representative original recording. Lower panel: mean values of protein content ($n = 8$ for each age). B, ratio of α -MHC to β -MHC mRNA expression measured by real-time quantitative RT-PCR. $N = 8$ animals for each age. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus adult age (63 days).

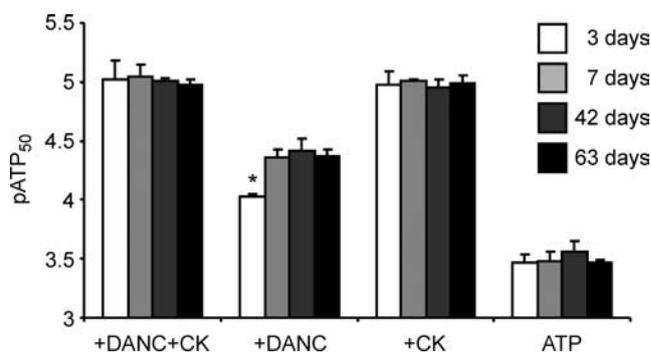


Figure 4. Sensitivity of rigor tension to MgATP from different sources in 3-, 7-, 42- and 63-day-old mice

$pMgATP_{50}$ ($pMgATP$ for half-maximal rigor tension) and role of creatine kinase and/or mitochondria in myofibrillar-ATPase energy supply. Rigor tension was recorded in solutions of decreasing MgATP concentration using different solutions that control ATP sources: external (ATP), and endogenous, namely bound CK (+CK), mitochondria (+DANC) or both (+DANC+CK). $n = 6$ –11 fibres from 3–6 animals for each age. $pMgATP_{50}$: * $P < 0.05$ vs. 63 days.

and which increased further in older mice. In general, these results suggest that the emergence between 3 and 7 days of age of efficient mitochondrial direct ATP channelling to myosin-ATPase was not, in fact, the consequence either of a marked difference in mitochondrial content or in the intrinsic function of mitochondria.

Interestingly, in contrast to the maturation of oxidative capacity, mitochondrial sensitivity to ADP (estimated using the Michaelis constant) did not change during early development (Fig. 5E). In adult animals, whilst the K_m in the presence of creatine was not changed, ADP sensitivity in the absence of creatine showed a spectacular decrease (K_m was augmented from 87 ± 17 in 21-day-old mice to $226 \pm 31 \mu\text{mol l}^{-1}$ in 63-day-old mice), indicating that the functional activity of mitochondrial CK was markedly higher in adult myocardium (Fig. 5F). This evolution in CK function did not, however, correlate with developmental changes in mitochondrial CK expression, which increased rather early (up to 7 days of age) before stabilizing (Fig. 5G). Total CK activity in ventricular tissue (Fig. 5H) showed a progressive increase from 3 days *post natum* up to adult age.

Cardiomyocyte ultrastructure and mitochondrial network organization during development

Since the functional analysis of mitochondria did not reveal why the efficacy of DANC between mitochondria and myosin-ATPase was lower in 3-day-old than 7-day-old mice, we looked instead for changes in cardiomyocyte ultrastructure during this period. Electron microscopy showed that at 3 days *post natum* there was a large amount of cytosolic space in the centre of cardiomyocytes, with the myofibrils situated at the periphery of the cell. The myofibrils were oriented parallel to the longitudinal axis of the cells with the mitochondria clustered in the cytosol predominantly around the nuclei (Fig. 6A). Clearly, in 3-day-old mouse hearts the mitochondrial network was not well organized and intermyofibrillar mitochondria were irregularly dispersed and not aligned (Fig. 6A). Thus, in the youngest mice mitochondria and myofilaments did not show obvious signs of having a mature organisation. By contrast, 7-day-old cardiomyocytes had a substantially less cytoplasmic space (Fig. 6B) and were predominantly filled with clusters of mitochondria arranged along longitudinally oriented myofilaments. Twenty-one days after birth, the ultrastructure of cardiomyocytes was regular, the interior of the cells was filled with myofibrils, and mitochondria were aligned in the longitudinal direction, similar to the appearance of adult cells (Fig. 6C and D).

Another striking difference among myocytes of different ages was in mutual spatial interaction among

mitochondria, sarcoplasmic reticulum and myofibrils. While in 3-day-old myocytes the mitochondria and the sarcoplasmic reticulum are freely distributed in the cytoplasm around myofibrils (Fig. 7A), at later stages of myocyte maturation, there is obvious increase in direct contacts between mitochondria and myofibrils. Indeed, mitochondria and myofilaments were separated by a large cytosolic space in the cells of the youngest mice (Fig. 7A), which greatly decreased at 7 days of age (Fig. 7B). This means that from 7 days of age mitochondria were closer to myosin-ATPase than in the 3-day-old mice. This

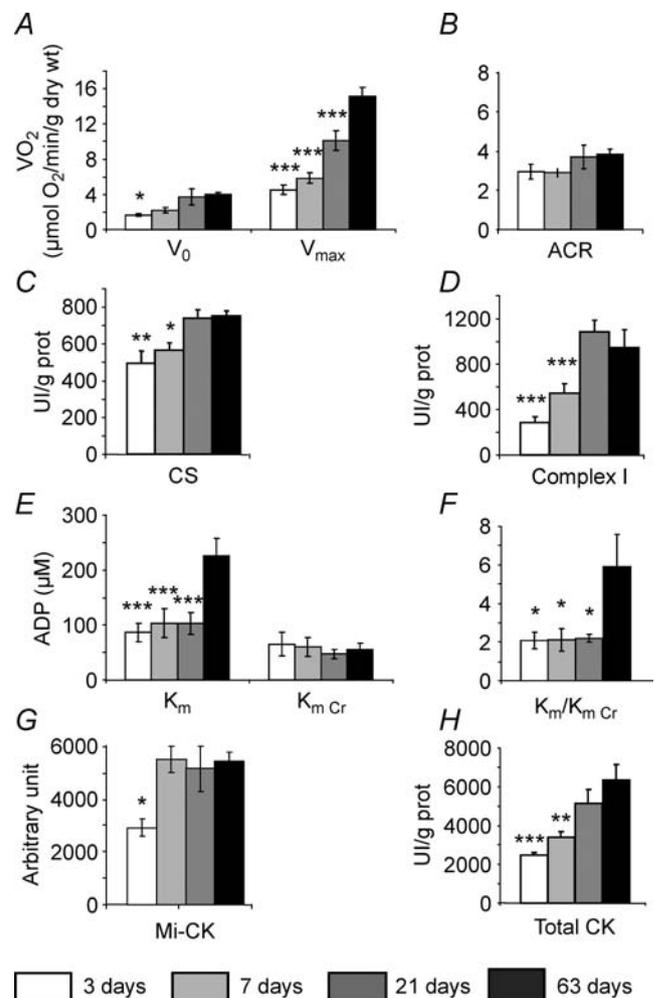


Figure 5. Intrinsic energy metabolism parameters at different ages

A, oxidative capacities of ventricular fibres were measured in the presence of 2 mM ADP, at saturating concentration of substrates. ($n = 15$ fibre bundles from 5–9 animals for each age.) B, acceptor control ratio was calculated as the ratio between maximal respiration rate (V_{max}) and basal respiration rate (V_0). C, citrate synthase (CS) enzymatic activity. D, Complex I enzymatic activity. E, apparent K_m of mitochondrial consumption for ADP without or with 12 mM creatine. F, ratio between K_m without creatine and K_m with creatine. G, Mi-CK expression. H, total CK activity. ($N = 8$ animals for each age.) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus 63 days.

could explain the difference in DANC efficiency between these two ages. In general, mitochondria-myofilament organization at the age of 7 days was more similar to the organization of older cells (Fig. 7C and D) than the organization of 3-day-old mice.

The biochemical and functional data indicated that there was not much SR at 3 days after birth. Indeed, sarcoplasmic reticulum could only be seen occasionally (Fig. 8A). By contrast, in 7-day-old cardiomyocytes the SR was developed. The longitudinal SR displayed short profiles and chains of vesicles near the myofibrils (Fig. 8B).

Older cells (21 days and 63 days) clearly showed mature longitudinal SR and t-tubules forming dyads near Z-lines (Fig. 8C and D).

Maturation process of the ultrastructure was not homogeneous. This is confirmed by stereological quantification of changes in volume densities of major organelles (Fig. 9). Comparison of changes in volume densities reveals earlier maturation of the mitochondrial content compared to the content of myofibrils. Of note is the drastic decrease in the cytosol content between 3 and 7 days and the peak of lipid drops content at the 7 day.

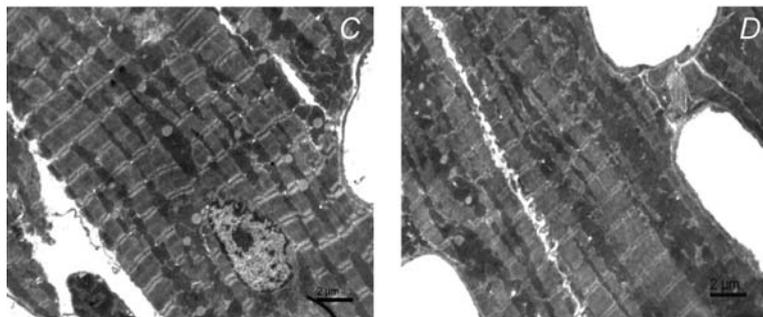
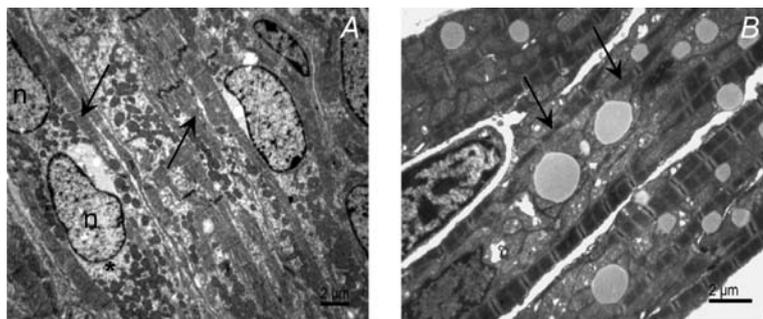


Figure 6. Electron micrographs of cardiomyocytes of papillary muscle

A, 3-day-old cardiomyocytes having a high content of free cytoplasm, myofibrils situated under the plasma membrane (arrows) and mitochondria clustered in the perinuclear regions (*). B, 7-day-old cardiomyocytes showing abundant mitochondrial clusters, and myofilaments of small diameters (arrows). C, 21-day-old cardiomyocytes showing regularly arranged myofilaments and mitochondria aligned in the longitudinal direction. D, 63-day-old cardiomyocytes demonstrating regular overall ultrastructure. Myofilaments and mitochondria are arranged in parallel along the longitudinal axis.

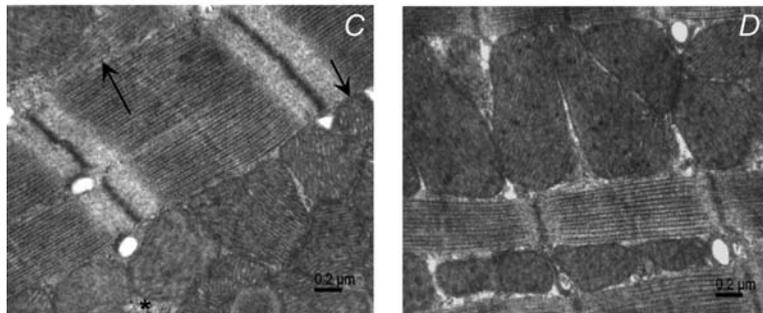
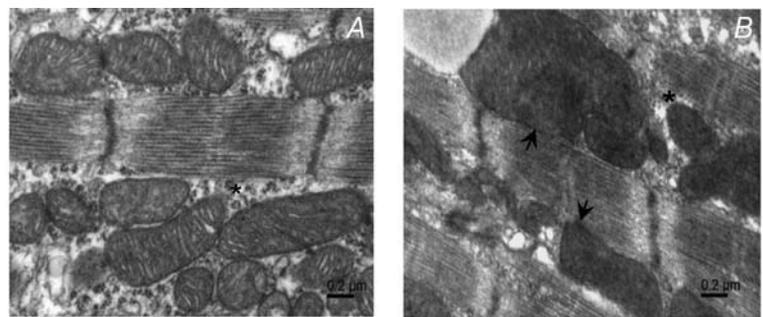
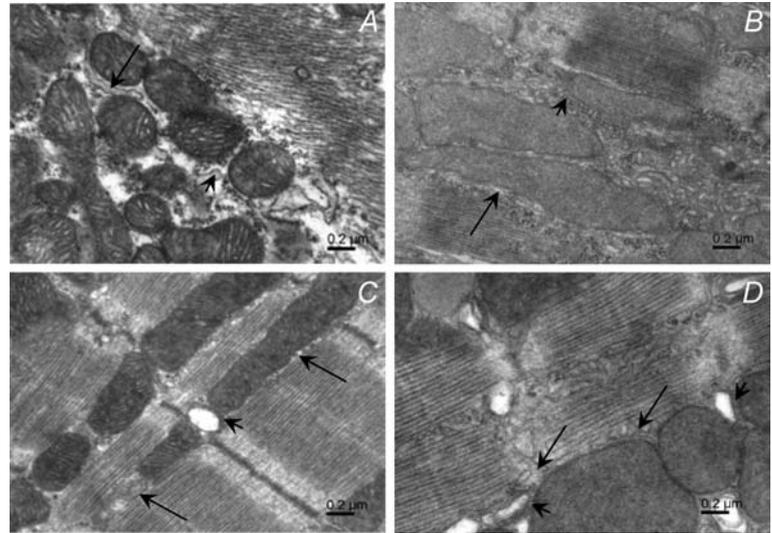


Figure 7. Spatial interaction between mitochondria and myofilaments in developing cardiomyocytes

A, 3-day-old cardiomyocytes with large cytoplasmic space (*) between myofilaments and mitochondria which are not in tight contact to each other. B, 7-day-old cardiomyocytes showing mitochondria in direct contact with myofilaments (short arrows) even though a thin layer of cytoplasm can still be found between mitochondria and myofibrils (*). C, 21-day-old cardiomyocytes with well developed longitudinal SR (arrow) and mitochondria in close contact with the myofibrils (short arrow). D, 63-day-old cardiomyocytes with mitochondria in direct contact with myofilaments.

Figure 8. Electron micrographs of cardiomyocytes showing spatial relationship of mitochondria and sarcoplasmic reticulum

A, mitochondrial cluster in 3-day-old mice cardiomyocytes. Profiles of rough endoplasmic reticulum (short arrow) and short stretches of sarcoplasmic reticulum (arrow) are present between mitochondria. **B**, 7-day-old cardiomyocytes show the presence of longitudinal sarcoplasmic reticulum between the myofilaments and the mitochondrial surface (arrow). Occasionally, short stretches of rough endoplasmic reticulum near the mitochondria are still observed (short arrow). **C**, 21-day-old cardiomyocytes with well developed longitudinal sarcoplasmic reticulum (arrows). The cisternae of SR of the dyads occur in the close vicinity of the mitochondrial surface (short arrow). **D**, 63-day-old cardiomyocytes display a rich network of sarcoplasmic reticulum (arrows) and cisternae of SR (short arrow) close to mitochondria.



Discussion

In the present study, we investigated the formation of intracellular energetic pathways during the hypertrophic phase of postnatal development of the mouse heart. We correlated the efficacy of energy transfer by DANC and CK with the degree of cell organization and organelle function. The main finding is that maturation of these two pathways is not simultaneous. Unexpectedly, we found that DANC was as efficient at regulating local SR and myosin-ATPase function from 7 days *post natum* as it was in adult cardiomyocytes, despite there being a non-maximal respiration capacity. By contrast, CK efficacy for acto-myosin ATPase regulation was maximal from 3 days *post natum*, whereas for SR ATPase regulation it progressively increased until 21 days *post natum*. Importantly, between 3 and 7 days after birth, we saw major cytoarchitectural remodelling, which is probably crucial to the improvement in energy transfer between mitochondria and myosin-ATPase. Our results highlight the complex relationship between energetics, architecture and cell function, and the need for very early optimization of local energy regulation.

Postnatal development as a model of physiological hypertrophy

Postnatal development offers a unique opportunity to understand the physiological importance of cell architecture and mitochondrial network organization in mammalian cardiac cell. If early postnatal growth is achieved by hyperplasia, very rapidly (3 days after birth in the mouse heart; see Leu *et al.* 2001) a second phase occurs involving hypertrophy of the cardiomyocyte. It is during this hypertrophic phase that the complex structures

involved in excitation–contraction coupling like SR or T tubules develop, providing the cardiomyocyte with a compartmented Ca^{2+} handling system and efficient amplification of the calcium signal.

Based on the results obtained in this study, the period between 3 and 7 days after birth appears to be an important step in the building up of mitochondria–SR and mitochondria–myofibril contacts in mouse cardiomyocytes. It is also during this period that SR and T-tubules organization is built up for maximum excitation–contraction coupling efficiency. Thus, it seems probable that this is during this short period of time that mitochondria, myofibrils and SR acquire their fixed position to form an effective intracellular energetic unit.

Interestingly, after 7 days, even if some modifications still occur, the whole cytoarchitecture organization seems

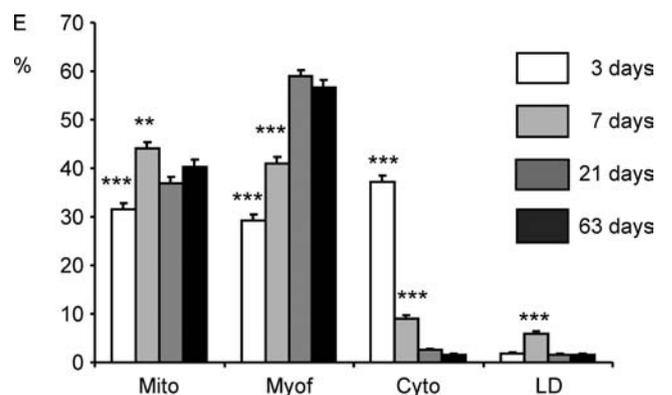


Figure 9. Stereological measurements of cardiomyocytes of papillary muscles

Relative cell volume occupied by mitochondria (Mito), myofilaments (Myof), cytosol (Cyto) and lipid drops (LD), evaluated from 20 images taken from 2 hearts of animals for each age. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ versus 63 days.

to be almost completed. The major changes observed between 7 and 21 days is a further increase in the myofilament compartment at the expense of the cytosol. It means that after this period, there is probably another type of hypertrophy where no major remodelling of the contacts between organelles occurs.

In parallel, compartmentation of the CK system contributes to cell maturation and the development of a sophisticated pathway of energy transfer from sites of energy production to sites of utilization (Hoerter *et al.* 1994; Tiivel *et al.* 2000). The mitochondrial network also undergoes profound remodelling. Mitochondria appear as isolated ellipsoids or tubules in embryonic stages but then reorganize into a reticular network in the adult heart (Muhlfeld *et al.* 2006). Moreover, mitochondrial volume increases and mitochondria exhibit morphological remodelling, causing changes in mitochondrial regulation and the formation of restricted diffusion domains (Anmann *et al.* 2006).

Our results show that the maturation of oxidative capacities is a rather long process. Despite the fact that major mitochondria network modifications are already visible by 21 days, there is a large increase of maximal respiration capacity (V_{\max}), suggesting the presence of more active mitochondria in adult heart. Perhaps more importantly, after 21 days, the access of external ADP to mitochondria becomes much more limited, which could be evidenced by a dramatic rise in the apparent K_m for ADP. This indicates appearance of a new energetic microdomain in the mitochondrial cellular compartment that needs mitochondrial CK to ensure adenine nucleotide exchange with extramitochondrial compartments. This long-lasting process of maturation of the mitochondrial sensitivity to ADP may also be related to development of various systems controlling ADP accessibility, for example adenine nucleotide translocase (ANT), in particular, isoform ANT1, which shows relatively slow maturation (Skarka *et al.* 2003). The time course of development of voltage-dependent anion channels (VDACs) or tubulin-related structures, which seem to be involved in the regulation of adenine nucleotide fluxes (Timohhina *et al.* 2009), might also determine such a maturation.

Lastly, the appearance of cell crowding and dense cytoarchitecture of the adult cardiomyocyte is well evidenced by the drastic decrease of the cytosolic compartment from $37.3 \pm 1.3\%$ at 3 days to $1.6 \pm 0.3\%$ in the adult.

Interestingly, between 21 days and 2 months there is a marked decrease in heart weight to body weight ratio. This suggests that the previous setting of all compartments and organisation of mitochondrial network allow cardiomyocytes to increase their contractile and metabolic efficiency, despite no major modification of cytoarchitecture arrangement.

Local regulation of energy-handling in the vicinity of ATPases during development

An important finding of this study is that energetic microdomains are established very early in the development of the mouse heart. Already by 3 days *post natum*, both DANC and CK regulate the ATP/ADP ratio near myosin ATPase much more effectively than simple adenine nucleotide diffusion. This is probably a very important developmental change, because the cardiomyocyte cytosol rapidly becomes densely packed and diffusion between organelles limited. At 3 days *post natum*, MM-CK appears to be at its maximal capacity in supporting myosin ATPase function. Moreover, energetic compartmentation in the mouse heart appears earlier than in the rat (Hoerter *et al.* 1994) or rabbit heart, in which the CK system is not very efficient until at least 8 days *post natum* (Hoerter *et al.* 1991), but it appears later than in the guinea pig where the CK system is already compartmented before birth (Hoerter *et al.* 1994). In contrast, we found that CK bound close to SERCA in mouse cardiomyocytes becomes maximally efficient only after 3 weeks of age. Thus bound CK in the vicinity of myofibrillar-ATPase becomes more efficient much earlier than bound CK in the vicinity of SERCA, even though the same CK isoform (MM-CK) is involved (Rossi *et al.* 1990; Wallimann & Eppenberger 1985). It would therefore seem that CK is preferentially localized near the myofilaments at the beginning of life *post natum* in the mouse.

Efficient direct energy transfer from mitochondria to myosin ATPase appears to be dependent on the cytoarchitecture, in contrast to the CK-supported energy transfer, which seems mainly to depend on enzyme expression and specific localisation. Indeed, we observed a significant improvement in the local regulation of myosin ATPase by mitochondria between 3 and 7 days after birth, despite unchanged maximal respiration capacity of mitochondria and myofilament to mitochondria ratio (Fig. 9), and an increase in myofilament energy demand evidenced by an increasing proportion of α -MHC isoform having the highest ATPase activity (Schiaffino & Reggiani 1996). It is during this period that major cytoarchitectural modifications are seen; the cytosolic space drastically diminishes, and the cells become densely packed and filled with clusters of mitochondria in close proximity to longitudinally oriented myofibrils (Figs 6 and 8) leading to restricted diffusion in the cytosol (Saks *et al.* 1991).

The close contact between mitochondria and SR occurs very early in development and in parallel with maturation of the SR. In our study, the absence of calcium release in several 3-day-old fibres could have been due to immaturity of the SR consisted with the low expression of SERCA2 in the youngest mice. Indeed, at 3 days of age, SR density is very low with little SR maturation visible. As a matter of fact, the contraction of very young cardiomyocytes is less

dependent on SR calcium release but highly dependent on transarcolemmal Ca^{2+} influx (Tanaka *et al.* 1998; Schroder *et al.* 2006). In 7-day-old mice, by contrast, the SR could easily be seen and functionally reached about 80% of the adult capacity. More importantly, it was as efficiently coupled to mitochondria as in adult heart.

In conclusion, we have shown in this paper the early formation of energetic micro-domains during the postnatal development of the mouse heart, and the need for the maturation of cell architecture to achieve maximal efficacy of mitochondria for the regulation of ATPases. We think that postnatal development constitutes a good model for understanding the role of energetic and of cytoarchitecture in the optimization of cardiac function.

References

- Anmann T, Guzun R, Beraud N, Pelloux S, Kuznetsov AV, Kogerman L, Kaambre T, Sikk P, Paju K, Peet N, Seppet E, Ojeda C, Tournier Y & Saks V (2006). Different kinetics of the regulation of respiration in permeabilized cardiomyocytes and in HL-1 cardiac cells. Importance of cell structure/organization for respiration regulation. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1597–1606.
- De Sousa E, Veksler V, Minajeva A, Kaasik A, Mateo P, Mayoux E, Hoerter J, Bigard X, Serrurier B & Ventura-Clapier R (1999). Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure. *Circ Res* **85**, 68–76.
- Estornell E, Fato R, Pallotti F & Lenaz G (1993). Assay conditions for the mitochondrial NADH:coenzyme Q oxidoreductase. *FEBS Lett* **332**, 127–131.
- Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V & Ventura-Clapier R (2003). Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* **551**, 491–501.
- Hew KW & Keller KA (2003). Postnatal anatomical and functional development of the heart: a species comparison. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **68**, 309–320.
- Hoerter JA, Kuznetsov A & Ventura-Clapier R (1991). Functional development of the creatine kinase system in perinatal rabbit heart. *Circ Res* **69**, 665–676.
- Hoerter JA, Ventura-Clapier R & Kuznetsov A (1994). Compartmentation of creatine kinases during perinatal development of mammalian heart. *Mol Cell Biochem* **133–134**, 277–286.
- Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A & Ventura-Clapier R (2001). Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res* **89**, 153–159.
- Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R & Kunz WS (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibres, tissues and cells. *Nat Protoc* **3**, 965–976.
- Leu M, Ehler E & Perriard JC (2001). Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anat Embryol (Berl)* **204**, 217–224.
- Minajeva A, Ventura-Clapier R & Veksler V (1996). Ca^{2+} uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum ATPase in situ strongly depends on bound creatine kinase. *Pflugers Arch* **432**, 904–912.
- Muhlfeld C, Urru M, Rumelin R, Mirzaie M, Schondube F, Richter J & Dorge H (2006). Myocardial ischemia tolerance in the newborn rat involving opioid receptors and mitochondrial K^{+} channels. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **288**, 297–303.
- Ogata T & Yamasaki Y (1985). Scanning electron-microscopic studies on the three-dimensional structure of mitochondria in the mammalian red, white and intermediate muscle fibres. *Cell Tissue Res* **241**, 251–256.
- Ostadal B, Ostadalova I & Dhalla NS (1999). Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol Rev* **79**, 635–659.
- Rossi AM, Eppenberger HM, Volpe P, Cotrufo R & Wallimann T (1990). Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca^{2+} uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *J Biol Chem* **265**, 5258–5266.
- Saks VA, Belikova YO & Kuznetsov AV (1991). In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *Biochim Biophys Acta* **1074**, 302–311.
- Saks VA, Kaambre T, Sikk P, Eimre M, Orlova E, Paju K, Piirsoo A, Appaix F, Kay L, Regitz-Zagrosek V, Fleck E & Seppet E (2001). Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem J* **356**, 643–657.
- Saks VA, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova OYu & Kuznetsov AV (1994). Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration: a synthesis. *Mol Cell Biochem* **133–134**, 155–192.
- Schiaffino S & Reggiani C (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* **76**, 371–423.
- Schroder EA, Wei Y & Satin J (2006). The developing cardiac myocyte: maturation of excitability and excitation-contraction coupling. *Ann N Y Acad Sci* **1080**, 63–75.
- Seppet EK, Eimre M, Anmann T, Seppet E, Peet N, Kaambre T, Paju K, Piirsoo A, Kuznetsov AV, Vendelin M, Gellerich FN, Zierz S & Saks VA (2005). Intracellular energetic units in healthy and diseased hearts. *Exp Clin Cardiol* **10**, 173–183.
- Seppet EK, Kaambre T, Sikk P, Tiivel T, Vija H, Tonkonogi M, Sahlin K, Kay L, Appaix F, Braun U, Eimre M & Saks VA (2001). Functional complexes of mitochondria with Ca, MgATPases of myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *Biochim Biophys Acta* **1504**, 379–395.
- Skarka L, Bardova K, Brauner P, Flachs P, Jarkovska D, Kopecky J & Ostadal B (2003). Expression of mitochondrial uncoupling protein 3 and adenine nucleotide translocase 1 genes in developing rat heart: putative involvement in control of mitochondrial membrane potential. *J Mol Cell Cardiol* **35**, 321–330.
- Tanaka H, Sekine T, Nishimaru K & Shigenobu K (1998). Role of sarcoplasmic reticulum in myocardial contraction of neonatal and adult mice. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **120**, 431–438.

- Tiivel T, Kadaya L, Kuznetsov A, Kaambre T, Peet N, Sikk P, Braun U, Ventura-Clapier R, Saks V & Seppet EK (2000). Developmental changes in regulation of mitochondrial respiration by ADP and creatine in rat heart in vivo. *Mol Cell Biochem* **208**, 119–128.
- Timohhina N, Guzun R, Tepp K, Monge C, Varikmaa M, Vija H, Sikk P, Kaambre T, Sackett D & Saks V (2009). Direct measurement of energy fluxes from mitochondria into cytoplasm in permeabilized cardiac cells in situ: some evidence for mitochondrial interactosome. *J Bioenerg Biomembr* **41**, 259–275.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A & Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, research0034.1-0034.II.
- Veksler VI, Kuznetsov AV, Anflous K, Mateo P, van Deursen J, Wieringa B & Ventura-Clapier R (1995). Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *J Biol Chem* **270**, 19921–19929.
- Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI & Saks VA (1987). Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibres. *Biochim Biophys Acta* **892**, 191–196.
- Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, Boehm E & Anflous K (1998). Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem* **184**, 231–247.
- Ventura-Clapier R, Kuznetsov AV, d'Albis A, van Deursen J, Wieringa B & Veksler VI (1995). Muscle creatine kinase-deficient mice. I. Alterations in myofibrillar function. *J Biol Chem* **270**, 19914–19920.
- Ventura-Clapier R & Veksler V (1994). Myocardial ischemic contracture. Metabolites affect rigor tension development and stiffness. *Circ Res* **74**, 920–929.
- Wallimann T & Eppenberger HM (1985). Localization and function of M-line-bound creatine kinase. M-band model and creatine phosphate shuttle. *Cell Muscle Motil* **6**, 239–285.
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K & Eppenberger HM (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* **281**, 21–40.
- Wharton DC & Tzagoloff A (1967). Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol* **10**, 245–250.
- Wilding JR, Joubert F, de Araujo C, Fortin D, Novotova M, Veksler V & Ventura-Clapier R (2006). Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts. *J Physiol* **575**, 191–200.

Author contributions

J.P. carried out the major part of the experimental work. M.N. performed and commented on images of electron microscopy (in the Slovak Republic). D.F. measured enzyme activities and prepared tissues for electron microscopy analysis. A.G. carried out real-time quantitative PCR experiment. All authors were involved in study design, data analysis and interpretation. J.P., M.N., R.V.-C., V.V. and F.J. wrote the paper and contributed to figure preparation. All authors discussed the results, commented on the manuscript and approved the version to be published.

Acknowledgements

This work was in part supported by a grant VEGA 2/0174/09. We thank Dr R. Fischmeister for continuous support and Dr J. Wilding for careful reading of the manuscript. We also thank Valérie Domergue-Dupont and the animal care facility of IFR141 for efficient handling and preparation of the animals. In addition, we thank Ladislav Novota for skilful technical assistance. This work was supported by grants from the European Union contract LSHM-CT-2005-018833/EUGeneHeart. R.V.-C. and F.J. are scientists at Centre National de la Recherche Scientifique.

La mesure des paramètres anatomiques a montré une augmentation progressive du poids du cœur au cours du développement postnatal et un accroissement du rapport « poids du cœur/poids du corps » durant les trois premières semaines de vie. Cette hypertrophie cardiaque a été accompagnée par une augmentation remarquable de la force développée par les fibres ventriculaires cardiaques, traitées à la saponine, jusqu'à 21 jours après la naissance. Ceci reflète une amélioration des capacités contractiles du myocarde qui dans le cas de cette étude est probablement due à une densification du réseau myofibrillaire des cardiomyocytes (Smith & Page, 1977 ; Lim *et al.*, 1983 ; Reiser *et al.*, 1994).

Les transferts énergétiques étant au centre de la question posée, l'étude a, dans un premier temps, porté sur la maturation des différents systèmes de transfert d'énergie.

L'estimation de la capacité des différents acteurs (CK et mitochondries) à approvisionner SERCA en molécules énergétiques a été réalisée de manière indirecte en mesurant la charge calcique du RS induite dans différentes conditions d'apport énergétique. Cette évaluation de la participation des CK et des mitochondries à la régulation du rapport ATP/ADP au voisinage de SERCA a montré dans un premier temps que le système des CK liées près de l'ATPase fonctionne dès 7 jours mais ne devient pleinement fonctionnel qu'à partir de 21 jours ; ceci est en adéquation avec la mesure de l'activité totale de la CK qui augmente jusqu'à 21 jours. La canalisation directe des nucléotides adényliques entre les mitochondries et SERCA, pour sa part, est apparue mature dès la première semaine de vie postnatale. Il est à noter que l'immaturation du RS à 3 jours, confirmée par le faible niveau d'expression des protéines spécifiques de cet organite (SERCA, Phospholamban, et Calséquestrine) ainsi que par l'observation des structures internes par microscopie électronique, n'a pas permis d'étudier l'état fonctionnel des différents systèmes énergétiques à cet âge.

Concernant l'implication des systèmes énergétiques dans le fonctionnement de l'ATPase des myofilaments, il a été montré que la canalisation directe gagne en efficacité entre 3 et 7 jours, âge auquel le système atteint sa maturité. Ceci est à corrélérer avec le fait qu'à partir de 7 jours, la demande énergétique des myofilaments augmente considérablement puisque la densité de myofilaments et la proportion de l'isoforme α -MHC, ayant une activité ATPasique plus importante que la β -MHC (Schiaffino & Reggiani, 1996), s'accroissent. Les CK liées au niveau des myofilaments sont pour leur part capables, dès l'âge de 3 jours, d'approvisionner la myosine-ATPase en énergie aussi efficacement que chez les souris adultes.

De manière intéressante, il semble que l'étude du système des CK liées indiquerait que la maturation des micro-domaines énergétiques est plus précoce au niveau des myofilaments et ce malgré l'expression de la même isoforme (MM-CK) près de SERCA et de la myosine-ATPase (Wallimann & Eppenberger, 1985 ; Rossi *et al.*, 1990). Tout se passe comme-ci la MM-CK était préférentiellement localisée au niveau des myofilaments au début de la vie postnatale de manière à privilégier la fonction myofilamentaire. Celle-ci est en effet indispensable à la contraction qui peut en revanche se passer dans un premier temps de la fonction du RS puisqu'à la naissance, et dans les jours qui suivent, cet organite ne joue pas un rôle de premier plan dans le mécanisme de contraction du cardiomyocyte (Chin *et al.*, 1990 ; Tanaka *et al.*, 1998).

L'étape suivante a consisté à déterminer si l'augmentation de l'apport d'énergie par canalisation directe entre les mitochondries et l'ATPase des myofilaments, observée entre 3 et 7 jours, était due à une maturation de la fonction mitochondriale ou à la mise en place d'une architecture cellulaire adéquate.

L'étude de la fonction mitochondriale a montré que les capacités oxydatives augmentent progressivement au cours du développement postnatal. La période postnatale est en effet marquée par des processus hypertrophiques physiologiques pour lesquels il a déjà été montré que les capacités oxydatives s'adaptent à la taille de la cellule (Rimbaud *et al.*, 2009b). Ceci s'explique par l'accroissement de la masse mitochondriale (estimée au moyen de l'activité de la CS), par l'augmentation de l'activité des complexes, et pourrait également être la conséquence d'une plus grande efficacité de la chaîne respiratoire durant la croissance en raison d'adaptations intrinsèques mitochondriales comme des modifications de la composition de la membrane interne et notamment la composition en cardiolipine (Fry & Green, 1981). De manière intéressante, le K_m pour l'ADP affiché par les mitochondries, qui reflète la sensibilité de la respiration mitochondriale à l'ADP, est constant jusqu'à 21 jours avant d'augmenter drastiquement à 63 jours. Ceci pourrait être la conséquence de la densification des structures internes telles que les myofilaments qui limiterait ainsi les voies d'accès de l'ADP externe (ajouté dans les solutions) aux mitochondries. L'ajout de créatine dans le milieu réactionnel ne provoque en outre une diminution du K_m qu'à partir de cet âge avancé, signifiant que la mi-CK acquiert un réel rôle fonctionnel que très tardivement. Cependant, la mesure de l'activité de la mi-CK a montré que celle-ci est active chez les jeunes souris, suggérant alors que la mi-CK fonctionne très tôt mais que son rôle ne serait pas visible puisqu'il n'y a pas d'obstacle à la diffusion de l'ADP en début de vie postnatale.

Si la mesure de nombreux paramètres (V_0 , V_{max} , ACR, activité de la CS et du complexe I) a permis de caractériser la maturation de la fonction mitochondriale, elle n'a cependant pas pu mettre en évidence de différence fonctionnelle significative entre les mitochondries de souris âgées de 3 et 7 jours. Ce résultat démontre clairement que le gain d'efficacité de la canalisation directe observé entre ces deux âges n'est pas dû à une fonction mitochondriale plus importante à 7 jours.

Les éléments de réponse pouvant expliquer la maturation du système de canalisation directe ont été apportés par l'observation de l'architecture cellulaire durant le développement. Cette analyse des structures internes des cardiomyocytes a clairement montré un réarrangement important des composants cytoplasmiques entre 3 et 7 jours. En l'espace de seulement 4 jours, la cellule passe d'une organisation anarchique, où les mitochondries intermyofibrillaires ne sont pas alignées et sont séparées des myofilaments par un large espace cytoplasmique, à une organisation ressemblant fortement à celle affichée par l'adulte. A 7 jours, tous les éléments cellulaires sont en effet mis en place et les mitochondries sont bien alignées le long des myofibrilles et en contact direct avec les myofilaments. La quantification des constituants cellulaires par des méthodes stéréologiques a également permis d'appréhender le niveau de structuration présenté par les cellules 7 jours après la naissance puisque le volume de cytoplasme libre (non occupé par les organelles ou les myofilaments) diminue considérablement entre 3 et 7 jours. La synchronisation parfaite de la maturation de la canalisation directe et de cette organisation architecturale particulière, où la proximité des mitochondries et des myofilaments peut créer un microenvironnement favorisant les échanges entre ces deux acteurs et limiter la diffusion des molécules énergétiques vers le cytoplasme, semble montrer que la cytoarchitecture est impliquée dans l'efficacité de la régulation de l'activité des ATPases par la mitochondrie.

Au-delà de la mise en évidence d'une formation très précoce des micro-domaines énergétiques pendant le développement postnatal, ce travail a permis de mettre en avant un nouvel argument poussant à penser que le système de canalisation directe est directement dépendant d'une architecture cellulaire particulière.

L'un des points critiques de cette étude résidait dans le fait de choisir les âges idoines qui devaient permettre de mettre à jour les principaux changements énergétiques et architecturaux survenant au cours du développement postnatal chez la souris. Ce choix a de

plus été complexifié par la sélection de l'espèce puisque la majorité des études menées sur le développement périnatal du cœur l'ont été sur le rat, le lapin et le cobaye (Hoerter *et al.*, 1994 ; Ostadal *et al.*, 1999 ; Hew & Keller, 2003). La souris étant cependant devenue, avec l'émergence des animaux transgéniques, l'espèce la plus utilisée en expérimentation animale, il semblait judicieux de réaliser cette étude chez ce rongeur. Devant la faiblesse de l'information, les âges étudiés ont été désignés avec l'appui d'une étude réalisée par l'équipe de J.C. Perriard qui détermine la temporalité des phases hyperplasiques et hypertrophiques du développement cardiaque (Leu *et al.*, 2001). L'ensemble des résultats démontrent clairement que la désignation des âges était pertinente.

Chapitre II : Morphologie mitochondriale et transferts énergétiques

I. Présentation

La cellule musculaire cardiaque présente une architecture cellulaire très complexe qui, comme il a été montré dans l'étude précédente, semble jouer un rôle essentiel dans les régulations énergétiques des acteurs impliqués dans les mécanismes de contraction (SERCA et la myosine-ATPase notamment). La mitochondrie faisant partie intégrante de cette architecture et étant modelée par des mécanismes de fusion et de fission, la deuxième étape de ce projet a consisté à étudier l'implication de la dynamique mitochondriale dans l'énergétique du cardiomyocyte.

L'étude a été menée sur un modèle de souris présentant un déficit d'expression pour une protéine impliquée dans le processus de fusion mitochondriale (OPA1). La littérature faisant état de nombreux travaux réalisés sur des modèles déficients pour des protéines de la dynamique mitochondriale (Chen *et al.*, 2003 ; Olichon *et al.*, 2003 ; Cipolat *et al.*, 2004 ; Griparic *et al.*, 2007), il était raisonnable de penser que la morphologie des mitochondries et du réseau mitochondrial puisse être affectée dans le modèle de souris utilisé.

Si le principal intérêt de cette étude, à cet état d'avancement du projet, résidait dans le fait que la mise en évidence d'un déficit de transfert d'énergie associé à une perturbation de la morphologie mitochondriale serait un élément supplémentaire pour assurer que l'architecture et l'énergétique cellulaire sont liées, il était également intéressant d'approcher les phénomènes de la dynamique mitochondriale dans le cœur adulte qui constituent un champ d'investigation relativement nouveau. De plus, le modèle murin utilisé développant une atrophie optique en réponse à la diminution d'expression de la protéine OPA1, l'étude de la fonction cardiaque de ces souris affiche un côté exotique captivant puisque l'essentiel des études menées sur les conséquences d'un déficit d'expression de cette protéine se cloisonnent souvent au domaine mécanistique ou aux neurosciences (Votruba *et al.*, 1998 ; Olichon *et al.*, 2002 ; Pellegrini & Scorrano, 2007 ; Davies *et al.*, 2007 ; Lenaers *et al.*, 2009).

L'expérimentation a eu recours à un ensemble de techniques permettant d'étudier la fonction cardiaque, le réseau mitochondrial et plus généralement l'architecture cellulaire, la fonction mitochondriale ainsi que l'efficacité des transferts énergétiques chez ce modèle de

souris. Ces animaux ont également subi un stress hémodynamique, par la pose d'un clip aortique, de manière à observer si la fonction cardiaque pouvait se révéler plus sensible à ce type de contrainte lorsque l'expression de la protéine OPA1 est altérée.

II. Résultats et discussion

Ce chapitre a fait l'objet d'un article qui a été soumis à *Cardiovascular research*.

**DOWN-REGULATION OF OPTIC ATROPHY 1 (OPA1) PROTEIN
ALTERS MITOCHONDRIAL MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL
PROPERTIES AS WELL AS CARDIAC ADAPTATION TO OVERLOAD.**

Jérôme Piquereau^{1,2}, Fanny Caffin^{1,2}, Philippe Mateo^{1,2}, Dominique Fortin^{1,2}, Marta Novotova³, Marcel Alavi⁴, Renée Ventura-Clapier^{1,2}, Vladimir Veksler^{1,2} and Frédéric Joubert^{1,2}

¹INSERM, U-769, F-92296 Châtenay-Malabry, France;

²Univ Paris-Sud, IFR141, F-92296 Châtenay-Malabry, France;

³Institute of Molecular Physiology & Genetics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic;

⁴Genetics Laboratory, Institute for Ophthalmic Research, Centre for Ophthalmology, University of Tübingen, Tübingen, Germany

Running title: OPA1 deficit and cardiac mitochondria

Key words: cardiac energy metabolism; mitochondria; mitochondrial dynamics; permeability transition pore; hypertrophy.

Address for correspondence: Dr Frédéric Joubert

U-769 INSERM

Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud

5 rue J-B Clément, 92296 Châtenay-Malabry

France

Tel.: (33-1) 46.83.57.17.

Fax: (33-1) 46.83.54.75.

E-mail: frederic.joubert@u-psud.fr

ABSTRACT

AIMS: Optic atrophy 1 (OPA1) protein is classically considered as an essential protein involved in mitochondrial dynamics and especially in the fusion of inner membranes of mitochondria. Thus, this protein is involved in the modelling of the highly organized mitochondrial network in the cardiomyocyte which play a key role in intracellular energetic transfers. However, the exact role of OPA1 in heart has been poorly explored. The aim of this study was to determine the phenotype of mouse heart with a partial deletion of Opa1 gene, to study the link between mitochondrial dynamics, energy transfer, mitochondrial morphology and heart function.

METHODS AND RESULTS: Opa1^{+/-} heterozygote mice showing a 30% reduction in OPA1 protein expression in the cardiac tissue were used in this study. Morphology of the mitochondrial network in Opa1^{+/-} was altered as revealed by electron and fluorescence microscopy: unexpectedly, mitochondria are larger, with the presence of clusters of fused mitochondria and alterations of mitochondrial cristae. In permeabilized ventricular fibers, oxidative capacities were maintained, but energy transfer between mitochondria and myofilaments was weakened. Interestingly, mitochondrial permeability transition pore (PTP) opening, estimated in isolated permeabilized cardiomyocytes, was less sensitive to intramitochondrial calcium accumulation. In mutant mice, cardiac function assessed by echocardiography was not significantly different from control. However, 6 weeks after transversal aortic constriction (TAC), Opa1^{+/-} hearts demonstrated hypertrophy two-fold higher than in wild -type hearts (p<0.001); similarly, ejection fraction is greatly altered compared to sham (31% versus 48% respectively, p<0.001).

CONCLUSION: The results suggest that in adult cardiomyocytes, OPA1 plays an important role in mitochondrial morphology and in PTP functioning. These properties may be critical for cardiac function under conditions of chronic pressure overload.

INTRODUCTION

Mitochondria are dynamic organelles which exhibit a variability in size, number, location and morphology.¹ The main processes which govern mitochondrial shape changes are fission and fusion. In mammalian cells, mitochondrial fission is regulated by dynamin-related protein 1 (DRP1) and its receptor FIS1 (Fission mediator protein 1) (for review see²). As for mitochondrial fusion, it is mediated by two dynamin-related proteins, mitofusin (MFN1 and MFN2)³ involved in outer membrane fusion, and OPA1 (Optic atrophic type 1 protein) that is closely related to the inner membrane.⁴ Mitochondrial fusion and fission are highly regulated and tightly balanced processes. The regulation of this dynamic state of the mitochondrial network is essential for the energetic of the cell. Indeed, a shift in the balance of the mitochondrial dynamic processes provokes division or elongation of mitochondria and mutations of genes encoded proteins involved in mitochondrial dynamics lead to severe diseases, and especially neurological disorders such as Charcot-Marie-Tooth disease type 2A or autosomal dominant optic atrophy (ADOA).^{5,6}

OPA1 is one of the most studied mitochondrial dynamic proteins because its mutation is responsible for the ADOA.⁷ Knowing that the main clinical features of this disease are a loss of central vision and colour vision abnormalities,⁸ the majority of the studies concerning OPA1 have been focused on the nervous system and in particular the optic nerve. However, OPA1 is a ubiquitously expressed protein^{5,7} highly presented particularly in the heart, which suggests a role of this protein in morpho-functional properties of cardiomyocytes.⁵ Since this protein is involved in the regulation of the dynamics of organelles which occupy about 30% of the cardiac cell volume,⁹ it could be suggested that OPA1 would play a key role in the energetic metabolism of the heart. Moreover, we have previously shown that the energetic transfer between mitochondria and energy-consumers performed by direct adenylic nucleotide

channelling (DANC),¹⁰ is very closely related to the architecture of the cell, in which the mitochondria are an integral part.¹¹ Indeed, the cardiac cell is a paradigm of highly compartmentalized cells possessing a sophisticated subcellular architecture, in which repeated arrays of sarcomeres, T-tubules, sarcoplasmic reticulum (SR) and mitochondria interact. The classical description of the cardiomyocytes ultrastructure affirms that mitochondria are of large size, strictly ordered between rows of contractile proteins, and forming tubular networks around myofibrils and SR.¹² If we refer to the role of mitochondrial dynamics in morphology and in function of the mitochondria, we could suggest that a decrease of the expression of OPA1, in ADOA disease for example, could induce large perturbations of mitochondrial morphology and/or function which could have deleterious effects on the energetic of cardiomyocyte. Knowing that energetic defects of the cardiac cell can be involved in heart diseases,^{13,14} it is very surprising that little is known about this topic. Currently, only one study performed on drosophila, has shown alterations of heart function resulting from perturbation of this fusion protein expression.¹⁵ This work showed that heterozygous mutation of drosophila Opa1 was associated with a decreased heart rate and cardiac arrhythmia. These data suggest that a loss of OPA1 could induce cardiac abnormalities.

Very recently a first mouse model carrying a splice mutation in the Opa1 gene leading to haploinsufficiency has been described.¹⁶ While homozygous mutants die in utero, heterozygous mutants are viable but exhibit an age-dependent loss of retinal ganglion cells (characteristic of ADOA), with disorganized cristae structure of mitochondria. This mouse model thus appears to be of great interest to study the role of OPA1 in mitochondrial morphology, organization and function and more generally in the dynamic processes of mitochondria in the heart.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Generation and genotyping of the $Opa1^{enu/+}$ strain mice have been described in detail elsewhere.¹⁶ Experiments which aim to determine basal cardiac phenotype were performed using five month-old mice ($Opa1^{+/+}$, n = 8; $Opa1^{+/-}$, n = 8). Experiments using ten week-old mice which underwent surgery were carried out in order to estimate the ability of mutated mice heart to adapt to a pathological stress (pressure overload).

Surgery procedures: After induction of anesthesia, aortic stenosis was created in four week-old mice by placing a silk suture around the aorta after thoracic incision (TAC, Transversal Aortic Constriction, group) ($Opa1^{+/+}$, n = 8; $Opa1^{+/-}$, n = 8). Age-matched controls underwent the same procedure without placement of suture (sham group) ($Opa1^{+/+}$, n = 7; $Opa1^{+/-}$, n = 7). Mice were studied six weeks after surgery. This procedure was carried out in accordance with the recommendations of the institutional animal care and use committee of INSERM.

Animals were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (60 mg.kg⁻¹). After thoracotomy, hearts were excised and rinsed in ice-cold calcium free Krebs solution equilibrated with 95% O₂ – 5% CO₂. Hearts were weighed and a part of each left ventricle was rapidly frozen in liquid nitrogen for further biochemical determinations and another part was immediately used to prepare cardiac muscle fibers for the mechanical and respiration experiments. For measurements of SR and myofibrillar function, papillary muscle fibers were dissected and permeabilized for 30 minutes in saponin (50 µg.ml⁻¹), as described previously^{10,17}. For mitochondrial function measurements, muscle fibers were dissected from the endocardial surface of the left ventricle.¹⁰ Additionally, lungs, kidney and liver were weighed and right tibia length was measured.

Western Blot

Protein extracts from hearts of $Opa1^{+/+}$ and $Opa1^{+/-}$ mice aged of five months were separated on 8% SDS-polyacrylamide gel and subsequently transferred to nitrocellulose membranes. After one hour of blocking with milk, the membranes were incubated overnight with primary antibody (OPA1: BD Biosciences 612606, produced in mouse; GAPGH: Abcam ab9485, produced in rabbit). After washing, the membranes were incubated with a secondary antibody for one hour and visualised using chemiluminescent substrate (SuperSignal West Dura kit, Thermo scientific). Light emission was detected by autoradiography and quantified using an image-analysis system (Bio-Rad). The antibodies used were highly specific because the five characteristic bands of the appropriate size (between 85 and 100 kDa) were obtained each time.

Echocardiography

After anesthesia with isofluran, echocardiography were realised using a specific probe for small animals (Vivid 7, 12MHz, General Electric Healthcare). The 2D images obtained allowed to calculate shortening fraction, ejection fraction, end-diastolic diameter and end-diastolic volume.

Cardiomyocytes isolation

Retrograde heart perfusion according to Langendorff method were performed using perfusion solution containing (in mM): NaCl 113, taurine 30, glucose 20, HEPES 10, BDM 10, KCl 4,7, Na HCO₃ 1,6, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 0,6 and NaH₂PO₄ 0,6 (pH: 7,4, temperature: 37°C). Addition of liberase (0.042 mg.ml⁻¹) to this solution for 8 minutes caused extracellular matrix digestion. Then, the left ventricle of the heart was cut and the cells were released from

the tissue by mechanical agitation using Pasteur pipette in the perfusion solution. After filtration, the concentration of the solution containing the cells is progressively increased in order to reach 1 mM. Finally, the cells were shared out in dishes coated with laminine and kept at room temperature during 2 hours.

Electron microscopy

Samples of left ventricular papillary muscle from five month-old mice (n = 3 for each genotype) were prepared for electron microscopy as previously described.¹⁸ Ultrathin longitudinal sections were dyed with lead citrate and studied using a JEM 1200 (JOEL, Japan) electron microscope. Images were recorded using a Gatan Dual Vision 300W CCD camera (Gatan Inc., Pleasanton, USA).

Morphological description of mitochondrial network by fluorescence microscopy

Mitochondria network morphology was assessed using fluorescence microscopy. Fresh isolated cardiomyocytes were loaded for 45 min at room temperature with 500 nM of Mito-Tracker Orange dye to label mitochondria, and with 1 μ M of calcein to estimate global cell volume (Invitrogen). Then cells were washed twice with culture medium.

Fluorescence experiments were performed with a Carl Zeiss LSM-510 confocal microscope using a 63X 1.4 plan Apochromat objective lens. Mito-Tracker Orange was excited with the 568-nm line of an argon/krypton laser and images were collected through a 570 nm long pass emission filter. Calcein fluorescence was excited simultaneously with the 488 nm line of the same laser, and images were collected through a 515- to 530 nm band pass filter.

To reconstruct 3D images of the cells, serial images of individual cardiomyocytes were collected in z axis. Then, data were imported and images were deconvolved using Autoquant X software (MediaCybernetics, Bethesda, MD). Volume of cardiomyocytes and of

individual mitochondria were obtained with IMARIS software (Bitplane Company, Zurich), which allows extracting different parameters of mitochondrial network, such as distribution or average of individual mitochondrion volume, area, and sphericity, as well as global mitochondrial network and cell volume.

Analysis of in situ mitochondrial function

The respiration rate of the total mitochondrial population in saponin-permeabilized muscle fibers was determined using a Clark electrode (Strathkelvin instruments) as previously described^{19; 20}. A protocol was designed to determine the sensitivity of the mitochondrial respiration to external ADP and creatine. Bundles of muscle fibers were transferred at 22°C to an oxygraphic cell filled with a respiration solution containing (in mmol.l⁻¹): EGTA-CaEGTA buffer 10 (free Ca²⁺ 0.1), free Mg²⁺ 1, dithiothreitol 0.5, imidazole 20, taurine 20, glutamate 10, malate 4, K₂HPO₄ 3, fatty acid free bovine serum albumin (2 mg.ml⁻¹), with ionic strength adjusted to 160 by addition of potassium methanesulfonate. Basal oxygen consumption of mitochondria in the absence of ADP (V_0) was recorded. Then respiration was stimulated by the addition of increasing concentrations of ADP to the chamber until maximal respiration was reached at a saturating [ADP] (2 mmol.l⁻¹). This experiment was performed without and with creatine (12 mmol.l⁻¹). After each respiration experiment, the bundles of muscle fibers were removed from the oxygraphic cell, dried at 80°C and weighed so that respiration rates could be expressed in $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g dry weight}^{-1}$.

The ADP-stimulated respiration (V_{ADP}) above basal oxygen consumption (V_0) was plotted as a function of [ADP]. Given that the respiration rate depends on [ADP] according to the Michaelis-Menten equation, the apparent K_m values for ADP and maximal ADP-stimulated respiration rate (V_{ADP}) were calculated using a nonlinear fitting procedure. Global maximal respiration rate (V_{max}) was determined as $V_0 + V_{\text{ADP}}$. The acceptor control ratio

(ACR), an index of oxidation-phosphorylation coupling, was calculated as V_{\max}/V_0 . Two to three experiments were assayed for each heart and each protocol (with and without creatine).

Biochemical analysis

Frozen tissues were homogenized in buffer (50 mg.ml^{-1}) containing (in mmol.l^{-1}) HEPES 5, EGTA 1, DTT 1 and 0.1 % Triton X100 and incubated for 1 hour at 0°C for complete enzyme extraction. Activities of total CK, citrate synthase and mitochondrial complex I were measured using standard spectrophotometric assays.²¹⁻²⁴

PTP experiments

For mPTP experiments, fresh cardiomyocytes were co-loaded in culture medium with $5\mu\text{M}$ Rhod-2 and $1 \mu\text{M}$ calcein (Invitrogen) for 45 min at room temperature, and then washed with culture medium solution. Rhod-2 was excited with the 568-nm line of an argon/krypton laser and images were collected through a 570 nm long pass emission filter. Calcein fluorescence was excited simultaneously with the 488 nm line of the same laser, and images were collected through a 515- to 530 nm band pass filter.

Cardiomyocytes in culture dishes were firstly permeabilized with saponin ($50\mu\text{g.ml}^{-1}$) for 3 min and then washed in respiration solution (see above) for 5 min before experiments. Rhod-2 and calcein signals were monitored after addition of Ca^{2+} ($2 \mu\text{M}$). In additional plates, cells were superfused with $1\mu\text{M}$ cyclosporine A (CsA), a potent mPTP inhibitor to check for specificity of the mPTP opening. Rhod-2 increase was used to determine the amount of calcium load in mitochondria. Permeability transition pore opening was determined by monitoring decrease in calcein fluorescence intensity. The time when calcein fluorescence starts to decrease (topen) and the rate of fluorescence decrease at this point (slopeopen) give indices of mPTP behavior.

Estimation of energy transfer to sarcoplasmic reticulum and to myofilaments.

The contribution of energetic transfer system, the creatine kinase (CK)^{25,26} system and the DANC¹⁰, to the provision of ATP for sarcoplasmic reticulum ATPase (SERCA) function was estimated by measuring SR calcium content in saponin-permeabilized fibers after loading under various energetic conditions as previously described.^{18,27}

The pMgATP/rigor tension relation measured in saponin-permeabilized ventricular fibers was used for studying the ability of the different energetic systems to supply ATP for myosin-ATPase function. Rigor tension is a tension developed when the MgATP concentration in the vicinity of the myofibrillar ATPase is not sufficient to ensure the dissociation of myosin heads from the actin filament. This effect is enhanced by the presence of ADP,²⁸ thus rigor tension is a good index of the ATP/ADP ratio in the vicinity of myosin ATPase. Under each energetic condition the pMgATP/rigor tension relationship was estimated by progressively decreasing ATP concentration under isometric conditions.²³ Data were fitted using the Hill equation, $T = K/(K + [\text{MgATP}]^{n_H})$, where T is the relative rigor tension, K a constant, and n_H the Hill coefficient. This fitting procedure was used to calculate pMgATP₅₀, which is the negative logarithm of [MgATP] at which half-maximum rigor tension is obtained. The solutions used were the same as the solutions used for the estimation of SR calcium uptake, except for the ATP concentration, which varied in this experiment.

Statistical Analysis

Values are expressed as means \pm sem. Statistical significance of the difference between the Opa1^{+/+} and Opa1^{+/-} groups was estimated by t-student test. In the experiments involving Opa1^{+/+}-Sham, Opa1^{+/+}-TAC, Opa1^{+/-}-Sham and Opa1^{+/-}-TAC, statistical significance was

estimated by two-way ANOVA using Newman-Keuls *post-hoc* test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Anatomical characteristics

Anatomical characteristics of the five month-old mice are presented in Table 1. Analysis of heart weight or body weight normalized to tibia length did not show any significant difference between control and Opa1^{+/-} mice.

Protein and gene expression

Densitometric quantification of the Western blot showed a 33% reduction in OPA1 protein expression in Opa1^{+/-} mice with GAPDH as calibrator (Fig. 1A). Gene expression of proteins involved in the mitochondrial dynamic (Drp1, Fis1, Mfn1 and Mfn2) measured by RT-PCR did not show any difference between control and mutant mice (Fig. 1B).

Cardiomyocyte ultrastructure and mitochondrial network organization

Electron microscopic analysis revealed that in the Opa1^{+/-} cardiomyocytes like in control the myofibrils run parallel to the longitudinal axis of myocytes with no signs of deterioration. However, obvious changes were found in the arrangement and in ultrastructure of mitochondria. While in the control cardiomyocytes the mitochondria formed regular rows extended along myofibrils, the arrangement of mitochondria in Opa1^{+/-} cardiomyocytes was irregular (Fig.2 A,B). Occasionally, clusters of mitochondria could be found. The mitochondria of Opa1^{+/-} mice demonstrated high variability in size and also in shape as compared to wild-type. Irregular shape was characteristic for big mitochondria. Mitochondrial cristae often showed altered morphology (Fig. 2). Mitochondria of control cardiomyocytes displayed regular cristae distributed homogeneously along the whole mitochondrial volume (Fig. 2A), while cristae of Opa1^{+/-} mitochondria formed semi-circular areas alternating with

areas of disintegrated cristae within the same mitochondrion (Fig. 2B). Moreover, unusual areas displaying slight spatial deformation of cristae inside mitochondria were observed (Fig. 2C). Other mitochondria displayed fragmented cristae together with loci in matrix devoid of cristae (Fig. 2D). Cristae remodeling in mitochondria of $Opa1^{+/-}$ myocytes was also accompanied by formation of free spaces between the outer and inner mitochondrial membranes (Fig. 3A, B).

The typical trait concomitant to big mitochondria was the presence of clusters of cristae with variable structure inside the same mitochondrion (Fig. 3C) and the presence of dense material at contact sites between neighboring mitochondria (Fig. 3D). At other such places the occurrence of dark material coincided with disappearance of the outer and inner mitochondrial membranes (Fig. 3E). These signs may represent the sites where abnormal mitochondrial fusion took place.

Morphological modifications of mitochondrial network in $Opa1^{+/-}$ mice.

We assessed the impact of partial deletion of *Opa1* gene on the morphology of mitochondrial network using Mito-Tracker Orange dye. 3D reconstruction of mitochondrial network, as well as distribution of individual mitochondria volume was obtained using IMARIS software. Compared to $Opa1^{+/+}$ mice, mitochondrial network in $Opa1^{+/-}$ mice appears to be more heterogeneous, with larger mitochondria and/or increase of clusters of mitochondria, and increase of volume dispersion (Fig. 4A). Analysis of the distribution of mitochondrial volume confirmed an increase in percentage of large mitochondria in $Opa1^{+/-}$ cardiomyocytes ($p < 0001$, Fig. 4B), and a decrease of small mitochondria number ($p < 0.05$). At the same time, analysis revealed a decrease in total number of mitochondria per cell (Fig. 4C, $p < 0.05$), but with the same global mitochondrial network volume (Fig. 4D). Finally, no change of cell volume was observed. The same results were obtained for the two-dimensional area of

mitochondrial network and cell (not shown). These results suggest that partial Opa1 gene deletion affects mitochondrial network morphology of adult cardiomyocytes at the level of distribution of individual mitochondria rather than at the level of global mitochondrial volume.

Mitochondrial function

To investigate whether the decrease of OPA1 expression altered the intrinsic mitochondrial function in our model, the rate of mitochondrial oxygen consumption was measured *in situ* in saponin-permeabilized muscle fibers from wild type and Opa1^{+/-} mice. Basal (V_0) and maximal (V_{max}) respiration respectively measured without ADP and with a saturating ADP concentration were not significantly different between the groups (Fig. 5A). Consequently, the acceptor control ratio (ACR) that reflects the degree of coupling between oxidation and phosphorylation did not show any notable difference (Fig. 5B). The sensitivity of mitochondrial respiration to ADP was estimated with and without creatine in order to study the coupling of mitochondrial respiration and mitochondrial creatine kinase (mi-CK). The K_m for ADP measured without (K_{mADP}) and with creatine ($K_{mADP+Cr}$) were significantly lower in mutant mice (K_{mADP} : 183 ± 15 and $131 \pm 13 \mu\text{mol.l}^{-1}$, ; $K_{mADP+Cr}$: 97 ± 13 and $62 \pm 6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ in control and mutant mice respectively) (Fig. 5C). Note that the creatine kinase efficacy assessed by $K_{mADP}/K_{mADP+Cr}$ is not significantly different between the two groups (Fig. 5D). The measure of citrate synthase (CS) activity, a marker of mitochondrial mass, revealed that the mitochondrial content was not significantly different in Opa1^{+/-} mice in comparison with control mice. Similarly, measure of activity of several enzymes (Complex I, cytochrome c oxidase, lactate dehydrogenase, adenylate kinase) which allow to determine the metabolic profile of animals showed no significant different between mutant and control mice (Fig. 5E).

All these data demonstrate that a downregulation of OPA1 does not alter respiratory capacity of mitochondria.

The impact of partial *Opa1* gene deletion on the mitochondrial calcium retention capacity and on PTP state was assessed in freshly isolated cardiomyocytes by fluorescent techniques. Mitochondria in these cells were loaded with calcium-sensitive Rhod-2 and with calcein and then the cells were permeabilized to remove non-specific labelling of the dyes. Permeability transition opening was activated by adding of 2 μ M external calcium. In order to block Ca²⁺ pumping by sarcoplasmic reticulum ATPase, ATP was removed from the medium. Following calcium addition, intramitochondrial [Ca²⁺] progressively increased as can be evidenced by rise in Rhod-2 fluorescence until PTP opening induced calcium loss from the mitochondrial matrix (Fig. 6A). Similarly, PTP opening provoked release of intramitochondrial calcein, which induced a decrease in calcein fluorescence (Fig. 6B). Addition of CsA greatly reduced the leak of calcein and Rhod-2 fluorescence (see movies in supplemental data), confirming that observed phenomenon is indeed PTP opening. The time course of Rhod-2 and calcein fluorescence is presented in Figure 7. In comparison to *Opa1*^{+/+} cardiomyocytes, *Opa1*^{+/-} cardiomyocytes appeared to load more calcium, whereas PTP opening was delayed. Statistical analysis evidenced the increase of mitochondria calcium retention capacity in *Opa1*^{+/-} cardiomyocytes, and consequently a shift in the beginning of Ca²⁺ leak from mitochondria (Fig. 7A, upper panel, p<0.01), suggesting a change in PTP opening properties. This is confirmed by the analysis of calcein traces, showing a delay in calcein leak and PTP opening, as well as a decrease in the rate of calcein leak in *OPA*^{+/-} cardiomyocytes (Fig. 7B, p<0.05). These results suggested that partial *Opa1* gene deletion induced a change of mitochondrial PTP function/mitochondrial calcium retention capacity.

Energetic transfer from mitochondria to SERCA and myosin-ATPase.

Because energetic transfers, and especially DANC, between energy-producers (mitochondria) and energy-consumers (SERCA and ATPase of myofilaments) are related to the specific arrangement of organelles in the cell, it is reasonable to suggest that OPA1 downregulation could influence the intracellular energy transport by modifying the mitochondrial network.

Energy transfer to SERCA was measured in saponin-permeabilized ventricular fibers by determination of SR calcium content after Ca^{2+} loading under various energetic conditions, namely, exogenous ATP only or exogenous ATP + phosphocreatine (CK support) or exogenous ATP + working mitochondria (DANC). The calcium content was assessed by measuring the force transient triggered by caffeine-induced SR calcium release. Developed tension was converted into calcium concentration units by using the force-calcium relationship determined for each fiber. Efficacy of each system (DANC or CK) was estimated by comparison with the efficacy of exogenous ATP only (Fig. 8A). Maximal SR loading capacity estimated under optimal energetic conditions, in the presence of exogenous ATP, PCr and working mitochondria was similar in the two groups of mice. Creatine kinase efficacy as well as DANC efficacy were also similar in control and mutant mice suggesting that the adenine nucleotide channelling between mitochondria and SERCA was not altered under conditions of down-regulation of OPA1 protein.

In the next series of experiments, we estimated the ability of these different energetic systems to support myosin-ATPase activity. Energy supply for myosin-ATPase was assessed by measuring the rigor tension developed by fibers when the MgATP concentration was progressively decreased. The ability of DANC+CK and CK alone to support myosin-ATPase activity (and to delay the onset of rigor) was similar for the two groups (Fig. 8B). However, DANC in mutant mice was significantly less efficient than in control mice. In wild type fibers, working mitochondria shifted pMgATP50 for rigor by 1.36 ± 0.09 units whereas in

Opa1^{+/-} fibers, this parameter was as low as 1.03 ± 0.04 ($p < 0.01$). Thus, the direct adenine nucleotide channelling from mitochondria to myosin ATPase was altered in mice, which expressed less OPA1 protein.

Anatomical parameters and cardiac function under conditions of pressure overload.

In order to estimate the role of OPA1 in cardiac response to high workload, echocardiographic analysis of cardiac function was performed after 6 weeks of TAC. Then the animals were sacrificed. In both Sham groups (Opa1^{+/+}-Sham and Opa1^{+/-}-Sham), the heart weight/tibia length ratio (Table 2) and parameters of the heart function (Fig. 9) were similar in control and mutant mice. However, after six weeks of TAC, the mutant heart showed two-fold higher hypertrophy (+ 79%) than in control (+ 36%) ($p < 0.001$). Such a high hypertrophy was associated with significant remodelling of cardiac contractile parameters. In contrast to wild type hearts, where TAC, at least at this stage, did not induced significant changes in the contractile indices, in Opa1^{+/-} group, pressure overload led to significant increase in left ventricle end-diastolic diameter and volume as well as to a 42% decrease in left ventricle ejection fraction and to a 55% drop in left ventricle shortening fraction of (Fig. 9). Thus, this data evidence an important role of OPA1 in the cardiac response to mechanical stress.

DISCUSSION

In the present study, we investigated the consequences of the decrease in expression of OPA1, a protein involved in mitochondrial dynamics, on the intracellular energetic pathways and the function of mouse heart. The results show that 1) the knock-down of Opa1 induced mitochondrial remodelling, 2) oxidative capacity was not altered in Opa1^{+/-} mice, 3) mitochondria of Opa1^{+/-} mice were able to accumulate more calcium and presented a delay in PTP opening under calcium stimulation, 4) direct channelling of ATP and ADP between mitochondria and myosin-ATPases was reduced in mutant mice and 5) despite a normal heart function at basal state, the mutant mice were more sensible to hemodynamic stress.

Heart and mitochondrial dynamics

The interest in mitochondrial dynamics in the heart is very recent and only a few studies are available to date.^{15,29-32} These studies brought variable and controversial information from which it is difficult to conclude the role of mitochondrial dynamic in the cardiac cell and heart function. Indeed, the role of mitochondrial dynamics is difficult to understand in adult cardiomyocyte which is a cell of specific type. In these particular cells, intracellular movements seem to be restricted due to a highly specialized cytoarchitecture³¹ and the dynamic of the organelle is not as visible as in the other cells. However, it is difficult to imagine an adult cardiomyocyte without any mitochondrial dynamic processes which are essential for the biogenesis of this organelle.¹⁴ Moreover, the high expression level of proteins involved in mitochondrial dynamic in the heart, shown by several previous studies,^{5,7,33-36} suggests that the dynamic behaviour of the mitochondrial network could be important for cardiac physiology. Deregulations of some of these proteins which induce specific response of the cardiac tissue could be another proof of the involvement of the mitochondrial dynamics in

the physiology of the heart. For example, the pharmacological inhibition of DRP1 has protective effect against alteration caused by ischemia-reperfusion.²⁹ Alterations of proteins of mitochondrial dynamics could also occur in particular physiological or physiopathological situations.^{30,32} Consequently, all of these data suggest that fusion and fission proteins are not silent in adult heart and mitochondrial network of cardiomyocyte could be more changeable than it seems.

The mouse model of OPA1 downregulation used in this study exhibited clear modifications of mitochondrial morphology and perturbations of cytoarchitecture in response to decrease of the protein residing in the mitochondrial internal membrane. However, this model does not allow to conclude about the fusion and fission processes in adult cardiomyocytes because these mutant mice expressed a lesser amount of OPA1 protein during their all life and in particular during the development of the heart which is a period during which cardiomyocytes exhibit a highly dynamic mitochondria (for review see³⁷). Thus, it is difficult to say whether the morphology of the mitochondria observed in our model is the consequence of the potential dynamic processes occurring in the adult heart or merely the result of the perturbations of the mitochondrial dynamics during the heart development. Nevertheless, this model is perfectly adapted to study the consequences of the mitochondrial morphology perturbations on cardiomyocyte energetic and on cardiac function. Besides, knowing that this model mimics ADOA^{16,38} it seems to be a good model to broaden the knowledge of cardiac function of patients affected by this disease.

Mitochondrial morphology and function of Opa1^{+/-} mouse model

A surprising finding of this study is that a decrease in OPA1 expression leads to an increase in the volume of the individual mitochondria.. This result clearly showed by the measure of mean volume of the mitochondria and by the observation of the cardiomyocytes

ultrastructure by electron microscopy, would mean that the mitochondria have a tendency to merge in mutant mice. Moreover, the high heterogeneity in size and shape exhibited by mitochondria in mutant mice shows that knock-down of Opa1 results in large perturbations of mitochondrial dynamics. Although modifications of the mitochondrial networks were expected, these results are surprising because several previous studies had showed that the loss of expression of a protein involved in the fusion or in the fission induces fragmentation or fusion of the mitochondria respectively,³⁹⁻⁴⁴ Even if the degree of the decrease of OPA1 expression in our mouse model in comparison with these studies could be propounded to explain the unexpected mitochondrial morphology observed in our study, the mechanism responsible for the increase of individual mitochondrial volume and the appearance of very big mitochondria remains unknown. However, OPA1 protein is not only responsible for internal membrane fusion; it ensures other functions like modelling of the mitochondrial cristae.⁴⁵ Thus, the mechanism responsible for this specific morphology could be explained by another function of OPA1 protein.

The mitochondrial morphology exhibited by the cardiomyocytes of Opa1^{+/-} mice is also in contradiction with a study led by Chen and colleagues³⁰ who proposed a link between a moderate decrease in OPA1 expression and the fragmentation of the mitochondrial network observed in heart failure. However, knowing that the mitochondrial mass is decreased in the same proportion in this disease,¹⁷ we might wonder if the decrease of OPA1 in heart failure is really felt as a decrease by the mitochondrial network. Moreover, the reduction of OPA1 content could just be a consequence of mitochondrial mass decrease.

Contrary to what the previously cited studies showed, the oxidative capacities of the mitochondria were not changed in mutant mice in our study, with the exception of an increase in K_m for ADP in Opa1^{+/-} mice which could be induced by disturbances in the cell architecture.^{46,47} The incompatibility of the results could be explained, one more time, by the

difference in the expression level of OPA1 protein in the different experimental model especially since a work performed on leucocytes from ADOA patients, which exhibit a partial loss of OPA1 expression, showed no alteration of oxidative capacity of the mitochondria of these cells.⁴⁸

Energy transport alterations and lower mitochondrial sensitivity to calcium in Opa1^{+/-} mouse model.

Interestingly, mice which expressed less OPA1 protein exhibit impairment of DANC system transfer between mitochondria and myofilaments with higher calcium loading capacity (CLC) and a delayed PTP opening under calcium stimulation. The consequences to energetic transfer could be easily explained by the architectural perturbations exhibited by the Opa1^{+/-} cardiomyocytes. It confirms the link between cellular architecture and DANC^{11,18} and shows for the first time that the mere perturbation of mitochondrial morphology can modulate cellular architecture to such an extent that the DANC can be impaired. On the other hand, the effects OPA1 deficiency on mitochondrial CLC and PTP properties are more difficult to understand. Knowing that no link between OPA1 and PTP proteins has been described, it is difficult to conclude whether this phenomenon is directly due to the level of OPA1 expression in this mouse or merely due to the volume of the mitochondria matrix which can have consequences on PTP opening properties.^{29,49,50}

A higher CLC and a delayed PTP opening have been described as a cardiac protective mechanism against ischemia/reperfusion injury.²⁹ However, it would seem wise to wonder if in our model these mitochondrial features are beneficial for the heart. Indeed, the hemodynamic stress by TAC induced higher hypertrophy and impressive hemodynamic alterations in mutant mice in comparison with control. Mechanisms responsible for such a prominent response to pressure overload are not clear. One possible reason could be partial

loss of DANC efficacy found in our study. Another possibility is the lower sensitivity of mPTP to calcium accumulation in the mitochondrial matrix, which could induce mitochondrial calcium overload under condition when calcium efflux from the mitochondria by pore transitory pore opening is inhibited. Indeed, aggravated hypertrophic response to TAC found in our study seems to be quite similar to that described by Molkentin's group⁵¹ for a mouse model, which does not express cyclophilin D protein (a protein involved in PTP functioning). This group has suggested that the pronounced cardiac response to mechanical stress in their animals could come from a higher intramitochondrial content which would reduce the dynamic range in cardiac metabolism, decreasing the metabolic reserve capacity of the heart. Thus, it could be interesting to determine whether the mitochondria of our Opa1^{+/-} mice would exhibit deregulations in Ca²⁺ homeostasis with higher intramitochondrial calcium content in response to the increase of CLC and the specific PTP opening properties. It would be also reasonable to suggest that the impairment of dynamic processes of the mitochondria in our model does not allow an appropriate and homogeneous response of mitochondrial network to the increase of the energetic demand in stress situation, thus inducing heart remodelling.

In conclusion, we have established that mutation of OPA1 protein in a mouse model which mimics human ADOA disease has consequences on morphology of the mitochondria and energetic transfers in heart as well as on mitochondrial CLC and PTP properties. Even if the heart function is normal at basal state, our results suggest that this mutation causes a sensitization of the heart to hemodynamic stress.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was in part supported by a grant VEGA 2/0174/09. We thank Dr. R. Fischmeister for continuous support. We also thank Valérie Domergue-Dupont and the animal care facility

of IFR141 for efficient handling and preparation of the animals. This work was supported by grants from the European Union contract LSHM-CT-2005-018833/EUGeneHeart. R V-C and F. J are scientists at Centre National de la Recherche Scientifique.

Reference List

1. Bereiter-Hahn J: Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* 1990;122:1-63
2. Liesa M, Palacin M, Zorzano A: Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 2009;89:799-845
3. Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M: Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 2002;13:4343-4354
4. Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Bricchese L, Gas N, Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP, Ducommun B, Lenaers G, Belenguer P: The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* 2002;523:171-176
5. Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P, Hamel CP: Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* 2001;109:584-591
6. Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM, Vance JM: Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 2004;36:449-451
7. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B: OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 2000;26:211-215
8. Votruba M, Moore AT, Bhattacharya SS: Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy. *J Med Genet* 1998;35:793-800
9. Barth E, Stammli G, Speiser B, Schaper J: Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:669-681
10. Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A, Ventura-Clapier R: Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res* 2001;89:153-159
11. Piquereau J, Novotova M, Fortin D, Garnier A, Ventura-Clapier R, Veksler V, Joubert F: Postnatal development of mouse heart: formation of energetic microdomains. *J Physiol* 2010;588:2443-2454
12. Ogata T, Yamasaki Y: Scanning electron-microscopic studies on the three-dimensional structure of mitochondria in the mammalian red, white and intermediate muscle fibers. *Cell Tissue Res* 1985;241:251-256
13. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V: Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* 2004;555:1-13

14. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F: Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta* 2010;
15. Shahrestani P, Leung HT, Le PK, Pak WL, Tse S, Ocorr K, Huang T: Heterozygous mutation of *Drosophila* Opa1 causes the development of multiple organ abnormalities in an age-dependent and organ-specific manner. *PLoS One* 2009;4:e6867
16. Alavi MV, Bette S, Schimpf S, Schuettauf F, Schraermeyer U, Wehrl HF, Ruttiger L, Beck SC, Tonagel F, Pichler BJ, Knipper M, Peters T, Laufs J, Wissinger B: A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* 2007;130:1029-1042
17. De Sousa E, Veksler V, Minajeva A, Kaasik A, Mateo P, Mayoux E, Hoerter J, Bigard X, Serrurier B, Ventura-Clapier R: Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure. *Circ Res* 1999;85:68-76
18. Wilding JR, Joubert F, de Araujo C, Fortin D, Novotova M, Veksler V, Ventura-Clapier R: Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts. *J Physiol* 2006;575:191-200
19. Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA: Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* 1987;892:191-196
20. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS: Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;3:965-976
21. Wharton, D. C. and Tzagoloff, A. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods in Enzymology* 10, 245-250. 67.
22. Estornell E, Fato R, Pallotti F, Lenaz G: Assay conditions for the mitochondrial NADH:coenzyme Q oxidoreductase. *FEBS Lett* 1993;332:127-131
23. Ventura-Clapier R, Kuznetsov AV, d'Albis A, van Deursen J, Wieringa B, Veksler VI: Muscle creatine kinase-deficient mice. I. Alterations in myofibrillar function. *J Biol Chem* 1995;270:19914-19920
24. Veksler VI, Kuznetsov AV, Anflous K, Mateo P, van Deursen J, Wieringa B, Ventura-Clapier R: Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *J Biol Chem* 1995;270:19921-19929
25. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM: Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 1992;281 (Pt 1):21-40
26. Saks VA, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova OYu, Kuznetsov AV: Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis. *Mol Cell Biochem* 1994;133-134:155-192
27. Minajeva A, Ventura-Clapier R, Veksler V: Ca²⁺ uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum ATPase in situ strongly depends on bound creatine kinase. *Pflugers Arch* 1996;432:904-912
28. Ventura-Clapier, R. and Veksler, V. Myocardial ischemic contracture. Metabolites affect rigor tension development and stiffness. *Circ Res* 74(5), 920-929. 94.
29. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ: Inhibiting Mitochondrial Fission Protects the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* 2010;
30. Chen L, Gong Q, Stice JP, Knowlton AA: Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovasc Res* 2009;84:91-9

31. Beraud N, Pelloux S, Usson Y, Kuznetsov AV, Ronot X, Tourneur Y, Saks V: Mitochondrial dynamics in heart cells: very low amplitude high frequency fluctuations in adult cardiomyocytes and flow motion in non beating H1-1 cells. *J Bioenerg Biomembr* 2009;41:195-214
32. Fang L, Moore XL, Gao XM, Dart AM, Lim YL, Du XJ: Down-regulation of mitofusin-2 expression in cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Life Sci* 2007;80:2154-2160
33. Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, van der Blik AM: A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* 1998;143:351-358
34. Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT : Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 2003;116:2763-2774
35. Jofuku A, Ishihara N, Mihara K: Analysis of functional domains of rat mitochondrial Fis1, the mitochondrial fission-stimulating protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:650-659
36. Nakamura N, Kimura Y, Tokuda M, Honda S, Hirose S: MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep* 2006;7:1019-1022
37. Ong SB, Hausenloy DJ: Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2010;
38. Alavi MV, Fuhrmann N, Nguyen HP, Yu-Wai-Man P, Heiduschka P, Chinnery PF, Wissinger B: Subtle neurological and metabolic abnormalities in an Opa1 mouse model of autosomal dominant optic atrophy. *Exp Neurol* 2009;220:404-9
39. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC: Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003;160:189-200
40. Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L: OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15927-15932
41. Griparic L, Kanazawa T, van der Blik AM: Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* 2007;178:757-764
42. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G: Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278:7743-7746
43. Stojanovski D, Koutsopoulos OS, Okamoto K, Ryan MT: Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci* 2004;117:1201-1210
44. Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA: The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 2003;23:5409-5420
45. Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L: OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 2006;126:177-89
46. Saks V, Kuznetsov A, Andrienko T, Usson Y, Appaix F, Guerrero K, Kaambre T, Sikk P, Lemba M, Vendelin M: Heterogeneity of ADP diffusion and regulation of respiration in cardiac cells. *Biophys J* 2003;84:3436-3456
47. Saks VA, Belikova YO, Kuznetsov AV: In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *Biochim Biophys Acta* 1991;1074:302-311
48. Mayorov VI, Lowrey AJ, Biousse V, Newman NJ, Cline SD, Brown MD: Mitochondrial oxidative phosphorylation in autosomal dominant optic atrophy. *BMC Biochem* 2008;9:22

49. Nogueira V, Devin A, Walter L, Rigoulet M, Leverve X, Fontaine E: Effects of decreasing mitochondrial volume on the regulation of the permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr* 2005;37:25-33
50. Iijima T, Tanaka K, Matsubara S, Kawakami H, Mishima T, Suga K, Akagawa K, Iwao Y: Calcium loading capacity and morphological changes in mitochondria in an ischemic preconditioned model. *Neurosci Lett* 2008;448:268-272
51. Elrod JW, Wong R, Mishra S, Vagnozzi RJ, Sakthivel B, Goonasekera SA, Karch J, Gabel S, Farber J, Force T, Brown JH, Murphy E, Molkenin JD: Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca(2+) exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *J Clin Invest* 2010;120:3680-3687

Table 1. Anatomical parameters of 5 month-old control and mutant mice.

	Opa ^{+/+}	Opa ^{+/-}
Body weight (g)	30,5 ± 0,6	29,6 ± 0,8
Heart weight (mg)	190 ± 4	177 ± 5
Tibia length (mm)	18 ± 0,2	17,8 ± 0,3
Heart weight /body weight (g.mm ⁻¹)	6,2 ± 0,2	6 ± 0,1
Heart weight/tibia length (mg.mm ⁻¹)	10,6 ± 0,3	9,9 ± 0,2

Table 2. Anatomical parameters of 2.5 month-old mice subjected to pressure overload (TAC) for 6 weeks.

	Opa ^{+/+} -Sham	Opa ^{+/+} -TAC	Opa ^{+/-} -Sham	Opa ^{+/-} -TAC
Body weight (g)	26,2 ± 0,6	26,8 ± 1	26 ± 0,7	25,4 ± 0,5
Heart weight (mg)	172 ± 8	232 ± 14 [*]	179 ± 7	329 ± 24 ^{***, °°°}
Tibia length (mm)	17,3 ± 0,2	17,2 ± 0,2	16,8 ± 0,2	17,1 ± 0,1
Heart weight /body weight (g.mm ⁻¹)	6,6 ± 0,2	8,7 ± 0,4 [*]	6,9 ± 0,3	13 ± 1 ^{***, °°°}
Heart weight/tibia length (mg.mm ⁻¹)	9,9 ± 0,4	13,5 ± 0,8 [*]	10,7 ± 0,5	19,2 ± 0,7 ^{***, °°°}

TAC versus Sham: * p < 0.05; *** p < 0.001

Opa^{+/-}-TAC versus Opa^{+/+}-TAC: °°° p < 0.001

FIGURE LEGENDS

Figure 1. OPA1 expression in Opa1^{+/+} and Opa1^{+/-} mice.

A, Western blot analysis of OPA1 protein expression. Upper panel: a representative original recording. Lower panel: Mean values of OPA1 protein content (n= 8 for both group). B, Real-time RT-PCR analysis of mRNA content of Drp1, Fis1, Mfn1 and Mfn2 of Opa1^{+/-} mice, relative to control normalized to 1. * p < 0.05 versus control

Figure 2. Electron micrographs of mitochondria in cardiomyocytes from control and Opa1^{+/-} mice.

A, Control mice. Individual mitochondria are arranged into regular rows. The shape of mitochondria is oval, mitochondrial cristae are regular and homogeneously distributed along the mitochondria (arrow). B, Opa1^{+/-} mice. The mitochondria form irregular rows. Mitochondrial cristae are disintegrated (asterisk) or form circular and semi-circular regions (arrow). C, A detail of mitochondrion of Opa1^{+/-} mice. In the central part of the mitochondrion (asterisk) the skewed cristae due to the spatial deformation can be seen. D, A high magnification image of a mitochondrion depicting the fragmented cristae (arrow) and the locus in the matrix devoid of the mitochondrial cristae (asterisk).

Figure 3. Electron micrographs characterizing details of mitochondrial changes in cardiomyocytes of Opa1^{+/-} mice.

A, The mitochondria with partially fragmented cristae; arrow – the inner mitochondrial membrane separated from the outer mitochondrial membrane (short arrow). B, The broaden space (asterisk) delimited by the inner mitochondrial membrane (arrow); short arrow – the

outer mitochondrial membrane. C, A big intermyofibrillar mitochondrion of irregular shape. Arrows - the cristae of a mitochondrion spreading in different directions. D, A mitochondrion with a dense material (arrows) at sites of mitochondrial fusion. E, The dense material forming semi-circle in the mitochondrion (arrow) indicates the regions of mitochondrial fusion. Note that the central part of the mitochondrion surrounded by the dense material is composed of grainy material while the peripheral part of the mitochondrion contains cristae (short arrow).

Figure 4. Mitochondrial network analysis.

A, representative pictures obtained with Imaris software, each mitochondrion is identified by a color in accordance with its volume (the smallest mitochondria are blue and the biggest ones are red). B, percentage of mitochondrial size categories. C, number of mitochondria per cell. D, total mitochondrial volume. E. cell volume.

Figure 5. Intrinsic energy metabolism parameters..

A, Oxygen consumption rate of ventricular fibers in the absence (V_o) and in the presence of 2 mM ADP (V_{max}). B, Acceptor control ratio calculated as the ratio between maximal respiration rate (V_{max}) and basal respiration rate (V_o). C, Apparent K_m of oxygen consumption for ADP without or with 12 mM creatine. D, Creatine kinase efficacy estimated by K_m without creatine to K_m with creatine ratio. E, Citrate synthase (CS), Complex I and total CK enzymatic activities. * $p < 0.05$ versus control (Opa1^{+/+}).

Figure 6. Kinetics of mitochondrial calcium loading and PTP opening.

A, Time course of mitochondrial calcium accumulation following Ca^{2+} addition (indicated by arrow) measuring by Rhod-2 fluorescence. B, Time course of mitochondrial calcein fluorescence following Ca^{2+} addition (indicated by arrow).

Figure 7. Mitochondrial calcium loading capacity and PTP opening properties.

A, Rhod-2 fluorescence analysis: (left panel) maximal increase of Rhod-2, and (right panel) time of mitochondrial Ca^{2+} leak beginning after Ca^{2+} addition. B, Calcein fluorescence analysis: (left panel) time of PTP opening after Ca^{2+} addition, and (right panel) slope of calcein fluorescence decrease after PTP opening. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus control ($\text{Opa1}^{+/+}$).

Figure 8. Creatine kinase (CK) and mitochondrial (DANC) efficacies to support SERCA or myosin ATPase in permeabilized fibers.

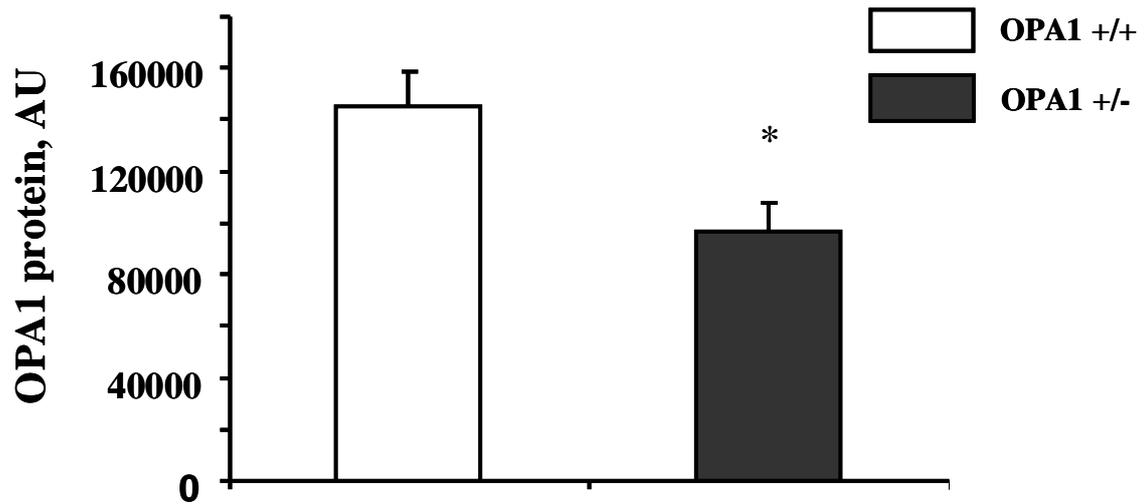
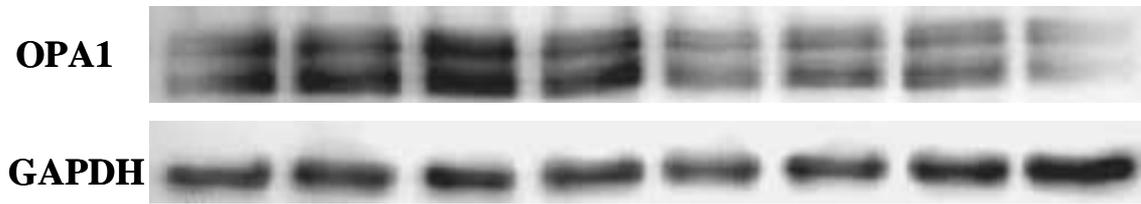
A. Efficiencies of different energy pathways to support SR calcium loading. Calcium uptake for 5 min at pCa 6.5 in the presence of exogenous ATP only, ATP + working mitochondria (DANC) or ATP + phosphocreatine to activate endogenous ATP production by CK (CK) was followed by caffeine-induced Ca^{2+} release. Using $[\text{Ca}^{2+}]$ -force relationship measured for each fiber, the $[\text{Ca}^{2+}]$ -time integral (SCa) was calculated as an index of SR calcium load. For each energetic condition, the efficacy was determined by normalization of corresponding SCa to SCa for loading in the presence of ATP only. B. Efficiencies of different energy pathways to support myosin ATPase. Rigor tension was recorded in solutions of decreasing MgATP concentration under different energetic conditions. For each energetic condition, the efficacy was determined by difference in pMgATP_{50} for rigor tension development between values for

corresponding energetic condition and for ATP only ** $p < 0.01$ versus Opa1^{+/+}

Figure 9. Contractile parameters of the left ventricle measured by echocardiography.

A, Shortening fraction. B, Ejection fraction. C, Left ventricle end-diastolic diameter. D, Left ventricle end-diastolic volume. * $p < 0.05$ versus control (Opa1^{+/+}).

A



B

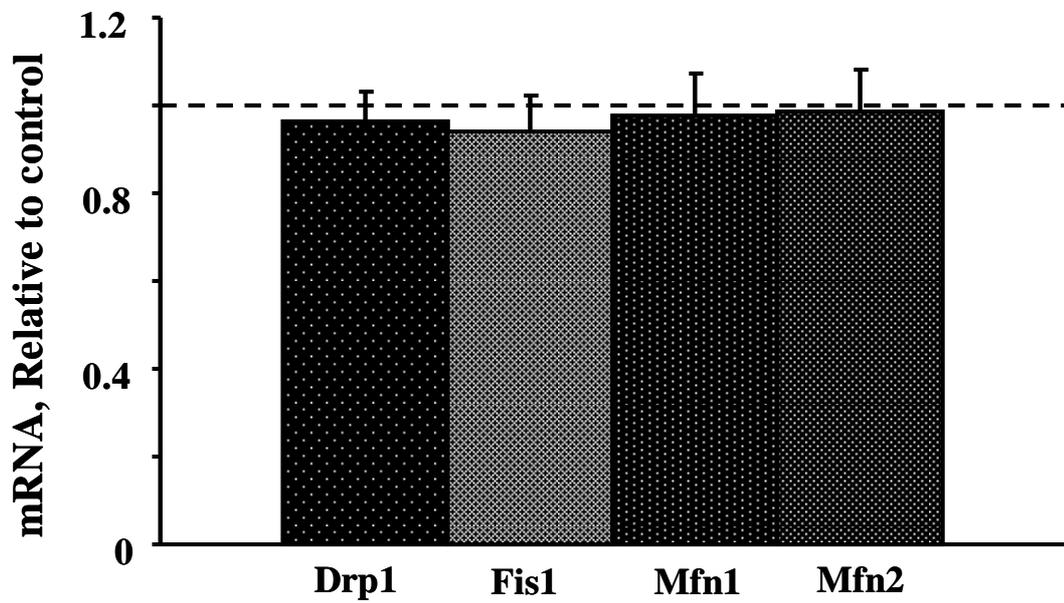


Figure 1

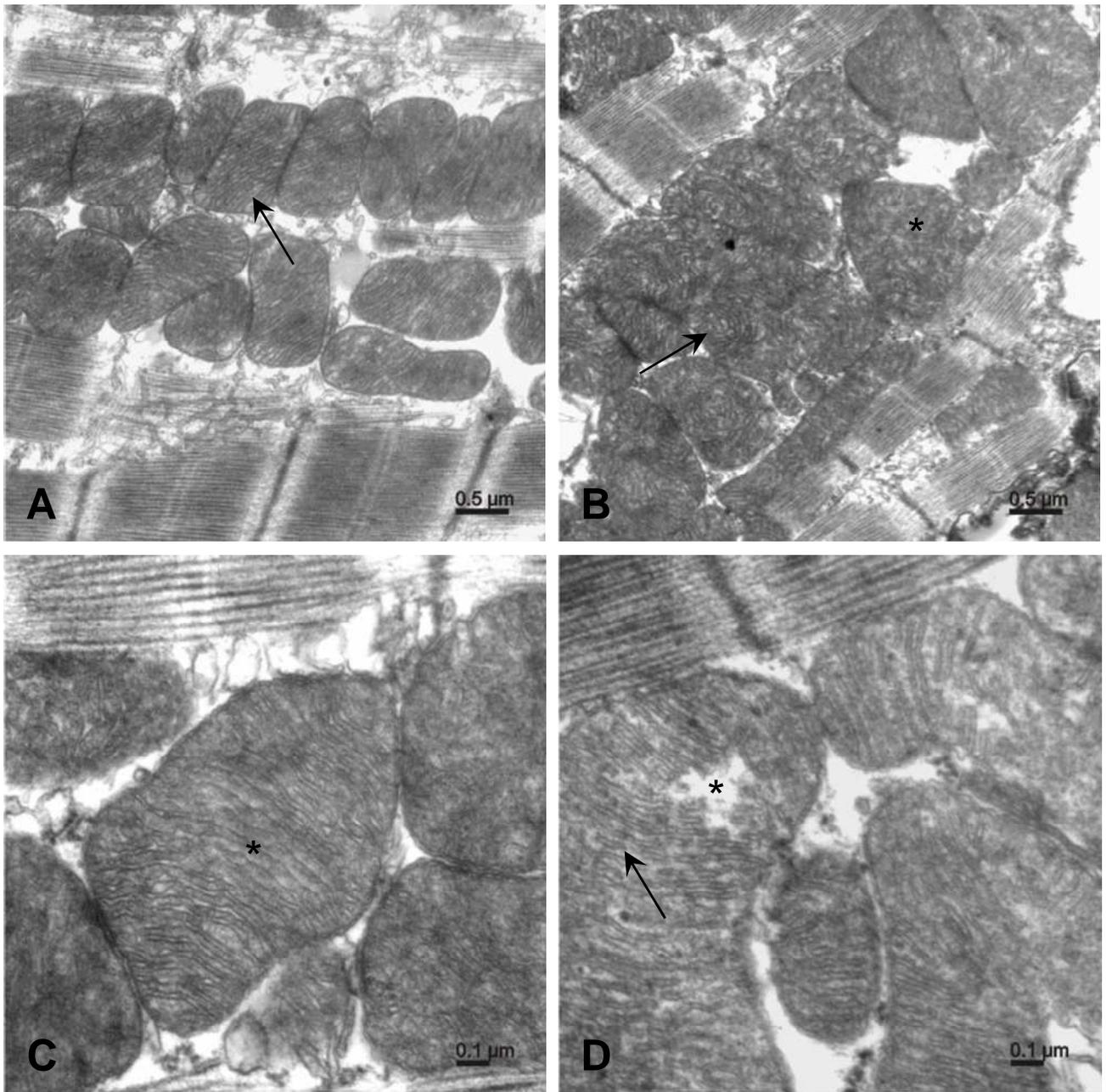


Figure 2

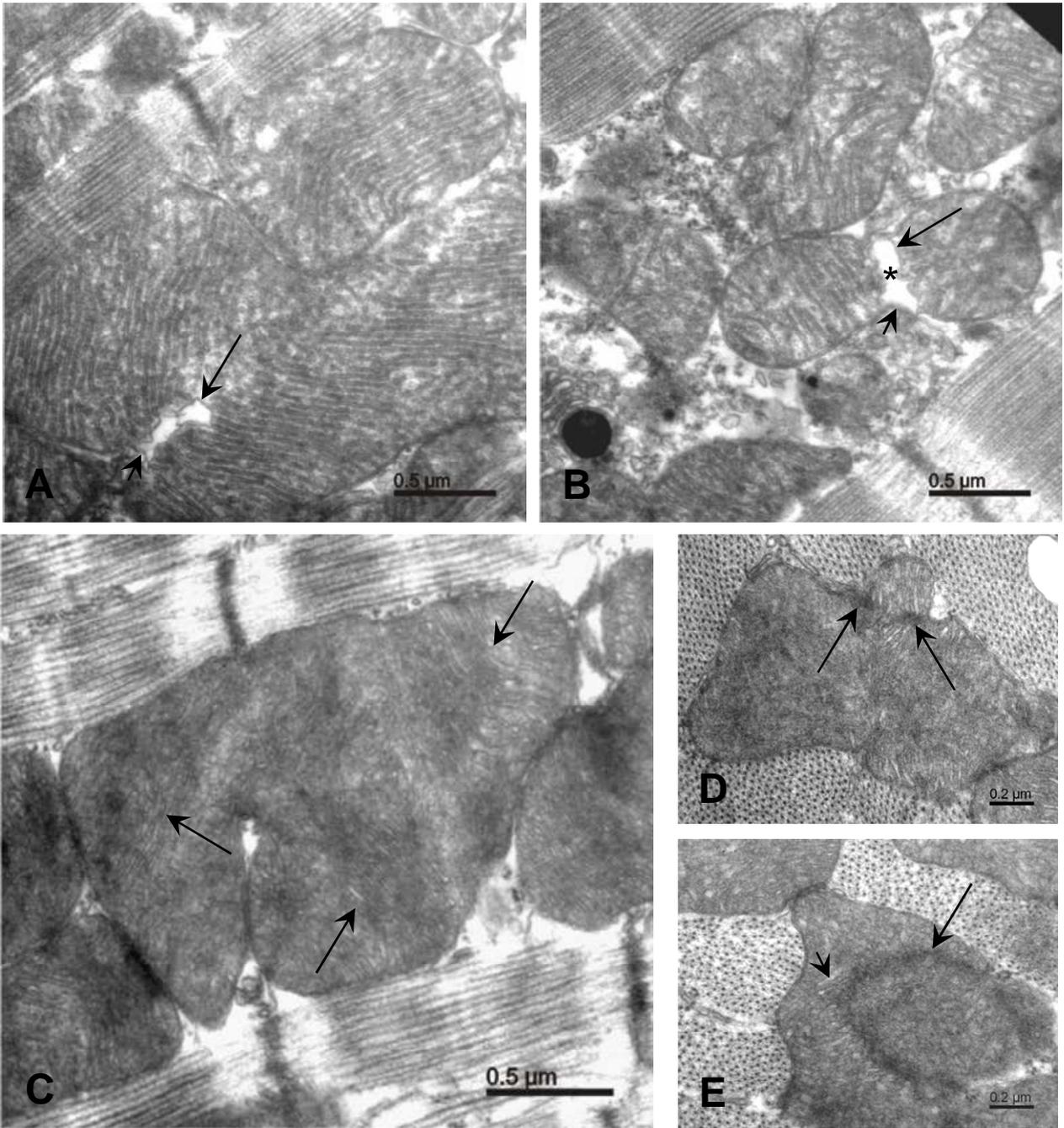
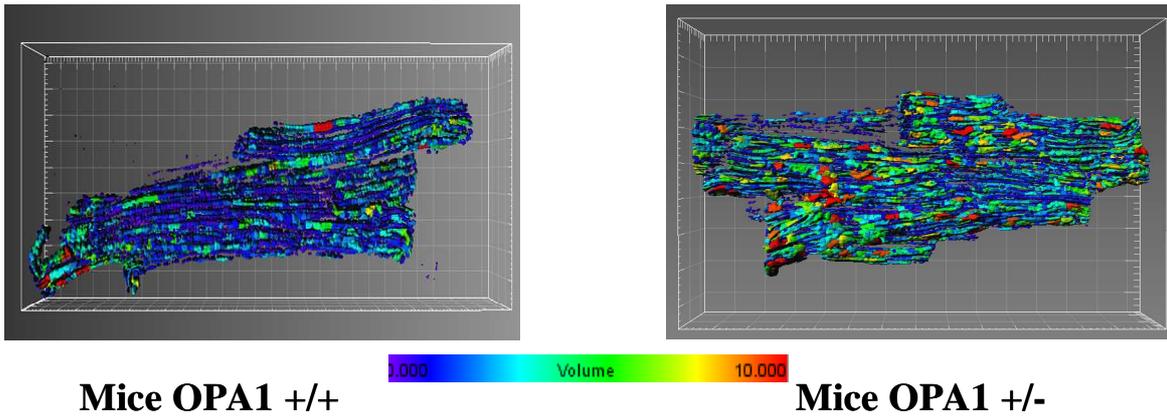
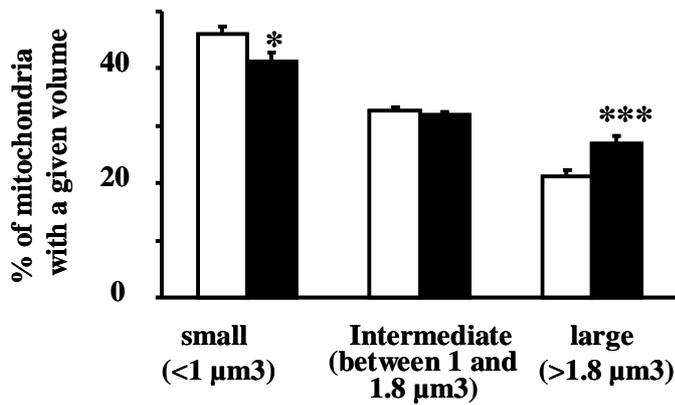
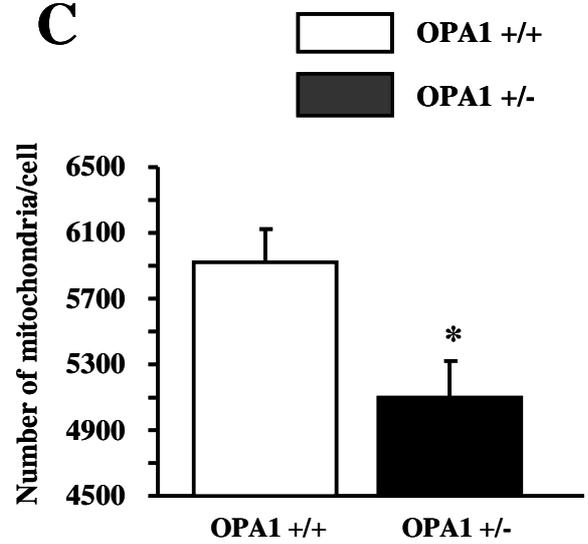
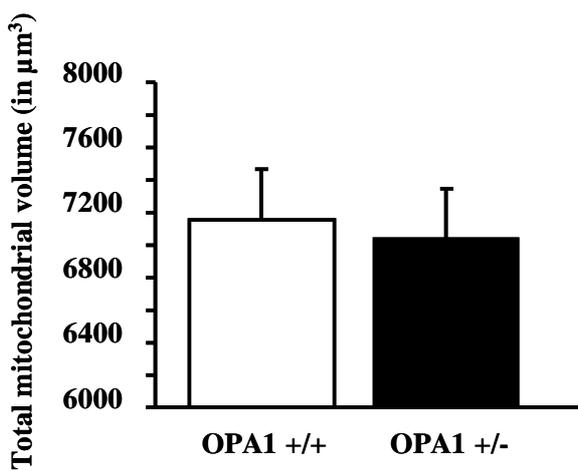
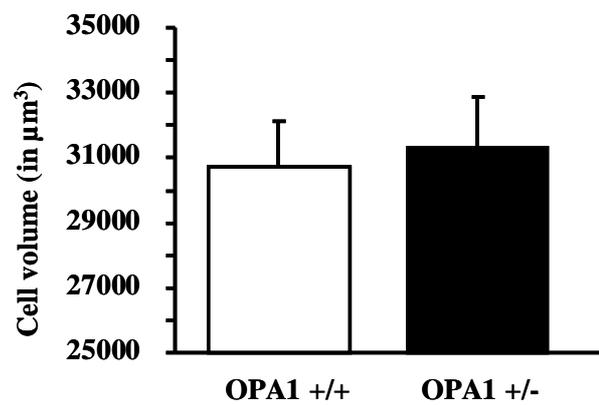


Figure 3

A**B****C****D****E****Figure 4**

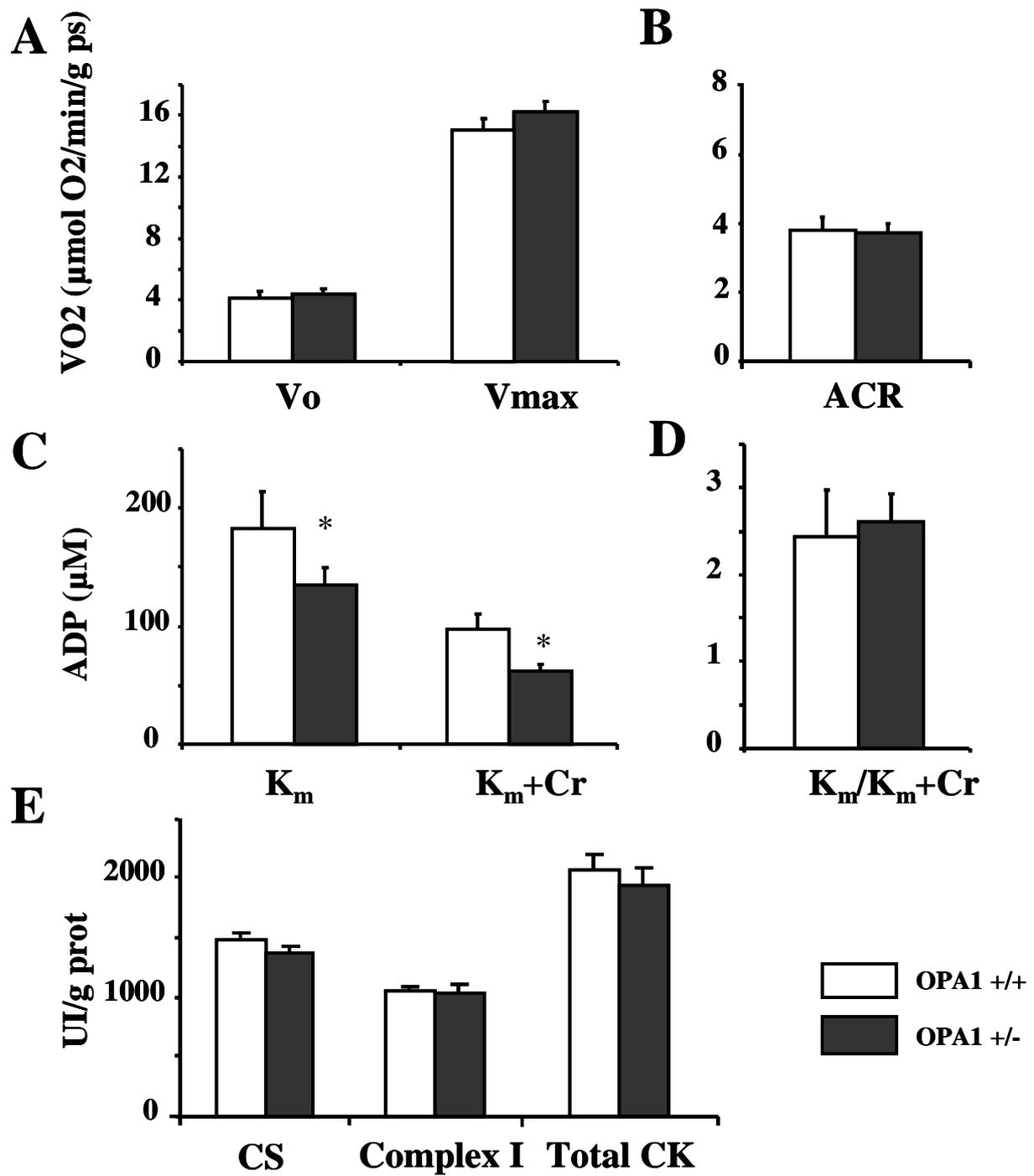
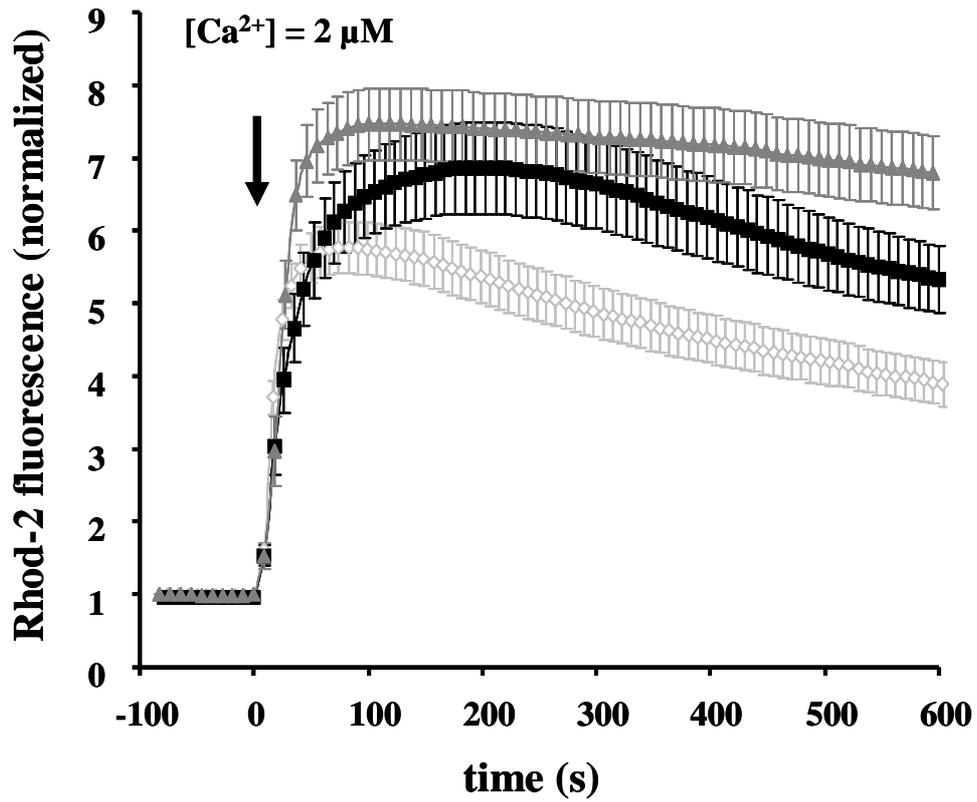
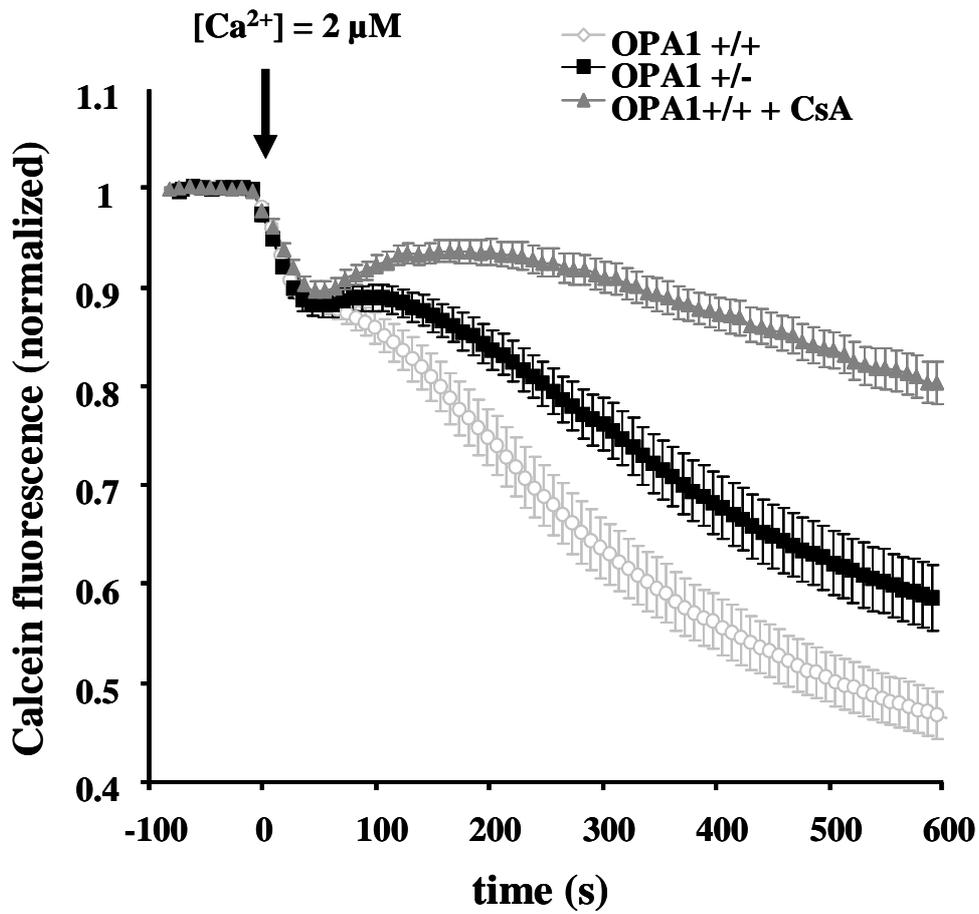
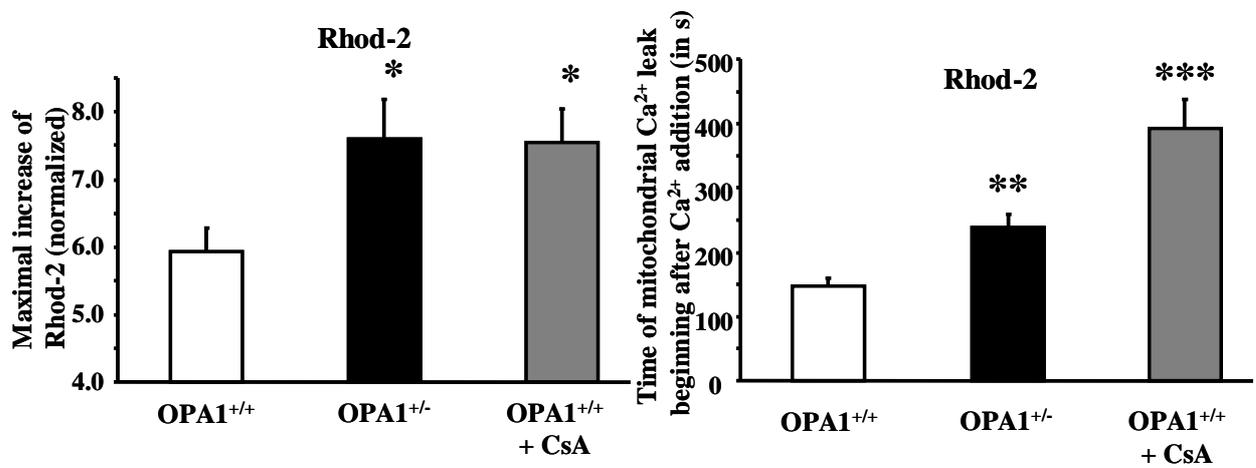
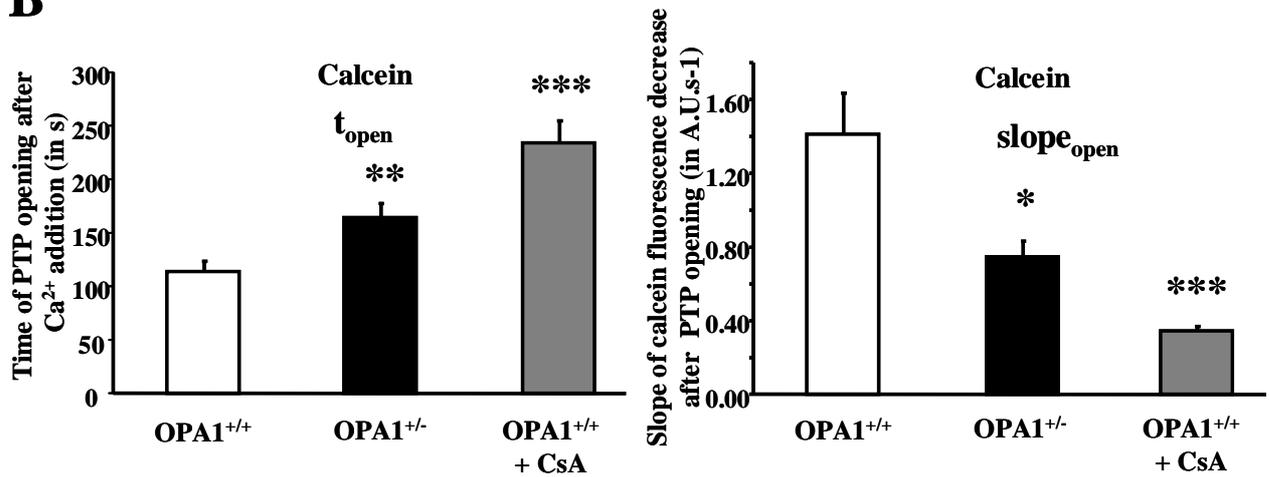


Figure 5

A**B****Figure 6**

A**B****Figure 7**

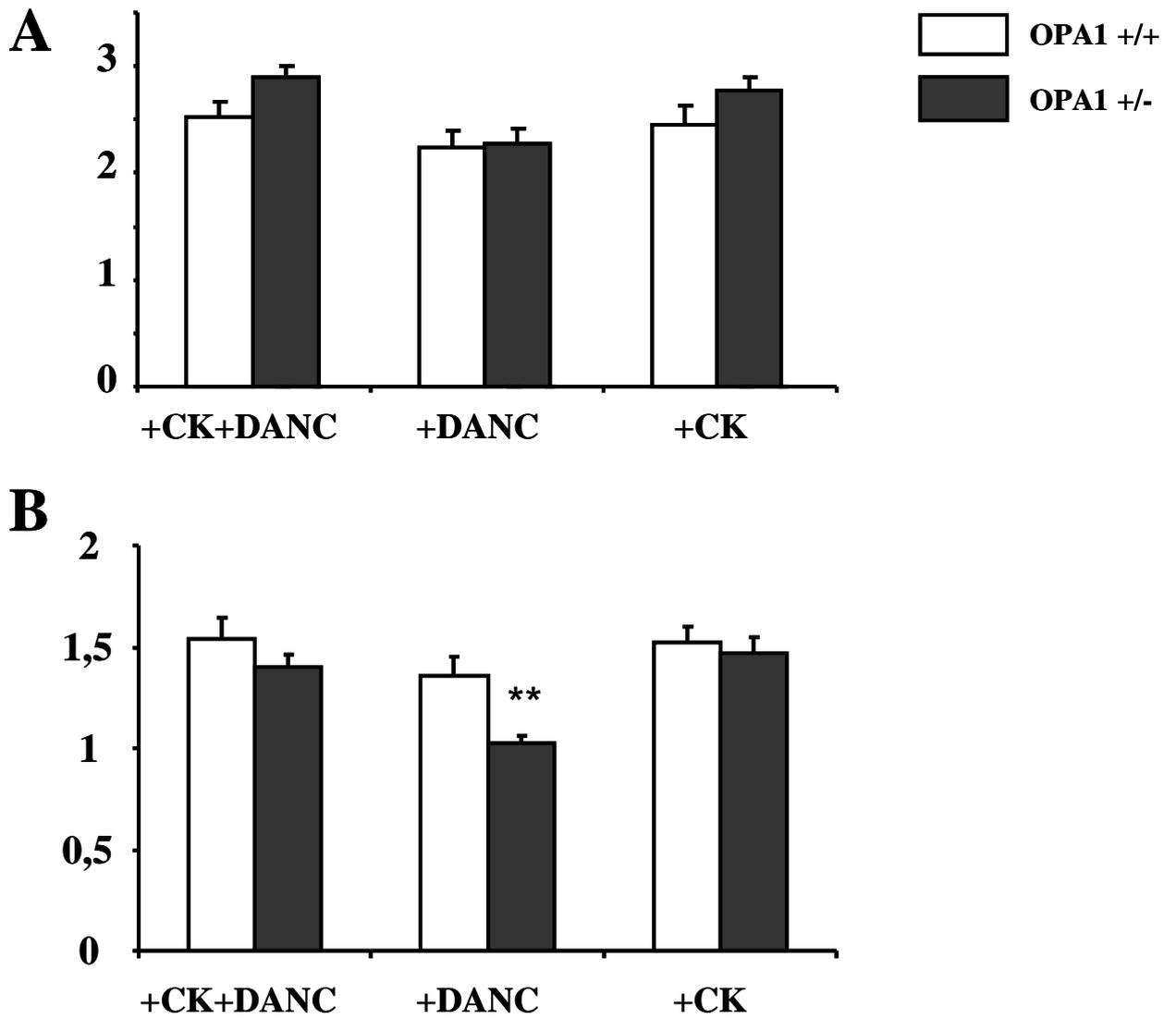


Figure 8

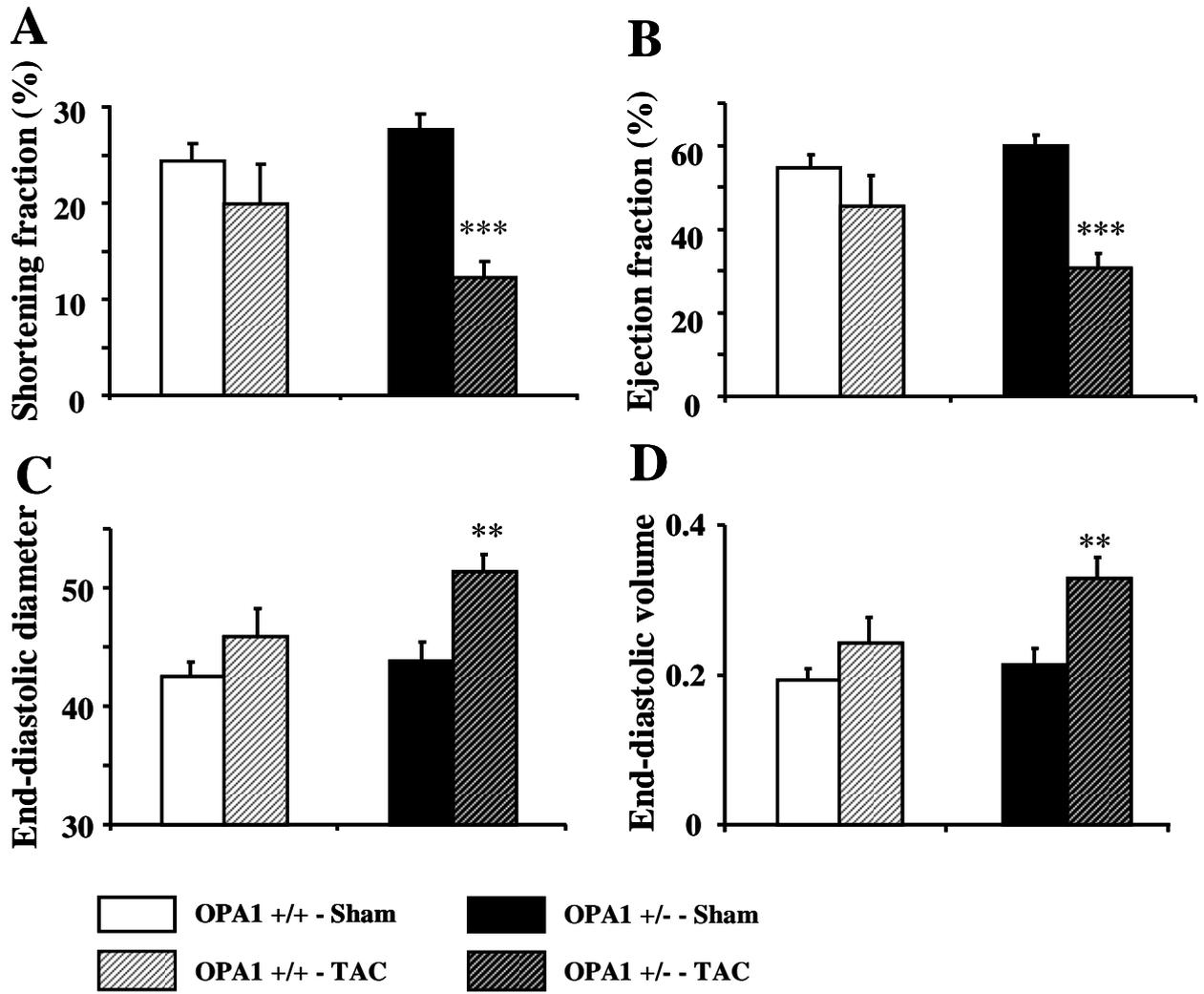


Figure 9

La première étape de l'étude a consisté à vérifier le niveau d'expression de la protéine OPA1 chez les souris mutantes. Il a ainsi été montré que ces animaux présentent une diminution d'environ 30% du niveau d'expression de la protéine par rapport aux contrôles, ce qui est légèrement inférieur à la réduction de 50% annoncée par l'équipe ayant fourni l'animal (Alavi *et al.*, 2007). La technique de Western blot utilisée dans les deux études n'étant cependant pas une des plus précises en terme de quantification et la mesure n'ayant pas été réalisée à partir des mêmes organes (cœur versus rétine), il peut être admis que les résultats sont concordants et que le point essentiel reste la confirmation d'une diminution relativement importante de la quantité de protéine OPA1 chez les souris Opa1^{+/-}. De manière intéressante, cette réduction d'expression n'induit aucun remaniement de l'expression des gènes des autres protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale.

Il a été montré, au cours de cette étude, que les souris Opa1^{+/-} âgées de 5 mois présentent une croissance générale, estimée par la mesure du poids du corps et de la longueur du tibia, et une croissance cardiaque comparables au souris contrôles. Le myocarde semble de plus être capable de générer une force tout à fait adaptée au bon fonctionnement circulatoire puisque la tension développée par les fibres ventriculaires perméabilisées à la saponine ainsi que leur sensibilité au calcium sont sensiblement les mêmes dans les deux groupes. Ces données, combinées à la normalité des paramètres fonctionnels mesurés par échocardiographie (fraction de raccourcissement, fraction d'éjection, diamètre et volume télédiastoliques) chez les souris contrôles âgée de 2,5 mois (Opa1^{+/+} et Opa1^{+/-}), attestent de la fonction parfaitement normale du cœur des souris ayant un déficit d'expression de la protéine de fusion. Le contraire eût été surprenant puisqu'il a été décrit que les souris Opa1^{+/-} ont une espérance de vie équivalente au souris Opa1^{+/+} (Alavi *et al.*, 2007) qui suggère un myocarde capable d'assurer une fonction adéquate dans le cadre d'une vie sans stress majeur.

La protéine OPA1 étant impliquée dans la fusion de la membrane interne de la mitochondrie, l'étude a tout d'abord été portée sur les conséquences de cette diminution du niveau d'expression de la protéine sur la morphologie du réseau mitochondrial et l'architecture cellulaire d'une façon générale. L'observation de l'organite et de son organisation a été réalisée par deux techniques de microscopie complémentaires qui ont montré une plus grande hétérogénéité dans la taille et la forme des mitochondries, associée à une proportion plus importante de grosses mitochondries chez les souris hétérozygotes. De plus, l'organisation intracellulaire stricte observée chez les souris contrôles semble être altérée

chez les souris affichant une réduction de l'expression de la protéine de fusion puisque les mitochondries forment, chez ces dernières, de nombreux amas qui se démarquent de l'organisation réticulaire des cardiomyocytes sains.

Malgré la diminution du nombre de mitochondries par cellule chez les animaux mutants, le volume mitochondrial total reste similaire à celui mesuré chez le contrôle, poussant ainsi à penser que les mitochondries sont sujettes à un processus fusionnel. Ce résultat, bien que très intéressant, n'en reste pas moins surprenant. Il va en effet à l'encontre de tout ce qui a pu être décrit dans la littérature puisque de nombreuses études ont montré qu'une perte d'expression des protéines impliquées dans la fusion de l'organelle (Mfn1, Mfn2 et OPA1) conduit de façon systématique à une fragmentation du réseau mitochondrial et à la formation de petites mitochondries (Chen *et al.*, 2003 ; Olichon *et al.*, 2003 ; Cipolat *et al.*, 2004 ; Griparic *et al.*, 2007).

La diminution d'expression de la protéine OPA1 affectant, de façon non négligeable, la morphologie mitochondriale, il était intéressant d'étudier quelles pouvaient être les conséquences de cette réduction d'expression et de ces modifications morphologiques sur les propriétés intrinsèques des mitochondries. La mesure de la respiration mitochondriale réalisée au cours de cette étude a ainsi montré qu'il n'existe pas de différence significative entre les capacités respiratoires des souris mutantes et des contrôles, excepté le fait que le K_m pour l'ADP soit un peu plus faible chez les souris $Opa1^{+/-}$. Ce résultat, associé au fait que la masse mitochondriale (estimée par la mesure de l'activité de la CS) et le volume mitochondrial sont également similaires chez les souris $Opa1^{+/+}$ et $Opa1^{+/-}$, suggère une même capacité de production énergétique.

Si les mitochondries ont des capacités oxydatives équivalentes dans les deux groupes, cette étude a en revanche montré que les mitochondries des souris $Opa1^{+/-}$ sont capables d'accumuler significativement plus de calcium et présentent ainsi une ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) plus tardive en réponse à l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium.

L'étude a ensuite été poursuivie par une évaluation des systèmes de transfert d'énergie de manière à mettre en évidence, si elles existent, les conséquences de la diminution d'OPA1, et de la perturbation de la morphologie mitochondriale, sur la signalisation énergétique. Si les différents systèmes de transfert d'énergie (CK et canalisation direct des nucléotides) permettant l'approvisionnement de SERCA ne semblent pas être altérés chez les souris

Opa1^{+/-}, il apparaît que le transfert des nucléotides entre les mitochondries et la myosine-ATPase par canalisation directe est moins efficace chez les souris mutantes que chez les contrôles. Il semblerait donc que la morphologie même des mitochondries pourrait perturber les échanges énergétiques. Ce résultat constitue un nouvel élément indiquant que l'architecture cellulaire joue un rôle crucial dans l'établissement de transferts énergétiques efficaces (Wilding *et al.*, 2006 ; Illaste *et al.*, 2010 ; Illaste *et al.*, 2010 ; Joubert *et al.*, 2008 ; Piquereau *et al.*, 2010).

Malgré cette altération du système de canalisation directe des nucléotides au voisinage de la myosine-ATPase, les souris Opa1^{+/-} vivent tout à fait normalement ce qui pourrait avoir tendance à discréditer l'utilité d'un tel système de transfert. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une redondance existe entre les différents systèmes de transfert et permet une certaine compensation dans la mesure où le travail cardiaque reste modéré (Kaasik *et al.*, 2001). C'est pourquoi la dernière étape de cette étude a consisté à stimuler la fonction cardiaque de ces souris. Il a ainsi été montré que les cœurs de souris exprimant moins de protéine OPA1 s'hypertrophient de façon plus importante que chez les souris contrôles et présentent des diminutions de la fraction de raccourcissement et d'éjection ainsi que des augmentations du diamètre et du volume télédiastoliques qui n'apparaissent pas chez les souris Opa1^{+/+} ayant subi la même opération. Le cœur de ces souris serait ainsi beaucoup plus sensible à l'augmentation de la post-charge hémodynamique que celles du cœur des souris contrôles. Cette sensibilité accrue des souris hétérozygotes rappelle celle décrite sur la drosophile par l'équipe de T.Huang qui a montré que les drosophiles exprimant moins de protéine OPA1 développent des arrhythmies cardiaques (Shahrestani *et al.*, 2009).

Discussion générale et conclusions

Le but de ce travail était de déterminer si les transferts énergétiques, et notamment le système de canalisation directe des nucléotides adényliques, étaient dépendants de la cytoarchitecture particulière de la cellule cardiaque. Pour ce faire, deux modèles d'étude ont été choisis selon une hypothèse commune qui leur attribuait des bouleversements importants de l'architecture des cardiomyocytes. De manière à donner de la puissance à l'argumentaire final, la problématique a été abordée au moyen de deux stratégies différentes qui devaient permettre d'explorer l'efficacité des systèmes de transfert d'énergie au cours de phénomènes opposés : la « mise en place » et la « désorganisation » de l'architecture cellulaire. La partie expérimentale a ainsi été basée, dans un premier temps, sur l'établissement conjoint de l'architecture cellulaire et des transferts énergétiques durant le développement postnatal, avant de s'intéresser à l'énergétique des cardiomyocytes de souris *Opa1*^{+/-} censés présenter des perturbations architecturales importantes.

Le choix de ces deux modèles constitue bien évidemment un point critique de cette étude étant donné que les résultats et les conclusions de ce travail sont directement dépendants de celui-ci. C'est pourquoi, il semble judicieux de juger de la capacité des deux modèles utilisés à répondre à la question principale de ce travail.

I. Pertinence des modèles

Si l'idée de travailler au cours du développement postnatal était plutôt confortable compte tenu du fait que de nombreuses études avaient déjà décrit de larges remaniements de l'organisation cellulaire durant la période périnatale (Cartwright & Goldstein, 1985 ; Li *et al.*, 1997a ; Ehler & Perriard, 2000), celle qui consistait à travailler sur un modèle de souris présentant un déficit d'expression d'une protéine de la dynamique mitochondriale était plus risquée. Ces phénomènes de dynamique ont en effet été très peu étudiés dans le cœur et il semblerait, selon une étude du groupe de V. Saks (Beraud *et al.*, 2009), que les processus de fusion et de fission, ou du moins les mouvements des mitochondries, soient très discrets dans les cardiomyocytes adultes qui présentent un arrangement mitochondrial particulier (Vendelin *et al.*, 2005 ; Birkedal *et al.*, 2006) difficilement compatible avec les processus fusionnels et fissionnels. De plus, aucune atteinte cardiaque n'a à ce jour été rapportée chez les malades atteints d'une mutation du gène *Opa1* qui présentent essentiellement des détériorations sévères de la vision (Votruba *et al.*, 1998). Il n'était donc, *a priori*, pas certain que les

cardiomyocytes de ce modèle de souris affichent une désorganisation importante du réseau mitochondrial en réponse à une diminution de l'expression de la protéine OPA1.

Si cette étude menée par le groupe de V. Saks (Beraud *et al.*, 2009) mettait en péril l'idée d'un réseau mitochondrial dynamique dans le cœur, il était cependant difficile d'imaginer un myocarde adulte exempt de toute dynamique mitochondriale qui est tout de même indispensable à des phénomènes tels que la biogénèse des mitochondries (Ventura-Clapier *et al.*, 2010). De plus, la forte expression des protéines de la dynamique mitochondriale dans le cœur, telles que les mitofusines et OPA1, (Alexander *et al.*, 2000 ; Delettre *et al.*, 2001 ; Nakamura *et al.*, 2006) ainsi que la diminution de l'expression de MFN2 et OPA1 accompagnée d'une fragmentation mitochondriale dans des situations d'hypertrophies physiologiques ou pathologiques (Fang *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2009) plaident en faveur d'une dynamique du réseau mitochondriale cardiaque.

Le modèle de souris mutée pour le gène *Opa1* utilisé au cours de cette étude a, par ailleurs, l'avantage de présenter un déficit constant de l'expression de la protéine tout au long de la vie de l'animal. Le cœur de cet animal est ainsi soumis à ce déficit d'expression durant le développement embryonnaire et le développement postnatal qui sont des périodes connues pour afficher des activités de biogénèse et de dynamique mitochondriale importantes (pour revue voir Ong & Hausenloy, 2010). Il était donc tout à fait raisonnable de penser que la diminution d'expression de la protéine OPA1 puisse conduire à des perturbations importantes du réseau mitochondrial dans le modèle étudié, même à un âge avancé.

L'aptitude des modèles à apporter des réponses quant à l'implication de l'architecture cellulaire dans l'efficacité des transferts énergétiques ne réside pas simplement dans le fait d'exhiber une cytoarchitecture particulière. Ces modèles doivent également présenter une fonction mitochondriale qui permette de tirer des conclusions, c'est pourquoi l'étude de la fonction mitochondriale s'est révélée essentielle.

A. Architecture cellulaire des différents modèles

1. Evolution de la cytoarchitecture durant le développement postnatal

Au cours de l'étude menée durant le développement postnatal, il a clairement été montré que l'architecture cellulaire du cardiomyocyte subit de profonds remaniements dès les

premiers jours de vie des souris. Ces modifications majeures de la structure de la cellule cardiaque sont, au même titre que les processus d'hyperplasie et d'hypertrophie, des éléments essentiels de la réponse du cœur pour augmenter son efficacité face au constant accroissement de la demande énergétique de l'organisme en croissance. La période comprise entre 3 et 7 jours après la naissance apparaît comme étant l'étape la plus importante de la mise en place de l'architecture cellulaire. Elle permet en effet à la cellule cardiaque de passer d'un état structurel relativement anarchique, où les mitochondries sont aléatoirement dispersées dans le cytoplasme, à une organisation réticulaire de l'ensemble des organites ressemblant très fortement à la disposition stricte des organelles du cardiomyocyte adulte observée lors de l'étude et également décrite par T. Ogata (Ogata & Yamasaki, 1985). De plus, la part cytoplasmique libre caractéristique des cardiomyocytes néonataux (Muhlfeld *et al.*, 2006) décroît fortement après 3 jours, suggérant une densification des structures internes et notamment une augmentation importante de la densité des myofilaments qui permet un accroissement de la force développée par les fibres cardiaques (Reiser *et al.*, 1994 ; Siedner *et al.*, 2003).

De manière intéressante, il semble exister une concordance parfaite entre la mise en place de l'architecture et l'étape de transition entre la phase hyperplasique et la phase hypertrophique de la croissance cardiaque qui commence environ 4 jours après la naissance des souriceaux (Leu *et al.*, 2001). Il est à noter qu'au-delà du simple établissement, visible par microscopie, de la cytoarchitecture du cardiomyocyte en cours de maturation, cette période, durant laquelle hyperplasie et hypertrophie coexistent, est également marquée par l'apparition de l'intervention du RS dans la contraction de la cellule cardiaque qui jusque là dépendait essentiellement du flux calcique transsarcolemmal (Tanaka *et al.*, 1998 ; Schroder *et al.*, 2006). Ceci est le reflet d'une réelle complexification de la structure interne du cardiomyocyte, atteignant son paroxysme avec la formation de tubules transverses aux alentours du quinzième jour après la naissance (Ziman *et al.*, 2009), qui dès lors nécessite un système calcique suffisamment efficace pour accéder à l'ensemble des myofibrilles. De manière générale, l'apparition d'un couplage excitation-contraction mature est révélatrice de l'exigence organisationnelle requise par la structure de plus en plus complexe de la cellule cardiaque en maturation qui, à partir d'un certain degré structurel, ne peut plus se contenter de simples mécanismes de diffusion.

Il semblerait que la période d'hyperplasie soit le théâtre de l'acquisition des caractéristiques physiologiques adultes par le jeune cardiomyocyte. Il en deviendrait alors presque évident qu'il y ait une synchronisation parfaite de la transition entre les deux types de croissance avec la mise en place de l'architecture cellulaire. S'il est en effet parfaitement concevable que la cellule pseudo-organisée du cœur néonatal puisse se diviser de façon à augmenter la masse musculaire cardiaque en début de vie postnatale, ce processus paraît plus difficilement envisageable pour une cellule ayant déjà acquis une architecture cellulaire présentant la complexité du cardiomyocyte adulte. Il est donc imaginable que, comme le suggèrent deux précédentes études (Li *et al.*, 1997a ; Li *et al.*, 1997 b), la densification des structures internes du cardiomyocyte soit la composante majeure qui conduirait à l'arrêt de l'hyperplasie pour passer à une croissance cardiaque strictement hypertrophique. Cette phase d'hypertrophie n'aurait alors pour rôle que d'augmenter la densité de myofilaments, et la quantité de mitochondries, sans pour autant modifier l'arrangement spatial des organites ; ceci expliquerait parfaitement le profil très similaire de l'architecture cellulaire des cardiomyocytes des souris de 7, 21 et 63 jours observés durant l'étude. Pour aller plus loin et s'assurer de ce rôle de premier plan que pourrait jouer l'architecture dans cette étape de transition, il serait intéressant d'étudier conjointement ces deux phénomènes dans plusieurs espèces présentant des différences dans la chronologie des processus hyperplasiques et hypertrophiques de la croissance cardiaque.

2. Conséquences d'un déficit d'expression d'OPAI sur la cytoarchitecture

L'observation de l'architecture cellulaire de cardiomyocytes de souris *Opa1*^{+/-} a montré qu'une diminution d'expression d'environ 30% de la protéine de fusion a des conséquences importantes sur la morphologie des mitochondries des cellules musculaires cardiaques du modèle étudié. Si des effets sur le réseau mitochondrial étaient espérés dès la conception de l'étude, ils n'en ont pas moins été surprenants puisqu'ils vont à l'encontre de tout ce qui avait été publié jusqu'à maintenant. De nombreux travaux s'attachant à l'étude des mécanismes impliqués dans la dynamique mitochondriale ont en effet eu recours à des techniques permettant de modifier les niveaux d'expression des protéines responsables des processus de fusion ou de fission (Chen *et al.*, 2003 ; Yoon *et al.*, 2003 ; Olichon *et al.*, 2003 ; Cipolat *et al.*, 2004 ; Stojanovski *et al.*, 2004 ; Griparic *et al.*, 2007). Il s'avère que les résultats qui en découlent ont fait émerger l'idée, simpliste mais séduisante, que la diminution de l'expression d'une protéine de fusion ou de fission conduit respectivement à la

fragmentation ou à la fusion du réseau mitochondrial. Ces données antérieures sont toutefois à prendre avec beaucoup des précautions puisqu'elles ont été obtenues sur des cultures cellulaires et dans des conditions où l'inhibition de l'expression des protéines ciblées était quasiment complète. Il faut de plus rappeler que, dans le cadre de ce projet, l'étude a été réalisée sur le muscle cardiaque qui, comme il a été dit précédemment, doit certainement présenter des régulations particulières des processus de la dynamique mitochondriale en raison de son organisation cellulaire singulière. Ces arguments ne sont en revanche pas valables pour expliquer l'opposition de ces résultats à ceux obtenus par L. Chen et ses collègues dans une étude qui met en relation la diminution de l'expression d'OPA1 et la fragmentation du réseau mitochondrial observées dans l'insuffisance cardiaque chez le rat (Chen *et al.*, 2009). Il faut cependant rappeler qu'un très grand nombre de paramètres sont modifiés dans une pathologie comme l'insuffisance cardiaque et que, par conséquent, il est difficile d'établir un lien de cause à effet entre l'expression d'OPA1 et le profil du réseau mitochondrial dans le modèle utilisé par L. Chen. De plus, le fait que la masse mitochondriale totale diminue au cours de l'insuffisance cardiaque chez le rat (De Sousa *et al.*, 1999 ; Garnier *et al.*, 2003 ; Garnier *et al.*, 2009) remet en cause la réalité physiologique de la diminution d'OPA1 mesurée dans ce modèle. Dans l'éventualité où les diminutions d'expression d'OPA1 et de la quantité de mitochondries seraient du même ordre, il serait en effet judicieux de se demander s'il peut être considéré que le changement du niveau d'expression est perçu comme une diminution de la quantité de protéine OPA1 du point de vue de l'organe et de sa dynamique.

Si la morphologie mitochondriale observée chez le modèle de souris mutée a dans un premier temps été déstabilisante, une observation plus précise des structures par microscopie électronique a cependant permis de proposer une théorie qui pourrait expliquer le déplacement de la balance de la dynamique mitochondriale vers la fusion chez ces souris. A très fort grossissement, il apparaît que les « grosses mitochondries », affichées par les souris Opa1^{+/-}, présentent des caractéristiques inhabituelles au niveau de leur structure interne. Les crêtes mitochondriales montrent effectivement une désorganisation particulière qui donne l'impression que ces « grosses mitochondries » seraient le résultat de la fusion incomplète de plusieurs mitochondries qui auraient seulement fusionné leur membrane externe. La morphologie des mitochondries des souris Opa1^{+/-} pourrait alors être la conséquence d'un échec du phénomène de fusion qui conduirait au blocage des processus de la dynamique mitochondriale en raison de l'impossibilité de fusionner correctement les membranes internes.

Bien que cette hypothèse soit fascinante, elle est cependant à considérer avec prudence. Malgré la puissance de la technique de microscopie électronique, les crêtes mitochondriales restent des structures présentant une organisation très complexe et il est difficile d'affirmer avec certitude que les membranes internes ne sont pas fusionnées dans les « grosses mitochondries ». L'organisation très particulière des crêtes de ces mitochondries pourrait simplement être expliquée par le rôle que joue la protéine OPA1 dans la morphologie des crêtes mitochondriales (Frezza *et al.*, 2006), sans pour autant impliquer un problème de fusion.

Quoiqu'il en soit, le phénomène responsable de l'apparition de mitochondries surdimensionnées semble conduire à une dérégulation de la répartition de la masse mitochondriale au sein de la cellule cardiaque. Les mitochondries s'organisent ainsi sous forme d'amas et sont alignées de façon beaucoup moins régulière chez les souris mutées que chez les souris contrôles qui présentent la structure cellulaire traditionnellement décrite chez les cardiomyocytes (Ogata & Yamasaki, 1985).

Si cette étude semble montrer qu'une réduction permanente, depuis la cellule œuf, de l'expression d'une protéine impliquée dans la fusion des mitochondries conduit à d'importantes perturbations de la morphologie de l'organelle, il est cependant difficile de tirer des conclusions générales quant à l'aspect dynamique du réseau mitochondrial dans le cœur adulte. La perturbation des processus de la dynamique mitochondriale s'effectuant tout au long de la vie de l'animal, il est en effet impossible de déduire si la morphologie observée est strictement due aux phénomènes dynamiques se déroulant pendant le développement embryonnaire et postnatal ou si d'hypothétiques fusions et fissions chez l'adulte pourraient prendre part à ce phénotype.

B. Fonction mitochondriale des différents modèles

L'évaluation de la fonction de la chaîne respiratoire a été réalisée sur des préparations de fibres cardiaques perméabilisées (Veksler *et al.*, 1987 ; Kuznetsov *et al.*, 2008). Le fait de travailler sur fibres perméabilisées plutôt que sur mitochondries isolées a présenté un réel intérêt dans le cadre de ce projet puisque les propriétés mitochondriales ont ainsi été étudiées dans un système cellulaire intégré où la cytoarchitecture est indemne et où les mitochondries

conservent leur position et leurs interactions originelles (Saks *et al.*, 1998 , Rizzuto *et al.*, 1998 ; Milner *et al.*, 2000 ; Kuznetsov *et al.*, 2008). Sachant que les propriétés mitochondriales semblent être fortement dépendantes de leur environnement cellulaire (Saks *et al.*, 1991 ; Saks *et al.*, 1995 ; Kay *et al.*, 1997), il était primordial d'étudier l'organite dans une situation se rapprochant des conditions *in vivo*. L'étude de la respiration de l'organite sur fibres perméabilisées paraissait ainsi être la mieux adaptée pour examiner la fonction mitochondriale des modèles utilisés qui sont caractérisés par des architectures particulières susceptibles d'influer sur les propriétés des mitochondries.

Le recours aux fibres perméabilisées permet en outre de s'affranchir de la sélection mitochondriale inhérente à la préparation de mitochondries isolées, autorisant ainsi l'étude de l'ensemble de la population mitochondriale. Etant donné que le travail a été réalisé sur des souris de différents âges et sur des souris mutées, il paraissait en effet essentiel d'éviter un quelconque processus de sélection des mitochondries puisqu'il est fort possible que les mitochondries des souris n'ayant pas le même âge ou n'exprimant pas la même quantité de protéine OPA1 puissent afficher une résistance différente face aux étapes d'isolation.

1. Fonction mitochondriale et développement postnatal

Les résultats obtenus au cours de l'étude menée sur le développement postnatal du cœur de souris ont montré que la maturation des capacités oxydatives est un processus relativement long. Si l'augmentation progressive des capacités respiratoires des mitochondries mais aussi de la masse mitochondriale était plutôt attendue durant cette période, il est en revanche assez surprenant de constater qu'il n'y a pas de réelle évolution de ces deux paramètres durant la première semaine de vie. Etant donné que, durant la période comprise entre 3 jours et 7 jours, le cardiomyocyte est sujet à des bouleversements importants de l'architecture du cardiomyocyte, mais aussi à un accroissement conséquent de la demande énergétique en raison de l'apparition d'un RS fonctionnel et d'une densification des myofilaments, il était effectivement raisonnable de s'attendre à une augmentation fulgurante de la production énergétique entre ces deux âges. Ce n'est cependant pas le cas, et c'est bien au contraire le contraste entre la mise en place très précoce de l'architecture cellulaire et la maturation tardive des mitochondries qui se dégage ici de manière très intéressante.

L'étude de la fonction mitochondriale a également permis de mettre en évidence une augmentation tardive du K_m pour l'ADP qui pourrait être le reflet d'un deuxième processus de

maturation de l'architecture cellulaire, après celui clairement observé entre 3 et 7 jours. Il s'instaurerait en fait une véritable compartimentation mitochondriale qui nécessiterait alors la mise en jeu de la CK mitochondriale pour assurer la distribution des nucléotides adényliques entre le cytoplasme et ce compartiment. Ce mécanisme de maturation secondaire ne reste bien évidemment qu'une hypothèse puisque la variation du K_m des mitochondries pour l'ADP pourrait avoir de multiples explications. Il a en effet déjà été suggéré que ce paramètre pouvait être influencé par des interactions protéiques encore méconnues (Kay *et al.*, 1997 ; Saks *et al.*, 1994 ; Saks *et al.*, 1991) et la capacité de l'ADP à stimuler la respiration dépend en outre de la perméabilité des membranes mitochondriales. Cet accroissement soudain de la sensibilité des mitochondries à l'ADP pourrait ainsi être relié au profil d'expression durant le développement de protéines comme VDAC (Timohhina *et al.*, 2009) ou comme l'ANT, et en particulier l'isoforme ANT1 qui mature relativement lentement (Skarka *et al.*, 2003).

2. Fonction mitochondriale et déficit d'OPA1

L'analyse des capacités oxydatives chez le modèle de souris présentant un déficit d'expression de la protéine OPA1 a montré qu'il n'existe pas de différence majeure entre les souris mutées et les souris contrôles. Si ce résultat peut paraître un peu surprenant au regard des études précédemment réalisées sur des modèles affichant une diminution d'expression d'OPA1 (Chen *et al.*, 2005), il peut tout de même s'expliquer par la relative faiblesse de la perte d'expression de la protéine par rapport à ces modèles. Ce résultat concorde de plus avec une étude réalisée sur des leucocytes de patients atteints d'atrophie optique qui, comme les souris *Opa1*^{+/-}, ont une mutation du gène *Opa1* de façon hétérozygote et ne présentent pas d'altération de leur fonction mitochondriale (Mayorov *et al.*, 2008). Cette fonction normale des mitochondries est enfin en accord avec les données échocardiographiques des souris *Opa1*^{+/-} non stimulée et l'espérance de vie des animaux mutés qui sont tout à fait équivalentes à celles des contrôles. Il serait, en effet, difficilement imaginable que les souris puissent vivre normalement, et avoir une espérance de vie similaire aux souris contrôles, avec des altérations importantes des capacités oxydatives des mitochondries.

De manière intéressante, les mitochondries des souris *Opa1*^{+/-} présentent un K_m pour l'ADP plus faible que celles des souris contrôles signifiant qu'elles sont plus sensibles à l'ADP ajouté dans les solutions utilisées pour mesurer leur capacité respiratoire. Tout comme pour l'étude réalisée au cours du développement postnatal, les différences de K_m peuvent faire

émerger plusieurs explications toutes aussi hypothétiques les unes que les autres. Il pourrait ainsi être supposé que les modifications de l'architecture cellulaire engendrées par les « grosses mitochondries » conduiraient à la rupture de la compartimentation des mitochondries qui favoriserait ainsi l'accès de l'ADP exogène aux organites. Mais il peut également être suggéré que, d'une manière ou d'une autre, la diminution de la quantité d'OPA1 rendrait les membranes mitochondriales plus perméables à l'ADP.

Les résultats les plus frappants et les plus surprenants, obtenus durant cette étude de la fonction mitochondriale, sont sans doute la modification des propriétés d'ouverture du PTP et une capacité de rétention calcique accrue chez les mitochondries des souris *OPA1*^{+/-}. Ceci semblerait indiquer que ces mitochondries ont développé un mécanisme de protection qui les rendrait moins susceptibles à l'apoptose. Bien que cette notion s'oppose une nouvelle fois à une précédente étude (Chen *et al.*, 2009), elle est en adéquation avec la morphologie des mitochondries du modèle étudié puisque la favorisation de la fusion ou l'inhibition de la fission conduisant à la formation de « grosses mitochondries » s'opposerait à l'apoptose (Frank *et al.*, 2001 ; Sugioka *et al.*, 2004) ; les mécanismes impliqués dans ce processus sont toutefois sujets à controverse (pour revue voir Sheridan & Martin, 2010). Il est cependant difficile de dire quel est le lien entre la diminution d'expression de la protéine OPA1 et le fait que le PTP s'ouvre pour des concentrations intracellulaires de calcium plus importantes chez les souris hétérozygotes. Il se pourrait que ceci soit simplement dû à la morphologie particulière des mitochondries qui, par un mécanisme inconnu, conduirait à une modification des propriétés d'ouverture du pore. Une autre hypothèse, tout aussi acceptable, pourrait faire intervenir OPA1 dans la formation de PTP bien qu'aucune interaction entre OPA1 et les protéines du PTP n'ait à ce jour été rapportée. Cependant, sachant que l'élaboration du PTP est un phénomène transitoire et que la protéine OPA1 est non seulement enchâssée dans la membrane interne de la mitochondrie mais peut aussi interagir avec des protéines de la membrane externe (Sato *et al.*, 2003), il pourrait être suggéré que la protéine OPA1 soit impliquée dans le recrutement des différentes protéines du PTP et jouerait ainsi un rôle dans la formation du pore. Cette dernière hypothèse mérite bien sûr de plus amples investigations, à commencer par des expériences d'immunoprécipitation pour déterminer si OPA1 est effectivement capable d'interagir directement avec des protéines telles que l'ANT et VDAC.

Les deux modèles animaux utilisés au cours de ce projet présentent clairement d'importantes modifications de l'architecture cellulaire, conformément à ce qui était attendu. Si ce critère s'avérait être nécessaire pour juger de l'implication de cette cytoarchitecture dans le bon fonctionnement des transferts énergétiques, elle n'était cependant pas suffisante. De manière à incriminer l'architecture dans un gain potentiel d'efficacité de la canalisation directe, il était en effet indispensable que la fonction mitochondriale ne varie pas entre la situation affichant un désordre architectural et la situation où les structures internes étaient parfaitement organisées. Dans le cas contraire, il aurait assurément été impossible de conclure quant à l'élément responsable du meilleur rendement du système énergétique. Sachant que la fonction des mitochondries de souris âgées de 3 et 7 jours ainsi que des souris $Opa1^{+/-}$ et $Opa1^{+/+}$ est assez similaire, il devient alors évident que les deux modèles d'étude choisis étaient tout à fait adaptés pour répondre à la question posée.

II. Cardiomyocyte et transferts énergétiques

L'estimation de la capacité des différents acteurs (CK et mitochondries) à approvisionner SERCA et la myosine-ATPase en énergie a été réalisée sur fibres cardiaques perméabilisées. Si la détermination de l'efficacité des systèmes énergétiques au voisinage des myofilaments s'est déroulée sans problème, elle a en revanche été moins aisée au voisinage de SERCA où elle a été réalisée de manière indirecte en mesurant la charge calcique du RS induite dans différentes conditions. Cette technique, bien qu'utilisée depuis de nombreuses années au laboratoire (Minajeva *et al.*, 1996 ; De Sousa *et al.*, 1999) a montré quelques limites puisqu'elle a souffert, chez les souris les plus jeunes (3 jours), de l'immaturité du RS. Cette difficulté était, toutefois, attendue puisque la maturation tardive du RS avait déjà été décrite lors d'études précédentes (Tanaka *et al.*, 1998 ; Schroder *et al.*, 2006). A partir de 7 jours après la naissance, il a en revanche été possible d'enregistrer une tension des fibres en présence de caféine. Cette mesure, indiquant une libération de calcium conséquente, démontre clairement que le RS est mature à 7 jours et que la technique était adaptée pour étudier les systèmes énergétiques à partir de cet âge.

L'étude effectuée durant le développement postnatal a montré que les micro-domaines énergétiques au niveau des ATPases, impliquant les CK et les mitochondries, s'établissent

très précocement. Ceci met en avant l'importance de la compartimentation énergétique dans un système cellulaire qui présente très rapidement, au cours du développement, des structures internes denses limitant les phénomènes de diffusion. Ainsi, de la même manière que le système calcique qui fait entrer en jeu des structures comme le RS et les tubules transverses lorsque l'architecture cellulaire se complexifie, l'énergétique cellulaire s'organise pour devenir plus efficace. Il semblerait cependant que le processus de maturation des micro-domaines énergétiques n'est pas exactement le même chez toutes les espèces et qu'il pourrait demander plus ou moins de temps. Il apparaît en effet que ces micro-domaines deviennent fonctionnels plus tôt chez la souris que chez le rat (Hoerter *et al.*, 1994) ou le lapin, où le système CK affiche une réelle efficacité qu'à partir de 8 semaines après la naissance (Hoerter *et al.*, 1991), alors qu'une compartimentation des CK est déjà mise en place avant la naissance chez le cobaye (Hoerter *et al.*, 1994).

La mesure de l'efficacité de la canalisation directe chez la souris en cours de développement montre clairement une synchronisation de la maturation de ce système énergétique et de la mise en place de l'architecture. Le fait que le transfert direct des nucléotides adényliques entre les mitochondries et les myosine-ATPases gagne en efficacité entre 3 et 7 jours, période où d'importantes modifications architecturales s'opèrent sans changements majeurs de la fonction mitochondriale, tend à démontrer qu'un lien direct entre architecture cellulaire et transfert énergétique existe. Il est intéressant de noter que l'apparition d'une canalisation directe mature, entre les mitochondries et les ATPases des myofilaments, survient en même temps que l'augmentation de la proportion de l'isoforme α -MHC de la myosine qui présente l'activité ATPasique la plus élevée, suggérant ainsi que la mise en place de ce système de transfert permet de pallier à l'augmentation de la demande énergétique. Cette hypothèse est renforcée par le contraste existant entre des capacités oxydatives mitochondriales qui n'évoluent quasiment pas entre 3 et 7 jours et cette canalisation directe qui acquiert ses caractéristiques adultes à cette même période. Tout semble se passer comme si la mise en place progressive, avec les modifications architecturales, de ce système de transfert permettait de compenser l'augmentation de la demande d'énergie au cours d'une première phase de maturation, jusqu'au moment où ce système, qui atteint son rendement optimal, ne puisse plus faire face à l'accroissement de la demande énergétique ; il s'en suivrait alors une augmentation de la production énergétique par les mitochondries.

L'étude menée sur le modèle de souris présentant un déficit d'expression de la protéine OPA1 confirme la relation étroite entre l'architecture cellulaire et les échanges d'ATP et d'ADP entre les mitochondries et l'ATPase des myofilaments par canalisation directe. Ce système de transfert d'énergie est en effet perturbé chez les souris hétérozygotes qui ne présentent pas d'altération de leur fonction mitochondriale, montrant ainsi que les simples modifications de l'architecture cellulaire engendrées par la morphologie particulière des mitochondries pouvaient être à l'origine d'une perte d'efficacité de la canalisation des nucléotides. Il est en outre intéressant que la morphologie de l'organelle puisse avoir de telles conséquences sur la physiologie du cardiomyocyte ; ceci révèle à quel point la structure du cardiomyocyte est optimisée et qu'elle peut être fragilisée à la moindre perturbation de l'un des éléments constitutifs.

Si l'ensemble des expériences réalisées au cours de ce projet permet de conclure assez sereinement que l'efficacité de la canalisation directe entre les mitochondries et la myosine-ATPase est dépendante de l'architecture cellulaire, la situation concernant ce système au voisinage de SERCA est moins claire. L'évaluation de l'approvisionnement de SERCA par ce type de transfert n'ayant pu être réalisée avant l'âge de 7 jours chez la souris, âge auquel ce transfert énergétique fonctionne de façon optimale au niveau des myofilaments et où l'architecture est mise en place, la dépendance de la canalisation directe au voisinage de SERCA n'a pu être étudiée que chez le modèle des souris *Opa1^{enu/+}*.

Malgré le fait qu'une étude précédente menée par J. Wilding (Wilding *et al.*, 2006) montre une corrélation entre des désordres architecturaux et une perte d'efficacité de la canalisation directe chez des modèles de souris présentant des mutations pour des protéines du cytosquelette, il semble que la dépendance de ce système au niveau du RS vis-à-vis d'une architecture cellulaire particulière soit moins stricte que pour les myofilaments. Les souris mutées, de façon hétérozygote, pour le gène *Opa1* présentent en effet une canalisation directe entre les mitochondries et SERCA tout à fait comparable à celle observée chez les souris contrôles. Il semblerait donc que ce système de transfert accorde un peu plus de flexibilité à l'architecture cellulaire au niveau du RS. Ceci est d'ailleurs en accord avec une étude de F. Joubert et ses collègues qui montre que les régulations locales des ATPases au voisinage des myofilaments sont affectées plus sévèrement qu'au niveau du RS dans un modèle de perturbations de l'architecture comme l'insuffisance cardiaque (Joubert *et al.*, 2008). Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que la rigidité des myofilaments impose un arrangement très particulier des mitochondries alors que le RS, beaucoup plus malléable,

pourrait s'adapté plus facilement à des modifications de l'organisation interne du cardiomyocyte et rester ainsi en contact étroit avec les mitochondries. Il se pourrait également que l'interaction entre le RS et les mitochondries soit plus forte en raison d'un lien physique entre ces deux entités. Même si une telle relation n'a pas encore été mise en évidence, elle reste parfaitement imaginable puisqu'il a été montré récemment que les mitochondries peuvent être liées au réticulum endoplasmique (RE) par l'intermédiaire de Mfn2 (de Brito & Scorrano, 2008). Sachant que le RS se différencie à partir du RE, cette hypothèse est tout à fait plausible. L'étude menée par J. Wilding montre cependant que la flexibilité du RS ou son lien potentiel avec les mitochondries ne sont pas sans limite puisque le transfert direct d'ATP et d'ADP entre les mitochondries et SERCA peut être altéré dans le cas de perturbations architecturales trop importantes.

L'absence de pathologie cardiaque chez les souris *Opa1^{+/-}* confirme qu'il existe une redondance entre le système CK et la canalisation directe qui permet à l'un des systèmes de compenser l'autre lorsqu'il est nécessaire. Ce mécanisme, déjà proposé par A. Kaasik et ses collègues chez les souris n'exprimant pas la CK (Kaasik *et al.*, 2001), permet ainsi au système CK d'assurer l'approvisionnement énergétique des ATPases des myofilaments chez les souris *Opa1^{+/-}* alors même que la canalisation directe n'est pas optimale. Cette compensation montre tout de même des limites. Si elle fonctionne très bien à l'état basal, c'est-à-dire lorsque le cœur n'est pas stimulé outre mesure, il apparaît que la stimulation du cœur par pose d'un clip aortique augmentant la post-charge conduit à une atteinte cardiaque plus sévère chez les animaux ayant une canalisation directe altérée. S'il est difficile d'établir un lien direct entre ces deux éléments, il est toutefois raisonnable de penser qu'en condition de stress la demande énergétique est beaucoup plus importante et requiert alors l'ensemble des capacités de transfert d'énergie. L'altération d'un des types de transfert pourrait alors mener à un déficit de l'apport d'énergie qui aboutirait à une pathologie du tissu cardiaque.

III. Conclusion et perspectives

Ce travail a consisté à étudier l'implication de l'architecture cellulaire dans l'efficacité des transferts d'énergie de la cellule musculaire cardiaque par le biais de deux stratégies. Il a permis de montrer de façon très claire que la canalisation directe des nucléotides adényliques entre les mitochondries et les ATPases des myofilaments est dépendante de l'architecture

hautement spécialisée du cardiomyocyte qui permet une proximité des entités productrices et consommatrices. La dépendance vis-à-vis de la cytoarchitecture est plus difficile à affirmer en ce qui concerne le transfert d'énergie au niveau de SERCA en se basant sur ce travail. Il semble cependant que les données d'études précédentes ainsi que la compréhension du mécanisme de canalisation directe grâce aux informations produites par ce travail permettent de suggérer que ce type de transfert est également en lien avec l'architecture du cardiomyocyte.

De manière très intéressante, ce travail montre également que dans le cas d'une demande accrue d'énergie de la part du myocarde, l'altération des transferts d'énergie par canalisation directe des nucléotides pourrait être un élément déclencheur ou aggravant de pathologie cardiaque. Cette perturbation des transferts énergétiques pourrait ainsi participer à l'aggravation des troubles métaboliques observés dans une pathologie comme l'insuffisance cardiaque, c'est pourquoi il pourrait être intéressant de distinguer plus précisément les éléments, tels que les protéines du cytosquelette, responsables de l'arrangement des organelles au sein du cardiomyocyte. L'identification de ces éléments pourrait permettre de s'orienter vers une nouvelle pharmacologie qui viserait à stabiliser ces derniers de manière à ralentir l'évolution de la pathologie.

L'étude menée sur les souris mutées pour le gène *Opa1* a permis de décrire les grandes lignes du phénotype cardiaque de ce modèle. Il reste néanmoins à approfondir ce travail de manière à découvrir les mécanismes responsables du profil particulier du réseau mitochondrial et de la modification des propriétés d'ouverture du PTP. Il faudra également étudier les raisons d'une plus grande sensibilité de ses souris à une augmentation de la post-charge puisque même si l'altération de la canalisation directe joue certainement un rôle dans ce phénomène, il est fort probable que bien d'autres mécanismes puissent entrer en jeu. Il serait, par exemple, judicieux de s'intéresser de plus près aux modifications des propriétés d'ouverture du PTP observées chez les mitochondries des souris *Opa1*^{+/-} et de l'importante capacité de rétention calcique mitochondriale qui en découle. Une étude réalisée par le groupe de J.D. Molkenin (Elrod *et al.*, 2010), a montré que des souris *Ppif*^{-/-} n'exprimant pas la cyclophiline D, une protéine du PTP, présentent les mêmes modifications des propriétés d'ouverture du PTP et de la capacité de rétention calcique que les souris *Opa1*^{+/-} et que ces souris *Ppif*^{-/-} ont une hypertrophie cardiaque très importante en réponse à un stress hémodynamique induit par le pose d'un clip aortique. Etant donné que cette équipe avance l'idée que la sensibilité accrue de leur modèle serait due à une orientation glycolytique du métabolisme en raison de la surcharge calcique des mitochondries, il pourrait être intéressant

d'étudier si les mitochondries des souris $Opa1^{+/-}$ présentent une surcharge calcique chronique et si ces souris ont tendance à utiliser préférentiellement les carbohydrates. De manière générale, le modèle de souris $Opa1^{enu/+}$ est loin d'avoir dévoilé tout son potentiel et fera certainement émerger de nouveaux concepts concernant le rôle de la mitochondrie, de la dynamique mitochondriale et du PTP dans la physiologie cardiaque.

Bibliographie

- Akepati, V.R., Muller, E.C., Otto, A., Strauss, H.M., Portwich, M. & Alexander, C. Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. *J Neurochem* (2008), **106**, 372-83.
- Alavi, M.V., Bette, S., Schimpf, S., Schuettauf, F., Schraermeyer, U., Wehrl, H.F., Ruttiger, L., Beck, S.C., Tonagel, F., Pichler, B.J., Knipper, M., Peters, T., Laufs, J. & Wissinger, B. A splice site mutation in the murine *Opal* gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* (2007), **130**, 1029-1042.
- Alcolea, S., Theveniau-Ruissy, M., Jarry-Guichard, T., Marics, I., Tzouanacou, E., Chauvin, J.P., Briand, J.P., Moorman, A.F., Lamers, W.H. & Gros, D.B. Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ Res* (1999), **84**, 1365-1379.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S. & Wissinger, B. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* (2000), **26**, 211-215.
- Anmann, T., Eimre, M., Kuznetsov, A.V., Andrienko, T., Kaambre, T., Sikk, P., Seppet, E., Tiivel, T., Vendelin, M., Seppet, E. & Saks, V.A. Calcium-induced contraction of sarcomeres changes the regulation of mitochondrial respiration in permeabilized cardiac cells. *FEBS J* (2005), **272**, 3145-3161.
- Appaix, F., Kuznetsov, A.V., Usson, Y., Kay, L., Andrienko, T., Olivares, J., Kaambre, T., Sikk, P., Margreiter, R. & Saks, V. Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria. *Exp Physiol* (2003), **88**, 175-90.
- Arber, S. & Caroni, P. Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. *Genes Dev* (1996), **10**, 289-300.
- Arber, S., Hunter, J.J., Ross, J. Jr, Hongo, M., Sansig, G., Borg, J., Perriard, J.C., Chien, K.R. & Caroni, P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* (1997), **88**, 393-403.
- Arnoult, D., Grodet, A., Lee, Y.J., Estaquier, J. & Blackstone, C. Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem* (2005), **280**, 35742-35750.
- Arrio-Dupont, M., Bechet, J.J. & d'Albis, A. A model system of coupled activity of co-immobilized creatine kinase and myosin. *Eur J Biochem* (1992), **207**, 951-955.
- Balaban, R.S., Kantor, H.L., Katz, L.A. & Briggs, R.W. Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart. *Science* (1986), **232**, 1121-1123.
- Balaban, R.S. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol* (2002), **34**, 1259-1271.

- Barth, E., Stammler, G., Speiser, B. & Schaper, J. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol* (1992), **24**, 669-681.
- Barton, P.J. & Buckingham, M.E. The myosin alkali light chain proteins and their genes. *Biochem J* (1985), **231**, 249-261.
- Bassani, J.W., Bassani, R.A. & Bers, D.M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* (1994), **476**, 279-293.
- Beraud, N., Pelloux, S., Usson, Y., Kuznetsov, A.V., Ronot, X., Tourneur, Y. & Saks, V. Mitochondrial dynamics in heart cells: very low amplitude high frequency fluctuations in adult cardiomyocytes and flow motion in non beating HL-1 cells. *J Bioenerg Biomembr* (2009), **41**, 195-214.
- Bereiter-Hahn, J. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* (1990), **122**, 1-63.
- Bereiter-Hahn, J. & Voth, M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* (1994), **27**, 198-219.
- Bers, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* (2002), **415**, 198-205.
- Bers, D.M. & Despa, S. Cardiac myocytes Ca²⁺ and Na⁺ regulation in normal and failing hearts. *J Pharmacol Sci* (2006), **100**, 315-322.
- Bessman, S.P. & Fonyo, A. The possible role of the mitochondrial bound creatine kinase in regulation of mitochondrial respiration. *Biochem Biophys Res Commun* (1966), **22**, 597-602.
- Bessman, S.P., Yang, W.C., Geiger, P.J. & Erickson-Viitanen, S. Intimate coupling of creatine phosphokinase and myofibrillar adenosinetriphosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* (1980), **96**, 1414-1420.
- Bessman, S.P. & Geiger, P.J. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* (1981), **211**, 448-452.
- Bing, R.J. cardiac metabolism. *Physiol Rev* (1965), **45**, 171-213.
- Birkedal, R., Shiels, H.A. & Vendelin, M. Three-dimensional mitochondrial arrangement in ventricular myocytes: from chaos to order. *Am J Physiol Cell Physiol* (2006), **291**, C1148-1158.
- Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J. & Shaw, J.M. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* (1999), **1**, 298-304.
- Boehm, E., Ventura-Clapier, R., Mateo, P., Lechene, P. & Veksler, V. Glycolysis supports calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in skinned ventricular fibres of mice deficient in mitochondrial and cytosolic creatine kinase. *J Mol Cell Cardiol* (2000), **32**, 891-902.

- Bonnefont, J.P., Djouadi, F., Prip-Buus, C., Gobin, S., Munnich, A. & Bastin, J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med* (2004), **25**, 495-520.
- Brand, T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* (2003), **258**, 1-19.
- Brandes, R. & Bers, D.M. Intracellular Ca²⁺ increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. *Circ Res* (1997), **80**, 82-87.
- Brandes, R., Maier, L.S. & Bers, D.M. Regulation of mitochondrial by cytosolic [Ca²⁺] and work in trabeculae from hypertrophic and normal rat hearts. *Circ Res* (1998), **82**, 1189-1198.
- Bras, M., Queenan, B. & Susin, S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)* (2005), **70**, 231-239.
- Braunwald, E. Structure and function of the normal myocardium. *Br Heart J* (1971), **33**, Suppl:3-8.
- Brdiczka, D. & Wallimann, T. The importance of the outer mitochondrial compartment in regulation of energy metabolism. *Mol Cell Biochem* (1994), **133-134**, 69-83.
- Breckenridge, D.G., Stojanovic, M., Marcellus, R.C. & Shore, G.C. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* (2003), **160**, 1115-1127.
- Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., Xie, Z.J. & Dong, Z. Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007), **104**, 11649-11654.
- Cahn, R.D., Zwilling, E., Kaplan, N.O. & Levine, L. Nature and Development of Lactic Dehydrogenases: The two major types of this enzyme form molecular hybrids which change in makeup during development. *Science* (1962), **136**, 962-969.
- Callewaert, G., Carmeliet, E. & Vereecke, J. Single cardiac Purkinje cells: general electrophysiology and voltage-clamp analysis of the pace-maker current. *J Physiol* (1984), **349**, 643-661.
- Calvo, S.E. & Mootha, V.K. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2010), **11**, 25-44.
- Capetanaki, Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc Med* (2002), **12**, 339-348.
- Carrasco, A.J., Dzeja, P.P., Alekseev, A.E., Pucar, D., Zingman, L.V., Abraham, M.R., Hodgson, D., Bienengraeber, M., Pucoat, M., Janssen, E., Wieringa, B. & Terzic, A. Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001), **98**, 7623-7628.

- Cartwright, J. Jr & Goldstein, M.A. Microtubules in the heart muscle of the postnatal and adult rat. *J Mol Cell Cardiol* (1985), **17**, 1-7.
- Cave, A.C., Ingwall, J.S., Friedrich, J., Liao, R., Saupe, K.W., Apstein, C.S. & Eberli, F.R. ATP synthesis during low-flow ischemia: influence of increased glycolytic substrate. *Circulation* (2000), **101**, 2090-2096.
- Cazorla, O., Wu, Y., Irving, T.C. & Granzier, H. Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes. *Circ Res* (2001), **88**, 1028-1035.
- Cereghetti, G.M., Stangherlin, A., Martins de Brito, O., Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P. & Scorrano, L. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008), **105**, 15803-8.
- Chan, D.C. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2006), **22**, 79-99.
- Chance, B. & Williams, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* (1956), **17**, 65-134.
- Chang, C.R. & Blackstone, C. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* (2007), **282**, 21583-21587.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E. & Chan, D.C. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* (2003), **160**, 189-200.
- Chen, H.W., Yu, S.L., Chen, W.J., Yang, P.C., Chien, C.T., Chou, H.Y., Li, H.N., Peck, K., Huang, C.H., Lin, F.Y., Chen, J.J. & Lee, Y.T. Dynamic changes of gene expression profiles during postnatal development of the heart in mice. *Heart* (2004), **90**, 927-934.
- Chen, H., Chomyn, A. & Chan, D.C. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* (2005), **280**, 26185-26192.
- Chen, H., McCaffery, J.M. & Chan, D.C. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* (2007), **130**, 548-562.
- Chen, L., Gong, Q., Stice, J.P. & Knowlton, A.A. Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovasc Res* (2009), **84**, 91-99.
- Chen, P.S., Joung, B., Shinohara, T., Das, M., Chen, Z. & Lin, S.F. The initiation of the heart beat. *Circ J* (2010), **74**, 221-225.
- Chin, T.K., Friedman, W.F. & Klitzner, T.S. Developmental changes in cardiac myocyte calcium regulation. *Circ Res* (1990), **67**, 574-579.
- Cho, D.H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z. & Lipton, S.A. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. (2009), *Science* **324**, 102-105.

- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B. & Scorrano, L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004), **101**, 15927-15932.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., Derks, C., Dejaegere, T., Pellegrini, L., D'Hooge, R., Scorrano, L. & De Strooper, B. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* (2006), **126**, 163-175.
- Clausen, T. & Everts, M.E. K(+)-induced inhibition of contractile force in rat skeletal muscle: role of active Na(+)-K⁺ transport. *Am J Physiol* (1991), **261**, C799-807.
- Clubb, F.J. Jr & Bishop, S.P. Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. *Lab Invest* (1984), **50**, 571-577.
- Cogswell, A.M., Stevens, R.J. & Hood, D.A. Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *Am J Physiol* (1993), **264**, C383-389.
- Cribbs, J.T. & Strack, S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* (2007), **8**, 939-944.
- Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* (1999), **341 (Pt 2)**, 233-249.
- Daems, W.T. & Wisse, E. Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria. *J Ultrastruct Res* (1966), **16**, 123-140.
- Dantzig, J.A., Hibberd, M.G., Trentham, D.R. & Goldman, Y.E. Cross-bridge kinetics in the presence of MgADP investigated by photolysis of caged ATP in rabbit psoas muscle fibres. *J Physiol* (1991), **432**, 639-680.
- Davies, V.J., Hollins, A.J., Piechota, M.J., Yip, W., Davies, J.R., White, K.E., Nicols, P.P., Boulton, M.E. & Votruba, M. Opal deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum Mol Genet* (2007), **16**, 1307-1318.
- Dawson, D.M., Goodfriend, T.L. & Kaplan, N.O. Lactic dehydrogenases: Functions of the two types rates of synthesis of the two major forms can be correlated with metabolic differentiation. *Science* (1964), **143**, 929-933.
- de Brito, O.M. & Scorrano, L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* (2008), **456**, 605-610.
- De Sousa, E., Veksler, V., Minajeva, A., Kaasik, A., Mateo, P., Mayoux, E., Hoerter, J., Bigard, X., Serrurier, B. & Ventura-Clapier, R. Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure. *Circ Res* (1999), **85**, 68-76.
- De Vos, K.J., Allan, V.J., Grierson, A.J. & Sheetz, M.P. Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr Biol* (2005), **15**, 678-683.

- Dedkova, E.N. & Blatter, L.A. Mitochondrial Ca²⁺ and the heart. *Cell Calcium* (2008), **44**, 77-91.
- Delettre, C., Griffoin, J.M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P. & Hamel, C.P. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* (2001), **109**, 584-591.
- Delivani, P. & Martin, S.J. Mitochondrial membrane remodeling in apoptosis: an inside story. *Cell Death Differ* (2006), **13**, 2007-2010.
- Delorme, B., Dahl, E., Jarry-Guichard, T., Briand, J.P., Willecke, K., Gros, D. & Theveniau-Ruissy, M. Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. *Circ Res* (1997), **81**, 423-437.
- Depre, C., Rider, M.H. & Hue, L. Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur J Biochem* (1998), **258**, 277-290.
- DiFrancesco, D. The contribution of the 'pacemaker' current (if) to generation of spontaneous activity in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol* (1991), **434**, 23-40.
- DiFrancesco, D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res* (2010), **106**, 434-446.
- Dimmer, K.S. & Scorrano, L. (De)constructing mitochondria: what for? *Physiology (Bethesda)* (2006), **21**, 233-241.
- Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., Bauer, M.F., Attardi, G., Larsson, N.G., Neupert, W. & Reichert, A.S. Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem* (2006), **281**, 37972-37979.
- Dzeja, P.P., Vitkevicius, K.T., Redfield, M.M., Burnett, J.C. & Terzic, A. Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium : increased contribution in heart failure. *Circ Res* (1999), **84**, 1137-1143.
- Dzeja, P.P., Bortolon, R., Perez-Terzic, C., Holmuhamedov, E.L. & Terzic, A. Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002), **99**, 10156-10161.
- Dzeja, P.P. & Terzic, A. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* (2003), **206**, 2039-2047.
- Dzeja, P. & Terzic, A. Adenylate kinase and AMP signaling networks: Metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int J Mol Sci* (2009), **10**, 1729-1772.
- Eberli, F.R., Weinberg, E.O., Grice, W.N., Horowitz, G.L. & Apstein, C.S. Protective effect of increased glycolytic substrate against systolic and diastolic dysfunction and increased coronary resistance from prolonged global underperfusion and reperfusion in isolated rabbit hearts perfused with erythrocyte suspensions. *Circ Res* (1991), **68**, 466-481.

- Ehler, E. & Perriard, J.C. Cardiomyocyte cytoskeleton and myofibrillogenesis in healthy and diseased heart. *Heart Fail Rev* (2000), **5**, 259-269.
- Elrod, J.W., Wong, R., Mishra, S., Vagnozzi, R.J., Sakthivel, B., Goonasekera, S.A., Karch, J., Gabel, S., Farber, J., Force, T., Brown, J.H., Murphy, E. & Molkentin, J.D. Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca²⁺ exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *J Clin Invest* (2010), **120**, 3680-3687.
- Elvir-Mairena, J.R., Jovanovic, A., Gomez, L.A., Alekseev, A.E. & Terzic, A. Reversal of the ATP-liganded state of ATP-sensitive K⁺ channels by adenylate kinase activity. *J Biol Chem* (1996), **271**, 31903-31908.
- Estigoy C. , Pontén F. , Odeberg J. , Herbert B. , Guilhaus M. , Charleston M. , Ho J.W. K. , Cameron D. , and dos Remedios C.G. Intercalated discs: multiple proteins perform multiple functions in non-failing and failing human hearts. *Biophys Rev* (2009), **1**, 43-49.
- Eura, Y., Ishihara, N., Oka, T. & Mihara, K. Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *J Cell Sci* (2006), **119**, 4913-4925.
- Fabiato, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* (1983), **245**, C1-14.
- Fang, L., Moore, X.L., Gao, X.M., Dart, A.M., Lim, Y.L. & Du, X.J. Down-regulation of mitofusin-2 expression in cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Life Sci* (2007), **80**, 2154-2160.
- Fisher, D.J., Tate, C.A. & Phillips, S. Developmental regulation of the sarcoplasmic reticulum calcium pump in the rabbit heart. *Pediatr Res* (1992), **31**, 474-479.
- Forbes, M.S. & Sperelakis, N. Intercalated discs of mammalian heart: a review of structure and function. *Tissue Cell* (1985), **17**, 605-648.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L. & Youle, R.J. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* (2001), **1**, 515-525.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B. & Scorrano, L. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* (2006), **126**, 177-189.
- Fry, M. & Green, D.E. Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* (1981), **256**, 1874-1880.
- Garnier, A., Fortin, D., Delomenie, C., Momken, I., Veksler, V. & Ventura-Clapier, R. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* (2003), **551**, 491-501.

- Garnier, A., Zoll, J., Fortin, D., N'Guessan, B., Lefebvre, F., Geny, B., Mettauer, B., Veksler, V. & Ventura-Clapier, R. Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II. *Circ Heart Fail* (2009), **2**, 342-350.
- Gautheron, D.C. Mitochondrial oxidative phosphorylation and respiratory chain: review. *J Inherit Metab Dis* (1984), **7 Suppl 1**, 57-61.
- Gellerich, F. & Saks, V.A. Control of heart mitochondrial oxygen consumption by creatine kinase: the importance of enzyme localization. *Biochem Biophys Res Commun* (1982), **105**, 1473-1481.
- Goldfarb, L.G. & Dalakas, M.C. Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J Clin Invest* (2009), **119**, 1806-1813.
- Goldman, Y.E., Hibberd, M.G. & Trentham, D.R. Initiation of active contraction by photogeneration of adenosine-5'-triphosphate in rabbit psoas muscle fibres. *J Physiol* (1984), **354**, 605-624.
- Gordon, A.M., Homsher, E. & Regnier, M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* (2000), **80**, 853-924.
- Griffin, E.E., Graumann, J. & Chan, D.C. The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* (2005), **170**, 237-248.
- Griparic, L., Kanazawa, T. & van der Blik, A.M. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* (2007), **178**, 757-764.
- Gros, D.B. & Jongsma, H.J. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* (1996), **18**, 719-730.
- Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombes, A., Belenguer, P., Arnoult, D. & Rojo, M. Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* (2008), **100**, 315-325.
- Gunning, P., Ponte, P., Blau, H. & Kedes, L. alpha-skeletal and alpha-cardiac actin genes are coexpressed in adult human skeletal muscle and heart. *Mol Cell Biol* (1983), **3**, 1985-1995.
- Gunter, T.E. & Pfeiffer, D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* (1990), **258**, C755-786.
- Guzun, R., Timohhina, N., Tepp, K., Monge, C., Kaambre, T., Sikk, P., Kuznetsov, A.V., Pison, C. & Saks, V. Regulation of respiration controlled by mitochondrial creatine kinase in permeabilized cardiac cells in situ. Importance of system level properties. *Biochim Biophys Acta* (2009), **1787**, 1089-1105.
- Hales, K.G. & Fuller, M.T. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* (1997), **90**, 121-129.

- Han, X.J., Lu, Y.F., Li, S.A., Kaitsuka, T., Sato, Y., Tomizawa, K., Nairn, A.C., Takei, K., Matsui, H. & Matsushita, M. CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol* (2008), **182**, 573-585.
- Hansford, R.G. Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* (1985), **102**, 1-72.
- Harder, Z., Zunino, R. & McBride, H. Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol* (2004), **14**, 340-345.
- Harford, S. & Weitzman, P.D. Evidence of isosteric and allosteric nucleotide inhibition of citrate synthase from multiple-inhibition studies. *Biochem J* (1975), **151**, 455-458.
- Harrison, G.J., van Wijhe, M.H., de Groot, B., Dijk, F.J. & van Beek, J.H. CK inhibition accelerates transcytosolic energy signaling during rapid workload steps in isolated rabbit hearts. *Am J Physiol* (1999), **276**, H134-140.
- Hasselbach, W. & Makinose, M. The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting. *Biochem Z* (1961), **333**, 518-28.
- Hew, K. W. and Keller, K. A. Postnatal anatomical and functional development of the heart: a species comparison. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* (2003), **68(4)**, 309-320.
- Hirschy, A., Schatzmann, F., Ehler, E. & Perriard, J.C. Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart. *Dev Biol* (2006), **289**, 430-441.
- Hoerter, J.A., Kuznetsov, A. & Ventura-Clapier, R. Functional development of the creatine kinase system in perinatal rabbit heart. *Circ Res* (1991), **69**, 665-676.
- Hoerter, J.A., Ventura-Clapier, R. & Kuznetsov, A. Compartmentation of creatine kinases during perinatal development of mammalian heart. *Mol Cell Biochem* (1994), **133-134**, 277-286.
- Hoshijima, M., Pashmforoush, M., Knoll, R. & Chien, K.R. The MLP family of cytoskeletal Z disc proteins and dilated cardiomyopathy: a stress pathway model for heart failure progression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (2002), **67**, 399-408.
- Huxley, A.F. Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem* (1957), **7**, 255-318.
- Illaste, A., Kalda, M., Schryer, D. & Sepp, M. Life of mice - development of cardiac energetics. *J Physiol* (2010).
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E. & Nunnari, J. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* (2005), **170**, 1021-1027.
- Ishihara, N., Eura, Y. & Mihara, K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* (2004), **117**, 6535-6546.

- Jackson, W.A. & Colyer, J. Translation of Ser16 and Thr17 phosphorylation of phospholamban into Ca²⁺-pump stimulation. *Biochem J* (1996), **316** (Pt 1), 201-207.
- Jacobus, W.E. & Lehninger, A.L. Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport. *J Biol Chem* (1973), **248**, 4803-4810.
- Jacobus, W.E. Theoretical support for the heart phosphocreatine energy transport shuttle based on the intracellular diffusion limited mobility of ADP. *Biochem Biophys Res Commun* (1985), **133**, 1035-1041.
- James, D.I., Parone, P.A., Mattenberger, Y. & Martinou, J.C. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* (2003), **278**, 36373-36379.
- Javadov, S. & Karmazyn, M. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* (2007), **20**, 1-22.
- Jazbutyte, V. Mitochondrial dynamics: molecular mechanisms and the role in the heart. *Minerva Cardioangiol* (2010), **58**, 231-239.
- Jofuku, A., Ishihara, N. & Mihara, K. Analysis of functional domains of rat mitochondrial Fis1, the mitochondrial fission-stimulating protein. *Biochem Biophys Res Commun* (2005), **333**, 650-659.
- Jorgensen, A.O. & Jones, L.R. Localization of phospholamban in slow but not fast canine skeletal muscle fibers. An immunocytochemical and biochemical study. *J Biol Chem* (1986), **261**, 3775-3781.
- Joubert, F., Wilding, J.R., Fortin, D., Domergue-Dupont, V., Novotova, M., Ventura-Clapier, R. & Veksler, V. Local energetic regulation of sarcoplasmic and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure. *J Physiol* (2008), **586**, 5181-5192.
- Kaasik, A., Veksler, V., Boehm, E., Novotova, M., Minajeva, A. & Ventura-Clapier, R. Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res* (2001), **89**, 153-159.
- Kaasik, A., Joubert, F., Ventura-Clapier, R. & Veksler, V. A novel mechanism of regulation of cardiac contractility by mitochondrial functional state. *FASEB J* (2004), **18**, 1219-1227.
- Kaasik, A., Kuum, M., Joubert, F., Wilding, J., Ventura-Clapier, R. & Veksler, V. Mitochondria as a source of mechanical signals in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* (2010), **87**, 83-91.
- Kay, L., Li, Z., Mericskay, M., Olivares, J., Tranqui, L., Fontaine, E., Tiivel, T., Sikk, P., Kaambre, T., Samuel, J.L., Rappaport, L., Usson, Y., Leverve, X., Paulin, D. & Saks, V.A. Study of regulation of mitochondrial respiration in vivo. An analysis of influence of ADP diffusion and possible role of cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* (1997), **1322**, 41-59.

- Kentish, J.C. & Wrzosek, A. Changes in force and cytosolic Ca²⁺ concentration after length changes in isolated rat ventricular trabeculae. *J Physiol* (1998), **506 (Pt 2)**, 431-444.
- Kimberg, D.V. & Loeb, J.N. Effects of cortisone administration on rat liver mitochondria. Support for the concept of mitochondrial fusion. *J Cell Biol* (1972), **55**, 635-643.
- Koch, A., Thiemann, M., Grabenbauer, M., Yoon, Y., McNiven, M.A. & Schrader, M. Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem* (2003), **278**, 8597-8605.
- Koch, A., Yoon, Y., Bonekamp, N.A., McNiven, M.A. & Schrader, M. A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* (2005), **16**, 5077-5086.
- Koshiha, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M. & Chan, D.C. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* (2004), **305**, 858-862.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* (2007), **87**, 99-163.
- Kruger, M. & Linke, W.A. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol* (2009), **46**, 490-498.
- Kuschel, M., Karczewski, P., Hempel, P., Schlegel, W.P., Krause, E.G. & Bartel, S. Ser16 prevails over Thr17 phospholamban phosphorylation in the beta-adrenergic regulation of cardiac relaxation. *Am J Physiol* (1999), **276**, H1625-1633.
- Kuznetsov, A.V., Veksler, V., Gellerich, F.N., Saks, V., Margreiter, R. & Kunz, W.S. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* (2008), **3**, 965-976.
- Labrousse, A.M., Zappaterra, M.D., Rube, D.A. & van der Blik, A.M. C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell* (1999), **4**, 815-826.
- Lahmers, S., Wu, Y., Call, D.R., Labeit, S. & Granzier, H. Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium. *Circ Res* (2004), **94**, 505-513.
- Lange, S., Auerbach, D., McLoughlin, P., Perriard, E., Schafer, B.W., Perriard, J.C. & Ehler, E. Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci* (2002), **115**, 4925-4936.
- Lardy, H.A. & Wellman, H. Oxidative phosphorylations; role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. *J Biol Chem* (1952), **195**, 215-224.
- Lea, P.J., Temkin, R.J., Freeman, K.B., Mitchell, G.A. & Robinson, B.H. Variations in mitochondrial ultrastructure and dynamics observed by high resolution scanning electron microscopy (HRSEM). *Microsc Res Tech* (1994), **27**, 269-277.

- Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L. & Youle, R.J. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* (2004), **15**, 5001-5011.
- Lenaers, G., Reynier, P., Elachouri, G., Soukkaieh, C., Olichon, A., Belenguer, P., Baricault, L., Ducommun, B., Hamel, C. & Delettre, C. OPA1 functions in mitochondria and dysfunctions in optic nerve. *Int J Biochem Cell Biol* (2009), **41**, 1866-1874.
- Leterrier, J.F., Rusakov, D.A., Nelson, B.D. & Linden, M. Interactions between brain mitochondria and cytoskeleton: evidence for specialized outer membrane domains involved in the association of cytoskeleton-associated proteins to mitochondria in situ and in vitro. *Microsc Res Tech* (1994), **27**, 233-261.
- Leu, M., Ehler, E. & Perriard, J.C. Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anat Embryol (Berl)* (2001), **204**, 217-224.
- Li, F., Wang, X., Capasso, J.M. & Gerdes, A.M. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol* (1996), **28**, 1737-1746.
- Li, F., Wang, X., Bunker, P.C. & Gerdes, A.M. Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: I. Role of actin-myosin contractile ring. *J Mol Cell Cardiol* (1997), **29**, 1541-1551.
- Li, F., Wang, X. & Gerdes, A.M. Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: II. Cytoskeletal organisation. *J Mol Cell Cardiol* (1997), **29**, 1553-1565.
- Liesa, M., Palacin, M. & Zorzano, A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* (2009), **89**, 799-845.
- Lim, S.S., Woodroffe, M.N. & Lemanski, L.F. An analysis of contractile proteins in developing chick heart by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and electron microscopy. *J Embryol Exp Morphol* (1983), **77**, 1-14.
- Liu, W., Yasui, K., Opthof, T., Ishiki, R., Lee, J.K., Kamiya, K., Yokota, M. & Kodama, I. Developmental changes of Ca²⁺ handling in mouse ventricular cells from early embryo to adulthood. *Life Sci* (2002), **71**, 1279-1292.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* (2001), **25**, 402-408.
- Maack, C. & O'Rourke, B. Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res Cardiol* (2007), **102**, 369-392.
- Machida, N., Brissie, N., Sreenan, C. & Bishop, S.P. Inhibition of cardiac myocyte division in c-myc transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* (1997), **29**, 1895-1902.
- Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombes, A. & Rojo, M. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep* (2005), **6**, 853-859.

- Mannella, C.A., Marko, M., Penczek, P., Barnard, D. & Frank, J. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech* (1994), **27**, 278-283.
- Mannherz, H.G. & Goody, R.S. Proteins of contractile systems. *Annu Rev Biochem* (1976), **45**, 427-465.
- Mansour, TE. Studies on heart phosphofructokinase: Purification, Inhibition and activation. *J Biol Chem* (1963), **238**(7), 2285-2292.
- Martonosi, A.N. & Pikula, S. The structure of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Acta Biochim Pol* (2003), **50**, 337-365.
- Mayorov, V.I., Lowrey, A.J., Biousse, V., Newman, N.J., Cline, S.D. & Brown, M.D. Mitochondrial oxidative phosphorylation in autosomal dominant optic atrophy. *BMC Biochem* (2008), **9**, 22
- McCormack, J.G. & Denton, R.M. The role of mitochondrial Ca²⁺ transport and matrix Ca²⁺ in signal transduction in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* (1990), **1018**, 287-291.
- McKenzie, M., Liolitsa, D. & Hanna, M.G. Mitochondrial disease: mutations and mechanisms. *Neurochem Res* (2004), **29**, 589-600.
- Mercadier, J.J., Bouveret, P., Gorza, L., Schiaffino, S., Clark, W.A., Zak, R., Swynghedauw, B. & Schwartz, K. Myosin isoenzymes in normal and hypertrophied human ventricular myocardium. *Circ Res* (1983), **53**, 52-62.
- Messerschmitt, M., Jakobs, S., Vogel, F., Fritz, S., Dimmer, K.S., Neupert, W. & Westermann, B. The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* (2003), **160**, 553-564.
- Miller, M.K., Granzier, H., Ehler, E. & Gregorio, C.C. The sensitive giant: the role of titin-based stretch sensing complexes in the heart. *Trends Cell Biol* (2004), **14**, 119-126.
- Milner, D.J., Mavroidis, M., Weisleder, N. & Capetanaki, Y. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J Cell Biol* (2000), **150**, 1283-1298.
- Minajeva, A., Ventura-Clapier, R. & Veksler, V. Ca²⁺ uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum ATPase in situ strongly depends on bound creatine kinase. *Pflugers Arch* (1996), **432**, 904-912.
- Mitchell, P. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* (1979), **206**, 1148-1159.
- Miyata, S., Minobe, W., Bristow, M.R. & Leinwand, L.A. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res* (2000), **86**, 386-390.
- Mootha, V.K., Arai, A.E. & Balaban, R.S. Maximum oxidative phosphorylation capacity of the mammalian heart. *Am J Physiol* (1997), **272**, H769-775.

- Moreadith, R.W. & Jacobus, W.E. Creatine kinase of heart mitochondria. Functional coupling of ADP transfer to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem* (1982), **257**, 899-905.
- Muhlfeld, C., Urru, M., Rumelin, R., Mirzaie, M., Schondube, F., Richter, J. & Dorge, H. Myocardial ischemia tolerance in the newborn rat involving opioid receptors and mitochondrial K⁺ channels. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* (2006), **288**, 297-303.
- Muller, M., Moser, R., Cheneval, D. & Carafoli, E. Cardiolipin is the membrane receptor for mitochondrial creatine phosphokinase. *J Biol Chem* (1985), **260**, 3839-3843.
- Murthy, M.S. & Pande, S.V. Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1987), **84**, 378-382.
- Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S. & Hirose, S. MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep* (2006), **7**, 1019-1022.
- Nakao, K., Minobe, W., Roden, R., Bristow, M.R. & Leinwand, L.A. Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest* (1997), **100**, 2362-2370.
- Navaratnam, V. Development of the nerve supply to the human heart. *Br Heart J* (1965), **27**, 640-650.
- Neely, J.R., Liebermeister, H., Battersby, E.J. & Morgan, H.E. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am J Physiol* (1967), **212**, 804-814.
- Neely, J.R., Denton, R.M., England, P.J. & Randle, P.J. The effects of increased heart work on the tricarboxylate cycle and its interactions with glycolysis in the perfused rat heart. *Biochem J* (1972), **128**, 147-159.
- Neubauer, S., Horn, M., Cramer, M., Harre, K., Newell, J.B., Peters, W., Pabst, T., Ertl, G., Hahn, D., Ingwall, J.S. & Kochsiek, K. Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* (1997), **96**, 2190-2196.
- Niggli, E. Ca²⁺ Sparks in Cardiac Muscle: Is There Life Without Them? *News Physiol Sci* (1999), **14**, 129-134.
- Nozaki, T., Kagaya, Y., Ishide, N., Kitada, S., Miura, M., Nawata, J., Ohno, I., Watanabe, J. & Shirato, K. Interaction between sarcomere and mitochondrial length in normoxic and hypoxic rat ventricular papillary muscles. *Cardiovasc Pathol* (2001), **10**, 125-132.
- O'Gorman, E., Beutner, G., Dolder, M., Koretsky, A.P., Brdiczka, D. & Wallimann, T. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* (1997), **414**, 253-257.

- Ogata, T. & Yamasaki, Y. Scanning electron-microscopic studies on the three-dimensional structure of mitochondria in the mammalian red, white and intermediate muscle fibers . *Cell Tissue Res* (1985), **241**, 251-256.
- Ogata, T. & Yamasaki, Y. Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers. *Anat Rec* (1997), **248**, 214-223.
- Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., Ducommun, B., Lenaers, G. & Belenguer, P. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* (2002), **523**, 171-176.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P. & Lenaers, G. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* (2003), **278**, 7743-7746.
- Olichon, A., Landes, T., Arnaune-Pelloquin, L., Emorine, L.J., Mils, V., Guichet, A., Delettre, C., Hamel, C., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Reynier, P., Lenaers, G. & Belenguer, P. Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. *J Cell Physiol* (2007), **211**, 423-430.
- Ong, S.B. & Hausenloy, D.J. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* (2010).
- Ostadal, B., Ostadalova, I., and Dhalla, N. S. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol Rev* (1999), **79(3)**, 635-659.
- Palmer, J.W., Tandler, B. & Hoppel, C.L. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem* (1977), **252**, 8731-8739.
- Papalouka, V., Arvanitis, D.A., Vafiadaki, E., Mavroidis, M., Papadodima, S.A., Spiliopoulou, C.A., Kremastinos, D.T., Kranias, E.G. & Sanoudou, D. Muscle LIM protein interacts with cofilin 2 and regulates F-actin dynamics in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* (2009), **29**, 6046-6058.
- Parra, V., Eisner, V., Chiong, M., Criollo, A., Moraga, F., Garcia, A., Hartel, S., Jaimovich, E., Zorzano, A., Hidalgo, C. & Lavandero, S. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovasc Res* (2008), **77**, 387-397.
- Paul, R.J. Functional compartmentalization of oxidative and glycolytic metabolism in vascular smooth muscle. *Am J Physiol* (1983), **244**, C399-409.
- Payne, R.M. & Strauss, A.W. Expression of the mitochondrial creatine kinase genes. *Mol Cell Biochem* (1994), **133-134**, 235-243.
- Pellegrini, L. & Scorrano, L. A cut short to death: Parl and Opa1 in the regulation of mitochondrial morphology and apoptosis. *Cell Death Differ* (2007), **14**, 1275-1284.

- Perkins, G.A. & Frey, T.G. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron* (2000), **31**, 97-111.
- Piquereau, J., Novotova, M., Fortin, D., Garnier, A., Ventura-Clapier, R., Veksler, V. & Joubert, F. Postnatal development of mouse heart: formation of energetic microdomains. *J Physiol* (2010), **588**, 2443-2454.
- Rappaport, L., Oliviero, P. & Samuel, J.L. Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function. *Mol Cell Biochem* (1998), **184**, 101-105.
- Reiser, P.J., Westfall, M.V., Schiaffino, S. & Solaro, R.J. Tension production and thin-filament protein isoforms in developing rat myocardium. *Am J Physiol* (1994), **267**, H1589-1596.
- Rimbaud, S., Garnier, A. & Ventura-Clapier, R. Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacol Rep* (2009a), **61**, 131-138.
- Rimbaud, S., Sanchez, H., Garnier, A., Fortin, D., Bigard, X., Veksler, V. & Ventura-Clapier, R. Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. *J Mol Cell Cardiol* (2009b), **46**, 952-959.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A. & Pozzan, T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* (1998), **280**, 1763-1766.
- Rossi, A.M., Eppenberger, H.M., Volpe, P., Cotrufo, R. & Wallimann, T. Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca²⁺ uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *J Biol Chem* (1990), **265**, 5258-5266.
- Rudolph, A.M. & Heymann, M.A. The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ Res* (1967), **21**, 163-184.
- Saetersdal, T., Greve, G. & Dalen, H. Associations between beta-tubulin and mitochondria in adult isolated heart myocytes as shown by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Histochemistry* (1990), **95**, 1-10.
- Saks, V.A., Lipina, N.V., Sharov, V.G., Smirnov, V.N., Chazov, E. & Grosse, R. The localization of the MM isozyme of creatine phosphokinase on the surface membrane of myocardial cells and its functional coupling to ouabain-inhibited (Na⁺, K⁺)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* (1977), **465**, 550-558.
- Saks, V.A., Rosenshtraukh, L.V., Smirnov, V.N. & Chazov, E.I. Role of creatine phosphokinase in cellular function and metabolism. *Can J Physiol Pharmacol* (1978), **56**, 691-706.
- Saks, V.A., Ventura-Clapier, R., Huchua, Z.A., Preobrazhensky, A.N. & Emelin, I.V. Creatine kinase in regulation of heart function and metabolism. I. Further evidence for compartmentation of adenine nucleotides in cardiac myofibrillar and sarcolemmal coupled ATPase-creatine kinase systems. *Biochim Biophys Acta* (1984), **803**, 254-264.

- Saks, V.A., Kuznetsov, A.V., Kupriyanov, V.V., Miceli, M.V. & Jacobus, W.E. Creatine kinase of rat heart mitochondria. The demonstration of functional coupling to oxidative phosphorylation in an inner membrane-matrix preparation. *J Biol Chem* (1985), **260**, 7757-7764.
- Saks, V.A., Belikova, Y.O. & Kuznetsov, A.V. In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *Biochim Biophys Acta* (1991), **1074**, 302-311.
- Saks, V.A., Khuchua, Z.A., Vasilyeva, E.V., Belikova, O.Y.u. & Kuznetsov, A.V. Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis. *Mol Cell Biochem* (1994), **133-134**, 155-192.
- Saks, V.A., Kuznetsov, A.V., Khuchua, Z.A., Vasilyeva, E.V., Belikova, J.O., Kesvatera, T. & Tiivel, T. Control of cellular respiration in vivo by mitochondrial outer membrane and by creatine kinase. A new speculative hypothesis: possible involvement of mitochondrial-cytoskeleton interactions. *J Mol Cell Cardiol* (1995), **27**, 625-645.
- Saks, V.A., Tiivel, T., Kay, L., Novel-Chate, V., Daneshrad, Z., Rossi, A., Fontaine, E., Keriél, C., Leverve, X., Ventura-Clapier, R., Anflous, K., Samuel, J.L. & Rappaport, L. On the regulation of cellular energetics in health and disease. *Mol Cell Biochem* (1996), **160-161**, 195-208.
- Saks, V.A., Ventura-Clapier, R. & Aliev, M.K. Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim Biophys Acta* (1996), **1274**, 81-88.
- Saks, V.A., Veksler, V.I., Kuznetsov, A.V., Kay, L., Sikk, P., Tiivel, T., Tranqui, L., Olivares, J., Winkler, K., Wiedemann, F. & Kunz, W.S. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biochem* (1998), **184**, 81-100.
- Saks, V.A., Kaambre, T., Sikk, P., Eimre, M., Orlova, E., Paju, K., Piirsoo, A., Appaix, F., Kay, L., Regitz-Zagrosek, V., Fleck, E. & Seppet, E. Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem J* (2001), **356**, 643-657.
- Saks, V., Kuznetsov, A., Andrienko, T., Usson, Y., Appaix, F., Guerrero, K., Kaambre, T., Sikk, P., Lemba, M. & Vendelin, M. Heterogeneity of ADP diffusion and regulation of respiration in cardiac cells. *Biophys J* (2003), **84**, 3436-3456.
- Saks, V.A., Kuznetsov, A.V., Vendelin, M., Guerrero, K., Kay, L. & Seppet, E.K. Functional coupling as a basic mechanism of feedback regulation of cardiac energy metabolism. *Mol Cell Biochem* (2004), **256-257**, 185-199.
- Saks, V., Dzeja, P., Schlattner, U., Vendelin, M., Terzic, A. & Wallimann, T. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol* (2006a), **571**, 253-273.
- Saks, V., Favier, R., Guzun, R., Schlattner, U. & Wallimann, T. Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *J Physiol* (2006b), **577**, 769-777.

- Santel, A. & Fuller, M.T. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* (2001), **114**, 867-874.
- Satoh, M., Hamamoto, T., Seo, N., Kagawa, Y. & Endo, H. Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* (2003), **300**, 482-493.
- Schaper, J., Meiser, E. & Stammeler, G. Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. *Circ Res* (1985), **56**, 377-391.
- Schapira, A.H. Mitochondrial disease. *Lancet* (2006), **368**, 70-82.
- Schatz, G. The protein import system of mitochondria. *J Biol Chem* (1996), **271**, 31763-31766.
- Schiaffino, S. & Reggiani, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* (1996), **76**, 371-423.
- Schneider, M.D., Payne, P.A., Ueno, H., Perryman, M.B. & Roberts, R. Dissociated expression of c-myc and a fos-related competence gene during cardiac myogenesis. *Mol Cell Biol* (1986), **6**, 4140-4143.
- Schroder, E.A., Wei, Y. & Satin, J. The developing cardiac myocyte: maturation of excitability and excitation-contraction coupling. *Ann N Y Acad Sci* (2006), **1080**, 63-75.
- Schwartz, K., Apstein, C., Mercadier, J.J., Lecarpentier, Y., de la Bastie, D., Bouveret, P., Wisnewsky, C. & Swynghedauw, B. Left ventricular isomyosins in normal and hypertrophied rat and human hearts. *Eur Heart J* (1984), **5 Suppl F**, 77-83.
- Sedmera, D. & McQuinn, T. Embryogenesis of the heart muscle. *Heart Fail Clin* . (2008), **4**, 235-245.
- Seppet, E.K., Kaambre, T., Sikk, P., Tiivel, T., Vija, H., Tonkonogi, M., Sahlin, K., Kay, L., Appaix, F., Braun, U., Eimre, M. & Saks, V.A. Functional complexes of mitochondria with Ca_vMgATPases of myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *Biochim Biophys Acta* (2001), **1504**, 379-395.
- Seppet, E.K., Eimre, M., Anmann, T., Seppet, E., Peet, N., Kaambre, T., Paju, K., Piirsoo, A., Kuznetsov, A.V., Vendelin, M., Gellerich, F.N., Zierz, S. & Saks, V.A. Intracellular energetic units in healthy and diseased hearts. *Exp Clin Cardiol* (2005), **10**, 173-183.
- Shafiq, S.A., Gorycki, M.A. & Mauro, A. Mitosis during postnatal growth in skeletal and cardiac muscle of the rat. *J Anat* (1968), **103**, 135-141.
- Shahrestani, P., Leung, H.T., Le, P.K., Pak, W.L., Tse, S., Ocorr, K. & Huang, T. Heterozygous mutation of *Drosophila* Opal causes the development of multiple organ abnormalities in an age-dependent and organ-specific manner. *PLoS One* (2009), **4**, e6867

- Sheridan, C. & Martin, S.J. Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* (2010).
- Shiels, H.A. & White, E. The Frank-Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. *J Exp Biol* (2008), **211**, 2005-2013.
- Siedner, S., Kruger, M., Schroeter, M., Metzler, D., Roell, W., Fleischmann, B.K., Hescheler, J., Pfitzer, G. & Stehle, R. Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J Physiol* (2003), **548**, 493-505.
- Siemankowski, R.F., Wiseman, M.O. & White, H.D. ADP dissociation from actomyosin subfragment 1 is sufficiently slow to limit the unloaded shortening velocity in vertebrate muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1985), **82**, 658-662.
- Simmerman, H.K. & Jones, L.R. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* (1998), **78**, 921-947.
- Sissman, N.J. Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: comparative chronology. *Am J Cardiol* (1970), **25**, 141-148.
- Skarka, L., Bardova, K., Brauner, P., Flachs, P., Jarkovska, D., Kopecky, J., and Ostadal, B. Expression of mitochondrial uncoupling protein 3 and adenine nucleotide translocase 1 genes in developing rat heart: putative involvement in control of mitochondrial membrane potential. *J Mol Cell Cardiol* (2003), **35(3)**, 321-330.
- Smirnova, E., Shurland, D.L., Ryazantsev, S.N. & van der Blik, A.M. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* (1998), **143**, 351-358.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L. & van der Blik, A.M. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* (2001), **12**, 2245-2256.
- Smith, R.B. The development of the intrinsic innervation of the human heart between the 10 and 70 mm stages. *J Anat* (1970), **107**, 271-279.
- Smith, H.E. & Page, E. Ultrastructural changes in rabbit heart mitochondria during the perinatal period. Neonatal transition to aerobic metabolism. *Dev Biol* (1977), **57**, 109-117.
- Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C. & Chan, D.C. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* (2007), **178**, 749-755.
- St-Pierre, J., Brand, M.D. & Boutilier, R.G. Mitochondria as ATP consumers: cellular treason in anoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000), **97**, 8670-8674.
- Starling, E.H. & Visscher, M.B. The regulation of the energy output of the heart. *J Physiol* (1927), **62**, 243-261.

- Stepanov, V., Mateo, P., Gillet, B., Beloeil, J.C., Lechene, P. & Hoerter, J.A. Kinetics of creatine kinase in an experimental model of low phosphocreatine and ATP in the normoxic heart. *Am J Physiol* (1997), **273**, C1397-1408.
- Stojanovski, D., Koutsopoulos, O.S., Okamoto, K. & Ryan, M.T. Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci* (2004), **117**, 1201-1210.
- Sugimoto, Y., Tokunaga, M., Takezawa, Y., Ikebe, M. & Wakabayashi, K. Conformational changes of the myosin heads during hydrolysis of ATP as analyzed by x-ray solution scattering. *Biophys J* (1995), **68**, 29S-33S; discussion 33S-34S.
- Sugioka, R., Shimizu, S. & Tsujimoto, Y. Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem* (2004), **279**, 52726-52734.
- Sztark, F., Payen, J.F., Piriou, V., Rigoulet, M., Ventura-Clapier, R., Mazat, J.P., Leverve, X. & Janvier, G. [Cellular energy metabolism: physiologic and pathologic aspects]. *Ann Fr Anesth Reanim* (1999), **18**, 261-269.
- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T. & Mihara, K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* (2007), **282**, 11521-11529.
- Tam, S.K., Gu, W., Mahdavi, V. & Nadal-Ginard, B. Cardiac myocyte terminal differentiation. Potential for cardiac regeneration. *Ann N Y Acad Sci* (1995), **752**, 72-79.
- Tanaka, H., Sekine, T., Nishimaru, K. & Shigenobu, K. Role of sarcoplasmic reticulum in myocardial contraction of neonatal and adult mice. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* (1998), **120**, 431-438.
- Taylor, E.W. Chemistry of muscle contraction. *Annu Rev Biochem* (1972), **41**, 577-616.
- Territo, P.R., Mootha, V.K., French, S.A. & Balaban, R.S. Ca²⁺ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* (2000), **278**, C423-435.
- Territo, P.R., French, S.A., Dunleavy, M.C., Evans, F.J. & Balaban, R.S. Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: rapid kinetics of mVO₂, NADH, AND light scattering. *J Biol Chem* (2001), **276**, 2586-2599.
- Tian, R., Christe, M.E., Spindler, M., Hopkins, J.C., Halow, J.M., Camacho, S.A. & Ingwall, J.S. Role of MgADP in the development of diastolic dysfunction in the intact beating rat heart. *J Clin Invest* (1997), **99**, 745-751.
- Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K. & Nunnari, J. The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol* (2002), **158**, 445-452.

- Tiivel, T., Kadaya, L., Kuznetsov, A., Kaambre, T., Peet, N., Sikk, P., Braun, U., Ventura-Clapier, R., Saks, V. & Seppet, E.K. Developmental changes in regulation of mitochondrial respiration by ADP and creatine in rat heart in vivo. *Mol Cell Biochem* (2000), **208**, 119-128.
- Timohhina, N., Guzun, R., Tepp, K., Monge, C., Varikmaa, M., Vija, H., Sikk, P., Kaambre, T., Sackett, D. & Saks, V. Direct measurement of energy fluxes from mitochondria into cytoplasm in permeabilized cardiac cells in situ: some evidence for Mitochondrial Interactosome. *J Bioenerg Biomembr* (2009), **41**, 259-275.
- Tondera, D., Czauderna, F., Paulick, K., Schwarzer, R., Kaufmann, J. & Santel, A. The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Sci* (2005), **118**, 3049-3059.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E. & Shirihai, O.S. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* (2008), **27**, 433-446.
- van den Bosch, B.J., van den Burg, C.M., Schoonderwoerd, K., Lindsey, P.J., Scholte, H.R., de Coo, R.F., van Rooij, E., Rockman, H.A., Doevendans, P.A. & Smeets, H.J. Regional absence of mitochondria causing energy depletion in the myocardium of muscle LIM protein knockout mice. *Cardiovasc Res* (2005), **65**, 411-418.
- van Deursen, J., Heerschap, A., Oerlemans, F., Ruitenbeek, W., Jap, P., ter Laak, H. & Wieringa, B. Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity. *Cell* (1993), **74**, 621-631.
- Vandekerckhove, J., Bugaisky, G. & Buckingham, M. Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms. *J Biol Chem* (1986), **261**, 1838-1843.
- Varadi, A., Johnson-Cadwell, L.I., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V.J. & Rutter, G.A. Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci* (2004), **117**, 4389-400.
- Veksler, V.I., Kuznetsov, A.V., Sharov, V.G., Kapelko, V.I. & Saks, V.A. Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* (1987), **892**, 191-196.
- Veksler, V.I., Kuznetsov, A.V., Anflous, K., Mateo, P., van Deursen, J., Wieringa, B. & Ventura-Clapier, R. Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *J Biol Chem* (1995), **270**, 19921-19929.
- Vendelin, M., Beraud, N., Guerrero, K., Andrienko, T., Kuznetsov, A.V., Olivares, J., Kay, L. & Saks, V.A. Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a "crystal-like" pattern. *Am J Physiol Cell Physiol* (2005), **288**, C757-767.

- Ventura-Clapier, R. and Veksler, V. Myocardial ischemic contracture. Metabolites affect rigor tension development and stiffness. *Circ Res* (1994), **74(5)**, 920-929.
- Ventura-Clapier, R., Veksler, V. & Hoerter, J.A. Myofibrillar creatine kinase and cardiac contraction. *Mol Cell Biochem* (1994), **133-134**, 125-144.
- Ventura-Clapier, R., Kuznetsov, A.V., d'Albis, A., van Deursen, J., Wieringa, B. & Veksler, V.I. Muscle creatine kinase-deficient mice. I. Alterations in myofibrillar function. *J Biol Chem* (1995), **270**, 19914-19920.
- Ventura-Clapier, R., Kuznetsov, A., Veksler, V., Boehm, E. & Anflous, K. Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem* (1998), **184**, 231-247.
- Ventura-clapier, R. Créatine kinases et transferts d'énergie dans le myocyte cardiaque. *Médecine Sciences* (1998), **14**, 1017-1124.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A. & Veksler, V. Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* (2004), **555**, 1-13.
- Ventura-clapier, R. and Veksler, V. Métabolisme énergétique cardiaque. *Cardiologie et maladies vasculaires* (2006), **1**, 37-41.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A. & Veksler, V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* (2008), **79**, 208-217.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V. & Joubert, F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta* (2010).
- Voos, W., Martin, H., Krimmer, T. & Pfanner, N. Mechanisms of protein translocation into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* (1999), **1422**, 235-254.
- Votruba, M., Moore, A.T. & Bhattacharya, S.S. Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy. *J Med Genet* (1998), **35**, 793-800.
- Wakabayashi, T., Asano, M. & Kurono, C. Mechanism of the formation of megamitochondria induced by copper-chelating agents. I. On the formation process of megamitochondria in cuprizone-treated mouse liver. *Acta Pathol Jpn* (1975), **25**, 15-37.
- Wakabayashi, T. & Green, D.E. Membrane fusion in mitochondria. I. Ultrastructural basis for fusion. *J Electron Microsc (Tokyo)* (1977), **26**, 305-320.
- Wallimann, T. & Eppenberger, H.M. Localization and function of M-line-bound creatine kinase. M-band model and creatine phosphate shuttle. *Cell Muscle Motil* (1985), **6**, 239-285.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K. & Eppenberger, H.M. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* (1992), **281 (Pt 1)**, 21-40.

- Weber, A. & Murray, J.M. Molecular control mechanisms in muscle contraction. *Physiol Rev* (1973), **53**, 612-673.
- Weiss, J. & Hiltbrand, B. Functional compartmentation of glycolytic versus oxidative metabolism in isolated rabbit heart. *J Clin Invest* (1985), **75**, 436-447.
- Weiss, J.N. & Lamp, S.T. Glycolysis preferentially inhibits ATP-sensitive K⁺ channels in isolated guinea pig cardiac myocytes. *Science* (1987), **238**, 67-69.
- Wilding, J.R., Joubert, F., de Araujo, C., Fortin, D., Novotova, M., Veksler, V. & Ventura-Clapier, R. Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts. *J Physiol* (2006), **575**, 191-200.
- Williamson, J.R., Ford, C., Illingworth, J. & Safer, B. Coordination of citric acid cycle activity with electron transport flux. *Circ Res* (1976), **38**, 139-151.
- Winegrad, S. Myosin binding protein C, a potential regulator of cardiac contractility. *Circ Res* (2000), **86**, 6-7.
- Wyss, M., Smeitink, J., Wevers, R.A. & Wallimann, T. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* (1992), **1102**, 119-166.
- Xu, K.Y., Zweier, J.L. & Becker, L.C. Functional coupling between glycolysis and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport. *Circ Res* (1995), **77**, 88-97.
- Yamaguchi, R., Lartigue, L., Perkins, G., Scott, R.T., Dixit, A., Kushnareva, Y., Kuwana, T., Ellisman, M.H. & Newmeyer, D.D. Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Mol Cell* (2008), **31**, 557-569.
- Yoon, Y., Pitts, K.R., Dahan, S. & McNiven, M.A. A novel dynamin-like protein associates with cytoplasmic vesicles and tubules of the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *J Cell Biol* (1998), **140**, 779-793.
- Yoon, Y., Pitts, K.R. & McNiven, M.A. Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell* (2001), **12**, 2894-2905.
- Yoon, Y., Krueger, E.W., Oswald, B.J. & McNiven, M.A. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* (2003), **23**, 5409-5420.
- Yoshikane, H., Nihei, T. & Moriyama, K. Three-dimensional observation of intracellular membranous structures in dog heart muscle cells by scanning electron microscopy. *J Submicrosc Cytol* (1986), **18**, 629-636.
- Youle, R.J. & Karbowski, M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2005), **6**, 657-663.
- Zak, R. Cell proliferation during cardiac growth. *Am J Cardiol* (1973), **31**, 211-219.
- Ziman, A.P., Gomez-Viquez, N.L., Bloch, R.J. & Lederer, W.J. Excitation-contraction coupling changes during postnatal cardiac development. *J Mol Cell Cardiol* (2009).