



HAL
open science

Conséquences de l'ischémie/reperfusion sur le pore de transition de perméabilité mitochondrial

Zineb Baidi

► **To cite this version:**

Zineb Baidi. Conséquences de l'ischémie/reperfusion sur le pore de transition de perméabilité mitochondrial. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT: 2011GRENV059 . tel-00721775

HAL Id: tel-00721775

<https://theses.hal.science/tel-00721775>

Submitted on 30 Jul 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« **Zineb / BAIDI** »

Thèse dirigée par « **Eric/FONTAINE** »

Préparée au sein du **Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée** dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Conséquences de l'ischémie / reperfusion sur le Pore de Transition de Perméabilité mitochondrial

Thèse soutenue publiquement le « **Octobre 2011** »,
devant le jury composé de :

Pr, Marc, SAVASTA

Directeur de l'école doctorale EDCSV Grenoble, (Président)

Pr, Michel, RIGOLET

Professeur à l'université de Bordeaux, (Rapporteur)

Pr, Laurent, ARGAUD

Professeur à l'université de Lyon, (Rapporteur)

Pr, Eric, FONTAINE

Professeur à l'UJF à Grenoble, (Directeur de thèse)



Sommaire

Remerciements.....	7
Résumé.....	8
Introduction.....	15
1 Mitochondrie.....	15
1.1 Mitochondrie : origine et structure.....	15
1.1.1 <i>Origine.....</i>	15
1.1.2 <i>Structure.....</i>	15
1.2 Oxydation phosphorylante.....	17
1.2.1 <i>La chaîne respiratoire.....</i>	17
1.2.2 <i>Le complexe V : ATP synthase.....</i>	19
1.3 La force protomotrice.....	20
1.3.1 <i>Théorie de Mitchell.....</i>	20
1.3.2 <i>La fuite de protons.....</i>	22
1.3.3 <i>Le patinage des pompes à protons.....</i>	22
2 Le phénomène de transition de perméabilité.....	23
2.1 Description du phénomène.....	23
2.2 Le phénomène de swelling.....	23
2.3 Le pore de transition de perméabilité le « PTP »	24
2.3.1 <i>Adénine Nucléotide Translocase (ANT).....</i>	26
2.3.2 <i>Le Canal Anionique Voltage Dépendant (VDAC)..</i>	27
2.3.3 <i>La cyclophiline D (CyP-D).....</i>	28
2.4 L'homéostasie calcique.....	29



2.5	La perméabilité de transition est un phénomène régulé.	30
2.5.1	<i>Régulation ionique du PTP</i>	30
2.5.2	<i>Régulation par le pH</i>	31
2.5.3	<i>PTP et stress oxydant</i>	32
2.5.4	<i>Régulation par le complexe I</i>	33
2.5.5	<i>Potentiel de membrane</i>	33
2.6	La perméabilité de transition est un phénomène régulateur	34
2.6.1	<i>Apoptose et perméabilité de transition</i>	34
2.6.2	<i>Physiopathologies liées à la perméabilité de transition</i>	36
2.6.2.1	<i>Pathologies du foie</i>	36
2.6.2.2	<i>Pathologies musculaires</i>	37
2.6.2.3	<i>Neurotoxicité et PTP</i>	39
2.6.2.4	<i>Ischémie reperfusion et PTP</i>	40
3	Ischémie/Reperfusion	40
3.1	Ischémie	40
3.1.1	<i>Conséquences de l'ischémie sur la chaîne respiratoire</i>	41
3.1.2	<i>Production de ROS pendant l'ischémie</i>	42
3.1.3	<i>Ischémie et les échanges ioniques</i>	43
3.2	Reperfusion	44
3.2.1	<i>Reperfusion et modifications structurales et fonctionnelles de la mitochondrie</i>	44
3.2.2	<i>La production de ROS pendant la reperfusion</i>	45
3.2.3	<i>Les échanges calciques à la reperfusion</i>	47



3.3 Exemple de l'implication pathologique de l'ischémie / reperfusion.....	48
3.4 Ischémie/reperfusion et PTP.....	50
3.4.1 <i>Conséquences d'ouverture du PTP</i>	51
3.4.2 <i>Prévention de l'ouverture du PTP</i>	53
3.4.2.1 <i>Le phénomène de pré-conditionnement</i>	53
3.4.2.2 <i>Le phénomène de post-conditionnement</i>	54
3.4.3 <i>Mesure de la perméabilité de transition</i>	54
Objectifs.....	58
Matériel et méthodes.....	60
1 Culture cellulaire.....	60
1.1 Conditions de culture cellulaire.....	60
1.2 Préparation des lamelles.....	61
2 Ischémie reperfusion et les groupes expérimentaux.....	62
2.1 Ischémie reperfusion.....	62
2.2 Les groupes expérimentaux.....	62
3 Mesure de l'ouverture du PTP par microscopie confocale.....	63
3.1 Principe et marquage cellulaire.....	63
3.2 Traitement des images.....	63
3.3 Mesure de la capacité de rétention calcique.....	64
3.3.1 <i>Perméabilisation des cellules</i>	64
3.3.2 <i>Conditionnement des cellules</i>	64
3.3.3 <i>La capacité de rétention calcique</i>	65



3.3.4 *Les groupes expérimentaux*.....66

Résultats et discussions.....69

1 Mise en évidence de l'ouverture du PTP dans un modèle d'ischémie reperfusion sur les cellules HMEC-1.....69

1.1 Observation de l'ouverture du PTP.....69

1.2 Effet des inhibiteurs du PTP à l'ischémie.....74

1.3 Effet des inhibiteurs du PTP à la reperfusion.....79

1.4 Discussion.....83

2 Etude de la durée et de la réversibilité des conséquences du phénomène d'ischémie.....86

2.1 Etude de la durée des conséquences de l'ischémie..86

2.2 Réversibilité de l'ischémie reperfusion.....93

2.3 Discussion et perspective.....95

3 Etudes de l'ouverture du PTP sur les cellules INS-1.....97

3.1 Analyse de la perméabilité de transition sur cellules adhérentes.....97

3.2 Etude de la rétention calcique mitochondriale dans le cadre de l'ischémie / reperfusion sur les cellules INS-1.....104

3.3 Discussion et perspectives.....110

Conclusion.....115

Références bibliographiques.....117



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE



Remerciements

Je remercie le défunt le professeur Xavier LEVERVE, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et pour m'avoir aidé à mener à terme mon projet de thèse.

Je remercie mon directeur de thèse, Eric FONTAINE, pour m'avoir accueilli dans son équipe. Merci pour toutes ses explications et conseils scientifiques, et pour avoir consacré du temps pour encadrer ce travail.

Je tiens à remercier les professeurs, Marc Savasa, Michel rigoulet et Laurent ARGAUD, pour avoir accepté d'être membre du jury de ce travail.

Je remercie l'AGIR à dom pour avoir financé ma thèse pendant trois ans.

Merci à tous les membres du LBFA, pour leurs conseils scientifiques, aides techniques et tous les moments agréables qu'on a partagé.

Merci à tous mes amis doctorants, pour les excellents moments que nous avons eu au sein et en dehors du labo. Un grand merci pour leur soutien dans les moments difficiles.

Merci à ma famille, qui m'a toujours soutenu tout au long de ma vie comme dans mes études.

Enfin, merci à Yves pour son aide et son soutien de tous les instants.



Résumé

Les dommages tissulaires associés à l'ischémie/reperfusion ont été largement étudiés. Plusieurs études ont montré que des dysfonctionnements mitochondriaux sont responsables de la survenue de ces dommages, et que la transition de perméabilité pourrait y être impliquée. Cette transition de perméabilité est médiée par l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP). Cette ouverture du PTP pourrait survenir pendant la phase d'ischémie ou pendant la phase de reperfusion. L'objectif de ce travail était de visualiser l'ouverture du PTP dans des conditions d'ischémie/reperfusion sur cellules intactes (HMEC-1 et INS-1) et d'étudier son implication dans ce phénomène. Nous avons pu visualiser pour la première fois l'ouverture du PTP par le suivi des dommages qu'elle engendre (sortie du NADH et la chute du $\Delta\Psi$) induits par une ischémie/reperfusion. Nous avons constaté que l'activation du PTP a lieu pendant la phase d'ischémie tant dans les cellules HMEC-1 que dans les cellules INS-1. Cette induction a été prévenue dans les deux modèles cellulaires par la cyclosporine A. Nos résultats suggèrent également que le complexe I pourrait être impliqué dans la prévention de la chute du $\Delta\Psi$ et de la sortie du NADH. Nous avons aussi montré que la capacité de rétention calcique des cellules perméabilisées diminue à l'ischémie et que cette diminution disparaît après 60 minutes de reperfusion.

Ainsi, la visualisation de l'ouverture du PTP dans un modèle d'ischémie/reperfusion constituerait une piste intéressante qui apporterait plus de certitude quant à l'implication du PTP dans ce phénomène. De plus, l'étude du phénomène d'ischémie *in vitro*, apporterait plus de réponses quant à l'implication des modifications du fonctionnement cellulaire dans les dommages tissulaires.



Mots clé: *ischémie / reperfusion, PTP*

Abstract

Several studies have shown that ischemia/reperfusion injury is strongly related to mitochondrial dysfunction. These studies have mostly focused on the involvement of the permeability transition in this phenomenon. The permeability transition is mediated by the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). PTP activation may occur during ischemia or reperfusion. The aim of this work was to visualize mPTP opening during ischemia/reperfusion conditions on intact cells (HMEC-1 and INS-1) and to study its involvement in this phenomenon. For the first time, we observed the opening of the mPTP mediated by ischemia/reperfusion by monitoring the damages caused by its activation (NADH efflux and $\Delta\Psi$ decrease). This mPTP activation occurred during ischemia in HMEC-1 and INS-1 cells. However, mPTP induction was prevented by cyclosporine A in both cell models. Furthermore, our results showed the involvement of complex I in the prevention of NADH efflux and $\Delta\Psi$ decrease. A decrease in the mitochondrial calcium retention capacity was also shown in permeabilised cells during ischemia, which disappear after 60 minutes of reperfusion.

Thus, the visualisation of the mPTP opening in a model of ischemia / reperfusion is an interesting observation indicating the involvement of PTP in this phenomenon. Furthermore, the study of ischemia *in vitro* would provide answers regarding the involvement of cellular function changes in tissue damage.

Key words: *ischemia / reperfusion, PTP*



Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Structure de la mitochondrie.....	16
Figure 2 : La chaîne respiratoire.....	17
Figure 3 : Complexe V : l'ATP synthase.....	19
Figure 4 : Représentation du $\Delta\Psi$ et du ΔpH ainsi que le phénomène de fuite de protons à travers la membrane interne.....	21
Figure 5 : Complexe protéique impliqué dans la transition de perméabilité mitochondriale	25
Figure 6 : Inhibition du PTP par la CsA.....	29
Figure 7 : Transport du calcium à travers la membrane interne.....	30
Figure 8 : schéma représentant la voie intrinsèque de l'apoptose.....	36
Figure 9 : Schéma de la voie d'apoptose dans la myopathie musculaire.....	39
Figure 10 : mise en évidence de l'ouverture du PTP pendant l'ischémie/reperfusion.....	72
Figure 11 : Effet des inhibiteurs du PTP (CsA et Rot) sur la fluorescence du NADH et du TMRM pendant l'ischémie/reperfusion.....	74
Figure 12 : Effet de la CsA sur la fluorescence du TMRM et du NADH pendant l'ischémie / reperfusion (n=1).....	77
Figure 13 : Effet de la Rot sur la fluorescence du TMRM et du NADH pendant l'ischémie / reperfusion (n=1).....	78



Figure 14 : Conséquences du changement de focus sur les fluorescences du NADH et TMRM en fonction du pinhole.....	78
Figure 15 : Mise en évidence de l'ouverture du PTP pendant l'ischémie/reperfusion.....	80
Figure 16 : Effet du DNP sur le statut redox du NADH et sur le $\Delta\Psi$ des HMEC-1.....	88
Figure 17 : Effet du DNP sur l'oxydation du NADH et sur le $\Delta\Psi$ des HMEC-1 après 5' d'ischémie.....	89
Figure 18: Effet du DNP sur l'oxydation du NADH et sur le $\Delta\Psi$ des HMEC-1 après 10' d'ischémie.....	90
Figure 19 : Effet du DNP sur l'oxydation du NADH et sur le $\Delta\Psi$ des HMEC-1 après 15' d'ischémie.....	91
Figure 20 : Effet du DNP sur l'oxydation du NADH et sur le $\Delta\Psi$ des HMEC-1 après 30' d'ischémie.....	92
Figure 21: Effet du DNP sur l'oxydation du NADH et sur le $\Delta\Psi$ des HMEC-1 après 60' d'ischémie.....	93
Figure 22: Variation de l'intensité de fluorescence en NADH et TMRM en ischémie reperfusion.....	100
Figure 23 : Représentation des rapports d'intensité de fluorescence du TMRM/NADH.....	101
Figure 24 : Variation de l'intensité de fluorescence en NADH et TMRM en présence de CsA 1μM.....	102
Figure 25 : Représentation des rapports de l'intensité de fluorescence du TMRM/NADH.....	103
Figure 26 : Effet de l'ischémie sur la rétention calcique des cellules INS-1.....	105
Figure 27 : Effet de la reperfusion sur la rétention calcique des ins-1.....	106
Figure 28 : Comparaison entre la rétention calcique à l'ischémie et à la reperfusion.....	107



Figure 29 : Effet de l'ischémie sur la rétention calcique des cellules INS-1 en glutamate/malate.....107

Figure 30 : Effet de l'ischémie sur la rétention calcique des cellules INS-1 en glutamate/malate.....108

Figure 31: Comparaison entre la rétention calcique à l'ischémie et à la reperfusion.....109

Tableau 1 : Intensité et surface de fluorescence du NADH et TMRM dans le contrôle.....73

Tableau 2 : Intensité et surface de fluorescence du NADH et TMRM en présence de CsA et de Rot à l'ischémie.....75

Tableau 3 : Intensité et surface de fluorescence du NADH et TMRM en présence de CsA et de roténone à la reperfusion.....81

Tableau 4: Etude de la réversibilité du phénomène d'ischémie/reperfusion après le DNP95



Liste des abréviations

3 HDOG: 2-Deoxy 3 (H) glucose
A23187: Calcium Ionophore (Calcimycin)
AAF: Acetylaminofluorene
ADP: Adenosine Di Phosphate
AIF: Apoptosis-inducing factor
ATP: Adénosine Tri Phosphate
BMS 199264: Submitochondrial particles B (inhibiteur ATP hydrolase)
Calcein AM: Acetomethoxy derivate of calcein
CoCl : Cobalt Chlorid
CsA : Cyclosporine A
CyP-D: Cyclophiline D
Cyt c: Cytochrome C
DISC : Death-Inducing Signaling Complex
HMEC: Human Microvascular Endothelial Cell
INS cells : Insulinoma cells
MSS: Milieu Sans Substrat
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
Pi : Phosphate inorganique
PTP : Pore de Transition de Perméabilité
ROS: Reactive Oxygene Species
ROT: Roténone
tBH: tert-buthyl hydroperoxide
TMRM: Tetramethyl rhodamine methyl ester
VDAC : Voltage Dependent Anion Channel
 ΔP : Force protomotrice
 $\Delta\Psi$: Potentiel électrique de membrane



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

INTRODUCTION



Introduction

1 Mitochondrie

1.1 Mitochondrie : origine et structure

1.1.1 *Origine*

Les mitochondries sont des organites de la cellule eucaryote de 1 μm de longueur. Elles constituent la principale source de transduction d'énergie cellulaire sous sa forme chimique ATP.

Selon la théorie endosymbiotique formulée par Lynn Margulis en 1960, ces organites cellulaires proviennent de la fusion de deux bactéries, archéobactérie anaérobie (hôte) et protobactérie aérobie (symbionte). Des travaux en 1980, ont confirmé cette hypothèse par la découverte de l'ADN spécifique des mitochondries qui diffère de l'ADN nucléaire, et par le fait qu'elles soient limitées par deux membranes.

1.1.2 *Structure*

La mitochondrie est limitée par une enveloppe formée de deux membranes : membrane externe et membrane interne et un espace matriciel (figure 1)



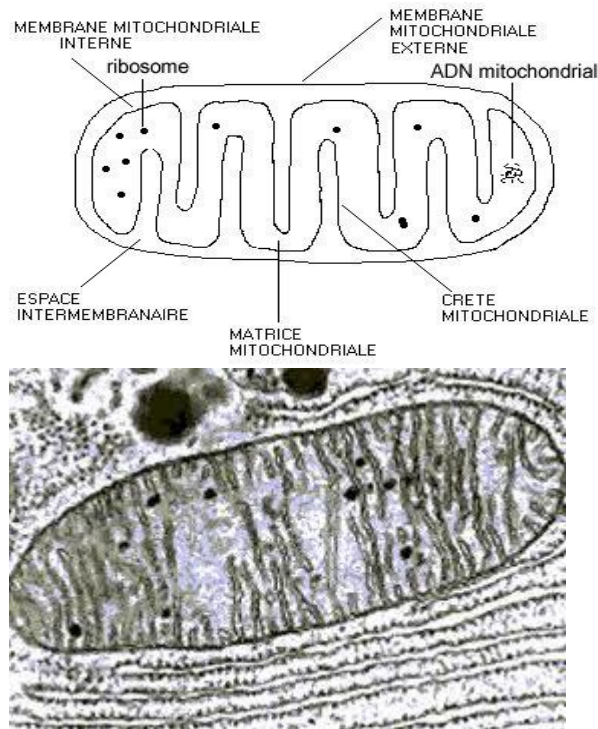


Figure 1 : Structure de la mitochondrie

La membrane externe uniforme et continue est constituée de 60% de protéines et 40% de lipides elle est perméable grâce à des protéines transmembranaires comme les porines, aux molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 10 KDa.

La membrane interne est très riche en protéines (75%), cependant sa composition en cardiolipines et autres acides gras la rend quasiment imperméable aux ions et aux métabolites hydrosolubles. Elle contient aussi les protéines de transport de protons appelées les complexes de la chaîne respiratoire, et une enzyme pour la synthèse de l'ATP appelée l'ATP synthase.

La matrice mitochondriale est un espace délimité par la membrane interne. Elle constitue le site où ont lieu le cycle Krebs et la β oxydation qui fournissent les substrats nécessaires pour

alimenter la chaîne respiratoire et favoriser ainsi la production d'ATP.

1.2 Oxydation phosphorylante

La mitochondrie est souvent considérée comme la centrale énergétique de la cellule. Elle constitue le lieu où se déroulent les dernières étapes de conversion de l'énergie, sous forme de molécules d'ATP nécessaires au fonctionnement cellulaire. Elle joue aussi un rôle dans la synthèse des stéroïdes, l'homéostasie du calcium et dans l'apoptose.

1.2.1 La chaîne respiratoire

L'énergie produite dans la mitochondrie, est issue d'un ensemble de réactions d'oxydoréduction d'équivalents réduits (NADH , H^+ et FADH_2), issus du cycle de Krebs de la glycolyse et de la β oxydation. Ces réactions sont accompagnées de flux de protons et d'électrons dans la membrane interne au niveau de la chaîne respiratoire (Figure 2)

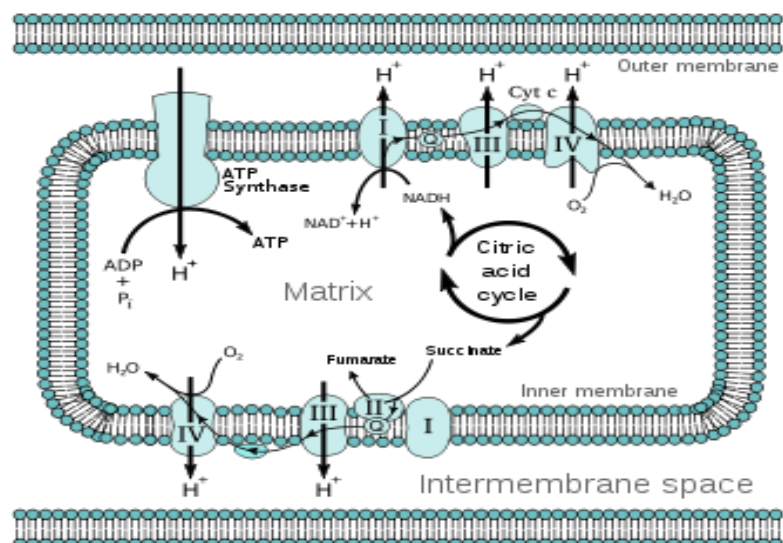


Figure 2 : La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire est constituée de quatre complexes qui interviennent dans un ordre précis selon les propriétés oxydantes ou réductrices de chaque couple redox, dans le transfert d'électrons vers l'accepteur final : l'oxygène moléculaire (Green, 1960, Hatefi, 1985).

Le complexe I : NADH-coenzyme Q oxydoréductase

La NADH oxydoréductase est l'un des principaux complexes de la chaîne respiratoire. Il assure la réduction de l'ubiquinone en ubiquinol QH_2 grâce au transfert de deux électrons du NADH au coenzyme Q. Cette réaction s'accompagne d'un transfert de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, participant ainsi à l'établissement d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne. Il représente aussi un site majeur de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la mitochondrie.

Le complexe II : succinate-ubiquinone réductase

Ce complexe ne joue aucun rôle dans la constitution du gradient de protons. Il catalyse le transfert d'électrons du succinate à l'ubiquinone Q et constitue ainsi une source auxiliaire qui fournit ses électrons à la chaîne respiratoire.

Le complexe III : ubiquinone cytochrome c réductase

Il catalyse le transfert d'électrons de deux ubiquinol au cytochrome c. Deux molécules QH_2 sont oxydées et chaque oxydation est accompagnée par un transfert de protons vers l'espace intermembranaire.

Le complexe IV : cytochrome oxydase.



C'est le dernier élément de la chaîne respiratoire. Il catalyse le transfert des électrons du cytochrome c à l'oxygène. Ce complexe contribue au maintien du gradient de protons, grâce au pompage d'ions H^+ depuis la matrice vers l'espace intermembranaire d'une part, et d'autre part, grâce à la soustraction de deux protons de la matrice pour former une molécule d' H_2O .

Ainsi, en tenant compte de l'imperméabilité de la membrane interne, le flux des protons de la matrice alcaline vers l'espace intermembranaire acide, crée un gradient de concentration de part et d'autre de la membrane interne qui constitue un véritable réservoir d'énergie. Cette énergie libre est utilisée pour la synthèse d'ATP.

1.2.2 *Le complexe V : ATP synthase*

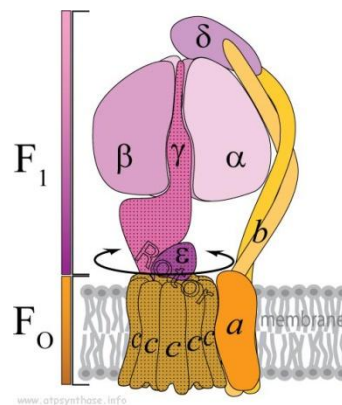


Figure 3 : Complexe V : l'ATP synthase

L'ATP synthase est constituée de deux sous unités Fo et F1 (figure 3). Cette enzyme se procure l'énergie nécessaire à la fabrication d'ATP, grâce à la sous unité Fo appelée aussi « canal à protons » qui facilite le retour des ions H^+ vers la matrice mitochondriale. Ce retour de protons catalyse la phosphorylation de l'ADP en ATP grâce à la sous unité F1.



L'ATP synthase peut fonctionner dans le sens de synthèse ou de dégradation de l'ATP. Ces deux réactions dépendent du rapport ATP/ADP et de la force protomotrice (Hatefi, 1985, Green, 1960)

1.3 La force protomotrice

1.3.1 *Théorie de Mitchell*

Peter Mitchell a proposé en 1961 le mécanisme de couplage entre la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP. Dans son postulat « théorie chimiosmotique » il a décrit que :

- Les réactions d'oxydoréduction de la chaîne respiratoire provoquent une expulsion vectorielle de protons à travers la membrane interne et permettent l'établissement d'un gradient électrochimique positif de protons à l'extérieur de la mitochondrie
- La membrane mitochondriale interne est imperméable aux ions chargés. Le delta de concentration des ions de part et d'autre de la membrane crée une force électrochimique : la différence de pH entre les deux compartiments ainsi que la différence de charge électrique pousse à la réentrée des protons vers la matrice (figure 4)
- Les différences de potentiel chimique ΔpH et électrique $\Delta\Psi$ ainsi créées, génèrent une force protomotrice ΔP , responsable de la formation d'ATP à partir d'ADP + Pi. (Mitchell, 1961)

Ainsi la force protomotrice peut être exprimée par la formule :

$$\Delta P = \Delta\Psi - (2,303 RT/ F) \Delta\text{pH}$$

R : Constante des gaz parfaits, *T* : température, *F* : constante de Faraday



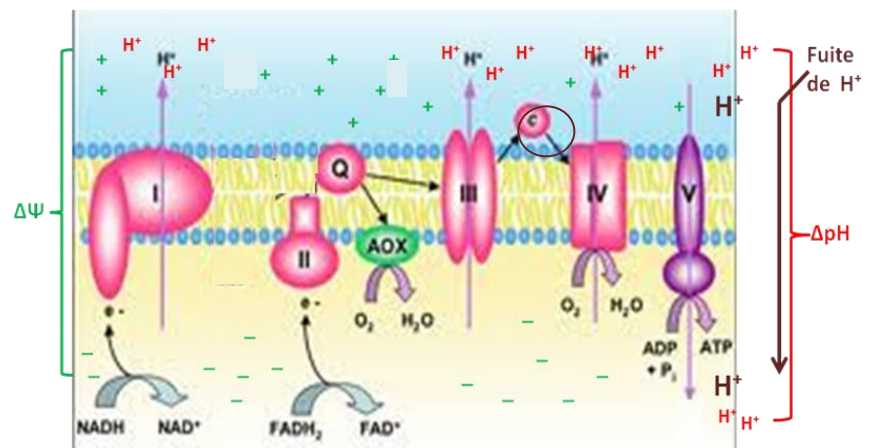


Figure 4 : Représentation du $\Delta\Psi$ et du ΔpH ainsi que le phénomène de fuite de protons à travers la membrane interne

Le potentiel membranaire joue un rôle important dans la régulation du fonctionnement mitochondrial. En effet, l'efficacité de l'oxydation phosphorylante déterminée par le rapport P/O est dépendante du maintien de la force protonotrice. (Fitton et coll., 1994)

Le rapport P/O représentant le nombre de molécules d'ATP formées par le nombre de molécules d'oxygène réduites, n'est pas toujours constant. La mitochondrie adapte ce rapport en fonction des situations physiologiques auxquelles elle est confrontée.

Plusieurs études ont montré qu'une partie de la force protonotrice peut être perdue sous forme de chaleur. Ces pertes d'énergie sont dues à des phénomènes de fuite de protons à travers la membrane interne, appelés « leak » de protons. Le potentiel de la membrane mitochondriale peut être régulé aussi par les pompes à protons on parle de phénomène de patinage « slipping ».

1.3.2 *La fuite de protons*

C'est Nicholl et ses collaborateurs qui ont décrit ce phénomène de fuite en 1974. Ils ont démontré que le retour de protons à travers la membrane interne (figure 4) augmente de façon non linéaire en fonction du potentiel membranaire. Cette fuite de protons peut être corrélée à la composition en acides gras de la membrane interne (Brand et coll., 2003, Fontaine et coll., 1996) et à sa teneur en translocase (l'ANT) (Brand et coll., 2005). Cette fuite peut être induite grâce à des agents découplants qui augmentent la perméabilité de la membrane aux ions H^+ comme : le 2,4 dinitrophénol (DNP) ou le carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP).

1.3.3 *Le patinage des pompes à protons*

L'efficacité du couplage entre la chaîne respiratoire et la phosphorylation d'ATP peut être altérée par une modification de la stœchiométrie des pompes à protons. D'une part une diminution du pompage de protons à travers la membrane interne « slipping » ou le changement de la proportion des électrons délivrés aux complexes I ou II de la chaîne respiratoire est responsable de la diminution du rapport H^+/e^- sans aucun changement ni dans le potentiel phosphate ni le gradient de concentration de protons $\Delta\mu_{H^+}$ (Azzone et coll., 1978, Rigoulet et coll., 1998). D'autre part, une augmentation du rapport H^+/ATP est responsable d'une diminution de la synthèse d'ATP sans aucun changement dans le gradient de concentration de protons, par conséquent le rapport P/O de l'oxydation phosphorylante diminue aussi (Rigoulet et coll., 1990)

Ainsi, l'étude des modifications du potentiel membranaire joue un rôle important dans la mise en évidence d'une régulation



finement contrôlée par la mitochondrie, face à différentes situations de stress physiologique, dont la modification de la perméabilité de transition mitochondriale.

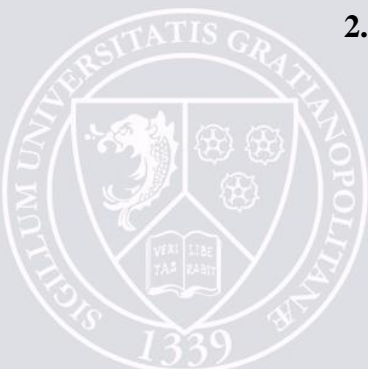
2 Le phénomène de transition de perméabilité

2.1 Description du phénomène

Ce phénomène a été décrit pour la première fois comme étant un gonflement passif de la mitochondrie induit par le Ca^{2+} et le Pi (Azzone and Azzi, 1965). En 1979, Haworth et Hunter ont décrit ce phénomène comme étant une augmentation soudaine de la perméabilité de la membrane interne, pour toute molécule de poids moléculaire inférieur à 1,5 KDa (Haworth and Hunter, 1979, Hunter and Haworth, 1979a). Tout d'abord, cette modification de la perméabilité mitochondriale a été expliquée comme étant la conséquence d'un dommage de la membrane interne par les phospholipases (Gunter and Pfeiffer, 1990). Ensuite, ce phénomène a été associé à la présence et l'ouverture d'un canal protéique, le pore de transition de perméabilité (PTP) (Bernardi, 1999). Cette ouverture est accompagnée par un gonflement mitochondrial pouvant aller jusqu'à la rupture de la membrane externe, libérant ainsi tout le contenu de l'espace intermembranaire dans le cytoplasme (Rasola and Bernardi, 2007).

2.2 Le phénomène de swelling

Le gonflement mitochondrial est un processus osmotique dû à la diffusion de solutés et d'eau dans la matrice mitochondriale. On distingue deux types de swelling : un gonflement actif « high energy swelling » ou « low amplitude swelling » il se produit quand le potentiel mitochondrial est élevé sans aucune modification de la perméabilité de la membrane interne. Ainsi, tout facteur



altérant le potentiel membranaire, comme les inhibiteurs de la chaîne respiratoire ou les agents découplants, est responsable de la réversibilité de ce phénomène. Ce gonflement a été étudié grâce à l'utilisation de la valinomycine qui favorise l'entrée des ions K^+ dans la mitochondrie. L'entrée de K^+ est compensée par l'expulsion des protons par la chaîne respiratoire et donc l'augmentation du ΔpH , ce qui favorise l'entrée des ions perméants (P_i ou de l'ion acétate) qui restent piégés dans la matrice induisant une entrée d'eau et un gonflement mitochondrial. Après le gonflement, les protons rentrent de nouveau dans la matrice qui se lient aux ions perméants, ce qui permet leur sortie de nouveau et donc un dégonflement de la mitochondrie (Azzi and Azzone, 1965). Quand la mitochondrie est dé-énergisée, il se produit un gonflement passif dit « low energy swelling » ou « high amplitude swelling », qui est induit par le phosphate inorganique P_i ou le calcium. Cette augmentation de volume de la matrice, survient suite à des agressions et des altérations de la mitochondrie et peut être reversé par l'ajout de l'ATP ou le Mg^{2+} (Azzone and Azzi, 1965). Par contre si les agressions se poursuivent, le gonflement devient irréversible et cause ainsi une altération et un arrêt définitif du fonctionnement mitochondrial. Ce gonflement de large amplitude est directement engendré par l'ouverture du pore de transition mitochondriale (le PTP) (Bernardi, 1999).

2.3 Le pore de transition de perméabilité le « PTP »

L'ouverture du PTP est un phénomène de plus en plus impliqué dans différents dommages cellulaires. Sa fonction physiologique et sa composition moléculaire est toujours un grand sujet de discussion. Le pore de transition de perméabilité est défini grâce à des études électrophysiologiques comme un « canal voltage dépendent » situé dans la membrane interne de la mitochondrie



(Szabo et coll., 1992). Des études ont été réalisées dans le but de lever l'ambiguïté sur sa composition. Ces études consistaient à purifier un certain nombre de protéines (figure 5) dont les propriétés ou dont la désactivation des gènes corrèlent avec la régulation du fonctionnement du PTP. Les protéines qui ont été sujet de ces études sont : l'adénine nucléotide translocase au niveau de la membrane interne (ANT) (Schultheiss et coll., 1984, Kokoszka et coll., 2004), le canal ionique voltage dépendant au niveau de la membrane externe (VDAC) (Beutner et coll., 1996, Krauskopf et coll., 2006)... et la cyclophiline D (Cyp-D) (Halestrap and Davidson, 1990, Baines et coll., 2005). Cependant, les résultats obtenus montrent seulement l'importance de ces molécules dans la régulation du pore sans qu'elles fassent forcément partie de ce canal.

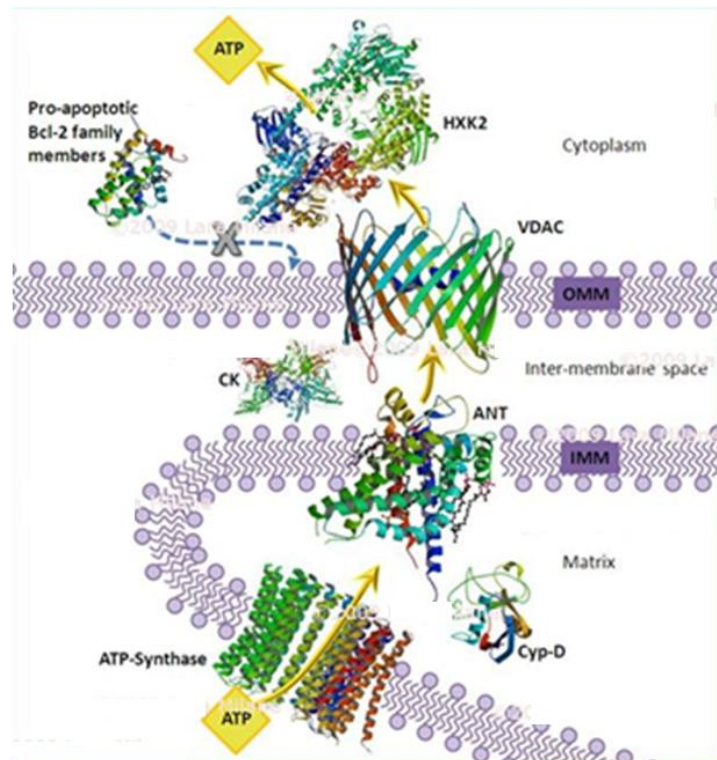


Figure 5 : Complexe protéique impliqué dans la transition de perméabilité mitochondriale.

2.3.1 *Adénine Nucléotide Translocase (ANT)*

L'adénine nucléotide translocase, est une protéine membranaire qui joue un rôle dans le transport de l'ATP et de l'ADP de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne. Le carboxyatractyloside et l'acide bongkrékiac sont des inhibiteurs de l'ANT. Ils sont aussi impliqués dans la régulation du PTP. En effet, le carboxyatractyloside qui inhibe l'ANT et la stabilise sous une conformation c (Schultheiss et coll., 1984) favorise l'ouverture du PTP, tandis que l'acide bongkrékiac qui inhibe l'ANT sous sa conformation m (Schultheiss et coll., 1984), induit la fermeture du pore. Ce rapprochement dans la régulation de l'ANT et le PTP, laisse supposer que cette protéine peut faire partie du « canal » précisément sous sa conformation c (Haworth and Hunter, 2000). Cette hypothèse est supportée par le travail de Woodfield et ses collaborateurs, qui ont montré que l'ANT est aussi liée à la cyclophiline D, celle-ci est impliqué dans la régulation du PTP (Woodfield et coll., 1998). Cependant, d'autres travaux ont remis en question cette hypothèse. En effet, d'autres protéines sensibles à la CsA autres que la CyP-D sont liées à l'ANT. De plus la liaison ANT-CyP-D est aussi présente chez le foie de rat que chez la levure, dont la perméabilité de transition n'est aucunement régulée par la CsA (Jung et coll., 1997). Aussi, il a été montré chez des souris ANT⁷⁷⁻ que le pore peut s'ouvrir suite à une activation par le Ca²⁺ et induire un gonflement mitochondrial, aussi bien que chez les souris ANT^{+/+}, la seule différence est que l'ouverture du pore chez les premiers rats nécessite plus de Ca²⁺ (Kokoszka et coll., 2004). Par conséquent l'ANT ne fait pas partie du PTP, mais joue probablement un effet indirect sur le pore en modifiant les propriétés de la membrane interne, via ses changements conformationnels (Fontaine and Bernardi, 1999).



2.3.2 *Le Canal Anionique Voltage Dépendant (VDAC)*

Le canal anionique voltage dépendant ou VDAC est une porine située dans la membrane externe de la mitochondrie. Il constitue un pont de communication entre la mitochondrie et le reste de la cellule et joue un rôle important dans la régulation des ses fonctions métaboliques et énergétiques. Le VDAC, joue un rôle clé dans l'apoptose et constitue un point de convergence des signaux de survie ou de mort cellulaire, à travers ces différents ligands et partenaires protéiques (Shoshan-Barmatz et coll.). Des études électrophysiologiques ont montré que ce canal voltage dépendent a un diamètre d'ouverture de 2,5 à 3 nm, dont l'activité est contrôlée par le Ca^{2+} et le NADH. D'autres chercheurs ont étudiés les partenaires de la CyP-D, ils ont constaté que deux autres protéines l'ANT et le VDAC co-immunoprécipitent avec la CyP-D. En présence de la CyP-D, ces deux protéines augmentent la perméabilité membranaire des liposomes aux solutés, selon un processus sensible à la CsA (Crompton et al 1998). Tous ces éléments, ainsi que l'interaction entre la membrane interne et externe de la mitochondrie au niveau du « site de contact » entre le VDAC et l'ANT, constituent des arguments logiques en faveur de l'appartenance du VDAC au canal (PTP) (Beutner et coll., 1996). Afin de confirmer cette hypothèse, des auteurs ont étudié l'effet d'un inhibiteur du PTP le Ro 68-3400 sur le VDAC dans des rats VDAC1-null et des rats wild-type. Cet inhibiteur a montré une forte affinité avec une molécule de 32 KDa qui est supposée être la VDAC1 (Cesura et coll., 2003). Cependant, le Ro 68-3400 a non seulement inhibé le PTP chez les rats VADC1-null comme chez les wild-type, mais on a pu montrer que cette protéine de 32 KDa ne correspond a aucun des trois isoformes du VDAC et ne constitue donc pas la cible de cet inhibiteur (Krauskopf et coll., 2006). Par



conséquent, l'appartenance du VDAC au complexe protéique du PTP reste discutable.

2.3.3 *La cyclophiline D (CyP-D)*

La CyP-D est une protéine de la matrice mitochondriale qui possède une activité peptidyl propyl isomérase. Cette molécule est connue pour être la cible de la CsA (Halestrap and Davidson, 1990), qui est un inhibiteur du PTP (figure 6) (Crompton et coll., 1988). En effet, la CsA inhibe le pore par modulation de la CyP-D, qui passe de la matrice à la membrane interne pour interagir avec le PTP (Connern and Halestrap, 1994). Actuellement, il n'y a pas de doute sur le fait que la cyclophiline D n'appartient pas au canal PTP. En effet, des études réalisées sur des souris KO en CyP-D, ont montré que le PTP est aussi bien présent chez les souris wild-type et que les KO en CyP-D (Ppif^{-/-}) d'une part, et d'autre part que la CyP-D n'est pas indispensable à la régulation du PTP (Basso et coll., 2005). Cependant, Baines et ses collaborateurs, ont montré que les rats KO en CyP-D, sont plus résistants à l'ouverture du PTP, puisque cela nécessite plus de Ca²⁺ que chez les wild type (Baines et coll., 2005, Nakagawa et coll., 2005). Ainsi, grâce à ces études, il est clair que même si la CyP-D ne fait pas partie du PTP, elle joue néanmoins un rôle important dans la régulation de son fonctionnement.



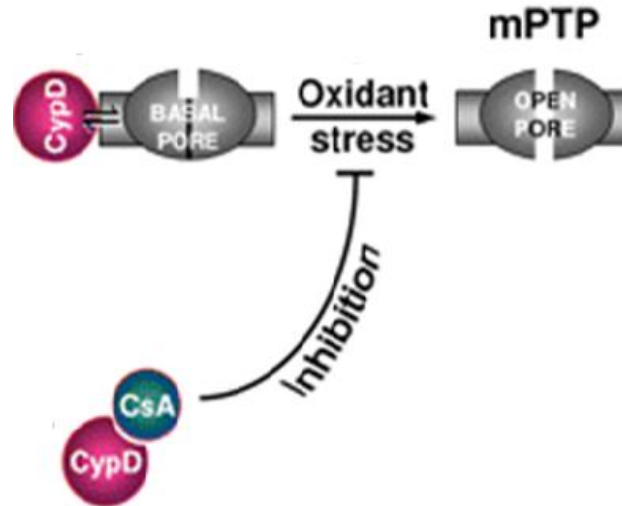


Figure 6 : Inhibition du PTP par la CsA

2.4 L'homéostasie calcique

Le calcium joue un rôle important dans la régulation du fonctionnement mitochondrial. En effet, il est impliqué dans la stimulation et le contrôle de l'oxydation phosphorylante, ainsi que la production d'ATP. Il existe une homéostasie calcique intramitochondriale qui est maintenue grâce à un équilibre de distribution entre le calcium cytosolique et matriciel on parle du cycle de calcium. Cet échange calcique est assuré grâce à un système de transport. Le calcium entre dans la mitochondrie par l'uniport de calcium (Gunter et coll., 2004). La sortie du Ca^{2+} de la mitochondrie est assurée grâce aux échanges $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (figure 7) (Gunter and Gunter, 1994, Gunter et coll., 1998). L'entrée et la sortie du calcium de la mitochondrie (cycle de Ca^{2+}) dépendent du gradient électrochimique. Ce cycle est un processus lent (moins de 1% ce calcium cytosolique entre dans la mitochondrie par seconde). Dans certaines situations



physiologiques, comme dans le cas d'augmentation des contractions cardiaques, les chercheurs ont remarqué que la vitesse du cycle peut augmenter. L'entrée du calcium est plus importante et la respiration mitochondriale est accélérée. Cependant, le rapport ATP/ADP reste stable (Denton and McCormack, 1985). Dans cette situation, l'équilibre du calcium de part et d'autre de la mitochondrie est vite rétabli, et les échanges $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sont activées dans le sens d'expulsion du Ca^{2+} . Par conséquent l'état stationnaire de distribution du Ca^{2+} se remet en place (Crompton, 1999)

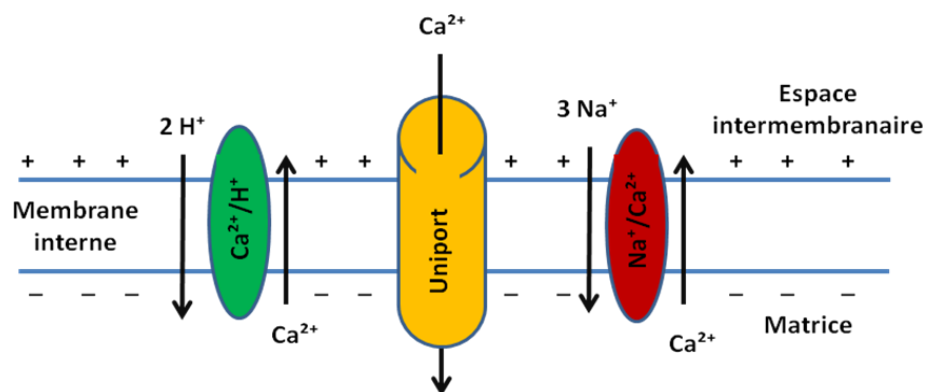


Figure 7 : Transport du calcium à travers la membrane interne.

Le transport du calcium est assuré par l'uniporteur qui permet l'entrée du Ca^{2+} dans la mitochondrie et les échanges $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ assurent sa sortie vers l'espace intermembranaire.

2.5 La perméabilité de transition est un phénomène régulé

2.5.1 Régulation ionique du PTP

Le calcium a été décrit comme étant un activateur puissant du PTP. Ce cation agit en présence de phosphate inorganique P_i dont le mode d'action reste inconnu (Hunter and Haworth, 1979b). Cependant, tous les ions bivalents n'ont pas une action d'induction du PTP, le Mg^{2+} , le Mn^{2+} , le Ba^{2+} et le Sr^{2+} sont des inhibiteurs du pore par compétition avec le Ca^{2+} (Szabo et coll., 1992).



Dans les conditions physiologiques, la distribution du Ca^{2+} entre le cytoplasme et la mitochondrie est maintenue en état stationnaire, qui peut être parfois rompu pour s'adapter aux différentes demandes de l'organisme, mais l'état stationnaire est vite rétabli. En effet, le cycle de Ca^{2+} est lent et toute augmentation occasionnelle du Ca^{2+} mitochondriale reste minime et facilement gérable. Aussi, l'augmentation du Ca^{2+} mitochondrial pourrait être corrigée par l'ouverture transitoire du PTP (flickering) qui permettrait de réguler l'échange calcique et préserver le fonctionnement cellulaire. Cependant, dans des situations pathologiques la concentration de Ca^{2+} cytosolique augmente et la concentration du Ca^{2+} mitochondrial augmente encore plus. Cependant, quand la concentration du Ca^{2+} atteint un certain seuil, on parle de « set point » (1 à $3\mu\text{M}$ de Ca^{2+} cytosolique) (Nicholls, 1978), l'échange calcique de part et d'autre de la membrane devient insuffisant, ce qui induit à une surcharge calcique. Cette augmentation énorme du Ca^{2+} matriciel s'accompagne d'une ouverture du PTP (Crompton, 1999).

2.5.2 *Régulation par le pH*

L'étude des échanges ionique entre la mitochondrie et le cytoplasme permet de mettre en évidence un autre régulateur du PTP qui est le pH. Plusieurs auteurs ont montré que le PTP s'ouvre à un pH physiologique et se ferme quand le pH de la matrice est inférieur à 7. C'est le cas l'acidose ischémique qui protège contre l'ouverture du PTP (Maddaford and Pierce, 1997) (Bernardi, 1992). Ainsi, en cas de stress, la concentration du Ca^{2+} matricielle augmente, les protons sont expulsés de la mitochondrie grâce à la chaîne respiratoire, et le pH matriciel augmente, d'où l'ouverture du PTP (Bernardi, 1992). Aussi il a été montré que la réversibilité de la protonation des résidus histidine dans la matrice, joue un rôle



dans la modification du pH et donc régule l'ouverture ou la fermeture du PTP (Nicolli et coll., 1993). Il a été suggéré que la protonation des résidus histidine est responsable du détachement de la CyP-D du PTP quand le pH de la matrice est acide. Ce détachement est empêché grâce à l'utilisation du diéthylpyrocarbonate (DPC) qui empêche la protonation de plusieurs résidus (Nicolli et coll., 1996). Ainsi, l'inhibition du PTP à pH acide pourrait s'expliquer par le détachement de la CyP-D du PTP. Cependant, cette hypothèse a été remise en cause par le travail de Basso et ses collaborateurs qui ont montré que le PTP est influencé par le pH même en absence de la CyP-D (Basso et coll., 2005)

2.5.3 *PTP et stress oxydant*

Ce canal voltage dépendent est maintenu dans les conditions physiologiques normales à l'état fermé (Bernardi, 1992). En cas de stress oxydant le PTP peut être ouvert (Zoratti and Szabo, 1995). En effet, des auteurs ont montré que l'induction du stress oxydant par un puissant pro-oxydant tBH (ter butyl hydroperoxide), est responsable de l'activation du PTP. Ils ont montré que le tBH est responsable de la délocalisation du cyt c à l'extérieur de la mitochondrie. Par conséquent, il pourrait être impliqué dans la mort cellulaire à travers l'activation du PTP, puisque le relargage de la cyt c et la mort cellulaire sont prévenus par la CsA (Detaille et coll., 2005). Une autre équipe a montré que l'oxydation du glutathion par l'interaction des résidus thiols avec l'arsénite (AsO) ou le phenylarsine (PhAsO), augmente la sensibilité du PTP au Ca^{2+} . Ce processus est indépendant de celui de l'oxydation des pyridines nucléotidiques qui active aussi le PTP quand le glutathion est maintenu à l'état réduit. Par conséquent, l'équipe a suggéré que l'ouverture du PTP est influencée par l'état redox des pyridines nucléotidiques ou du glutathion au niveau de deux sites distincts (le



site thiol « site-S » et le site pyridine nucléotide « site-P »). De plus, l'oxydation des pyridines nucléotidiques et du glutathion au même temps est responsable d'un gonflement plus important que si l'un ou l'autre est le seul à être oxydé. Par conséquent, l'oxydation des deux pools a un effet additif sur la régulation de la perméabilité de transition (Chernyak and Bernardi, 1996).

2.5.4 *Régulation par le complexe I*

Des études ont montré que le complexe I est fortement impliqué dans la régulation du PTP. L'équipe de Fontaine ont montré sur muscle squelettique que le choix des substrats joue un rôle important dans l'induction de la perméabilité de transition. En effet, quand les mitochondries sont alimentées en glutamate-malate l'activation du PTP grâce au Ca^{2+} est plus rapide qu'en succinate plus roténone, cette induction est sensible à la CsA. Cette différence observée en fonction du substrat concernant la sensibilité du PTP au Ca^{2+} , disparaît en présence d'un inhibiteur du flux d'électron. Par conséquent l'implication du complexe I dans le phénomène de perméabilité de transition serait régulée par le flux d'électrons à travers ce complexe (Fontaine et coll., 1998).

2.5.5 *Potentiel de membrane*

Plusieurs études ont montré l'importance du potentiel membranaire dans la régulation du PTP (Bernardi, 1992, Petronilli et coll., 1993)... La dépolarisation de la membrane interne est une cause majeure de l'induction du PTP (Bernardi, 1992), qui est fortement dépendante du Ca^{2+} . En effet, en présence d'un inhibiteur des canaux calciques (rouge de ruthénium), l'induction du pore est prévenue même s'il y a une chute du potentiel (Bernardi, 1992). L'ouverture du PTP peut être aussi induite par la variation de la valeur seuil du potentiel « gating potential » à laquelle le PTP est



activé. En effet, Petronilli et ses collaborateurs ont montré que les activateurs du pore comme le Ca^{2+} induisent un changement du « gating potential » vers des valeurs plus négatives ce qui induit l'ouverture du PTP alors que les inhibiteurs comme le Mg^{2+} favorise la fermeture du PTP en amenant le « gating potential » à des valeurs plus positives (Petronilli et coll., 1993).

2.6 La perméabilité de transition est un phénomène régulateur

2.6.1 Apoptose et perméabilité de transition

L'apoptose est une mort cellulaire programmée. En cas de dysfonctionnement majeur, la cellule s'autodétruit ce qui permet la survie de l'organisme. Cette mort cellulaire peut suivre deux voies : une voie extrinsèque et une voie intrinsèque (figure 8) au niveau de la mitochondrie. La voie extrinsèque est la voie des récepteurs de mort cellulaire qui stimulent l'assemblage du complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex) aboutissant à l'activation de la caspase 8 qui clive la caspase 3, qui est responsable de la protéolyse des substrats cellulaires induisant à la mort cellulaire (Crow et coll., 2004). Concernant la voie intrinsèque, la mort cellulaire est déclenchée par la rupture de la membrane mitochondriale externe et la libération dans le cytoplasme du contenu protéique de l'espace intermembranaire, suite à l'ouverture du PTP (Petronilli et coll., 1994). Parmi les protéines libérées, on distingue les protéines pro-apoptotiques : le cytochrome c, l'AIF (Apoptosis Inducing Factor), l'endonucléase G et le SMAC/DIABLO. L'endonucléase G et l'AIF sont responsables de la dégradation d'ADN, le SMAC/DIABLO se lie à l'IAP (Inhibitor Apoptosis Protein) et active comme le cytochrome c la caspase 9 (caspase initiateur) qui active à son tour la caspase 3 (caspase effectrice) qui permet de déclencher le signal de dégradation de l'ADN grâce aux endonucléases (Varecha et coll., 2009, Du et



coll., 2000). Le relargage de ces protéines est favorisé par l'insertion au niveau de la membrane externe d'un complexe pro-apoptotique Bax/Bak (Korsmeyer et coll., 2000) qui joue un rôle dans l'activation du PTP. En effet, quand la quantité d'ATP diminue, Bax passe du cytoplasme à la mitochondrie où il se fixe sur la membrane externe et induit une chute du $\Delta\Psi$ et la mort cellulaire (Saikumar et coll., 1998). L'action de Bax est contrée par les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl₂, qui se lient au VDAC et inhibent l'ouverture du PTP (Rasola and Bernardi, 2007). Petronilli et ses collaborateurs ont étudié le lien entre le potentiel membranaire et l'apoptose. Pour ce faire, ils ont suivi l'ouverture du PTP en utilisant la sonde calceine AM + CoCl₂ et le potentiel membranaire en utilisant le sonde TMRM. L'induction de la perméabilité de transition par l'utilisation de l'acide arachidonique et l'A23187 permet visualiser l'ouverture du PTP aussi bien en calceine AM CoCl₂ qu'en TMRM. Cependant, la première sonde permet de détecter une ouverture du pore très rapide (ouverture transitoire) tandis que le TMRM permet de détecter une activation plus longue du PTP, accompagnée d'une chute du potentiel membranaire. De plus, ils ont montré que l'ouverture rapide du PTP n'est pas suffisante pour déclencher l'apoptose qui nécessite une ouverture plus longue accompagnée d'une dépolarisation de la membrane (Petronilli et coll., 2001).



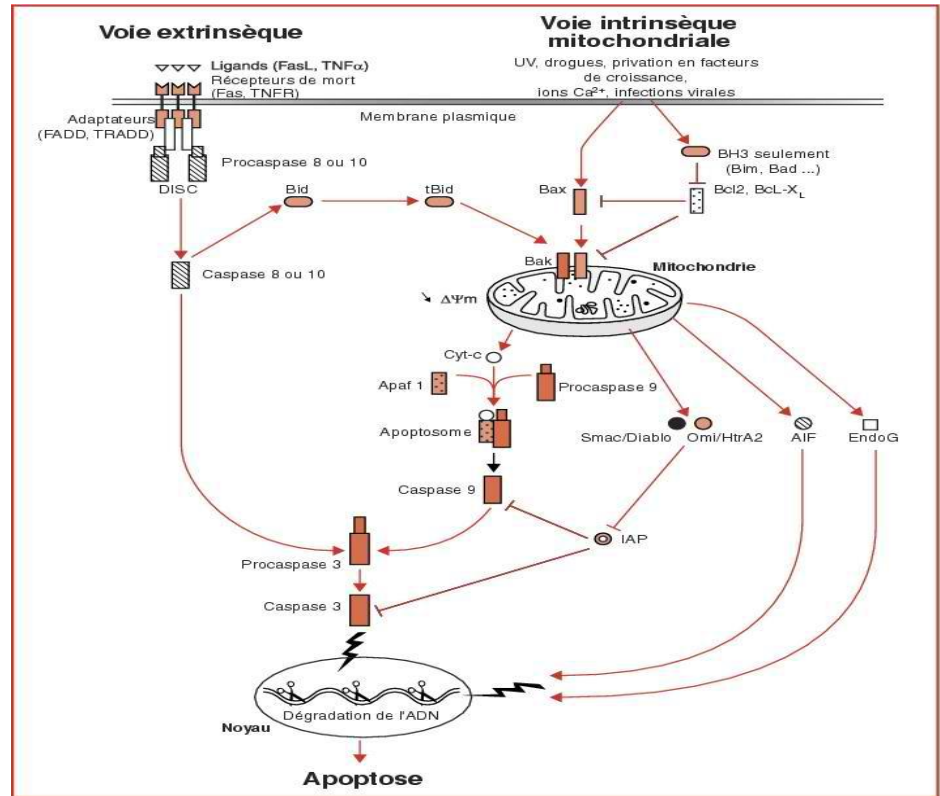


Figure 8 : schéma représentant la voie intrinsèque de l'apoptose. (Blondel B 2006)

2.6.2 *Physiopathologies liées à la perméabilité de transition*

2.6.2.1 *Pathologies du foie*

Plusieurs études ont montré l'implication du PTP dans des pathologies hépatiques. L'équipe de Soriano a étudié l'effet de la CsA sur l'hépatotoxicité sensible au TNF α causée par les lipopolysaccharides LPS et la d-Galactosamide (d-GALN). Le traitement aux LPS stimule la réponse hépatique au TNF α , le foie est alors sensibilisé à la toxicité des cellules. Par la suite, le d-GALN est utilisé afin de déclencher le processus de nécrose, ce traitement induit des dommages de foie et déclenche le processus de l'apoptose (Biburger and Tiegs, 2005). Tout d'abord, l'équipe de Seranio a montré par une mesure de la rétention calcique, que les mitochondries de foie de rat traitées à la CsA *ex vivo*, sont



plus résistantes à l'ouverture du PTP induite par le Ca^{2+} . Ensuite, ils ont déterminé la dose de CsA nécessaire pour avoir un effet maximal qui est de 5mg/Kg du poids de l'animal et que son effet dure approximativement pendant 9 heures. Ce traitement à la CsA est efficace 1 heure avant ou pendant le traitement aux LPS. Son efficacité dure jusqu'à 3 heures après le traitement aux LPS et les dommages du foie sont ainsi prévenus grâce à l'inhibition du PTP. Cependant, il n'est plus efficace au-delà de 8h de traitement, d'où l'importance de la réadministration de la CsA toutes les 10 heures pour une protection continue (Soriano et coll., 2004). Une autre étude effectuée par Klöhn et ses collaborateurs, a montré l'implication du PTP dans la régulation des pathologies hépatiques. Ils ont testé l'effet d'un hépatocarcinogène le 2-acétylaminofluorene (AAF) sur le foie en présence de LPS. Cette étude, a montré que les hépatocytes traités à l'AAF développent une résistance à l'induction du PTP et donc à l'apoptose, au bout de deux semaines seulement du traitement. Cette résistance est due à l'activation de la voie anti-apoptotique de Bcl-2 par l'AAF, qui développe une résistance des hépatocytes à la dépolarisation mitochondriale, au relargage du cyt c et donc à l'apoptose, ce qui confirme l'implication des modifications mitochondriales dans la sélection des hépatocytes résistants au cancer (Klohn et coll., 2003).

2.6.2.2

Pathologies musculaires

Parmi les pathologies musculaires liées au PTP, on cite la dystrophie musculaire congénitale d'Ulrich. C'est une maladie de dégénérescence du tissu musculaire. Bernardi et ses collaborateurs ont travaillé sur cette maladie qui consiste en une mutation du gène qui code pour le collagène VI responsable d'une faiblesse musculaire et une hyperlaxité des articulations distales. Ils ont



travaillé sur des souris Col61a mutantes en collagène de types VI. Ce modèle de souris possède des réticulums sarcoplasmiques SR dilatés dans 20 à 30% des fibres musculaires, des mitochondries endommagées et présente un phénomène d'apoptose (Irwin et coll., 2003). L'objectif de cette étude est de déterminer l'implication du PTP dans cette maladie. Pour cela, ils ont d'abord mesuré le potentiel membranaire en utilisant le TMRM. Cette mesure a montré qu'il n'y a aucune différence entre les souris Col61a null et les wild types (WT) et donc le potentiel n'est pas affecté par la perte du collagène VI. Cependant, suite à l'utilisation de l'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase), ils ont remarqué que les souris Col61a null subissent une dépolarisation contrairement aux WT et que cette dépolarisation est prévenue par la CsA. Ils ont expliqué ces résultats par un flickering du PTP (ouverture rapide et brève du PTP) qui induit un faible relargage des nucléotides pyridiniques à l'extérieur de la mitochondrie, ce qui perturbe la respiration mitochondriale et active l'ATP synthase dans le sens de formation de l'ADP. L'ADP généré inhibe le PTP et restaure donc le potentiel membranaire et la respiration mitochondriale. Cependant, si le flickering est plus long et fréquent, l'apoptose peut avoir lieu induisant la mort des fibres musculaires (figure 9) (Bernardi and Bonaldo, 2008). La dépolarisation avec l'oligomycine, pourrait s'expliquer aussi par l'ouverture du PTP suite à une surcharge calcique dans la matrice puisque la dilatation du SR diminue sa capacité à capter le Ca^{2+} (Milanesi et coll., 2006). Par conséquent, la mitochondrie joue un rôle important dans la régulation des myopathies via la régulation de la perméabilité de transition.



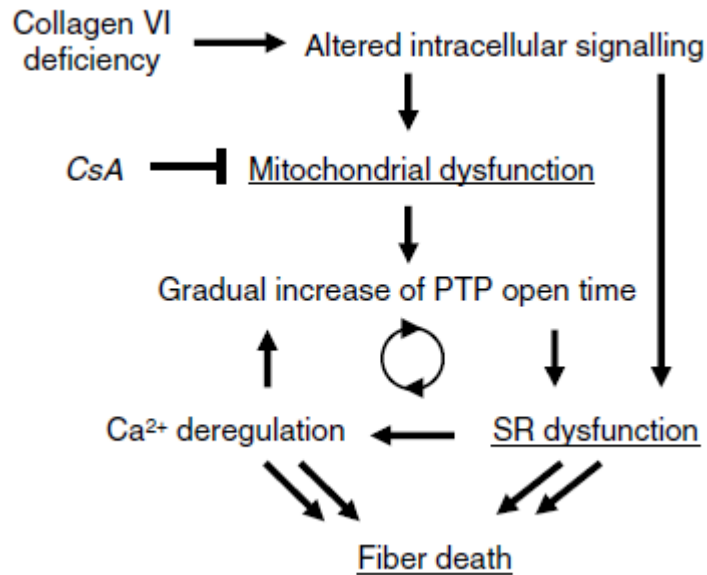


Figure 9 : Schéma de la voie d'apoptose dans la myopathie musculaire (Bernardi 2008)

2.6.2.3 Neurotoxicité et PTP

Plusieurs études ont déterminé le rôle de la régulation du PTP dans les maladies neurodégénératives (Thomas et coll., Berman and Hastings, 1999)... Vanderluit et ses collaborateurs ont étudié l'effet du PTP dans les dommages du neurone moteur suite à une axotomie qui provoque la mort des neurones chez les rats nouveaux nés mais pas chez les adultes. Tout d'abord ils ont regardé la localisation du cytochrome c au niveau de la mitochondrie chez des neurones endommagés par rapport aux contrôles non axotomisés. Le double marquage de la cytochrome c et du cytochrome oxydase Cox IV a révélé une diffusion du marquage cytochrome c chez les neurones endommagés alors que le marquage reste localisé au niveau de la mitochondrie à proximité du Cox IV chez le contrôle, d'où l'importance de la sortie du cytochrome c de la mitochondrie dans le processus d'apoptose. Ensuite ils ont déterminé les étapes d'apoptose chez les neurones moteurs d'un rat nouveau né par rapport à un adulte (contrôle) et dans quel ordre elles se



déclenchent. Ils ont constaté que tout d'abord il y a sortie du cytochrome c de la mitochondrie. Le cytochrome c active la caspase 3 qui à son tour induit une dégradation d'ADN des neurones. Ces dommages sont prévenus par l'utilisation de la CsA ou de l'acide bongkrélic (inhibiteur de l'ANT), ce qui prouve l'implication du PTP dans ce type de dommages chez le nouveau né (Vanderluit et al 2003).

2.6.2.4 Ischémie reperfusion et PTP

Plusieurs études ont déterminé le rôle majeur du PTP dans les lésions d'ischémie reperfusion dans différents tissus ((Friberg et coll., 1998) (Kristian and Siesjo, 1998) (Bernardi et coll., 2006) (Di Lisa et coll., 2001).... Ce paragraphe sera plus détaillé dans le chapitre suivant.

3 Ischémie/Reperfusion

3.1 Ischémie

L'ischémie peut se définir comme un arrêt ou une insuffisance de l'apport sanguin dans un tissu ou dans un organe. Cette insuffisance ne concerne pas seulement l'apport en oxygène, mais aussi celui des substrats et des produits du métabolisme. La glycolyse anaérobie se met alors en place, mais son apport énergétique reste insuffisant (Kubler and Spieckermann, 1970). L'ischémie peut être due à une compression artérielle ou à une présence d'un caillot sanguin qui vient se bloquer dans une zone artérielle déjà rétrécie. C'est notamment le cas de l'athérosclérose. L'ischémie peut se manifester aussi en cas d'accident vasculaire cérébral ou un infarctus de myocarde. L'ischémie peut être réversible et ne causer qu'une gêne limitée, cependant elle peut être irréversible et induire un infarctus de l'organe en question. Les tissus les plus sensibles à l'ischémie et les plus étudiés sont le cerveau et le cœur.



3.1.1 *Conséquences de l'ischémie sur la chaîne respiratoire*

Plusieurs études ont rapporté l'effet de l'ischémie sur la respiration mitochondriale. L'intensité des dommages sur la chaîne respiratoire, dépend de la durée de l'ischémie (Jennings, 1976) (Veitch et coll., 1992). Ainsi, une ischémie brève (\leq à 10 minutes) peut être réversible. Cependant, au-delà de 10 min les conséquences sont de plus en plus graves voir même irréversibles à 60 min d'ischémie. En effet, la mitochondrie peut subir des changements structuraux comme la désorganisation des crêtes ou le gonflement mitochondrial (Jennings, 1976). Des perturbations de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire peuvent avoir lieu. En effet, à partir de 10 à 20 min d'ischémie, l'activité du complexe I diminue (Rouslin and Ranganathan, 1983) (Sadek et coll., 2004). Cette diminution est de 25% et est associée à une baisse de 24% de la respiration à l'état 3 (Paradies et coll., 2004). Cette perturbation peut être due à la dégradation des cardiolipines nécessaires à l'activité du complexe I (Fry and Green, 1981) par peroxydation de leurs chaînes en acide gras par les espèces réactives de l'oxygène (Paradies et coll., 2004). Plus l'ischémie se poursuit, plus le complexe I est endommagé, et la perturbation atteint les complexes en aval (Chen et coll., 2007). En effet, au-delà de 45 min, l'activité des complexes III et IV peut être altérée (Veitch et coll., 1992). Quant à l'activité du complexe II, elle reste stable pendant l'ischémie (Rouslin and Ranganathan, 1983, Veitch et coll., 1992). Concernant le complexe V ou ATP synthase, des chercheurs ont montré que pendant l'ischémie l'activité de l'ATPase passe de la synthèse à l'hydrolyse de l'ATP. Par conséquent le contenu en ATP diminue ainsi que l'activité de l'organe en question. Plusieurs études ont montré que l'utilisation de l'oligomycine (Inhibiteur de l'ATPase) ou du BMS199264 (Inhibiteur de la seule activité hydrolase de l'ATPase) prévient la



perte d'ATP pendant l'ischémie et protège les fonctions mitochondriales (Rouslin et coll., 1990, Jennings et coll., 1991, Grover et coll., 2004) Ainsi, pendant l'ischémie la chaîne respiratoire est ralentie, et la production d'ATP diminue ce qui perturbe le fonctionnement mitochondrial.

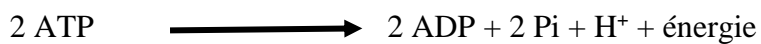
3.1.2 Production de ROS pendant l'ischémie

La mitochondrie est une source importante de production de ROS. Moins de 2% de l'oxygène entrant dans la mitochondrie sont destinés à être transformés en ROS. Pendant l'ischémie le fonctionnement mitochondrial est ralenti et l'activité des deux principaux sites de production de ROS (complexes I et III) est affaiblie, ce qui laisse supposer que la production de ROS diminue pendant l'ischémie. Cependant, et paradoxalement des études ont montré que la mitochondrie est la première source de production de ROS pendant l'ischémie. La production de ROS a été mesurée grâce à une sonde dont la fluorescence augmente pendant l'ischémie. Par conséquent, la production de ROS augmente pendant cette phase (Becker et coll., 1999). Cette production de ROS est due à l'oxygène résiduel durant l'ischémie. En effet, la production de ROS a diminué pendant l'ischémie suite à l'utilisation de pièges à oxygène. Par conséquent, les effets secondaires de l'ischémie sur la viabilité de l'organe en cause diminuent aussi (Vanden Hoek et coll., 1997, Becker et coll., 1999). Becker et ses collaborateurs ont montré aussi grâce à l'utilisation des inhibiteurs de la chaîne respiratoire (roténone et myxothiazol) que les ROS sont produits au niveau du complexe I et du complexe III et que ce dernier est la principale source de ROS pendant l'ischémie (Becker et coll., 1999).



3.1.3 *Ischémie et les échanges ioniques*

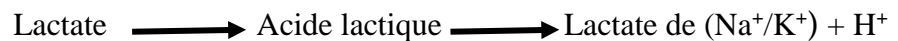
Pendant l'ischémie, la production de l'ATP diminue. Par conséquent, la glycolyse anaérobie est activée (Allen and Xiao, 2003). Le bilan de cette activation est le suivant :



Le lactate produit dans la cellule est ensuite transféré dans le milieu extracellulaire :

Acidification

Hydrolyse



Les ions H^+ produits dans cette réaction, et résultant de l'hydrolyse de l'ATP, sont responsables d'une baisse du pH intracellulaire, par conséquent, il se produit un phénomène d'« acidose », qui s'installe dans les 10 premières minutes de l'ischémie (Neely and Grotyohann, 1984). L'augmentation de la concentration des ions H^+ induit une activation de la pompe Na^+/H^+ dans le sens d'expulsion de protons, ce qui a pour conséquence l'augmentation de la concentration intracellulaire des ions Na^+ . Pour compenser cette hausse en sodium, l'échange $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est activé dans le sens d'expulsion de Na^+ , ce qui est responsable d'une augmentation de la concentration calcique cytosolique et donc, de la hausse de la concentration du calcium intramitochondrial (Riess et coll., 2002, Allen and Xiao, 2003)

Les effets secondaires des accidents d'ischémie, n'apparaissent pas pendant la période d'ischémie mais plutôt au moment de la reperfusion. Cependant, les modifications



métaboliques et ioniques qui ont lieu pendant l'ischémie, favorisent les dommages observés pendant la reperfusion.

3.2 Reperfusion

Lorsqu'une athérosclérose provoquant une obstruction des artères se produit par exemple, l'urgence médicale est de rétablir le flux sanguin. Cette opération permet de réapprovisionner le tissu ou l'organe en question en oxygène et en substrats. On parle de « reperfusion ». Cependant et paradoxalement, le rétablissement du flux sanguin au niveau de l'organe, s'accompagne d'effets secondaires dans les premières minutes de la reperfusion dont la gravité dépend de la durée et des modifications métaboliques de l'ischémie. En effet, des travaux ont montré que malgré le rétablissement des conditions physiologiques (oxygène et substrats), l'organe ayant subi l'ischémie a des difficultés de réutiliser l'oxygène correctement puisque la consommation post-ischémique de l'oxygène est plus faible que la normale (Murphy et coll., 1975). En plus, si la période d'ischémie est longue, les dommages qui en résultent deviennent irréversibles, même après de longues périodes de reperfusion (Kane et coll., 1975).

3.2.1 *Reperfusion et modifications structurales et fonctionnelles de la mitochondrie*

Des auteurs ont observé que les cellules du myocarde subissent pendant l'ischémie un léger gonflement qui devient de plus en plus important après 20 minutes de reperfusion (Kloner et coll., 1974). Cette observation est confirmée par d'autres chercheurs qui ont remarqué qu'après de longues périodes d'ischémie, les mitochondries subissent des changements structuraux. En effet, ils ont remarqué que l'espace et la densité matriciels augmentent. L'augmentation de la densité de la matrice, peut être due à une accumulation de substances lipidiques ou du



calcium pendant la reperfusion à l'intérieur de la mitochondrie (Kloner et coll., 1974) (Jennings, 1976).

D'autres changements apparaissent pendant la reperfusion et influencent le fonctionnement de la chaîne respiratoire. En effet, des chercheurs ont montré que le complexe I qui était inhibé pendant l'ischémie, retrouve 80 à 85% de son activité pendant la reperfusion. Quant à l'activité de la cytochrome oxydase, elle reste inchangée pendant la reperfusion (Maklashina et coll., 2002). Après de longues périodes d'ischémie, le taux de respiration mitochondriale diminue à la reperfusion (Veitch et coll., 1992) et une grande quantité de l'oxygène présent se transforme en ROS. La diminution de la respiration mitochondriale est moindre par rapport à celle enregistrée pendant la reperfusion, quand elle est mesurée juste après la période d'ischémie. Ceci indique que la reperfusion apporte d'autres dommages fonctionnels à la mitochondrie, qui sont dus à la diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, notamment celle des complexes I et III après une ischémie sévère (Veitch et coll., 1992). Concernant la synthèse d'ATP, plusieurs auteurs ont montré que la production des nucléotides adényliques ne s'améliore pas pendant la reperfusion (Vial et coll., 1982, Silverman et coll., 1982) et que le ratio ADP/O quant à lui diminue (Lesnefsky et coll., 2004). Par conséquent, les modifications qui apparaissent pendant la reperfusion, ne sont pas en faveur du rétablissement du bon fonctionnement mitochondrial.

3.2.2

La production de ROS pendant la reperfusion

Myers et ses collaborateurs ont montré que les dommages induits par le phénomène d'ischémie / reperfusion sont en partie dus à la production de ROS. Ils ont montré que l'utilisation de certaines enzymes à propriétés anti-oxydantes telles : la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase pendant l'ischémie, prévient les



lésions et perturbations fonctionnelles induite par l'ischémie / reperfusion. Par conséquent, les ROS sont impliqués dans l'apparition de ces effets secondaires (Myers et coll., 1985). Ce résultat a été confirmé par une autre étude qui non seulement a prouvé l'implication des ROS dans les dommages associés à l'ischémie / reperfusion, mais a montré aussi que la production de ROS commence à l'ischémie puis s'accroît pendant la reperfusion et dure pendant 3 heures après la réoxygénation (Bolli, 1988). En plus cette étude a montré que la gravité des dommages induits par les ROS dépend de l'importance de la période d'ischémie (Bolli, 1988). La même équipe a montré plus tard que les ROS impliqués dans ces dommages sont principalement les ions hydroxyles (OH^\cdot). Leur production augmente pendant les premières secondes de la reperfusion. Par conséquent les perturbations fonctionnelles qui en résultent ne peuvent être prévenues par les antioxydants que s'ils sont utilisés pendant l'ischémie ou juste avant la reperfusion (Bolli et coll., 1989). Cette augmentation de la production de ROS pendant la reperfusion, peut s'expliquer par la transformation d'une grande partie de l'oxygène directement en ROS. En effet, l'accumulation des équivalents réduits pendant l'ischémie consécutive au ralentissement de la chaîne respiratoire, la baisse du rapport ADP/O pendant la reperfusion en plus de la diminution des pièges à ROS (Julicher et coll., 1984) sont responsables d'un transfert direct des électrons sur l'oxygène et donc une augmentation de la production de radicaux libres (Baker and Kalyanaraman, 1989). Ambrosio et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition du complexe I (l'amobarbital de sodium) prévient cette accumulation des ROS pendant la reperfusion. Ils ont alors suggéré que la production de ROS se fait principalement au niveau du site I de la chaîne respiratoire pendant la reperfusion (Ambrosio et coll., 1993). Cependant, ce travail est discutable. En effet, en présence de



substrat pour le complexe I (glutamate / malate), l'inhibition de ce site I de la chaîne respiratoire (roténone) est responsable de l'augmentation de la production de ROS. Alors qu'en présence de substrat du complexe II (succinate), l'inhibition du complexe I est responsable d'une diminution de la production de ROS. Par conséquent, l'inhibition du complexe I n'induit pas automatiquement une diminution de la production de ROS, cela dépend fortement des substrats de la chaîne respiratoire utilisés (Batandier et coll., 2006).

3.2.3 *Les échanges calciques à la reperfusion*

La reperfusion joue un rôle important dans la correction de l'acidose qui s'installe pendant l'ischémie. Plusieurs auteurs ont montré l'implication de l'échange Na^+/H^+ dans cette correction (Argaud and Ovize, 2000). En effet, dès les premières secondes de la reperfusion l'échange Na^+/H^+ est activée (Maddaford and Pierce, 1997) dans le sens d'expulsion des protons de la cellule, de ce fait, la concentration intracellulaire de Na^+ augmente. Cette accumulation de Na^+ active à son tour l'échange $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dans le sens inverse c'est à dire que l'échange $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est favorisé dans le sens des potentiels membranaires les plus négatifs (Varadarajan et coll., 2001). Il en résulte une entrée massive du Ca^{2+} dans la cellule puis dans la mitochondrie (Lazdunski et coll., 1985, Maddaford and Pierce, 1997). L'ensemble de ces échanges permet de corriger l'acidose ischémique par une augmentation du pH. En contre partie, une surcharge calcique mitochondriale s'installe à cause de la défaillance du mécanisme d'échange de Ca^{2+} ATP dépendant ($\text{K}^+-\text{K}(\text{ATP})$) (Varadarajan et coll., 2001), la concentration calcique intramitochondriale reste élevée, ce qui est selon plusieurs auteurs la cause principale des dommages de l'ischémie reperfusion (Jennings et coll., 1985, Shen et coll., 1972). Pour cela, le contrôle



du fonctionnement des pompes d'échanges ioniques constitue une cible intéressante de plusieurs études, afin de prévenir l'accumulation du calcium pendant la reperfusion. Plusieurs chercheurs dont Maddaford et Pierce ont montré que l'inhibition de l'échange Na^+/H^+ avant ou à la reperfusion, protège contre les dommages de l'ischémie / reperfusion. Kowaltowski a montré que l'activation pharmacologique de l'ouverture du canal $\text{K}(\text{ATP})$ a aussi un effet protecteur contre les dommages fonctionnels et métaboliques mitochondriaux et permet de restaurer le contenu en ATP et protéger la structure de la mitochondrie (Cavero et coll., 1995, Kowaltowski et coll., 2001).

3.3 Exemple de l'implication pathologique de l'ischémie / reperfusion

L'ischémie est un état pathologique qui est responsable d'une diminution des apports en oxygène et en substrats d'un tissu ou d'un organe, perturbant son bon fonctionnement. En effet, en cas d'ischémie il se produit un déséquilibre métabolique (le contenu en ATP diminue et lactate s'accumule), qui peut être responsable de dommages implorants et irréversibles, si l'ischémie dure trop longtemps. L'une des plus importantes pathologies causée par l'ischémie, est l'infarctus de myocarde.

En effet l'infarctus du myocarde est la première cause de mortalité dans le monde. Cette pathologie consiste en une nécrose d'une partie du muscle cardiaque, causée par le rétrécissement d'artères coronariennes importantes irrigant cette partie. Ceci se traduit par des douleurs thoraciques dues au défaut de contraction des cardiomyocytes lorsqu'ils sont en ischémie. L'urgence médicale alors, est de rétablir le flux sanguin « reperfusion » dans la ou les artères obstruées par intervention chirurgicale. Cependant



– et paradoxalement- ce phénomène de reperfusion peut être accompagné de dommages et d'effets indésirables.

C'est en 1935 qu'un effet paradoxal de la reperfusion du myocarde ischémique a été rapporté pour la première fois (Tennant et Wiggers., 1935). Tennant et Wiggers, ont remarqué que le rétablissement du flux sanguin dans une artère coronaire occluse chez le chien, est accompagné d'effets indésirables et de perturbations fonctionnelles cardiaques. Ces perturbations liées à la reperfusion sont appelées « syndromes de reperfusion », qui peuvent se manifester sous forme d'arythmie ventriculaires, de sidération cardiaque et de nécrose des cardiomyocytes (Bolli., 1991).

Les arythmies cardiaques commencent dès les premières 30 secondes de reperfusion (Manning et coll., 1984). Elles sont principalement dues au stress oxydant qui est responsable de la perturbation de l'équilibre ionique. Par conséquent, il se produit des perturbations dans l'activité électrique cardiaque (potentiel d'action) suite à l'accumulation de calcium (Bolli., 1991, Opie., 1989). La sidération myocardique (myocardial stunning) est un dysfonctionnement contractile qui est réversible quelques heures ou quelques jours après la reperfusion. Ce trouble est principalement du à l'accumulation des ROS qui peuvent interagir avec certaines protéines contractiles, cette interaction diminue la sensibilité des myofibrilles au calcium, ce qui perturbe l'activité mécanique responsable de la contraction du ventricule (Heyndrickx et coll., 1975).

Parmi les perturbations liées au phénomène de reperfusion, il existe un phénomène dit de « non reflux ». En effet après la revascularisation, la région ischémique d'intérêt reste faiblement reperfusée. Ce phénomène peut être du à des dommages



microvasculaires, des agrégations de microvaisseaux par des plaquettes ou des contractions ischémiques du myocarde faisant pression sur les artères coronaires. Une étude sur le myocarde de ventricule gauche de chien, a montré que ce tissu reste faiblement reperfusé après une ischémie de 90 minutes, alors que la reperfusion. Cela veut dire que plus la durée de l'ischémie est longue, moins la reperfusion est efficace puisqu'une ischémie prolongée induit à des dommages tissulaires importants qui deviennent irréversibles (Kloner et coll., 1996)

3.4 Ischémie / reperfusion et PTP

Le phénomène de reperfusion a plusieurs conséquences : un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, une déplétion en ATP, une accumulation des ROS et une surcharge calcique. Cependant, l'étendue de ces conséquences n'est observée à l'échelle du tissu ou de l'organe qu'après l'ouverture du pore de perméabilité de transition. L'ouverture du PTP semble être un élément déclencheur de phénomène de mort cellulaire qui est responsable de la dégradation du tissu ayant subi une ischémie. Plusieurs études ont montré l'implication du PTP dans les dommages induits par l'ischémie reperfusion. Tout d'abord ce lien a été supposé dans la fin des années 80 quand Crompton et ses collaborateurs ont étudié la régulation du PTP par le calcium et l'accumulation de celui-ci à la reperfusion (Crompton and Costi, 1990, Crompton et coll., 1987). L'accumulation du calcium dans la matrice est l'une des principales conséquences de la reperfusion. Elle est accompagnée d'une baisse en ATP. En tenant compte de la faible vitesse de sortie du Ca^{2+} par rapport à sa vitesse d'entrée, les échanges de Ca^{2+} pourraient être inefficaces. Dans ce cas, l'évacuation de la surcharge calcique serait assurée par une autre voie, qui permet l'évacuation rapide d'une grande quantité de Ca^{2+} , probablement



l'ouverture du PTP (Crompton, 1999). L'implication du PTP dans le phénomène d'ischémie reperfusion, a été largement étudiée par d'autres auteurs dans le cadre de certaines pathologies dont les maladies cardiovasculaires. Griffiths et ses collaborateurs ont montré que le PTP s'ouvre à la reperfusion. Ils ont montré que 2-deoxy 3(H) glucose (3 HDOG) (qui ne rentre dans la mitochondrie que si le PTP est ouvert) rentre dans la mitochondrie à la reperfusion (Griffiths and Halestrap, 1995). Cependant, ce résultat peut être remis en cause, puisque l'entrée du 3 HDOG n'est pas prévenue par la CsA. L'équipe de Kato par exemple ont montré que l'inhibition de l'expression de la CyP-D par si-RNA est associée une radioprotection contre les dommages de la reperfusion, d'où l'implication du PTP (Kato et coll., 2009). Ainsi l'implication de PTP dans les altérations associées à la reperfusion constitue une piste intéressante afin de mieux définir le fonctionnement du pore, les conséquences de son ouverture et surtout comment la prévenir afin protéger le tissu étudié contre les lésions de l'ischémie / reperfusion.

3.4.1 Conséquences d'ouverture du PTP

L'ouverture du PTP n'est pas associée seulement à des phénomènes de lésions graves et sévères. Le pore peut s'ouvrir transitoirement afin d'évacuer des ions comme le calcium et rétablir un équilibre osmotique de part et d'autre de la membrane mitochondriale (Crompton, 1999). Dans le cas d'une ischémie prolongée et sévère, l'ouverture du PTP est définitive et responsables de dommages irréversibles. L'accumulation brutale du Ca^{2+} pendant le reperfusion active l'ouverture du PTP ce qui permet d'établir un équilibre des molécules $\leq 1500\text{Da}$ de part et d'autre de la membrane interne (Gomez et coll., 2009). Cependant, l'accumulation d'ions et de molécules $< 1500\text{Da}$ exerce une



pression osmotique qui est responsable d'une entrée d'eau et du gonflement mitochondrial, donc la rupture de la membrane externe. Par conséquent, le potentiel membranaire s'effondre, la phosphorylation oxydative se découple et l'ATP synthase s'active dans le sens de dégradation de l'ATP. La rupture de la membrane externe permet le relargage de plusieurs molécules mitochondriale dans le cytoplasme. Tout d'abord, Di Lisa et ses collaborateurs ont montré que suite à l'activation du PTP, le NAD^+ est relargué puis hydrolyser par la NAD^+ glycohydrolase localisée à l'extérieur de la matrice. Le contenu en NAD^+ chute alors considérablement à la reperfusion et cette diminution est prévenue par la CsA. Par conséquent, le contenu mitochondrial en NAD^+ pourrait être régulé par de le PTP (Di Lisa et coll., 2001). Ensuite, d'autres molécules contenues dans l'espace matriciel peuvent être aussi relarguées. En effet, des facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c sont libérés (Gomez et coll., 2009), ils déclenchent à leur tour la cascade des caspases pour aboutir à la mort cellulaire. L'ouverture du PTP peut induire cette mort cellulaire par apoptose ou par nécrose. En effet, des travaux ont montré que le type de mort cellulaire dépend du contenu mitochondrial en ATP. L'équipe de Leist ont montré qu'en présence d'un inhibiteur de la chaîne respiratoire (NO), la mort cellulaire se fait plutôt par nécrose, suite à la diminution du contenu d'ATP (Leist et coll., 1999). D'autres chercheurs ont montré que la régénération d'ATP par la glycolyse après la reperfusion prévient la nécrose et la mort cellulaire se fait par apoptose (Kim et coll., 2003). Ainsi, en cas de pathologie et en présence d'ATP, la mort cellulaire se fait par apoptose, sinon, en cas de faible teneur en ATP c'est la nécrose qui l'emporte



3.4.2 *Prévention de l'ouverture du PTP*

Plusieurs études ont montré l'efficacité de la cyclosporine A dans l'inhibition du PTP et donc la protection des tissus contre les dommages de l'ischémie /reperfusion. Plusieurs molécules pharmacologiques ont été étudiées dans ce même objectif et toutes celles qui inhibent soit l'ouverture du pore (CsA ou NIM811) ou les processus en amont de l'activation du PTP comme la surcharge calcique (Amiloride inhibiteur de la pompe Na^+/H^+) ou la production de ROS (Catalase...) ont prouvé leur efficacité pour prévenir ces lésions tissulaires (Broekemeier et coll., 1989, Maddaford and Pierce, 1997, Myers et coll., 1985, Waldmeier et coll., 2002). Cependant, il existe d'autres moyens non pharmacologiques qui peuvent prévenir l'ouverture du PTP dans les phénomènes d'ischémie / reperfusion, le pré-conditionnement et le post-conditionnement.

3.4.2.1 *Le phénomène de pré-conditionnement*

Le phénomène de pré-conditionnement a été décrit la première fois en 1986 par l'équipe de Murry. Ils ont remarqué que de courtes séquences d'ischémie (pas plus de 10min) ne provoquaient pas de grosses pertes en ATP, et c'est ainsi qu'ils ont postulé que des épisodes brefs et répétés d'ischémie avant la phase d'ischémie prolongée, auraient un effet protecteur sur le myocarde (Murry et coll., 1986). Cependant, le mécanisme d'action du pré-conditionnement n'était pas encore connu. D'autres chercheurs ont montré par la suite que le canal ATP dépendant $\text{K}(\text{ATP})$ peut être impliqué dans la régulation du pré-conditionnement (Fry and Green, 1981, Gross and Fryer, 1999). Ils ont montré que l'activation du canal potassique provoque une dépolarisation membranaire et inhibe l'accumulation du calcium et protège le cœur de l'ouverture du PTP (Murata et coll., 2001). Donc, le pré-



conditionnement aurait un effet sur le PTP et cela a été confirmé par une étude qui montre que le pré-conditionnement suit le même mode d'action que la CsA et que leur action sur le pore n'est pas plus importante quand ils sont utilisés au même temps, donc le pré-conditionnement est un moyen de régulation du PTP (Argaud et coll., 2004).

3.4.2.2 Le phénomène de post-conditionnement

Le phénomène de post-conditionnement a été testé par l'équipe de Zhao en 2003. Ils ont voulu regarder si des épisodes brefs et répétés après la phase prolongée d'ischémie « post-conditionnement » ont un effet protecteur dans le cadre d'infarctus du myocarde, comme celui observé à l'issue du pré-conditionnement. En effet, ils ont montré que le post-conditionnement diminue aussi bien que le pré-conditionnement la taille de l'infarctus et qu'il peut être appliqué cliniquement chez les patients dont le cœur présente des dommages liés à la reperfusion (Zhao et coll., 2003). Ce mode de prévention est comme le pré-conditionnement impliqué dans la régulation du PTP (Argaud et coll., 2004). Cependant le post-conditionnement prévient l'ouverture du PTP sans prévenir l'accumulation du Ca^{2+} mitochondrial, contrairement au pré-conditionnement où la surcharge calcique est prévenue, par conséquent, il est probable que le post-conditionnement exerce son effet en désensibilisant le PTP au Ca^{2+} (Argaud L et al 2008).

3.4.3 *Mesure de la perméabilité de transition*

Afin de mieux comprendre les relations de cause à effet entre l'effondrement du potentiel membranaire et l'activation du PTP, une méthode a été développée afin de mesurer l'ouverture du pore dans la cellule vivante. Tout d'abord, pour mesurer le



potentiel il existe une sonde TMRM (Tetra Methyl Rodhamine Methylester) qui s'accumule dans la matrice grâce à sa charge positive (la matrice étant chargée négativement) et dont la distribution est contrôlée par l'équation de Nerst. Le $\Delta\Psi$ est dépendant de l'équilibre ionique de part et d'autre de la membrane. Par conséquent, toute modification de cet équilibre induit parallèlement une variation du $\Delta\Psi$ et de la distribution de la sonde. Ainsi le changement de fluorescence du TMRM est directement proportionnel au $\Delta\Psi$ (Scaduto et coll., 1999). Ensuite pour mesure l'ouverture du pore, la AM calceine (Acéto Methoxy ester calceine) qui peut entrer dans la cellule après sa dissociation du groupement ester grâce à l'hydrolyse du groupement AM par les estérases intracellulaires est utilisée. Afin de distinguer la calceine mitochondriale de celle cytosolique dans une cellule vivante, le cobalt (CoCl_2) qui ne rentre pas dans la mitochondrie est utilisé. Le cobalt interagit avec la calceine qui perd alors sa fluorescence donc seule la calceine dans la mitochondrie fluoresce. Ainsi, la fluorescence de la sonde diminue après l'ouverture du PTP puisque le cobalt rentre dans la mitochondrie et interagit avec la sonde (Petronilli et coll., 1999). Cependant, l'inconvénient de cette technique est qu'elle ne nous permet pas de distinguer entre l'ouverture définitive et transitoire.

Une autre mesure peut être utilisée pour mettre en évidence l'ouverture du PTP dans la cellule vivante. L'activation du PTP est accompagnée par une chute du potentiel membranaire et un relargage du NADH matriciel (Fontaine et coll., 1998) et NAD^+ qui est ensuite réduit par la NAD^+ glycohydrolase. Le niveau d'oxydo-reduction du couple $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$ est accessible directement grâce à une propriété intrinsèque du $\text{NADH}+\text{H}^+$. Le noyau pyrimidique réduit est en effet capable de subir une transition électronique à des longueurs d'ondes utilisables ($\lambda_{\text{excitation}} = 345$



nm, $\lambda_{\text{émission}} = 455 \text{ nm}$) ce qui fait du NADH un chromophore naturel dont la fluorescence décroît lors de son oxydation. Ainsi, grâce à l'autofluorescence du NADH et l'utilisation du TMRM on peut déterminer si le PTP est activé ou pas et indiquer le moment de son ouverture qui se caractérise par une chute de la fluorescence du TMRM et une augmentation de celle du NADH à l'extérieur de la mitochondrie (Dumas et coll., 2009).



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

OBJECTIFS



Objectifs

Le pore de perméabilité de transition est impliqué dans différentes pathologies. Plusieurs études se sont intéressées à l'étude du PTP et la compréhension de son fonctionnement. Certains travaux ont porté sur sa structure, d'autres se sont intéressés à l'étude sa régulation. Plusieurs chercheurs ont mis en évidence différents processus qui régulent l'ouverture du PTP (activation ou inhibition) et ont montré leur effet sur la prévention ou la correction de différents dysfonctionnements ou pathologies. Cependant son fonctionnement physiologique n'est toujours pas bien compris. Dans notre travail, nous avons voulu visualiser l'ouverture du PTP pour la première fois, dans des conditions d'ischémie/reperfusion. De plus nous avons voulu étudier l'implication de la régulation du PTP dans le phénomène d'ischémie. Nous avons travaillé sur deux modèles cellulaires : cellules intactes et cellules perméabilisées (HMEC-1 et INS-1).



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

MATERIEL ET METHODES



Matériel et méthodes

1 Culture cellulaire

1.1 Conditions de culture cellulaire

Toutes les manipulations sont réalisées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire vertical. Les cellules sont mises en culture dans une étuve à atmosphère humidifiée contrôlée enrichie à 5 % de CO₂ et maintenue à 37°C. Tous les milieux de cultures et de rinçage sont placés au préalable à 37°C afin d'éviter un stress cellulaire. Les cellules ont été maintenues en phase de croissance exponentielle par repiquage selon leur vitesse de croissance.

Les cellules endothéliales immortalisées HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cell) sont cultivées dans du milieu complet MCDB 131 supplémenté avec 15% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 2 mM L-glutamine, 50 IU/mL pénicilline, 50 µg/mL streptomycine, 10 ng/mL de facteurs de croissance et 1 µg/mL d'hydrocortisone. Les HMEC-1 sont cultivées jusqu'à 90% de confluence et repiquées tous les 3 jours. Une fois à confluence, les cellules sont rincées avec du PBS (10 mM de Na₂HPO₄, 137 mM de NaCl, 3 mM de KCl, pH 7,4) puis avec de la trypsine 1X pour enlever toute trace de milieu complet, ensuite elles sont incubées à 37°C dans 3 mL de trypsine 2X pour les détacher de leur support. Après 4 minutes d'incubation, l'action de la trypsine est inhibée avec 10 mL de milieu complet, les cellules sont détachées et récupérées dans un Falcon de 50 mL puis centrifugées à 25°C à 2000g pendant 10 minutes. Le culot est resuspendu dans



du milieu complet puis incubé dans des flasques T75 à 37°C à raison de 5 millions de cellules par 15 mL de milieu complet à 37°C.

Les cellules cancéreuses du pancréas INS-1 (Insulinoma Cells) sont cultivées dans un milieu complet RPMI 1640, supplémenté en 10mM HEPES, 10% FCS, 2mM L glutamine, 100U/mL pénicilline, 100µg/mL streptomycine, 1mM sodium pyruvate et 50µM 2 β-mercaptoéthanol pour favoriser la croissance cellulaire (Asfari et coll., 1992). Les cellules INS-1 sont cultivées dans des flasques T75 et repiquées tous les 10 jours. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours, puis une fois confluentes les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS, ensuite elles sont incubées à 37°C dans 3 mL de trypsine 1X. Après 4 minutes d'incubation, l'action de la trypsine est inhibée avec 10 mL de milieu complet, les cellules sont détachées et récupérées dans un Falcon de 50 mL puis centrifugées à 4°C à 1000g pendant 5 minutes. Le culot est resuspendu dans du milieu complet puis incubé dans des flasques T75 à 37°C à raison de 4,5 millions de cellules par 15 mL de milieu complet à 37°C.

1.2 Préparation des lamelles

Les lamelles de verre (5µg/cm²) sont d'abord exposées aux UV pendant 15 minutes, ensuite, elles sont rincée à l'éthanol puis au PBS et séchée à l'air libre sur des boîtes de pétri de 60 mm de diamètre. Les cellules HMEC-1 adhèrent facilement sur les lamelles, cependant pour favoriser l'adhésion des INS-1, les lamelles sont traitées avec du collagène de type I (1mg/mL) dilué dans du PBS puis incubées pendant 1 heure à température ambiante. Ensuite, elles sont rincées au PBS etensemencées avec 0,7 millions de cellules par 3 mL de milieu complet puis placées à



l'étuve à 37°C. Les lamelles sont préparées 5 jours avant l'utilisation et le milieu est changé la veille de l'expérience.

2 Ischémie reperfusion et les groupes expérimentaux

2.1 Ischémie reperfusion

Pour soumettre les cellules à une ischémie, elles sont incubées en anoxie dans un milieu ischémique sans substrat MSS pour les cellules INS-1 (0,054. 10⁻² mol/L Ca(NO₃)₂, 4H₂O, 5,3 mmol/L KCl, 0,04. 10⁻² mol/L MgSO₄, 7H₂O, 0,1 mol/L NaCl, 0,023 mol/L NaHCO₃, 0,56. 10⁻² mol/L Na₂HPO₄, 3,2 μmol/L GSH, 10 mmol/L Hepes (1M), 5mg/L rouge phenol, 50μmol/L 2 β-mercaptoéthanol rouge de phénol), pour les cellules HMEC-1 (1,6 mmol/L CaCl₂, 4 mM KCl, 10 mmol/L MgSO₄, 7 H₂O, 110,1 mmol/L NaCl, 0,94 mmol/L Na₂HPO₄, 14 mmol/L NaHCO₃). Ensuite les cellules sont reperfusées en normoxie avec du milieu complet. Pour cela, les lamelles sont placées dans un microscope confocal dans une chambre de perfusion (POC chamber, LaCon, Erbach, Germany) liée à un système d'incubation (O₂, CO₂, °C, Pecon, Erbach, Germany) et dans une atmosphère humide (95% d'air et 5% de CO₂). L'anoxie est déclenchée grâce à la fermeture de la vanne d'arrivée de l'oxygène qui est remplacé par l'N₂ (95% N₂, 5% CO₂) et le milieu complet est remplacé par le MSS, l'ischémie dure 1 heure. Pour la reperfusion, la vanne d'O₂ est ouverte de nouveau, les cellules sont placées dans un milieu complet puis elles sont perfusées en continu à l'aide d'un système de perfusion équipé à l'entrée d'un diaflo et d'une pompe à la sortie. Le débit de perfusion est 1 goutte/10 secondes.

2.2 Les groupes expérimentaux

Le contrôle : c'est le groupe ayant réellement subi une ischémie / reperfusion.



Le SHAM : c'est le groupe n'ayant pas subi une ischémie (en présence d'O₂ et de substrat) suivie d'une reperfusion.

Le groupe CsA : c'est le groupe traité à la CsA à l'ischémie ou à la reperfusion et ayant subi une vraie ischémie / reperfusion.

Le groupe ROT : c'est le groupe traité à la ROT à l'ischémie ou à la reperfusion et ayant subi une vraie ischémie / reperfusion.

3 Mesure de l'ouverture du PTP par microscopie confocale

3.1 Principe et marquage cellulaire

Il s'agit de mesurer l'ouverture du PTP en analysant deux paramètres : le potentiel de membrane grâce à l'utilisation du TMRM et la concentration NADH + H⁺/ NAD⁺ grâce à l'autofluorescence du NADH.

Les lamelles sont incubées au TMRM 30 nM et avec les différents traitements (CsA 1μM et ROT 1μM) 1heure avant le début de l'expérience à l'étuve. L'acquisition des images en temps réel est réalisée grâce au logiciel Leica TCS SP2 Acoustico Optical Beam Splitter (AOBS) au microscope confocal équipé d'un laser UV (351-364 nm) avec un objectif à huile x 63 (HCX PLAPO 63.0 x 1.518 de correction). L'excitation du Laser est de 351-364 nm pour le NADH et 565-645 nm pour le TMRM et l'ouverture de pinhole est de 4,33 et 1 pour le NADH et le TMRM respectivement. Ces conditions sont constantes pendant toute l'expérience.

3.2 Traitement des images

Les images sont filtrées grâce au logiciel de traitement d'images (imageJ). L'autofluorescence du NADH a été améliorée grâce à l'application du filtre « médian », qui améliore la qualité du



bruit de fond en remplaçant la valeur d'un pixel par la valeur médiane de l'ensemble des pixels de son voisinage, puis un masque est appliqué pour segmenter l'image et garder seulement les objets d'intérêts bien isolés grâce à un seuillage manuel. La fluorescence du TMRM est améliorée grâce à l'application d'un filtre « Top-Hat » qui permet d'extraire les pics les plus intenses du bruit de fond en fonction de la taille et de la forme puis un masque est appliqué. Les images sont ensuite quantifiées grâce au logiciel (Volocity). Les paramètres quantifiés sont la surface et l'intensité de fluorescence, puis les valeurs sont normalisées en attribuant 100% d'intensité et de surface à l'image prises à T0.

3.3 Mesure de la capacité de rétention calcique

3.3.1 *Perméabilisation des cellules*

L'utilisation de cellules entières pour l'étude de paramètres mitochondriaux comme la capacité de rétention calcique nécessite une étape préalable de perméabilisation. En effet, l'entrée de Ca^{2+} dans les cellules intactes est un processus hautement régulé qui ne permet le passage que de petites quantités de Ca^{2+} . De même, certains composés utilisés, comme les substrats énergétiques (succinate, glutamate) sont incapables de traverser la membrane plasmique. La perméabilisation de la membrane plasmique des cellules est réalisée par la digitonine, un détergent qui détruit les membranes en fonction de leur richesse en cholestérol.

A la concentration utilisée ($50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de DMSO), les membranes mitochondriales, plus pauvres en cholestérol que les membranes plasmiques, restent intactes.

3.3.2 *Conditionnement des cellules*

Une fois trypsinées les cellules sont comptées et resuspendues à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules/mL dans du milieu complet,



puis elles sont incubées en suspension dans des tubes fermés reliés aux bouteilles de gaz et placés à 37°C dans un bain-marie sous agitation. Tout d'abord, les cellules sont d'abord gazées pendant 15 minutes à 95% d'O₂, 5% de CO₂, elles sont centrifugées à 2000g pendant 5 minutes à température ambiante, puis elles sont resuspendues dans du milieu ischémique préalablement gazé à l'azote, les cellules sont ensuite gazé à 95% N₂, 5% CO₂ à 37°C sous agitation pendant 1 heure. Avant la reperfusion, les cellules sont centrifugées à 2000g pendant 5 minutes puis resuspendues dans du milieu complet, puis elles sont gazées à 95% d'O₂, 5% de CO₂ à 37°C pendant 1 heure sous agitation.

3.3.3 *La capacité de rétention calcique*

C'est une mesure qui permet de déterminer la capacité de rétention calcique maximale de la mitochondrie qui induit une ouverture définitive du PTP. En pratique, il s'agit d'ajouts successifs de quantités constantes de Ca²⁺ externe, à un intervalle de temps précis, pour induire une perméabilité de transition. Cette mesure permet d'évaluer l'efficacité d'une molécule à induire ou au contraire à inhiber le PTP, Ainsi, une molécule inhibitrice augmente la quantité de calcium nécessaire à l'ouverture du pore, alors qu'une molécule inductrice diminue cette quantité.

La sonde calcium-green a été utilisée pour mesurer le calcium extra-mitochondrial. Cette sonde ($\lambda_{excitation} = 506 \text{ nm}$, $\lambda_{émission} = 527 \text{ nm}$), ne s'accumule pas dans les membranes et ne diffuse pas au travers d'elles, sa la fluorescence est accrue par la présence de Calcium.



3.3.4 *Les groupes expérimentaux*

Le groupe ischémie : c'est le groupe des cellules récupérés jute après l'ischémie

Le groupe SHAM : c'est le groupe de cellules n'ayant pas subi une ischémie (présence de substrats et d'O₂).

Les groupes CsA : ce sont les groupes de cellules récupérées juste après l'ischémie et traitées à la CsA pendant le conditionnement, ou juste au moment de la mesure ou les deux.

Les groupes SHAM CsA : ce sont les groupes de cellules n'ayant pas subi traitées à la CsA pendant le conditionnement, ou juste au moment de la mesure ou les deux.

Le groupe reperfusion : c'est le groupe des cellules récupérés à la fin de la reperfusion

Le groupe SHAM : c'est le groupe de cellules n'ayant pas subi une ischémie (présence de substrats et d'O₂) suivie d'une étape de reperfusion.

Les groupes CsA : ce sont les groupes de cellules récupérées à la fin de la reperfusion et traitées à la CsA pendant le conditionnement, ou juste au moment de la mesure ou les deux.

Les groupes SHAM CsA : ce sont les groupes de cellules récupérées à la fin de la reperfusion et n'ayant pas subi d'ischémie, traitées à la CsA pendant le conditionnement, ou juste au moment de la mesure ou les deux.

Après chaque étape et en fonction des groupes, les cellules sont centrifugées à 2000g pendant 5 minutes puis rincées une foie au PBS sans magnésium et sans calcium (10 mM de Na₂HPO₄,



137 mM de NaCl, 3 mM de KCl, pH 7,4) puis recentrifugées et resuspendues dans 1 mL de tampon de rétention calcique CRC (250 mM de saccharose, 1 mM de Pi-Tris et 10 mM de Tris-MOPS, pH 7,4) dans une cuve en quartz de 2 mL.

Les capacités de rétention calcique ont été mesurées à 25°C avec un spectrofluorimètre. Les cellules ont été perméabilisées immédiatement avant leur utilisation en les incubant pendant deux minutes à 25°C et sous agitation en présence de 50 µg/ml de digitonine dans du tampon de rétention calcique. La concentration finale en cellules est de 5 millions de cellules par ml, la concentration extra-mitochondriale de Ca²⁺ libre est mesurée grâce à la présence de 1 µM de Calcium-Green. Les cellules ont été énergisées soit avec 5 mM de succinate-Tris soit avec 2,5 mM de Glutamate/0,5 mM Malate. Par la suite, des additions successives de 7 µM de Ca²⁺ ont été réalisées toutes les minutes jusqu'à obtenir une ouverture du PTP.



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

RESULTATS ET DISCUSSIONS



Résultats et discussions

1 Mise en évidence de l'ouverture du PTP dans un modèle d'ischémie reperfusion sur les cellules HMEC-1

Plusieurs études ont été réalisées pour déterminer l'implication du PTP dans le phénomène d'ischémie reperfusion. Ces recherches ont porté principalement sur le cœur comme l'étude de l'infarctus du myocarde ou sur le cerveau où le phénomène d'ischémie a eu lieu in vivo ou ex vivo. Dans cette étude, et pour la première fois, l'étude du phénomène d'ischémie/reperfusion est réalisée sur modèle cellulaire où l'ischémie est provoquée in vitro.

1.1 Observation de l'ouverture du PTP

Les paramètres observés sont le NADH et le potentiel membranaire, l'ouverture du PTP est caractérisée par une chute du potentiel membranaire (une baisse de la fluorescence du TMRM) et une sortie du NADH de la mitochondrie (une augmentation de l'autofluorescence du NADH) (Dumas et coll., 2009).

Pour analyser l'ouverture du PTP, les cellules HMEC-1, sont placées sur une lamelle dans une chambre fermée conditionnée à 37°C. Cette chambre est reliée d'une part à un système de régulation des taux d'O₂, d'N₂, de CO₂, où le gaz circule à pression négative (l'air est aspiré vers l'intérieur). D'autre part, elle est connectée à un système de perfusion. Cette chambre permet mettre les cellules en contact avec un microscope confocal afin suivre différents paramètres en fonction des étapes d'ischémie ou de reperfusion.



Dans notre modèle, nous avons utilisé un système d'ischémie / reperfusion qui nous a permis de simuler l'ischémie à l'échelle du tissu et de l'organe. Nous avons tout d'abord éliminé tous les substrats du milieu cellulaire, en utilisant un milieu ischémique sans substrat (MSS). Pour se mettre en anoxie, la vanne d'arrivée d'oxygène (95% O₂, 5% CO₂) a été fermée. Ensuite, nous avons ouvert l'arrivée du gaz (95% N₂, 5% CO₂) afin de remplacer tout l'oxygène restant dans la chambre du microscope. Notre objectif était de faire diminuer la pression de l'oxygène (Fi O₂) de 21% à 0% dans la chambre. De plus, le milieu complet (MC) dans lequel les cellules ont été incubées, a été remplacé par un MSS qui est gazé au préalable à (95% N₂, 5% CO₂) pendant minutes. Avant de démarrer l'acquisition des images des cellules en ischémie, il nous fallait attendre 5 minutes le temps que la Fi O₂ chute à 0%. Après la phase d'ischémie, pour démarrer la reperfusion, la vanne d'arrivée de l'oxygène a été ouverte de nouveau. Le MSS a été remplacé par un MC et le système de perfusion a été activé. Le débit de perfusion a été réglé à une goutte toutes les 10 secondes.

Les cellules sont rechargées à la fin en TMRM pour vérifier la cause de la diminution de la fluorescence du TMRM observée à la reperfusion. Si les cellules sont rechargées en TMRM à la fin de la reperfusion, cela veut dire que la baisse observée est due seulement au rinçage de la sonde pendant l'expérience. Par contre, si les cellules ne se rechargent pas en TMRM, cela veut dire que la diminution observée pendant la reperfusion est due à une chute du potentiel membranaire après l'ischémie.

La figure 10 représente le rapport de la fluorescence du TMRM sur celle du NADH, en fonction des différentes étapes de l'ischémie reperfusion, du contrôle. Les résultats ont été représentés sous forme d'un rapport d'intensité de fluorescence afin



de s'affranchir du nombre de cellules qui change d'une expérience à une autre.

Chez le contrôle, nous remarquons que la fluorescence du TMRM est en baisse jusqu'à à la fin de la reperfusion où elle chute considérablement (31,26%). Concernant l'autofluorescence du NADH, nous remarquons une augmentation à la fin de l'ischémie, puis nous retrouvons approximativement la valeur de T0 à la fin de la reperfusion (tableau 1). En ce qui concerne le rapport de fluorescence TMRM/NADH, nous remarquons qu'il diminue à la fin de l'ischémie puisque l'autofluorescence du NADH augmente et la fluorescence du TMRM diminue.



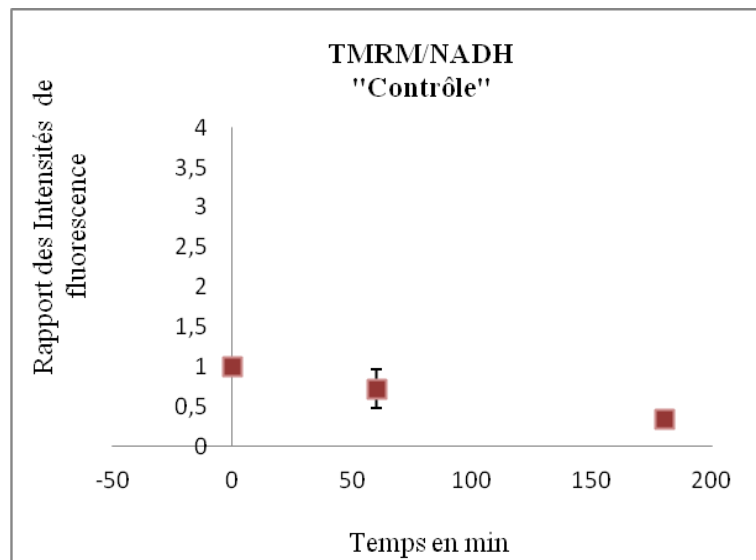
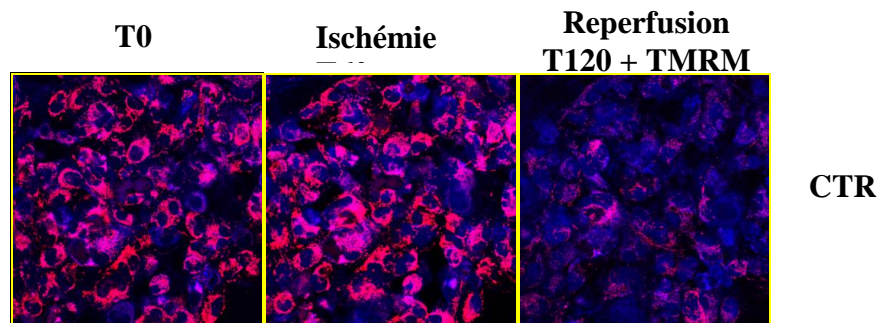


Figure 10 : mise en évidence de l'ouverture du PTP pendant l'ischémie/reperfusion.

Les images représentent l'overlay du TMRM et du NADH qui est représenté par le rapport des intensités de fluorescence TMRM/NADH sur les courbes. Les cellules ont été incubées avec 30 nM de TMRM pendant 1h, puis mises en ischémie dans du MSS pendant 1h. Enfin, elles sont reperfusées avec du MC en présence d'O₂ pendant 2h. Elles ont été rechargées avec du TMRM à 30 nM, 30 min avant la fin de la reperfusion. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne + SEM. Contrôle : n=4.

Pourcentage de fluorescence				
Intensité		T0	Ischémie T60	Reperfusion T120 + TMRM
Contrôle	NADH	100	206 ± 108	98 ± 35
	TMRM	100	79 ± 18	31 ± 5
Surface		T0	Ischémie T60	Reperfusion T120 + TMRM
Contrôle	NADH	100	188 ± 94	97 ± 33
	TMRM	100	82 ± 11	41 ± 9

Tableau 1 : Intensité et surface de fluorescence du NADH et TMRM dans le contrôle.

Les images nous montrent que l'autofluorescence du NADH augmente et devient plus diffuse, ceci est confirmé par la surface du NADH qui augmente à la fin d'ischémie par rapport à T0 (tableau 1). Cela suggère une sortie du NADH des mitochondries. Cependant, à la fin de l'ischémie, la diminution du potentiel n'est que de 20% approximativement par rapport à T0. Par conséquent, la sortie du NADH et le maintien du potentiel à 60 minutes d'ischémie, pourraient être interprétées comme étant une ouverture transitoire du PTP qui laisse sortir le NADH sans dépolariiser la mitochondrie.

Après la phase d'ischémie, nous constatons que l'autofluorescence du NADH retrouve approximativement la valeur de T0. Probablement parce que le NADH a été métabolisé dans le cytoplasme. Parallèlement, nous observons que le potentiel s'effondre à la fin de la reperfusion et que cette diminution n'est pas corrigée par la recharge en TMRM à la fin de la reperfusion. Ces résultats pourraient être en faveur d'une ouverture définitive que PTP à la fin de la reperfusion.

Afin de confirmer nos hypothèses quant à l'ouverture transitoire et définitive du PTP pendant l'ischémie / reperfusion, nous avons utilisé des inhibiteurs du PTP (cyclosporine A et la roténone) pour voir si les changements observés chez le contrôle seront prévenus ou pas.



1.2 Effet des inhibiteurs du PTP à l'ischémie

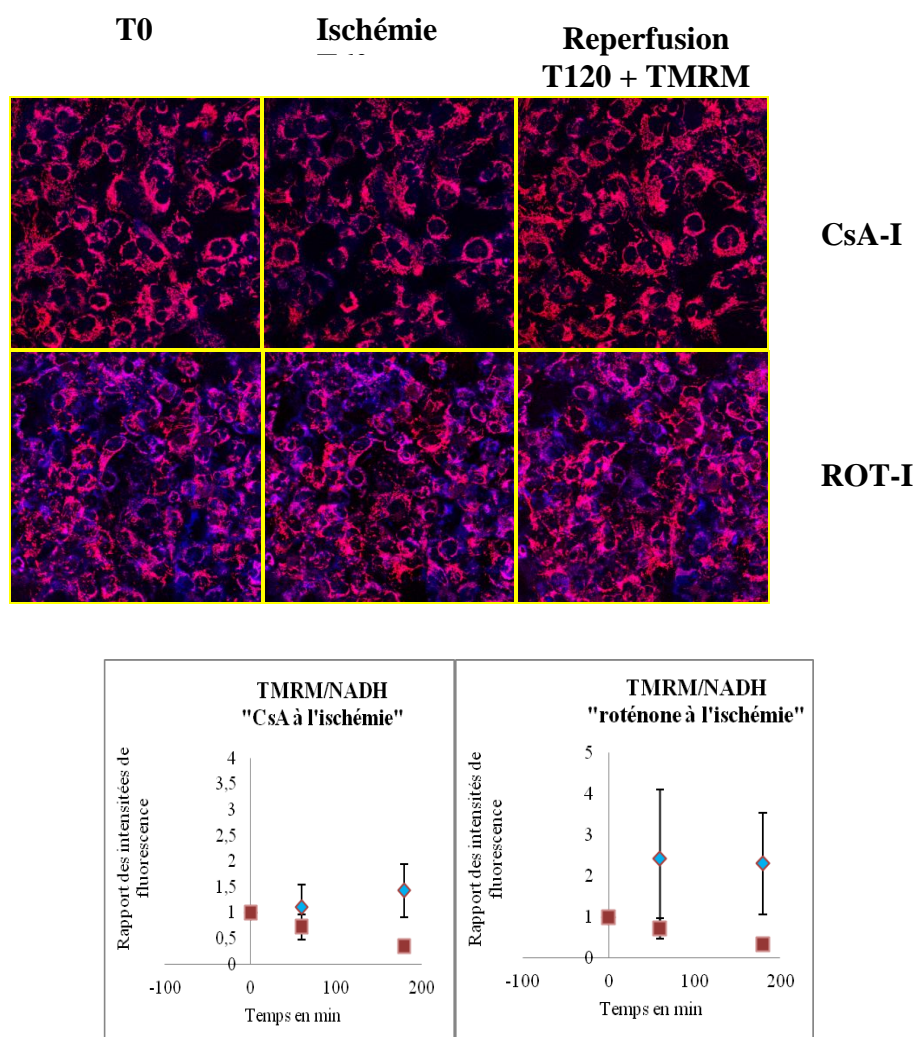


Figure 11 : Effet des inhibiteurs du PTP (CsA et Rot) sur la fluorescence du NADH et du TMRM pendant l'ischémie/reperfusion.

Les images représentent l'overlay du TMRM et du NADH qui est représenté par le rapport des intensités de fluorescence TMRM/NADH sur les courbes. Les cellules ont été incubées avec 30 nM de TMRM + 1 μ M de CsA ou de Rot pendant 1h. Ensuite, elles sont mises en anoxie dans du MSS pendant 1h. Enfin elles sont reperfusées avec du MC en présence d'O₂ pendant 2h. Elles ont été rechargées avec du TMRM à 30 nM, 30 min avant la fin de la reperfusion. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne + SEM. CsA à l'ischémie : n=3, Rot à l'ischémie : n=2.



Pourcentage de fluorescence				
Intensité		T0	Ischémie T60	Reperfusion T120 + TMRM
CsA-I	NADH	100	93 ± 10	107 ± 33
	TMRM	100	100 ± 35	149 ± 73
ROT-I	NADH	100	69 ± 23	74 ± 13
	TMRM	100	148 ± 59	162 ± 60
Surface		T0	Ischémie T60	Reperfusion T120 + TMRM
CsA-I	NADH	100	92 ± 9	106 ± 29
	TMRM	100	96 ± 22	129 ± 43
ROT-I	NADH	100	70 ± 20	76 ± 14
	TMRM	100	130 ± 36	146 ± 40

Tableau 2 : Intensité et surface de fluorescence du NADH et TMRM en présence de CsA et de Rot à l'ischémie

Les résultats de l'utilisation de la CsA à l'ischémie (CsA-I), nous montrent que le rapport de fluorescence TMRM/NADH reste plus ou moins stable (on passe de 1 à 1,49). La légère augmentation de ce rapport est due à la hausse de la fluorescence du TMRM alors que l'autofluorescence du NADH reste stable (tableau2). L'augmentation de la fluorescence du TMRM est due à la recharge des cellules en TMRM à la fin de l'expérience après qu'elles aient perdu un peu de leur fluorescence sous l'effet du rinçage (figure 12). Dans la figure 11 les images nous montrent une parfaite colocalisation entre le NADH et le TMRM à la fin de l'ischémie contrairement au contrôle (figure10) où nous avons remarqué une délocalisation du NADH par rapport au TMRM qui s'accroît à la fin de la reperfusion. La surface de fluorescence du NADH reste plus ou moins stable (tableau 2), ce qui montre que le NADH ne diffuse pas. Donc le NADH ne sort pas de la mitochondrie à la fin de l'ischémie en présence de CsA. De plus, la colocalisation reste maintenue jusqu'à la fin de l'expérience.

Ainsi nous pouvons conclure que la CsA prévient les modifications de la fluorescence du NADH et du TMRM que nous



avons observé chez le contrôle à la fin de l'ischémie, et à la fin de la reperfusion.

En ce qui concerne la roténone à l'ischémie, nous constatons que le rapport de fluorescence augmente considérablement à la fin de l'ischémie (on passe de 1 à 2,24). Cette augmentation est due à une hausse anormale de la fluorescence du TMRM au niveau d'une des deux expériences réalisées (190% à T60 ischémie) (figure 13) alors que dans l'autre la fluorescence du TMRM reste stable. Cette hausse dans la fluorescence du TMRM pourrait être due au fait que les cellules n'étaient pas assez chargées en TMRM à T0, donc elles continuent à diffuser le TMRM à l'intérieur des mitochondries pendant l'expérience (figure 13). Il est probable aussi que cette augmentation de fluorescence soit due à un changement de focus. Cependant, ces changements de fluorescence en TMRM ne sont pas reproduits au niveau de l'autofluorescence du NADH, ce qui ne corrèle pas avec un changement de focus. Néanmoins, on sait que le pinhole du NADH est complètement ouvert (4,33) alors que celui du TMRM est au minimum (1). Par conséquent, l'autofluorescence du NADH est étalée sur une plus large épaisseur par rapport à la fluorescence du TMRM, et le moindre changement de focus serait plus visible en TMRM qu'en NADH (figure 14).

Cette observation est confirmée par les valeurs de la surface de fluorescence du TMRM qui augmentent à partir de la fin de l'ischémie (tableau 2). Donc, l'augmentation de l'intensité du signal TMRM est due au fait qu'il couvre une zone plus importante de la cellule (figure 14). Alors que la surface du NADH diminue approximativement de 30% par rapport à T0 (tableau 2). Les images de la Rot-I nous montrent que l'autofluorescence du



NADH, reste plus ou moins stable tout au long de l'expérience (diminue de 30% par rapport à T0) (Tableau 2).

Ainsi, en s'affranchissant de l'augmentation anormale de la fluorescence du TMRM, nous remarquons que le rapport de fluorescence entre la fin de l'ischémie et la fin de la reperfusion reste stable. Par conséquent, puisque le potentiel ne s'effondre pas, et l'autofluorescence du NADH reste maintenue. De plus, les images montrent une colocalisation entre le TMRM et le NADH parfaitement maintenue tout au long de l'expérience. Nous pouvons suggérer que la roténone prévient les modifications de la fluorescence du TMRM et du NADH observées chez le contrôle à la fin de l'ischémie et de la reperfusion, et que le complexe I est impliqué dans la régulation du potentiel membranaire et de la distribution du NADH dans la mitochondrie.

T0 fin reperfusion recharge

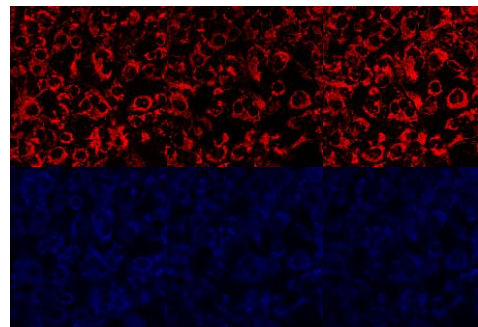


Figure 12 : Effet de la CsA sur la fluorescence du TMRM et du NADH pendant l'ischémie / reperfusion (n=1)

T0 Isch T15' Isch T60 reperf T90 reperf T120'

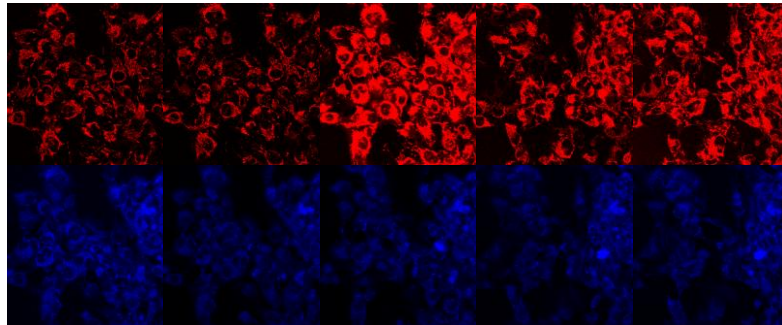


Figure 13 : Effet de la Rot sur la fluorescence du TMRM et du NADH pendant l'ischémie / reperfusion (n=1)

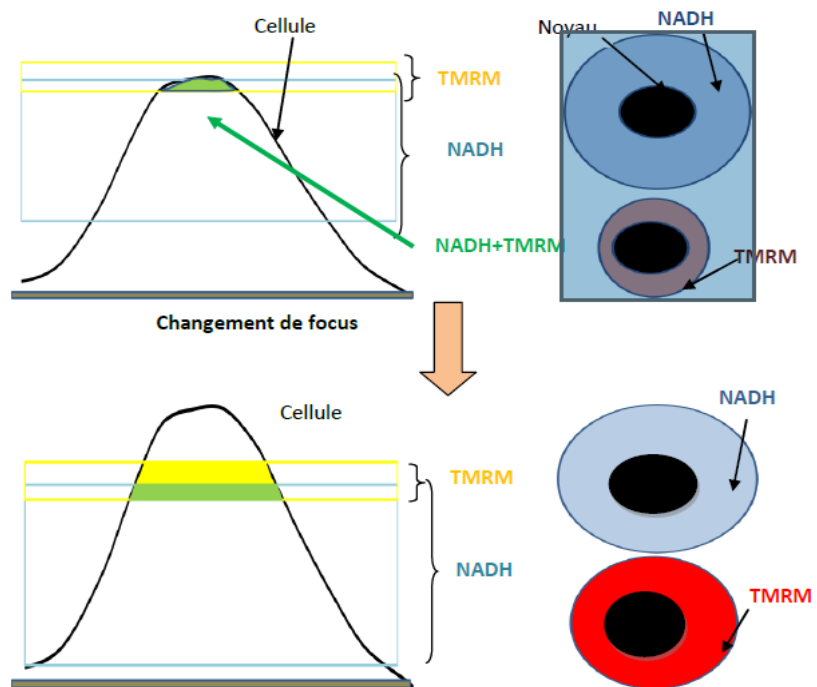


Figure 14 : Conséquences du changement de focus sur les fluorescences du NADH et TMRM en fonction du pinhole. La fluorescence du TMRM concerne une couche fine de la cellule (pinhole 1) alors que celle du NADH occupe une épaisseur plus importante (pinhole 4,33). Donc le moindre changement du focus serait plus visible en TMRM qu'en NADH. La fluorescence du TMRM augmente considérablement alors que celle du NADH est à peine visible après le changement de focus.



Les résultats de l'utilisation des inhibiteurs du PTP à l'ischémie confirment notre hypothèse : les modifications de la fluorescence du TMRM et du NADH à la fin de l'ischémie et de la reperfusion correspondent à une ouverture transitoire suivie d'une ouverture définitive du PTP dans notre modèle d'ischémie / reperfusion.

1.3 Effet des inhibiteurs du PTP à la reperfusion

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que les inhibiteurs du PTP pouvaient prévenir l'ouverture transitoire et définitive du PTP à la fin de l'ischémie et de la reperfusion. Dans ce chapitre nous avons voulu vérifier si ces inhibiteurs peuvent prévenir l'ouverture définitive du PTP à la fin de la reperfusion. Nous avons utilisé la CsA ou la Rot à la reperfusion, les résultats sont présentés dans la figure 15.



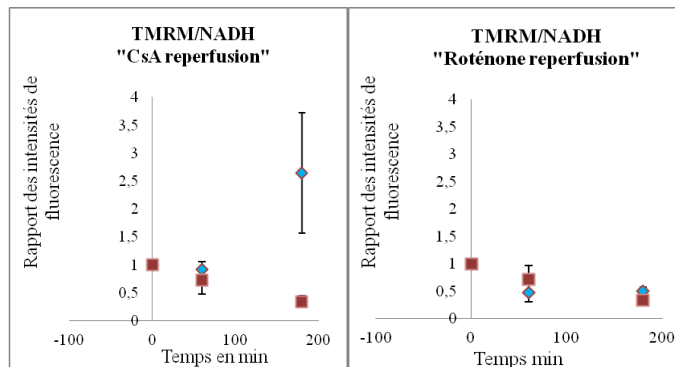
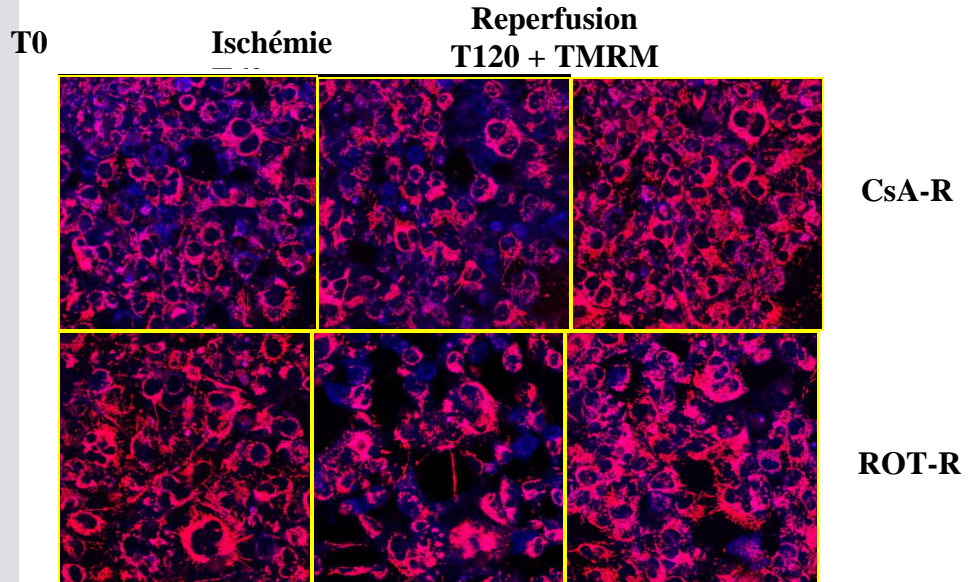


Figure 15 : Mise en évidence de l'ouverture du PTP pendant l'ischémie/reperfusion. Les images représentent l'overlay du TMRM et du NADH qui est représenté par le rapport des intensités de fluorescence TMRM/NADH sur les courbes. Les cellules ont été incubées avec 30 nM de TMRM pendant 1h, puis mises en hypoxie dans du MSS pendant 1h. Enfin elles sont reperfusées avec du MC en présence d'O₂ pendant 2h. A la reperfusion de CsA (1 μM) ou de Rot (1 μM) a été rajoutée. Elles ont été rechargées avec du TMRM à 30 nM, 30 min avant la fin de la reperfusion. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne + SEM. CsA à la reperfusion : n=3, roténone à la reperfusion : n=3.

Pourcentage de fluorescence				
Intensité		T0	Ischémie T60	Reperfusion T120 + TMRM
CsA-R	NADH	100	87 ± 13	65 ± 28
	TMRM	100	83 ± 6	149 ± 13
ROT-R	NADH	100	148 ± 25	214 ± 28
	TMRM	100	65 ± 12	108 ± 12
Surface		T0	Ischémie T60	Reperfusion T120 + TMRM
CsA-R	NADH	100	91 ± 10	67 ± 26
	TMRM	100	82 ± 6	141 ± 11
ROT-R	NADH	100	141 ± 18	190 ± 23
	TMRM	100	68 ± 13	106 ± 9

Tableau 3 : Intensité et surface de fluorescence du NADH et TMRM en présence de CsA et de roténone à la reperfusion.

En présence de la CsA à la reperfusion, nous constatons tout d'abord une diminution de 17% du potentiel à la fin de l'ischémie (tableau 3). Ensuite nous remarquons que certaines cellules sont complètement dépolarisées (délocalisation du NADH par rapport au TMRM). Ce résultat confirme celui observée au niveau du contrôle qui représente une ouverture transitoire du PTP à la fin de l'ischémie (figure 10). Cependant - pour une raison que nous n'arrivons pas à expliquer - l'autofluorescence du NADH à l'ischémie diminue de 13% alors que nous nous attendions à avoir une augmentation comme dans le contrôle. De plus, la surface de fluorescence n'augmente pas. Donc le NADH ne sort pas de la mitochondrie (tableau 3). Après utilisation de la CsA à la reperfusion, nous remarquons une nette augmentation de la fluorescence du TMRM contrairement au contrôle et une diminution du NADH à la fin de la reperfusion (tableau 3). La fluorescence du TMRM dépasse les 100% au T0. Les cellules ont perdu un peu de leur fluorescence en TMRM pendant l'expérience suite au rinçage, puis se sont rechargées après l'ajout du TMRM à la fin de la reperfusion. Alors que chez le contrôle la fluorescence du TMRM n'augmente pas même après la recharge en TMRM à la



fin de la reperfusion. La hausse de la fluorescence du TMRM et la diminution de celle du NADH à la fin de la reperfusion induisent à une augmentation du rapport de fluorescence TMRM/NADH comme nous pouvons le constater sur la courbe de gauche.

Nous pouvons en conclure que la CsA à la reperfusion prévient l'ouverture du PTP.

En ce qui concerne l'utilisation de la Rot à la reperfusion, nous observons tout d'abord que le rapport de fluorescence diminue de moitié entre T0 et la fin de l'ischémie, puis se stabilise jusqu'à la fin de la reperfusion (figure 15). La baisse du rapport est due à une augmentation de l'autofluorescence du NADH à la fin de l'ischémie accompagnée d'une baisse de la fluorescence du TMRM. Par la suite, l'autofluorescence du NADH continue à augmenter et nous remarquons une hausse de la fluorescence du TMRM ce qui permet la stabilisation du rapport (tableau 3). L'augmentation de la fluorescence du TMRM à la fin de la reperfusion est due au fait que les cellules ont été rechargées à la fin de la reperfusion. Les images montrent une délocalisation du NADH qui augmente et devient diffus ce qui est confirmé par l'augmentation de la surface d'autofluorescence du NADH à la fin de l'ischémie (tableau 3). La surface de fluorescence du TMRM qui diminue. Ce résultat rejoint celui obtenu chez le contrôle à la fin de l'ischémie. Cet effet disparaît suite à l'utilisation de la roténone à la reperfusion, où nous remarquons que les cellules se sont repolarisées et le NADH se colocalise à nouveau avec le TMRM.

Cette expérience nous a confirmé d'une part qu'à la fin de l'ischémie dans notre modèle d'ischémie, il se produit une ouverture transitoire du PTP. D'autre part, elle a montré que



l'inhibition du complexe I permet de prévenir l'ouverture définitive du PTP à la fin de la reperfusion.

1.4 Discussion et perspectives

Dans ce chapitre nous avons montré que l'ischémie pourrait induire la perméabilité de transition d'une manière transitoire et définitive dans les cellules intactes. Nous avons montré qu'à la fin de l'ischémie, le NADH sort de la mitochondrie (augmentation de la surface et de la fluorescence du NADH) et le potentiel de membrane diminue légèrement. Nos résultats ont montré que cette sortie du NADH est prévenue par la CsA. Par conséquent, cette modification pourrait être interprétée comme une ouverture du PTP. Cependant, le potentiel de membrane ne s'effondre pas à la fin de l'ischémie, nous suggérons alors que le PTP dans notre modèle expérimental s'ouvre à la fin de l'ischémie mais seulement d'une manière transitoire, ce qui permet de préserver le potentiel membranaire. Cependant et paradoxalement, la sortie du NADH est accompagnée par une augmentation de sa fluorescence, alors que celle-ci devrait plutôt diminuer puisque le NADH sera moins concentré dans le cytosole que dans la mitochondrie. Nous pouvons suggérer que cette augmentation de fluorescence est due au fait que la réaction de réduction du NAD^+ n'est pas inhibée malgré l'inhibition de la chaîne respiratoire par l'ouverture du PTP. Le NADH continue alors à être produit. Par conséquent même si le NADH est métabolisé à l'extérieur de la mitochondrie, son flux de production reste supérieur à celui de sa consommation. Sa fluorescence est alors plus importante après ouverture du PTP. Ensuite nous avons montré qu'à la fin de la reperfusion le potentiel de membrane s'effondre complètement, et que cet effondrement n'est pas corrigé par la recharge en TMRM à la fin de la reperfusion. Par conséquent, l'effondrement du potentiel de



membrane n'est pas due au phénomène de rinçage, mais plutôt au phénomène de l'ischémie / reperfusion. De plus, cet effondrement du potentiel est prévenu par la CsA, ce qui suggère une ouverture définitive du PTP à la fin de la reperfusion. Nos résultats rappellent ceux d'une étude préalable dans notre laboratoire. En effet, il a été constaté que l'ouverture du PTP induite par un ionophore à calcium (A23187) sur les cellules HMEC-1 est responsable d'une augmentation de la fluorescence du NADH, alors que le potentiel de membrane s'effondre dans certaines cellules et se maintient dans d'autres. Ces résultats suggèrent que l'activation du PTP peut induire des ouvertures transitoires (quand le potentiel de membrane est préservé) correspondant à un phénomène de « flickering » continu du PTP (Dumas et coll., 2009). Nos résultats correspondent aussi à d'autres données de la littérature qui ont montré que les conséquences du phénomène d'ischémie commencent à l'ischémie et se poursuivent pendant la reperfusion. En effet, l'équipe de Borutaite a montré que l'ischémie seule peut induire l'apoptose et un dysfonctionnement mitochondrial, ils ont montré que l'activation des caspases apparaît dès 30 minutes d'ischémie avec une inhibition de la chaîne respiratoire et un relargage du cytochrome c. Ensuite, ils ont constaté une fragmentation de l'ADN à 60 minutes d'ischémie. Ces modifications s'accroissent pendant la reperfusion et sont prévenues par la CsA. Par conséquent le PTP est impliqué dans les perturbations apparaissant à l'ischémie (Borutaite and Brown, 2003, Borutaite et coll., 2003). Une autre étude sur des myocytes ventriculaires a montré un relargage du cytochrome c et une activation du phénomène de l'apoptose à l'ischémie qui peuvent être prévenues par l'utilisation de l'acide bonkréique (inhibiteur du PTP). Ces résultats suggèrent une ouverture du PTP pendant l'ischémie (Gurevich et coll., 2001). Nous avons montré aussi que les perturbations apparaissant à la fin de l'ischémie peuvent être corrigées grâce à l'utilisation de la CsA



à la reperfusion. En effet, nous avons remarqué que le potentiel de membrane est maintenu à la reperfusion et que le rapport TMRM/NADH est stabilisé, donc l'utilisation de la CsA à la reperfusion a prévenue l'ouverture définitive du PTP.

Il a été montré que l'inhibition du complexe I dans certains tissus par la roténone a prévenu l'ouverture du PTP d'une manière plus efficace que la CsA sur cellules intactes et perméabilisées et que la roténone est un inhibiteur du PTP (Chauvin et coll., 2001). En effet, nous avons remarqué que l'utilisation de la roténone à l'ischémie ne présentait aucun signe de l'ouverture du PTP (pas de chute du potentiel, ni sortie du NADH). Par conséquent la roténone a prévenu l'ouverture du PTP dans nos conditions expérimentales. L'utilisation post-ischémique de la roténone, nous a permis de confirmer les résultats obtenus par la CsA. En effet, les modifications observées à la fin de l'ischémie (sortie du NADH) sont corrigées par l'utilisation de la roténone à la reperfusion (le potentiel de membrane se stabilise ainsi que le rapport TMRM/NADH) et l'ouverture définitive du PTP a été prévenue. Ces résultats confirment aussi, l'implication du complexe I dans la régulation du phénomène d'ischémie / reperfusion.

Nos résultats sur cellules intactes nous ont permis de concrétiser et de confirmer l'implication du PTP dans la régulation du phénomène d'ischémie / reperfusion - qui a été longtemps supposée dans la littérature – et ceci, grâce à l'observation en directe de l'ouverture du PTP dans les conditions expérimentales d'ischémie / reperfusion que nous avons mis au point dans notre laboratoire. Cependant, il est évident que la durée d'ischémie utilisée (60 minutes) reste très importante par rapport à la vie réelle, d'où l'importance de compléter ce travail par une étude *in vivo* qui



nous permettra d'étudier l'implication du PTP dans des conditions réelles d'ischémie / reperfusion.

Parfois, la pression de l'oxygène ne descendait pas jusqu'à 0% à l'ischémie. Nous nous sommes rendu compte un peu tard que nous avions des fuites d'air de temps à autre qui contaminaient l'anoxie totale pendant l'ischémie. Dans notre système, le gaz circule à pression négative, donc en présence de ces fuites, l'air ambiant entrainé dans le système ce qui contaminait les conditions d'anoxie totale pendant l'ischémie. Ces incidents, pourraient expliquer les modifications inattendues et inexplicables que nous rencontrons parfois dans nos résultats.

2 Etude de la durée et de la réversibilité des conséquences du phénomène d'ischémie

2.1 Etude de la durée des conséquences de l'ischémie

Plusieurs études ont montré que la durée de l'ischémie est un élément clé dans la détermination de l'ampleur des dommages à la reperfusion. Au-delà de 10 min, les conséquences de l'ischémie peuvent être de plus en plus graves voir même irréversibles (Jennings, 1976). Dans ce travail nous voulons déterminer la durée nécessaire pour déclencher le phénomène d'ischémie in vitro et au bout de combien de temps de reperfusion le phénomène peut être réversible.

Les cellules ont été soumises à des durées variables d'ischémie puis incubées avec du 2,4-dinitrophénole (DNP) à 200 μM pendant 20 minutes. L'objectif est de comparer la concentration du NADH après le DNP avec ou sans ischémie. Le DNP est un puissant découplant de la phosphorylation oxydative, il découple le transfert d'électrons au travers la chaîne respiratoire à la synthèse d'ATP, il en résulte que la respiration s'accélère donc le



NADH est fortement oxydé, une perméabilisation de la membrane aux protons et l'ATPase s'active dans le sens de dégradation de l'ATP. Par conséquent, le $\Delta\Psi$ et l'autofluorescence du NADH s'effondrent.

La figure 16 représente l'effet du DNP sur les cellules n'ayant subi aucune ischémie et qui représente notre contrôle. Les images et les histogrammes montrent un effondrement du potentiel membranaire après 20 min de DNP (3,7% par rapport à T0) et une forte diminution de l'autofluorescence du NADH (24% par rapport à T0). Le traitement de 5 minutes d'ischémie suivi de DNP ne montre aucune différence significative par rapport au contrôle (8,3% pour le TMRM et 25,2% pour le NADH par rapport à T0) (figure 17).



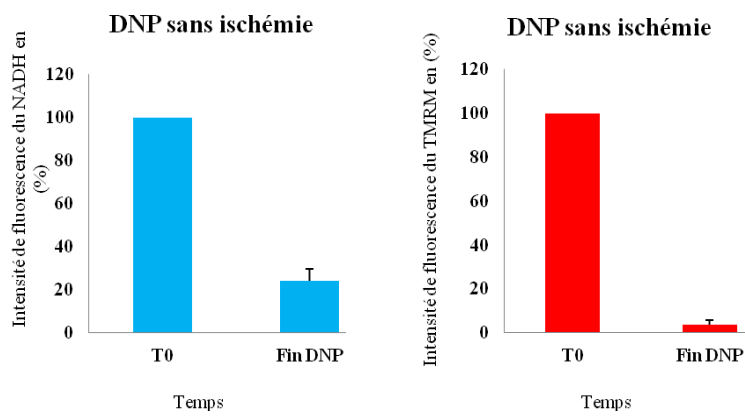
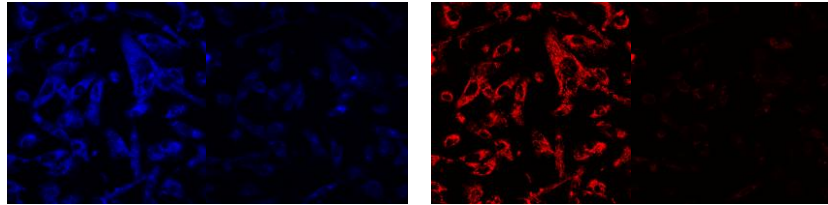


Figure 16 : Effet du DNP sur le statut redox du NADH et sur le $\Delta\Psi$ des HMEC-1. L'autofluorescence du NADH (canal bleu) est détectée grâce au laser UV et le $\Delta\Psi$ grâce à l'incubation des avec 30nM de TMRM (canal rouge). Après 1h de charge une image à T0 est prise représentant les deux canaux puis les cellules sont incubées avec 200 μ M de DNP pendant 20 min. Les valeurs de fluorescence ont été normalisées par rapport à 100% de fluorescence à T0 et sont représentées sous forme de moyenne + SEM (n = 7)

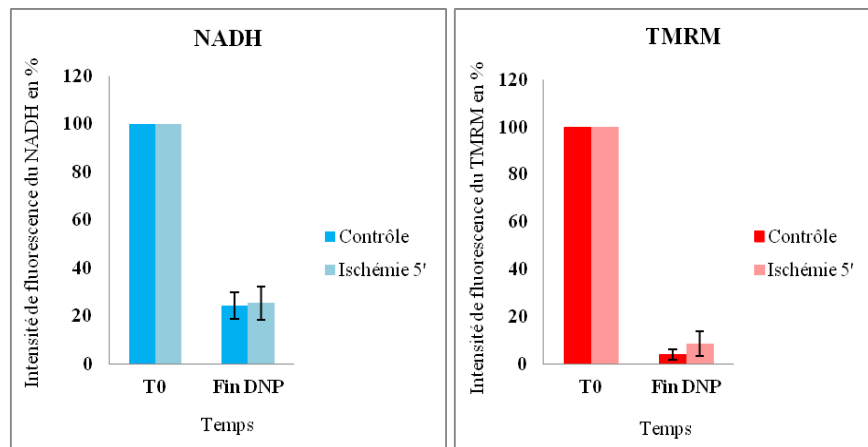
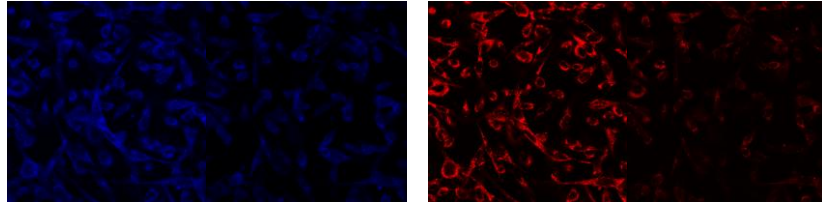


Figure 17 : Effet du DNP sur l'oxydation du NADH et sur le $\Delta\Psi$ des HMEC-1 après 5' d'ischémie. Après 1h de recharge au TMRM 30 nM l'image en T0 est acquise. Le milieu complet est ensuite remplacé par le MSS et l'hypoxie est déclenchée. L'ischémie dure 5 min puis les cellules sont ré-incubées avec du milieu complet contenant du DNP à 200 μ M pendant 20 min en normoxie. Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM (n = 6).

Le même résultat est observé pour 10 minutes d'ischémie. Il n'y a pas une différence significative avec le contrôle. Nous remarquons que l'autofluorescence du NADH diminue considérablement (33,4% par rapport à T0) et le potentiel s'effondre (7,3% par rapport à T0) (figure 18).

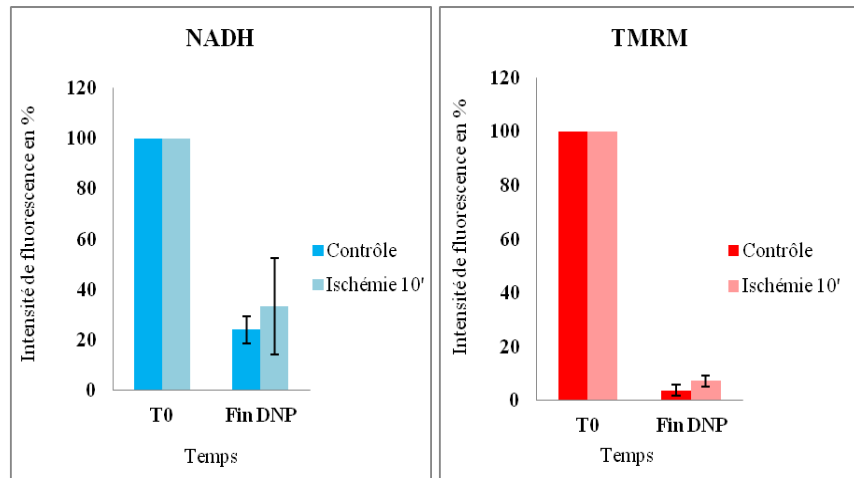
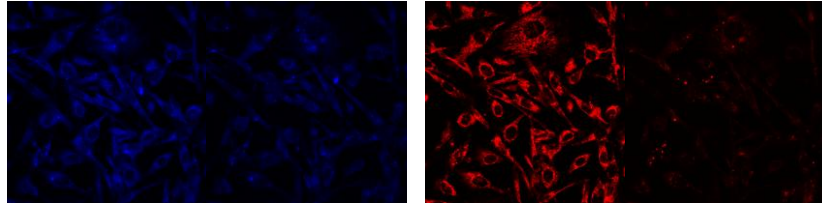


Figure 18: Effet du DNP sur l'oxydation du NADH et sur le $\Delta\Psi$ des HMEC-1 après 10' d'ischémie. Après 1h de recharge au TMRM 30 nM l'image en T0 est acquise. Le milieu complet est ensuite remplacé par le MSS et l'hypoxie est déclenchée. L'ischémie dure 10 min puis les cellules sont ré-incubées avec du milieu complet contenant du DNP à 200 μ M pendant 20 min en normoxie. Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM (n = 3).

Cependant, à partir de 15 minutes (figure 19) d'ischémie les différences concernant l'autofluorescence du NADH sont significatives par rapport au contrôle. Nous observons que la fluorescence du NADH après le DNP diminue de moitié par rapport à celle du T0 (45,3% et 49,2% pour 15 et 30 min d'ischémie respectivement) (figures 19, 20) alors qu'elle chute de plus de 70% pour des périodes d'ischémie inférieures ou égales à 10 minutes. Quant au potentiel de membrane, il s'effondre quelque soit la durée de l'ischémie (12,2% et 19,3% pour 15 et 30 min respectivement).

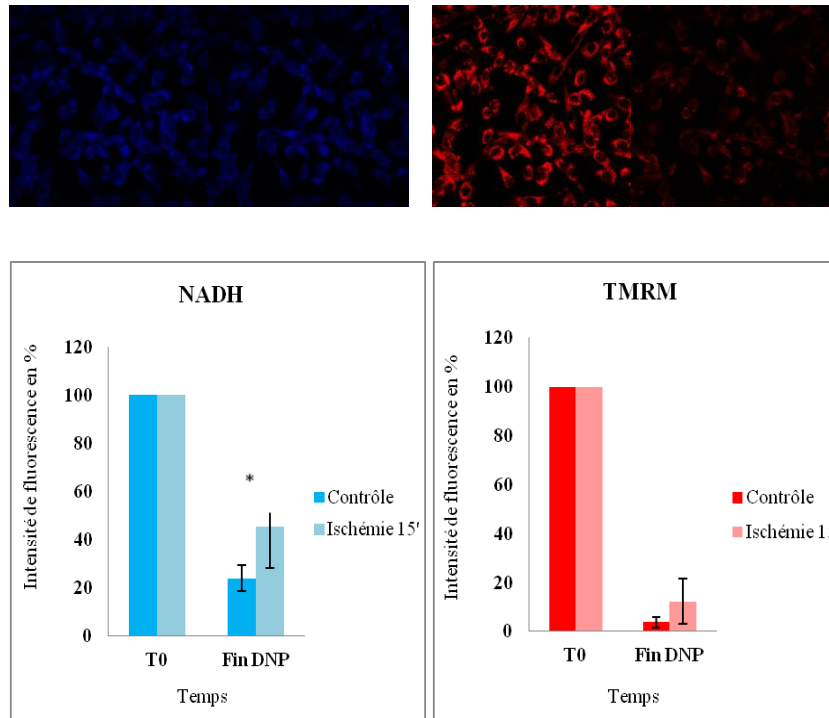


Figure 19 : Effet du DNP sur l'oxydation du NADH et sur le $\Delta\Psi$ des HMEC-1 après 15' d'ischémie. Après 1h de recharge au TMRM 30 nM l'image en T0 est acquise. Le milieu complet est ensuite remplacé par le MSS et l'hypoxie est déclenchée. L'ischémie dure 15 min puis les cellules sont ré-incubées avec du milieu complet contenant du DNP à 200 μM pendant 20 min en normoxie. Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM (n = 6). * = différence significative entre le contrôle et l'ischémie 15 minutes

La figure 21 montre l'effet du DNP après 60' minutes d'ischémie sur un n = 2. Une expérience sur deux confirme le résultat observé à 15 et 30 minutes d'ischémie concernant l'autofluorescence du NADH (53,8% par rapport à T0), cependant l'autre expérience montre une diminution de la fluorescence du NADH (30,3% par rapport à T0) qui se rapproche plutôt du contrôle. Cette baisse peut être due à l'état des cellules ce jour là ou une erreur pendant la mesure, d'où l'importance de refaire l'expérience. Quant au $\Delta\Psi$, les mitochondries se sont dépolarisées comme prévu.

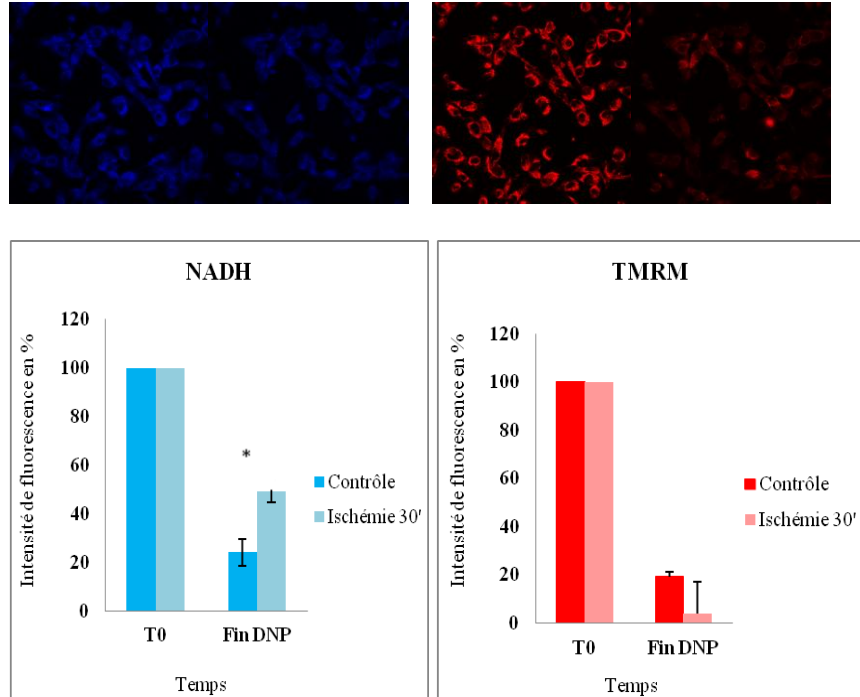


Figure 20 : Effet du DNP sur l'oxydation du NADH et sur le $\Delta\Psi$ des HMEC-1 après 30' d'ischémie. Après 1h de recharge au TMRM 30 nM l'image en T0 est acquise. Le milieu complet est ensuite remplacé par le MSS et l'hypoxie est déclenchée. L'ischémie dure 30 min puis les cellules sont ré-incubées avec du milieu complet contenant du DNP à 200 μ M pendant 20 min en normoxie. Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM (n = 4). * = différence significative entre le contrôle et l'ischémie 30 minutes

Ces résultats montrent que l'ischémie commence à avoir un effet à partir de 15 minutes sur cellules in vitro. En effet, l'autofluorescence du NADH est préservée même après 20 minutes de DNP. Nous pouvons en conclure que l'activité du complexe I est fortement inhibée après 15 minutes d'ischémie. Ce résultat correspond à une étude précédente. Il a été constaté qu'un découplant (FCCP) n'a aucun effet sur la fluorescence du NADH après inhibition du complexe I (avec la roténone), contrairement au contrôle où la fluorescence du NADH s'effondre complètement (Dumas et coll., 2009). Par conséquent 15 minutes d'ischémie sont suffisants pour inhiber la chaîne respiratoire dans notre modèle. Cependant nous soupçonnons que l'inhibition de la chaîne respiratoire commence à partir de 10 minutes d'ischémie.

Concernant 60 minutes d'ischémie les expériences doivent être refaites avec un effectif plus important.

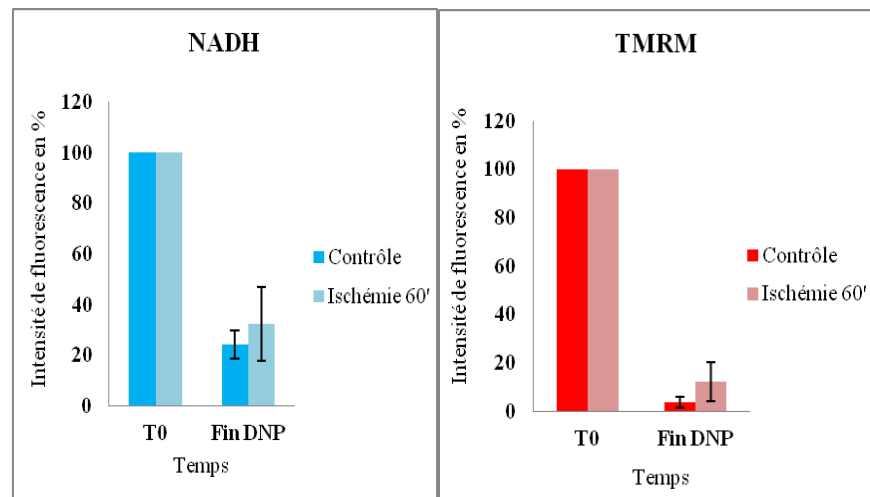


Figure 21: Effet du DNP sur l'oxydation du NADH et sur le $\Delta\Psi$ des HMEC-1 après 60' d'ischémie. Après 1h de recharge au TMRM 30 nM l'image en T0 est acquise. Le milieu complet est ensuite remplacé par le MSS et l'hypoxie est déclenchée. L'ischémie dure 60 min puis les cellules sont ré-incubées avec du milieu complet contenant du DNP à 200 μM pendant 20 min en normoxie. Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM (n = 2).

2.2 Réversibilité de l'ischémie reperfusion

Nous supposons qu'il faut au moins 10 minutes pour induire les conséquences de l'ischémie. Dans ce paragraphe, nous avons voulu savoir combien de temps peuvent durer les conséquences de l'ischémie, s'ils sont réversibles et si c'est le cas, quelle est la durée de reperfusion nécessaire pour les rendre réversibles dans notre modèle d'ischémie / reperfusion.

Nous avons essayé plusieurs temps d'ischémie, suivis de plusieurs temps de reperfusion. Ensuite, nous avons ajouté 200 μM de DNP afin d'analyser les variations de la concentration du NADH après 20 minutes de DNP par rapport à la fin de la reperfusion (T0). Le tableau 4 représente l'ensemble des essais effectués.

Nous constatons tout d'abord que 10 minutes d'ischémie suivis de 30 minutes de reperfusion induisent un effondrement de la



fluorescence du NADH ($< 10\%$ par rapport à T0). Nous pouvons supposer alors qu'en absence d'ischémie la fluorescence du NADH après le DNP serait $\leq 10\%$. Dans ce cas les 10 minutes d'ischémie qui ont induit une baisse de la fluorescence du NADH (33,4% par rapport à T0) dans la figure seraient suffisantes pour inhiber la chaîne respiratoire. Dans le tableau, nous constatons que l'autofluorescence du NADH diminue presque autant après 10, 60 et 90 minutes de reperfusion quand l'ischémie dure 10 minutes. Cependant le NADH s'effondre beaucoup plus après 30 minutes de reperfusion. Ces variations rendent compliquée l'interprétation de ces résultats.

Nous remarquons que seul l'essai avec 15 minutes d'ischémie suivies de 15 minutes de reperfusion semble être irréversible. L'ajout du DNP a provoqué une diminution moindre de l'autofluorescence du NADH par rapport à T0, comparativement aux autres essais. Donc, 15 minutes de reperfusion ne sont pas suffisantes pour lever l'inhibition de la chaîne respiratoire provoquée par l'ischémie. Quand nous avons prolongé la durée de la reperfusion à 30 et 60 minutes, nous observons que l'inhibition de la chaîne respiratoire induite par les 15 minutes d'ischémie redevient réversible.

Concernant 30 minutes d'ischémie, nous remarquons que quelque soit la durée de la reperfusion 30, 60 ou 120 minutes, les conséquences de l'ischémie sont réversibles. Cependant, ce résultat est incohérent avec celui obtenu après 90 minutes de reperfusion, ce qui rend difficile l'interprétation de ces résultats.

Pour tous les essais, le potentiel s'effondre complètement après le découplage avec le DNP.



fluorescence en (%)		10'isch/10' rprf	10'isch/30' rprf	10'isch/60' rprf	10'isch/90' rprf	15'isch/15' rprf	15' isch/30' rprf
NADH	T0	100	100	100	100	100	100
	Fin DNP	33	9	32	25	50	14
TMRM	T0	100	100	100	100	100	100
	Fin DNP	4	2	5	8	3	8
fluorescence en (%)		15'isch/60' rprf	30'isch/30' rprf	30'isch/30' rprf	30'isch/90' rprf	30'isch/120' rprf	
NADH	T0	100	100	100	100	100	
	Fin DNP	19	9	20	39	17	
TMRM	T0	100	100	100	100	100	
	Fin DNP	14	3	5	3	0,7	

Tableau 4: Etude de la réversibilité du phénomène d'ischémie/reperfusion après le DNP.

Après 1h de recharge au TMRM 30 nM le milieu complet est remplacé par le MSS et l'hypoxie est déclenchée. Ensuite pour la reperfusion, les cellules sont ré-incubées avec du milieu complet en normoxie puis à la fin de la reperfusion une image est acquise représentant T0. Enfin 200 μ M de DNP sont ajoutés pendant 20 min.

2.3 Discussion et perspective

Le 2, 4-dinitrophenol est un puissant découplant de l'oxydation phosphorylante qui induit une accélération du métabolisme et une augmentation de la consommation d'oxygène (Dunlop DM 1934). De plus, il est responsable de l'augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale aux protons (Mitchell and Moyle, 1967). Par conséquent, le potentiel mitochondrial s'effondre, l'oxydation mitochondriale augmente et l'ATP synthase est activée dans le sens d'hydrolyse de l'ATP. En effet, il a été montré que les ratios $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$, ATP/ADP diminuent suite à l'utilisation du DNP et le $\Delta\Psi$ s'effondre sur cellule intacte (Leverve et coll., 1998), autrement dit une diminution de l'autofluorescence du NADH due à sa forte oxydation en NAD^+ et une baisse de la fluorescence du TMRM. Nos résultats confirment ces observations, l'utilisation du DNP à



200 μ M sur les cellules HMEC-1 induit à un effondrement du $\Delta\Psi$ et une diminution de plus de 70% de l'autofluorescence du NADH. Plusieurs auteurs ont montré que les perturbations fonctionnelles de la mitochondrie n'apparaissent qu'au-delà de 10 minutes d'ischémie. Nos résultats ont confirmé ces données puisque l'utilisation post-ischémique du DNP pour 5 et 10 minutes d'ischémie conduit au même résultat que le contrôle (Effondrement du NADH et du TMRM). Cependant, à partir de 15 minutes d'ischémie nous avons constaté qu'il y a un changement par rapport au contrôle concernant l'autofluorescence du NADH. En effet, l'oxydation du NADH est moins importante à partir de 15 minutes d'ischémie. Une explication est possible : pendant l'ischémie la chaîne respiratoire fonctionne au ralenti et une acidose s'installe, ce qui constitue une protection contre les dommages de l'ischémie. À la reperfusion, l'oxydation du NADH augmente à nouveau, les ROS et le Ca^{2+} s'accumulent et le pH est rétabli, ce qui est responsable des dommages observés à la reperfusion. Cependant, plusieurs auteurs ont montré que l'ajout du DNP à la reperfusion permet de maintenir l'acidité du pH et la faible quantité de ROS et de Ca^{2+} (Elz and Nayler, 1988, Serrano et coll., 1999). Donc malgré l'ajout du DNP qui provoque normalement l'accélération de la respiration mitochondriale, l'oxydation mitochondriale est ralentie si l'ajout du découplant est précédé d'une phase d'ischémie. Cela pourrait expliquer le maintien de l'autofluorescence du NADH après 20 min de DNP (à partir de 15 minutes d'ischémie) par rapport au contrôle. Nous suggérons que sur cellules *in vitro* les dommages de l'ischémie apparaissent à partir de 15 minutes. Cependant, l'effet du DNP sur l'autofluorescence du NADH peut varier d'une expérience à une autre. Donc, nous supposons que les modifications fonctionnelles liées à l'ischémie commencent à partir de 10 minutes d'ischémie



dans notre modèle cellulaire. Concernant 60 minutes d'ischémie, on ne peut malheureusement pas conclure sur les résultats, puisqu'ils sont contradictoires. Nous envisageons de refaire ces expériences. L'ensemble des résultats incohérents que nous avons eu, peut être dû aux variations de la pression de l'oxygène pendant l'ischémie qui ont perturbé les conditions d'anoxie. Donc l'ischémie a induit autre chose que nous n'arrivons pas à expliquer.

En ce qui concerne la réversibilité du phénomène d'ischémie, des auteurs ont montré que les dommages sont réversibles après 20 minutes de reperfusion, si l'ischémie dure 10 minutes (Shen and Jennings, 1972). Certains chercheurs ont montré que les conséquences de l'ischémie reperfusion commencent à devenir irréversibles à partir de 20 minutes d'ischémie (Miura M et al 1991), d'autres ont montré que les dommages de 60 minutes d'ischémie sont presque totalement réversibles après 50 minutes de reperfusion (Mulch et coll., 1979). Ainsi les études sur la réversibilité du phénomène d'ischémie restent variées et nombreuses. Nos résultats ont montré que 15 minutes d'ischémie sont suffisantes pour induire des modifications fonctionnelles dans la chaîne respiratoire, qui ne peuvent être réversibles qu'au delà de 15 minutes de reperfusion. Cependant, ces résultats n'ont pas été reproduits, d'où l'importance d'augmenter l'effectif de résultats, avant d'établir des conclusions concernant la régulation du phénomène d'ischémie / reperfusion dans notre modèle expérimental.

Ensuite nous avons étudié les effets de l'ischémie reperfusion observés sur les cellules HMEC-1 et concernant l'ouverture du PTP et sa prévention par la CsA sur un autre type cellulaire les « INS-1 ».



3 Etudes de l'ouverture du PTP sur les cellules INS-1

3.1 Analyse de la perméabilité de transition sur cellules adhérentes

Les INS-1 (insulinoma cell 1) sont des cellules cancéreuses issues par transformation induite chez le rat et qui représentent les mêmes caractéristiques que les cellules β de Langerhans. Elles sont utilisées dans le cadre des études portant sur le diabète de type I.

Le diabète de type I est une maladie auto-immune, aboutissant à une destruction totale des cellules β des îlots de Langerhans (Ricordi et coll., 1992). Par conséquent, une grande défaillance en insuline s'installe et induit des phénomènes d'hyperglycémie. La transplantation de cellules β est une alternative à l'insulinothérapie (Oberholzer and Morel, 2002). Cependant, la survie des îlots lors de la transplantation semble être fortement affectée par les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS), se traduisant principalement par des dysfonctionnements liés au phénomène d'ischémie reperfusion et l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) causant ainsi la mort cellulaire (l'apoptose) (Vollmar et coll., 1999).

Les conséquences probables de cette greffe sont étudiées sur un modèle cellulaire proche des îlots β de Langerhans, les INS-1 (Insulin Secreting Cell).

Les INS-1, sont placées sur une lamelle dans la chambre fermée à hypoxie après 60 minutes de recharge au TMRM 30nM à l'étuve. Une image est alors acquise représentant la condition basale T0 puis l'expérience d'ischémie suivie de reperfusion est démarrée. Les paramètres observés sont le NADH et le potentiel membranaire pour mettre en évidence l'ouverture du PTP durant ce phénomène. La figure 23 représente la variation de l'intensité de fluorescence du NADH et TMRM à la fin de l'ischémie puis à la fin de la reperfusion par rapport à T0.



Nous remarquons dans la figure 22 que le NADH diminue fortement à l'ischémie puis augmente à la reperfusion à un niveau moindre par rapport à l'intensité de base (témoin), alors que le TMRM reste plus ou moins stable à l'ischémie et diminue fortement (jusqu'à 30%) à la reperfusion. La dispersion de la sonde TMRM à T0 n'est pas homogène cela est dû au fait que les cellules INS-1 poussent en amont ce qui fait que la sonde ne peut pas atteindre les cellules au centre.



T0 T60 ischemie T60 reperfusion

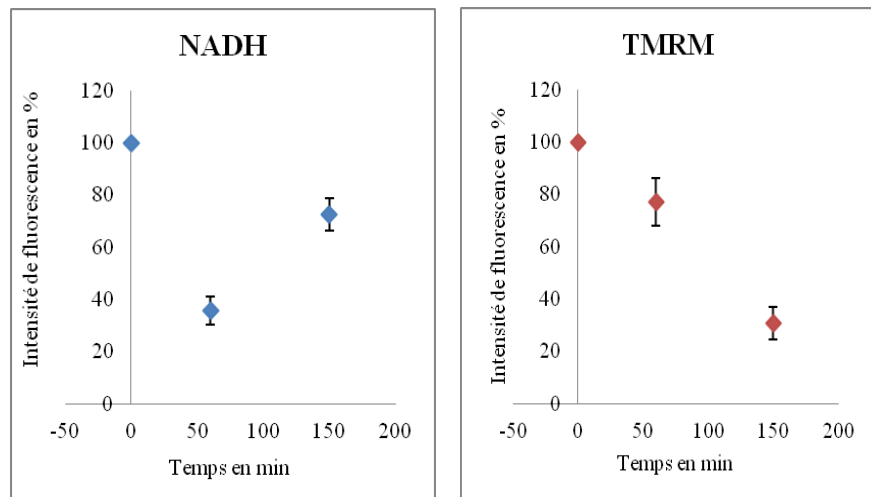
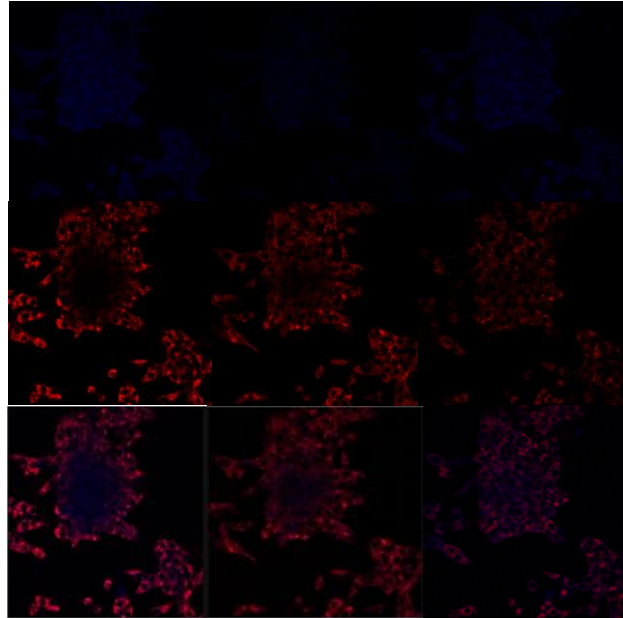


Figure 22: Variation de l'intensité de fluorescence en NADH et TMRM en ischemie reperfusion. Les cellules INS-1 sont chargée avec 30 nM de TMRM pendant 1h. Ensuite elles sont mises en ischemie pendant 60 min, puis en reperfusion pendant 1h. Les valeurs sont représentées en moyenne + SEM (n = 4)



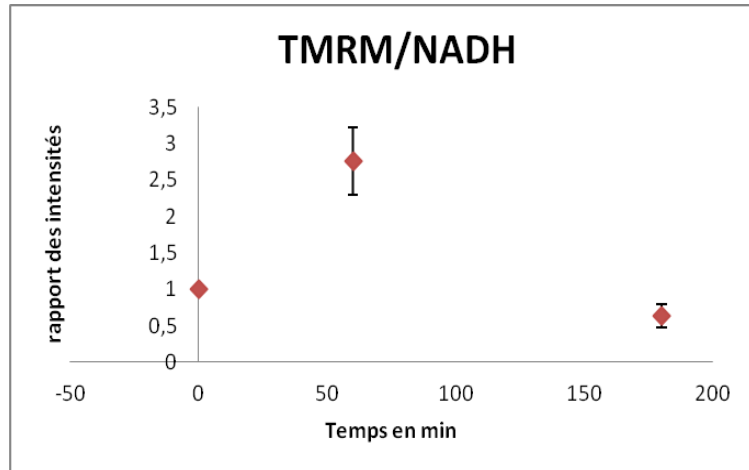


Figure 23 : Représentation des rapports d'intensité de fluorescence du TMRM/NADH.

L'overlay représente le rapport de l'intensité de fluorescence du TMRM sur celle du NADH. Nous observons que ce rapport augmente à la fin de l'ischémie (2,15 par rapport à 1 à T0) puis diminue à la fin de la reperfusion (0,42 par rapport à T0), avec la présence de certaines cellules qui se sont complètement dépolarisées tout en préservant une autofluorescence du NADH considérable (cellules bleues) (figure 22, 23). Cela renseigne sur l'ouverture du PTP qui se traduit par un effondrement du $\Delta\Psi$ et une augmentation du NADH extramitochondrial.

Pour confirmer ce résultat, nous avons utilisé la CsA afin de prévenir l'ouverture du PTP.



T0 T60 ischémie T60 reperfusion

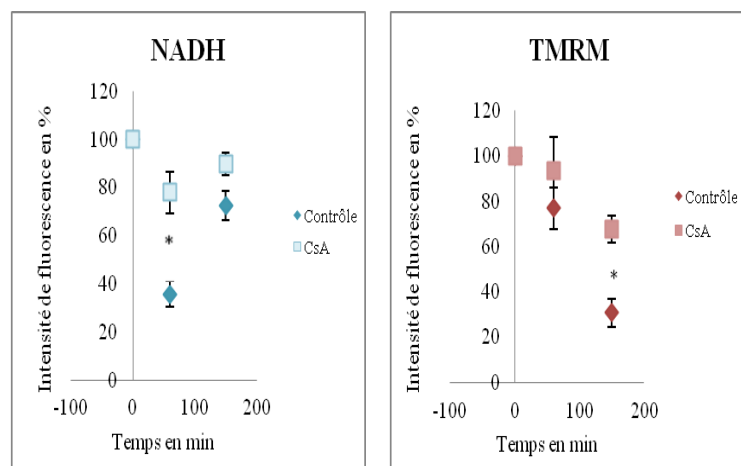
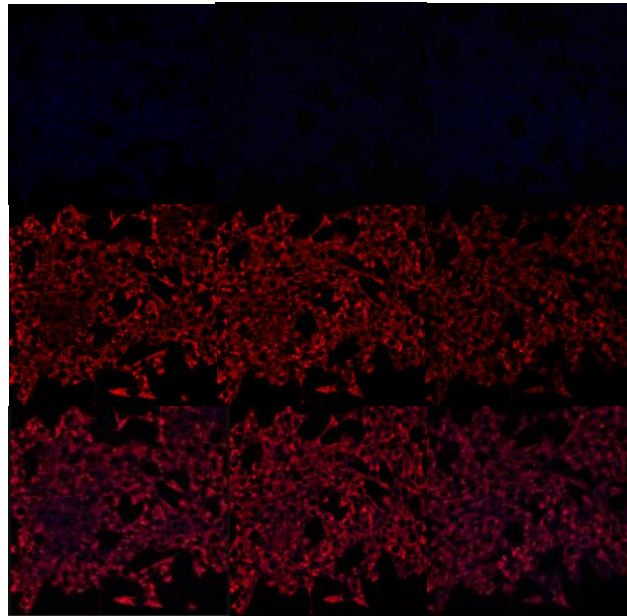


Figure 24 : Variation de l'intensité de fluorescence en NADH et TMRM en présence de CsA 1 μ M. Les cellules INS-1 sont chargée avec 30 nM de TMRM et 1 μ M de CsA pendant 1h. Ensuite elles sont mises en ischémie pendant 60 min, puis en reperfusion pendant 1h. Les valeurs sont représentées en moyenne + SEM (n = 4) * = différence significative entre le contrôle et la CsA



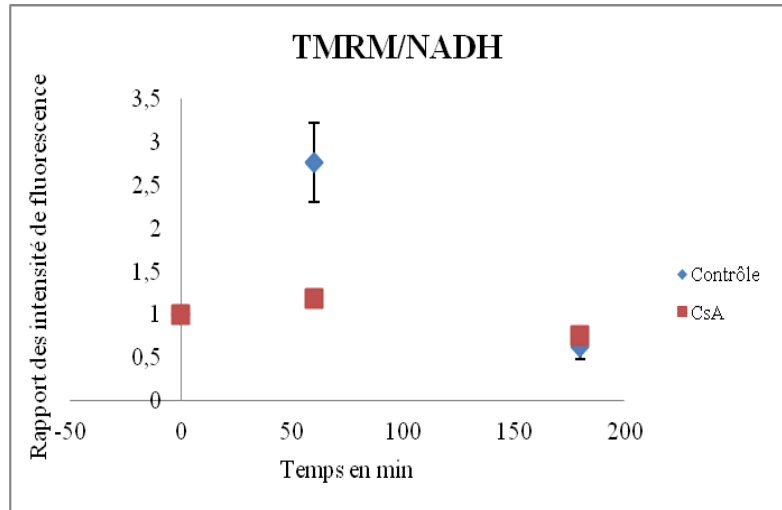


Figure 25 : Représentation des rapports de l'intensité de fluorescence du TMRM/NADH.

La figure 24 nous montre que le NADH reste constant tout le long de l'expérience, le $\Delta\Psi$ est plus ou moins stable avec une faible diminution à la fin de la reperfusion. Cette baisse est probablement due au rinçage des cellules par le changement du milieu d'une étape à une autre. La diminution de l'autofluorescence du NADH observée pendant l'ischémie dans la figure 23 a été prévenue aussi par la CsA. Ainsi, l'ischémie induit des modifications qui sont responsables de la diminution de la fluorescence du NADH et qui sont liées au PTP. L'overlay une légère variation du rapport NADH/TMRM par rapport à T0 (0,75 par rapport à 1 à T0) (figure 25). Par conséquent, nous pouvons dire que la CsA agit bien comme inhibiteur du PTP sur les cellules INS-1 puisque le potentiel est préservé et il n'y a pas d'augmentation de l'autofluorescence du NADH et que ce résultat confirme l'ouverture du PTP observée dans la figure 22.



3.2 Etude de la rétention calcique mitochondriale dans le cadre de l'ischémie / reperfusion sur les cellules INS-1

Nous avons étudié l'ouverture du PTP sur cellules intactes suite à une ischémie reperfusion par microscopie confocale, dans ce chapitre nous avons déterminé l'effet de l'ischémie et de la reperfusion sur l'ouverture du PTP sur cellules perméabilisées.

Nous avons mis au point un protocole pour induire une ischémie chez les INS-1 en suspension suivie d'une reperfusion. Les cellules ont été partagées en plusieurs groupes en fonction du traitement qu'elles subissent, et chaque groupe contenait 5 millions de cellules qui ont été placées dans un tube fermé et relié aux bouteilles de gaz (95%O₂ + 5%CO₂ et 95%N₂ + 5%CO₂). Tout d'abord les différents groupes ont été gazés au mélange O₂ + CO₂ pendant 15 minutes, puis ils ont été mis en hypoxie dans un milieu sans substrat pendant une heure et enfin ils ont été reperfusés au mélange O₂ + CO₂ dans un milieu complet pendant 1 heure avant de mesurer la rétention calcique.

La figure 26 représente 6 groupes de traitements différents dont la rétention calcique a été mesurée juste après la phase de l'ischémie.

Nous remarquons que le groupe contrôle (sham) nécessite 70,3 μM de Ca²⁺ externe pour ouvrir le PTP, cette ouverture est retardée en présence du CsA qui augmente la capacité de rétention calcique des ins-1 à 125,7 μM de Ca²⁺. Le groupe ischémie montre une capacité de rétention calcique moins importante 41,1 μM de Ca²⁺ qui est significativement inférieur à celle du sham. L'ouverture du PTP chez le groupe ischémie est inhibée comme prévue avec de la CsA quelque soit le moment de son utilisation (pendant ou après l'ischémie ou les deux) et retrouve approximativement la valeur du contrôle.



Par conséquent on peut dire que l'ischémie est responsable de l'activation de la perméabilité de transition qui est prévenue par la CsA.

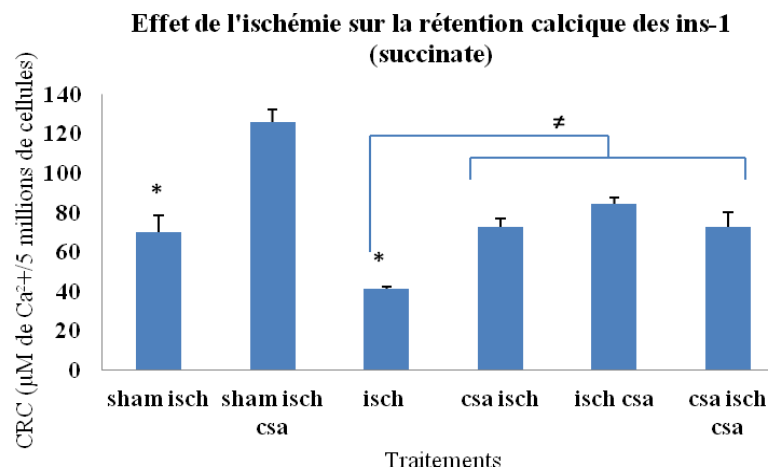


Figure 26 : Effet de l'ischémie sur la rétention calcique des cellules INS-1. Les cellules ont subi une ischémie pendant 1h, on distingue le groupe contrôle (Sham) qui a été gazé à l'O₂ et CO₂ seulement pendant 1h15 min avec CsA (sham CsA) ou sans au moment de la mesure de la rétention calcique. Un groupe ischémie avec CsA pendant le conditionnement (CsA isch) ou après (isch CsA) ou pendant et après (CsA isch CsA) puis le groupe ischémie sans CsA (isch). Les mesures de la rétention calcique ont été effectuées dans un tampon CRC à pH 7,4. Les valeurs ont été représentées en moyenne + SEM (n = 6, P < 0,05). * = différence significative entre le sham et l'isch. ≠ = différence significative entre les groupes isch avec et sans CsA.

La figure 27 représente 6 groupes de traitements différents déterminant l'effet de la reperfusion sur la capacité de rétention calcique sur les cellules INS-1 perméabilisées et en suspension énergisées en succinate.



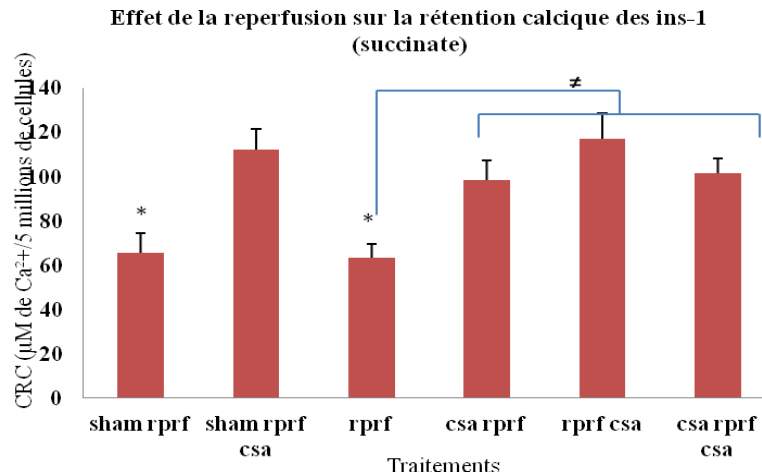


Figure 27 : Effet de la reperfusion sur la rétention calcique des ins-1. Les cellules ont subi une ischémie pendant 1h, suivie de 1h de reperfusion, on distingue le groupe contrôle (Sham) qui a été gazé à l'O₂ et CO₂ seulement pendant 2h15 min avec CsA (sham CsA) ou sans au moment de la mesure de la rétention calcique. Un groupe reperfusion avec CsA pendant le conditionnement (CsA rprf) ou après (rprf CsA) ou pendant et après (CsA rprf CsA) puis le groupe ischémie sans CsA (rprf). Les mesures de la rétention calcique ont été effectuées dans un tampon CRC à pH 7,4. Les valeurs ont été représentées en moyenne + SEM (n = 6, P < 0,05). * = différence significative entre le sham et la rprf. ≠ = différence significative entre les groupes rprf avec et sans CsA.

Le résultat montre qu'il n'y a pas de différence significative entre la capacité de rétention calcique du groupe reperfusion par rapport au sham (63,3 µM Ca²⁺ et 65,6 µM Ca²⁺ respectivement). Cette capacité de rétention calcique est augmentée en présence de CsA aussi bien chez les groupes reperfusion (CsA rprf, rprf CsA et CsA rprf CsA) que chez le sham à des concentrations de Ca²⁺ externe presque équivalentes (98,3 µM, 117µM, 101,6µM et 112 µM de Ca²⁺ respectivement).

Nous pouvons en conclure d'une part que le traitement ischémie suivie de reperfusion n'a aucun effet sur la perméabilité de transition mitochondriale, puisque qu'il ne présente aucune différence avec le sham qui n'a subi aucun traitement. D'autre part, la phase de reperfusion permet de corriger la perturbation induite par l'ischémie et qui est responsable de l'activation du PTP, puisqu'à la reperfusion la capacité de rétention calcique a augmenté significativement à par rapport à l'ischémie figure 28.



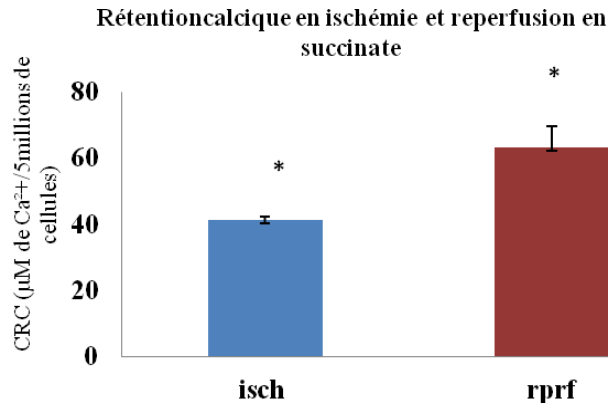


Figure 28 : Comparaison entre la rétention calcique à l'ischémie et à la reperfusion.

* = différence significative entre la rétention calcique en ischémie en en reperfusion

Par la suite nous avons effectué les mêmes expériences que les précédentes mais en glutamate/malate.

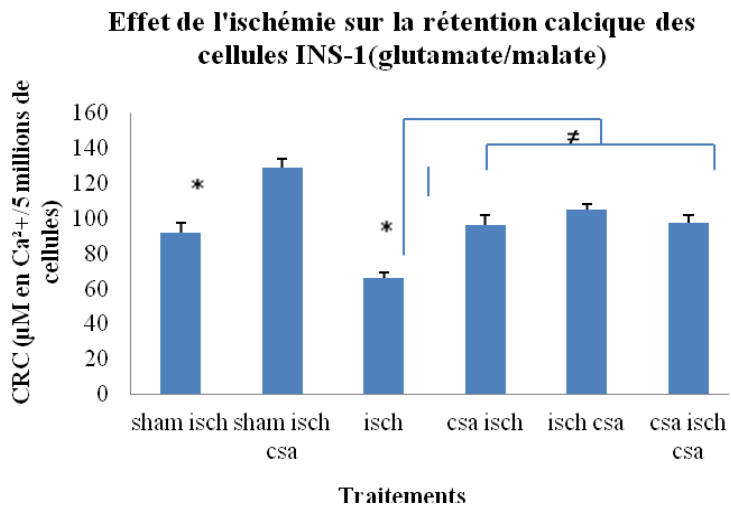


Figure 29 : Effet de l'ischémie sur la rétention calcique des cellules INS-1 en glutamate/malate. Les cellules ont subi une ischémie pendant 1h, on distingue le groupe contrôle (Sham) qui a été gazé à l'O₂ et CO₂ seulement pendant 1h15 min avec CsA (sham CsA) ou sans au moment de la mesure de la rétention calcique. Un groupe ischémie avec CsA pendant le conditionnement (CsA isch) ou après (isch CsA) ou pendant et après (CsA isch CsA) puis le groupe ischémie sans CsA (isch). Les mesures de la rétention calcique ont été effectuées dans un tampon CRC à pH 7,4. Les valeurs ont été représentées en moyenne + SEM (n = 3, P < 0,05). * = différence significative entre le sham et l'isch. ≠ = différence significative entre les groupes isch avec et sans CsA.



Nous remarquons dans la figure 29 que le groupe ischémie montre une capacité de rétention calcique significativement inférieure par rapport au sham (66 μM et 91,6 μM respectivement). L'induction du PTP nécessite plus de Ca^{2+} externe en présence de CsA, aussi bien chez le sham (129 μM de Ca^{2+}) que chez le groupe ischémie en présence de CsA (96,3 μM , 105,2 μM et 97,3 μM de Ca^{2+} pour CsA isch, isch CsA et CsA isch CsA respectivement). Nous constatons que l'inhibition de la perméabilité de transition par la CsA chez le groupe ayant subi une ischémie permet presque de retrouver les valeurs du contrôle. Nous pouvons en conclure que l'ischémie induit l'ouverture du PTP.

Quand l'ischémie est suivie d'une phase de reperfusion, il se produit d'autres modifications dans la rétention calcique représentées dans la figure 30

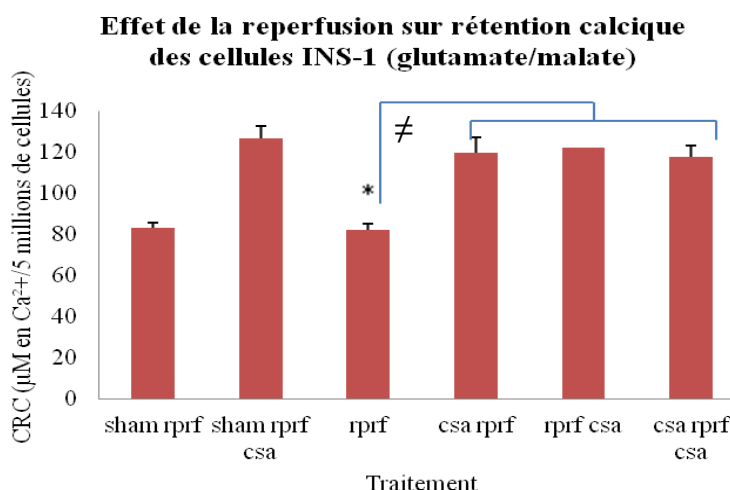


Figure 30 : Effet de l'ischémie sur la rétention calcique des cellules INS-1 en glutamate/malate. Les cellules ont subi une ischémie pendant 1h, on distingue le groupe contrôle (Sham) qui a été gazé à l' O_2 et CO_2 seulement pendant 1h15 min avec CsA (sham CsA) ou sans au moment de la mesure de la rétention calcique. Un groupe ischémie avec CsA pendant le conditionnement (CsA isch) ou après (isch CsA) ou pendant et après (CsA isch CsA) puis le groupe ischémie sans CsA (isch). Les mesures de la rétention calcique ont été effectuées dans un tampon CRC à pH 7,4. Les valeurs ont été représentées en moyenne + SEM (n = 3, P < 0,05). \neq = différence significative entre le sham et la rprf. * = différence significative entre les groupes rprf avec et sans CsA.



Nous constatons d'après cet histogramme, que les concentrations en Ca^{2+} externe nécessaires pour induire le PTP ne présentent aucune différence significative entre le sham et le groupe reperfusion (83,3 μM et 82,3 μM respectivement). L'activation du PTP est retardée en présence de CsA aussi bien chez le sham (126,6 μM Ca^{2+}) que chez le groupe reperfusion (119,6 μM , 122 μM et 117,3 μM Ca^{2+} pour CsA rprf, rprf CsA et CsA rprf CsA respectivement). A la reperfusion la capacité de rétention calcique est augmentée significativement par rapport à l'ischémie figure 31.

Ainsi, en glutamate/malate aussi bien qu'en succinate, l'ouverture du PTP induite par l'ischémie est prévenue par la CsA quelque soit le moment de son utilisation et devient réversible grâce à la reperfusion.

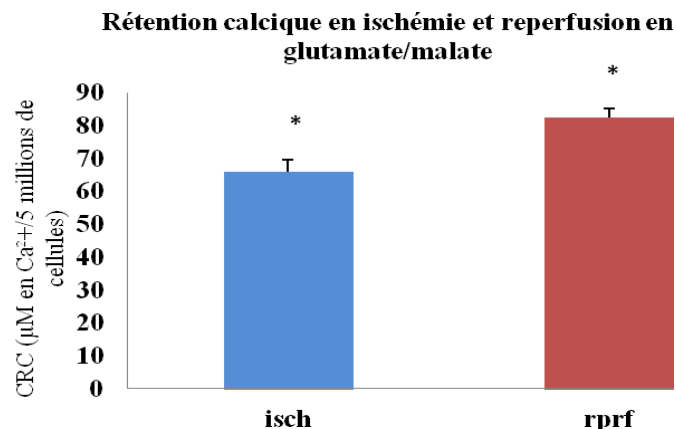


Figure 31: Comparaison entre la rétention calcique à l'ischémie et à la reperfusion.

*= différence significative entre la rétention calcique en ischémie en en reperfusion



3.3 Discussion et perspectives

L'étude de perméabilité de transition sur les cellules INS-1 a montré différentes modifications dues à l'ischémie / reperfusion et qui sont liées au PTP. Tout d'abord, sur cellules intactes, nous avons constaté que l'autofluorescence du NADH diminue pendant l'ischémie et que cette diminution est prévenue par la CsA, alors que la fluorescence du TMRM reste inchangée avec ou sans CsA. Par conséquent, la modification de la fluorescence du NADH pourrait être interprétée comme une ouverture transitoire du PTP. Cependant, nous avons vu chez les cellules HMEC-1 que l'ouverture transitoire du PTP est accompagnée plutôt d'une augmentation de la fluorescence du NADH. Nous pouvons suggérer que chez les cellules INS-1, il n'y a probablement pas de réserve de substrat qui pourrait maintenir le flux de production du NADH après l'ouverture du PTP. Par conséquent le flux de production du NADH est inférieur à celui de sa consommation, et le NADH est vite consommé après sa sortie de la mitochondrie malgré l'inhibition de la chaîne respiratoire. Nous avons aussi constaté qu'à la reperfusion le potentiel de membrane s'effondre et la fluorescence du NADH augmente et que ces modifications sont prévenues par la CsA. Ce résultat rappelle celui obtenu sur les cellules HMEC-1 à la fin de la reperfusion, ce qui suggère une ouverture définitive du PTP chez les cellules INS-1 aussi.

Notre objectif dans ce travail est de visualiser l'ouverture du PTP dans un modèle cellulaire, en mesurant deux paramètres : la variation de la fluorescence du NADH et celle du TMRM. Cependant, nous avons constaté qu'en fonction du type cellulaire utilisé les variations liées à la fluorescence du NADH varient, alors que celles liées à la fluorescence du TMRM restent inchangées. Par conséquent, il est probable que la mesure de la variation de la



fluorescence du NADH n'est pas un paramètre directement lié à l'ouverture du PTP, et que seule la variation du potentiel, peut nous renseigner directement sur l'ouverture ou non du PTP dans nos conditions expérimentales.

Nos résultats sur cellules perméabilisées ont montré d'une part que l'induction du PTP se produit pendant l'ischémie et d'autre part que cette induction est prévenue par la CsA. Ce résultat confirme nos observations sur les cellules HMEC-1, qui montrent que l'ouverture du PTP se produit également avant la reperfusion et quelle est inhibée par la CsA. Ces résultats restent contradictoires par rapport à plusieurs études qui ont prouvé que l'ischémie constitue plutôt une phase où les dommages restent discrets (Bernardi, 1992, Maddaford and Pierce, 1997). Ensuite nous avons montré que la reperfusion ne provoque aucune perturbation cellulaire qui active le PTP, et contre toute attente, l'induction de la perméabilité de transition observée pendant l'ischémie est corrigée à la reperfusion. Plusieurs études ont montré que les dommages de l'ischémie peuvent être réversibles, s'ils sont suivis de périodes de reperfusion prolongées, pendant lesquelles il se produit une ouverture du PTP (Mulch et coll., 1979). Dans nos résultats, nous avons représenté seulement la valeur de la capacité de rétention calcique à t60 de reperfusion. Il est probable alors qu'une ouverture du PTP ait eu lieu avant la fin de la reperfusion. Cependant, nous avons effectué d'autres mesures à t20 et à t30 de reperfusion (résultat ne figurant pas dans ce travail), qui nous ont montré qu'à ces temps intermédiaires de reperfusion, nous avons le même résultat obtenu à t60 de reperfusion. Par conséquent, nous supposons que dans notre modèle le PTP reste fermé pendant la phase de reperfusion, qui constitue alors une étape de correction des dommages dus à l'ischémie.

Nous pouvons conclure que dans le cas de cellules perméabilisées, la reperfusion représente qu'une étape bénéfique



qui permet de corriger la baisse de la rétention calcique induite par l'ischémie.

Nos résultats ont également montré que l'utilisation du glutamate / malate comme substrat, protège plus contre l'induction du PTP que l'utilisation du succinate. Ces résultats s'opposent à d'autres de la littérature qui montrent que l'induction du PTP est plus facile en glutamate / malate qu'en succinate (Chavez et coll., 2002, Fontaine et coll., 1998). En effet, plusieurs auteurs ont proposé que le NADH sous sa forme réduite, pourrait freiner l'induction de la transition de perméabilité. Par conséquent, l'utilisation du succinate plus la roténone (le NADH est préservé sous sa forme réduite), nécessite plus de Ca^{2+} pour l'ouverture du PTP que l'utilisation du glutamate / malate comme substrat (le NADH est oxydé). La différence que présentent nos résultats par rapport à la littérature, est probablement due d'une part, la possibilité que dans ce modèle cellulaire la quantité du NADH est très réduite (le flux de consommation du NADH est supérieur à celui de sa production). D'autre part, au fait que nous n'avons pas inhibé le complexe I (par la roténone) en présence du succinate comme substrat. Par conséquent, cela a du induire un phénomène de flux reverse, augmentant la production des ROS, et favorisant ainsi l'ouverture du PTP.

Nous constatons dans ce travail, qu'en fonction du type cellulaire utilisé et des conditions expérimentales (cellules perméabilisées ou pas), les résultats obtenus sur l'ouverture du PTP dans le cadre de l'ischémie / reperfusion ne sont pas les mêmes. Par conséquent, nous ne pouvons pas établir une seule et unique conclusion quant à l'implication du PTP dans la régulation du phénomène d'ischémie / reperfusion dans la cellule. Cette variation dans les résultats pourrait probablement être due aux fuites d'oxygène dans notre système sur cellules intactes, d'où l'intérêt de faire une étude comparative entre le phénomène d'ischémie /



reperfusion en hypoxie et en anoxie totale. De plus une étude *in vivo* nous permettrait d'une part, d'avoir probablement plus d'explications quant à la diversification de nos résultats sur cellule, et de valider ainsi nos essais *in vitro*. D'autre part, elle nous permettrait d'avoir plus d'éléments quant à l'implication réelle du PTP dans la régulation du phénomène d'ischémie / reperfusion.



CONCLUSION



Conclusion

La mitochondrie constitue le centre de régulation de différents processus physiologiques impliqués dans le fonctionnement de différents tissus et organes. La faible perméabilité de sa membrane interne constitue un élément clé qui contrôle le bon fonctionnement de la mitochondrie. La transition de cette perméabilité membranaire a depuis longtemps été associée à différentes pathologies. Cette transition de perméabilité est médiée par l'ouverture d'un pore de transition de perméabilité le « PTP ». Ce pore représente un canal de haute conductance qui permet le passage de molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1,5 KDa. L'ouverture du PTP peut être régulée par le stress oxydant ou le pH, mais le principal régulateur est le calcium. L'activation du PTP peut être la cause ou la conséquence d'un ensemble de dysfonctionnements mitochondriaux (chute du potentiel mitochondrial, inhibition de la chaîne respiratoire, inhibition de la synthèse d'ATP) qui peuvent induire à la mort cellulaire. Pour toutes ces raisons, l'étude de la structure et la compréhension du fonctionnement du PTP a suscité l'intérêt de plusieurs études. Le principal objectif de ces études était de déterminer l'implication du PTP dans différentes pathologies, afin de les prévenir ou les corriger grâce à l'inhibition de l'ouverture du PTP. Plusieurs travaux ont donné des résultats intéressants et exploitables quant à l'amélioration des essais thérapeutiques visant à corriger ou prévenir les dommages de l'induction du PTP. Grâce à ces travaux, différentes molécules (la cyclosporine A, la roténone, et d'autres) et des processus thérapeutiques (pré et post-conditionnement ischémiques) ont été mise en évidence pour inhiber le PTP.

Dans ce travail, nous avons eu pour objectif de visualiser l'ouverture du PTP dans des conditions d'ischémie / reperfusion



sur cellules intactes (HMEC-1 et INS-1) et d'étudier son implication dans ce phénomène d'ischémie.

Dans ce travail nous avons réussi à visualiser pour la première fois l'ouverture du PTP sur cellules intactes *in vitro* dans un modèle d'ischémie / reperfusion par microscopie confocale. Nous avons utilisé un modèle d'ischémie / reperfusion simulée à celui du tissu ou de l'organe, sur des cellules intactes et perméabilisées. Nous avons montré que sur cellules intactes les (HMEC-1), le PTP peut s'ouvrir de façon transitoire. En effet, nous avons remarqué à la fin de l'ischémie que le NADH sort de la mitochondrie sans qu'il ait une chute considérable du potentiel membranaire. Ensuite, le $\Delta\Psi$ a continué de diminuer après l'ischémie, jusqu'à l'effondrement total à la fin de la reperfusion. Cette diminution n'est pas corrigée par la recharge en TMRM à la fin de la reperfusion, ce qui confirme que les modifications observées sont dues au phénomène d'ischémie / reperfusion. De plus, nous avons montré que ces modifications sont transitoires ou définitives sont prévenues par les inhibiteurs du PTP (cyclosporine A et roténone) que ce soit à l'ischémie ou à la reperfusion. Par conséquent, les modifications obtenues sont bien liées au PTP. La prévention des dommages de l'ischémie grâce à la roténone montre que le complexe I est impliqué dans la régulation des modifications causées par l'ischémie / reperfusion dans notre modèle. Nous avons aussi montré que les dommages de l'ischémie peuvent commencer à partir de 10 minutes d'ischémie et que 15 minutes d'ischémie sont largement suffisantes pour les induire.

Dans l'autre modèle cellulaire que nous avons utilisé (les cellules INS-1), nos résultats ont montré de la même manière que les cellules HMEC-1, que l'ouverture définitive du PTP a lieu pendant la reperfusion et est prévenue par la CsA. Cependant, nous n'avons observé aucune sortie du NADH pendant l'ischémie. Néanmoins, les modifications de la fluorescence du NADH



pendant l'ischémie dans les cellules INS-1 sont bien prévenues par la CsA. Par conséquent, dans ces cellules, l'ischémie induit un changement lié au PTP dont nous ignorons la nature. Cette diversité de nos résultats, nous a amené à remettre en question l'utilisation de la mesure des variations de la fluorescence du NADH comme paramètre direct, renseignant sur l'ouverture ou non du PTP dans nos conditions expérimentales.

Sur cellules perméabilisées, nous avons montré que la rétention calcique diminue considérablement à la fin de l'ischémie. Cette diminution - contrairement à nos résultats sur cellules intactes - est complètement corrigée par la reperfusion. Par conséquent, l'implication du PTP dans la régulation du phénomène d'ischémie / reperfusion change en fonction de plusieurs paramètres (type de cellules, conditions expérimentales), d'où l'importance de valider ces résultats par une étude *in vivo*, qui pourrait nous apporter plus d'éléments de réponse quant à l'implication réelle du PTP dans le phénomène d'ischémie / reperfusion.



Références bibliographiques

Allen DG and Xiao XH. Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res*, 57: 934-941, 2003.

Ambrosio G, Zweier JL, Duilio C, Kuppusamy P, Santoro G, Elia PP, Tritto I, Cirillo P, Condorelli M, Chiariello M, and et al. Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem*, 268: 18532-18541, 1993.

Argaud L and Ovize M. [Myocardial metabolism abnormalities during ischemia and reperfusion]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 93: 87-90, 2000.

Argaud L, Prigent AF, Chalabreysse L, Loufouat J, Lagarde M, and Ovize M. Ceramide in the antiapoptotic effect of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286: H246-251, 2004.

Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, and Wollheim CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*, 130: 167-178, 1992.

Azzi A and Azzone GF. Potassium-Transport-Linked Swelling Induced by Valinomycin in Liver Mitochondria. *Biochem J*, 96: 1C-2C, 1965.

Azzone GF and Azzi A. Volume changes in liver mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 53: 1084-1089, 1965.

Azzone GF, Pozzan T, Massari S, and Bragadin M. Proton electrochemical gradient and rate of controlled respiration in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 501: 296-306, 1978.

Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, and Molkentin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 434: 658-662, 2005.



Baker JE and Kalyanaraman B. Ischemia-induced changes in myocardial paramagnetic metabolites: implications for intracellular oxy-radical generation. *FEBS Lett*, 244: 311-314, 1989.

Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, and Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem*, 280: 18558-18561, 2005.

Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir MY, Fontaine E, Rigoulet M, and Leverve XM. The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr*, 38: 33-42, 2006.

Becker LB, vanden Hoek TL, Shao ZH, Li CQ, and Schumacker PT. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am J Physiol*, 277: H2240-2246, 1999.

Berman SB and Hastings TG. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem*, 73: 1127-1137, 1999.

Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*, 79: 1127-1155, 1999.

Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem*, 267: 8834-8839, 1992.

Bernardi P and Bonaldo P. Dysfunction of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the pathogenesis of collagen VI muscular dystrophies. *Ann N Y Acad Sci*, 1147: 303-311, 2008.

Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F, and Forte MA. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J*, 273: 2077-2099, 2006.

Beutner G, Ruck A, Riede B, Welte W, and Brdiczka D. Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett*, 396: 189-195, 1996.



Biburger M and Tiegs G. Alpha-galactosylceramide-induced liver injury in mice is mediated by TNF-alpha but independent of Kupffer cells. *J Immunol*, 175: 1540-1550, 2005.

Bolli R. Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("stunned myocardium"). *J Am Coll Cardiol*, 12: 239-249, 1988.

Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, and McCay PB. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res*, 65: 607-622, 1989.

Bolli R. Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2:249-68 2:249-68, 1991.

Borutaite V and Brown GC. Mitochondria in apoptosis of ischemic heart. *FEBS Lett*, 541: 1-5, 2003.

Borutaite V, Jekabsone A, Morkuniene R, and Brown GC. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, 35: 357-366, 2003.

Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, and Cornwall EJ. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J*, 392: 353-362, 2005.

Brand MD, Turner N, Ocloo A, Else PL, and Hulbert AJ. Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem J*, 376: 741-748, 2003.

Broekemeier KM, Dempsey ME, and Pfeiffer DR. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem*, 264: 7826-7830, 1989.

Cavero I, Djellas Y, and Guillon JM. Ischemic myocardial cell protection conferred by the opening of ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovasc Drugs Ther*, 9 Suppl 2: 245-255, 1995.

Cesura AM, Pinard E, Schubeneil R, Goetschy V, Friedlein A, Langen H, Polcic P, Forte MA, Bernardi P, and Kemp JA. The



voltage-dependent anion channel is the target for a new class of inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*, 278: 49812-49818, 2003.

Chauvin C, De Oliveira F, Ronot X, Mousseau M, Leverve X, and Fontaine E. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem*, 276: 41394-41398, 2001.

Chavez E, Zazueta C, Correa F, Garcia N, Aviles C, Robles SG, Rodriguez CD. Modulation by substrates of the protective effect of cyclosporin A on mitochondrial damage. *Life Sc.* 70(20):2413-20, 2002.

Chen Q, Camara AK, Stowe DF, Hoppel CL, and Lesnefsky EJ. Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292: C137-147, 2007.

Chernyak BV and Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur J Biochem*, 238: 623-630, 1996.

Connern CP and Halestrap AP. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. *Biochem J*, 302 (Pt 2): 321-324, 1994.

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 341 (Pt 2): 233-249, 1999.

Crompton M and Costi A. A heart mitochondrial Ca²⁺(+)-dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem J*, 266: 33-39, 1990.

Crompton M, Costi A, and Hayat L. Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J*, 245: 915-918, 1987.

Crompton M, Ellinger H, and Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J*, 255: 357-360, 1988.



Crow MT, Mani K, Nam YJ, and Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*, 95: 957-970, 2004.

Denton RM and McCormack JG. Ca²⁺ transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. *Am J Physiol*, 249: E543-554, 1985.

Detaille D, Guigas B, Chauvin C, Batandier C, Fontaine E, Wiernsperger N, and Leverve X. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes*, 54: 2179-2187, 2005.

Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, and Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem*, 276: 2571-2575, 2001.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, and Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102: 33-42, 2000.

Dumas JF, Argaud L, Cottet-Rousselle C, Vial G, Gonzalez C, Detaille D, Lerverve X, and Fontaine E. Effect of transient and permanent permeability transition pore opening on NAD(P)H localization in intact cells. *J Biol Chem*, 284: 15117-15125, 2009.

Elz JS and Nayler WG. Calcium gain during postischemic reperfusion. The effect of 2,4-dinitrophenol. *Am J Pathol*, 131: 137-145, 1988.

Fitton V, Rigoulet M, Ouhabi R, and Guerin B. Mechanistic stoichiometry of yeast mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry*, 33: 9692-9698, 1994.

Fontaine E and Bernardi P. Progress on the mitochondrial permeability transition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs. *J Bioenerg Biomembr*, 31: 335-345, 1999.



Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, and Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem*, 273: 12662-12668, 1998.

Fontaine EM, Moussa M, Devin A, Garcia J, Ghisolfi J, Rigoulet M, and Leverve XM. Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1276: 181-187, 1996.

Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, and Wieloch T. Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci*, 18: 5151-5159, 1998.

Fry M and Green DE. Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem*, 256: 1874-1880, 1981.

Gomez L, Li B, Mewton N, Sanchez I, Piot C, Elbaz M, and Ovize M. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients. *Cardiovasc Res*, 83: 226-233, 2009.

Green DE. Structure and function in the mitochondrial electron-transport system. *Radiat Res*, Suppl 2: 504-527, 1960.

Griffiths EJ and Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*, 307 (Pt 1): 93-98, 1995.

Gross GJ and Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res*, 84: 973-979, 1999.

Grover GJ, Atwal KS, Sleph PG, Wang FL, Monshizadegan H, Monticello T, and Green DW. Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F₁F₀-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H1747-1755, 2004.

Gunter KK and Gunter TE. Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 26: 471-485, 1994.



Gunter TE, Buntinas L, Sparagna GC, and Gunter KK. The Ca²⁺ transport mechanisms of mitochondria and Ca²⁺ uptake from physiological-type Ca²⁺ transients. *Biochim Biophys Acta*, 1366: 5-15, 1998.

Gunter TE and Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*, 258: C755-786, 1990.

Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, and Salter JD. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett*, 567: 96-102, 2004.

Gurevich RM, Regula KM, and Kirshenbaum LA. Serpin protein CrmA suppresses hypoxia-mediated apoptosis of ventricular myocytes. *Circulation*, 103: 1984-1991, 2001.

Halestrap AP and Davidson AM. Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J*, 268: 153-160, 1990.

Hatefi Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem*, 54: 1015-1069, 1985.

Haworth RA and Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys*, 195: 460-467, 1979.

Haworth RA and Hunter DR. Control of the mitochondrial permeability transition pore by high-affinity ADP binding at the ADP/ATP translocase in permeabilized mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 32: 91-96, 2000.

Heyndrickx G R, Millard R W, McRitchie R J, Maroko P R, and Vatner S F. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest*, 56(4): 978-985, 1975.

Hunter DR and Haworth RA. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 195: 453-459, 1979a.



Hunter DR and Haworth RA. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Arch Biochem Biophys*, 195: 468-477, 1979b.

Irwin WA, Bergamin N, Sabatelli P, Reggiani C, Megighian A, Merlini L, Braghetta P, Columbaro M, Volpin D, Bressan GM, Bernardi P, and Bonaldo P. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat Genet*, 35: 367-371, 2003.

Jennings RB. Relationship of acute ischemia to functional defects and irreversibility. *Circulation*, 53: 126-29, 1976.

Jennings RB, Reimer KA, and Steenbergen C. Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, 23: 1383-1395, 1991.

Julicher RH, Tijburg LB, Sterrenberg L, Bast A, Koomen JM, and Noordhoek J. Decreased defence against free radicals in rat heart during normal reperfusion after hypoxic, ischemic and calcium-free perfusion. *Life Sci*, 35: 1281-1288, 1984.

Jung DW, Bradshaw PC, and Pfeiffer DR. Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *J Biol Chem*, 272: 21104-21112, 1997.

Kane JJ, Murphy ML, Bissett JK, deSoyza N, Doherty JE, and Straub KD. Mitochondrial function, oxygen extraction, epicardial S-T segment changes and tritiated digoxin distribution after reperfusion of ischemic myocardium. *Am J Cardiol*, 36: 218-224, 1975.

Kato M, Akao M, Matsumoto-Ida M, Makiyama T, Iguchi M, Takeda T, Shimizu S, and Kita T. The targeting of cyclophilin D by RNAi as a novel cardioprotective therapy: evidence from two-photon imaging. *Cardiovasc Res*, 83: 335-344, 2009.

Kim JS, He L, and Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 304: 463-470, 2003.

Klohn PC, Soriano ME, Irwin W, Penzo D, Scorrano L, Bitsch A, Neumann HG, and Bernardi P. Early resistance to cell death and to onset of the mitochondrial permeability transition during



hepatocarcinogenesis with 2-acetylaminofluorene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 10014-10019, 2003.

Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*. 54(6):1496-508, 1974.

Kloner RA, Ganote CE, Whalen DA, Jr., and Jennings RB. Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow. *Am J Pathol*, 74: 399-422, 1974.

Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, and Wallace DC. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, 427: 461-465, 2004.

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, and Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*, 7: 1166-1173, 2000.

Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, and Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: H649-657, 2001.

Krauskopf A, Eriksson O, Craigen WJ, Forte MA, and Bernardi P. Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1757: 590-595, 2006.

Kristian T and Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke*, 29: 705-718, 1998.

Kubler W and Spieckermann PG. Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 1: 351-377, 1970.

Lazdunski M, Frelin C, and Vigne P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal



concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol*, 17: 1029-1042, 1985.

Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kuhnle S, and Nicotera P. Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp Cell Res*, 249: 396-403, 1999.

Lesnefsky EJ, Chen Q, Slabe TJ, Stoll MS, Minkler PE, Hassan MO, Tandler B, and Hoppel CL. Ischemia, rather than reperfusion, inhibits respiration through cytochrome oxidase in the isolated, perfused rabbit heart: role of cardiolipin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H258-267, 2004.

Leverve X, Sibille B, Devin A, Piquet MA, Espie P, and Rigoulet M. Oxidative phosphorylation in intact hepatocytes: quantitative characterization of the mechanisms of change in efficiency and cellular consequences. *Mol Cell Biochem*, 184: 53-65, 1998.

Maddaford TG and Pierce GN. Myocardial dysfunction is associated with activation of Na⁺/H⁺ exchange immediately during reperfusion. *Am J Physiol*, 273: H2232-2239, 1997.

Maklashina E, Sher Y, Zhou HZ, Gray MO, Karliner JS, and Cecchini G. Effect of anoxia/reperfusion on the reversible active/de-active transition of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in rat heart. *Biochim Biophys Acta*, 1556: 6-12, 2002.

Manning AS, Coltart DJ, and Hearse DJ. Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circulation Research*, 55:545-548, 1984.

Milanesi E, Costantini P, Gambalunga A, Colonna R, Petronilli V, Cabrelle A, Semenzato G, Cesura AM, Pinard E, and Bernardi P. The mitochondrial effects of small organic ligands of BCL-2: sensitization of BCL-2-overexpressing cells to apoptosis by a pyrimidine-2,4,6-trione derivative. *J Biol Chem*, 281: 10066-10072, 2006.

Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191: 144-148, 1961.



Mitchell P and Moyle J. Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria. *Biochem J*, 105: 1147-1162, 1967.

Mulch J, Schaper J, Scheld HH, and Hehrlein FW. Recovery of the heart after normothermic ischemia. Part I: Ultrastructural findings during postischemic reperfusion. *Thorac Cardiovasc Surg*, 27: 12-17, 1979.

Murata M, Akao M, O'Rourke B, and Marban E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca²⁺ overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*, 89: 891-898, 2001.

Murphy ML, Kane JJ, Straub KD, and Doherty JE. Impairment of mitochondrial function following reperfusion of acutely ischemic myocardium. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*, 8: 343-351, 1975.

Murry CE, Jennings RB, and Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74: 1124-1136, 1986.

Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley CJ, and Roberts R. Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation*, 72: 915-921, 1985.

Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, and Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, 434: 652-658, 2005.

Neely JR and Grotyohann LW. Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ Res*, 55: 816-824, 1984.

Nicholls DG. Calcium transport and proton electrochemical potential gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. *Biochem J*, 170: 511-522, 1978.

Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, and Bernardi P. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane



and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J Biol Chem*, 271: 2185-2192, 1996.

Nicolli A, Petronilli V, and Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry*, 32: 4461-4465, 1993.

Oberholzer J and Morel P. [Perspectives for diabetes treatment through pancreas transplantation or islet transplantation]. *Diabetes Metab*, 28: 2S27-2S32, 2002.

Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation*, 80(4):1049-62, 1989

Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A, and Ruggiero FM. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ Res*, 94: 53-59, 2004.

Petronilli V, Cola C, Massari S, Colonna R, and Bernardi P. Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. *J Biol Chem*, 268: 21939-21945, 1993.

Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, and Di Lisa F. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J*, 76: 725-734, 1999.

Petronilli V, Nicolli A, Costantini P, Colonna R, and Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta*, 1187: 255-259, 1994.

Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, and Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem*, 276: 12030-12034, 2001.

Rasola A and Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*, 12: 815-833, 2007.



Ricordi C, Ildstad ST, and Starzl TE. Induction of Pancreatic Islet Graft Acceptance: The Role of Antigen Presenting Cells. *Transplant Sci*, 2: 34-38, 1992.

Riess ML, Camara AK, Novalija E, Chen Q, Rhodes SS, and Stowe DF. Anesthetic preconditioning attenuates mitochondrial Ca²⁺ overload during ischemia in Guinea pig intact hearts: reversal by 5-hydroxydecanoic acid. *Anesth Analg*, 95: 1540-1546, table of contents, 2002.

Rigoulet M, Devin A, Espie P, Guerin B, Fontaine E, Piquet MA, Nogueira V, and Leverve X. Flux-force relationships in intact cells: a helpful tool for understanding the mechanism of oxidative phosphorylation alterations? *Biochim Biophys Acta*, 1365: 117-124, 1998.

Rigoulet M, Fraisse L, Ouhabi R, Guerin B, Fontaine E, and Leverve X. Flux-dependent increase in the stoichiometry of charge translocation by mitochondrial ATPase/ATP synthase induced by almitrine. *Biochim Biophys Acta*, 1018: 91-97, 1990.

Rouslin W, Broge CW, and Grupp IL. ATP depletion and mitochondrial functional loss during ischemia in slow and fast heart-rate hearts. *Am J Physiol*, 259: H1759-1766, 1990.

Rouslin W and Ranganathan S. Impaired function of mitochondrial electron transfer complex I in canine myocardial ischemia: loss of flavin mononucleotide. *J Mol Cell Cardiol*, 15: 537-542, 1983.

Sadek HA, Szweda PA, and Szweda LI. Modulation of mitochondrial complex I activity by reversible Ca²⁺ and NADH mediated superoxide anion dependent inhibition. *Biochemistry*, 43: 8494-8502, 2004.

Saikumar P, Dong Z, Patel Y, Hall K, Hopfer U, Weinberg JM, and Venkatachalam MA. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene*, 17: 3401-3415, 1998.

Scaduto RC Jr, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential usin fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J*, 76(1 Pt 1):469-77, 1999



Schultheiss HP, Berg PA, and Klingenberg M. Inhibition of the adenine nucleotide translocator by organ specific autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol*, 58: 596-602, 1984.

Serrano OK, Jovanovic A, and Terzic A. Inhibition of both Na/H and bicarbonate-dependent exchange is required to prevent recovery of intracellular pH in single cardiomyocytes exposed to metabolic stress. *Biosci Rep*, 19: 99-107, 1999.

Shen AC and Jennings RB. Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury. *Am J Pathol*, 67: 441-452, 1972.

Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, and Arbel N. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med*, 31: 227-285.

Silverman NA, Levitsky S, Kohler J, Trenkner M, and Feinberg H. Pulsatile reperfusion does not modify global myocardial ischemic injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 84: 406-412, 1982.

Soriano ME, Nicolosi L, and Bernardi P. Desensitization of the permeability transition pore by cyclosporin a prevents activation of the mitochondrial apoptotic pathway and liver damage by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, 279: 36803-36808, 2004.

Szabo I, Bernardi P, and Zoratti M. Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. *J Biol Chem*, 267: 2940-2946, 1992.

Tennant R, Wiggers CJ. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol* 112:351-61, 1935.

Thomas B, Mandir AS, West N, Liu Y, Andrabi SA, Stirling W, Dawson VL, Dawson TM, and Lee MK. Resistance to MPTP-neurotoxicity in alpha-synuclein knockout mice is complemented by human alpha-synuclein and associated with increased beta-synuclein and Akt activation. *PLoS One*, 6: e16706.

Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, Schumacker PT, and Becker LB. Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 29: 2571-2583, 1997.



Varadarajan SG, An J, Novalija E, Smart SC, and Stowe DF. Changes in $[Na^{+}]_i$, compartmental $[Ca^{2+}]_i$, and NADH with dysfunction after global ischemia in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: H280-293, 2001.

Varecha M, Zimmermann M, Amrichova J, Ulman V, Matula P, and Kozubek M. Prediction of localization and interactions of apoptotic proteins. *J Biomed Sci*, 16: 59, 2009.

Veitch K, Hombroeckx A, Caucheteux D, Pouleur H, and Hue L. Global ischaemia induces a biphasic response of the mitochondrial respiratory chain. Anoxic pre-perfusion protects against ischaemic damage. *Biochem J*, 281 (Pt 3): 709-715, 1992.

Vial C, Crozatier B, Goldschmidt D, and Font B. Adenine nucleotide content and regional function during ischemia and reperfusion in canine ventricular myocardium. *Basic Res Cardiol*, 77: 645-655, 1982.

Vollmar B, Janata J, Yamauchi JI, and Menger MD. Attenuation of microvascular reperfusion injury in rat pancreas transplantation by L-arginine. *Transplantation*, 67: 950-955, 1999.

Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, and Lemasters JJ. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. *Mol Pharmacol*, 62: 22-29, 2002.

Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, and Halestrap AP. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J*, 336 (Pt 2): 287-290, 1998.

Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, and Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285: H579-588, 2003.

Zoratti M and Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*, 1241: 139-176, 1995.



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

