



HAL
open science

Protection du myocarde ischémique et pore géant mitochondrial : applications pharmacologiques

Rana Assaly

► **To cite this version:**

Rana Assaly. Protection du myocarde ischémique et pore géant mitochondrial : applications pharmacologiques. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114820 . tel-00734466

HAL Id: tel-00734466

<https://theses.hal.science/tel-00734466>

Submitted on 22 Sep 2012

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

DISCIPLINE :

Pharmacologie Expérimentale et Clinique

ANNÉE 2011 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1109

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 21/09/2011

par

Rana ASSALY

PROTECTION DU MYOCARDE ISCHEMIQUE et PORE GEANT MITOCHONDRIAL : APPLICATIONS PHARMACOLOGIQUES

| | | |
|-------------------------------------|--|---|
| Directeur de thèse : | Mr le Pr Alain BERDEAUX | Professeur UFR de Médecine de Paris-Est, Créteil. |
| <u>Composition du jury :</u> | | |
| <i>Président du jury :</i> | Mr le Pr Alain GARDIER | Professeur UFR de Pharmacie de Paris-Sud Châtenay-Malabry. |
| <i>Rapporteurs :</i> | Mr le Pr Luc ROCHETTE | Professeur UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Université de Bourgogne, Dijon. |
| | Mr le Dr René FERRERA | Directeur de recherche INSERM Université de Lyon 1, Lyon |
| <i>Examineurs :</i> | Mme le Dr Catherine BRENNER- JAN | Directeur de recherche CNRS UFR de Pharmacie de Paris-Sud Châtenay-Malabry |
| | Mme le Dr Alexandra D'ANGLEMONT DE TASSIGNY | Maître de conférences Université Paris-Est, Créteil. |
| | Mr le Dr Didier MORIN | Directeur de recherche CNRS Université Paris-Est, Créteil. |

Remerciements

*A mes parents, **Joseph et Mona**, à qui je dois tout et qui ont toujours cru en moi,*

*To my parents, **Joseph and Mona**, They bore me, raised me, supported me, taught me, and loved me. To them I dedicate this thesis,*

A mes grands parents,

*Mais aussi à ma **belle famille**, la famille **Kaddoum**, le soutien de chacun d'entre eux, à sa manière, a toujours été généreux et chaleureux,*

*A ma sœur **Rima** et mon beau-frère **Robert***

*A mon frère **Charbel** et ma future belle-sœur **Maya***

*Pour nos vacances d'été qui me permettaient de décrocher
de temps en temps de mes histoires de mitochondries,*

*A mon mari, **Patrick**, Merci de m'avoir tenu la main jusqu'aux dernières lignes de cette thèse. Merci pour ton soutien quotidien et surtout pour ta patience et ta présence pour fêter et partager les joies mais surtout pour me reconforter et m'encourager pendant les moments d'angoisse, de doute et de faiblesse. Cette thèse est la tienne aussi. Je t'aime.....*

*A ma petite perle rare, **Chloé**, née pendant la réalisation de cette thèse.....En espérant que maman n'ait pas été trop absente surtout pendant les mois de rédaction,*

A toute ma famille,

*A mon oncle, **François El-Hajj**
que j'ai perdu cruellement au début de cette thèse
Tu nous manques !!!*

Comme le veut la tradition, je vais tenter de satisfaire au difficile exercice de la page des remerciements. Non qu'exprimer ma gratitude envers les personnes en qui j'ai trouvé un soutien soit contre ma nature, bien au contraire. La difficulté tient plutôt dans le fait de n'oublier personne. C'est pourquoi, je remercie par avance ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. Ils se reconnaîtront...

*Il m'est impossible d'exprimer toute ma gratitude au Monsieur le Professeur **Alain Berdeaux**, mon directeur de thèse au sein du Laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Créteil. Voici plus de six ans que je l'ai rencontré et il est devenu au fil des années comme un père. Sa manière bien à lui de me pousser continuellement à la remise en question, sa confiance et ses conseils m'ont été si précieux et m'ont permis de mener le présent travail à terme. J'espère que cette thèse sera un remerciement suffisant au soutien et à la confiance sans cesse renouvelés dont il a fait preuve en mon égard,*

*A Monsieur le Professeur **Alain Gardier**, mon responsable de formation à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry. Je tiens à le remercier pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils quant à mon projet professionnel. Son aide et sa connaissance du monde de l'enseignement m'ont soutenu dans l'accès à des fonctions auxquelles j'aspirais. Cela constitue pour moi à la fois un honneur et une grande joie d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse,*

*A Monsieur le Professeur **Luc Rochette**, qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, veuillez trouver ici le témoignage de ma plus vive reconnaissance,*

*A Monsieur le Docteur **René Ferrera**, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Je souhaite lui témoigner ma profonde gratitude,*

*A Madame le Docteur **Catherine Brenner-Jan**, pour sa gentillesse et sa disponibilité, pour nos discussions autour des mitochondries et ses conseils quant à mon projet professionnel. Vous m'avez fait honneur d'accepter de participer à ce jury de thèse,*

*A Madame le Professeur **Véronique Leblais** et le Docteur **Rodolphe Fischmeister**, qui m'ont acceptée dans leur équipe d'enseignement et de recherche avant que le présent travail soit terminé. Je vous remercie de m'avoir laissée une totale liberté pour finir cette thèse.*

*A Monsieur le Docteur **Didier Morin**, pour m'avoir encadrée dès le début de cette thèse. Nous avons vécu ensemble bien de moments de mise au point expérimentale assez difficile et capricieuse mais nous avons réussi notre pari grâce à vos précieux conseils et votre soutien. Pour votre disponibilité et votre confiance que j'ai pu apprécier tout le long de ma thèse, je souhaite vous exprimer ma reconnaissance et mon profond respect. Votre présence dans ce jury constitue un honneur puisque vous étiez à l'origine de ce sujet.*

*J'éprouve un profond respect pour Monsieur le Professeur **Bijan Ghaleh-Marzaban** qui m'a encadrée pendant mon Master au sein de l'équipe. Son savoir et sa rigueur scientifique ont été la source de ma formation à la recherche. Il a toujours montré de l'intérêt pour mes travaux et répondu à mes sollicitations lorsque le besoin s'en faisait sentir. Je tiens à le remercier pour son soutien et son amitié.*

*Je ne saurais à ce stade, manquer de citer une personne dont la disponibilité dès mes premiers pas dans le domaine de la recherche et son implication, même parfois dans les coulisses, m'a permis de vivre un séjour doctoral exceptionnel. Il m'est impossible d'exprimer en quelques mots ma profonde reconnaissance pour le Docteur **Alexandra d'Anglemont De Tassigny**. Elle a toujours été présente pour écouter, tempérer, aider et résoudre. Plus qu'un encadreur, j'ai trouvé en elle une ami qui m'a aidée aussi bien dans le travail que dans la vie lorsque j'en avais besoin. Je tiens à la remercier d'être à mes côtés jusqu'au bout en acceptant de participer à mon jury de thèse.*

*Veillez croire **Alexandra** en ma profonde reconnaissance*

*Dans ce même élan, je remercie aussi le Docteur **Sandrine Pons** pour son soutien au quotidien, pour m'avoir permis d'acquérir ma première expérience dans l'enseignement supérieur, pour m'avoir appris à « lister mes priorités » et pour une amitié que j'espère va continuer après cette thèse.*

*Aux Docteurs **Stéphanie Michineau**, **Lydie Laure**, **Fatou Nsoure Obame**, **Catherine Plin**, **Roland Zini**, **Renaud Tissier**, **Mourad Chenoune**, **Nicolas Couvreur**, **Hubert Dabiré**, **Jinbo Su** et **Rachid Soukṭani** pour nos discussions sur divers sujets et votre soutien.*

«Faire une thèse» est une échappée solitaire au milieu de compagnons de fortune (ou d'infortune). On ne se rend pas toujours compte à quel point ils peuvent être importants dans le travail et dans la vie jusqu'au jour où nos chemins se séparent. Je remercie tout particulièrement **Clément** pour son aide inestimée, son sourire et son « sens du rangement » et... toutes ses qualités humaines. Je remercie également **Valérie, Stéphanie P, Sophie J, Lolita, Romain, Maya, Sophie N, Hind,** et l'équipe d'**Alfort Fanny, Lys, Camille, Mario, Alain B et Lucien.** Je regrette déjà les moments que l'on a passés autour des « antidépresseurs naturels », gâteaux, chocolats, etc... à raconter nos problèmes, nos joies, nos vacances, nos manips qui ne fonctionnent pas, nos pseudos vacances pendant les congrès etc... Merci pour votre soutien dans les jours « où on est persuadé qu'on y arrivera jamais ».

Merci aussi à ceux qui se sont arrêtés un instant dans leur parcours au laboratoire et dont la rencontre a été plus qu'un simple «bonjour-au revoir», le Docteur **Kamília Ksouda, Adam Caluche** et aux personnes avec qui j'ai partagé cette année des bons moments au sein de l'**unité U769** à Châtenay-Malabry et aux Docteurs **Claire Smadja, Denis David, Jean-Philippe Guilloux et Bruno Guiard** qui m'ont aidée afin d'accomplir au mieux mes enseignements en tant qu'attaché temporaire d'enseignement et de recherche cette année

A Madame **Sandrine Bonizec** pour son soutien tout le long de cette thèse et pour sa disponibilité à tout moment, même parfois hors les heures du travail,

A Madame **Corinne Deschennes** pour son soutien,

A l'**équipe de l'annimalerie** pour le soin apporté à mes animaux, et aussi l'**équipe de la laverie**

Je ne saurais clore cette page sans remercier, pour leur contribution dans la réalisation de cette œuvre, la famille **Kassis, Gracia, Charbel, Tristan et Florian** pour leur soutien sans faille et pour avoir gardé Chloé pendant les moments difficiles, Madame **Michelle Schibert** pour nos discussions et nos apéros le Dimanche soir, **Jean-Pierre et Mona,** la famille **Pheng,**

Et aussi à tous les membres des familles **Assaly, Kaddoum, Andraos, Ruchdan, El-Hajj** et nos amis au Liban et dans le monde...Merçi

Enfin, pourquoi ne pas le dire, dans cette épreuve où seuls le courage et la maîtrise des connaissances ne suffisent pas, **Merci à Celui** qui rien de tout n'aurait été possible.....

Rana Assaly Kaddoum

Sommaire

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Introduction générale | 14 |
| 1^{er} Chapitre : La Cardioprotection | 21 |
| I. Introduction | 21 |
| II. Les différents types de la mort cellulaire | 21 |
| II.1 Apoptose | 22 |
| II.2 Autophagie | 24 |
| II.3 Nécrose | 25 |
| III. Pourquoi la mort cellulaire suite l'ischémie/reperfusion ? | 28 |
| III.1 Les événements liés à l'ischémie | 30 |
| III.2 Les événements liés à la reperfusion | 30 |
| IV. Les voies de signalisation | 32 |
| IV.1 Les récepteurs couplés à la protéine G (RCPG) | 34 |
| IV.2 La Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI ₃ Kinase) | 34 |
| IV.3 La Protéine Kinase B ou Akt | 34 |
| IV.4 La "Glycogen Synthase Kinase-3β" (GSK-3β) | 35 |
| IV.5 La « Nitric oxide Synthase/endothelial nitric oxide synthase » (NOS/eNOS) | 36 |
| IV.6 La Protéine Kinase G/ la Protéine Kinase C (PKG/PKC-ε) | 36 |
| IV.7 "Mitogen Activated Protein Kinase" (MAPKinase) | 37 |
| IV.7.1 "Les Extracellular signal-Regulated protein Kinases" (ERKs) | 37 |
| IV.7.2 "P38 Mitogen Activated Protein Kinase" (p38 MAPK) | 38 |
| IV.7.3 c-Jun NH ₂ -terminal kinases (JNKinase) : | 39 |
| IV.8 La voie "Survivor Activating Factor Enhancement" (SAFE) | 39 |
| IV.9 Des voies alternatives ? | 40 |
| IV.10 Les effecteurs terminaux de la cardioprotection | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 2^{ème} Chapitre : Cardioprotection et mitochondries | 42 |
| Première Partie | 42 |
| I. Généralités | 42 |
| II. Structure de la mitochondrie | 43 |
| II.1 La membrane externe mitochondriale | 43 |
| II.2 La membrane interne | 43 |
| II.3 L'espace intermembranaire | 45 |
| II.4 La matrice mitochondriale | 46 |
| III. Fonctions de la mitochondrie : | 48 |
| III.1 La mitochondrie : une véritable usine de production d'énergie | 48 |
| III.1.1 Le point de départ : les cofacteurs | 48 |
| III.1.2 La chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative | 49 |
| III.2 L'homéostasie du calcium | 52 |
| III.3 La génération et la détoxification des espèces réactives d'oxygène (EROs) | 54 |
| III.3.1 Bref rappel sur les différentes formes des espèces réactives d'oxygène | 54 |
| L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$): | 54 |
| Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2): | 55 |
| Le radical hydroxyle ($\bullet OH$): | 55 |
| III.3.2 Sites de production des EROs : | 55 |
| III.3.2.1 Principale source de production des radicaux libres : la mitochondrie | 56 |
| III.3.2.2 Autres sources de production d'EROs | 58 |
| III.3.3 Systèmes antioxydants : | 58 |
| III.3.3.1 Les systèmes enzymatiques : | 59 |
| La superoxyde dismutase (SOD) : | 59 |
| La catalase : | 59 |
| Les glutathions peroxydase et réductase : | 59 |
| III.3.3.2 Les systèmes non enzymatiques : | 60 |
| Les oligoéléments : | 60 |
| L'ubiquinone et le cytochrome c : | 60 |
| Les vitamines E et C : | 61 |
| Le glutathion : | 61 |
| L'acide urique | 61 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| III.4 | Mitochondrie et mort/survie cellulaire : | 63 |
| III.4.1 | Les protéines de la famille Bcl-2 | 63 |
| III.4.2 | Les canaux potassiques mitochondriaux | 64 |
| | Canal potassique ATP-dépendant mitochondrial (mKATP) : | 65 |
| III.4.3 | Le Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale (mPTP) | 65 |
| | Deuxième Partie | 66 |
| I. | L'identité moléculaire du mPTP : | 66 |
| I.1 | Le « Voltage-Dependent Anion Channel » (VDAC) | 68 |
| I.2 | L'«Adenine Nucleotide Translocase » (ANT) | 68 |
| I.3 | La cyclophiline D (Cyp-D) | 69 |
| I.4 | Le transporteur mitochondrial de phosphates (PiC) | 69 |
| I.5 | La Protéine Translocatrice (TSPO) | 70 |
| | I.5.1 Localisation : | 70 |
| | I.5.2 Structure du TSPO : | 71 |
| | I.5.3 Les fonctions du TSPO : | 71 |
| I.6 | Autres protéines : | 72 |
| II. | Régulation de l'ouverture du mPTP : | 76 |
| II.1 | Le calcium | 76 |
| II.2 | Le pH intracellulaire (pH _i) | 77 |
| II.3 | Le phosphate inorganique (Pi) | 77 |
| II.4 | Les espèces réactives d'oxygène (EROs) | 78 |
| | II.4.1 Actions physiologiques des EROs : rôle dans la signalisation | 78 |
| | II.4.2 Actions pathologiques des EROs : Le côté sombre | 79 |
| | Peroxydation lipidique : | 79 |
| | Oxydation protéique : | 79 |
| | Oxydation de l'ADN | 80 |
| | II.4.3 Relation entre les EROs et le mPTP: | 80 |
| | II.4.3.1 La vision traditionnelle : EROs produites pendant la reperfusion | 80 |
| | II.4.3.2 La vue actuelle paradoxale : les EROs produites pendant l'ischémie | 81 |

| | |
|---|-----------|
| III. La perméabilité mitochondriale comme cible pharmacologique de la cardioprotection | 82 |
| III.1 Les stratégies pharmacologiques directes | 84 |
| III.1.1 Le mPTP comme cible pharmacologique de la cardioprotection | 84 |
| III.1.2 Le mKATP | 86 |
| III.1.3 Le canal « Mitochondrial apoptosis induced channel »/Bax (Mac/Bax) | 86 |
| III.1.4 Le TSPO | 87 |
| III.2 Les stratégies pharmacologiques indirectes | 88 |
| III.2.1 La voie RISK comme cible pharmacologique de la cardioprotection | 89 |
| III.2.2 Les antioxydants et la perméabilité mitochondriale | 89 |

BUTS DE L'ETUDE _____ **93**

Matériels et Méthodes : _____ **94**

| | |
|--|-----------|
| I. Animaux | 94 |
| II. La dissociation des cardiomyocytes de rats adultes selon un modèle de type Langendorff à pression constante | 94 |
| III. Etude de la fonction contractile des cardiomyocytes | 96 |
| III.1 But de la technique | 96 |
| III.2 Dispositif expérimental | 97 |
| III.3 Critères d'inclusion des cardiomyocytes | 97 |
| III.4 Paramètre étudié | 98 |
| IV. Modèle d'hypoxie-réoxygénation des cardiomyocytes de rats adultes. | 99 |
| IV.1 Description du dispositif expérimental | 99 |
| IV.2 L'évaluation de la stabilité du modèle | 100 |
| IV.3 Mise au point du modèle | 100 |
| IV.4 Mesure du temps d'ouverture du mPTP | 101 |
| IV.5 Quantification de la mortalité cellulaire | 101 |
| IV.6 Evaluation de la production des espèces réactives d'oxygène (EROs) | 102 |
| IV.7 Acquisition des images | 103 |
| IV.8 Analyse des résultats et expressions des données | 103 |
| IV.9 Validation du modèle d'hypoxie-réoxygénation : étude de l'effet cardioprotecteur de La cyclosporine A | 107 |

| | |
|--|------------|
| IV.10 Etude de l'effet de TRO 40303 sur le modèle d'hypoxie/réoxygénation _____ | 108 |
| IV.11 Etude de l'effet de morphine sur le modèle d'hypoxie/réoxygénation _____ | 108 |
| V. Etude du rôle des espèces réactives d'oxygène sur l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire __ | 108 |
| VI. Etude des effets de la cyclosporine A sur la production des espèces réactives d'oxygène (EROs) | 111 |
| VII. Analyses statistique des résultats _____ | 111 |
| Résultat 1 : Rôle de la production des espèces réactives de l'oxygène dans l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire _____ | 112 |
| I. Objectif de l'étude: _____ | 112 |
| II. Protocole expérimental : _____ | 113 |
| II.1 Mise au point et validation du modèle d'H/R _____ | 113 |
| II.2 Etude de la relation entre les EROs, l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire _____ | 113 |
| II.3 Etude de l'effet de la CsA sur la production des EROs _____ | 114 |
| III. Résultats : _____ | 114 |
| III.1 Mise au point et validation du modèle _____ | 115 |
| III.2 Relation entre la production des EROs, l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire _____ | 115 |
| III.3 Effet de la CsA sur la production de ROS _____ | 116 |
| IV. Conclusions : _____ | 116 |
| Résultat 2 : Etude de l'effet de TRO 40303, un ligand du TSPO, sur le mPTP. _____ | 117 |
| I. Objectif de l'étude: _____ | 117 |
| II. Matériels et Méthodes : _____ | 118 |
| II.1 Protocole <i>in-vivo</i> : _____ | 118 |
| II.2 Protocole <i>in-vitro</i> : _____ | 118 |
| III. Résultats obtenus _____ | 119 |
| III.1 Effet du TRO40303 sur la taille de l'infarctus _____ | 119 |
| III.2 Effet du TRO40303 sur les mitochondries _____ | 119 |
| III.3 Effet du TRO40303 sur l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire sur des cardiomyocytes soumis à hypoxie/réoxygénation. _____ | 119 |
| IV. Conclusions _____ | 119 |

| | |
|--|----------------|
| Résultats 3: Effet de la morphine et d'un inhibiteur de la GSK-3β sur le mPTP | 121 |
| I. Objectif de l'étude: | 121 |
| II. Matériels et Méthodes : | 121 |
| II.1 Substances utilisées : | 121 |
| II.2 Protocoles utilisés | 122 |
| III. Résultats obtenus | 122 |
| III.1 Effet de la morphine et du SB216763 sur la taille de l'infarctus, les fonctions mitochondriales et la lipoperoxydation | 122 |
| III.2 Effet de la morphine et du SB216763 sur l'ouverture du mPTP sur des cardiomyocytes soumis à une hypoxie/réoxygénation. | 123 |
| IV. Conclusions | 123 |
| Discussion générale | 124 |
| Conclusions et Perspectives | 136 |

Liste des Figures

Listes des Figures

| | |
|--|------|
| Figure 1 : Signalisation de l'apoptose _____ | 23 |
| Figure 2 : Formation de l'autophagolysosome au cours de l'autophagie _____ | 24 |
| Figure 3 : Voies de signalisation de la nécrose _____ | 26 |
| Figure 4 : Concept de lésions de reperfusion coronaire et cardioprotection _____ | 29 |
| Figure 5 : Séquences des événements intervenant au niveau de la mitochondrie à : _____ | 31 |
| A: l'ischémie _____ | 31 |
| B: la reperfusion _____ | 31 |
| Figure 6 : Signalisation intracellulaire du pré- et du post-conditionnement _____ | 33 |
| Figure 7 : Schéma descriptif de la structure mitochondriale _____ | 47 |
| Figure 8 : Le transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale et la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative _____ | 51 |
| Figure 9 : Couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes dans les conditions physiologiques _____ | 53 |
| Figure 10 : La production cellulaire des espèces réactives d'oxygène et les systèmes antioxydants endogènes _____ | 62 |
| Figure 11 : Les canaux potassiques mitochondriaux _____ | 64 |
| Figure 12 : l'identité moléculaire proposée du mPTP _____ | 67 |
| Figure 13 : Schéma de la structure de la protéine translocatrice mitochondriale (TSPO) _____ | 72 |
| Figure 14 : Le modèle proposé du mPTP _____ | 75 |
| Figure 15 : L'inhibition de la perméabilité mitochondriale comme approche pharmacologique afin de limiter les lésions d'ischémie/reperfusion _____ | 83 |
| Figure 16 : Structures chimiques de quelques agents pharmacologiques capables de moduler la perméabilité mitochondriale _____ | 92 |
| Figure 17 : Modèle de type-Langendorff à pression constante _____ | 96 |
| Figure 18 : Critères de sélection des cardiomyocytes _____ | 97 |
| Figure 19 : Mesure de la contractilité des cardiomyocytes isolés _____ | 98 |
| Figure 20 : Dispositif expérimental du modèle hypoxie/réoxygénation _____ | 99 |
| Figure 21 : Un champ de cardiomyocytes chargés en calcéine, chlorure de cobalt et iodure de propidium _____ | 104 |
| Figure 22 : Présentation des résultats évaluant l'ouverture du mPTP et la mortalité cellulaire par microscopie de fluorescence _____ | 106 |
| Figure 23 : Protocole d'administration de la Cyclosporine A _____ | 107 |
| Figure 24 : Les différents protocoles d'administration du cocktail antioxydants _____ | 110 |
| Figure 25 : Etude de la fonction contractile _____ | 1104 |
| Figure 26 : Principales conclusions de ce travail de thèse _____ | 110 |

Glossaire

Glossaire

| | |
|-------------------------|---|
| $\Delta\psi_m$ | Potentiel membranaire mitochondrial |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| AIF | Apoptosis-Inducing Factor |
| AKt | Protéine Kinase B |
| AMP | Adénosine monophosphate |
| ANT | Adenine Nucleotide Translocator |
| Atg5 | Autophagie protein 5 |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| ATPase | adénosine 5'-triphosphatase |
| Bax | BCL-X _L /Bcl-2 Associated death |
| Bcl-2 | B-cell Leukemia-2 |
| Bid | BH3-interacting domain death |
| BIR3 | C-terminal domain of X-chromosome linked inhibitor of Apoptosis |
| CBR | Récepteur Central aux Benzodiazépines |
| cGMP | Guanosine 3',5'-monophosphate cyclique |
| CK | Créatine Kinase |
| CoCl ₂ | Chlorure de Cobalt |
| CoQ | Coenzyme Q ou ubiquinone |
| CsA | Cyclosporine A |
| Cyp-D | Cyclophiline-D |
| Cys57, Cys 160, Cys 257 | Cystéine 57, cystéine 160, Cystéine 257 |
| DCF | Dichlorofluorescéine |
| DCFA-DA | 2',7'-dichlorofluorescine diacétate |
| DCFH | 2',7'-dichlorofluorescine réduit |
| DHE | Dihydroéthidium |
| eNOS | endothelial Nitric Oxide Synthase |
| ERK | Extracellular signal Regulated Kinase |
| EROs | Espèces Réactives de l'Oxygène |
| Eth | Ethidium |

| | |
|-------------------------------|---|
| Eth-DNA | Ethidium-DNA |
| FADH ₂ | Flavine Adénine Dinucléotide |
| Fe ²⁺ | Fer ferreux |
| GPx | Glutathion peroxydase |
| GR | Glutathion reductase |
| GSH | Glutathion réduit |
| GSK-3β | Glycogen Synthase Kinase-3β |
| GSSG | glutathion oxydé |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| HKII | Hexokinase II |
| H ₂ O ₂ | Peroxyde d'hydrogène |
| H/R | Hypoxie/Reoxygénation |
| IMAC | Inner Membrane Anion Channel |
| I/R | Ischémie/Reperfusion |
| JAKinase | Janus Kinase |
| JNK | c-jun-NH ₂ terminal Kinase |
| K _{Ca} ²⁺ | Canal potassique active par le calcium |
| MAC | Mitochondrial Apoptosis induced factor |
| MAO-A | MonoAmine Oxydase-A |
| MAPkinase | Mitogen Activated Protein Kinase |
| mKATP | Canal potassique mitochondrial ATP-dépendant |
| 2-MPG | 2-mercaptopropionyl glycine |
| mPTP | Pore de transition de perméabilité mitochondriale |
| NADH | Nicotinamide adénine Dinucléotide |
| NO | Monoxyde d'Azote |
| NOS | Nitric Oxide Synthase |
| O ₂ ^{-•} | Anion superoxyde |
| •OH | Radical hydroxyle |
| p38MAPK | p-38 Mitogen Activated Protein Kinase |
| p70S6K | p70-Ribosomal S6 Kinase |
| PBR | Récepteur Périphérique aux Benzodiazépines |

| | |
|------------------------|--|
| PDK1 | Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1 |
| PHEN | Phénanthroline |
| PI | Iodure de Propidium |
| Pi | Phosphate inorganique |
| PiC | Mitochondrial Phosphate carrier |
| PI ₃ Kinase | Phosphatidylinositol-3 Kinase |
| PIP ₃ | Phosphatidyl inositol 3,4,5-triphosphate |
| PKC | Protéine Kinase C |
| PKC ϵ | Protéine Kinase C-epsilon |
| PKC δ | Protéine Kinase C-delta |
| PKG | Protéine Kinase G |
| PMA | Phorbol 12-myristate 13-acétate |
| PTD-BIR3 | Protein Transduction Domain-BIR3 |
| RCPGs | Récepteurs couplés à la Protéine G |
| REOX | Reoxygénation |
| RISK | Reperfusion Injury Salvage Kinases |
| SAFE | Survivor Activating Factor Enhancement pathway |
| SOD | Superoxyde Dismutase |
| STAT-3 | Signal Transducer and Activator of Transcription 3 |
| T ₅₀ mPTP | Temps 50 moyen d'ouverture du mPTP |
| T ₅₀ PI | Temps 50 moyen de mortalité cellulaire |
| TMRM | Tetramethylrhodamine Methyl ester |
| TNF- α | Tumor Necrosis Factor-alpha |
| TOM | Translocase of the Outer Membrane |
| TSPO | Protéine Translocatrice |
| UbH• | Radical semi-ubiquinone |
| UCP | Protéines découplantes (UnCoupling Proteins) |
| VDAC | Voltage Dependent Anion Channel |

Introduction générale

La maladie coronaire d'origine ischémique est et reste l'une des principales causes de mortalité dans le monde industrialisé. Le traitement de l'ischémie aiguë du myocarde est cependant entré dans une nouvelle ère où la mortalité peut être diminuée de moitié en utilisant des procédures qui permettent un retour rapide du débit sanguin dans la zone ischémique du myocarde, c'est-à-dire la revascularisation. Toutefois, cette reperfusion entraîne par elle-même des complications appelées lésions de la reperfusion qui ont été décrites pour la première fois par Jennings *et al.*, en 1960. Par conséquent, le développement de stratégies cardioprotectrices associées à la reperfusion constitue donc un besoin majeur en clinique afin d'améliorer la fonction myocardique, de diminuer l'incidence des arythmies, de retarder l'apparition de la mort cardiomyocytaire et de limiter la taille de l'infarctus du myocarde lors de l'ischémie/reperfusion (I/R) (Yellon *et al.*, 2007, Berdeaux, 2007). La découverte de deux formes principales de mécanismes cardioprotecteurs endogènes, qui consistent en la réalisation de brefs cycles d'I/R appliqués avant l'ischémie (pré-conditionnement ischémique) ou après une longue période d'ischémie et du décours de la reperfusion (post-conditionnement ischémique), a encouragé l'exploration de nouveaux moyens pharmacologiques afin de protéger le myocarde ischémié/reperfusé et a développé nos connaissances sur les bases moléculaires des lésions et de la survie cellulaire au cours des processus d'I/R.

Ainsi, l'étude de modèles expérimentaux d'infarctus myocardiques induits par I/R a permis de mettre en évidence l'implication de la mitochondrie, notamment l'augmentation de la perméabilité des membranes mitochondriales à la reperfusion, dans l'induction de la mort cellulaire. Cette augmentation de perméabilité est notamment causée par la formation/ouverture d'un pore au niveau des points de contacts entre les membranes mitochondriales; ce pore a été appelé « pore de transition de la perméabilité mitochondriale » (mPTP). Plusieurs études ont montré que ce pore pouvait être une cible pharmacologique intéressante pour protéger le myocarde des effets délétères de l'I/R.

En outre, la proposition que les lésions de reperfusion soient directement dues à la réadmission de l'oxygène et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) a attiré l'attention sur l'importance du stress oxydant dans la physiopathologie de l'I/R et l'effet qu'il pourrait avoir sur le mPTP.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude de la relation entre le stress oxydant et la perméabilité membranaire mitochondriale, plus précisément le mPTP, afin d'explorer des stratégies pharmacologiques permettant de limiter cette perméabilité lors de l'hypoxie/réoxygénation cardiomyocytaire expérimentale. Pour cela, nous avons mis au point plusieurs variantes d'un modèle cellulaire d'hypoxie/réoxygénation (H/R).

Le présent manuscrit est composé de deux parties :

- La première reprend les données de la littérature concernant la cardioprotection, l'implication de la mitochondrie au cours de ce processus et expose plus précisément le rôle du mPTP.
- La deuxième partie décrit la mise au point du modèle d'H/R ainsi que les protocoles expérimentaux que nous avons utilisés, puis présente les résultats que nous avons obtenus ainsi que leur discussion.

1^{er} Chapitre : La Cardioprotection

I. Introduction

Le concept de cardioprotection permet de distinguer deux fenêtres de protection : la première, dite précoce, résulte d'interventions expérimentales ou d'agents pharmacologiques modulant le métabolisme des cellules ou les voies de signalisation, directement ou via des modifications post-traductionnelles des protéines, et la seconde, responsable des effets à long terme, nécessite une nouvelle transcription ou traduction de protéines. Dans le contexte de la cardioprotection précoce, les agents cardioprotecteurs exercent leur effet en diminuant l'évolution des lésions et/ou en atténuant l'activité des voies de la mort cellulaire. D'autres approches comme l'hypothermie, diminuent le métabolisme et la consommation de l'ATP. Dans tous les cas, la pathogenèse de l'I/R est associée à une mort cellulaire et la plupart des stratégies cardioprotectrices ont donc mis l'accent sur la réduction de la mort myocytaire au cours d'un épisode aigu d'I/R. Dans ce contexte, au cours des dernières années, l'objectif majeur des chercheurs a été de comprendre les mécanismes de signalisation impliqués dans la mort cellulaire afin de la prévenir et a permis d'améliorer notre capacité à faire de la cardioprotection une stratégie utilisable en clinique.

II. Les différents types de la mort cellulaire

Pendant longtemps, l'origine des lésions survenant au cours d'un épisode d'I/R a fait débat : les cardiomyocytes subissaient-ils des dommages irréversibles principalement pendant l'ischémie mais uniquement visibles à la reperfusion ou bien des lésions supplémentaires se produisaient-elles pendant la reperfusion (lésions de la reperfusion) ? On a longtemps pensé que la mort cellulaire survenant au cours de l'ischémie occupait une place prépondérante dans les lésions induites lors d'un épisode d'I/R. La reperfusion était considérée comme essentielle afin de restaurer la production de l'ATP et protéger les cellules non-lésées par l'ischémie. Certains ont même fait valoir que les cellules qui meurent pendant la reperfusion étaient déjà irréversiblement endommagées et condamnées à

mourir et que cette mort était principalement accélérée par la reperfusion. Dans le paradigme actuel de l'I/R et de la cardioprotection, la formation et/ou l'ouverture du mPTP à la reperfusion apparaît comme un facteur déterminant de la mort ou de la survie cellulaire.

II.1 Apoptose

La notion de mort cellulaire programmée ou apoptose a été introduite par Kerr *et al.* (1972) pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la seule connue jusqu'alors c'est à dire la nécrose. Au cours de ce phénomène, les cellules se caractérisent par un grand nombre de changements morphologiques et biochimiques : externalisation des résidus phosphatidylsérines de la membrane plasmique, diminution du volume cellulaire, fragmentation non randomisée de l'ADN (laddering) et condensation de la chromatine. Les cellules bourgeonnent sous la forme de corps apoptotiques (blebs) qui sont phagocytés par les cellules voisines ou par les macrophages. L'apoptose est considérée comme une mort cellulaire propre puisque la phagocytose rapide des débris cellulaires permet de limiter l'établissement d'une réaction inflammatoire.

L'apoptose « physiologique » est un phénomène génétiquement prédéterminé qui peut être induit par différentes voies moléculaires dont les mieux caractérisées sont la voie extrinsèque (également connu sous le nom de « voie des récepteurs de mort cellulaire ») et la voie intrinsèque (également connue comme la "voie mitochondriale"). La première est médiée par des facteurs extracellulaires venant se fixer sur des récepteurs situés sur la membrane cytoplasmique des cellules déclenchant une cascade d'activation d'enzymes appelées caspases qui représentent le principal lien entre cette voie et la voie intrinsèque. Cette dernière dépend de l'activation d'une cascade d'événements intracellulaires qui convergent vers la mitochondrie, entraînant la perméabilisation de ses membranes et la libération de facteurs proapoptotiques comme le cytochrome c permettant l'activation des caspases effectrices conduisant à la mort de la cellule (figure 1).

Figure 1

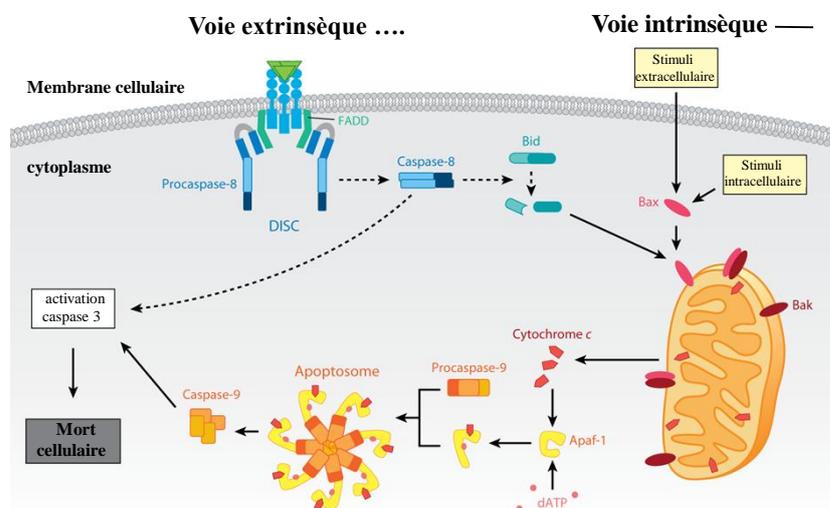


Figure 1: Signalisation de l'apoptose.

L'apoptose est régulée par deux voies :

1. la voie extrinsèque est caractérisée par la liaison de signaux extracellulaires à leurs récepteurs spécifiques situés sur la membrane plasmique et appelés récepteurs de mort.
2. la voie intrinsèque converge vers la mitochondrie afin de permettre la libération de protéines apoptogènes.

Figure adaptée de Whelan *et al.*, 2010.

Cette forme de mort cellulaire a aussi été décrite dans le cadre de l'I/R. L'inhibition des protéines proapoptotiques ainsi que l'augmentation de l'expression des protéines antiapoptotiques ont en effet été impliquées dans la réduction de la mort cellulaire lors de l'I/R. Ainsi, la surexpression de la protéine antiapoptotique Bcl-2 (B-cell leukemia) réduit la taille de l'infarctus (Chen *et al.*, 2001). Malgré le rôle central joué par les caspases au cours de l'apoptose, l'effet de leur inhibition dans la réduction de la taille de l'infarctus reste sujet à discussion. Pour certains auteurs, l'inhibition des caspases entraîne une modeste réduction de la taille de l'infarctus (Gottlieb *et al.*, 2005) alors que

pour d'autres les inhibiteurs de caspases la diminuent fortement (Stephanou *et al.*, 2001). Souktani *et al.* (2009) ont même démontré que l'inhibition de la voie d'activation des caspases pouvait limiter l'extension d'un infarctus expérimental par l'injection de la protéine PTD-Bir3 jusqu'à 3 heures après le début de la reperfusion.

II.2 Autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire, physiologique, lui aussi essentiel pour assurer à long terme l'homéostasie des cellules. Une partie du réseau trans golgien entoure progressivement la région cytoplasmique à détruire contenant les organites indésirables ou endommagés tels que les mitochondries et le réticulum endoplasmique. L'autophagosome ainsi formé va fusionner avec un lysosome pour former un autolysosome dans lequel les organites ingérés sont dégradés grâce à l'action conjointe du pH acide et des hydrolases (figure 2).

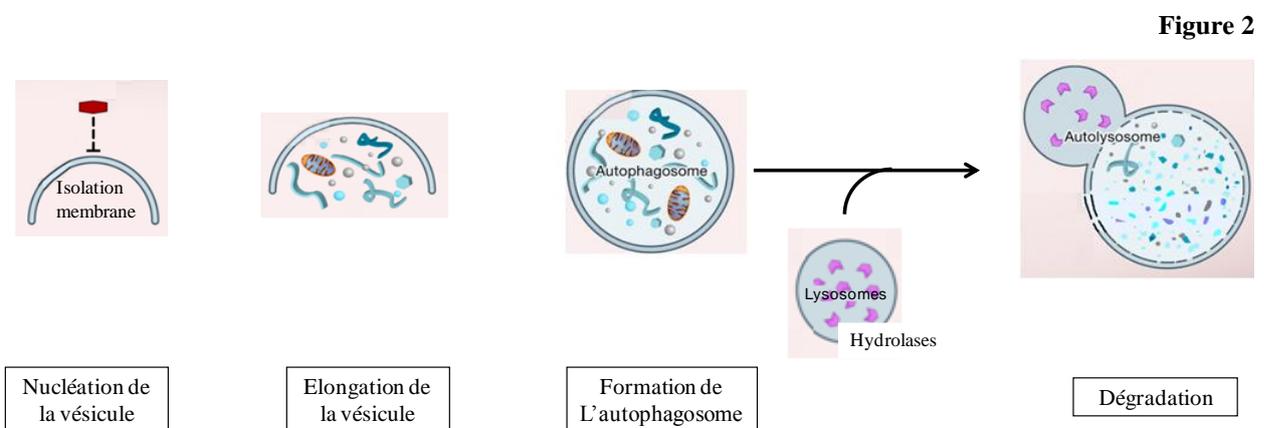


Figure 2: Formation de l'autolysosome au cours de l'autophagie.

Figure adaptée de Levine *et al.*, 2008.

Au cours d'un épisode d'I/R ou d'un stress oxydant, la mitochondrie représente la cible principale de l'autophagie qui peut protéger la cellule en séquestrant et dégradant les mitochondries

susceptibles de la faire basculer vers un processus d'apoptose et/ou de nécrose (Gottlieb R *et al.*, 2009). Par ailleurs, il existe des situations au cours desquelles une autophagie excessive peut amener le taux de mitochondries à un seuil critique, inférieur à celui permettant de répondre aux besoins énergétiques de la cellule. De telles situations extrêmes conduisent à la mort de la cellule (Rothermel *et al.*, 2008).

De nombreuses études ont impliqué le processus d'autophagie dans la cardioprotection. Yan *et al.* (2005) ont montré que l'autophagie augmente suite à une ischémie chronique du myocarde et, plus récemment, Gurusamy *et al.* (2009) ont montré que l'autophagie contribue aussi à la cardioprotection induite par le pré-conditionnement.

Plusieurs liens unissent les différents types de mort cellulaire. L'augmentation de la concentration calcique observée pendant l'ischémie déclenche l'autophagie et entraîne l'activation d'une protéase calcium-dépendante, la calpaïne, qui est impliquée dans le clivage de la protéine Atg5 qui intervient dans le processus autophagique. Atg5 subit alors une translocation vers les mitochondries puis se lie à Bcl-2, stimulant ainsi l'apoptose (Hamacher-Brady *et al.*, 2006). Enfin, il a été montré que la liaison entre Bcl-2 et beclin-1, un gène impliqué dans l'autophagie, entraîne l'inhibition de ce type de mort cellulaire suggérant que la famille Bcl-2 peut fonctionner non seulement en bloquant directement l'apoptose, mais aussi en inhibant l'autophagie (Patingre *et al.*, 2005). En conclusion, il semble que le calcium, la calpaïne, les caspases et les membres de la famille Bcl-2 constituent une interconnection entre l'autophagie et les autres voies de mort cellulaire actives lors de l'I/R.

II.3 Nécrose

Ce phénomène se caractérise par un gonflement cellulaire correspondant à une perte précoce du métabolisme énergétique nécessaire au maintien de l'homéostasie ionique. En effet, la nécrose est caractérisée par une hyperosmolarité intracellulaire due à la formation d'ADP et de phosphate inorganique (P_i) par hydrolyse de l'ATP et des trioses par glycogénolyse. Il s'en suit une entrée d'eau dans la cellule et donc une augmentation du volume cellulaire. Cette inflation volumique peut à

terme devenir excessive, entraînant ainsi la rupture des membranes cytoplasmiques et le relargage du contenu intracellulaire, responsable de l'apparition d'une réponse inflammatoire (figure 3).

Figure 3

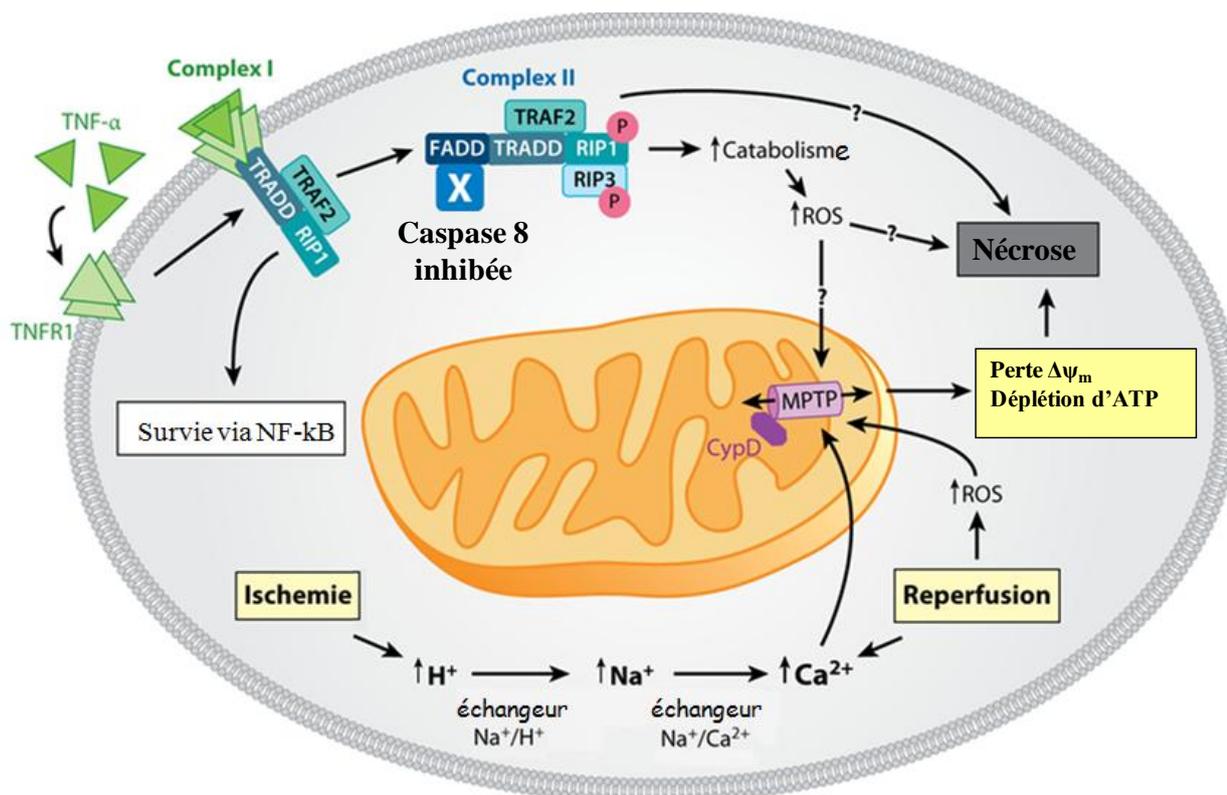


Figure 3: Voies de signalisation de la nécrose.

La nécrose a longtemps été considérée comme une forme de mort cellulaire passive et non-réglée mais des études récentes montrent que cette forme de mort cellulaire serait en partie régulée et impliquerait l'ouverture/la formation du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP).

Figure adaptée de Whelan *et al.*, 2010.

Le choix de la mort par apoptose ou par nécrose est en partie dicté par l'abondance des réserves énergétiques intracellulaire. En effet, alors que l'apoptose nécessite une quantité minimale d'ATP intracellulaire, la nécrose est généralement accompagnée d'un épuisement total des stocks d'ATP (Nicotera *et al.*, 1998). Ainsi, la nécrose n'est pas génétiquement prédéterminée et se produit normalement dans un court délai suite au stimulus déclencheur (2-4 h). Des études récentes (Golstein *et al.*, 2007) suggèrent que la nécrose peut être contrôlée, et que des stratégies cardioprotectrices qu'elles soient interventionnelles ou pharmacologiques, interagissant avec les événements qui sont impliqués dans la rupture de la membrane plasmique, tels que l'activation des protéases avec perte d'ATP, la modification de l'homéostasie ionique et le gonflement des cellules, peuvent réduire la mort cellulaire par nécrose. Une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire libre dans le cytosol est systématiquement observée au cours de l'ischémie et au début de la reperfusion. Cette augmentation de la concentration de calcium intracellulaire provoque une activation des calpaïnes à l'origine du clivage de protéines (Bid [BH3 interacting domain death] et Atg5) engagées dans la rupture de la membrane plasmique. L'augmentation de la concentration calcique et de la production d'EROs peut conduire à l'activation du mPTP. L'ouverture de ce canal conduit à la chute des stocks d'ATP aboutissant au gonflement de la matrice mitochondriale et la libération du cytochrome c. Si un grand nombre de mitochondries dans une cellule ouvrent ou forment leurs mPTP, la cellule perd sa capacité à produire de l'ATP et à maintenir son homéostasie ionique; l'ensemble contribue à l'augmentation du volume cellulaire entraînant ainsi la rupture des membranes cytoplasmiques, le relargage du contenu intracellulaire et au final à la mort cellulaire.

L'I/R semble faire intervenir les trois types de morts cellulaires : l'apoptose, l'autophagie et la nécrose. Au vu des données récentes (Murphy, 2008) montrant les liens inextricables les unissant, il est raisonnable de penser qu'il est plus utile d'analyser les mécanismes de la mort cellulaire que de tenter de définir précisément le mode exact de cette mort. Le point crucial est que les dommages cellulaires provoqués par l'I/R semblent résulter d'un processus actif qui peut être modulé par des stratégies cardioprotectrices appropriées instaurées le plus tôt possible au cours de l'ischémie et/ou à la reperfusion.

III. Pourquoi la mort cellulaire suite à l'ischémie/reperfusion?

Avec une prévalence d'environ 120.000 cas/an en France, l'infarctus du myocarde reste l'une des principales causes de morbidité et de mortalité. Il est dû à une ischémie myocardique prolongée qui résulte d'une diminution de l'apport sanguin au niveau du myocarde et qui engendre un apport en oxygène insuffisant au niveau des mitochondries pour soutenir la phosphorylation oxydative et donc le métabolisme cellulaire. La phase de reperfusion qui correspond à la restauration du flux sanguin et donc à la réintroduction de l'oxygène et des substrats métaboliques est nécessaire à la sauvegarde du tissu. Cependant, bien que ce soit la stratégie la plus efficace pour réduire la taille de l'infarctus, la reperfusion est par elle-même associée à des modifications biochimiques, structurales et fonctionnelles supplémentaires qui peuvent amplifier la mort des cardiomyocytes. Ce phénomène, appelé lésions de reperfusion myocardique, peut paradoxalement réduire les effets bénéfiques de la reperfusion (figure 4). Il est courant de considérer les lésions dues à l'I/R comme une entité composite puisque la reperfusion ne peut jamais se produire indépendamment de l'ischémie. Les investigateurs ont néanmoins étudié les deux phénomènes isolément de manière à décrire précisément les événements liés à l'ischémie et ceux survenant lors de la reperfusion.

Figure 4

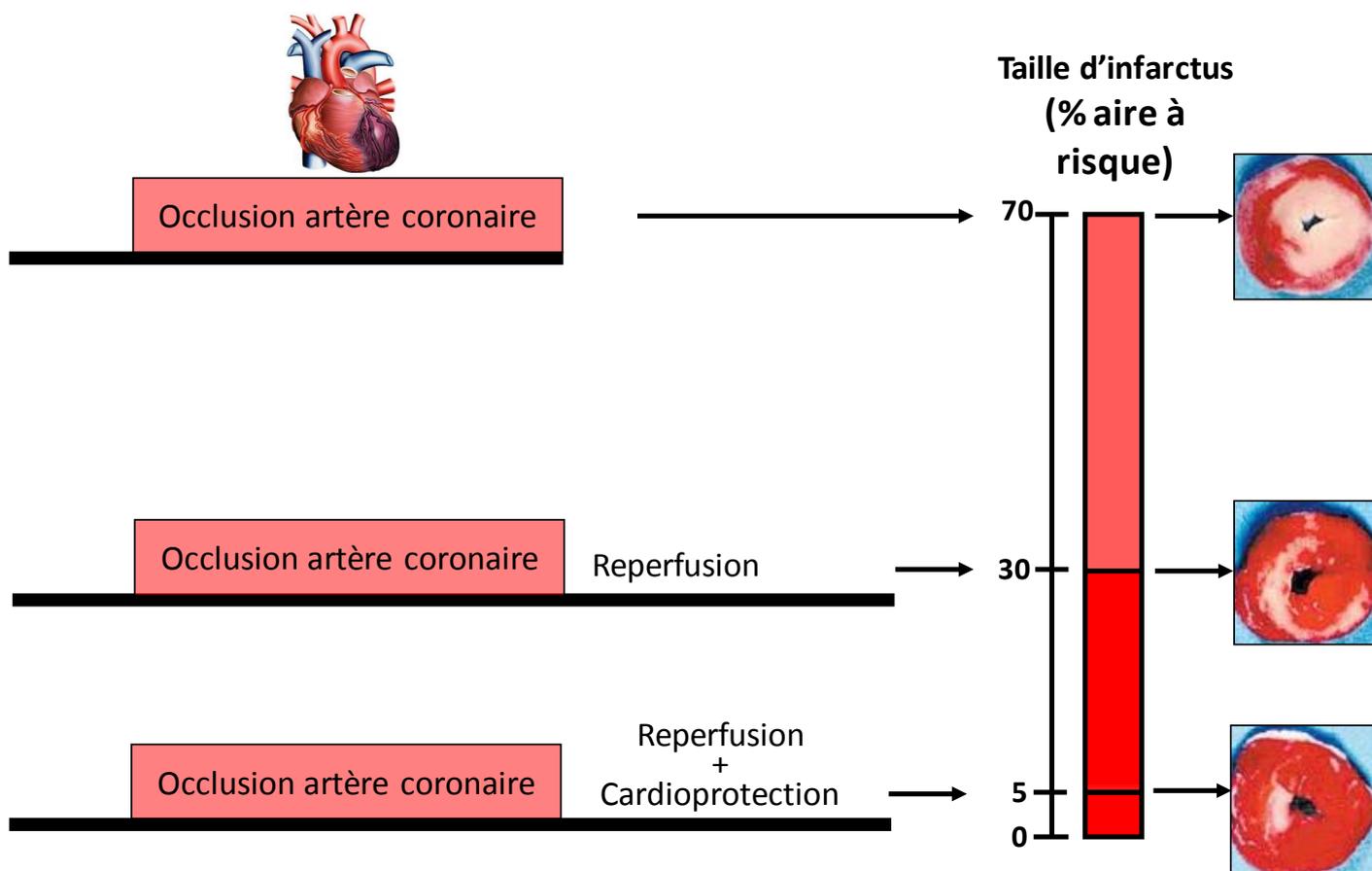


Figure 4 : Concept de lésions de reperfusion coronaire et cardioprotection.

Ce schéma représente la réduction de taille d'infarctus obtenue après reperfusion suite à une ischémie. Le pré- ou post-conditionnement ischémique ou l'administration d'agents pharmacologiques cardioprotecteurs au moment de la reperfusion permettent de réduire de 25% la taille d'infarctus par rapport à la reperfusion seule.

La zone blanche correspond à la zone infarctée alors que la zone colorée en rouge correspond à l'aire à risque.

Figure Adapté de Yellon *et al.*, 2007

III.1 Les événements liés à l'ischémie

Au cours de l'ischémie, l'arrêt de la circulation sanguine provoquée par l'occlusion d'une artère coronaire est à l'origine d'une forte diminution de l'oxygène et des substrats métaboliques cellulaires. La conséquence immédiate est un ralentissement de la chaîne respiratoire mitochondriale et donc de la production d'ATP, aggravée par d'importantes perturbations du métabolisme des acides gras à l'origine de la diminution des équivalents réducteurs (FADH₂, NADH) disponibles pour la phosphorylation oxydative (Solaini et Harris, 2005). L'hydrolyse de l'ATP, en absence de phosphorylation oxydative, conduit à une rapide chute des concentrations d'ATP et du potentiel électrochimique mitochondrial. Parallèlement, l'ischémie provoque une augmentation de la production d'EROs qui est à l'origine d'une altération de la composition des membranes cellulaires (figure 5A).

Au cours de l'ischémie, les concentrations calciques cytosoliques sont également modifiées. Les mécanismes de capture du calcium par le réticulum sarcoplasmique (RS) sont altérés entraînant une accumulation intracellulaire de calcium. De plus, le métabolisme anaérobique est associé à une acidose provoquée par l'accumulation intracellulaire de phosphate inorganique (Pi), de lactate et de protons. Cette acidose intracellulaire cause l'activation de l'échangeur sodium/proton et par conséquent l'accumulation de sodium intracellulaire. Cette surcharge sodique est exacerbée par l'inhibition de la pompe sodium/potassium ATPase suite à une diminution des stocks d'ATP. Cependant, la diminution d'ATP et l'augmentation du calcium intracellulaire pendant l'ischémie ne semblent pas entraîner immédiatement de lésions irréversibles. En revanche, si l'ischémie perdure, l'augmentation cytosolique des concentrations ioniques entraîne un gonflement osmotique des cellules cardiaques qui peut aboutir à la rupture de la membrane plasmique (Ferdinandy *et al.*, 2007).

III.2 Les événements liés à la reperfusion

La réintroduction soudaine de l'oxygène stimule la réactivation de la chaîne respiratoire mitochondriale avec une production massive d'EROs. Ces EROs provoquent des lésions cellulaires

telles que la rupture du RS à l'origine de la libération du calcium. De plus, lors de la levée de l'occlusion coronaire, l'afflux d'oxygène est à l'origine de la restauration des stocks d'ATP et d'une correction rapide du pH_i par activation de l'échangeur sodium/proton. Ceci conduit à l'augmentation du sodium cytosolique qui secondairement provoque la mise en route de l'échangeur sodium/calcium qui permet l'entrée du calcium conduisant à une surcharge cytosolique. L'association de ces trois événements, surcharge calcique, production d'EROs et alcalinisation du pH_i favorise l'ouverture du mPTP (figure 5B).

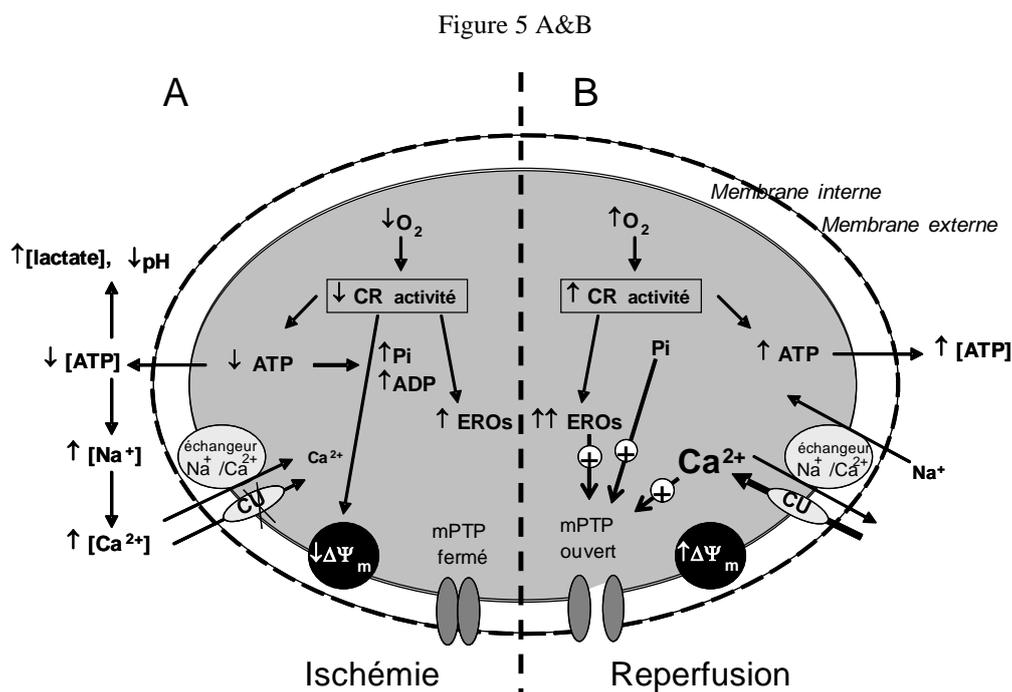


Figure 5: Séquences des événements intervenant au niveau de la mitochondrie pendant l'ischémie (A) et la reperfusion (B).

Ce schéma illustre la relation existante entre la consommation d'oxygène, la production d'ATP, l'accumulation de calcium, la production des espèces réactives d'oxygène et l'activation de l'ouverture/la formation du mPTP au cours d'un épisode d'I/R.

CR, chaîne respiratoire; CU, uniporteur calcique mitochondrial; $\Delta\psi_m$, potentiel de membrane;

Figure adaptée de Morin *et al.*, 2009

Il résulte de l'ensemble de ces données que les stratégies cardioprotectrices, pré- et post-conditionnement ischémiques ainsi que les traitements pharmacologiques qui miment ces deux mécanismes, peuvent protéger le myocarde par des voies communes convergeant vers la

mitochondrie qui apparait comme un carrefour incontournable dans la régulation de toutes les formes de mort cellulaire associées à l'I/R.

IV. Les voies de signalisation

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont recherché des stratégies permettant de prévenir les lésions d'I/R. La découverte du pré-conditionnement ischémique par Murry *et al.* (1986) qui consiste en la réalisation de brefs séquences d'I/R permettant de protéger le cœur d'un épisode ischémique plus long et qui reste la stratégie protectrice de référence, a non seulement permis d'évaluer les niveaux de protection possibles mais aussi de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués. Plus récemment, les post-conditionnements ischémique (des brefs séquences d'I/R avant la reperfusion) et pharmacologique se sont également révélés comme des stratégies cardioprotectrices efficaces (Cour *al.*, 2011 ; Ovize *al.*, 2010; Piot *al.*, 2008). Selon certains auteurs, il paraît assez vraisemblable que le pré- et le post-conditionnement ne soient que deux modalités d'un même mécanisme de cytoprotection concourant à l'activation des kinases de la voie dite « Reperfusion injury salvage kinases » «RISK». De façon schématique (figure 6), le signal cytoprotecteur est véhiculé par deux cascades intracellulaires, celle de la PI₃Kinase-Akt (phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt) et celle de ERK (p42/44 extracellular signal regulated kinase) dont les stimuli pourraient être des médiateurs endogènes tels que l'adénosine, les dérivés opioïdes ou la bradykinine via l'activation de récepteurs membranaires (Hausenloy et Yellon, 2004).

Plusieurs autres protéines kinases telles que les MAPKinases (Mitogen Activated Protein Kinases), la p38 MAPKinase (p38 mitogen Activated Protein Kinase) et la JNKinase (c-Jun-NH2 terminal kinase), sont également impliquées dans les mécanismes cardioprotecteurs (figure 6). Plus récemment une autre voie, la voie «SAFE» (Survivor Activating Factor Enhancement pathway) a été individualisée par Lecour *et al.* (2009). Cette voie met en jeu les facteurs JAKinase (Janus kinase) et STAT-3 (signal transducer and activator of transcription 3) (figure 6).

Étant donné la complexité inhérente à l'ensemble des voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de cardioprotection, nos discussions seront centrées sur les voies de signalisation les plus étudiées.

Figure 6

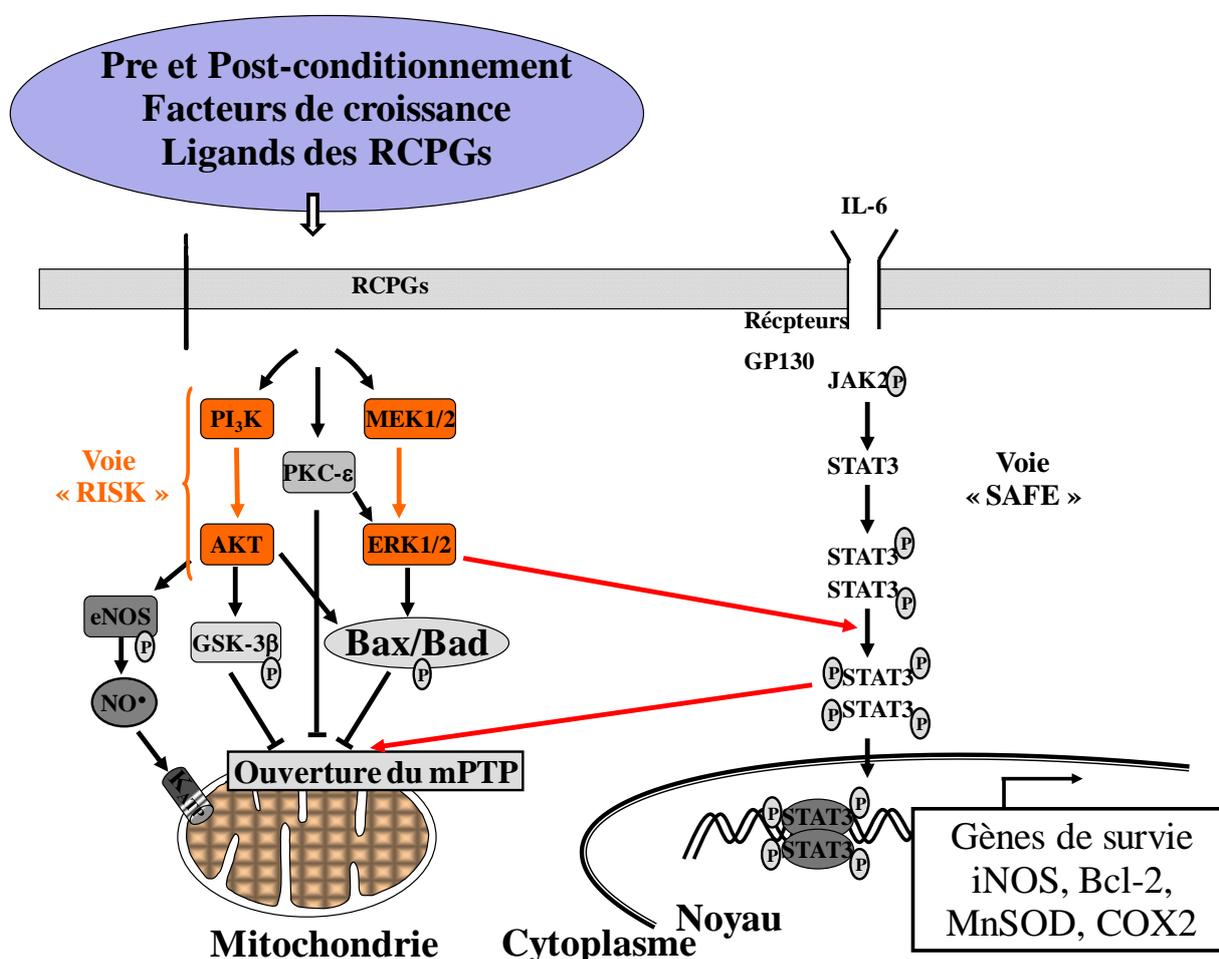


Figure 6: Signalisation intracellulaire du pré- et du post-conditionnement

Deux voies de signalisation ont été principalement décrites pour expliquer le pré-et le post-conditionnement :

La voie RISK, qui est activée par stimulation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) , et qui est composée de la voie PI₃K/AKT et de la voie MAPKs.

La voie SAFE, avec l'activation du récepteur TNFR2 et la translocation de STAT-3

Ces deux voies aboutissent à l'inhibition de l'ouverture du mPTP.

Abréviations : PI₃K, phosphoinositide 3-kinase ; PKC, protein kinase C ; ERK, extracellular regulated kinase ; MEK, mitogen activated kinase/ERK ; eNOS, endothelial NOS ; GSK-3β, glycogen synthase kinase 3β ; K⁺ATP, mitochondrial potassium channel ; mPTP, mitochondrial permeability transition pore.

IV.1 Les récepteurs couplés à la protéine G (RCPG)

Plusieurs études suggèrent que le pré- et post-conditionnement produisent la libération de médiateurs endogènes (Gross et Gross, 2006) tels que l'adénosine (Liu GS *et al.*, 1991), les opioïdes (Gross *et al.*, 2004) et la bradykinine (Goto *et al.*, 1995) qui se lient aux RCPG et activent les voies de signalisation évoquées précédemment, notamment la voie PI₃Kinase et la voie MAPKinase.

IV.2 La Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI₃Kinase)

L'action de la PI₃Kinase est généralement attribuée à la formation de phosphatidyl inositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃) qui, par action de la phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) facilite la phosphorylation de substrats comme Akt (aussi dénommée protéine kinase B ou PKB), la p70 Ribosomal S6 Kinase (p70S6K), la protéine kinase C (PKC) et la NO synthase endothéliale (eNOS). L'activation de la PI₃Kinase est associée à une protection cellulaire et une réduction de l'apoptose, tandis que son inhibition par la wortmannine ou le LY294002 bloque l'effet protecteur du pré- et du post-conditionnement ischémique (Bopassa *et al.*, 2006 ; Tong *et al.*, 2005 ; Tsang *et al.*, 2004).

IV.3 La Protéine Kinase B ou Akt

Il a été démontré que le pré-conditionnement ischémique augmente la phosphorylation d'Akt et cette activation est inhibée par la wortmannine et le LY 294002, deux inhibiteurs de la PI₃Kinase, suggérant un rôle de la PI₃Kinase dans l'activation d'Akt au cours du pré-conditionnement (Tong *et al.*, 2000). Akt agit en phosphorylant un certain nombre de protéines cibles (Murphy, 2008) telles que la glycogen Synthase kinase-3β (GSK-3β), eNOS, les protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax [Bcl-2 associated x protein], Bad [Bcl-xL/Bcl-2-Associated Death]) et la caspase 9 (Fayard *et al.*, 2005). Ceci se traduit par l'activation de eNOS et l'inactivation de GSK-3β, deux facteurs fortement impliqués dans les mécanismes cardioprotecteurs. Par ailleurs, la surexpression

d'Akt bloque l'activation hypoxie-dépendante des caspases 3 et 9 ainsi que la phosphorylation de Bad, inhibant de ce fait l'apoptose (Uchiyama *et al.*, 2004).

IV.4 La “Glycogen Synthase Kinase-3 β ” (GSK-3 β)

Le rôle de GSK-3 β dans la protection des cellules au cours de l'I/R a été mis en évidence par Tong *et al.* (2002) qui ont montré que le pré-conditionnement entraîne une augmentation de la phosphorylation de la GSK-3 β qui peut être bloquée par des inhibiteurs de la PI₃Kinase. De même, plusieurs agents cardioprotecteurs augmentent la phosphorylation de la GSK-3 β dans des modèles de cardiomyocytes (Juhaszova *et al.*, 2004). Des études pharmacologiques ont confirmé *in-vivo* l'importance de cette protéine. Ainsi, l'inhibition pharmacologique de cette protéine réduit la taille d'infarctus et améliore la fonction cardiaque post-ischémique (Tong *et al.*, 2002). Son inhibition est impliquée dans la cardioprotection induite par l'administration d'opioïdes et reste efficace lorsque les inhibiteurs de la GSK-3 β sont ajoutés à la reperfusion (Gross *et al.*, Circ Res 2004). Le rôle de la GSK-3 β a également été mis en évidence dans le post-conditionnement ischémique. En effet, son inactivation génétique limite les lésions de la reperfusion (Gomez *et al.*, 2008). Par ailleurs, comme nous le verrons dans la partie résultats de ce travail, nous avons montré que l'administration lors de l'I/R de morphine ou d'un inhibiteur de la GSK-3 β , le SB 216763, retarde l'ouverture du mPTP et limite ainsi la mort cellulaire (Obame *et al.*, 2008), liant ainsi l'inhibition de la GSK-3 β au mPTP.

Les mécanismes par lesquels l'inhibition de la GSK-3 β retarde l'ouverture du mPTP ne sont pas bien établis ; ils pourraient être indirects et impliqués des intermédiaires au niveau du cytosol. Il est possible que GSK-3 β modifie l'ouverture du mPTP en altérant la phosphorylation de plusieurs substrats cibles (Samarjit Das *et al.*, 2008).

IV.5 La « Nitric oxide Synthase/endothelial nitric oxide synthase » (NOS/eNOS)

La phosphorylation de l'eNOS par l'Akt conduit à la production de NO responsable de l'augmentation de l'activité du canal potassique mitochondrial ATP-dépendant (mK_{ATP}) (Sasaki *et al.*, 2000). De récentes études ont montré cependant que les effets du NO sur le mK_{ATP} ne seraient pas directs mais pourraient faire intervenir la protéine kinase G (PKG) et la protéine kinase C-epsilon (PKC- ϵ). En effet, le NO active la guanylyl cyclase qui, via PKG, stimulerait la PKC- ϵ mitochondriale entraînant l'ouverture du mK_{ATP} (Costa *et al.*, 2005). Alternativement, le NO pourrait induire la S-nitrosation d'un certain nombre de protéines, comme par exemple, le complexe I mitochondrial conduisant ainsi à l'inhibition de l'ouverture du mPTP et à la diminution des lésions d'I/R (Fontaine *et al.*, 1998).

IV.6 La Protéine Kinase G/ la Protéine Kinase C- ϵ (PKG/PKC- ϵ)

La PKG semble être l'étape terminale de la cascade de transduction des signaux cardioprotecteurs au niveau du cytosol, phosphorylant une cible encore inconnue de la membrane mitochondriale externe. Les études de Costa *et al.* (2005) ont clairement montré que la phosphorylation de la PKG mène à l'ouverture du canal mK_{ATP} . Cependant, la PKG est incapable de traverser la membrane mitochondriale externe, elle ne peut donc pas être à l'origine d'une phosphorylation directe de ce canal. La PKG pourrait induire la phosphorylation d'une cible inconnue de la membrane mitochondriale externe qui activerait ultérieurement la PKC- ϵ présente au sein de l'espace intermembranaire mitochondrial.

Plusieurs études ont montré le rôle important de la PKC- ϵ dans le processus de cardioprotection. La PKC- ϵ est activée par des donneurs de NO (Ping *et al.*, 1999), ce qui suggère que la eNOS se situe en amont de cette protéine. Le pré-conditionnement ischémique induit par l'activation de la PKC- ϵ peut être bloqué par la wortmannine (Tong H *et al.*, 2004) suggérant que la

PKC- ϵ se positionne en aval de la PI₃Kinase. En outre, Philip *et al.* (2006) ont observé que la protection provoquée par un activateur de la PKC, le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) administré au moment de la reperfusion, est abolie par un antagoniste des récepteurs A₂ de l'adénosine ou par la wortmannine. Ces données suggèrent que la protection induite par l'activation de la PKC- ϵ au cours de la reperfusion pourrait être due à la stimulation des récepteurs de l'adénosine et de la PI₃Kinase. La PKC- ϵ semble aussi être activée par les EROs générées pendant le pré-conditionnement. La PKC- ϵ joue également un rôle au cours du post-conditionnement ischémique puisque Zatta *et al.* (2006) ont montré que l'inhibition de la PKC- ϵ limite la réduction de la taille d'infarctus causée par le post-conditionnement. La PKC- ϵ formerait avec la MAPKinase un complexe de signalisation localisé au niveau de la mitochondrie (Baines *et al.*, 2002). D'autres complexes formés avec le VDAC (Voltage dependent anion channel), l'ANT (anion nucleotide translocator) et l'HKII (hexokinase II) (Baines *et al.*, 2003) ont aussi été mis en évidence par coimmunoprécipitation.

En résumé, la PKG conduit à l'activation de la PKC- ϵ qui, à son tour active le mK_{ATP} entraînant une modeste production d'EROs qui serait responsable de l'activation accrue de la PKC- ϵ et de l'inhibition de l'ouverture du mPTP (Costa *et al.*, 2006).

IV.7 “Mitogen Activated Protein Kinase” (MAPKinase)

La voie de signalisation de la MAPKinase est composée de trois grandes branches dénommées selon leurs effecteurs terminaux, les voies ERK (extracellular signal-regulated protein kinases), JNKinase (c-Jun NH₂-terminal kinases) et p38 MAPKinase. Une fois activées, ces kinases phosphorylent directement diverses protéines cytoplasmiques, nucléaires et mitochondriales afin de moduler l'expression de gènes, le métabolisme cellulaire et la mort cellulaire (Baines *et al.*, 2005).

IV.7.1 “Les Extracellular signal-Regulated protein Kinases” (ERKs)

S'il est bien établi que la voie PI₃k-Akt est impliquée dans les mécanismes de protection du pré- et du post-conditionnement ischémique et pharmacologique, l'implication de ERK dans ce cadre est

plus discutée (Mocanu *et al.*, 2002 ; Fryer *et al.*, 2001). Baines *et al.* (2002) ont montré que ERK est phosphorylée chez des souris exprimant la forme active de la PKC- ϵ suggérant ainsi que cette tyrosine kinase se positionne en aval de la PKC- ϵ . Les agonistes du canal mK_{ATP} ont également été décrits comme activant ERK (Samavati *et al.*, 2002). Cependant, plusieurs autres travaux suggèrent qu'ERK pourrait également agir parallèlement à la PKC (Vahlhaus *et al.*, 1998) puisque le pré-conditionnement ischémique augmente la phosphorylation d'ERK, un effet bloqué par un inhibiteur du canal mK_{ATP} , le PD 98059. A noter que Mocanu *et al.* (2002) contredisent cette hypothèse en montrant que PD98059 n'abolit pas les effets protecteurs du pré-conditionnement ischémique. Par ailleurs, Hauselnoy *et al.* (2004) ont montré que le pré-conditionnement ischémique entraîne une phosphorylation biphasique d'Akt et d'ERK dans un modèle de cœur isolé de rat, la première phase ayant lieu à la fin du pré-conditionnement c'est-à-dire avant l'ischémie prolongée, la deuxième se déroulant durant la reperfusion. Cette activation à la reperfusion serait responsable de l'inhibition de l'ouverture du mPTP (Ping *et al.*, 1999).

Il est à noter que la modulation de l'activité des facteurs de transcription par ERK pourrait être plus particulièrement impliquée dans le pré-conditionnement tardif.

IV.7.2 “P38 Mitogen Activated Protein Kinase” (p38 MAPK)

La p38 MAPKinase est activée par des signaux de stress. Son rôle dans le processus de cardioprotection est controversé (Sun *et al.*, 2006 ; Schneider *et al.*, 2001) et ceci pourrait être dû à l'évolution de sa concentration cytosolique. En effet, cette kinase est rapidement phosphorylée au début de l'ischémie alors que son niveau de phosphorylation diminue lorsque l'ischémie se prolonge avant d'augmenter à nouveau au moment de la reperfusion (Shimizu *et al.*, 1998). D'autres raisons pourraient expliquer cette controverse, notamment l'équilibre relatif existant entre les différentes isoformes de la protéine dans les différentes espèces et modèles expérimentaux ainsi que la sélectivité et la dose des inhibiteurs utilisés dans les études (Yellon et Downey, 2003).

IV.7.3 c-Jun NH₂-terminal kinases (JNKinase) :

JNKinase est un autre membre de la famille MAPKinase activé par le stress. Pour certains auteurs, JNKinase est fortement activé au cours de la reperfusion. Pour d'autres, JNKinase est phosphorylé pendant l'ischémie (Behrends *et al.*, 2000) alors que pour d'autres encore cette phosphorylation est diminuée pendant l'ischémie et augmentée lors du pré-conditionnement (Nakano *et al.*, 2000). Sun *et al.* (2006) ont noté une diminution de l'activité de JNKinase et de la p38 MAPKinase lors du post-conditionnement.

Le rôle de cette protéine dans l'I/R et la cardioprotection reste encore une source de débat.

IV.8 La voie “Survivor Activating Factor Enhancement” (SAFE)

Depuis quelques années, une autre voie dénommée «SAFE» (Survivor Activating Factor Enhancement pathway) par Lecour *et al.* (2009) est l'objet de travaux croissants. Cette voie met en jeu les facteurs JAKinase (Janus kinase) et STAT-3 (signal transducer and activator of transcription 3).

L'activation de STAT-3 après l'induction d'un infarctus aigu du myocarde a été démontrée chez le rat en 2000 (Negoro *et al.*, 2000). Cette activation persiste jusqu'à 24 h après ligature de l'artère coronaire gauche chez le rat (Negoro *et al.*, 2001). Le groupe de Bolli *et al.* (2001) a ensuite mis en évidence la phosphorylation de JAKinase et la translocation de STAT-3 dans le noyau au cours de la phase tardive du pré-conditionnement ischémique dans un modèle murin (Xuan *et al.*, 2001). Plus tard, la même séquence d'événements a été décrite durant la phase aiguë du pré-conditionnement ischémique (Hattori *et al.*, 2001) ainsi qu'au début de la reperfusion, l'effet cardioprotecteur du pré-conditionnement étant bloqué par l'administration à la reperfusion d'un inhibiteur de JAKinase, l'AG490 (Lecour *et al.*, 2005). L'implication de STAT-3 a également été démontrée lors de pré-conditionnements pharmacologiques : traitement par l'érythropoïétine (Rafiee *et al.*, 2005), les agonistes des cannabinoïdes (Montecucco *et al.*, 2009), les opiacés (Gross *et al.*, 2006) ou le TNF α (Tumor Necrosis Factor) (Suleman *et al.*, 2008).

La voie «SAFE» a aussi été impliquée dans la protection induite par le post-conditionnement. En effet, le post-conditionnement ischémique est inefficace chez des souris délétées pour le gène codant pour STAT-3 (Boengler *et al.*, 2008) et inversement le post-conditionnement pharmacologique induit par l'administration de l'insuline au moment de la reperfusion induit la phosphorylation de STAT-3 (Fuglestad *et al.*, 2008). Cette voie «SAFE» semble donc bien être une alternative à la voie «RISK». Néanmoins, l'inhibition de l'une de ces deux voies abolit totalement la protection induite par le pré-conditionnement ischémique, ce qui suggère une relation entre elles.

Il convient de noter que plusieurs cibles de STAT-3 ont été identifiées, notamment des protéines impliquées dans la survie cellulaire comme Bcl-2, Bcl-xL (Hattori *et al.*, 2001) et GSK-3 β (Gross *et al.*, 2006) ce qui suggère, comme l'ont fait Boengler *et al.* (2010), que cette voie pourrait converger vers le mPTP, même si cela n'a pas été intensivement étudié comme c'est le cas pour la voie «RISK».

IV.9 Des voies alternatives ?

La présence d'autres voies de protection que celles évoquées précédemment a aussi été suggérée dans le pré-conditionnement ischémique. Par exemple, l'adénosine semble capable d'induire une protection indépendamment de l'activation de la voie «RISK» (Downey, 2007) et de la voie «SAFE» puisque des souris délétées pour le gène codant pour le TNF alpha sont encore pré-conditionnables (Smith *et al.*, 2002). Par ailleurs, des résultats récents (Burley *et al.*, 2007) indiquent que la voie impliquant la guanosine 3', 5'-monophosphate cyclique (cGMP) et la PKG pourrait être une voie de survie dans le pré- et le post-conditionnement ischémique. Cependant un lien entre ces voies et les voies «RISK» et «SAFE» n'a pas encore été étudié.

IV.10 Les effecteurs terminaux de la cardioprotection

Comme nous venons de le voir, plusieurs voies de signalisation et médiateurs de cardioprotection ont été identifiés mais le (ou les) effecteur(s) terminal(aux) reste(nt) à préciser

même si des cibles intéressantes ont déjà été identifiées. La première d'entre elles est la mitochondrie où la formation/l'ouverture du mPTP semble jouer un rôle primordial.

Il est également possible que les kinases de signalisation modifient des protéines non-mitochondriales ainsi que d'autres aspects du métabolisme cellulaire. Par exemple, le pré-conditionnement provoque une altération des connexines (Schwanke *et al.*, 2002) ainsi qu'une modification de la régulation du calcium par le RS (Zucchi *et al.*, 2001). De plus, deux types de pré-conditionnement ont été décrits, aigu et tardif, ce dernier passant par une régulation des gènes.

En résumé, il est probable que le processus de cardioprotection implique des effecteurs différents mais les mitochondries semblent occuper une place fondamentale dans la décision d'une cellule à survivre ou à mourir au cours de l'I/R. Plus spécifiquement, au sein de la mitochondrie, les voies de cardioprotection semblent converger principalement vers le mPTP en inhibant son ouverture/formation soit directement soit indirectement en empêchant les conditions qui la favorisent. Le rôle des mitochondries dans la cardioprotection sera discuté en détail dans le 2^{ème} chapitre.

2^{ème} Chapitre : Cardioprotection et mitochondries

La mitochondrie a longtemps été considérée comme une véritable centrale énergétique puisque responsable de la production d'ATP. Cependant, depuis plusieurs années, elle a aussi été identifiée comme un acteur majeur dans le processus de mort cellulaire la mettant au centre d'intenses travaux de recherche dans le domaine de l'I/R. Dans ce deuxième chapitre, nous présenterons quelques généralités sur la mitochondrie avant d'aborder son rôle dans les mécanismes de cardioprotection et plus particulièrement l'implication d'un de ces constituants, le mPTP.

Première Partie

I. Généralités

La mitochondrie serait née lorsque deux bactéries auraient fusionné pour donner un eucaryote primitif duquel tous les eucaryotes actuels dériveraient. Cette hypothèse sur l'origine de la mitochondrie a été suggérée, en 1963, grâce à la mise en évidence dans les cellules eucaryotes d'un ADN différent de l'ADN nucléaire, l'ADN mitochondrial (ADNmt de 16 Kb chez les mammifères). Chaque cellule de l'organisme contient entre 500 et 2000 mitochondries de 0,5 à 1 µm de diamètre. Ces organites de forme variée peuvent fusionner les uns avec les autres avant de se séparer à nouveau. Les mitochondries sont très mobiles et se déplacent dans le cytoplasme en utilisant les microtubules du cytosquelette comme rails.

Les mitochondries sont responsables de la production d'ATP, source d'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire. De par leur fonction, elles se localisent donc préférentiellement dans des zones de forte demande énergétique. On peut donc distinguer des mitochondries péri-nucléaires, des mitochondries subsarcolemmales et des mitochondries inter-fibrillaires.

II. Structure de la mitochondrie

Le mot mitochondrie dérive du grec mitos, « filaments », et chondros, « graine » en raison de l'aspect de cet organite au microscope électronique (figure 7A). Bien qu'il ait été mis en évidence différentes formes de mitochondries (cylindriques, arrondies) (figure 7B), la structure caractéristique de base demeure la même (figure 7C). Elle est formée de deux membranes concentriques hautement spécialisées, une membrane externe et une membrane interne qui délimitent deux compartiments, l'espace matriciel et l'espace inter-membranaire, beaucoup plus étroit.

II.1 La membrane externe mitochondriale

La membrane externe est constituée d'une bicouche phospholipidique classique, composée de 40% de lipides et de 60% de protéines. Elle contient des protéines de transport, les porines, permettant le transport passif et non sélectif de molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 10KDa et des canaux ioniques transmembranaires appelés VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) dont l'ouverture dépend de la différence de potentiel entre les membranes. Le VDAC fournit également des sites de liaison pour certaines protéines du cytosquelette et de nombreuses kinases cellulaires comme l'hexokinase, et il peut interagir avec les récepteurs périphériques aux benzodiazépines localisés dans la membrane externe. Le canal VDAC peut former un complexe avec des protéines de la famille Bax. La membrane externe contient également d'autres canaux comme des translocases appelées TOM (Translocase of the Outer Membrane) impliqués dans le transport des protéines dans l'organite.

II.2 La membrane interne

La membrane interne présente de nombreuses circonvolutions, crêtes et replis, qui augmentent sa surface de contact avec l'espace matriciel. Elle se caractérise par une grande richesse protéique (80%) et par un lipide spécifique appelé cardiolipine.

La membrane interne renferme la chaîne respiratoire mitochondriale qui se compose de cinq complexes protéiques :

- Le complexe I ou NADH ubiquinone oxydoréductase est le plus gros des complexes de la chaîne respiratoire avec une masse moléculaire supérieure à 800 000 daltons. Il existe plusieurs inhibiteurs spécifiques du complexe I dont la roténone.
- Le complexe II appelé succinate-ubiquinone oxydoréductase est constitué de quatre peptides dont deux forment la succinate déshydrogénase, une enzyme intégrée dans le cycle de Krebs, et les deux autres permettent l'ancrage du complexe dans la membrane.
- Le complexe III ou cytochrome c réductase.
- Le complexe IV, cytochrome c oxydase est une pompe à protons constituée de 13 sous-unités protéiques. Son site actif contient un centre bimétallique (Fe-Cu) dans lequel l'O₂ peut se fixer.
- Le complexe V correspond à la F₀F₁-ATP synthétase. Bien que les premières expériences sur les protéines membranaires impliquées dans la phosphorylation oxydative remontent au début des années 1960, le fonctionnement de la F₀F₁-ATP synthétase n'a été élucidé qu'en 1997 (Noji *et al.*, 1997). La molécule d'ATP synthétase ressemble à un champignon dont le pied (F₀), ancré dans la membrane interne possède une fonction de canal à protons. F₀ est relié au chapeau (F₁) responsable de l'activité catalytique à l'origine de la synthèse de l'ATP.

La membrane interne est imperméable aux protons et à la plupart des ions et des métabolites. Elle possède donc des systèmes très sélectifs de transport transmembranaire qui assurent l'approvisionnement en ions et en substrats de la matrice mitochondriale. Nous listerons ici quelques exemples (O'Rourke, 2007) :

- L'Adenine nucleotide Translocator (ANT) : c'est un antiport responsable de l'importation de l'ADP dans la matrice mitochondriale en échange d'une molécule d'ATP. L'ANT participe à la constitution du mPTP.
- L'Inner Membrane Anion Channel (IMAC) : il véhicule une grande variété d'anions assurant l'homéostasie mitochondrial. Ce canal, dépendant de la température et du pH (inhibition par H⁺) est inhibé par l'ion magnésium.
- L'unipporteur calcique mitochondrial : il permet l'entrée du calcium dans la matrice selon le gradient électrochimique. Les ions calciques entrent dans la matrice par l'unipporteur calcique

et en sortent au moyen de l'échangeur sodium/calcium. L'activité de cet uniporteur dépend directement du potentiel de membrane mitochondriale et elle augmente lorsque la concentration du calcium cytosolique augmente. Les composés cytosoliques comme l'ATP, le Pi et le magnésium inhibent ou modulent l'ouverture de l'uniporteur calcique mitochondrial.

- Les canaux potassiques mitochondriaux : il y a plusieurs types de canaux sélectifs du transport du potassium existant au niveau de la membrane interne, notamment des canaux ATP-dépendants (mK_{ATP}). Ils interviennent dans le contrôle de l'homéostasie volumique de la mitochondrie, et paraissent jouer un rôle important dans la protection du cardiomyocyte contre les effets délétères de l'I/R.
- Les récepteurs de la ryanodine : de récentes études ont signalé la présence de récepteurs à la ryanodine de type 1 sur la membrane interne des mitochondries cardiaques. Ces récepteurs semblent participer à l'influx ou à la sortie du calcium dans le cytosol mais des études complémentaires sont nécessaires pour élucider le rôle précis de ces récepteurs dans la régulation calcique mitochondriale.
- Les protéines découplantes : les UCPs (UnCoupling Proteins) interviennent dans la dissipation d'énergie dans le cadre de la thermogénèse. Ces protéines permettent aux protons de s'échapper à travers la double couche membranaire. La chute de gradient de protons et donc du potentiel membranaire accélère la respiration, stimule l'oxydation des graisses et augmente la production de chaleur, mais compromet la production d'ATP. Le rôle physiologique des UCPs reste encore mal connu mais des études récentes ont mis l'accent sur l'effet protecteur d'un découplage modéré des mitochondries.

II.3 L'espace intermembranaire

L'espace intermembranaire contient de nombreuses protéines telles que le cytochrome c, l'apoptosis inducing factor (AIF), Smac/DIABLO impliquées dans le processus de mort cellulaire et renferme également un important groupe d'enzymes comme la créatine kinase qui métabolisent l'ATP. L'accumulation de protons au niveau de cet espace est à l'origine de sa charge positive.

II.4 La matrice mitochondriale

La matrice contient tout un arsenal d'enzymes impliquées dans le cycle de Krebs, la β oxydation des acides gras, le cycle de l'urée etc.... ; l'ensemble de ces cycles représente le point de départ de la chaîne respiratoire. Elle renferme également plusieurs copies circulaires de l'ADN mitochondrial ainsi que les composants nécessaires à sa transcription et sa traduction.

Figure 7

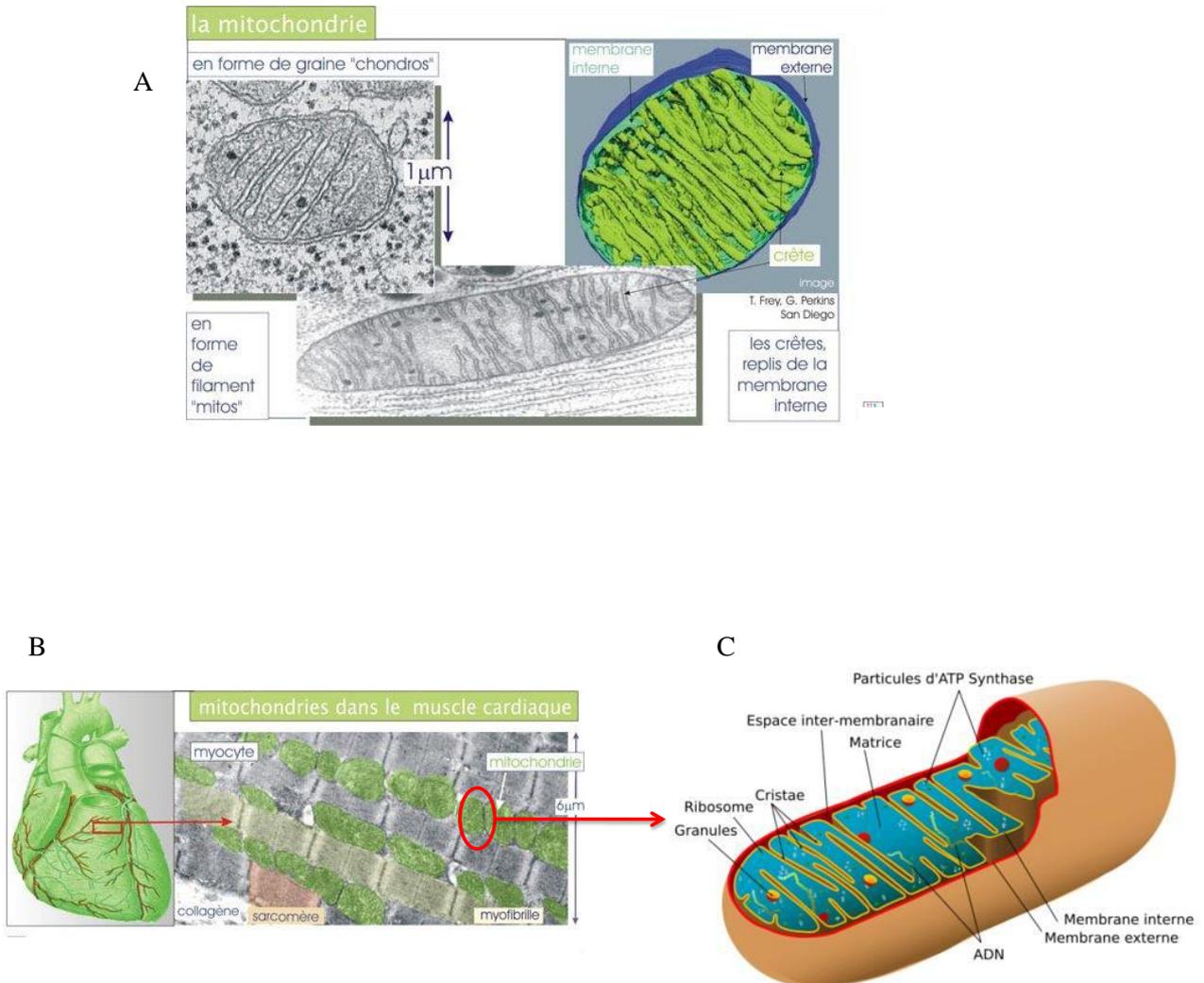


Figure 7: Schéma descriptif de la structure mitochondriale.

(A) L'aspect de la mitochondrie en microscopie électronique

(<http://www.ulyse.u-bordeaux.fr>).

(B) Représentation d'un myocarde et vue d'ensemble des mitochondries dans les myocytes (<http://www.ulyse.u-bordeaux.fr>).

(C) Structure de la mitochondrie (<http://www.vulgariz.com>).

III. Fonctions de la mitochondrie :

La mitochondrie est clairement impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires, mais nous ne détaillerons ici que les rôles directement liés à notre travail de recherche, c'est à dire (a) la production d'énergie, (b) l'homéostasie du calcium, (c) la génération et la détoxification des radicaux libres, et enfin (d) son implication dans les processus de mort cellulaire et par conséquent son rôle dans l'effet cardioprotecteur.

III.1 La mitochondrie : une véritable usine de production d'énergie

III.1.1 Le point de départ : les cofacteurs

Fritz Lipmann (prix Nobel de Médecine et Physiologie 1953) a démontré que la cellule utilise l'ATP comme source universelle d'énergie. Les mitochondries convertissent l'énergie, contenue dans les liaisons moléculaires des métabolites provenant des aliments ingérés, en ATP. Les divers nutriments (glucides, acides gras et acides aminés) fournis par l'alimentation sont dégradés grâce à plusieurs voies pour donner des cofacteurs réduits, le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et la flavine adénine dinucléotide (FADH₂), nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Lors de la glycolyse, une molécule de glucose va générer dans le cytosol deux molécules de pyruvate, ce qui est associé à la production de deux molécules d'ATP et de NADH. Puis, le pyruvate pénètre à l'intérieur de la mitochondrie où il est transformé en acétyl-CoA.

L'acétyl-CoA provient également de la dégradation des acides gras par β -oxydation. L'acétyl-CoA entre ensuite dans le cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs) dont les enzymes se trouvent dans la matrice ou ancrées dans la membrane interne mitochondriale. Chaque tour de cycle permet, à partir d'une molécule d'acétyl-CoA, de réduire trois molécules de NAD⁺ en NADH+ H⁺, une molécule de FAD en FADH₂ et de produire une molécule de guanosine triphosphate (GTP). Selon la

théorie de Mitchell (Mitchell, 1966, prix Nobel de Chimie 1978), l'énergie libre produite par la réoxydation des cofacteurs (NADH et FADH₂) et convertie sous la forme d'un gradient de protons généré par le transfert d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale est utilisée par l'ATP synthétase pour catalyser la réaction de phosphorylation de l'ADP en ATP en présence de P_i.

III.1.2 La chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative

La chaîne respiratoire est composée de cinq complexes protéiques et deux transporteurs solubles, le coenzyme Q (CoQ, encore appelé ubiquinone) faisant la navette entre les complexes I, II et III et le cytochrome c, lié à la cardiolipine assurant le transport des électrons entre les complexes III et IV (figure 8). Ces complexes passent d'un état réduit à un état oxydé grâce à un transfert d'électrons de complexe en complexe. Les complexes I et II oxydent respectivement NADH et FADH₂ en prenant à chaque cofacteur deux électrons. L'énergie fournie au cours de cette réaction d'oxydo-réduction permet d'éjecter des protons dans l'espace intermembranaire. Les complexes I et II retrouvent leur état oxydé en transmettant chacun un électron au CoQ. Celui-ci, alors réduit, transporte ces 2 électrons au complexe III, ou cytochrome c réductase, qui à son tour est réduit et se réoxyde par un transfert des deux électrons au cytochrome c. Cette réoxydation fournit l'énergie nécessaire au transfert de nouveaux protons dans l'espace intermembranaire. Le cytochrome c transporte les électrons reçus jusqu'au complexe IV, le dernier complexe de la chaîne respiratoire. Le complexe IV retrouve ensuite son état oxydé en réduisant une molécule d'oxygène en eau ce qui conduit à la translocation de 4 protons vers l'espace intermembranaire. Suite à la réduction successive des différents complexes, un gradient de protons se forme et crée une force électrochimique due à la différence de pH et de potentiel électrique ($\Delta\Psi_m$) à travers la membrane interne qui est imperméable aux protons. Ceux-ci ne peuvent donc revenir dans la matrice qu'en empruntant un canal spécifique pour les protons. Cette force protomotrice propulse les protons à travers la membrane mitochondriale interne vers la matrice au niveau du domaine F0 de la F0F1-ATP synthétase (figure 8) ce qui procure l'énergie nécessaire à la synthèse de l'ATP au niveau du chapeau F1 de l'enzyme selon la réaction : $ADP + P_i \rightarrow ATP$. On parle alors de phosphorylation oxydative pour caractériser le couplage entre l'oxydation intervenant au niveau des complexes I à IV et la phosphorylation de l'ADP par le complexe V. La respiration (consommation d'oxygène) et la phosphorylation (production d'ATP)

sont intimement couplées de telle sorte que la quantité d'ATP produite est proportionnelle à la quantité d'oxygène consommée.

Figure 8

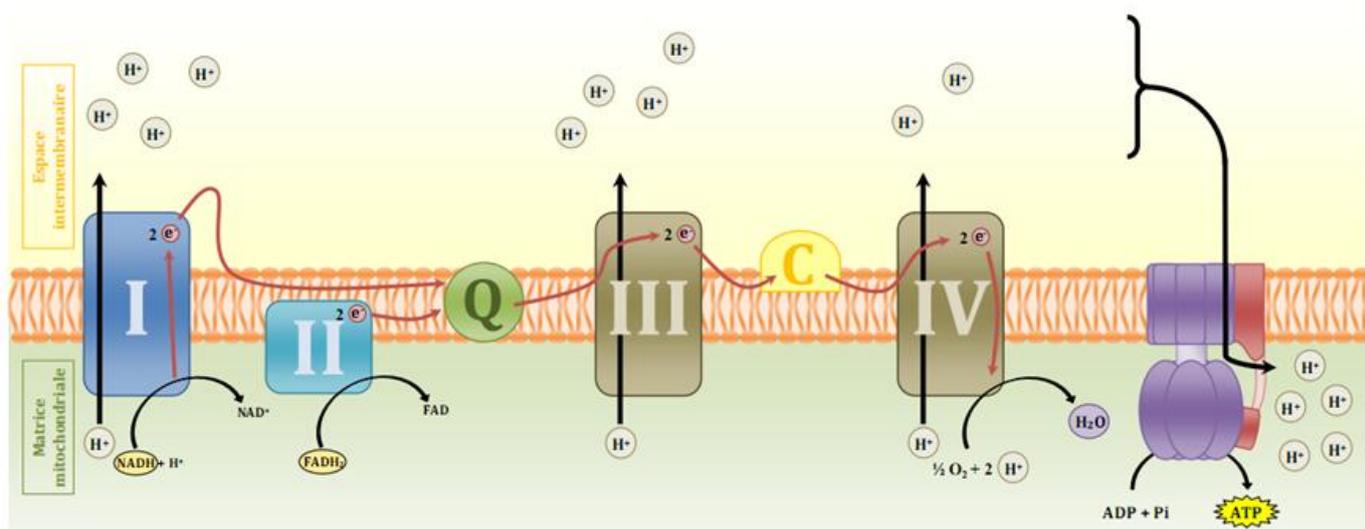


Figure 8 : Le transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale et la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative

La production d'ATP est réalisée grâce à la formation d'un gradient électrochimique de protons formé par l'énergie des électrons transportés successivement via les différents complexes :

Le complexe I récupère les électrons du NADH et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire.

Le complexe II récupère les électrons du FADH₂

Le complexe III permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire.

Le coenzyme Q transfère les électrons des complexes I ou II vers le complexe III. Puis le cytochrome C transfère les électrons du complexe III au IV qui les utilisent pour réduire l'oxygène en eau. Le gradient protons ainsi formé génère une force électromotrice qui est utilisée par la F₀F₁-ATP synthétase pour former l'ATP

Figure adaptée de www.cours-pharmacie.com

Durant l'ischémie, le manque d'oxygène au niveau de la chaîne respiratoire entraîne une perturbation importante du métabolisme des acides gras, notamment une diminution de l'acétyl-CoA dans les membranes cellulaires qui favorise une modulation de leur fluidité et une altération des transports ioniques pouvant entraîner des arythmies cardiaques (Van der Vusse et Glatz, 1992). Parallèlement, une chute du potentiel électrochimique en protons et une inversion du fonctionnement de la F1/F0 ATP synthétase poussent la mitochondrie à passer du statut de producteur d'ATP à celui de consommateur, ce qui potentialise la déplétion des réserves énergétiques intracellulaires.

III.2 L'homéostasie du calcium

Le calcium est un facteur qui régule de nombreuses réactions métaboliques et des processus physiologiques variés. Les variations de la concentration du calcium intracellulaire interviennent dans les phénomènes électrique et mécanique comme la contraction des cardiomyocytes. Le calcium est aussi un important régulateur de la respiration mitochondriale. Le pool de calcium cytosolique est limité et doit être finement contrôlé. Les mitochondries, en relation étroite avec le réticulum sarcoplasmique, sont équipées de systèmes de transport du calcium permettant la régulation de sa concentration cellulaire. Suite à un signal extracellulaire, les ions calciques gagnent le cytosol par l'intermédiaire de canaux calciques situés principalement au niveau des membranes plasmique, mitochondriale et des membranes du réticulum sarcoplasmique augmentant ainsi la concentration calcique du cytosol à l'origine de la contraction des myofibrilles. Au niveau de la mitochondrie myocardique, la sortie du calcium est assurée par deux transporteurs localisés dans la membrane mitochondriale interne, l'échangeur sodium/calcium et la pompe d'efflux calcique indépendante du sodium. Pour la relaxation, le calcium est repompé par des canaux ioniques spécifiques du calcium, tels que la calcium-ATPase sarcoplasmique, l'échangeur sodium/calcium sarcolemmal et l'uniporteur calcique mitochondriale (Bers, 2006) (figure 9). Cette homéostasie calcique est fortement perturbée en cas d'I/R myocardique et les mitochondries deviennent capables de stocker d'importantes quantités de calcium (Griffiths *et al.*, 2009). Lorsque l'accumulation du calcium dans la mitochondrie dépasse les capacités de stockage de cette dernière il se produit une chute drastique du potentiel membranaire aboutissant à la libération du calcium accumulé, à une augmentation du potentiel membranaire interne, au gonflement de la matrice et à la rupture de la membrane externe.

L'ensemble de ces phénomènes constitue le phénomène de transition de perméabilité mitochondriale qui peut conduire à la mort cellulaire.

Figure 9

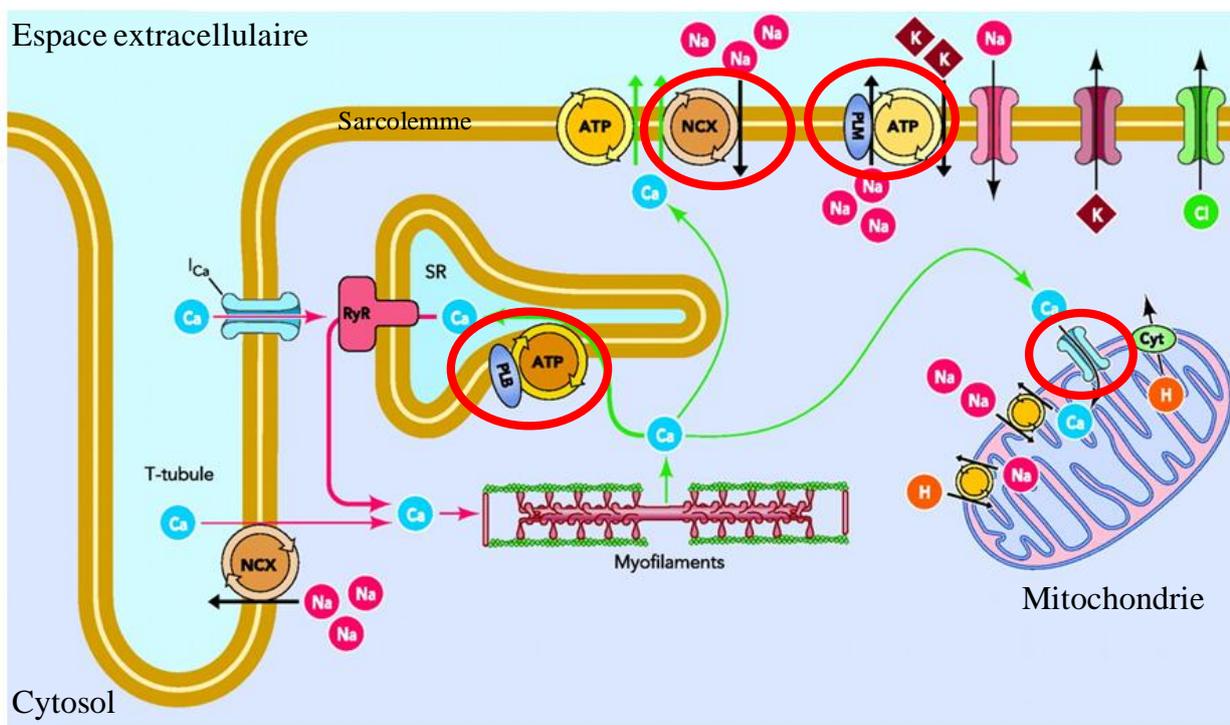


Figure 9 : Couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes dans les conditions physiologiques.

Un potentiel d'action (AP) déclenche la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique (SR) (flèches roses) qui résulte en l'augmentation du calcium cytosolique ($[Ca]_i$) entraînant ainsi la contraction des myofibrilles.

Lors de la relaxation, le calcium est transporté hors du cytosol (flèches vertes) par plusieurs transporteurs (désigné sur la figure par des cercles rouges) 1) la Ca²⁺-ATPase au niveau du réticulum sarcoplasmique, 2) l'échangeur Na⁺-Ca²⁺ sarcolemmal (NCX), 3) La Ca-ATPase sarcolemmale, et 4) l'uniporteur calcique mitochondrial.

PLB, phospholamban; PLM, phospholemman.

Figure adaptée de Bers DM, Physiology, 2006

III.3 La génération et la détoxification des espèces réactives d'oxygène (EROs)

L'oxygène est essentiel pour le métabolisme aérobique en tant qu'accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire mais son utilisation entraîne la formation d'EROs. Traditionnellement considérées comme délétères car à l'origine de l'oxydation des protéines, des lipides et de l'ADN, on sait maintenant que les EROs participent aussi à la signalisation cellulaire de différents processus physiologiques et sont impliquées dans les phénomènes de cardioprotection (Penna *et al.*, 2009 ; Lecour *et al.*, 2005). Le défi de la cellule eucaryote est donc de maintenir un juste équilibre entre la production et l'élimination des EROs et elle possède à cet effet des systèmes de défense interne pour éviter des dommages aux macromolécules cellulaires.

III.3.1 Bref rappel sur les différentes formes des espèces réactives d'oxygène (d'après Halliwell et Gutteridge, 2007 ; Vergely et Rochette, 2003).

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié, ce qui la rend instable et très réactive. Il est capable d'extraire un électron des molécules voisines pour combler la vacance de son orbitale. L'oxygène, essentiel dans le catabolisme aérobique, est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leur orbital externe deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de donner naissance à des EROs en captant facilement des électrons pour être partiellement réduit, selon 3 étapes successives, en anion superoxyde ($O^{\cdot-}_2$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et radical hydroxyle ($\cdot OH$).

➤ **L'anion superoxyde ($O^{\cdot-}_2$):**

C'est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron provenant par exemple d'une fuite au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, selon l'équation : $O_2 + e^- \rightarrow O^{\cdot-}_2$

Le radical superoxyde est moins réactif que le radical hydroxyle mais sa durée de vie est longue (dizaine de secondes) et il peut diffuser loin de son lieu de production. Ce radical peut réagir avec H_2O_2 pour fournir $\cdot OH$. Dans les cardiomyocytes, une production d' $O^{\cdot-}_2$ a été observée au cours de

la respiration mitochondriale physiologique ainsi qu'au cours de la réoxygénation suite à une hypoxie. Cette production a été baptisée « flashes de superoxyde » (Wang *et al.*, 2008).

➤ **Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :**

H₂O₂ se forme par dismutation d'O^{•-}₂ sous l'action d'une enzyme, la superoxyde dismutase (SOD) selon l'équation : $O^{\bullet-}_2 + O^{\bullet-}_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Sa grande capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut être retrouvé à bonne distance de son lieu de production. Ce n'est pas un radical libre au sens propre du terme ; cependant il est extrêmement réactif. Il peut générer des radicaux hydroxyles en présence de cations métalliques tels que Fe²⁺ selon la réaction de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \bullet OH + Fe^{3+} + OH^-$. Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux. Cependant, en présence d'O^{•-}₂, les ions ferriques sont régénérés à partir des ions ferreux. Ainsi, la présence simultanée de H₂O₂, d'O^{•-}₂ et de fer permet la production d'•OH

➤ **Le radical hydroxyle (•OH) :**

Avec une demi-vie de quelques nanosecondes, •OH est l'espèce radicalaire la plus instable et la plus réactive de tous les dérivés de l'oxygène. Du fait d'une diffusion limitée, ce radical réagit directement à proximité de son site de production avec de nombreuses espèces moléculaires, entraînant ainsi de multiples lésions cellulaires. L'•OH apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des EROs (Halliwell et Gutteridge, 1992).

III.3.2 Sites de production des EROs : (d'après Halliwell et Gutteridge, 2007; Vergely et Rochette, 2003).

Les radicaux sont produits naturellement dans l'organisme par le métabolisme cellulaire ou lors de réactions d'oxydoréduction. Les principales voies de production des EROs sont sous la dépendance de divers systèmes enzymatiques et non enzymatiques. Dans le système cardiovasculaire, les sources principales de cette production sont la chaîne respiratoire mitochondriale, les leucocytes activés, la xanthine oxydase, les NAD(P)H oxydases et la NOS (nitric oxide synthase).

III.3.2.1 Principale source de production des radicaux libres : la mitochondrie

La principale source de production des EROs est la chaîne respiratoire mitochondriale qui génère 90% des EROs cellulaires (Balaban *et al.*, 2005). Comme nous l'avons vu précédemment (section II.3.1), la chaîne respiratoire transfère les électrons de complexes en complexes et le complexe IV est responsable d'une réaction contrôlée réduisant l'O₂ en H₂O selon la réaction suivante :



Cependant, le rendement de ce transfert électronique n'est pas de 100% et le système laisse échapper des électrons qui sont à l'origine d'une réduction partielle de l'oxygène matriciel. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisé par les mitochondries serait incomplètement réduit et conduirait à la formation d' O[•]₂ (Boveris et Cadenas, 1975). La production d'O[•]₂ augmente parallèlement à la concentration en O₂ ou lorsque l'activité du complexe IV diminue.

D'un point de vue thermodynamique, l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire sous leur forme réduite pourraient transférer leurs électrons à l'oxygène pour former des O[•]₂. Cependant, des études réalisées sur des mitochondries isolées ont montré l'existence de deux sites principaux de formation d'EROs au niveau de la chaîne respiratoire, l'un au niveau du complexe I et l'autre au niveau du complexe III (figure 10). Une partie des électrons issus de l'oxydation de FADH₂ sont rétrocedés du complexe II vers le complexe I. Ce flux inverse d'électrons a été identifié comme la source majeure de production d'EROs au niveau du complexe I (Liu *et al.*, 2002), mais à ce jour, le mécanisme moléculaire de la production d'EROs au niveau de ce complexe reste encore controversé. Trois hypothèses sont émises : cette production aurait lieu au niveau (i) des quinones, (ii) du groupe des flavines mononucléotides ou (iii) du groupe fer-soufre (Kowaltowski *et al.*, 2009). Comme ces trois structures interagissent les unes avec les autres, il est difficile de dire laquelle intervient spécifiquement dans la production d'EROs.

La production d'O[•]₂ par le complexe III est mieux expliquée. Elle résulte de la réduction partielle de l'ubiquinone en radical semi-ubiquinone (UbH[•]) instable. Si ce radical interagit avec une molécule d'oxygène, il y a génération d'O[•]₂. Lorsque la génération d'O[•]₂ mitochondriale augmente ou lorsque les systèmes antioxydants sont déplétés, H₂O₂ peut s'accumuler et entraîner un stress

oxydant mitochondrial. Dans cette situation H_2O_2 peut réagir avec le fer ferreux (Fe^{2+}) de la mitochondrie pour produire des $\cdot OH$.

La vitesse de production des EROs dépend du flux d'électrons et du degré de réduction des transporteurs électroniques. Cette production radicalaire semble également liée au potentiel de membrane ($\Delta\psi$). Une diminution du potentiel de membrane s'accompagne d'un renforcement de la respiration mitochondriale et d'une diminution de la production d'EROs (Karshunov *et al.*, 1997). Néanmoins cette notion de corrélation entre production d'EROs et $\Delta\psi$ est à nuancer. En effet, la formation d'EROs liée à l'oxydation de NADH au niveau du complexe I ainsi que celle générée au niveau du complexe III sont peu sensibles aux variations de $\Delta\psi$. Ainsi, seul le flux inverse d'électrons dépend réellement du $\Delta\psi$ (Starkov et Fiskum 2003).

Enfin, les protéines découplantes (UCPs) permettent aussi de réguler le flux d'électrons et donc la production d'EROs en provoquant une réentrée de protons dans la matrice mitochondriale qui induit une dissipation de l'énergie due au potentiel électrochimique (Vidal-Puig *et al.*, 2000).

Dans les conditions pathologiques et plus particulièrement dans le cadre de l'I/R, la reperfusion est associée à une augmentation très forte de la production des EROs qui prend sa source au niveau des complexes I et III. Les protéines mitochondriales sont extrêmement sensibles aux dommages induits par les EROs qui peuvent provoquer un découplage de la chaîne respiratoire. Les EROs peuvent entraîner l'oxydation du glutathion, la peroxydation des acides gras de la membrane interne de la mitochondrie mais également avoir des effets délétères sur les pompes ioniques, aggravant ainsi l'inhibition de la chaîne respiratoire et les lésions liées à la reperfusion.

La formation des EROs ne semble pas être uniquement associée à la phase de reperfusion. Des études réalisées sur divers modèles expérimentaux (Vanden Hoek *et al.*, 1997) ont mis en évidence leur production pendant l'ischémie. L'origine de cette genèse semble être principalement mitochondriale via les complexes I et III (Solaini et Harris, 2005). Les mécanismes de production des EROs pendant l'ischémie ainsi que leur implication dans les lésions résultant de l'I/R restent obscurs. La relation EROs-mitochondrie lors de l'I/R sera détaillée dans la deuxième partie de ce chapitre.

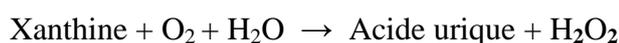
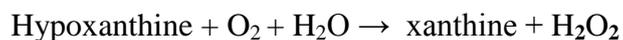
En dehors de la chaîne respiratoire, de nombreux autres sites mitochondriaux ont été décrits comme participant à la production des EROs, les plus importants étant les monoamines oxydases et la cytochrome b5 reductase au niveau de la membrane externe mitochondriale et l'aconitase dans la matrice (Andreyev *et al.*, 2005).

III.3.2.2 Autres sources de production d'EROs

Dans l'organisme, il existe de nombreuses autres sources d'EROs parmi lesquelles la eNOS et la NADPH-oxydase présentes au niveau des cellules vasculaires endothéliales et qui peuvent conduire à la formation de radicaux $O^{\cdot-}_2$ transformés ensuite en H_2O_2 ou en d'autres EROs (Orient *et al.*, 2007) (figure 10).

Par ailleurs, les $O^{\cdot-}_2$ peuvent provenir de la détoxification de xénobiotiques (toxines, médicaments, etc.) par l'intermédiaire des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique hépatique.

Les EROs peuvent également être produites par action de la xanthine oxydase. Cette dernière catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP produisant ainsi H_2O_2 selon l'équation :



Les peroxydes sont aussi une importante source de production d' H_2O_2 cellulaire. Toutefois, l' H_2O_2 est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de peroxyder d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification intervenant dans le foie et le rein.

III.3.3 Systèmes antioxydants : (d'après Halliwell et Gutteridge, 2007, Vergely et Rochette, 2003).

Les espèces réactives sont produites spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non-cytotoxique d'EROs est assuré par des systèmes

antioxydants qui permettent de les éliminer et ou de limiter leurs dommages. Ce paragraphe présente les principaux systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques intervenant dans l'élimination des EROs.

III.3.3.1 Les systèmes enzymatiques :

Ils sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les EROs. Les principaux acteurs sont (figure 10) :

➤ **La superoxyde dismutase (SOD) :**

Cette enzyme catalyse la dismutation de l' $O^{\cdot-}_2$ en H_2O_2 selon l'équation :



Cette dismutation peut se produire de façon spontanée à pH neutre. Dans des conditions physiologiques, la présence d' H_2O_2 est donc inévitable lorsque $O^{\cdot-}_2$ est produit. Il est d'ailleurs souvent admis qu' $O^{\cdot-}_2$ est peu réactif du fait de cette rapidité à être dismuté en H_2O_2 .

La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique. On distingue donc une forme associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD ou SOD1) localisée dans le cytosol et le noyau, une forme mitochondriale associée aux ions manganèse (Mg-SOD ou SOD2) et une troisième de type Cu/Zn-SOD qui est extracellulaire.

➤ **La catalase :**

La SOD élimine $O^{\cdot-}_2$ mais génère une autre forme d'EROs, H_2O_2 , qui peut être toxique et doit être éliminée par d'autres enzymes. L'une d'elles est la catalase qui convertit H_2O_2 en eau et oxygène selon la réaction :

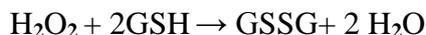


L'affinité de la catalase pour l' H_2O_2 augmente lorsque les concentrations d' H_2O_2 sont élevées. La catalase est localisée préférentiellement dans les peroxysomes, elle est présente dans le cytosol et en faible quantité dans les mitochondries (Radi *et al.*, 1991).

➤ **Les glutathions peroxydase et réductase :**

Le glutathion est présent dans toutes les cellules animales et existe sous deux formes, une forme réduite (GSH) et une forme oxydée (GSSG). L'équilibre du système glutathion est maintenu par la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR). La GPx agit en synergie avec la SOD

puisque son rôle est d'accélérer la dismutation de H₂O₂ en H₂O et O₂. Lors de cette réaction deux molécules de GSH sont oxydées en GSSG selon la réaction :



Il existe également une GPx associée à la membrane mitochondriale qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique. La GR, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons selon l'équation :



En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans la mitochondrie.

D'autres systèmes antioxydants existent dans la cellule et notamment la thiorédoxine dont l'une des formes (Thiorédoxine 2) est présente dans la mitochondrie. Elle peut agir comme agent réducteur en acceptant les électrons des protéines oxydées.

III.3.3.2 Les systèmes non enzymatiques :

D'autres systèmes de défense non-enzymatiques existent sous la forme de molécules qui piègent les EROs. Dans cette catégorie, nous retrouvons :

➤ Les oligoéléments :

Toutes les enzymes antioxydantes ont besoin d'un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique : la SOD mitochondriale nécessite du manganèse, la catalase du fer et la GPx du sélénium. Ces oligoéléments sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Cependant, certains d'entre eux, notamment le fer peuvent avoir une action pro-oxydante lorsqu'ils sont en excès (réaction de Fenton).

➤ L'ubiquinone et le cytochrome c :

La forme réduite de l'ubiquinone, l'ubiquinol, agit comme un antioxydant en protégeant les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxy. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E.

Le cytochrome c présent dans l'espace inter-membranaire intervient dans les processus de détoxification. En effet, il est intéressant de constater que cet antioxydant est capable de produire de l'énergie en donnant des électrons au complexe IV tout en éliminant les molécules d' $O_2^{\bullet-}$ produites accidentellement par la chaîne respiratoire, formant ainsi du cytochrome c oxydé et de l' H_2O .

➤ **Les vitamines E et C :**

La vitamine E (α -tocophérol) est une molécule insoluble qui se fixe aux membranes pour séquestrer des radicaux libres et empêcher la propagation des réactions de peroxydation lipidique. Au sein de la membrane mitochondriale elle est régénérée par le coenzyme Q ou par l'acide ascorbique à la surface des membranes.

La vitamine C (acide ascorbique) qui est hydrosoluble se trouve dans le cytosol et dans le milieu extracellulaire ; elle peut capter directement l' $O_2^{\bullet-}$ et l' $\bullet OH$.

➤ **Le glutathion :**

Le rapport GSH/GSSG est souvent utilisé comme un marqueur de stress oxydant car le glutathion réduit (GSH), réduit H_2O_2 et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la GPx. Le glutathion peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, abaissant ainsi le niveau de peroxydation lipidique.

➤ **L'acide urique**

L'acide urique fait partie des piègeurs hydrosolubles des EROs.

En conclusion, la réduction de l'oxygène en molécule d'eau nécessite l'apport de quatre électrons qui peuvent s'associer, un à un, à l' O_2 en conduisant aux intermédiaires respectifs $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 et $\bullet OH$. Ces intermédiaires sont appelés EROs car ils ont une réactivité beaucoup plus importante que l'oxygène qui leur a donné naissance. Dans certaines conditions pathologiques, il apparaît un déséquilibre caractérisé par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des systèmes de défense, ou encore par la conjonction des deux phénomènes. Un tel déséquilibre caractérise l'état de stress oxydant. Ce déséquilibre peut survenir à la suite de l'exposition à un stress de nature physique (pollution, changements de la concentration d'oxygène), chimique (toxines,

xénobiotiques), ou lors du vieillissement ou de certaines pathologies telles que l'I/R au cours desquelles la formation des EROs dans la mitochondrie est significativement augmentée.

Figure 10

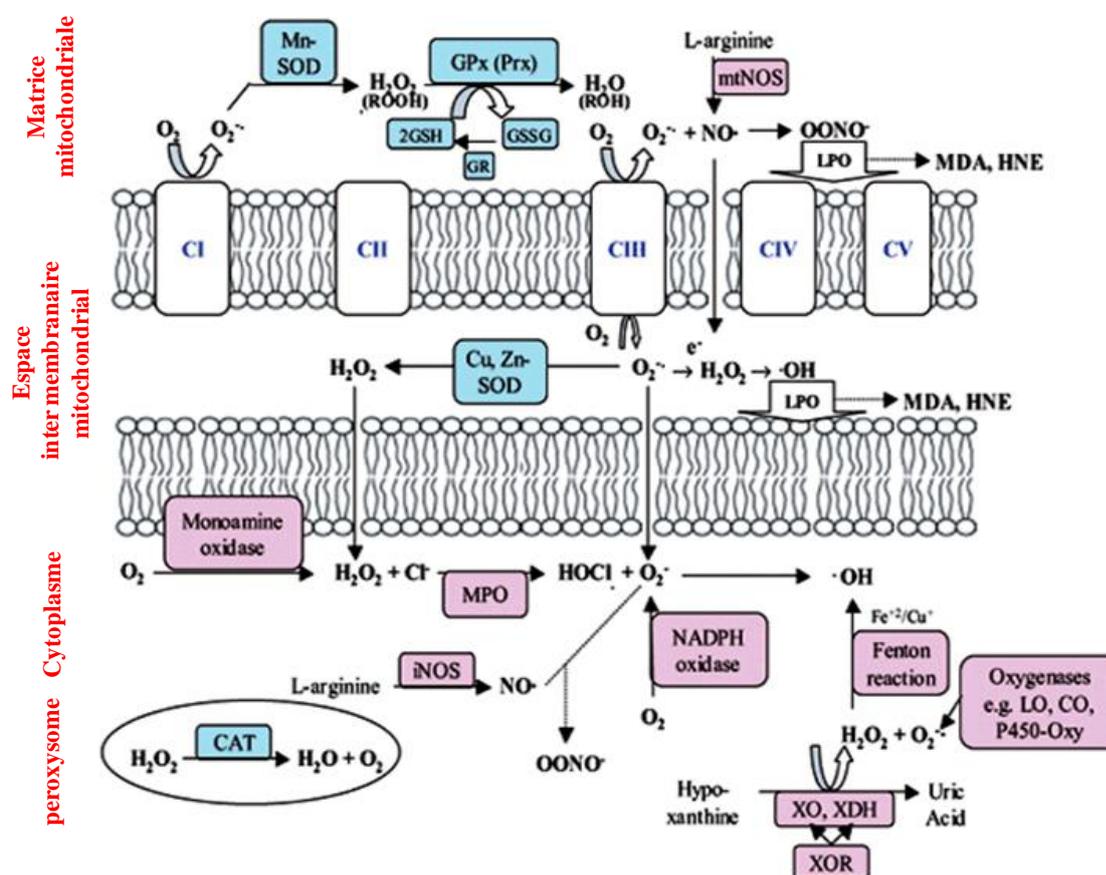


Figure 10 : La production cellulaire des espèces réactives d'oxygène et les systèmes antioxydants endogènes.

Les sites de production des EROs sont représentés par la couleur rose et les systèmes de détoxification en bleu.

Abréviations: CAT, catalase; CI, CII, CIII et CV, les complexes de la chaîne respiratoire; CO, cyclooxygénase; CuZnSOD, superoxyde dismutase associée au cuivre et zinc; GSH, glutathione; GPx, glutathione peroxydase; GR, glutathione reductase; GST, glutathione S transferase; GSSG, glutathione disulfide; HNE, 4 hydroxy nonenal; iNOS, nitric oxide synthase inductible; LO, lipooxygénase; MDA, malondialdéhyde; MnSOD, superoxyde dismutase associée au manganèse; mtNOS, nitric oxide synthase mitochondriale; NO, nitric oxide; MPO, myeloperoxydase; P-450-Oxy, oxygenases dépendantes du cytochrome P450; XO, xanthine oxydase; XDH, xanthine dehydrogénase; XOR, xanthine oxydoréductase; LPO, peroxydation des lipides; Prx, peroxyredoxin; ROOH, alkyl hydroxydes.

Figure adaptée de Zacks *et al.*, 2005

III.4 Mitochondrie et mort/survie cellulaire :

Comme nous venons de le voir, du fait de leur rôle dans la production d'énergie, l'homéostasie calcique et la régulation des EROs, les mitochondries jouent un rôle crucial dans la survie des cellules et elles interviennent comme des régulateurs décisifs de la mort cellulaire. Elles sont en effet des effecteurs des voies de signalisation de l'I/R et de la cardioprotection et de ce fait sont devenues primordiales dans la conception de thérapies cardioprotectrices.

Ces signaux sont induits par des récepteurs situés sur la membrane plasmique et convergent vers les mitochondries où ils déclenchent/inhibent plusieurs composants de signalisation intra-mitochondriaux. Ainsi, différentes protéines/complexes, notamment les protéines de la famille Bcl-2, la protéine connexin 43 et les canaux ioniques comme le mK_{ATP} et le mPTP ont été impliqués comme régulateurs essentiels de la mort des cardiomyocytes. Le but de cette partie est de présenter les médiateurs/inhibiteurs mitochondriaux de la mort cellulaire les plus couramment décrits.

III.4.1 Les protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 se subdivisent en plusieurs groupes : les protéines antiapoptotiques à domaine BH4 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w), les protéines proapoptotiques à domaine BH3 (Bax, Bak) et les protéines antiapoptotiques BH3-only (Bid, Bad). La plupart des travaux de recherche se sont concentrés sur les membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2, et plus spécifiquement sur Bcl-2 et son homologue Bcl-xL. Des nombreuses stratégies cardioprotectrices telles que le préconditionnement ischémique sont associées à un maintien des taux basaux de protéines antiapoptotiques dont Bcl-2 (Maulik *et al.*, 1999). Chez les souris surexprimant la protéine Bcl-2 au niveau du myocarde, la dysfonction mitochondriale, la libération du cytochrome c et la taille de l'infarctus lors d'une I/R sont réduites. De plus, il a été montré dans des myocytes infectés avec Bcl-xL que la dysfonction mitochondriale et la mort cellulaire induite par l'hypoxie ou par la doxorubicine sont atténuées. Cependant, la protection induite par Bcl-2 et Bcl-xL ne peut être attribuée uniquement à l'inhibition de l'apoptose puisque Bcl-2 joue aussi un rôle dans le métabolisme (Imahashi *et al.*, 2004) et la régulation de la libération du calcium stocké dans le RS à l'origine d'un effet bénéfique sur la survie des cardiomyocytes (Oakes *et al.*, 2003).

D'autres études ont été menées sur les protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2. En effet, dans les cellules myocardiques, l'activation de Bax, sa translocation et son intégration dans les membranes des mitochondries ont été décrites en réponse à l'I/R, la doxorubicine et le stress oxydant (An *et al.*, 2009 ; Hochhauser *et al.*, 2003 ; Jungas *et al.*, 2002).

III.4.2 Les canaux potassiques mitochondriaux

Il existe sur la membrane interne mitochondriale des canaux dont l'ouverture apparaît bénéfique dans un contexte d'I/R : les canaux potassiques mitochondriaux sensibles à l'ATP (mK_{ATP}) et les canaux potassiques activés par le calcium ($mK_{Ca^{2+}}$). Dans des conditions physiologiques, ces canaux potassiques permettent l'influx de potassium dans la matrice mitochondriale qui est ensuite expulsé en échange des protons grâce à l'échangeur potassium/proton (figure 11). Dans ce paragraphe, nous aborderons le rôle du canal potassique mK_{ATP} dans la cardioprotection.

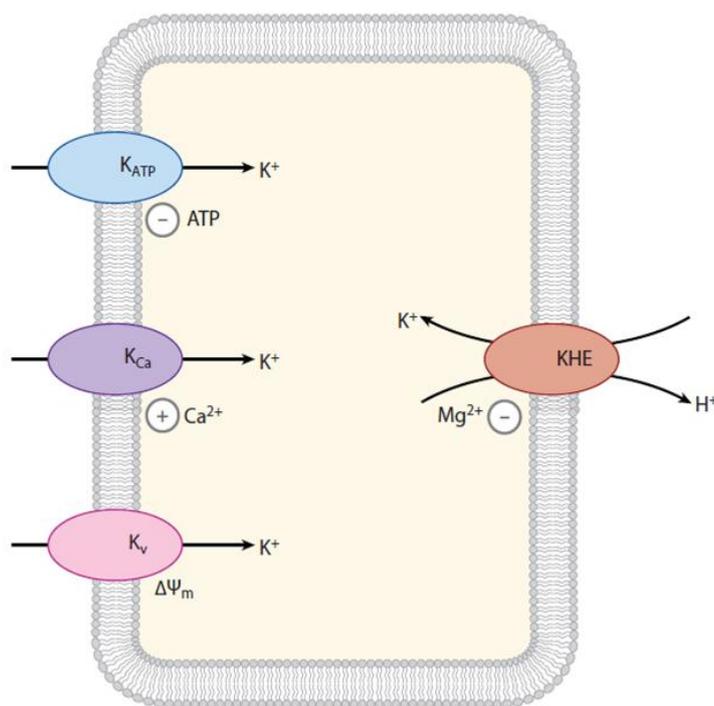


Figure 11

Figure 11 : Les canaux potassiques mitochondriaux.

Trois types de canaux potassiques ont été décrits au niveau de la membrane interne mitochondriale : le canal potassique ATP-dépendant (mK_{ATP}), le canal potassique activé par le calcium ($mK_{Ca^{2+}}$), et le canal potassique voltage-dépendant (mK_v). Dans les conditions physiologiques, ces 3 canaux permettent l'influx du potassium à l'intérieur de la matrice mitochondriale tandis que l'efflux du potassium est assuré par l'échangeur potassium/protons ($mKHE$). Cet équilibre permet la régulation du volume mitochondriale et la préservation de la structure de la mitochondrie.

Figure adaptée de Baines C, 2010.

➤ **Canal potassique ATP-dépendant mitochondrial (mKATP) :**

Le canal mK_{ATP} a été purifié et reconstitué pour la première fois en 1991 (Inoue *et al.*, 1991). L'ouverture de ce canal provoque une entrée d'ions potassiques dans la matrice mitochondriale entraînant une baisse du potentiel mitochondrial et un gonflement de la matrice dû à une entrée d'eau osmotiquement liée aux ions potassiques. Le canal mK_{ATP} comprend deux types de sous-unités situées dans la membrane interne mitochondriale et a été caractérisé essentiellement par ses propriétés pharmacologiques. *In vitro*, l'activité du mK_{ATP} est régulée par les nucléotides. En présence de magnésium, l'ATP, l'ADP et les acyl-CoA inhibent le canal et entraînent sa fermeture. En revanche, le GTP et le GDP ouvrent ce canal. En présence de magnésium et d'ATP, ce canal se comporte comme un récepteur avec une affinité élevée pour des molécules connues pour ouvrir les canaux potassiques, comme le diazoxide et la cromakaline, ce qui entraîne un gonflement matriciel (Garlid *et al.*, 2003). Si le canal est ouvert par l'action d'un agoniste, il devient sensible aux effets d'inhibiteurs tels que le glyburide ou le 5-hydroxydécanoate, ce qui provoque la fermeture du canal potassique et inhibe le gonflement matriciel. L'utilisation de ces agents pharmacologiques a permis de mettre en évidence l'implication des mK_{ATP} dans la signalisation du pré-conditionnement (O'Rourke *et al.*, 2004) mais leur rôle exact n'est pas actuellement clairement défini. Trois hypothèses ont été avancées (Argaud *et al.*, 2006) : (1) L'effet protecteur pourrait être dû à la diminution du $\Delta\psi_m$ provoquant une diminution de la surcharge calcique matricielle et une réduction de la probabilité d'ouverture du mPTP ; (2) l'effet protecteur serait associé à la régulation du volume matriciel, l'ouverture du mK_{ATP} limitant l'une des conséquences immédiates de l'ischémie à savoir la diminution de l'entrée passive d'eau et de potassium dans la cellule, préservant ainsi son volume et donc une respiration mitochondriale efficace et enfin (3) les canaux mK_{ATP} pourraient conduire à l'inhibition de l'ouverture du mPTP en diminuant la production des EROs à la reperfusion .

III.4.3 Le Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale (mPTP)

Pendant plus de 40 ans la communauté scientifique a pensé que suite à une surcharge calcique, les mitochondries subissaient une distension massive (Crofts *et al.*, 1965) aboutissant à une perméabilisation non spécifique de leur membrane interne par activation des phospholipases sensibles au calcium et accumulation d'acides gras et de lysophospholipides dans les membranes. Pourtant, les études de Haworth et Hunter (1979) et plus tard de Crompton *et al.* (1987) ont prouvé

que l'augmentation de la perméabilité résulte de l'ouverture d'un canal non spécifique de diamètre bien défini, présent dans la membrane et laissant passer des molécules de poids moléculaire inférieur à 1,5 kDa. Ce canal pharmacologiquement identifié a été nommé pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). L'ouverture du mPTP a pour conséquence majeure l'établissement d'un équilibre de la concentration de protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne, ce qui dissipe $\Delta\psi_m$, inhibe la production d'ATP et peut entraîner un gonflement de la mitochondrie pouvant aller jusqu'à la rupture de la membrane externe. La conséquence est dramatique pour la cellule puisque si un nombre important de mitochondries ouvrent leurs mPTP, elle ne peut pas maintenir son niveau d'ATP ce qui conduit à une perturbation du métabolisme et de l'homéostasie ionique et aboutit à la mort par nécrose. Crompton et Costi (1990) ont été les premiers à suggérer que l'ouverture du mPTP était un facteur critique des lésions provoquées par l'I/R. De nombreuses données expérimentales ont confirmé le rôle crucial de l'ouverture du mPTP au moment de la reperfusion et par conséquent son importance comme cible pharmacologique de cardioprotection. Le mPTP apparaît actuellement comme l'effecteur commun le plus probable à toutes les voies de signalisation cardioprotectrices.

La 2^{ème} partie de ce chapitre sera entièrement consacré au mPTP.

Deuxième Partie

I. L'identité moléculaire du mPTP :

Le rôle crucial du mPTP dans la vie ou la mort cellulaire nécessite de préciser l'identité moléculaire de ce pore qui demeure jusqu'à présent incertaine. A l'heure actuelle certains constituants comme l'« Adenine Nucleotide Translocase » (ANT), la cyclophiline D (Cyp-D), le « Voltage Dependent Anion Channel » (VDAC) et le « mitochondrial Phosphate Carrier » (PiC) semblent impliqués dans la formation et/ou la régulation du mPTP. D'autres protéines telles que l'HexoKinase (HKII), la Créatine Kinase (CK), la protéine translocatrice (TSPO, connu

anciennement sous le nom de récepteurs périphériques aux benzodiazépines, PBR), Bcl-2 et GSK-3 β seraient des modulateurs de son ouverture plutôt que des constituants (figure 12).

Figure 12

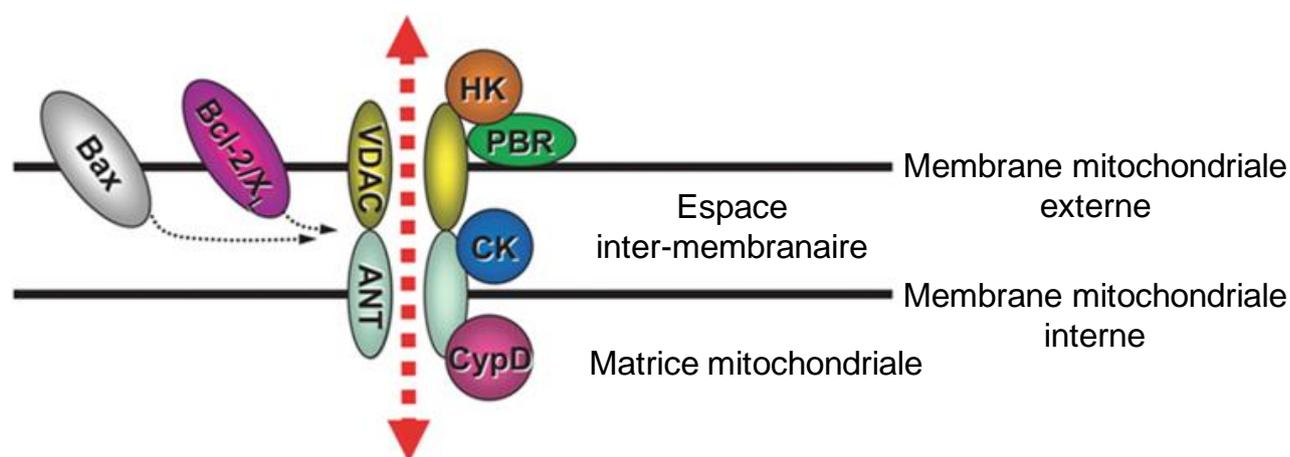


Figure 12 : L'identité moléculaire proposée du mPTP

Le mPTP serait formé par l'interaction du VDAC, de l'ANT et de la Cyp-D au niveau des sites de contact entre les membranes mitochondriales externes et internes. Des protéines comme HKII, PBR (maintenant connu comme TSPO) et les protéines de la famille Bcl-2 régulent l'ouverture/la formation du mPTP.

Abréviations : VDAC, voltage dependent anion channel ; ANT, adenine nucleotide translocase ; Cyp-D, cyclophilin D ; HKII, hexokinase II ; PBR, récepteurs périphériques aux benzodiazépines nommé actuellement TSPO, protéine translocatrice ; Bcl-2/xL, B-cell lymphoma 2/B-cell lymphoma leukaemia ; Bax, Bcl-2 associated x protein ; CK, creatine kinase.

Figure adaptée de Zorov *et al.*, 2009.

I.1 Le « Voltage-Dependent Anion Channel » (VDAC)

Le VDAC est la protéine la plus abondante de la membrane mitochondriale externe et facilite le transport de l'ATP/ADP à travers elle. Bien que le VDAC ait longtemps été considéré comme un élément clé du mPTP, sa participation est actuellement fortement remise en cause car les principales caractéristiques de la perméabilité mitochondriale sont préservées chez les souris délétées pour les gènes codant pour les trois isoformes de VDAC (Baines *et al.*, 2007). Par ailleurs, la délétion des trois isoformes de VDAC amplifie la mort des fibroblastes induite par le stress oxydant, suggérant que VDAC pourrait avoir des propriétés protectrices. Le VDAC n'est donc plus considéré comme un constituant du mPTP, voir même pour certains auteurs comme un régulateur du mPTP (Zorov *et al.*, 2009).

I.2 L'«Adenine Nucleotide Translocase » (ANT)

L'ANT intervient dans l'échange ATP/ADP à travers la membrane mitochondriale interne. Contrairement au VDAC, les preuves du rôle de l'ANT dans la constitution du mPTP sont plus convaincantes. De nombreuses études ont montré que l'ouverture du mPTP est favorisée par la déplétion en nucléotides adényliques et inhibée par l'addition d'ATP ou d'ADP (Halestrap et Brenner, 2003). L'ouverture du mPTP est également modulée par d'autres ligands spécifiques de l'ANT comme le carboxyatractyloside et l'acide bongkréique. L'implication de l'ANT comme élément constitutif du mPTP a également été reconsidéré. En effet, l'ouverture du mPTP est inhibée par la cyclosporine A (CsA) dans des mitochondries isolées du foie de souris délétées en ANT1 et ANT2 alors que les hépatocytes isolés de ces souris répondent normalement à différents stimuli de mort cellulaire, menant les auteurs à conclure que l'ANT n'entre pas dans la composition du mPTP. Néanmoins, l'ouverture du pore dans ces mitochondries est moins sensible aux concentrations calciques que les mitochondries des souris sauvages et insensible aux ligands de l'ANT tels que l'ADP, le carboxyatractyloside et l'acide bongkréique (Kokoszka *et al.*, 2004). Toutefois, il convient de noter qu'une autre isoforme de l'ANT, l'ANT4 récemment identifié (Da cruz *et al.*,

2003) est présente chez les souris ANT1/ANT2^{-/-} expliquant la capacité de ces souris à survivre. Ces observations suggèrent que l'ANT serait un élément régulateur du mPTP.

I.3 La cyclophiline D (Cyp-D)

La peptidyl-prolyl cis-trans isomérase ou Cyp-D (Connern *et al.*, 1992) est une protéine matricielle d'environ 18 KDa de la famille des cyclophilines. Durant la formation du mPTP, la Cyp-D interagit avec l'ANT, facilitant le changement de conformation de l'ANT déclenché par le calcium afin de créer un canal. L'implication de la Cyp-D dans la formation du mPTP a tout d'abord été révélé grâce à la CsA qui se lie à la Cyp-D et inhibe son activité (Clarke *et al.*, 2002). C'est aussi un puissant inhibiteur de l'ouverture du mPTP (Crompton *et al.*, 1988). L'effet inhibiteur de la CsA est indépendant de son effet sur la calcineurine puisque d'autres dérivés de la CsA, tels que l'immunosuppresseur Sanglifehrin A (SfA) ainsi que les molécules dénuées de propriétés immunosuppressives comme le NIM 811 et le UNIL025 ont des propriétés similaires sur l'ouverture du pore tout en étant dépourvues d'activité inhibitrice sur la calcineurine (Hansson *et al.*, 2004 ; Clarke *et al.*, 2002). Des études génétiques ont ensuite confirmé le rôle de la Cyp-D dans l'ouverture du mPTP. En effet, chez des souris délétées pour le gène codant pour la Cyp-D, les mitochondries isolées ont besoin d'une concentration de calcium beaucoup plus élevée que des mitochondries isolées de souris sauvages pour que l'ouverture du mPTP puisse être observée. Par ailleurs, la sensibilité du mPTP de ces mitochondries à une surcharge calcique est identique à celle des mitochondries isolées de souris sauvages traitées par la CsA (Javadov *et al.*, 2007). Malgré ces arguments impliquant la Cyp-D dans la composition du mPTP, de récentes études génétiques suggèrent que la Cyp-D ne jouerait qu'un rôle de régulateur du mPTP (Basso *et al.*, 2005).

I.4 Le transporteur mitochondrial de phosphates (PiC)

Le transporteur mitochondrial de phosphates (PiC) est une protéine de 30 à 35 kDa localisée dans la membrane mitochondriale interne. En interagissant avec la Cyp-D et, éventuellement avec l'ANT, le PiC peut induire des changements de conformation du mPTP calcium-dépendants à l'origine de

l'ouverture de ce pore (Halestrap, 2010). L'invalidation du gène codant pour le PiC conforte ces données puisqu'elle entraîne une diminution de l'apoptose induite par la staurosporine dans les cellules HeLa, alors qu'une surexpression de PiC favorise la mort de ces mêmes cellules (Alcala *et al.*, 2008). Cependant, l'équipe d'A. Halestrap, qui ont fortement défendu le PiC comme un constituant du mPTP, ont récemment montré que l'inactivation de ce transporteur n'affecte pas l'ouverture du mPTP induite par une surcharge calcique (Varanyuwatanaa et Halestrap, 2011). Ils ont donc émis deux hypothèses pour expliquer cette observation ; le PiC ne serait pas un constituant du mPTP ou 25% de l'activité de PiC restante, l'inactivation n'étant pas totale, serait suffisante pour former le mPTP.

I.5 La Protéine Translocatrice (TSPO)

Le TSPO est une protéine de 18 kDa qui a d'abord été dénommé récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR) car il a été découvert dans les organes périphériques où il est localisé au niveau de la membrane externe mitochondriale et présente un site de liaison pour les benzodiazépines. Le PBR a initialement été considéré comme un sous-type des récepteurs centraux aux benzodiazépines (CBRs), puis des études pharmacologiques ont démontré que ces deux types de récepteurs étaient des entités différentes (Beurdeley-Thomas *et al.*, 2001). Le 4'-chlorodiazépam (Ro5-4864) se fixe uniquement au PBR avec une affinité nanomolaire, alors que sa liaison aux CBRs nécessite une concentration micromolaire (Beurdeley-Thomas *et al.*, 2001). En outre, des ligands appartenant à d'autres classes chimiques comme les isoquinolones permettent le marquage spécifique du PBR. En 2006, Papadopoulos *et al.* ont proposé de renommer le PBR TSPO de manière à privilégier davantage la fonction de la protéine plutôt que sa localisation ou l'appartenance à une classe chimique de ses ligands.

I.5.1 Localisation :

Le TSPO est une protéine ubiquitaire impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques. Le TSPO est très répandu dans les tissus glandulaires et sécrétoires où la synthèse d'hormones stéroïdiennes est importante, et est essentiellement impliqué dans la translocation du cholestérol du

cytosol vers la mitochondrie. Le TSPO est également présent dans les organes non stéroïdiens comme le cœur, les vaisseaux sanguins, les glandes salivaires et la paroi de l'artère pulmonaire (Baurdeley-Thomas *et al.*, 2001). Des études de liaison ont montré que le TSPO se situe dans les mitochondries (Anholt *et al.*, 1986), et plus précisément dans la membrane externe mitochondriale, ainsi que dans les fractions nucléaires (Venturini *et al.*, 1998).

I.5.2 Structure du TSPO :

Le TSPO est une protéine hydrophobe de 169 acides aminés et de 18 KDa. La structure tridimensionnelle révèle cinq hélices α transmembranaires (figure 13) localisées au niveau des sites de contact entre les membranes externe et interne mitochondriales (Papadopoulos *et al.*, 2003)

I.5.3 Les fonctions du TSPO :

Le rôle physiologique exact du TSPO n'est pas entièrement connu à ce jour. Le TSPO régule le transport du cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne mitochondriale où ce dernier est métabolisé afin de servir de précurseur à la synthèse des hormones stéroïdiennes (Krueger et Papadopolous, 1990). Il intervient également dans le transport des porphyrines impliquées dans la synthèse de l'hème (Castedo *et al.*, 2002), la respiration mitochondriale (Hirsch et al, 1988), la prolifération cellulaire et l'apoptose (Bono *et al.*, 1999). Toutes ces études montrent que le TSPO pourrait avoir une fonction régulatrice au niveau de la mitochondrie, mais également participer au contrôle mitochondrial de l'apoptose. Le TSPO est souvent associé au VDAC et à l'ANT. Au niveau cardiaque, les ligands du TSPO modulent la libération du calcium à l'origine du gonflement mitochondrial associé à l'ouverture du mPTP (Veenman et Gavish, 2006). Des études de patch-clamp ont mis en évidence un canal mitochondrial, supposé être le mPTP, car sensible à la CsA et modulé par le 4'-chlorodiazépam. Des études réalisées dans notre laboratoire (Obame *et al.*, 2008) ont montré que le 4'-chlorodiazépam induit une diminution de la taille d'infarctus dans un modèle d'I/R chez le rat. Une limitation de la perméabilité mitochondriale et une modification de la réorganisation des différentes protéines de la famille Bcl-2 au niveau des mitochondries accompagnent l'effet protecteur du 4'-chlorodiazépam. De même, l'occupation du TSPO par un de ses ligands de synthèse, le SSR180575, diminue la taille de l'infarctus dans un modèle d'I/R chez le

rat et confère aux cardiomyocytes une résistance au stress oxydant (Leducq *et al.*, 2003). L'ensemble de ces études suggèrent que le TSPO agit comme un régulateur du mPTP et peut être considéré comme une cible potentielle pour la cardioprotection pharmacologique.

Figure 13

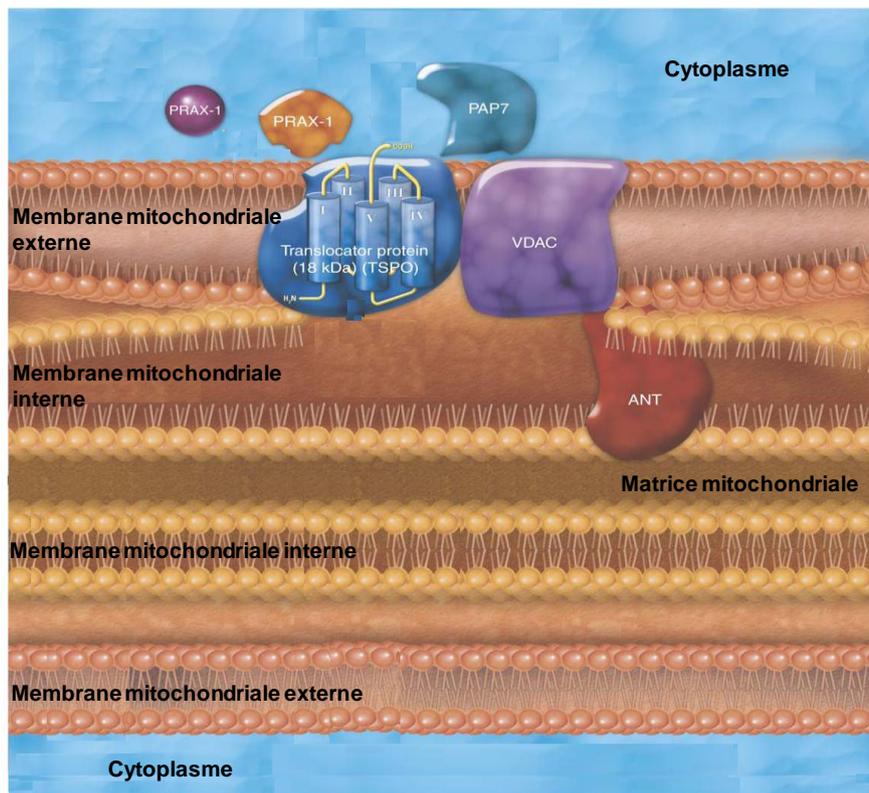


Figure 13 : Schéma de la structure de la protéine translocatrice mitochondriale (TSPO)

Le TSPO, anciennement dénommé PBR, est organisé en 5 sous-unités qui forment un pore localisé au niveau des sites de contact entre les membranes externe et interne mitochondriales.

Il est modulé par différentes protéines, PRAX-1, peripheral benzodiazepine receptor associated protein-1 et PPAP-7, protein kinase A (PKA) regulatory subunit RIa-associated protein

Le TSPO est souvent associé au VDAC et à l'ANT

Figure adaptée de Papadopoulos et al., 2006.

I.6 Autres protéines :

Plusieurs autres protéines sont décrites comme des composants et/ou des modulateurs du mPTP. Il s'agit :

➤ De l'hexokinase II (HKII) qui est une enzyme cytosolique associée à la surface de la mitochondrie au niveau des sites de contact entre les membranes mitochondriales interne et externe. Cette enzyme catalyse la première étape du métabolisme du glucose caractérisée par la formation du glucose-6-phosphate grâce au transfert du phosphate terminal à partir d'une molécule d'ATP. Plusieurs travaux suggèrent l'implication de l'HKII dans la régulation du mPTP, l'association entre l'HKII et le VDAC étant corrélée à une inhibition du mPTP (Beutner *et al.*, 1998). D'autres études ont montré que cette interaction peut entraîner un changement de conformation du VDAC conduisant à la fermeture du mPTP et/ou prévenir les interactions entre les composants du mPTP et les protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 (Mathupala *et al.*, 2006). Cette interaction peut être neutralisée par la phosphorylation du VDAC par GSK-3 β ou favorisée par Akt par inhibition de GSK-3 β . De façon surprenante, le détachement de l'HKII d'un site différent de celui du VDAC peut déclencher l'apoptose via un changement conformationnel des membranes mitochondriales et des composants/modulateurs du mPTP, et cela indépendamment du VDAC (Chiara *et al.*, 2008).

➤ Des protéines de la famille Bcl-2 qui sont ancrées dans la membrane externe mitochondriale à proximité du mPTP et agissent en stabilisant l'intégrité de la membrane (Marzo *et al.*, 1998). Bax forme des canaux avec l'ANT ; la formation de ces canaux étant prévenue par action de Bcl-2 sur Bax (Brenner *et al.*, 2000). Ces canaux sont responsables de l'induction de l'apoptose en favorisant la libération du cytochrome c et la déstabilisation de la bicouche lipidique rendant la membrane externe plus perméable. Les protéines de la famille Bcl-2 semblent être capables de produire ou au moins de réguler leurs effets via une interaction directe avec le mPTP ou avec ces composants/régulateurs (Juhaszova *et al.*, 2008).

➤ De la créatine kinase (CK) qui est une enzyme localisée au niveau de l'espace intermembranaire qui facilite la production et l'exportation dans le cytosol de la phosphocréatine. La forme active de la CK est un dimère dont l'association sous la forme d'un octamère cubique est capable de se lier aux membranes (Rojo *et al.*, 1991). L'incorporation de créatine kinase

mitochondriale, d'hexokinase cytosolique, de VDAC et d'ANT dans des bicouches phospholipidiques génère une structure dont l'activité est semblable à celle du mPTP (Beutner *et al.*, 1998). De plus, l'interaction directe entre l'ANT et le VDAC ne serait possible qu'après dissociation de l'octamère de CK (Vyssokikh et Brdiczka, 2003), ce qui confirme le rôle régulateur exercé par cette protéine sur le mPTP.

L'ensemble de ces données laisse à penser que la structure moléculaire du mPTP n'est à ce jour toujours pas totalement déterminée. Des études génétiques remettent en cause régulièrement la structure établie du mPTP transformant des constituants décrits comme essentiels du mPTP en simples régulateurs de ce dernier (figure 14).

La caractérisation de l'identité moléculaire du mPTP reste un défi important car elle devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques et ainsi aider à la conception de médicaments utiles dans les pathologies nécessitant la modulation de ce canal.

Figure 14

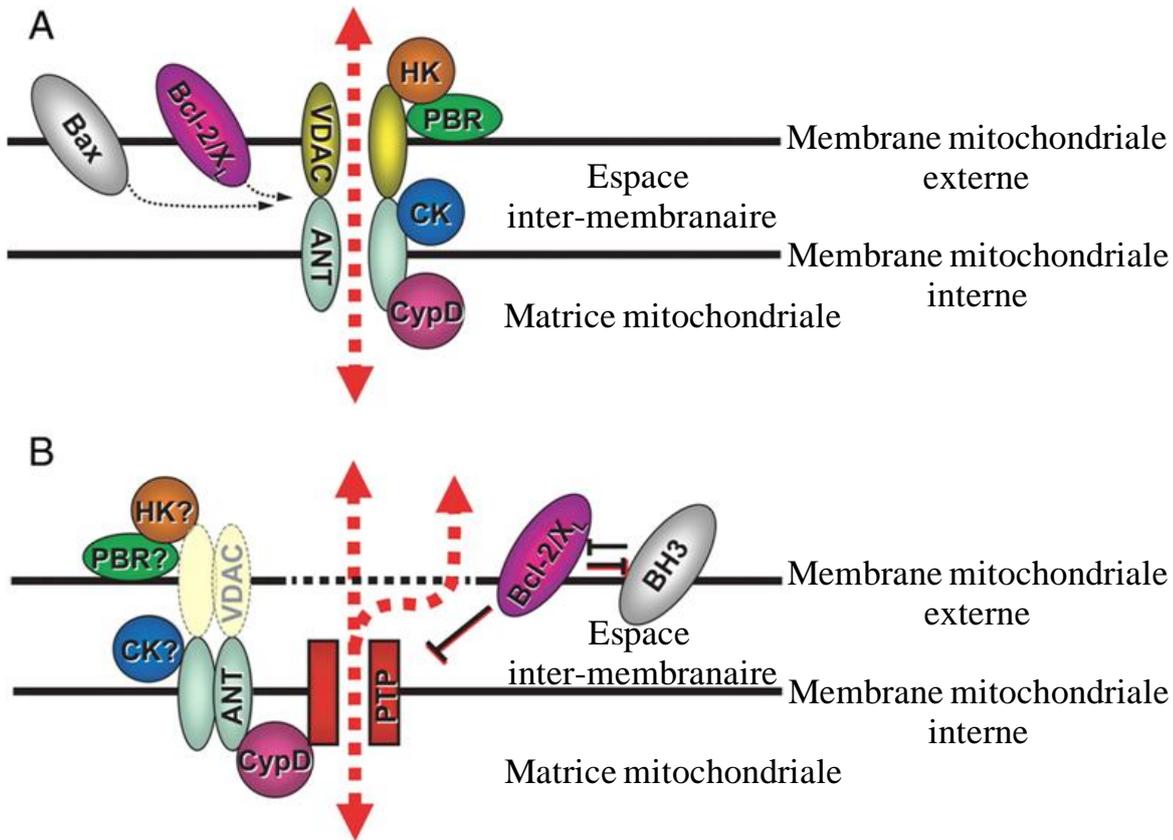


Figure 14 : Le modèle proposé du mPTP.

A, vue classique et B, vue actuelle.

Les protéines considérées jusqu'à présent comme composantes du mPTP semblent être des éléments régulateurs de ce pore. L'identité moléculaire du mPTP reste toujours inconnue.

Abréviations : VDAC, voltage dependent anion channel ; ANT, adenine nucleotide translocase ; Cyp-D, cyclophilin D ; HKII, hexokinase II ; PBR, récepteurs périphériques aux benzodiazépines nommé actuellement TSPO, protéine translocatrice ; Bcl-2/xL, B-cell lymphoma 2/B-cell lymphoma leukaemia ; Bax, Bcl-2 associated x protein ; BH₃, Bcl-2 homology domain 3 ; CK, creatine kinase;.

Figure adaptée de Zorov *et al.*, 2009.

II. Régulation de l'ouverture du mPTP :

En plus des protéines régulatrices précédemment évoquées, une multitude d'autres facteurs capables de moduler l'ouverture du mPTP ont été décrits comme les kinases des différentes voies de signalisations (1^{er} Chapitre), les nucléotides, les cations bivalents, le potentiel de membrane mitochondrial, etc. Nous présenterons ici les facteurs les plus étudiés dans la littérature en nous focalisant sur le rôle clé joué par les espèces réactives de l'oxygène.

II.1 Le calcium

Le calcium est un facteur essentiel dans l'induction de l'ouverture du mPTP mais la concentration calcique matricielle nécessaire à cette ouverture est difficile à définir (Di Lisa *et al.*, 2009) car elle est influencée par différents facteurs tels que le pH et le P_i . L'ouverture du mPTP semble pouvoir être favorisée par des réponses cellulaires déclenchées par une élévation de la concentration de calcium intracellulaire à l'origine d'une accumulation des EROs. Cependant, dans le modèle d'I/R, la formation des EROs semble jouer un rôle plus important dans l'ouverture du mPTP que la concentration de calcium intracellulaire (Halestrap *et al.*, 2009). Il a récemment été démontré dans des cardiomyocytes que le mPTP est largement insensible à une augmentation de calcium cytosolique mais qu'il devient très sensible au calcium lorsque les mitochondries de ces cellules sont isolées (Zorov *et al.*, 2009). Cette différence peut être expliquée par la perte d'un ou de plusieurs facteur(s) soluble(s) impliqué(s) dans la régulation de cette sensibilité au calcium lors de l'isolement des mitochondries. Le rôle du calcium dans l'ouverture du mPTP serait plus important dans les cellules isolées non excitables (Juhaszova, 2008) que dans les cellules excitables où le stress oxydant joue un rôle prépondérant dans l'ouverture du mPTP, notamment lorsqu'elles sont soumises à une hypoxie/réoxygénation (H/R) (Zorov *et al.*, 2009).

II.2 Le pH intracellulaire (pH_i)

Le pH_i est considéré comme un facteur important dans les lésions myocardiques induites par l'I/R. Pendant l'ischémie, le pH extracellulaire baisse localement en raison des H⁺ expulsés de la cellule par l'échangeur sodium/proton. A la reperfusion, le pH extracellulaire retourne rapidement à la normale conduisant à une perturbation de la signalisation calcique et à l'apparition de lésions au niveau du myocarde. Les premières études montrant qu'une diminution du pH à la réoxygénation retarde l'ouverture du mPTP dans un modèle de mitochondries isolées ont été publiées par Haworth et Hunter en 1979. L'effet protecteur de l'acidose a été largement confirmé *in vitro* (Juhaszova *et al.*, 2008) mais également sur des cœurs soumis à une I/R (Cohen *et al.*, 2008). Un pH proche de 7,3 à la réoxygénation est optimal pour induire l'ouverture du mPTP (Di Lisa et Bernardi, 2009). La probabilité d'ouverture du mPTP diminue nettement en cas de pH inférieur à 7,3 en raison de la protonation réversible de résidus histidyl ainsi que lorsque ce pH est au dessus de 7,4 mais le mécanisme est inconnu. Les stratégies cardioprotectrices pourraient donc faire intervenir une modulation du pH. Ainsi, les inhibiteurs de l'échangeur sodium/proton administrés à l'animal au moment de la reperfusion provoquent une protection légèrement inférieure à celle observée lors de leur administration pendant l'ischémie et à la reperfusion (Murphy *et al.*, 1991). Malgré cela, les essais cliniques effectués en présence d'inhibiteurs de l'échangeur sodium/proton, tel que le cariporide, lors de l'I/R se sont avérés décevants en raison de l'administration de fortes doses responsables d'une augmentation de l'incidence des accidents vasculaires cérébraux (Theroux *et al.*, 2000). Des approches permettant de contrôler l'acidose au sein de la zone infarctée avec un cathéter, au moment de la reperfusion, pourraient être prometteuses dans le traitement des patients atteints d'un infarctus aigu du myocarde (Zorov *et al.*, 2009).

II.3 Le phosphate inorganique (Pi)

Depuis de nombreuses années, il est établi que l'ouverture du mPTP est activée par la présence de Pi, mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas entièrement élucidés. Le Pi pourrait exercer une double action sur le mPTP. Le Pi pourrait favoriser l'ouverture du mPTP en diminuant la

concentration de magnésium matricielle et/ou en formant des polyphosphates (Di lisa et Bernardi, 2009 ; Basso, *et al.*, 2005). Le Pi contribue également au maintien des valeurs optimales du pH et/ou de l'homéostasie du calcium mitochondrial provoquant l'ouverture du mPTP. Cependant, en présence de CsA ou en cas de délétion du gène codant pour la Cyp-D, le Pi réduit la probabilité d'ouverture du mPTP par action directe sur le mégacanal laissant à penser que, dans ce modèle, la présence de Cyp-D empêche l'action inhibitrice du Pi en bloquant son site régulateur au niveau du mPTP (Di lisa et Bernardi 2009 ; Basso, *et al.*, 2008). Enfin, des résultats récents indiquent que le transporteur mitochondrial de phosphate, PiC, pourrait interagir avec des composants du mPTP et constituer un lien entre la concentration de phosphate et la régulation du mPTP (Leung *et al.*, 2008).

II.4 Les espèces réactives d'oxygène (EROs)

II.4.1 Actions physiologiques des EROs : rôle dans la signalisation

Bien que les EROs soient la plupart du temps responsables de dommages causés aux structures biologiques, il est également admis que de faibles concentrations d'EROs participent à la régulation de nombreux processus comme par exemple la réponse immunitaire, l'adhérence cellule-cellule, la prolifération cellulaire, l'inflammation, le métabolismeet la protection cellulaire. De nombreuses études ont montré l'implication des EROs dans l'activation des kinases impliquées dans la cardioprotection. Ainsi, l'inhibition de PKC abolit la diminution de mort cellulaire induite par une élévation modérée des EROs (Lebuff *et al.*, 2003). La voie RISK peut également être activée par les EROs. En effet, l'application d'H₂O₂ provoque une phosphorylation d'Akt (Pham *et al.*, 2000) mais pourrait aussi provoquer la phosphorylation d'autres kinases telles que MAPK, ERK et p38 (Yue *et al.*, 2002).

La dualité entre les effets bénéfiques et délétères des EROs a été exposée dans un bon nombre d'études. Ainsi, un traitement avec 100µM d'H₂O₂ est capable d'induire l'ouverture du mPTP dans des mitochondries isolées de cœur, ouverture qui est prévenue par un pré-conditionnement réalisé grâce à 2µM d'H₂O₂ (Costa *et al.*, 2006). Les effets cardioprotecteurs du diazoxide un activateur des canaux potassiques et du pré-conditionnement ischémique sont en partie dues à une augmentation de

la production des EROs (Garlid *et al.*, 2003) et sont abolis par un antioxydant (Hausenloy *et al.*, 2004). Ceci a été confirmé par des études génétiques. En effet, des souris transgéniques invalidées pour une sous-unité de la NADPH oxydase responsable de la production d'EROs ne peuvent pas être pré-conditionnées car le niveau de production d'EROs des souris délétées pré-conditionnées n'excède pas celui de souris sauvages pré-conditionnées et traitées par un antioxydant (Bell *et al.*, 2005).

En conclusion, le niveau de production d'EROs est crucial ; de faibles niveaux sont nécessaires au maintien d'une physiologie cellulaire normale alors qu'une production élevée et prolongée d'EROs est délétère, voire toxique.

II.4.2 Actions pathologiques des EROs : Le côté sombre

Un excès de production d'EROs et/ou une diminution de l'activité des systèmes anti-oxydants, conduit à la mise en place d'un stress oxydant à l'origine de situations pathologiques (Rochette *et al.*, 2011). Le stress oxydant se traduit par une peroxydation lipidique, une oxydation protéique et des mutations de l'ADN, notamment de l'ADN mitochondrial (ADNmt)

➤ Peroxydation lipidique :

La peroxydation lipidique touche principalement les lipides contenant des acides gras insaturés. L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques eux mêmes très réactifs. La présence des lipides peroxydés perturbe les fonctions membranaires en augmentant la rigidité des doubles couches lipidiques à l'origine de la modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. Cette peroxydation fournit aussi une grande variété de produits réagissant avec les protéines et l'ADN. Parmi ces produits, le malondialdéhyde (MDA) est utilisé comme marqueur de la peroxydation lipidique. Dans la mitochondrie, la cardiolipine est particulièrement sensible à la peroxydation lipidique.

➤ Oxydation protéique :

Les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les EROs. Ces réactions, fréquemment influencées par les cations métalliques de type Cu^{2+} et Fe^{2+} , inactivent les centres Fe/S, affectent les complexes de la chaîne respiratoire, la FOF1-ATP-synthétase et l'ANT, ce qui se traduit par une

baisse dans la production énergétique mitochondriale. Les protéines oxydées semblent constituer un facteur majeur dans la dégénérescence cellulaire de nombreuses maladies, comme l'Alzheimer et le Parkinson.

➤ **Oxydation de l'ADN**

Les mitochondries sont les premières cibles des EROs. L'ADNmt est très sensible au stress oxydant, 10 fois plus que l'ADN nucléaire. Cette grande sensibilité de l'ADNmt est due à sa grande proximité avec la membrane mitochondriale interne, à l'absence d'introns et d'histones protectrices autour de l'ADNmt et aux faibles capacités réparatrices de la mitochondrie. La genèse de protéines non fonctionnelles au niveau des complexes respiratoires pourrait exacerber la fuite d'électrons, produisant plus d'EROs et aggravant ainsi le phénomène.

Les fonctions de la mitochondrie sont donc particulièrement exposées aux dommages oxydatifs. Dans ces dernières années les recherches menées sur le mPTP semblent accorder au stress oxydant un rôle déterminant dans la transition de perméabilité et l'ouverture du mPTP. Dans ce paragraphe, nous aborderons les relations existant entre EROs et mPTP.

II.4.3 Relation entre les EROs et le mPTP :

II.4.3.1 La vision traditionnelle : EROs produites pendant la reperfusion

Un nombre considérable d'études supporte une théorie selon laquelle les lésions de reperfusion sont causées par une production accrue des radicaux libres au moment de la reperfusion c'est-à-dire lors de la réintroduction de l'oxygène dans les tissus ischémiques (Ambrosio *et al.*, 1991, Rochette et Maupoil, 1993). Les EROs, particulièrement celles générées pendant les premières minutes de la reperfusion, conduisent à un stress oxydant cellulaire, entraînant la mort cellulaire (Kim *et al.*, 2006). Une diminution de la production des EROs à la réoxygénation améliore de façon significative la survie cellulaire après H/R (Vanden Hoek *et al.*, 1997). Au contraire, l'administration de diverses substances pro-oxydantes potentialisent la sensibilité du mPTP à la surcharge calcique (Lenartowicz *et al.*, 1991 ; Crompton *et al.*, 1988). Les EROs augmentent la probabilité d'ouverture du mPTP en

favorisant la liaison de la Cyp-D à l'ANT (Halestrap *et al.*, 2009). En effet, des études ont montré que l'oxydation des groupes thiols de l'ANT pourrait être responsable de cet effet. Plus particulièrement, les EROs provoqueraient une liaison interne entre Cys160 et Cys257 (sites de liaison des nucléotides sur l'ANT) qui pourrait changer la conformation de l'ANT au niveau de la Cys57 (site de liaison de la Cyp-D sur l'ANT) ce qui expliquerait l'augmentation de la liaison ANT/Cyp-D (McStay *et al.*, 2002).

Les EROs générées au début de la réoxygénation semblent donc être l'un des activateurs principaux de l'ouverture du mPTP et de la mort cardiomyocytaire. Toutefois, la plupart de ces données ont été acquises à partir de modèles cellulaires et les résultats obtenus dans des modèles intégrés sont plus discutables. En effet, si le traitement par certains antioxydants (Forrat *et al.*, 1997) permet d'améliorer certains aspects des lésions de reperfusion, comme par exemple le « stunning » (Tang *et al.*, 2002 ; Bolli et Marban, 1999), le rôle des EROs dans la réduction de la taille de l'infarctus est controversé. Bien qu'un certain nombre d'études montrent une diminution de la taille d'infarctus en présence d'antioxydants ou de piègeurs d'EROs, d'autres auteurs n'ont pas pu mettre en évidence d'amélioration (Downey et Yellon 1992). Ces études contradictoires soulèvent de nombreuses questions concernant les différences physiologiques liées à l'espèce utilisée, les techniques de détermination de la taille d'infarctus, les durées d'ischémie et de reperfusion, le moment et la zone d'injection et la dose d'antioxydant à administrer, etc.

II.4.3.2 La vue actuelle paradoxale : les EROs produites pendant l'ischémie

Récemment, plusieurs études ont montré que les EROs peuvent être produites durant l'ischémie. Cet effet peut apparaître paradoxal puisque l'ischémie est associée à une baisse du niveau d'oxygène. La génération d'EROs pendant l'ischémie est liée au niveau résiduel d'O₂ présent dans les tissus. Ainsi, l'utilisation de piègeurs permettant d'éliminer totalement l'O₂ résiduel provoque une anoxie et diminue l'oxydation et la mort cellulaire lors de la réoxygénation (Robin *et al.*, 2007). Les EROs produites pendant la période ischémique semblent inoffensifs puisque la mort cellulaire n'augmente pas pendant l'hypoxie (Robin *et al.*, 2007), ce qui indique que l'effet immédiat de ce stress oxydant est peu délétère. A la différence de son rôle toxique à la reperfusion /ou réoxygénation, selon certains auteurs, les EROs générées au cours de l'ischémie sont même susceptibles d'être à l'origine des EROs impliqués dans le pré-conditionnement (Becker *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces observations indique que le stress oxydant du à l'hypoxie est nécessaire, mais pas suffisant pour provoquer la mort cellulaire. Cependant, l'effet des EROs produites pendant l'hypoxie sur l'ouverture du mPTP reste mal connu et constitue un chapitre important de notre travail de thèse.

III. La perméabilité mitochondriale comme cible pharmacologique de la cardioprotection ? (d'après Morin *et al.*, 2009)

Dans ce paragraphe, nous expliquerons pourquoi l'inhibition de la perméabilité de la membrane mitochondriale, plus particulièrement l'inhibition pharmacologique du mPTP représente une stratégie pertinente afin de protéger le myocarde contre l'I/R et nous aborderons ce concept selon deux approches (figure 15):

- Les stratégies pharmacologiques agissant directement sur la membrane mitochondriale en ciblant les canaux mitochondriaux
- les agents pharmacologiques agissant indirectement sur la perméabilité de la membrane mitochondriale, et empêchant les conditions favorisant la perméabilisation membranaire (la stimulation de la voie RISK et le stress oxydant).

Figure 15

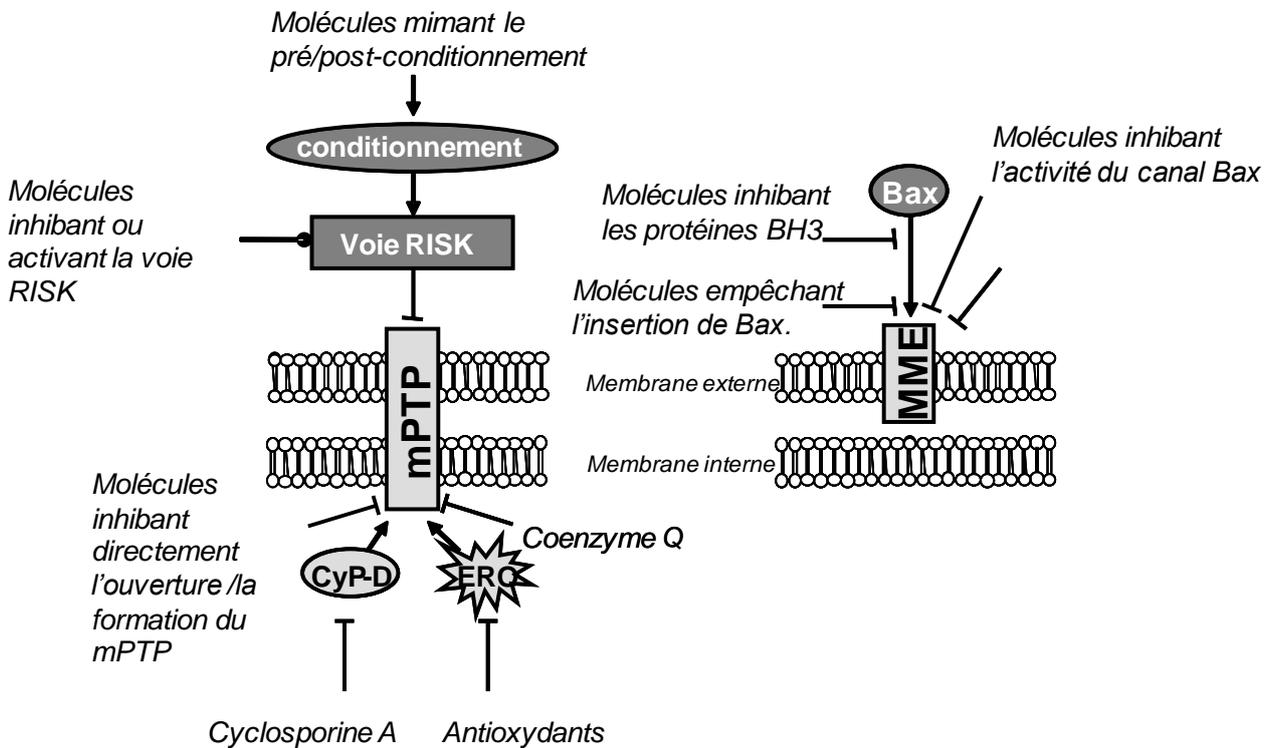


Figure 15 : L'inhibition de la perméabilité mitochondriale comme approche pharmacologique afin de limiter les lésions d'I/R.

Les stratégies pharmacologiques peuvent agir directement ou indirectement au niveau de la membrane mitochondriale externe (MME) ou au niveau des membranes internes et externes (mPTP).

→ : activation

—| : inhibition

—● : activation ou inhibition

Figure adaptée de Morin *et al.*, 2009.

III.1 Les stratégies pharmacologiques directes

Pendant l'I/R, la mort cellulaire est induite par un changement de la perméabilité de la membrane mitochondriale régulée par des signaux de stress provenant de la mitochondrie et du cytosol comme les protéines de la famille Bcl-2. Deux types de mécanismes participent à la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Green et Kroemer, 2004). Le premier implique la participation des membranes interne et externe de la mitochondrie et correspond à la formation du mPTP. Le second mécanisme ne met en jeu que la membrane mitochondriale externe et la formation de canaux à travers cette membrane (figure 15).

La perméabilisation de la membrane mitochondriale induit la libération d'effecteurs de la mort cellulaire et entraîne la perte des fonctions mitochondriales fondamentales pour la survie des cellules. Les substances capables de bloquer ou de limiter la perméabilisation de la membrane mitochondriale pourraient donc être cytoprotectrices lors de l'I/R.

III.1.1 Le mPTP comme cible pharmacologique de la cardioprotection

Le mPTP étant un acteur principal des lésions cellulaires lors de l'I/R myocardique, il apparaît donc comme une cible pharmacologique prometteuse : (1) l'ouverture du mPTP est favorisée par les conditions qui prévalent pendant l'I/R, (2) le mPTP contrôle la mort cellulaire en libérant les facteurs apoptotiques (Green *et al.*, 2005 ; Crompton *et al.*, 1999), (3) le mPTP est régulé par les membres pro - et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Baines C, 2010) et enfin, (4) il est impliqué dans l'effet cardioprotecteur du pré- et du post-conditionnement ischémique.

Bien que la structure moléculaire du mPTP reste inconnue (voir 2^{ème} chapitre, 2^{ème} partie paragraphe D), des approches ciblant les composants putatifs du pore ont été développées afin de trouver des inhibiteurs de son ouverture.

L'étude de l'interaction de la CsA avec la Cyp-D a fourni la première démonstration de la pertinence de cette approche. La CsA se lie à la Cyp-D avec une forte affinité et empêche l'interaction de cette protéine avec un composant du mPTP (probablement l'ANT) inhibant son ouverture. La CsA diminue la mort des cardiomyocytes soumis à une H/R (Nazareth *et al.*, 1991) et réduit la taille de l'infarctus dans les modèles *ex vivo* d'I/R cardiaque (Argaud *et al.*, 2004 ; Griffiths

et al., 1993). Des études cliniques ont également démontré que l'inhibition de l'ouverture du mPTP par la CsA, administrée au début de la reperfusion, protège le myocarde humain contre les lésions de l'I/R (Shanmuganathan *et al.*, 2005). L'utilisation clinique de la CsA est cependant limitée pour des raisons pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (Morin *et al.*, 2001) et par le fait que la CsA ne parvient plus à inhiber l'ouverture du mPTP lorsque les mitochondries sont exposées à de forts stimuli (Halestrap *et al.*, 2004). Pourtant, une étude clinique récente a montré qu'un bolus intraveineux de CsA 2,5 mg/kg administré juste avant la reperfusion réduit la taille de l'infarctus chez les patients souffrant d'infarctus aigu du myocarde (Piot *et al.*, 2008).

Des effets cardioprotecteurs similaires ont été obtenus avec des dérivés de la CsA non-immunosuppresseurs (figure 16), [N-méthyl-ala⁶] CsA, [N-méthyl-Val⁴] CsA, Debio 025 ou NIM811 (Argaud *et al.*, 2005 ; Griffiths *et al.*, 1993) confirmant la pertinence de cette approche. La Sanglifehrin A, un médicament non-apparenté à la CsA inhibe fortement l'ouverture du mPTP en inhibant l'activité isomérase de la Cyp-D (figure 15). Il convient d'ajouter que l'inhibition de l'ouverture du mPTP par la CsA est également efficace dans un cas particulier de l'I/R *i.e.*, la préservation hypothermique du cœur avant transplantation. La CsA améliore la récupération fonctionnelle après une longue préservation hypothermique du cœur (Rajesh *et al.*, 2003).

Une autre approche pharmacologique intéressante a été apportée par le laboratoire de P. Bernardi qui a montré qu'en dehors de ses effets antioxydants et de son rôle dans la régulation du transfert d'électrons, le coenzyme Q (ubiquinone) et des molécules apparentées modulent l'ouverture du mPTP en agissant sur un site spécifique (Fontaine *et al.*, 1998). Les coenzymes exogènes, Q0 (ubiquinone 0) et Q10 (decylubiquinone), sont de puissants inhibiteurs de l'ouverture du mPTP induite par la surcharge calcique, alors que le coenzyme Q1 (ubiquinone 5) neutralise les effets du coenzyme Q0 et de la decylubiquinone sans inhiber l'ouverture du mPTP (Fontaine *et al.*, 1998). Le VDAC a été proposé comme l'une des cibles potentielles des analogues de l'ubiquinone (Cesura *et al.*, 2003), mais comme les mitochondries isolées de foie de souris délétées pour le VDAC1 présentent une ouverture normale du mPTP, ouverture qui est inhibée par les analogues de l'ubiquinone (Krauskopf *et al.*, 2006), cette hypothèse est peu probable. En revanche, les propriétés antioxydantes du coenzyme Q pourraient contribuer à l'inhibition de l'ouverture du mPTP. En effet,

la décylubiquinone inhibe l'activation du mPTP en inhibant la production des EROs (Armstrong *et al.*, 2003).

III.1.2 Le mKATP

L'implication des canaux mKATP dans la cardioprotection a été décrite dans la 1^{ère} partie de ce 2^{ème} chapitre (section III.4.2). Suite aux résultats obtenus dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, l'administration intraveineuse de nicorandil (un activateur de l'ouverture du mKATP et un donneur de NO) chez des patients présentant un infarctus aigu du myocarde (Ono *et al.*, 2004 ; Ishii *et al.*, 2005) a permis de montrer un effet cardioprotecteur de cet agoniste potassique bien qu'une autre étude n'ait pas réussi à mettre en évidence cet effet dans le même cadre clinique (Kitakaze *et al.*, 2007). Il faut noter que la démonstration définitive de la participation des canaux mKATP dans le mécanisme de cardioprotection est entravée par l'absence d'agents sélectifs pour ce canal. Bien que les activateurs et les inhibiteurs de ce canal qui ont été utilisés pour démontrer les effets cardioprotecteurs (plus particulièrement le diazoxide et le 5-hydroxydécanoate), soient considérés comme sélectifs, de nombreuses études mettent en cause cette spécificité (Halestrap *et al.*, 2007). Une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires et du rôle des canaux mKATP nécessitera des agents pharmacologiques plus spécifiques et plus sélectifs. Cependant, ces canaux semblent toujours être une cible prometteuse pour le développement de nouveaux agents cardioprotecteurs.

III.1.3 Le canal « Mitochondrial apoptosis induced channel »/Bax (Mac/Bax)

Comme mentionné dans la section II.4.1, la perméabilisation de la membrane mitochondriale est sous le contrôle des protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2. En effet, l'activation de Bax provoque sa translocation dans la mitochondrie et (1) son intégration dans la membrane externe mitochondriale où il peut former un canal perméable (Crow *et al.*, 2004) ou (2) interagir avec un canal qui préexiste comme le VDAC (Granville *et al.*, 2003). A noter que le canal Bax semble identique au canal MAC (mitochondrial apoptosis induced channel) qui a été détecté au niveau des mitochondries (Kinnally *et al.*, 2007). Polster *et al.* (2003) ont montré que le propranolol et la bucaïne inhibent le changement de la perméabilité induite par Bax ainsi que la libération du

cytochrome c de la mitochondrie. Plus récemment, Hetz *et al.* (2005) ont identifié deux inhibiteurs de l'activité du canal Bax, bcl1 et bcl2, qui empêchent la libération du cytochrome c *in vivo* et *in vitro* et montrent un effet protecteur à la reperfusion dans un modèle d'I/R cérébrale. Ce type de molécule constitue une approche pharmacologique intéressante mais non étudiée jusqu'à présent, à notre connaissance, sur un modèle d'I/R cardiaque.

III.1.4 Le TSPO

Plusieurs études ont suggéré que les ligands du TSPO pourraient moduler l'apoptose (Bono *et al.*, 1999) et joueraient un rôle antiapoptotique dans des conditions de stress oxydant comme l'I/R (Carayon *et al.*, 1996). Dans ce contexte, des travaux sur le rein ont montré qu'il existe une corrélation entre l'expression du TSPO et la qualité de la préservation du rein, indiquant que le TSPO peut servir d'indicateur de viabilité rénale et mitochondriale pendant la période de préservation du greffon (Hauet *et al.*, 2002). Il est donc raisonnable de penser que l'augmentation pharmacologique des niveaux d'expression et de transcription du TSPO pourrait améliorer la résistance des cellules à un stress oxydant généré pendant l'I/R. Le SSR180575, un ligand irréversible du TSPO, empêche les dommages cellulaires induits par le stress oxydant et les lésions de l'I/R chez les rongeurs (Leducq *et al.*, 2003). Dans le laboratoire, nous avons montré que le 4'-chlorodiazépam, un ligand spécifique de TSPO (figure 16) réduit la taille de l'infarctus dans un modèle d'I/R myocardique chez le rat. Le mécanisme de protection implique une limitation de la perméabilisation membranaire mitochondriale due à une résistance des mitochondries à l'ouverture du mPTP et une réorganisation de l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 au niveau des membranes mitochondriales (Obame *et al.*, 2007). Le TSPO paraît donc être un modulateur de la mort cellulaire induite par l'I/R, ce qui suggère qu'il pourrait constituer une cible possible pour la cardioprotection. Pour cela, nous avons étudié l'effet cardioprotecteur d'un nouveau ligand du site cholestérol du TSPO, le TRO 40303, lors de l'I/R (Schaller *et al.*, 2010). *In vitro*, le TRO40303 augmente la résistance à l'ouverture du mPTP et limite la libération de facteurs pro apoptotiques mitochondriaux comme AIF (Apoptosis inducing factor). *In vivo*, il réduit la taille de l'infarctus et le remodelage cardiaque consécutif à un infarctus. Les résultats obtenus seront exposés ultérieurement dans la partie « résultats » de cette thèse.

L'ensemble des données de ce paragraphe indiquent que l'inhibition directe de l'ouverture du mPTP représente un objectif à atteindre dans l'élaboration d'une stratégie cardioprotectrice. Cela exige l'identification de la structure moléculaire du mPTP et des sites d'actions ainsi que la recherche de nouveaux inhibiteurs directs du mPTP (Fuks *et al.*, 2005 ; Cesura *et al.*, 2003) possédant spécificité et sélectivité .

III.2 Les stratégies pharmacologiques indirectes

Bien que récemment décrit, le post-conditionnement est déjà transposé en clinique, renforçant ainsi la preuve de ce concept (Ovize *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2007 ; Laskey *et al.*, 2005 ; Staat *et al.*, 2005). Dans le cadre d'une intervention percutanée coronarienne, le post-conditionnement est induit chez les patients par une série d'épisodes successifs de gonflement-dégonflement du ballonnet utilisé lors de l'angioplastie. Il a été montré que le post-conditionnement protège significativement le cœur contre les lésions induites par l'I/R avec une persistance significative de l'effet protecteur dans la durée (Thibaut *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2007).

Même si les mécanismes cellulaires qui régissent la protection induite par le pré- et le post-conditionnement ne sont pas complètement élucidés ils aboutissent à un mécanisme commun, à savoir l'inhibition indirecte de la perméabilité de la membrane mitochondriale via l'inhibition de l'ouverture du mPTP (Ferrera *et al.*, 2007) pendant la reperfusion, grâce à la mise en place de la voie RISK. Le mécanisme par lequel la voie RISK inhibe l'ouverture du mPTP lui non plus n'est pas encore totalement élucidé et plusieurs candidats ont été décrits comme capables d'inhiber cette ouverture du mPTP comme décrit dans le 1^{er} chapitre.

Cependant, quels que soient les mécanismes reliant la voie RISK à l'inhibition de l'ouverture du mPTP, l'activation de cette cascade de kinases provoque l'inhibition de l'ouverture du mPTP à la reperfusion et par conséquent accroît la cardioprotection. Cette propriété est exploitée pharmacologiquement comme décrit ci-dessous.

III.2.1 La voie RISK comme cible pharmacologique de la cardioprotection

L'administration de doses élevées d'adénosine au moment de la reperfusion protège le myocarde suite à un infarctus (Marzilli *et al.*, 2000). De même dans des études cliniques contrôlées, l'ajout d'adénosine au traitement thrombolytique initié après le début de la reperfusion a permis de diminuer la taille de l'infarctus (Ross *et al.*, 2005 ; Mahaffey *et al.*, 1999) mais sans pour autant améliorer les résultats cliniques à savoir l'insuffisance cardiaque et l'hospitalisation (Ross *et al.*, 2005).

La morphine, agoniste de récepteurs opiacés couplés aux protéines G, active la voie RISK en augmentant la phosphorylation de GSK-3 β , inhibe l'ouverture du mPTP et confère ainsi une cardioprotection lorsqu'elle est administrée à la reperfusion chez l'animal, comme montré dans la partie résultat de cette thèse (Gross *et al.*, 2005 ; Obame *et al.*, 2008). L'utilisation de la morphine qui est un médicament bien connu et qui peut être administré en aigu en toute sécurité représente une stratégie clinique intéressante pour le traitement de l'infarctus du myocarde.

Enfin, la stimulation directe de la PKC via des activateurs de la PKC ϵ ou des inhibiteurs de la PKC δ peut être à l'origine d'effets cardioprotecteurs. Ainsi, le KAI-9803, un peptide inhibiteur de la PKC δ administré par injection intra-coronaire lors d'intervention percutanée coronarienne effectuée suite à un infarctus aigu du myocarde entraîne des signes de cardioprotection. Malheureusement, les améliorations observées ne se sont pas révélées significatives, ce qui est probablement due à la petite taille de l'échantillon étudié (Bates *et al.*, 2008).

III.2.2 Les antioxydants et la perméabilité mitochondriale :

Les EROs jouant un rôle délétère majeur dans l'I/R, de nombreuses stratégies pharmacologiques ont été développés afin de les piéger, plus particulièrement les EROs d'origine mitochondriale, ou d'augmenter leur dégradation. Par exemple, Bogнар *et al.* (2006) ont développé une molécule, le HO-3538 (figure 16), qui mime la superoxyde dismutase et qui permet d'éliminer les EROs dans le microenvironnement du mPTP et d'inhiber ainsi son ouverture, conduisant à la protection du myocarde lors d'un épisode d'I/R. De même, l'édavarone, un piégeur des radicaux libres, inhibe l'ouverture du mPTP et limite les lésions de reperfusion (Rajesh *et al.*, 2003). Lors

d'un infarctus aigu du myocarde, l'injection intraveineuse d'édavarone limite la taille de l'infarctus et les arythmies au moment de la reperfusion et améliore les résultats cliniques à court terme (Tsujita *et al.*, 2006).

Cependant, la plupart des études cliniques réalisées avec des antioxydants conventionnels ont conduit à des résultats décevants (Griendling *et al.*, 2003). Plusieurs raisons peuvent être évoquées afin d'expliquer l'échec de ces études parmi lesquelles, le moment de l'administration des antioxydants ainsi que leur délivrance dans un compartiment précis. Comme nous l'avons vu auparavant, la production d'EROs débute au cours de la phase ischémique et il peut être crucial de commencer le traitement avec les antioxydants le plus tôt possible *i.e.*, avant le début de la reperfusion. De plus, l'administration optimale de ces molécules devrait avoir lieu directement au niveau des mitochondries, ce qui représente un autre facteur limitant.

Afin de surmonter ce dernier point, des chercheurs ont tenté de synthétiser des cations amphiphiles à partir des composés antioxydants existants, comme le tocophérol- α (MitoVitE) et l'ubiquinone (MitoQ) (figure 16). Ces composés sont attirés de façon sélective à l'intérieur des mitochondries grâce au potentiel membranaire négatif (Murphy *et al.*, 2008). Cette approche est une stratégie pharmacologique prometteuse puisque chez le rat l'administration de MitoQ limite significativement les lésions induites par l'I/R cardiaque (Adlam *et al.*, 2005). Contrairement aux MitoQ et MitoVitE, d'autres peptides antioxydants ont été synthétisés pour entrer dans les mitochondries de manière indépendante du potentiel membranaire. Ils comportent en effet dans leurs séquences des domaines permettant un adressage ciblé vers les mitochondries (Zhao *et al.*, 2004). Ces peptides réduisent la production mitochondriale d'EROs, inhibent l'ouverture du mPTP, empêchent la libération du cytochrome c (Zhao *et al.*, 2004) et préviennent l'I/R myocardique *ex vivo* et *in vivo* (Szeto *et al.*, 2008).

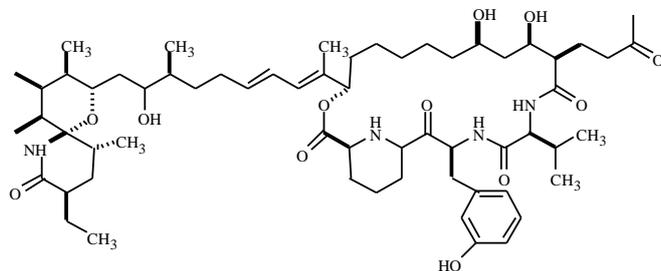
Une autre approche consiste à empêcher la production mitochondriale d'EROs afin de protéger la membrane de l'organite. Plusieurs approches ont été envisagées. Le développement d'inhibiteurs spécifiques de MAO-A (monoamines oxydases-A), permet de limiter les lésions induites par l'I/R (Bianchi *et al.*, 2005). L'utilisation de découpleurs de la membrane interne mitochondriale (Skulachev *et al.*, 1998) au moment de la reperfusion limite l'augmentation brutale du

potentiel de membrane, la production massive d'EROs et l'augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale. Ainsi, l'utilisation des molécules découplantes ou la surexpression des protéines découplantes entraînent elles une diminution de la production d'EROs associée à une protection du myocarde (Brennan *et al.*, 2006 ; Ganote *et al.*, 2003 ; Teshima *et al.*, 2003).

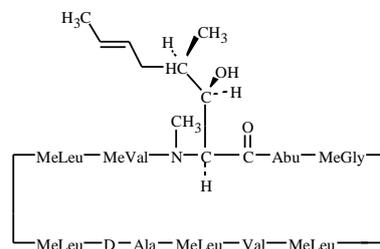
En conclusion, dans les prochaines années, le développement d'agents pharmacologiques pertinents utilisables en clinique, dépendra de l'évolution de notre compréhension des mécanismes et de notre capacité à développer des molécules spécifiques pour un site d'action, minimisant les effets sur les autres voies de signalisation. Toute la difficulté est de cibler une espèce radicalaire, un compartiment cellulaire spécifique, de définir un délai d'administration précis afin de fournir le traitement adapté au bon moment. Tous ces facteurs seront nécessaires afin d'obtenir des résultats cliniques bénéfiques et fiables.

Figure 16

Inhibiteurs directs du mPTP

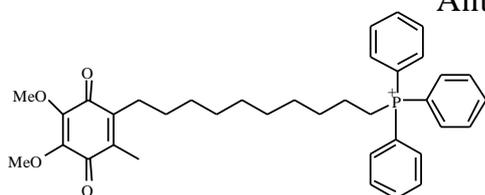


Sanglipherine A

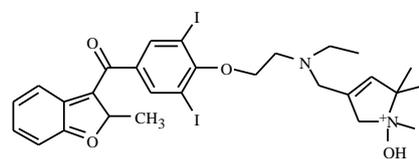


Cyclosporine A

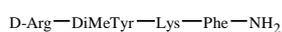
Antioxydants ciblant la mitochondrie



MitoQ

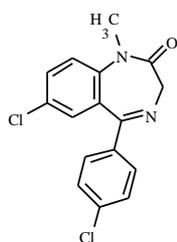


HO-3538: Mimétique du superoxide dismutase

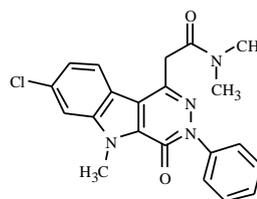


Antioxydant peptide SS-31

Ligands du TSPO



RO5-4864
4'-chlorodiazépam



SSR180575

Figure 16 : Structures chimiques de quelques agents pharmacologiques capables de moduler la perméabilité mitochondriale.

Figure adaptée de Morin *et al.*, 2010.

BUTS DE L'ETUDE

Nous avons vu dans les chapitres précédents que l'une des cibles pharmacologiques pertinentes pour induire une cardioprotection est d'accroître la résistance à l'ouverture du pore de transition de perméabilité membranaire afin de limiter l'augmentation de perméabilité des membranes mitochondriales, et donc de ralentir le processus de mort cellulaire et de maintenir la capacité de production d'énergie des cellules. De nombreuses études ont montré que les EROs jouent un rôle majeur dans ces lésions et dans l'ouverture du mPTP. En revanche, il existe peu d'informations claires sur le seuil et la période de production (ischémie et/ou reperfusion) des EROs qui conduisent à l'ouverture du mPTP. Par conséquent, nous avons cherché à établir une relation causale entre la production d'EROs, l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire et à explorer le rôle des différents types d'EROs.

Les buts de ce travail ont donc été :

- De mettre au point un modèle d'hypoxie/réoxygénation sur des cardiomyocytes adultes afin d'explorer en temps réel l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire. Le modèle a été validé au moyen de la cyclosporine A, une substance de référence dans l'étude du mPTP.
- D'étudier dans ce modèle le rôle des espèces réactives d'oxygène sur l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé comme molécules un cocktail d'antioxydant, 2-mercaptopropionylglycine et phénanthroline, et nous avons comparé leur effet à la substance de référence, la CsA.
- Enfin, la dernière partie de ce travail a été consacrée à deux applications pharmacologiques de ce modèle consistant à étudier l'effet (1) de la morphine et (2) d'un nouveau ligand du TSPO, le TRO 40303, dont nous avons montré des effets cardioprotecteurs dans notre modèle d'hypoxie/réoxygénation.

Matériels et Méthodes :

I. Animaux

Les travaux ont été effectués sur des rats adultes mâles de souche Wistar de 280-300g (Janvier, Centre de Production Animale, France). Ces animaux ont été maintenus dans une animalerie thermostatée à 19°C avec un degré d'hygrométrie ambiante de 65%. Ils ont eu un libre accès à la nourriture et à la boisson. Ils ont été soumis à un rythme nyctéméral imposé de 12h de lumière et 12h d'obscurité.

Toutes les expérimentations ont été effectuées en conformité avec la législation relative à l'expérimentation animale (Agrément N°94-043-12).

II. La dissociation des cardiomyocytes de rats adultes selon un modèle de type Langendorff à pression constante

Les rats ont reçu 500 UI d'héparine (Héparine Choay 25000 UI/5ml, Sanofi Winthrop, Gentilly, France) par voie intrapéritonéale puis ont été anesthésiés grâce à une administration intrapéritonéale de pentobarbital sodique de 50mg/kg (Sanofi Santé animale, Libourne, France).

Après avoir procédé à une thoracotomie, le cœur a été excisé et immédiatement plongé dans un tampon de perfusion refroidi sans calcium ([mM] NaCl 113 ; KCl 4,7 ; KH₂PO₄ 0,6 ; Na₂HPO₄ 0,6 ; HEPES 10 ; MgSO₄ 1,2 ; NaHCO₃ 12 ; KHCO₃ 10 ; taurine 30 ; rouge phénol 0,032 ; glucose 5,5 ; pH ajusté à 7,46 à l'aide d'une solution de NaOH 1N) afin d'arrêter tout battement. Le péricarde, la trachée, le thymus et la partie la plus haute de l'aorte ont été retirés. Puis le cœur a été attaché par l'aorte à un appareil de type Langendorff (figure 17) grâce à un fil (Ethicon mersutures 2/0 déc.3) afin d'être perfusé de manière rétrograde avec le tampon de perfusion pendant 4min à pression constante et à 37°C. Une fois le cœur devenu blanc, le tampon de perfusion a été remplacé par un tampon de dissociation ([mM] NaCl 113 ; KCl 4,7 ; KH₂PO₄ 0,6 ; Na₂HPO₄ 0,6 ; HEPES 10 ;

MgSO₄ 1,2 ; NaHCO₃ 12 ; KHCO₃ 10 ; taurine 30 ; rouge phénol 0,032 ; glucose 5,5 ; CaCl₂ 0,0125 ; pH ajusté à 7,46 à l'aide d'une solution de NaOH 1N) contenant les enzymes de digestion (0,1mg/ml de libérase type TM, Roche diagnostics, Meylan, France et 0,14mg/ml de trypsine, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Le cœur est considéré comme bien dissocié lorsqu'il prend une consistance gélatineuse.

Au terme de la dissociation, le cœur a été détaché et placé dans une boîte de Pétri de 33mm de diamètre. Les deux oreillettes et le ventricule droit ont été retirés et le ventricule gauche a été dilacéré à l'aide de ciseaux. Les morceaux du tissu ventriculaire ainsi obtenus ont immédiatement été déposés dans le tampon de dissociation ([mM] NaCl 113 ; KCl 4,7 ; KH₂PO₄ 0,6 ; Na₂HPO₄ 0,6 ; HEPES 10 ; MgSO₄ 1,2 ; NaHCO₃ 12 ; KHCO₃ 10 ; Taurine 30 ; rouge phénol 0,032 ; glucose 5,5 ; CaCl₂ 0,0125 ; pH ajusté à 7,46 à l'aide d'une solution de NaOH 1N) contenant 10% de sérum de veau (Cambrex Bio, Saint Beuzire, France) ce qui permet de neutraliser l'action des enzymes de digestion. Le contenu du tube a été agité avec précaution à l'aide d'une pipette Pasteur puis a été filtré afin de séparer les cardiomyocytes dissociés du reste du tissu ventriculaire. Après 10min, les cellules vivantes ayant sédimenté sous l'effet de la gravité, le surnageant a été aspiré et a été remplacé par le tampon de dissociation mais ne contenant plus que 5% de sérum de veau. Après une nouvelle sédimentation et aspiration du surnageant, les cardiomyocytes ont été remis en suspension dans le tampon précédent supplémenté avec 0,062mM de calcium. Cette procédure d'enrichissement en calcium a été poursuivie avec des concentrations croissantes de calcium (112 ; 212 ; 500 et 1000 mM). Une fois la concentration de 1mM atteinte, les cardiomyocytes en suspension ont été déposés dans des boîtes de culture, recouvertes de laminine (10µg/ml, Millipore, Molsheim, France) et incubés pendant deux heures dans 2 ml de milieu M199 (Invitrogen Corporation, Auckland, Nouvelle Zélande) pour permettre la fixation des cardiomyocytes au fond des boîtes de culture.

Figure 17



Figure 17 : Dissociation des cardiomyocytes adultes selon un modèle de Langendorff à pression constante.

III. Etude de la fonction contractile des cardiomyocytes : validation du modèle de dissociation

III.1 But de la technique

La mesure en continue des variations de la longueur du sarcomère des cardiomyocytes isolés et battants permet d'évaluer la fonction contractile des cellules isolées à l'état de base mais également après adjonction dans le milieu de culture de concentrations croissantes de substances inotropes positives tels que le calcium ($[M] : 10^{-3} ; 2 \cdot 10^{-3} ; 3 \cdot 10^{-3}$) ou l'isoprénaline ($[M] : 10^{-9} ; 10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5}$).

III.2 Dispositif expérimental

Les cardiomyocytes isolés ont été placés dans une chambre thermostatée à 37°C, contenant deux électrodes de platine reliées à un stimulateur Grass S88K (Grass Instruments, Trappes, France) et perfusée avec une solution oxygénée de Krebs ([mM]: NaCl 140 ; KCl 5,4 ; NaH₂PO₄ 0,33 ; MgCl₂ 1 ; HEPES 5 ; Glucose 10 et CaCl₂ 1 avec un pH ajusté à 7,4 à l'aide d'une solution de NaOH 1 N). Les cellules ont été stimulées à 1 Hz. Les mouvements contractiles des cardiomyocytes ont été visualisés à l'aide d'une caméra CCD (Myocam, Ionoptix, Milton, MA, USA) et d'un détecteur de mouvements relié à un ordinateur. Après avoir repéré les différentes stries Z du cardiomyocyte, un logiciel (Ionoptix, Milton, MA, USA) a analysé, grâce à une transformée de Fourier, la longueur moyenne des différents sarcomères sélectionnés au niveau d'une cellule.

La durée d'application de chaque concentration de calcium et d'isoprénaline a été de 300s

III.3 Critères d'inclusion des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes sélectionnés pour cette étude l'ont été selon les critères suivants : une apparence de bâtonnets avec des striations nettes, absence de « bleb » membranaire (figure 18) et pas de contraction spontanée dans un milieu contenant 1 mM de calcium.

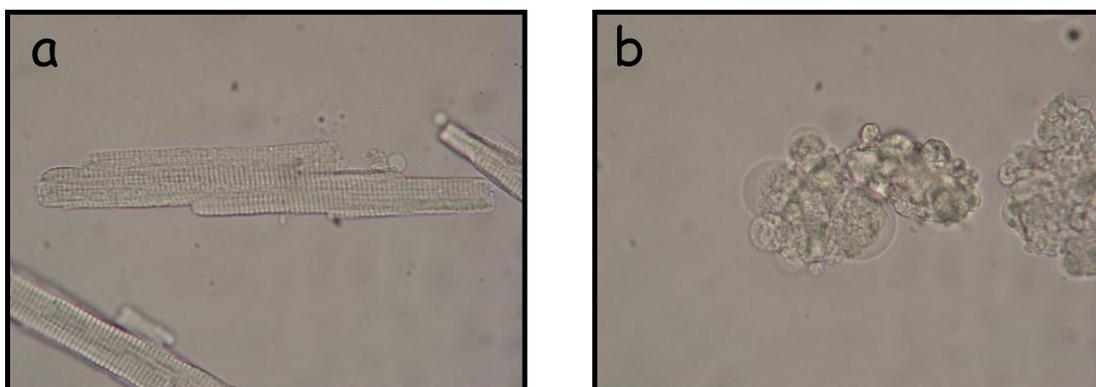


Figure 18

Figure 18 : Critères de sélection des cardiomyocytes

- (a) Cardiomyocyte vivant présentant une forme de bâtonnet avec de nettes striations.
- (b) Forme apoptotique des cardiomyocytes caractérisée par une contraction cellulaire et la présence de nombreux « blebs ».

III.4 Paramètre étudié

Au cours de cette étude, le raccourcissement du sarcomère, utilisé comme indice de contractilité, a été calculé comme la différence entre la longueur maximale du sarcomère lors de sa relaxation et minimale obtenue au cours de sa contraction. Ce raccourcissement a été exprimé en pourcentage par rapport à la longueur maximale du sarcomère (Figure 19).

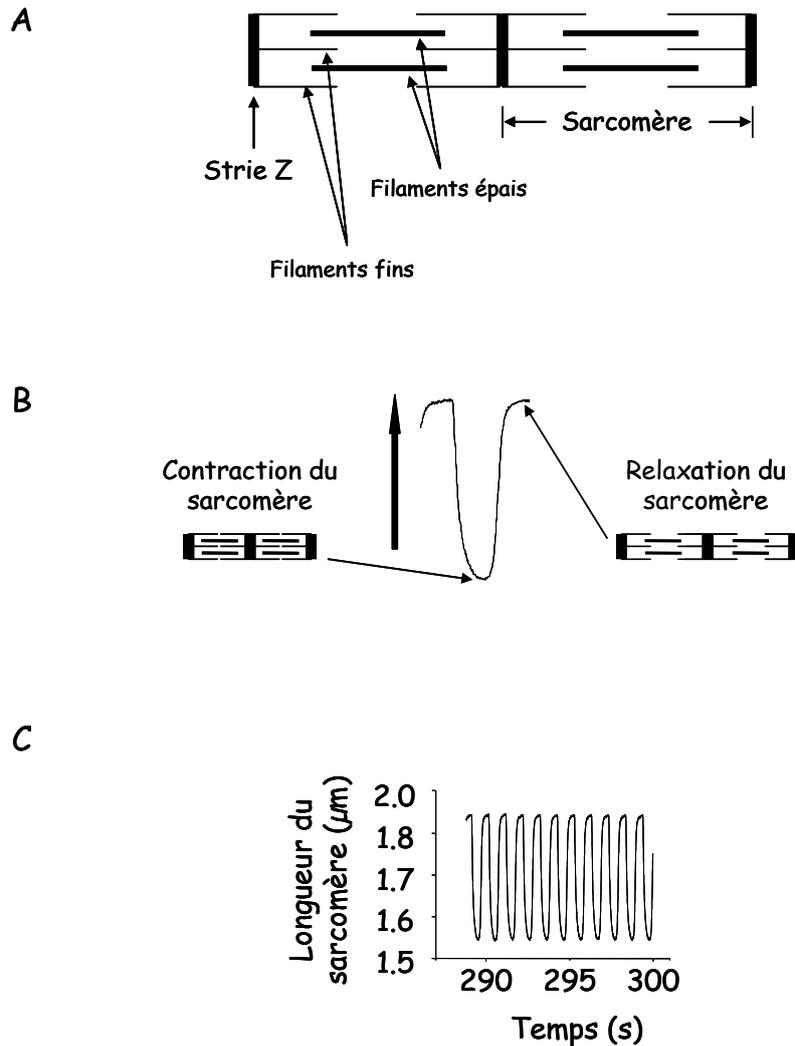


Figure 19

Figure 19 : Mesure de la contractilité des cardiomyocytes isolés

A : Structure du sarcomère d'un cardiomyocyte

B: Schéma de la contraction et du signal obtenu

C: Tracé représentatif obtenu lors de la stimulation d'un cardiomyocyte pendant 300s

IV. Modèle d'hypoxie-réoxygénation des cardiomyocytes de rats adultes.

IV.1 Description du dispositif expérimental

Les cardiomyocytes ont été placés dans un micro-incubateur thermostaté (37°C, Warner Instruments, USA) monté sur la platine d'un microscope inversé à fluorescence (Olympus IX81) associé à une caméra CC12 (figure 20) permettant d'acquérir des images qui ont ensuite été enregistrées grâce à un logiciel d'analyse d'images (Cell M, Olympus, France). Le micro-incubateur possède plusieurs zones d'entrées permettant une arrivée contrôlée des flux gazeux, une perfusion thermostatée (37°C, Warner Instruments, USA) des solutions et une injection de molécules pharmacologiques. Il est également relié à un stimulateur Grass S88K (Grass Instruments, Trappes, France) par l'intermédiaire de deux électrodes de platine assurant la stimulation en continu des cellules. Une fibre optique (Ocean Optics, IDIL Orsay, France) a été utilisée afin de suivre l'évolution du pourcentage d'oxygène du milieu de perfusion à l'intérieur de la chambre.

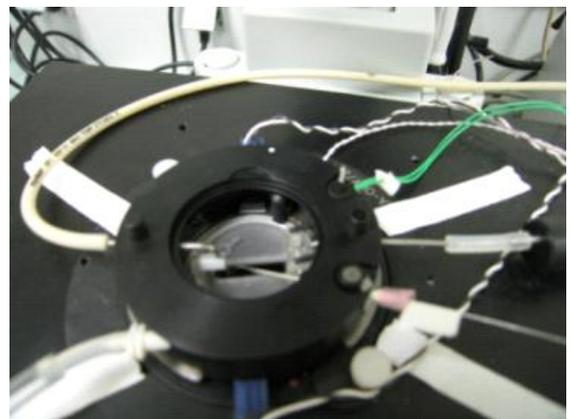


Figure 20

Figure 20 : Dispositif expérimental du modèle hypoxie/réoxygénation

A: Vue d'ensemble

B: micro-incubateur thermostaté et monté sur la platine du microscope à fluorescence

IV.2 L'évaluation de la stabilité du modèle

Les cardiomyocytes ont été placés dans le micro-incubateur dans des conditions dites « normoxiques ». En effet, les cellules ont été soumises à une atmosphère contenant 74% N₂, 21% O₂ et 5% CO₂ et perfusées avec une solution de Tyrode contenant du glucose ([mM] NaCl 130 ; KCl 5 ; HEPES 10 ; MgCl₂ 1 ; CaCl₂ 1,36 ; avec un pH ajusté à 7,46 à l'aide d'une solution de NaOH 1N) et un débit de 0,5ml/min pendant 5 h. Le but de cette étape a été de tester l'effet propre de la chambre sur la viabilité cellulaire et de vérifier qu'elle n'était pas altérée par les conditions « normoxiques ».

IV.3 Mise au point du modèle

Dans une première série d'expériences, le temps d'hypoxie nécessaire pour provoquer l'ouverture du mPTP de toutes les cellules présentes dans le champ du microscope a été déterminé. Les cardiomyocytes ont alors été soumis à des séquences d'hypoxie d'une durée croissante (0,5 à 3h) suivie d'une réoxygénation de 2h. Après une phase de stabilisation de 15 min en conditions de perfusion normoxique, l'hypoxie a été obtenue après arrêt de la pompe de perfusion et en remplaçant le milieu par un milieu hypoxique composé d'une solution du Tyrode préalablement bullée à l'azote et supplémentée en 2-déoxyglucose (10mM, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) et en enrichissant l'atmosphère du micro-incubateur par un flux continu d'azote (100% N₂) pendant toute la période de l'hypoxie. L'hypoxie a été réalisée en stase c.à.d. pompe arrêtée, et durant cette période, des pressions partielles en oxygène de l'ordre de 1% ont été atteintes. La réoxygénation a été induite par la reperfusion des cellules avec le tyrode contenant du glucose et l'azote a été remplacé par une atmosphère correspondant aux conditions normoxiques (74% N₂, 21% O₂ et 5% CO₂).

Faisant l'hypothèse que les modifications des équilibres gazeux dans le milieu cellulaire sont lentes au moment de la réoxygénation contrairement à ce qui se passe *in vivo*, une deuxième série d'expériences, cherchant à optimiser la réoxygénation et à mimer les conditions de la reperfusion *in vivo*, a été menée. Les cellules ont été soumises à des périodes croissantes d'hypoxie (0,5-3h) dans des conditions identiques à celles décrites ci-dessus. En revanche, lors de la réoxygénation, l'azote a été remplacé par un flux correspondant aux conditions normoxiques et le milieu hypoxié a été

remplacé à l'aide d'une pipette directement dans le micro-incubateur par le tyrode supplémenté en glucose et préalablement hyperoxié par 10min de bullage à l'oxygène (95% O₂). La reperfusion des cellules par le tyrode a été induite par remise en route de la pompe en conditions normoxiques.

IV.4 Mesure du temps d'ouverture du mPTP

L'évaluation directe de l'ouverture du mPTP sur les cardiomyocytes isolés de rats adultes a été réalisée grâce au suivi de la fluorescence émise par l'acétoxyméthylester de calcéine (calcéine AM, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) lorsqu'il est piégé par le chlorure de cobalt (CoCl₂, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) (Petronilli *et al.*, 1999). Lorsque les cardiomyocytes ont adhéré au fond des boîtes de Pétri, ils ont été incubés avec la calcéine AM (1μM) dans le milieu M199. La calcéine AM diffuse dans l'ensemble de la cellule, pénétrant dans tous les organites et notamment dans les mitochondries. Après 20min d'incubation, du CoCl₂ (1mM) a été ajouté aux cellules. Le CoCl₂ piège la fluorescence de la calcéine dans toute la cellule excepté dans les mitochondries qui y sont imperméables. Cette procédure de chargement entraîne la localisation mitochondriale de la fluorescence de la calcéine (Petronilli *et al.*, 2001, 1999). Les cellules ont ensuite été lavées pour éliminer la calcéine et le CoCl₂ en excès et ont été incubées dans le tampon Tyrode supplémenté en glucose afin d'entamer les expériences d'H/R. Il est à noter qu'au moment de l'ouverture du mPTP, le CoCl₂ pénètre dans et/ou la calcéine sort de la mitochondrie, piégeant ainsi la fluorescence émise par la calcéine.

IV.5 Quantification de la mortalité cellulaire

Afin d'évaluer la mort cellulaire, les cellules ont été incubées avec de l'iodure de propidium (PI, 2,5μM, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) simultanément avec la calcéine. Le PI est un colorant fluorescent non perméant qui ne peut pénétrer que les membranes des cellules mortes et s'intercaler dans l'ADN nucléaire (Lemasters *et al.*, 1987). La viabilité des cardiomyocytes est donc corrélée négativement à l'intensité de la fluorescence émise. De manière à pouvoir suivre l'évolution

de la mortalité au cours des différentes étapes de nos travaux, le PI a aussi été ajouté aux milieux d'hypoxie et de réoxygénation.

IV.6 Evaluation de la production des espèces réactives d'oxygène (EROs)

La production intracellulaire des EROs a été évaluée en analysant les changements de la fluorescence émise par deux sondes fluorescentes intracellulaires, le dihydroéthidium (DHE, 5 μ M ; Molecular Probes, Invitrogen corporation, Cergy Pontoise, France) et le 2',7'- dichlorofluorescine diacétate (DCFH-DA, 5 μ M, Molecular Probes, Invitrogen corporation, Cergy Pontoise, France). Les cardiomyocytes ont été perfusés pendant les 15min de la phase de stabilisation avec une solution du Tyrode supplémentée en glucose et contenant le DHE ou le DCFH-DA afin de charger les cellules avec les fluorochromes.

Le DHE diffuse facilement à travers la membrane cellulaire et peut être directement oxydé par les EROs notamment par l' $O^{\bullet-}_2$ (Vanden Hoek *et al.*, 1997) pour produire un composé fluorescent rouge, l'éthidium (Eth) qui s'intercale dans la chaîne d'ADN nucléaire (Eth-DNA), ce qui amplifie sa fluorescence (Laurindo *et al.*, 2008 ; Benov *et al.*, 1998).

Le DCFH-DA pénètre dans les cellules où les estérases clivent le groupe acétate, piégeant la sonde réduite (DCFH) dans les cellules. Ce dernier est facilement oxydé par les EROs (plus particulièrement par H_2O_2 et $\cdot OH$) (Possel *et al.*, 1997 ; Vanden Hoek *et al.*, 1997) produisant le composé fluorescent vert, la dichlorofluorescéine (DCF) (Sawada *et al.*, 1996).

De manière à pouvoir suivre l'évolution de la production des EROs au cours des différentes étapes de nos travaux, le DHE et le DCFH-DA ont aussi été ajoutés aux milieux d'hypoxie et de réoxygénation.

IV.7 Acquisition des images

Le micro-incubateur a été monté sur une platine du microscope à fluorescence inversé, motorisé (Olympus IX 81) et équipé d'une lampe à mercure comme source de lumière, d'une roue de filtres motorisée et des filtres d'excitation et d'émission appropriés.

Pour détecter la fluorescence de la calcéine, des filtres de 460 à 490 nm ont été utilisés pour exciter la sonde et de 510nm pour détecter son émission. Ainsi la fluorescence émise par la calcéine est détectée dans le spectre vert. La fluorescence du PI a été détectée à 580nm dans le spectre rouge après une excitation à 520 à 550nm. Pour détecter les EROs, la fluorescence émise par l'Eth-DNA a été enregistrée à 605nm dans le spectre rouge après une excitation à 545nm alors que la fluorescence émise par le DCF a été détectée 520nm dans le spectre vert après une excitation à 495nm.

Pour des raisons techniques liées à la couleur des sondes et à leur spectre d'émission, seules les associations suivantes de fluorochromes ont pu être réalisées : calcéine et PI ou calcéine et DHE ou PI et DCFH-DA.

Les images ont été acquises à l'aide de la caméra 12-bit (Hamamatsu, ville de Hamamatsu, Japon) refroidie et contrôlée par un ordinateur. Dans certaines expériences, les images ont été acquises toutes les minutes pendant les périodes de l'hypoxie et de la réoxygénation. Pour toutes les autres expériences, les images ont été obtenues toutes les 15 min au cours des premières 135 min de l'expérience, *i.e.*, du début jusqu'à la fin de l'hypoxie. Au cours de la période de réoxygénation, les images ont été enregistrées toutes les 5 min jusqu'à la fin du protocole pour le Eth-DNA tandis que pour le DCF, les images ont été prises chaque minute pendant les 5 premières minutes et ensuite toutes les 5 min pour la durée restante de l'expérience.

IV.8 Analyse des résultats et expressions des données

Les données ont été obtenues et analysées à l'aide du logiciel Cell-M (Olympus, Rungis, France). La fluorescence a été intégrée sur une surface d'intérêt d'environ $80\mu\text{m}^2$ pour chaque cardiomyocyte (environ 40 cardiomyocytes par champ, figure 21) et la fluorescence du fond (bruit de fond) correspond à la même surface d'intérêt sur une zone sans cellule. La valeur de la fluorescence finale

pour chaque cellule à un temps donné (t) a été obtenue après soustraction de la valeur du fond de la valeur initiale de la fluorescence de la cellule. Ainsi, une courbe de la variation de la fluorescence en fonction du temps a pu être obtenue pour chaque cardiomyocyte. Afin de déterminer la fluorescence globale par expérience, nous avons effectué une moyenne de l'ensemble des courbes obtenues pour les cardiomyocytes d'un même champ (environ 40 cardiomyocytes). Les résultats finaux ont été exprimés comme la moyenne de 3 à 6 expériences.

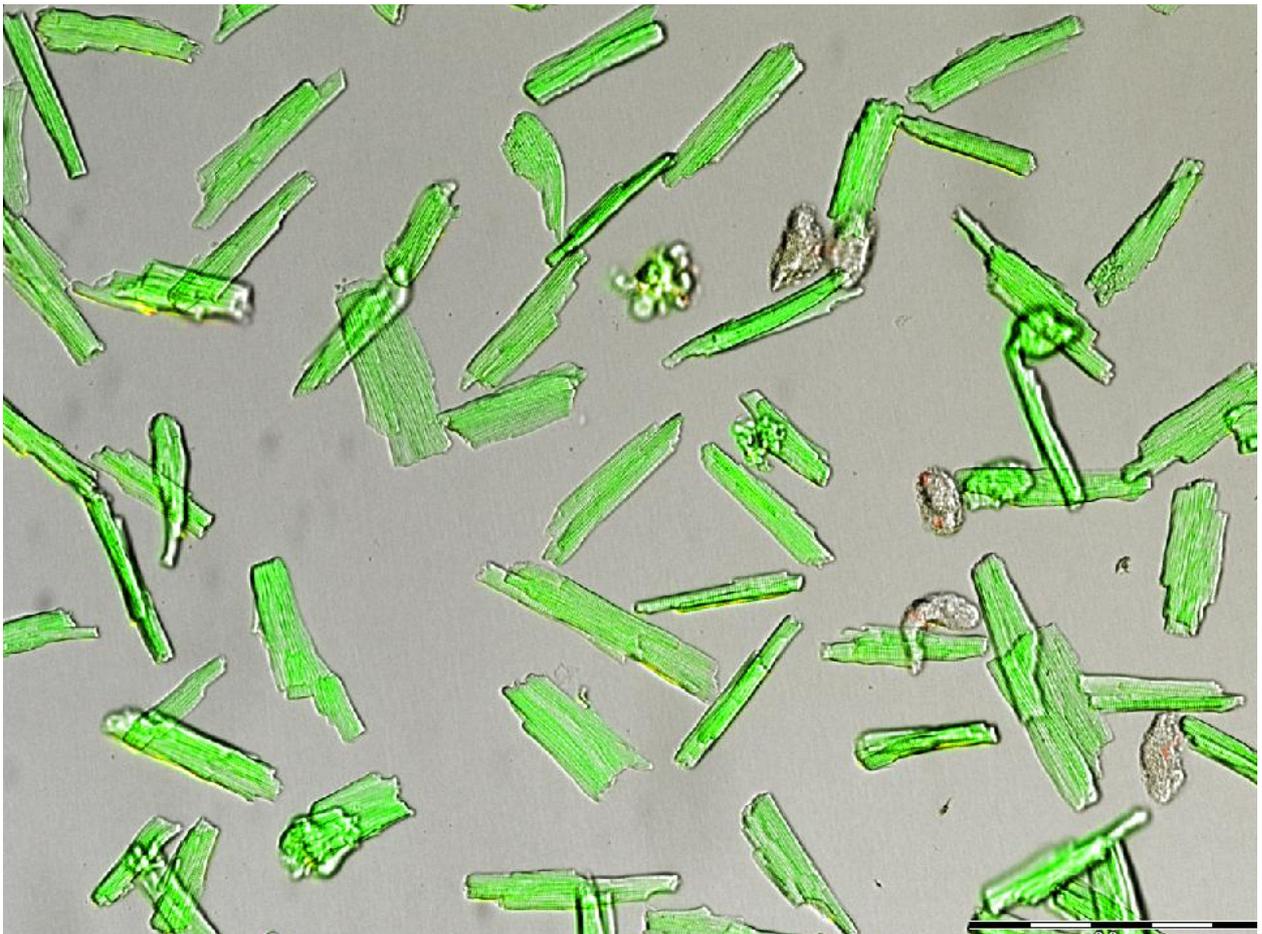


Figure 21

Figure 21 : Exemple d'un champ de cardiomyocytes chargés en calcéine, chlorure de cobalt et iodure de propidium.

Pour chaque expérience réalisée avec la calcéine, les valeurs d'intensité obtenues pour chaque cellule ont été normalisées par rapport à la valeur de la fluorescence de la cellule à $t=0$ et ensuite représentées comme le pourcentage des valeurs de la fluorescence à $t=0$ après soustraction du bruit de fond. Des courbes de décroissance de l'intensité de la fluorescence de la calcéine au cours du temps matérialisant l'ouverture du mPTP ont ainsi été obtenues. A partir de ces courbes, nous avons calculé le temps 50 moyen d'ouverture du mPTP ($T_{50\text{mPTP}}$) par cellule en mesurant le temps de réoxygénation nécessaire afin d'atteindre une diminution de 50 % de l'intensité de fluorescence de la calcéine (figure 22). La courbe globale par expérience a ensuite été calculée en moyennant les courbes obtenues pour l'ensemble des cellules d'un même champ. Une moyenne similaire a été réalisée pour calculer le $T_{50\text{mPTP}}$ par expérience. Les résultats finaux ont été exprimés comme la moyenne de 3 à 6 expériences.

Dans chaque expérience utilisant le PI, les valeurs d'intensité obtenues pour chaque cellule ont été normalisées par rapport à la valeur de fluorescence de la cellule obtenue à $t=0$ et ensuite représentées en pourcentage ; le 100% de mortalité ayant été caractérisée par addition de Triton (10%) à la fin de chaque expérience. Des courbes présentant l'augmentation de la fluorescence du PI au cours du temps ont ainsi pu être tracées pour chaque cellule. A partir de ces courbes, le temps 50 moyen de mortalité cellulaire ($T_{50\text{PI}}$) correspondant à une augmentation de 50% de la fluorescence a été calculé (figure 22). Les résultats finaux ont été exprimés comme la moyenne de 3 à 6 expériences soit la fluorescence moyenne émise par au moins 150 cellules.

Dans les expériences utilisant l'Eth-DNA et le DCF, les valeurs d'intensité de fluorescence de chaque cellule ont été normalisées en fonction de la valeur initiale de la fluorescence émise par la cellule à $t=0$ et ensuite représentées en unités arbitraires ou en pourcentage de la valeur moyenne maximale atteinte au cours des expériences témoins. Les résultats finaux ont été exprimés comme la moyenne de 3 à 6 expériences soit la fluorescence moyenne émise par au moins 150 cellules.

Figure 22

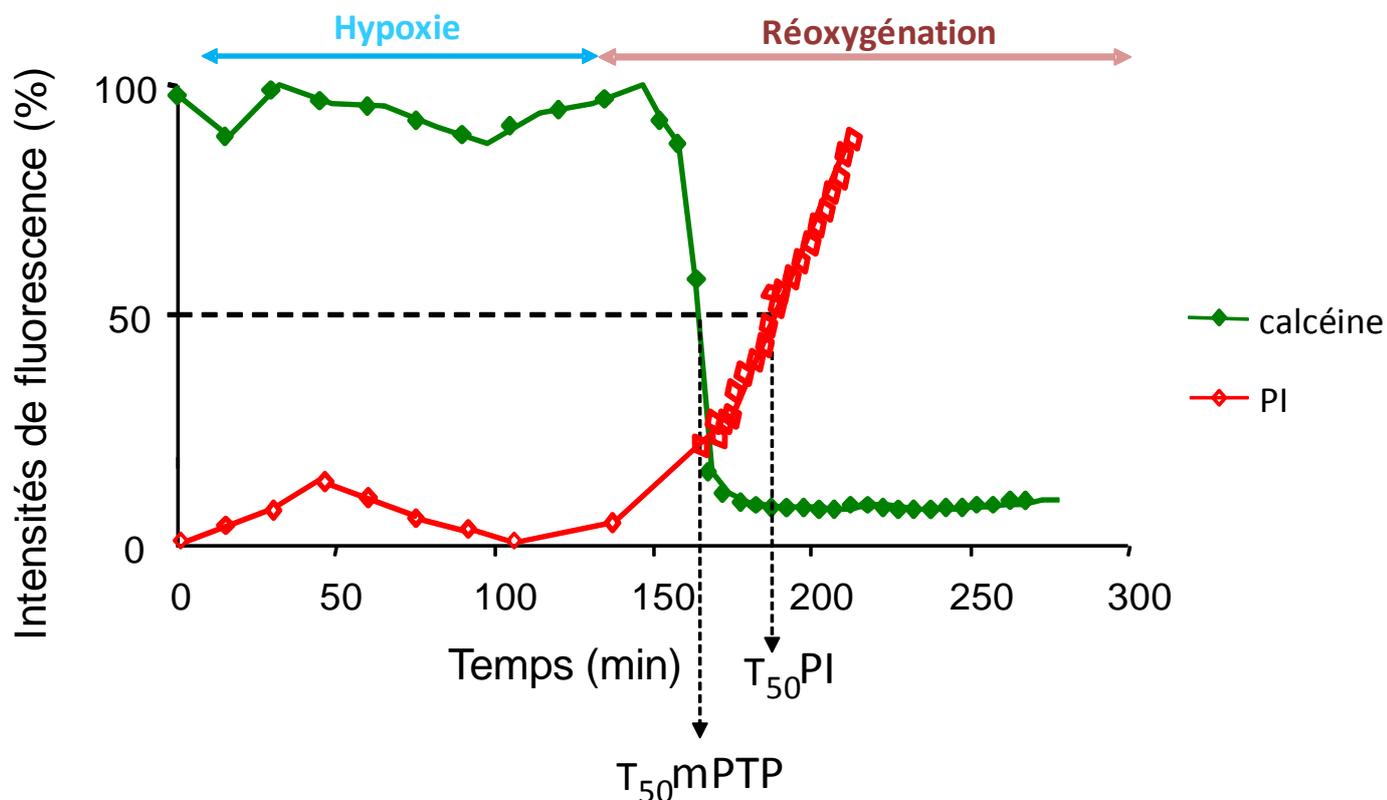


Figure 22 : Présentation des résultats évaluant l'ouverture du mPTP et la mortalité cellulaire par microscopie de fluorescence.

Nous avons calculé le temps 50 moyen d'ouverture du mPTP ($T_{50}mPTP$) par cellule en mesurant le temps de réoxygénation nécessaire afin d'atteindre une diminution de 50 % de l'intensité de fluorescence de la calcéine et le temps 50 moyen de mortalité cellulaire ($T_{50}PI$) correspondant à une augmentation de 50% de la fluorescence de l'iodure de propidium (PI).

IV.9 Validation du modèle d'hypoxie-réoxygénation : étude de l'effet cardioprotecteur de la cyclosporine A.

Pour valider notre modèle, nous avons choisi la CsA car (1) c'est l'inhibiteur le plus sélectif de l'ouverture du mPTP décrit à ce jour et (2) que cet effet s'accompagne de propriétés cardioprotectrices clairement démontrées (Sharov *et al.*, 2007 ; Piot *et al.*, 2008). Les cardiomyocytes isolés ont été soumis à 2h d'hypoxie suivie d'une réoxygénation en absence (groupe témoin) et en présence de 1 μ M de CsA. Le traitement a débuté 15 min avant le début de la réoxygénation et s'est achevé 10 min après le début de la réoxygénation (figure 23).

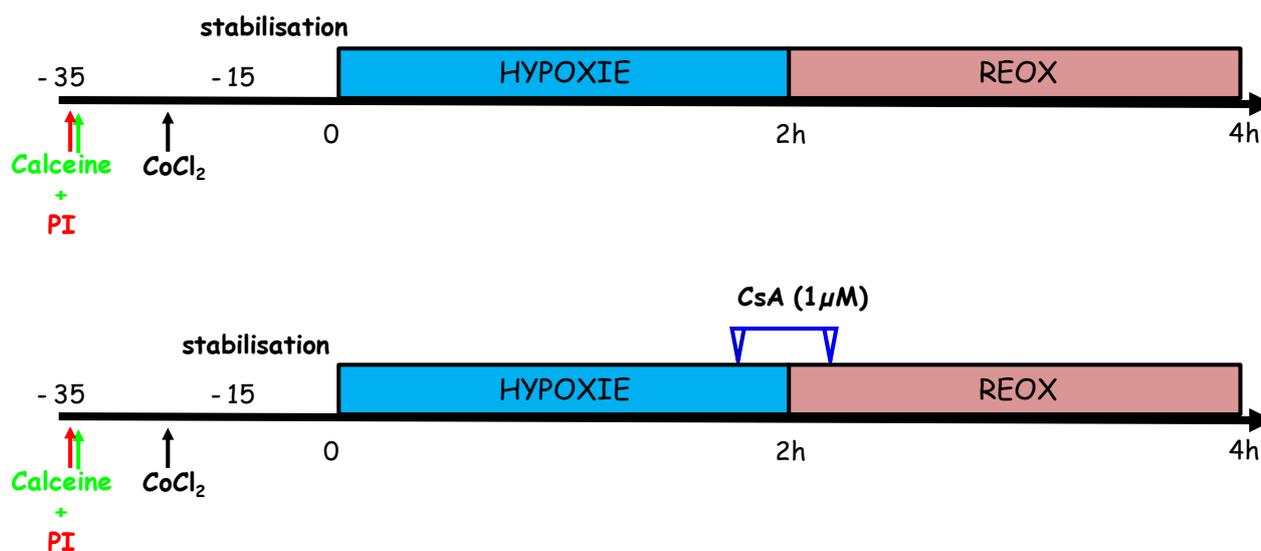


Figure 23

Figure 23 : Protocole d'administration de la CsA 1 μ M

REOX, reoxygénation; CsA, cyclosporine A, PI, iodure de propidium

IV.10 Etude de l'effet de TRO 40303 sur le modèle d'hypoxie/réoxygénation

Nous avons étudié l'effet du TRO40303, un ligand du TSPO, sur l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire de cardiomyocytes de rats adultes soumis à une H/R. Le TRO40303 a été ajouté à une concentration de 3 μ M selon le même protocole que la CsA.

IV.11 Etude de l'effet de morphine sur le modèle d'hypoxie/réoxygénation

Nous avons étudié l'effet d'un agoniste des récepteurs opioïdes, la morphine (2 μ M) ; connue pour activer la voie RISK et inhiber l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire sur des cardiomyocytes de rats adultes soumis à une H/R. L'implication de la voie RISK dans l'effet de la morphine sur le mPTP a été montrée par l'utilisation d'un inhibiteur de la PI₃K, la wortmanine (1 μ M) et d'un inhibiteur direct de la GSK-3 β kinase, le SB21676 (1 μ M). La morphine en présence ou en absence de l'un des inhibiteurs a été administrée avant le début de l'hypoxie.

V. Etude du rôle des espèces réactives d'oxygène (EROs) sur l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire

Au cours de cette étude, l'effet d'un cocktail d'antioxydants composé de 1, 10-phénanthroline (PHEN) et de 2-mercaptopropionyl glycine (2-MPG, 400 μ M) a été utilisé afin d'inhiber les EROs produites par le stress oxydant dans le modèle d'H/R. Le 2-MPG, un analogue synthétique du glutathion a été principalement décrit comme un piègeur d'H₂O₂ (Horwitz *et al.*, 1994 ; Bolli *et al.*, 1988). La PHEN séquestre le fer ferreux le rendant indisponible pour la formation d' \cdot OH par la réaction de Fenton (Thomas *et al.*, 2009).

Trois protocoles utilisant le cocktail d'antioxydants ont été testés (figure 24) :

Protocole 1 : les antioxydants sont présents pendant toute la durée de l'expérience (hypoxie et réoxygénation)

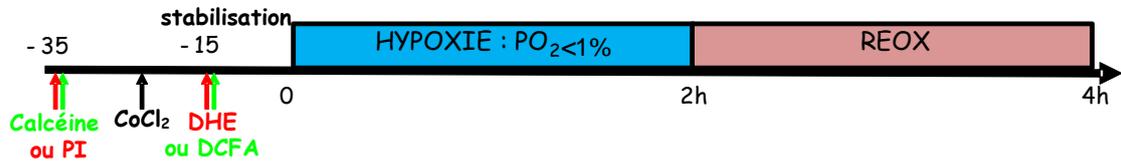
Protocole 2 : les antioxydants sont présents pendant la période de l'hypoxie

Protocole 3 : les antioxydants ont été ajoutés 15 min avant le début de la réoxygénation et l'administration a été stoppée 10 min après le début de la réoxygénation

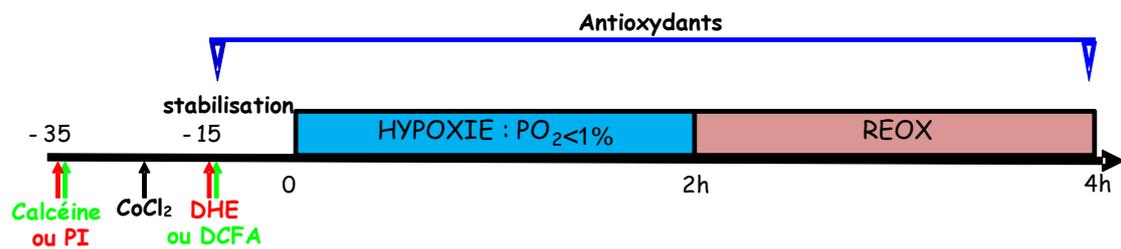
Des expériences ont également été réalisées en absence de tout traitement, constituant les groupes témoins.

Figure 24

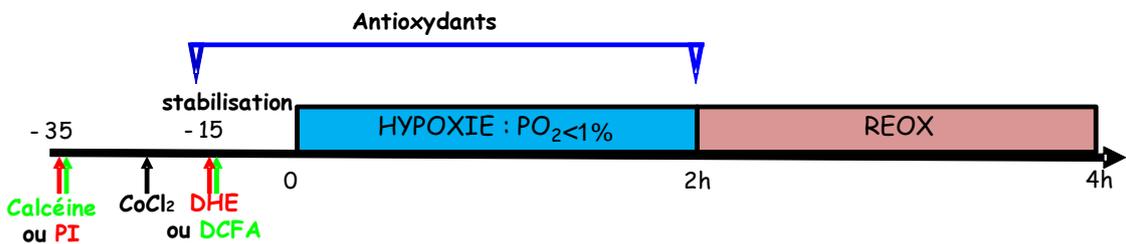
A: Groupe témoin



B: Antioxydants selon protocole 1



C: Antioxydants selon protocole 2



D: Antioxydants selon protocole 3

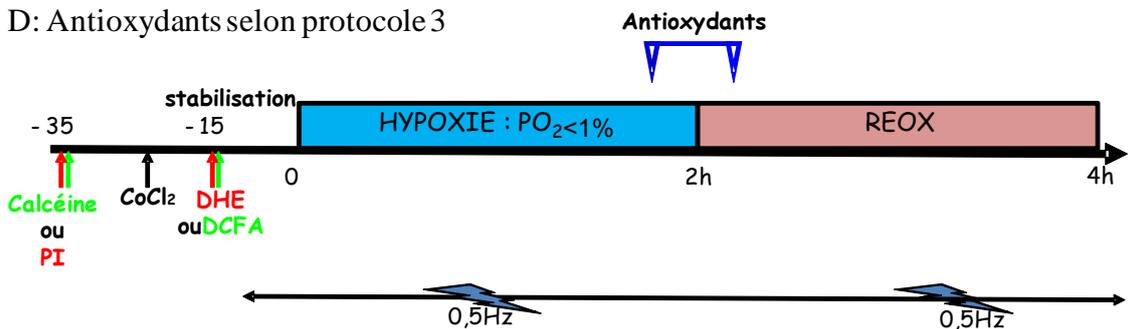


Figure 24 : Les différents protocoles d'administration du cocktail antioxydants

REOX, réoxygénation; PI, iodure de propidium; DHE, dihydroéthidium; DCFA, 2',7'-dichlorofluoresceine

VI. Etude des effets de la cyclosporine A sur la production des espèces réactives d'oxygène (EROs)

La production des EROs au cours de l'H/R a été aussi évaluée en absence (groupe témoin) et en présence de la CsA qui a été ajoutée de la même façon que pour les expériences de validation du modèle.

VII. Analyses statistique des résultats

Les valeurs ont été exprimées en moyenne \pm s.e.m.

Dans les expériences réalisées sur le modèle d'H/R, l'analyse statistique des données a été effectuée grâce à une ANOVA à deux facteurs pour comparer les profils d'intensité de fluorescence et grâce à une ANOVA à un facteur pour comparer les T_{50mPTP} et T_{50PI} . Dans tous les cas, l'analyse a été suivie par un test de Student. Le seuil de significativité a été fixé pour un $p < 0,05$.

Résultat 1 : Rôle de la production des espèces réactives de l'oxygène dans l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire

Ce travail a fait l'objet d'un manuscrit actuellement soumis à European Journal of Pharmacology

Rana Assaly, Alexandra d'Anglemont de Tassigny, Stephanie Paradis, Sophie Jacquin, Alain Berdeaux and Didier Morin : Oxidative stress, mitochondrial permeability transition pore opening and cell death during hypoxia/reoxygenation in adult cardiomyocytes

I. Objectifs de l'étude:

Il est maintenant bien établi que la production des espèces EROs et l'ouverture du mPTP jouent un rôle clé dans la mort des cardiomyocytes au cours d'une I/R. Cependant, il existe peu d'informations détaillant la chronologie des 2 événements et la nature des EROs qui sont impliqués. Dans la première étude de cette thèse nous avons donc mis au point un modèle *in vitro* d'H/R sur cardiomyocytes fraîchement isolés de cœur de rats adultes afin :

- d'évaluer en temps réel l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire
- d'établir une relation entre la production des EROs, l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire
- de déterminer les rôles respectifs des différents types d'EROs ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ et H_2O_2) sur l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire

II. Protocole expérimental :

II.1 Mise au point et validation du modèle d'H/R

Les expériences ont été réalisées sur des cardiomyocytes fraîchement isolés à partir de cœur de rats Wistar adultes en utilisant des enzymes digestives comme décrit dans la 2ème partie de cette thèse (Matériels et Méthodes).

Ces cellules ont été chargées par plusieurs marqueurs fluorescents : la calcéine (1 μ M) et le CoCl₂ (1mM) pour l'évaluation de l'ouverture du mPTP et l'iodure du Propidium (PI, 2,5 μ M), un marqueur de la mort cellulaire.

Après le chargement avec la calcéine, le CoCl₂ et le PI, les cellules étaient soumises à plusieurs temps d'hypoxie suivie d'une réoxygénation afin de déterminer le temps d'hypoxie optimal pour induire l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire.

Pour valider le modèle d'H/R, nous avons utilisé la CsA (1 μ M), un inhibiteur sélectif de l'ouverture du mPTP. Elle a été administrée 15 min avant la fin de l'hypoxie et perfusée pendant les 10 premières min de la réoxygénation.

II.2 Etude de la relation entre les EROs, l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire

Dans cette étude, nous avons utilisé Le dihydroethidium (DHE, 5 μ M) pour détecter la production des anions superoxydes (O⁻²) et le 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA, 5 μ M) pour détecter la production du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de l'anion hydroxyle ([•]OH).

Les cardiomyocytes étaient chargés soit avec de la calcéine, du CoCl₂ et du DHE soit avec du PI et du DCFH-DA puis soumis à une H/R en présence ou en absence d'un cocktail antioxydant constitué d'un mélange de 2-Mercaptopropionylglycine (2-MPG, 400 μ M), un piègeur de H₂O₂, et de Phénanthroline (PHEN 10 μ M), un piègeur de fer, comme inhibiteurs directs des EROs.

Ce cocktail a été introduit selon 3 protocoles :(i) tout le long de l'expérience, (ii) pendant l'hypoxie, (iii) 15 min avant la fin de l'hypoxie et pendant les premières 10min de la réoxygénation.

II.3 Etude de l'effet de la CsA sur la production des EROs

Selon un protocole identique au précédent, les cardiomyocytes étaient chargés soit avec de la calcéine, du CoCl₂ et du DHE, soit du PI et du DCFH-DA. Ces cardiomyocytes ont ensuite été soumis à une H/R en présence ou absence de la CsA (1μM) qui a été ajoutée 15 min avant la fin de l'hypoxie et perfusée pendant les 10 premières min de la réoxygénation.

III. Résultats :

III.1 Validation du modèle de dissociation de cardiomyocytes de rats adultes : étude de la fonction contractile

Dans le cadre de la validation du modèle de dissociation des cardiomyocytes de rats adultes, nous avons évalué la contractilité des cardiomyocytes fraîchement isolés, afin de vérifier l'intégrité fonctionnelle de ces cellules. Comme l'illustre la figure 25 l'isoprénaline a engendré une augmentation concentration-dépendante et statistiquement significative du raccourcissement du sarcomère des cardiomyocytes de rats adultes (n= 6 pour chaque concentration).

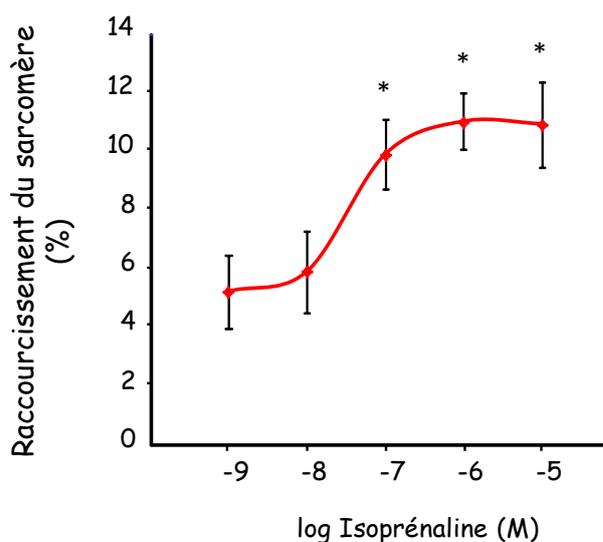


Figure 25 : Etude de la fonction contractile

Effet concentration-dépendant de l'isoprénaline (n=6) sur le raccourcissement de la longueur du sarcomère des cardiomyocytes isolés de rats adultes.

*: $p < 0.05$ vs. Isoprénaline 10^{-9} M

Figure 25

III.2 Mise au point et validation du modèle

Le pourcentage de cardiomyocytes dont le mPTP s'est ouvert au cours de la réoxygénation dépendait de la durée de l'hypoxie (12, 90, 98 et 100 % respectivement avec 0,5, 1, 2 et 3 h, respectivement). Nous avons choisi d'utiliser 2h d'hypoxie suivies de 2h de réoxygénation pour l'ensemble de nos expériences.

Grâce à l'étude simultanée des cinétiques d'ouverture du mPTP et de la mortalité cellulaire nous avons montré que l'ouverture du mPTP précédait la mort des cardiomyocytes dans notre modèle.

La CsA retardait le temps de l'ouverture du mPTP suite à l'H/R (de $30,62 \pm 0,06$ à $64,80 \pm 1,36$ min respectivement en absence et en présence de CsA; $p < 0,05$ vs. contrôle). De même, la CsA réduisait la mort cellulaire.

III.3 Relation entre la production des EROs, l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire

Les antioxydants retardaient le temps d'ouverture du mPTP lorsqu'ils étaient mis tout le long de l'expérience (de $30,62 \pm 0,06$ à $71,64 \pm 3,44$ min respectivement en absence et en présence de CsA ; $p < 0,05$ vs. contrôle) ou lorsqu'ils étaient présents pendant l'hypoxie (de $30,62 \pm 0,06$ à $75,53 \pm 2,16$ min respectivement en absence et en présence de CsA; $p < 0,05$ vs. contrôle). En revanche, ces antioxydants n'ont pas eu d'effet sur l'ouverture du mPTP lorsqu'ils étaient introduits juste avant la réoxygénation. Le retard du temps d'ouverture du mPTP était couplé à une réduction de la mort cellulaire.

L'inhibition de l'ouverture du mPTP et la réduction de la mort cellulaire étaient associées à une baisse de la production des EROs, et plus particulièrement H_2O_2 et $\cdot OH$ au cours de l'hypoxie et les premières minutes de la réoxygénation. L'amélioration de la viabilité cellulaire était reflétée par une production d' $O_2^{\cdot -}$ pendant la période de réoxygénation qui était comparable à celle obtenue dans les conditions normoxiques.

III.4 Effet de la CsA sur la production de ROS

La CsA a montré un effet protecteur malgré une production inchangée d' H_2O_2 et d' OH^\bullet pendant l'hypoxie. De la même manière qu'avec les antioxydants, l'amélioration de la viabilité cellulaire due au traitement par la CsA s'est accompagnée d'une production d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ pendant la réoxygénation.

IV. Conclusions :

S'il est bien connu que les EROs produites au début de la reperfusion contribuent fortement aux lésions d'I/R, nous avons montré dans cette étude que :

- ✓ l'ouverture du mPTP suite à l'H/R précédait la mort cellulaire
- ✓ la production des EROs précédait l'ouverture du mPTP suite à l'H/R et un seuil de production d'EROs, plus spécifiquement d' H_2O_2 et d' OH^\bullet , au cours de l'hypoxie était nécessaire pour induire l'ouverture du mPTP
- ✓ la CsA exerçait son effet protecteur en agissant directement sur le mPTP, indépendamment d'une diminution de la production d'EROs.

Résultat 2 : Etude de l'effet de TRO 40303, un ligand du TSPO, sur le mPTP.

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

Sophie Schaller*, Stéphanie Paradis*, Gladys A.Nogh*, Rana Assaly, Bruno Buisson, Cyrille Drouot, Mariano A. Ostuni, Jean-Jacques Lacapere, Firas Bassissi, Thierry Bordet, Alain Berdeaux, Steven P. Jones, Didier Morin and Rebecca M.Pruss : TRO40303, a New Cardioprotective Compound, Inhibits Mitochondrial Permeability Transition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333:696-706, 2010.

I. Objectif de l'étude:

Dans cette étude nous avons étudié l'effet sur le mPTP d'un nouveau ligand du TSPO, le TRO40303 sur des modèles *in vitro* et *in vivo*. Après avoir confirmé la liaison de la molécule sur le TSPO et la présence du récepteur au niveau du cœur, nous avons examiné :

- l'effet du TRO40303 sur la taille de l'infarctus
- l'effet du TRO40303 sur les mitochondries isolées en étudiant leur fonction respiratoire, la résistance à l'ouverture du mPTP provoquée par une surcharge calcique et les protéines mitochondriales comme le cytochrome c et l'apoptosis-inducing factor (AIF).
- l'effet du TRO40303 sur l'ouverture du mPTP et la mort des cardiomyocytes soumis à une H/R.

Par ailleurs des collaborateurs de l'équipe de Jones (Louisville, Kentucky, USA), ont étudié l'effet du TRO40303 sur le stress oxydant associé aux lésions de l'I/R.

II. Matériels et Méthodes :

Pour atteindre ces objectifs, nous avons réalisé des expériences *in-vivo* et *in-vitro*, selon les protocoles suivants :

II.1 Protocole *in-vivo* :

Dans un modèle d'I/R sur rats adultes, le TRO40303 à des doses croissantes (0,5, 1,25 et 2,5mg/kg), a été administré 10 min avant la reperfusion suite à une ischémie de 30 min. Le temps de reperfusion était de 24 h pour l'étude de la taille d'infarctus, de 1 h pour les dosages des protéines mitochondriales à partir des fractions cytosoliques du tissu cardiaque de la zone à risque et de 10 min pour les expériences étudiant l'ouverture du mPTP provoquée par une surcharge calcique des mitochondries isolées à partir des prélèvements cardiaque correspondant à l'aire à risque.

II.2 Protocole *in-vitro* :

Les cardiomyocytes fraîchement isolés de rats adultes ont été chargés en calcéine AM (1 μ M) et CoCl₂ (1mM) pour suivre l'ouverture du mPTP, et le PI (2,5 μ M) un marqueur de la mort cellulaire. Ces cardiomyocytes ont été soumis à une H/R en présence ou en absence de TRO40303. Ce dernier a été administré à une concentration de 3 μ M ; la perfusion a débuté 15 min avant la réoxygénation et s'est achevée 10 minutes après le début de la réoxygénation. La CsA (1 μ M) a été employée comme témoin positif selon le même protocole que celui utilisé avec le TRO40303. L'ouverture du mPTP a été évaluée grâce au suivi de la fluorescence émise par la calcéine et du calcul du T₅₀ mPTP et la mort cellulaire par la fluorescence émise par le PI.

III. Résultats obtenus

III.1 Effet du TRO40303 sur la taille de l'infarctus

Contrairement aux doses de 0,5 et 1,25 mg/kg, le TRO40303 à une dose de 2,5mg/kg réduisait de 38% la taille de l'infarctus par rapport à un cœur ischémié-reperfusé non traité. Aucune variation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle moyenne n'a été observée au cours de l'expérience.

III.2 Effet du TRO40303 sur les mitochondries

Dans un modèle de mitochondries isolées de cœurs de rats ischémiés-reperfusés, l'administration du TRO40303 10 min avant la reperfusion n'a pas amélioré la résistance à l'ouverture du mPTP provoquée par une surcharge calcique sur des mitochondries isolées 10 min après la reperfusion. Sur ces mêmes rats, le traitement avec TRO40303 (2,5mg/kg) a diminué la libération d'AIF alors que la libération de cytochrome c restait inchangée.

III.3 Effet du TRO40303 sur l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire des cardiomyocytes soumis à une hypoxie/réoxygénation.

Le TRO40303 (3 μ M) retardait le temps d'ouverture du mPTP (T_{50mPTP} de 34,5 \pm 4,3 à 69,3 \pm 9,4 min respectivement en absence et en présence de TRO40303 ; $p<0,05$) ainsi que la mort cellulaire des cardiomyocytes de rats adultes soumis à une H/R. Ces effets étaient comparables à ceux obtenus en présence de CsA 1 μ M utilisée dans les mêmes conditions.

IV. Conclusions

L'ensemble des résultats de cette étude nous ont permis de montrer que le TRO 40303 possédait un effet cardioprotecteur ; les études *in vitro* ont lié cet effet à une inhibition de l'ouverture du mPTP à la reperfusion.

Par ailleurs, l'étude réalisée par l'équipe de Jones, a démontré que l'effet de TRO40303 diminue la production des espèces réactives d'oxygène sur des cardiomyocytes soumis à un stress oxydant induit par H₂O₂.

Résultats 3: Effet de la morphine et d'un inhibiteur de la GSK-3 β sur le mPTP

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante

Fatou Nsoure Obame*, Catherine Plin-Mercier*, Rana Assaly, Roland Zini, Jean Luc Dubois-Randé, Alain Berdeaux, and Didier Morin : Cardioprotective Effect of Morphine and a Blocker of Glycogen Synthase Kinase 3 β , SB216763 [(3-2,4-Dichlorophenyl)-4(1-methyl-1*H*-indol-3yl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione], via Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326:252-258, 2008.

I. Objectif de l'étude:

Dans l'étude précédente, nous avons montré que l'effet cardioprotecteur d'un ligand du TSPO passe par un effet direct sur les mitochondries en modulant la perméabilité membranaire mitochondriale. L'objectif de ce travail était de montrer que l'effet protecteur médié via la stimulation de la voie de protection endogène RISK était également associé à une limitation de la perméabilité membranaire et plus particulièrement à l'inhibition de l'ouverture du mPTP.

II. Matériels et Méthodes :

II.1 Substances utilisées :

Nous avons utilisé un agoniste des récepteurs opioïdes, la morphine, connue pour activer la voie RISK et le SB216763 un inhibiteur direct de la GSK-3 β kinase de la voie RISK.

II.2 Protocoles utilisés

Afin d'atteindre notre objectif, nous avons réalisé des expériences *in-vivo* et *in-vitro*.

Protocole *in-vivo* :

Dans un modèle de rats adultes soumis à 35 min d'ischémie myocardique puis reperfusés, la morphine (0,3mg/kg) et le SB21673 (0,6mg/kg) ont été administrés 5 min avant le début de la reperfusion. Le temps de reperfusion était de 24h pour l'évaluation de la taille d'infarctus et de la lipopéroxydation et de 15 min pour les expériences analysant les fonctions mitochondriales réalisées sur des organites isolés à partir des prélèvements cardiaques issus de l'aire à risque.

Protocole *in-vitro* :

Les cardiomyocytes fraîchement isolés de rats adultes ont été prétraités 15 min soit par la morphine (2 μ M), soit par du SB216763 (3 μ M), soit par l'association morphine (2 μ M) - wortmanine (0,1 μ M) puis soumis à une H/R. L'ouverture du mPTP a été évaluée par la mesure de la fluorescence émise par la calcéïne et la mort cellulaire a été suivie par la fluorescence émise par le PI.

III. Résultats obtenus

III.1 Effet de la morphine et du SB216763 sur la taille de l'infarctus, les fonctions mitochondriales et la lipoperoxydation

La morphine et le SB216763 réduisaient significativement la taille de l'infarctus (13 \pm 2 et 14 \pm 3% respectivement) par rapport à un cœur ischémié-reperfusé non traité (33 \pm 4%). Aucune variation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle moyenne n'a été observée au cours de l'expérience. Nous avons montré que l'effet cardioprotecteur de la morphine était associé à une diminution de la lipopéroxydation membranaire.

La morphine et le SB216763 amélioraient *ex vivo* les paramètres de la respiration mitochondriale et la résistance à l'ouverture du mPTP provoquée par une surcharge calcique, que ce soit après 15 min ou 24 h de reperfusion.

III.2 Effet de la morphine et du SB216763 sur l'ouverture du mPTP des cardiomyocytes soumis à une hypoxie/réoxygénation.

La morphine (2 μ M) et le SB216763 (3 μ M) retardaient le temps d'ouverture du mPTP de 50% et diminuaient la mort cellulaire par rapport aux cardiomyocytes témoins soumis à une H/R. L'effet protecteur de la morphine était aboli par l'addition de wortmanine (0,1 μ M) dans le milieu.

IV. Conclusions

L'ensemble des résultats de cette étude nous ont permis de montrer que:

- ✓ Les effets cardioprotecteurs de la morphine et du SB216763 sont liés à l'inhibition du mPTP.
- ✓ Cette inhibition est due à la stimulation de la voie de protection endogène RISK et à l'inactivation de la GSK-3 β .

Ces résultats confirment donc que l'inhibition du mPTP par inactivation indirecte (morphine) ou directe de la GSK-3 β (SB216763) correspond à un mécanisme clé permettant de protéger le myocarde de l'I/R.

Discussion générale

Il est aujourd'hui bien établi que pendant le processus d'hypoxie/reoxygénation (H/R), les espèces réactives d'oxygène (EROs) produites à la reoxygénation jouent un rôle majeur dans l'augmentation de la perméabilité des membranes mitochondriales, plus précisément dans l'ouverture du pore de transition de la perméabilité mitochondriale (mPTP), et *in fine* dans la mort cellulaire. Dans ce travail de thèse, nous avons montré que la production des EROs débute pendant la période de l'hypoxie et nous avons mis en évidence pour la première fois qu'elle est nécessaire à l'ouverture du mPTP qui induit la mort cellulaire. De plus, ce travail nous a permis d'illustrer l'importance des radicaux hydroxyles et du peroxyde d'hydrogène produits pendant l'hypoxie sur l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire. Enfin, nous avons montré que des stratégies pharmacologiques qui agissent soit directement sur la mitochondrie en ciblant le TSPO, soit en activant la voie RISK par stimulation des récepteurs opioïdes ou par inhibition de la protéine GSK-3 β permettent de limiter l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire.

I. La mise au point du modèle d'hypoxie/réoxygénation

Pour réaliser ce projet, il nous fallait pouvoir disposer d'un dispositif expérimental permettant de mimer les modèles d'I/R *in vivo*. De nombreux modèles d'H/R cellulaire ont été décrits dans la littérature et beaucoup d'entre eux ont été réalisés sur des cardiomyocytes issus de rongeurs nouveaux-nés (Robin *et al.*, 2007; Brar *et al.*, 2001). Ces derniers ont été préférés aux cardiomyocytes adultes, la principale raison étant la possibilité de les mettre en culture, donc de les utiliser pendant plusieurs jours et d'extraire une quantité suffisante de protéines pour évaluer les étapes de signalisation cellulaire. L'utilisation de cardiomyocytes adultes nécessite un isolement quotidien d'une durée \approx 5h mais reflètent plus la réalité et les conditions *in vivo*. C'est pourquoi nous avons décidé de les utiliser.

Dans un premier temps, nous avons mis au point le modèle de dissociation de cardiomyocytes de rats adultes par une technique de digestion enzymatique. Tout l'enjeu était d'isoler chaque myocyte tout en conservant dans la mesure du possible ses caractéristiques fonctionnelles. Nous avons donc

évalué la capacité contractile des cardiomyocytes fraîchement isolés et avons montré que les caractéristiques contractiles de ces derniers sont maintenues, ce qui suggère que l'intégrité des cardiomyocytes isolés au moyen de la digestion enzymatique est globalement conservée. Ceci nous a permis de valider le modèle de dissociation.

Dans un second temps, notre but a été de mettre au point le modèle d'H/R des cardiomyocytes isolés afin de mesurer simultanément et de visualiser en temps réel l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire en fonction du temps, ce qui fournit de précieuses informations pour comprendre les mécanismes intracellulaires mis en jeu. De nombreux modèles cellulaires d'induction de l'ouverture du mPTP ont été décrits dans la littérature (Park *et al.*, 2006 ; Juhaszova *et al.*, 2004). Dans certaines études, le TMRM, un marqueur fluorescent photoexcitable, a été utilisé afin d'induire l'ouverture du mPTP (Kadono *et al.*, 2006 ; Juhaszova *et al.*, 2004.). Dans d'autres modèles, les cellules ont été exposées à des concentrations élevées de calcium (Seguchi *et al.*, 2005) ou des agents pro-oxydants comme H₂O₂ (Park *et al.*, 2006) pour perméabiliser les membranes cellulaires. Notre objectif a été de mettre au point un modèle d'H/R *in vitro* exposant les cellules à des conditions les plus proches possibles de celles des cellules cardiaques au cours de l'infarctus du myocarde. C'est pourquoi nous nous sommes tournée vers le modèle de cardiomyocytes isolés d'un animal adulte soumis à un épisode d'hypoxie suivi d'une réoxygénation. En plus, nous avons pris en compte la fonction contractile des cellules cardiaques. Il a été décrit que les besoins des cardiomyocytes en oxygène sont réduits de 60% s'ils ne se contractent pas (Maddford *et al.*, 1999 ; Rose et Kammermeier, 1986). Dans notre modèle, nous n'avons pas réussi à induire l'ouverture du mPTP ni la mort cellulaire en l'absence d'une stimulation électrique. Un autre facteur qui contribue au stress métabolique subi par les cellules lors d'un épisode d'I/R est le changement dans la composition des substrats fournis aux cellules. Les cellules soumises à l'H/R ont une probabilité moindre de récupérer leurs fonctions, et par conséquent plus importante de mourir, lorsqu'on réduit la pression partielle d'oxygène et la concentration de glucose dans le milieu hypoxique (Poizat *et al.*, 1994 ; Geisbuhler *et al.*, 1990). C'est pour cela que nous avons soumis les cellules à une hypoxie sévère (PO₂<1%) en bullant préalablement le milieu hypoxique par de l'azote (100% N₂) et en perfusant cet azote en continu tout au long de la période hypoxique. Nous avons aussi utilisé un bloqueur métabolique pour limiter au maximum la quantité du glucose disponible pour les cellules lors de l'hypoxie.

Ces conditions pourtant stringentes ne nous ont cependant pas permis d'obtenir le pourcentage de mortalité recherché (100%) après 2 h de réoxygénation. Pour atteindre ce résultat nous avons donc reoxygéné les cellules brutalement avec un milieu hyperoxié (préalablement bullé à l'oxygène 95%) pendant les 10 premières minutes de la réoxygénation. Ce protocole nous semble mimer l'environnement auquel les cellules sont soumises *in vivo* puisque la revascularisation permet de rétablir rapidement la pression partielle tissulaire en oxygène.

Ayant ainsi défini les conditions matérielles et environnementales, nous avons recherché le protocole optimal d'H/R qui permettait d'engendrer l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire de la quasi-totalité des cellules. Cette partie de notre travail a comporté deux étapes. Tout d'abord, nous avons démontré que le dispositif expérimental et les conditions environnementales des cardiomyocytes (Tyrode, température, stimulation électrique...) en normoxie n'altéraient pas leur viabilité. Nos résultats démontrent que dans nos conditions expérimentales le modèle est stable puisque l'intensité de fluorescence de la calcéïne, un marqueur de l'ouverture du mPTP restait stable pendant une période de 5h. La seconde étape a consisté à rechercher le temps d'hypoxie optimal nécessaire pour induire l'ouverture du mPTP dans presque toutes les cellules. Le pourcentage des cellules qui ouvrent leur mPTP à la réoxygénation augmentait avec l'allongement des durées d'hypoxie. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Rumsey *et al.* (1990) et Budinger *et al.* (1996) qui ont montré que les cardiomyocytes adultes sont capables de maintenir une fonction cellulaire normale lorsqu'ils sont soumis à de courtes périodes d'hypoxie. Nos résultats indiquent que 2 et 3h d'hypoxie sont nécessaires pour obtenir une ouverture du mPTP de la totalité des cellules lors de la réoxygénation. Cependant, après 3h d'hypoxie, approximativement 15% des cellules présentent déjà une ouverture du mPTP avant la réoxygénation, ce qui rend difficile la possibilité de montrer l'effet inhibiteur potentiel d'une molécule sur l'ouverture du mPTP. Nous avons donc fixé les durées d'hypoxie et de réoxygénation à 2h pour l'ensemble de nos expériences. L'étude de l'ouverture du mPTP dans notre modèle a permis alors de mettre en évidence que l'ouverture du mPTP a bien lieu pendant la phase de réoxygénation, confirmant ainsi des études précédentes (Halestrap *et al.*, 2004 ; Griffiths et Halestrap 1995). De plus, l'étude en temps réel de l'ouverture du mPTP et de la mortalité cellulaire démontre que cette ouverture participe à l'induction de la mort cellulaire au cours du processus d'H/R.

La fin de la mise au point a consisté à valider notre modèle en testant l'effet protecteur de la CsA, l'inhibiteur sélectif de l'ouverture du mPTP (Di Lisa *et al.*, 2011). Nous avons pu mettre en évidence l'effet protecteur de la CsA puisqu'elle induit une augmentation du temps moyen d'ouverture du mPTP et une réduction de la mortalité cellulaire des cardiomyocytes soumis à l'H/R, validant ainsi le modèle.

A noter que l'utilisation de concentrations plus élevées de CsA ($>1\mu\text{M}$) ainsi qu'un contact prolongé avec les cardiomyocytes abolissent son effet protecteur dans notre modèle et ceci en accord avec la littérature (Skyschally *et al.*, 2010 ; Qian *et al.*, 1997 ; Griffiths *et al.*, 1993).

Par ailleurs, nous avons observé deux cinétiques de décroissance de l'intensité de la fluorescence de la calcéine des cardiomyocytes soumis à l'H/R. Certaines cellules ont montré une diminution brusque (~ 2 min) et complète de la fluorescence de calcéine, tandis que d'autres ont montré une diminution graduelle et lente de cette fluorescence. Ces observations sont compatibles avec les deux modes d'ouverture du mPTP précédemment décrits (Kim *et al.*, 2006 ; Griffiths *et al.*, 2000). L'ouverture rapide est habituellement accompagnée d'une phase de raccourcissement des cellules associée à une perte rapide et complète de la fluorescence de la calcéine, ce qui correspondrait à une ouverture du mPTP irréversible suivie d'une mort cellulaire rapide. En revanche, le profil d'ouverture lente correspondrait à une ouverture transitoire du mPTP et consisterait en une perte lente et progressive de la fluorescence de la calcéine à la réoxygénation, non suivie d'une mort cellulaire, et qui ne se produit que lorsque l'ouverture du mPTP devient soutenue dans le temps. Notre étude est la première à souligner la dépendance de ces modes d'ouverture du mPTP à la durée de l'hypoxie. En effet, le pourcentage de cardiomyocytes présentant une ouverture rapide du mPTP augmente avec le temps d'hypoxie. La présence de CsA favorise les ouvertures lentes ce qui confirme la participation du mPTP au phénomène observé. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Kim *et al.* (2006) qui ont associé cette ouverture transitoire à une diminution partielle d'ATP conduisant à l'inhibition des pompes calciques cellulaires.

II. La relation entre la production des EROs, l'ouverture du mPTP et la mortalité cellulaire

Après avoir mis au point le modèle d'H/R, l'objectif de notre travail a été d'étudier le rôle des EROs sur l'ouverture du mPTP et la mortalité cellulaire dans le processus d'H/R.

II.1 Les EROs sont produites pendant l'hypoxie

De nombreuses études ont montré une forte production des EROs pendant les premières minutes de la reperfusion du myocarde ischémié (Lauzier *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2006 ; Bopassa *et al.*, 2005). Nos résultats ne sont pas en conflit avec ces observations, mais ils montrent surtout que la production des EROs commence dès la période d'hypoxie et bien avant la réoxygénation. Cette production hypoxique d'EROs n'induit cependant pas de mort cellulaire, indiquant que les effets immédiats de ces EROs ne sont pas délétères, mais prédisposent les cardiomyocytes aux lésions de la réoxygénation par un épuisement progressif de la capacité antioxydante des cellules (Ferrari *et al.*, 1993). Bien que la génération des EROs pendant l'hypoxie puisse sembler paradoxale puisque les conditions ischémiées consistent en une baisse de la pression partielle d'oxygène, plusieurs études appuient ce concept (Robin *et al.*, 2007 ; Becker *et al.*, 1999 ; Duranteau *et al.*, 1998 ; Vanden Hoek *et al.*, 1997). En effet, les complexes respiratoires qui sont fortement réduits sous les conditions hypoxiques peuvent céder leurs électrons à l'oxygène résiduel pour former des EROs (Hess et Manson, 1984). En revanche, certains auteurs n'ont pas observé de production d'EROs pendant l'hypoxie (Shao *et al.*, 2010 ; Halpern *et al.*, 1995 ; Henry *et al.*, 1990 ; Garlick *et al.*, 1987). Cette contradiction pourrait être liée à la différence des niveaux d'oxygène résiduel pendant l'hypoxie et aux modèles cellulaires utilisés dans les différentes études. Dans le but de simuler le mieux possible les conditions *in vivo*, nous avons choisi d'exposer les cellules à des conditions d'hypoxie sévère ($PO_2 \approx 1\%$) et non d'anoxie. D'autre part, notre étude montre que l'augmentation du temps d'hypoxie, présenté par plusieurs auteurs comme un facteur important dans les lésions de l'I/R (Ovize *et al.*, 2010 ; Reimer *et al.*, 1977), est directement liée à une augmentation de la génération des EROs conduisant d'une manière proportionnelle à des lésions plus importantes représentées ici par l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire.

II.2 Les EROs produits à l'hypoxie sont différents des EROs produits à la réoxygénation

Afin de mesurer la production des EROs, nous avons utilisé deux sondes intracellulaires fluorescentes, le dihydroéthidium (DHE) et le 2',7' dichlorofluoresceine diacetate (DCFH-DA). De nombreuses études ont observé la spécificité de ces deux sondes dans la détection des EROs (Zielonka *et al.*, 2010 ; Dikalov *et al.*, 2007 ; Vanden Hoek *et al.*, 1997 ; Bindokas *et al.*, 1996). En résumé, l'oxydation de DCFH-DA est indicative de la formation de H₂O₂ et/ou d'·OH, tandis que l'oxydation de DHE reflète la production d'O[•]₂. Par ailleurs, les travaux de Vanden Hoek *et al.* (1997) ont montré qu'·OH est capable d'induire l'oxydation de DHE. Sur la base de ces études de spécificité, nous avons montré que les cardiomyocytes exposés à l'H/R produisent rapidement les 3 types d'EROs, O[•]₂, H₂O₂ et ·OH pendant la période d'hypoxie tandis qu'une forte production d'·OH et d'H₂O₂ est observée à la réoxygénation. En plus d'une différence de niveau de production d'EROs pendant l'hypoxie et la réoxygénation, il y a un changement d'espèces produites qui peut être dû à des modifications de l'activité des systèmes antioxydants cellulaires. Les travaux de Kirshenbaum et Singal (1992) ont ainsi montré une variation de l'activité de la superoxyde dismutase pendant l'I/R ; celle-ci diminue pendant l'ischémie mais augmente pendant la reperfusion, ce qui pourrait expliquer en partie la forte production d'H₂O₂.

II.3 La production des EROs précède l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire.

Plusieurs données de la littérature montrent que la diminution de la production/élimination des EROs induit un effet cardioprotecteur. En effet, la surexpression de la SOD manganèse-dépendante réduit les effets délétères de l'I/R chez la souris (Chen *et al.*, 1998) et un antioxydant de type pyrazolinique diminue la taille d'infarctus dans un modèle d'occlusion coronaire chez le lapin, ce qui est accompagné d'une diminution de la perméabilité membranaire mitochondriale (Rajesh *et al.*, 2003). Plus récemment, Townsend *et al.* (2007) ont montré que l'urocortine, un peptide apparenté au CRF (cortisone releasing factor) empêche l'ouverture du mPTP en inhibant le stress oxydant. Le mécanisme d'action ne serait pas direct mais impliquerait la PKC. Cependant, ces

auteurs soulignent qu'une question demeure quant au lien potentiel existant entre la diminution de perméabilité membranaire mitochondriale et la limitation du stress oxydant : la production d'EROs à la reperfusion pourrait être secondaire à l'ouverture du mPTP et l'inhibition du stress oxydant pourrait être une conséquence et non une cause de l'inhibition du mPTP (Zorov *et al.*, 2004 ; Batandier *et al.*, 2000).

Nulton et Szweda (2001) ont montré que la production des EROs au moment de la reperfusion inhibe la phosphorylation oxydative, ce qui augmente la perméabilité membranaire mitochondriale ; l'oxydation des fonctions thiols de l'ANT par les EROs favorisant l'induction du mPTP (Vieira *et al.*, 2001). Ceci est cohérent avec les travaux de l'équipe de Lemasters qui ont montré que la production des EROs au début de la réoxygénation pourrait être responsable de l'ouverture du mPTP et de la mort cellulaire (Kim *et al.*, 2006). Les effets des EROs produites pendant l'hypoxie ont été principalement décrits par l'équipe de Schumacher qui a montré que les EROs produites à l'hypoxie sont nécessaires mais pas suffisantes pour induire la mort cellulaire. Notre travail montre clairement que la mort cellulaire induite par cette production d'EROs pendant l'hypoxie est concomitante de l'ouverture du mPTP. Ce travail de thèse nous a en plus permis, grâce au modèle d'H/R permettant d'enregistrer en temps réel et simultanément la production d'EROs et l'ouverture du mPTP, de conclure quant à une relation de causalité entre la limitation des EROs et l'inhibition du mPTP. Nous avons plus particulièrement montré que la production d' OH^\bullet et de H_2O_2 pendant l'hypoxie est nécessaire pour induire l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire. En effet, l'inhibition de la production d' OH^\bullet et H_2O_2 par la phénanthroline et le 2-MPG pendant l'hypoxie retarde l'ouverture du mPTP et prévient la mort cellulaire tandis que ces molécules n'ont pas d'effet lorsqu'elles sont introduites peu avant la reperfusion. Ceci peut indiquer que la production de ces EROs à la reperfusion n'est pas impliquée dans l'ouverture du mPTP, suggérant que cette production est plutôt une conséquence qu'une cause mais ceci peut également être du au fait que les antioxydants utilisés n'atteignent pas suffisamment rapidement leurs cibles (les EROs) pour les piéger, ce qui est une hypothèse plus plausible. Ceci pourrait être une explication de l'échec des études cliniques qui ont évalué l'effet des antioxydants lors de leur administration à la reperfusion (Farbstein *et al.*, 2010). Par ailleurs, nous avons observé que l'effet protecteur des antioxydants et de la CsA est accompagné d'une production d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ à la réoxygénation, ce qui semble refléter avant tout le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et donc la viabilité cellulaire. En effet, une production d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ a été

décrite dans la littérature sur des cardiomyocytes dans les conditions normoxiques (Wang *et al.*, 2008).

La nécessité d'approfondir nos connaissances sur le rôle important du stress oxydant dans la modulation de la perméabilité membranaire mitochondriale, notamment le rôle des EROs produites par la mitochondrie ainsi que le rôle d'espèces réactives autres que celles de l'oxygène comme l'anion carbonate, et les espèces réactives de l'azote (pour une revue sur les autres espèces réactives voir Rochette et Vergely 2008) est donc majeur pour (i) développer des bio-marqueurs appropriés afin de prédire le pronostic des patients souffrant d'un infarctus du myocarde (Lorgis *et al.*, 2010) et cibler le traitement (ii) ainsi que pour développer de nouvelles stratégies cardioprotectrices.

III. L'inhibition pharmacologique directe de la perméabilité mitochondriale : TSPO et cardioprotection

Il est maintenant clairement établi que l'inhibition du mPTP constitue une approche thérapeutique efficace pour protéger le myocarde lors de l'I/R. Les travaux les plus représentatifs sont ceux réalisés avec des inhibiteurs de la Cyp-D, une étude clinique ayant récemment montré que la CsA administrée au moment de la réalisation de l'angioplastie percutanée (la reperfusion coronaire) réduit la taille de l'infarctus par rapport au groupe placebo (Piot *et al.*, 2008). Ce rôle critique du mPTP nous a amené à porter notre attention sur l'une de ses protéines modulatrices, le TSPO. Cette protéine a été décrite comme intervenant dans le processus d'I/R. Leducq *et al.* (2003) ont montré qu'un ligand synthétique du TSPO, le SSR180575, protégeait le myocarde dans un modèle d'I/R cardiaque. Par ailleurs, une étude du laboratoire a montré que le 4'-chlorodiazépam, un autre ligand du TSPO, diminue la taille d'infarctus, améliore la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP (Nsoure *et al.*, 2007) renforçant l'idée que la modulation du TSPO peut induire une cardioprotection.

La présente étude confirme cette hypothèse puisque nous avons montré qu'un nouveau ligand de TSPO, le TRO40303, est également cardioprotecteur. L'originalité du TRO40303 par rapport aux ligands classiques du TSPO, tels que le PK11195 ou le 4'-chlorodiazépam, est qu'il se lie au site du cholestérol et est un substrat potentiel du TSPO, contrairement aux ligands classiques qui se fixent

sur un site adjacent et qui modulent l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie. Par ailleurs, le TRO4030 s'accumule dans le cœur, pénètre très peu dans le cerveau et sa distribution est superposable à celle du TSPO, ce qui en faisait un bon candidat pour protéger le myocarde. Nous avons montré que le TRO40303 réduit la taille de l'infarctus du myocarde chez le rat. Contrairement à la CsA, le TRO40303 n'améliore pas la phosphorylation oxydative et n'inhibe pas l'ouverture du mPTP induite par une surcharge calcique dans un modèle de mitochondries isolées après I/R myocardique chez le rat. En revanche, le TRO40303 retarde l'ouverture du mPTP et la mortalité des cardiomyocytes induite par H/R *in vitro*. Ceci montre que la mise en évidence de l'effet du TRO40303 sur le mPTP nécessite probablement l'intervention de composants cellulaires absents lorsque les mitochondries sont isolées et souligne la différence de mode d'action par rapport à la CsA qui inhibe la Cyp-D tandis que le TRO40303 se lie au TSPO afin d'empêcher l'ouverture du mPTP induite par l'H/R.

Comment les ligands du TSPO sont-ils capables de moduler la perméabilité membranaire mitochondriale ? Des travaux relativement anciens ont suggéré que certains de ces ligands, et notamment le 4'-chlorodiazépam, pourraient être capables de diminuer le stress oxydant (Mühling *et al.*, 2005). Le travail de l'équipe de S. Jones a montré que le TRO40303 inhibe l'ouverture du mPTP lorsque des cardiomyocytes sont soumis à une intoxication par H₂O₂ suggérant que le TRO40303 réduit la production des EROs, ce qui pourrait expliquer l'effet que nous observons dans notre modèle d'H/R. D'autres hypothèses peuvent être proposées, la première est liée à la propriété du TSPO de transporter le cholestérol de l'extérieur vers l'intérieur de la mitochondrie. Rouslin *et al.* (1982) ont montré chez le porc, et Venter *et al.* (1991) chez le rat, que l'I/R myocardique favorise le transfert du cholestérol libre dans les membranes mitochondriales qui deviennent plus rigides, contribuant à la destruction de la mitochondrie et donc de la cellule. Ce phénomène a également été associé à une altération de l'induction du mPTP dans les mitochondries hépatiques (Colell *et al.*, 2003). La modulation du TSPO par TRO40303 pourrait limiter ce transfert et donc favoriser la survie cellulaire.

La seconde hypothèse prend en compte l'analogie de structure entre le TRO40303 et le cholestérol. Le TRO40303, comme le cholestérol, pourrait favoriser l'interaction VDAC-hexokinase ce qui augmente la glycolyse et réduit ainsi le besoin de maintenir les niveaux d'ATP par la

phosphorylation oxydative (Pastorino et Hoek, 2008). Ceci protégerait le tissu en réduisant la production des EROs causée par la chaîne respiratoire à la reperfusion après un épisode ischémique. Sachant que, comme nous avons montré dans la première étude, la production des EROs précède l'ouverture du mPTP, l'effet inhibiteur du TRO40303 sur l'ouverture du mPTP lors d'I/R pourrait être lié à une diminution de la production des EROs.

Cette partie de notre travail nous a donc permis de confirmer au moyen d'une molécule originale que le TSPO est une cible pertinente pour protéger le myocarde lors de l'I/R. Cet effet fait intervenir l'inhibition de l'ouverture du mPTP et la suite de ce travail devrait apporter plus de précisions sur le mécanisme par lequel le TRO40303 inhibe cette ouverture.

IV. L'inhibition pharmacologique indirecte de la perméabilité mitochondriale : la voie RISK et cardioprotection

Dans la dernière partie de notre travail, nous nous sommes intéressée à l'effet cardioprotecteur médié par la voie RISK et nous avons cherché à savoir si cet effet pouvait être causé par une limitation de la perméabilité membranaire mitochondriale induite par le mPTP. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser la morphine car il a été clairement démontré que cet agoniste des récepteurs opiacés protège le myocarde lors de l'I/R (Gross *et al.*, 2004) et que cet effet est du à la stimulation de la voie RISK (Gross *et al.*, 2007). Ces résultats ont été confirmés par Peart *et al.* (2008) avec un autre agoniste sélectif des récepteurs opiacés, le U50 488. Dans le laboratoire, nous avons confirmé que la morphine administrée juste avant la reperfusion réduit la taille d'infarctus chez le rat (Obame *et al.*, 2008). Nous avons par ailleurs montré que cet effet cardioprotecteur est associé à une amélioration de la respiration, de la synthèse d'ATP et à une augmentation de la résistance des mitochondries à une surcharge calcique qui témoigne de la résistance à l'ouverture du mPTP. Cependant, ces résultats ne nous permettaient pas d'affirmer que l'inhibition de l'ouverture du mPTP était directement responsable de la protection du cardiomyocyte. Pour cela, nous avons étudié l'effet de la morphine dans notre modèle de cardiomyocytes isolés de rats adultes soumis à une H/R. Nous avons montré que la morphine retarde l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire. Nous avons également montré que l'effet inhibiteur de la morphine sur l'ouverture du mPTP est aboli par la

wortmanine, un inhibiteur de la PI3kinase, ce qui confirme bien le rôle important de la voie PI3kinase/Akt dans l'effet de la morphine et surtout établi un lien direct entre l'activation de la voie RISK et l'inhibition du mPTP.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré le rôle clé joué par la protéine GSK-3 β , qui est située en aval de la voie RISK, et plus particulièrement de sa phosphorylation dans le mécanisme de protection du myocarde après I/R (Juhaszova *et al.*, 2009 ; Gomez *et al.*, 2008). En accord avec ces études, nous avons montré que le SB216763, un inhibiteur sélectif de la GSK-3 β , induit une protection des cardiomyocytes semblable à celle obtenue avec la morphine dans notre modèle, ce qui nous a permis de conclure que l'inactivation de GSK-3 β est bien impliquée dans le mécanisme d'action induisant l'inhibition du mPTP.

Bien que l'inhibition de GSK-3 β soit efficace pour protéger le myocarde ischémique, des études ont montré que le pré et le post-conditionnement demeurent efficaces en terme de réduction de la taille d'infarctus sur des souris déficientes en GSK-3 β (Nishino *et al.*, 2008). Ces résultats indiquent donc que d'autres médiateurs que GSK-3 β interviennent dans l'inhibition de l'ouverture du mPTP. La protéine p70S6K, qui est activée par la voie PI3kinase/Akt pourrait être l'un de ces médiateurs. Cette protéine est capable d'inactiver la protéine proapoptotique Bad en la phosphorylant (Harada *et al.*, 2001) ce qui favoriserait un effet cardioprotecteur causé par l'effet antiapoptotique de Bcl-2 mais n'impliquerait pas GSK-3 β . Un autre mécanisme d'inhibition du mPTP indépendamment de la phosphorylation de GSK-3 β pourrait faire intervenir la PKC- ϵ . En effet, celle-ci induit une réduction du gonflement mitochondrial causé par une surcharge calcique en phosphorylant VDAC (Baines *et al.*, 2003) et est impliquée dans l'inhibition du mPTP et l'effet cardioprotecteur induit par l'urocortine (Townsend *et al.*, 2007) .

Quel mécanisme peut-on évoquer pour expliquer l'effet de GSK-3 β sur le mPTP ? Une première hypothèse a été fournie par Das *et al.* (2008) qui ont montré que l'inhibition de GSK-3 β diminue l'entrée d'ADP/AMP dans la mitochondrie via le VDAC dans des conditions d'anoxie ce qui réduit le potentiel de membrane et l'entrée de calcium durant l'I/R. Pour notre part, nous venons de voir dans la première étude que le stress oxydant joue un rôle majeur dans l'ouverture du mPTP et la mort cardiomyocytaire suite à l'I/R. De plus, en utilisant un modèle d'I/R *in vivo*, notre troisième étude a

montré que les effets protecteurs du SB216763 et de la morphine sont associés à une limitation de l'oxydation des lipides membranaires. Notre travail suggère donc que la morphine ou l'inactivation de GSK-3 β lors d'I/R pourraient limiter la production des EROs conduisant ainsi à une limitation de l'ouverture du mPTP. Cependant, notre étude ne permet pas de conclure définitivement quant à une relation de causalité entre l'inhibition du mPTP par la morphine ou l'inactivation de GSK-3 β et la limitation du stress oxydant. La suite de ce travail permettra d'apporter plus de précisions sur la question.

Conclusions et Perspectives

L'ischémie myocardique résulte d'un déséquilibre entre les besoins et les apports en oxygène et en substrat et en limiter la durée par reperfusion est vitale pour la cellule cardiaque. Cependant, cette reperfusion peut s'accompagner d'altérations dites « lésions de reperfusion » qui peuvent induire la mort cellulaire. L'étude des mécanismes responsables de l'induction de la mort cellulaire a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant joué par la mitochondrie et la limitation de l'augmentation de la perméabilité de ses membranes induite par l'ouverture du mPTP apparaît comme une cible privilégiée pour protéger le myocarde. A la vue du rôle critique joué par la production des EROs dans les lésions de l'I/R, nous avons étudié le rôle des EROs dans l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire afin de conclure sur un point essentiel du mécanisme de cardioprotection : la réduction du stress oxydant est-elle une cause ou une conséquence de la limitation de la perméabilité membranaire mitochondriale ? Nous avons également étudié les moyens pharmacologiques de limiter la perméabilité membranaire en inhibant l'ouverture du mPTP et les résultats obtenus sont résumés sur la figure 26.

Une grande partie de notre travail a été consacrée à la mise au point d'un modèle d'H/R sur des cardiomyocytes de rats adultes fraîchement isolés qui nous permet de mesurer en temps réel et simultanément la production des EROs, l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire. Nous avons montré que l'augmentation du temps d'hypoxie est directement liée à une augmentation de la production des EROs à l'hypoxie. Cette production d'EROs à l'hypoxie, plus particulièrement la production d' $\cdot\text{OH}$ et de H_2O_2 , a été directement relié, et ceci pour la première fois, à l'ouverture du mPTP et à la mort cellulaire lors de l'H/R.

Nous avons également étudié grâce à ce modèle des moyens pharmacologiques permettant de limiter l'ouverture du mPTP. Ainsi nous avons montré que les propriétés cardioprotectrices d'un ligand du TSPO, le TRO40303, sont associées à une inhibition du mPTP, ce qui n'avait pas été démontré *ex vivo*. D'autre part, une stratégie pharmacologique indirecte, activant la voie RISK par la morphine, aboutit aussi à une limitation de la taille d'infarctus associée à une amélioration des fonctions mitochondriales. Nous avons montré que les deux moyens pharmacologiques utilisés

entraînent un effet cardioprotecteur suite à l'inhibition du mPTP et un retard de la mort cellulaire des cardiomyocytes isolés soumis à une H/R.

Comme nous venons de le voir, le stress oxydant joue un rôle majeur dans l'induction du mPTP. La suite logique de ce travail sera de rechercher si l'inhibition du stress oxydant peut constituer un mécanisme commun aux deux stratégies pharmacologiques cardioprotectrices que nous avons décrites en utilisant notre modèle d'H/R. Pour cela, il serait possible d'étendre notre modèle à des animaux génétiquement modifiés pour appréhender plus précisément les phénomènes impliqués dans cette activité antioxydante.

A plus long terme, il sera nécessaire d'approfondir nos connaissances sur la production d'EROs pendant l'I/R en recherchant plus spécifiquement l'origine de cette production, notamment le rôle joué par la mitochondrie et l'effet d'autres espèces réactives dans le but de cibler le traitement et de développer de nouvelles stratégies cardioprotectrices.

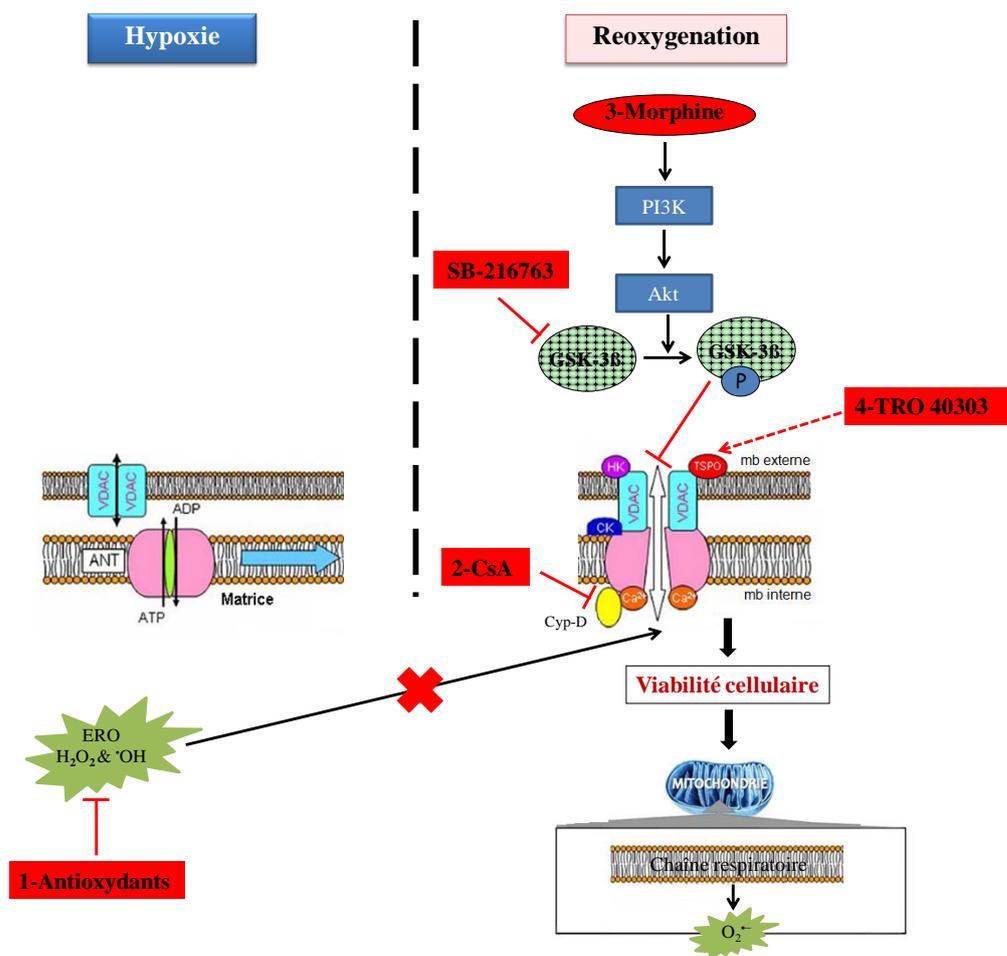


Figure26

Figure 26: Principales conclusions de ce travail de thèse

Ce schéma résume les mécanismes d'action des stratégies pharmacologiques impliquées dans l'inhibition de l'ouverture du mPTP suite à une hypoxie/réoxygénation :

1. Les antioxydants inhibent la production d'EROs à l'hypoxie, plus particulièrement la production d' $\cdot\text{OH}$ et de H_2O_2 . Cette production a été directement reliée à l'ouverture du mPTP.
2. La CsA inhibe directement l'ouverture du mPTP en se liant à la Cyp-D.
3. La morphine inhibe indirectement l'ouverture du mPTP via l'activation de la voie $\text{PI}_3\text{K}/\text{Akt}$ et la phosphorylation de GSK-3 β . Cette dernière peut être inhibée par le SB 216763.
4. Le TRO40303 inhibe l'ouverture du mPTP en se liant au TSPO, l'une des protéines régulatrices de cette ouverture.

Ce travail montre que l'inhibition de l'ouverture du mPTP par différents mécanismes prévient la mort cellulaire. La production d' O_2^- qui est un reflet de l'amélioration de la respiration mitochondriale semble témoigner de la viabilité cellulaire.

ANT, adénine nucléotide translocase ; CsA, cyclosporine A ; Cyp-D, cyclophiline D ; EROs, espèces réactives d'oxygène ; GSK-3 β , glycogène synthase kinase 3 β ; mPTP, pore de transition de perméabilité mitochondriale ; TSPO, protéine translocatrice mitochondriale ; VDAC, voltage dépendant anion channel.

References

- Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP and Sammut IA (2005) Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *Faseb J* 19:1088-1095.
- Alcala S, Klee M, Fernandez J, Fleischer A and Pimentel-Muinos FX (2008) A high-throughput screening for mammalian cell death effectors identifies the mitochondrial phosphate carrier as a regulator of cytochrome c release. *Oncogene* 27:44-54.
- Ambrosio G, Zweier JL and Flaherty JT (1991) The relationship between oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 23:1359-1374.
- An J, Li P, Li J, Dietz R and Donath S (2009) ARC is a critical cardiomyocyte survival switch in doxorubicin cardiotoxicity. *J Mol Med* 87:401-410.
- Andreyev AY, Kushnareva YE and Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70:200-214.
- Anholt RR, Pedersen PL, De Souza EB and Snyder SH (1986) The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 261:576-583.
- Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Bejui F, Robert D and Ovize M (2004) Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 61:115-122.
- Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D and Ovize M (2005) Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 111:194-197.
- Argaud L, Ovize M, Robert D (2006) Mitochondria: a target to protect myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Réanimation* 15: 109-16.

Armstrong JS, Whiteman M, Rose P and Jones DP (2003) The Coenzyme Q10 analog decylubiquinone inhibits the redox-activated mitochondrial permeability transition: role of mitochondrial [correction mitochondrial] complex III. *J Biol Chem* 278:49079-49084.

Baines CP (2010) The cardiac mitochondrion: nexus of stress. *Annu Rev Physiol* 72:61-80.

Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ and Molkentin JD (2007) Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 9:550-555.

Baines CP and Molkentin JD (2005) STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 38:47-62.

Baines CP, Song CX, Zheng YT, Wang GW, Zhang J, Wang OL, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM and Ping P (2003) Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ Res* 92:873-880.

Baines CP, Zhang J, Wang GW, Zheng YT, Xiu JX, Cardwell EM, Bolli R and Ping P (2002) Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circ Res* 90:390-397.

Balaban RS, Nemoto S and Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495.

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

Basso E, Petronilli V, Forte MA and Bernardi P (2008) Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *J Biol Chem* 283:26307-26311.

Batandier C, Picard A, Tessier N and Lunardi J (2000) Identification of a novel T398A mutation in the ND5 subunit of the mitochondrial complex I and of three novel mtDNA polymorphisms in two patients presenting ocular symptoms. *Hum Mutat* 16:532.

Bates E, Bode C, Costa M, Gibson CM, Granger C, Green C, Grimes K, Harrington R, Huber K, Kleiman N, Mochly-Rosen D, Roe M, Sadowski Z, Solomon S and Widimsky P (2008) Intracoronary KAI-9803 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Circulation* 117:886-896.

Becker LB (2004) New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 61:461-470.

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

Behrends M, Schulz R, Post H, Alexandrov A, Belosjorow S, Michel MC and Heusch G (2000) Inconsistent relation of MAPK activation to infarct size reduction by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H1111-1119.

Bell RM, Cave AC, Johar S, Hearse DJ, Shah AM and Shattock MJ (2005) Pivotal role of NOX-2-containing NADPH oxidase in early ischemic preconditioning. *Faseb J* 19:2037-2039.

Benov L, Szejnberg L and Fridovich I (1998) Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic Biol Med* 25:826-831.

Berdeaux A (2007) [Pharmacological protection against myocardial infarction: realities and actualities]. *Ann Pharm Fr* 65:315-324.

Bers DM (2006) Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 21:380-387.

Bers DM, Despa S and Bossuyt J (2006) Regulation of Ca²⁺ and Na⁺ in normal and failing cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1080:165-177.

Beurdeley-Thomas A, Miccoli L, Oudard S, Dutrillaux B and Poupon MF (2000) The peripheral benzodiazepine receptors: a review. *J Neurooncol* 46:45-56.

Beutner G, Ruck A, Riede B and Brdiczka D (1998) Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability

transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1368:7-18.

Bianchi P, Kunduzova O, Masini E, Cambon C, Bani D, Raimondi L, Seguelas MH, Nistri S, Colucci W, Leducq N and Parini A (2005) Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury. *Circulation* 112:3297-3305.

Bindokas VP, Jordan J, Lee CC and Miller RJ (1996) Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16:1324-1336.

Boengler K, Buechert A, Heinen Y, Roeskes C, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G and Schulz R (2008) Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice. *Circ Res* 102:131-135.

Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G and Schulz R (2010) Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol* 105:771-785.

Bognar Z, Kalai T, Palfi A, Hanto K, Bognar B, Mark L, Szabo Z, Tapodi A, Radnai B, Sarszegi Z, Szanto A, Gallyas F, Jr., Hideg K, Sumegi B and Varbiro G (2006) A novel SOD-mimetic permeability transition inhibitor agent protects ischemic heart by inhibiting both apoptotic and necrotic cell death. *Free Radic Biol Med* 41:835-848.

Bolli R and Marban E (1999) Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 79:609-634.

Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK and McCay PB (1988) Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest* 82:476-485.

Bono F, Lamarche I, Prabonnaud V, Le Fur G and Herbert JM (1999) Peripheral benzodiazepine receptor agonists exhibit potent antiapoptotic activities. *Biochem Biophys Res Commun* 265:457-461.

Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E and Ovize M (2006) PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res* 69:178-185.

Bopassa JC, Michel P, Gateau-Roesch O, Ovize M and Ferrera R (2005) Low-pressure reperfusion alters mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H2750-2755.

Boveris A and Cadenas E (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 54:311-314.

Brar BK, Stephanou A, Liao Z, O'Leary RM, Pennica D, Yellon DM and Latchman DS (2001) Cardiotrophin-1 can protect cardiac myocytes from injury when added both prior to simulated ischaemia and at reoxygenation. *Cardiovasc Res* 51:265-274.

Brennan JP, Southworth R, Medina RA, Davidson SM, Duchon MR and Shattock MJ (2006) Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of KATP channel activation. *Cardiovasc Res* 72:313-321.

Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andrews D, Duclouhier H, Reed JC and Kroemer G (2000) Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19:329-336.

Budinger GR, Chandel N, Shao ZH, Li CQ, Melmed A, Becker LB and Schumacker PT (1996) Cellular energy utilization and supply during hypoxia in embryonic cardiac myocytes. *Am J Physiol* 270:L44-53.

Burley DS, Ferdinandy P and Baxter GF (2007) Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *Br J Pharmacol* 152:855-869.

Carayon P, Portier M, Dussossoy D, Bord A, Petitpretre G, Canat X, Le Fur G and Casellas P (1996) Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the protection of hematopoietic cells against oxygen radical damage. *Blood* 87:3170-3178.

Castedo M, Perfettini JL and Kroemer G (2002) Mitochondrial apoptosis and the peripheral benzodiazepine receptor: a novel target for viral and pharmacological manipulation. *J Exp Med* 196:1121-1125.

Cesura AM, Pinard E, Schubnel R, Goetschy V, Friedlein A, Langen H, Polcic P, Forte MA, Bernardi P and Kemp JA (2003) 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.

Chen Z, Chua CC, Ho YS, Hamdy RC and Chua BH (2001) Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2313-2320.

Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC and Chua BH (1998) Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 30:2281-2289.

Chiara F, Castellaro D, Marin O, Petronilli V, Brusilow WS, Juhaszova M, Sollott SJ, Forte M, Bernardi P and Rasola A (2008) Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels. *PLoS One* 3:e1852.

Clarke SJ, McStay GP and Halestrap AP (2002) Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* 277:34793-34799.

Cohen MV, Yang XM and Downey JM (2008) Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success. *Basic Res Cardiol* 103:464-471.

Colell A, Garcia-Ruiz C, Lluís JM, Coll O, Mari M and Fernandez-Checa JC (2003) Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. *J Biol Chem* 278:33928-33935.

Connern CP and Halestrap AP (1992) Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochem J* 284 (Pt 2):381-385.

Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV and Critz SD (2005) Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res* 97:329-336.

Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC and Garlid KD (2006) The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 281:20801-20808.

Cour M, Gomez L, Mewton N, Ovize M and Argaud L Postconditioning: from the bench to bedside. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 16:117-130.

Crofts AR and Chappell JB (1965) Calcium Ion Accumulation and Volume Changes of Isolated Liver Mitochondria. Reversal of Calcium Ion-Induced Swelling. *Biochem J* 95:387-392.

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

Crompton M and Costi A (1988) Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload. *Eur J Biochem* 178:489-501.

Crompton M and Costi A (1990) 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.

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

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

- Crow MT, Mani K, Nam YJ and Kitsis RN (2004) The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 95:957-970.
- Da Cruz S, Xenarios I, Langridge J, Vilbois F, Parone PA and Martinou JC (2003) Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 278:41566-41571.
- Das S, Wong R, Rajapakse N, Murphy E and Steenbergen C (2008) Glycogen synthase kinase 3 inhibition slows mitochondrial adenine nucleotide transport and regulates voltage-dependent anion channel phosphorylation. *Circ Res* 103:983-991.
- Di Lisa F and Bernardi P (2009) A CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition. *J Mol Cell Cardiol* 46:775-780.
- Di Lisa F, Carpi A, Giorgio V and Bernardi P (2011) The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 1813:1316-1322.
- Dikalov S, Griendling KK and Harrison DG (2007) Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 49:717-727.
- Downey JM, Davis AM and Cohen MV (2007) Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev* 12:181-188.
- Downey JM, Yellon (1992) Myocardial protection, the pathophysiology of reperfusion and reperfusion injury. New York: Raven press: 35-57,
- Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z and Schumacker PT (1998) Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273:11619-11624.
- Farbstein D, Kozak-Blickstein A and Levy AP Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease. *Molecules* 15:8098-8110.
- Fayard E, Tintignac LA, Baudry A and Hemmings BA (2005) Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci* 118:5675-5678.

Ferdinandy P, Schulz R and Baxter GF (2007) Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 59:418-458.

Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Alfieri O and Visioli O (1993) Myocardial damage during ischaemia and reperfusion. *Eur Heart J* 14 Suppl G:25-30.

Ferrera R, Bopassa JC, Angoulvant D and Ovize M (2007) Post-conditioning protects from cardioplegia and cold ischemia via inhibition of mitochondrial permeability transition pore. *J Heart Lung Transplant* 26:604-609.

Fontaine E, Eriksson O, Ichas F and Bernardi P (1998) 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.

Fontaine E, Ichas F and Bernardi P (1998) A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 273:25734-25740.

Forrat R, de Lorgeril M, Hadour G, Sebbag L, Delaye J and Ferrera R (1997) Effect of chronic oral supplementation with alpha-tocopherol on myocardial stunning in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 29:457-462.

Fryer RM, Pratt PF, Hsu AK and Gross GJ (2001) Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 296:642-649.

Fuglestad BN, Suleman N, Tiron C, Kanhema T, Lacerda L, Andreassen TV, Sack MN, Jonassen AK, Mjos OD, Opie LH and Lecour S (2008) Signal transducer and activator of transcription 3 is involved in the cardioprotective signalling pathway activated by insulin therapy at reperfusion. *Basic Res Cardiol* 103:444-453.

Fuks B, Talaga P, Huart C, Henichart JP, Bertrand K, Grimee R and Lorent G (2005) In vitro properties of 5-(benzylsulfonyl)-4-bromo-2-methyl-3(2H)-pyridazinone: a novel permeability transition pore inhibitor. *Eur J Pharmacol* 519:24-30.

Ganote CE and Armstrong SC (2003) Effects of CCCP-induced mitochondrial uncoupling and cyclosporin A on cell volume, cell injury and preconditioning protection of isolated rabbit cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 35:749-759.

Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ and Slater TF (1987) Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res* 61:757-760.

Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD and Paucek P (2003) Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 1606:1-21.

Garlid KD and Paucek P (2003) Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. *Biochim Biophys Acta* 1606:23-41.

Geisbuhler TP and Rovetto MJ (1990) Lactate does not enhance anoxia/reoxygenation damage in adult rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 22:1325-1335.

Golstein P and Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32:37-43.

Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G and Ovize M (2008) Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* 117:2761-2768.

Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV and Downey JM (1995) Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 77:611-621.

Gottlieb R (2005) ICE-ing the heart. *Circ Res* 96:1036-1038.

Gottlieb RA, Finley KD and Mentzer RM, Jr. (2009) Cardioprotection requires taking out the trash. *Basic Res Cardiol* 104:169-180.

Granville DJ and Gottlieb RA (2003) The mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC) as a therapeutic target for initiating cell death. *Curr Med Chem* 10:1527-1533.

Green DR (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121:671-674.

- Green DR and Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629.
- Griendling KK and FitzGerald GA (2003) Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 108:2034-2040.
- Griffiths EJ (2009) Mitochondrial calcium transport in the heart: physiological and pathological roles. *J Mol Cell Cardiol* 46:789-803.
- Griffiths EJ and Halestrap AP (1993) Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 25:1461-1469.
- Griffiths EJ and Halestrap AP (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 307 (Pt 1):93-98.
- Griffiths EJ, Ocampo CJ, Savage JS, Stern MD and Silverman HS (2000) Protective effects of low and high doses of cyclosporin A against reoxygenation injury in isolated rat cardiomyocytes are associated with differential effects on mitochondrial calcium levels. *Cell Calcium* 27:87-95.
- Gross ER and Gross GJ (2006) Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* 70:212-221.
- Gross ER, Hsu AK and Gross GJ (2004) Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res* 94:960-966.
- Gross ER, Hsu AK and Gross GJ (2006) The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H827-834.
- Gross ER, Hsu AK and Gross GJ (2007) GSK3beta inhibition and K(ATP) channel opening mediate acute opioid-induced cardioprotection at reperfusion. *Basic Res Cardiol* 102:341-349.
- Gurusamy N, Lekli I, Gorbunov NV, Gherghiceanu M, Popescu LM and Das DK (2009) Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein. *J Cell Mol Med* 13:373-387.

Halestrap AP (2010) A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans* 38:841-860.

Halestrap AP (2009) What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 46:821-831.

Halestrap AP and Brenner C (2003) The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* 10:1507-1525.

Halestrap AP, Clarke SJ and Javadov SA (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61:372-385.

Halestrap AP, Clarke SJ and Khaliulin I (2007) The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta* 1767:1007-1031.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edition. Oxford University press

Halliwell B and Gutteridge JM (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307:108-112.

Halpern HJ, Yu C, Barth E, Peric M and Rosen GM (1995) In situ detection, by spin trapping, of hydroxyl radical markers produced from ionizing radiation in the tumor of a living mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:796-800.

Hamacher-Brady A, Brady NR and Gottlieb RA (2006) The interplay between pro-death and pro-survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis meets autophagy. *Cardiovasc Drugs Ther* 20:445-462.

Hansson MJ, Mattiasson G, Mansson R, Karlsson J, Keep MF, Waldmeier P, Ruegg UT, Dumont JM, Besseghir K and Elmer E (2004) The nonimmunosuppressive cyclosporin analogs NIM811 and UNIL025 display nanomolar potencies on permeability transition in brain-derived mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 36:407-413.

Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N and Korsmeyer SJ (2001) p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9666-9670.

Hattori R, Maulik N, Otani H, Zhu L, Cordis G, Engelman RM, Siddiqui MA and Das DK (2001) Role of STAT3 in ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 33:1929-1936.

Hauet T, Han Z, Wang Y, Hameury F, Jayle C, Gibelin H, Goujon JM, Eugene M and Papadopoulos V (2002) Modulation of peripheral-type benzodiazepine receptor levels in a reperfusion injury pig kidney-graft model. *Transplantation* 74:1507-1515.

Hausenloy D, Wynne A, Duchen M and Yellon D (2004) Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation* 109:1714-1717.

Hausenloy DJ, Mocanu MM and Yellon DM (2004) Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 63:305-312.

Hausenloy DJ and Yellon DM (2004) New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 61:448-460.

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

Henry TD, Archer SL, Nelson D, Weir EK and From AH (1990) Enhanced chemiluminescence as a measure of oxygen-derived free radical generation during ischemia and reperfusion. *Circ Res* 67:1453-1461.

Hess ML and Manson NH (1984) Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 16:969-985.

Hetz C, Vitte PA, Bombrun A, Rostovtseva TK, Montessuit S, Hiver A, Schwarz MK, Church DJ, Korsmeyer SJ, Martinou JC and Antonsson B (2005) Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-

mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia. *J Biol Chem* 280:42960-42970.

Hirsch JD, Beyer CF, Malkowitz L, Beer B and Blume AJ (1989) Mitochondrial benzodiazepine receptors mediate inhibition of mitochondrial respiratory control. *Mol Pharmacol* 35:157-163.

Hochhauser E, Kivity S, Offen D, Maulik N, Otani H, Barhum Y, Pannet H, Shneyvays V, Shainberg A, Goldshtaub V, Tobar A and Vidne BA (2003) Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H2351-2359.

Horwitz LD, Fennessey PV, Shikes RH and Kong Y (1994) Marked reduction in myocardial infarct size due to prolonged infusion of an antioxidant during reperfusion. *Circulation* 89:1792-1801.

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

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

Imahashi K, Schneider MD, Steenbergen C and Murphy E (2004) Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 95:734-741.

Inoue I, Nagase H, Kishi K and Higuti T (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352:244-247.

Ishii H, Ichimiya S, Kanashiro M, Amano T, Imai K, Murohara T and Matsubara T (2005) Impact of a single intravenous administration of nicorandil before reperfusion in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circulation* 112:1284-1288.

Javadov S and Karmazyn M (2007) Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* 20:1-22.

Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA and Linn H (1960) Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 70:68-78.

Juhaszova M, Wang S, Zorov DB, Nuss HB, Gleichmann M, Mattson MP and Sollott SJ (2008) The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown. *Ann N Y Acad Sci* 1123:197-212.

Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN and Sollott SJ (2004) Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 113:1535-1549.

Juhaszova M, Zorov DB, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S and Sollott SJ (2009) Role of glycogen synthase kinase-3 β in cardioprotection. *Circ Res* 104:1240-1252.

Jungas T, Motta I, Duffieux F, Fanen P, Stoven V and Ojcius DM (2002) Glutathione levels and BAX activation during apoptosis due to oxidative stress in cells expressing wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 277:27912-27918.

Kadono T, Zhang XQ, Srinivasan S, Ishida H, Barry WH and Benjamin IJ (2006) CRYAB and HSPB2 deficiency increases myocyte mitochondrial permeability transition and mitochondrial calcium uptake. *J Mol Cell Cardiol* 40:783-789.

Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.

Kim JS, Jin Y and Lemasters JJ (2006) Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H2024-2034.

Kinnally KW and Antonsson B (2007) A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* 12:857-868.

Kirshenbaum LA and Singal PK (1992) Antioxidant changes in heart hypertrophy: significance during hypoxia-reoxygenation injury. *Can J Physiol Pharmacol* 70:1330-1335.

Kirshenbaum LA and Singal PK (1992) Changes in antioxidant enzymes in isolated cardiac myocytes subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lab Invest* 67:796-803.

Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H, Hamasaki T, Seguchi O, Myoishi M, Minamino T, Ohara T, Nagai Y, Nanto S, Watanabe K, Fukuzawa S, Hirayama A, Nakamura N, Kimura K, Fujii K, Ishihara M, Saito Y, Tomoike H and Kitamura S (2007) Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet* 370:1483-1493.

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

Korshunov SS, Skulachev VP and Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416:15-18.

Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF and Vercesi AE (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 47:333-343.

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

Krueger KE and Papadopoulos V (1990) Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 265:15015-15022.

Laskey WK (2005) Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv* 65:361-367.

Laurindo FR, Fernandes DC and Santos CX (2008) Assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation products. *Methods Enzymol* 441:237-260.

Lauzier B, Sicard P, Bouchot O, Delemasure S, Menetrier F, Moreau D, Vergely C and Rochette L (2007) After four hours of cold ischemia and cardioplegic protocol, the heart can still be rescued with postconditioning. *Transplantation* 84:1474-1482.

Lebuffe G, Schumacker PT, Shao ZH, Anderson T, Iwase H and Vanden Hoek TL (2003) ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H299-308.

Lecour S (2009) Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol* 47:32-40.

Lecour S, Rochette L and Opie L (2005) Free radicals trigger TNF alpha-induced cardioprotection. *Cardiovasc Res* 65:239-243.

Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B and Opie LH (2005) Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation* 112:3911-3918.

Leducq N, Bono F, Sulpice T, Vin V, Janiak P, Fur GL, O'Connor SE and Herbert JM (2003) Role of peripheral benzodiazepine receptors in mitochondrial, cellular, and cardiac damage induced by oxidative stress and ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 306:828-837.

Lemasters JJ, DiGuiseppi J, Nieminen AL and Herman B (1987) Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 325:78-81.

Lenartowicz E, Bernardi P and Azzone GF (1991) Phenylarsine oxide induces the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 23:679-688.

Leung AW, Varanyuwatana P and Halestrap AP (2008) The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem* 283:26312-26323.

Levine B and Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132:27-42.

Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA and Downey JM (1991) Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 84:350-356.

Liu Y, Fiskum G and Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80:780-787.

Lorgis L, Fayard M, Dentan G, Richard C, Buffet P, L'Huillier I, Mock L, Ravisy J, Zeller M and Cottin Y (2010) Clinical predictors of successful thrombectomy with the Export(R) aspiration catheter in the acute phase of myocardial infarction. Data from the RICO survey working group. *Arch Cardiovasc Dis* 103:522-529.

Maddaford TG, Hurtado C, Sobrattee S, Czubyrt MP and Pierce GN (1999) A model of low-flow ischemia and reperfusion in single, beating adult cardiomyocytes. *Am J Physiol* 277:H788-798.

Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata NA, DiCarli MF, Leeser MA, Browne KF, Eisenberg PR, Bolli R, Casas AC, Molina-Viamonte V, Orlandi C, Blevins R, Gibbons RJ, Califf RM and Granger CB (1999) Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of ADenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol* 34:1711-1720.

Marzilli M, Orsini E, Marraccini P and Testa R (2000) Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction. *Circulation* 101:2154-2159.

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC and Kroemer G (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187:1261-1271.

Mathupala SP, Ko YH and Pedersen PL (2006) Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* 25:4777-4786.

Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE, 3rd, Deaton D and Das DK (1999) Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation* 100:II369-375.

McStay GP, Clarke SJ and Halestrap AP (2002) Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem J* 367:541-548.

Mocanu MM, Bell RM and Yellon DM (2002) PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 34:661-668.

Montecucco F, Lenglet S, Braunersreuther V, Burger F, Pelli G, Bertolotto M, Mach F and Steffens S (2009) CB(2) cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a mouse model of ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 46:612-620.

Morin D, Assaly R, Paradis S and Berdeaux A (2009) Inhibition of mitochondrial membrane permeability as a putative pharmacological target for cardioprotection. *Curr Med Chem* 16:4382-4398.

Morin D, Hauet T, Spedding M and Tillement J (2001) Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 49:151-174.

Muhling J, Gonter J, Nickolaus KA, Matejec R, Welters ID, Wolff M, Sablotzki A, Engel J, Krull M, Menges T, Fuchs M, Dehne MG and Hempelmann G (2005) Benzodiazepine receptor-dependent modulation of neutrophil (PMN) free amino- and alpha-keto acid profiles or immune functions. *Amino Acids* 28:85-98.

Murphy E, Perlman M, London RE and Steenbergen C (1991) Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res* 68:1250-1258.

Murphy E and Steenbergen C (2008) Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 88:581-609.

Murphy MP (2008) Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1777:1028-1031.

- Murry CE, Jennings RB and Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-1136.
- Nakano A, Baines CP, Kim SO, Pelech SL, Downey JM, Cohen MV and Critz SD (2000) Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart: evidence for involvement of p38 MAPK. *Circ Res* 86:144-151.
- Nazareth W, Yafei N and Crompton M (1991) Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *J Mol Cell Cardiol* 23:1351-1354.
- Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, Funamoto M, Darville MI, Eizirik DL, Osugi T, Izumi M, Oshima Y, Nakaoka Y, Hirota H, Kishimoto T and Yamauchi-Takahara K (2001) Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation* 104:979-981.
- Negoro S, Kunisada K, Tone E, Funamoto M, Oh H, Kishimoto T and Yamauchi-Takahara K (2000) Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 47:797-805.
- Nicotera P, Leist M and Ferrando-May E (1998) Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 102-103:139-142.
- Nishino Y, Webb IG, Davidson SM, Ahmed AI, Clark JE, Jacquet S, Shah AM, Miura T, Yellon DM, Avkiran M and Marber MS (2008) Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the mouse. *Circ Res* 103:307-314.
- Noji H, Yasuda R, Yoshida M and Kinosita K, Jr. (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* 386:299-302.
- Nulton-Persson AC and Szweda LI (2001) Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 276:23357-23361.

Oakes SA, Opferman JT, Pozzan T, Korsmeyer SJ and Scorrano L (2003) Regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Pharmacol* 66:1335-1340.

Obame FN, Plin-Mercier C, Assaly R, Zini R, Dubois-Rande JL, Berdeaux A and Morin D (2008) Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 beta, SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Pharmacol Exp Ther* 326:252-258.

Obame FN, Zini R, Souktani R, Berdeaux A and Morin D (2007) Peripheral benzodiazepine receptor-induced myocardial protection is mediated by inhibition of mitochondrial membrane permeabilization. *J Pharmacol Exp Ther* 323:336-345.

Ono H, Osanai T, Ishizaka H, Hanada H, Kamada T, Onodera H, Fujita N, Sasaki S, Matsunaga T and Okumura K (2004) Nicorandil improves cardiac function and clinical outcome in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: role of inhibitory effect on reactive oxygen species formation. *Am Heart J* 148:E15.

Orient A, Donko A, Szabo A, Leto TL and Geiszt M (2007) Novel sources of reactive oxygen species in the human body. *Nephrol Dial Transplant* 22:1281-1288.

O'Rourke B (2004) Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res* 94:420-432.

O'Rourke B (2007) Mitochondrial ion channels. *Annu Rev Physiol* 69:19-49.

Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM and Schulz R (2010) Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 87:406-423.

Papadopoulos V (2003) Peripheral benzodiazepine receptor: structure and function in health and disease. *Ann Pharm Fr* 61:30-50.

Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR and Gavish M (2006) Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 27:402-409.

Park SS, Zhao H, Mueller RA and Xu Z (2006) Bradykinin prevents reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through glycogen synthase kinase 3beta. *J Mol Cell Cardiol* 40:708-716.

Pastorino JG and Hoek JB (2008) Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 40:171-182.

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD and Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122:927-939.

Peart JN, Gross ER, Reichelt ME, Hsu A, Headrick JP and Gross GJ (2008) Activation of kappa-opioid receptors at reperfusion affords cardioprotection in both rat and mouse hearts. *Basic Res Cardiol* 103:454-463.

Penna C, Mancardi D, Rastaldo R and Pagliaro P (2009) Cardioprotection: a radical view Free radicals in pre and postconditioning. *Biochim Biophys Acta* 1787:781-793.

Penna C, Perrelli MG, Raimondo S, Tullio F, Merlino A, Moro F, Geuna S, Mancardi D and Pagliaro P (2009) Postconditioning induces an anti-apoptotic effect and preserves mitochondrial integrity in isolated rat hearts. *Biochim Biophys Acta* 1787:794-801.

Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P and Di Lisa F (1999) 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.

Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P and Di Lisa F (2001) 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.

Pham FH, Sugden PH and Clerk A (2000) Regulation of protein kinase B and 4E-BP1 by oxidative stress in cardiac myocytes. *Circ Res* 86:1252-1258.

Philipp S, Yang XM, Cui L, Davis AM, Downey JM and Cohen MV (2006) Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res* 70:308-314.

Ping P, Takano H, Zhang J, Tang XL, Qiu Y, Li RC, Banerjee S, Dawn B, Balafonova Z and Bolli R (1999) Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia-induced preconditioning. *Circ Res* 84:587-604.

Ping P, Zhang J, Cao X, Li RC, Kong D, Tang XL, Qiu Y, Manchikalapudi S, Auchampach JA, Black RG and Bolli R (1999) PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits. *Am J Physiol* 276:H1468-1481.

Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, Andre-Fouet X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G and Ovize M (2008) Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 359:473-481.

Poizat C, Keriell C and Cuchet P (1994) Is oxygen supply sufficient to induce normoxic conditions in isolated rat heart? *Basic Res Cardiol* 89:535-544.

Polster BM, Basanez G, Young M, Suzuki M and Fiskum G (2003) Inhibition of Bax-induced cytochrome c release from neural cell and brain mitochondria by dibucaine and propranolol. *J Neurosci* 23:2735-2743.

Possel H, Noack H, Augustin W, Keilhoff G and Wolf G (1997) 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Lett* 416:175-178.

Qian T, Nieminen AL, Herman B and Lemasters JJ (1997) Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 273:C1783-1792.

Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD and Freeman BA (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 266:22028-22034.

Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA, Jr., Tweddell JS and Baker JE (2005) Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol* 100:187-197.

Rajesh KG, Sasaguri S, Ryoko S and Maeda H (2003) Mitochondrial permeability transition-pore inhibition enhances functional recovery after long-time hypothermic heart preservation. *Transplantation* 76:1314-1320.

Rajesh KG, Sasaguri S, Suzuki R and Maeda H (2003) Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability transition pore and upregulates Bcl-2 expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2171-2178.

Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM and Jennings RB (1977) The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56:786-794.

Robin E, Guzy RD, Loor G, Iwase H, Waypa GB, Marks JD, Hoek TL and Schumacker PT (2007) Oxidant stress during simulated ischemia primes cardiomyocytes for cell death during reperfusion. *J Biol Chem* 282:19133-19143.

Rochette L, Tatou E, Maupoil V, Zeller M, Cottin Y, Jazayeri S, Brenot R, Girard C, David M and Vergely C (2011) Atrial and vascular oxidative stress in patients with heart failure. *Cell Physiol Biochem* 27:497-502.

Rochette L, Vergely C (2008) Forgotten Radicals in Biology. *Int J Biomed Sci* 4 (4):255-259

Rochette L and Maupoil V (1993) [From ischemia to reperfusion lesions]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 86 Spec No 4:13-17.

Rojo M, Hovius R, Demel RA, Nicolay K and Wallimann T (1991) Mitochondrial creatine kinase mediates contact formation between mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 266:20290-20295.

Rose H and Kammermeier H (1986) Contraction and metabolic activity of electrically stimulated cardiac myocytes from adult rats. *Pflugers Arch* 407:116-118.

Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA and Alexander RW (2005) A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol* 45:1775-1780.

Rothermel BA and Hill JA (2008) Autophagy in load-induced heart disease. *Circ Res* 103:1363-1369.

Rouslin W, MacGee J, Gupte S, Wesselman A and Epps DE (1982) Mitochondrial cholesterol content and membrane properties in porcine myocardial ischemia. *Am J Physiol* 242:H254-259.

Rumsey WL, Schlosser C, Nuutinen EM, Robiolio M and Wilson DF (1990) Cellular energetics and the oxygen dependence of respiration in cardiac myocytes isolated from adult rat. *J Biol Chem* 265:15392-15402.

Samavati L, Monick MM, Sanlioglu S, Buettner GR, Oberley LW and Hunninghake GW (2002) Mitochondrial K(ATP) channel openers activate the ERK kinase by an oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C273-281.

Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B and Marban E (2000) Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation* 101:439-445.

Sawada GA, Raub TJ, Decker DE and Buxser SE (1996) Analytical and numerical techniques for the evaluation of free radical damage in cultured cells using scanning laser microscopy. *Cytometry* 25:254-262.

Schaller S, Paradis S, Ngoh GA, Assaly R, Buisson B, Drouot C, Ostuni MA, Lacapere JJ, Bassissi F, Bordet T, Berdeaux A, Jones SP, Morin D and Pruss RM (2010) TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther* 333:696-706.

Schneider S, Chen W, Hou J, Steenbergen C and Murphy E (2001) Inhibition of p38 MAPK alpha/beta reduces ischemic injury and does not block protective effects of preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H499-508.

Schwanke U, Konietzka I, Duschin A, Li X, Schulz R and Heusch G (2002) No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1740-1742.

Seguchi H, Ritter M, Shizukuishi M, Ishida H, Chokoh G, Nakazawa H, Spitzer KW and Barry WH (2005) Propagation of Ca²⁺ release in cardiac myocytes: role of mitochondria. *Cell Calcium* 38:1-9.

Shanmuganathan S, Hausenloy DJ, Duchon MR and Yellon DM (2005) Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H237-242.

Shao ZH, Sharp WW, Wojcik KR, Li CQ, Han M, Chang WT, Ramachandran S, Li J, Hamann KJ and Vanden Hoek TL (2011) Therapeutic hypothermia cardioprotection via Akt- and nitric oxide-mediated attenuation of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298:H2164-2173.

Sharov VG, Todor A, Khanal S, Imai M and Sabbah HN (2007) Cyclosporine A attenuates mitochondrial permeability transition and improves mitochondrial respiratory function in cardiomyocytes isolated from dogs with heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 42:150-158.

Shimizu N, Yoshiyama M, Omura T, Hanatani A, Kim S, Takeuchi K, Iwao H and Yoshikawa J (1998) Activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 in myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res* 38:116-124.

Skulachev VP (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363:100-124.

Skyschally A, Schulz R and Heusch G (2010) Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs. *Cardiovasc Drugs Ther* 24:85-87.

Smith RM, Suleman N, McCarthy J and Sack MN (2002) Classic ischemic but not pharmacologic preconditioning is abrogated following genetic ablation of the TNFalpha gene. *Cardiovasc Res* 55:553-560.

Solaini G and Harris DA (2005) Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J* 390:377-394.

Souktani R, Pons S, Guegan C, Bouhidel O, Bruneval P, Zini R, Mandet C, Onteniente B, Berdeaux A and Ghaleh B (2009) Cardioprotection against myocardial infarction with PTD-BIR3/RING, a XIAP mimicking protein. *J Mol Cell Cardiol* 46:713-718.

Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, Andre-Fouet X and Ovize M (2005) Postconditioning the human heart. *Circulation* 112:2143-2148.

Starkov AA and Fiskum G (2003) Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J Neurochem* 86:1101-1107.

Stephanou A, Brar B, Liao Z, Scarabelli T, Knight RA and Latchman DS (2001) Distinct initiator caspases are required for the induction of apoptosis in cardiac myocytes during ischaemia versus reperfusion injury. *Cell Death Differ* 8:434-435.

Suleman N, Somers S, Smith R, Opie LH and Lecour SC (2008) Dual activation of STAT-3 and Akt is required during the trigger phase of ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 79:127-133.

Sun HY, Wang NP, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J and Zhao ZQ (2006) Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis* 11:1583-1593.

Szeto HH (2008) Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury. *Antioxid Redox Signal* 10:601-619.

Tang XL, Takano H, Rizvi A, Turrens JF, Qiu Y, Wu WJ, Zhang Q and Bolli R (2002) Oxidant species trigger late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H281-291.

Teshima Y, Akao M, Jones SP and Marban E (2003) Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res* 93:192-200.

Theroux P, Chaitman BR, Danchin N, Erhardt L, Meinertz T, Schroeder JS, Tognoni G, White HD, Willerson JT and Jessel A (2000) Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators. *Circulation* 102:3032-3038.

Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit JF, Finet G, Andre-Fouet X, Macia JC, Raczka F, Rossi R, Itti R, Kirkorian G, Derumeaux G and Ovize M (2008) Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* 117:1037-1044.

Thomas C, Mackey MM, Diaz AA and Cox DP (2009) Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep* 14:102-108.

Tong H, Chen W, Steenbergen C and Murphy E (2000) Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res* 87:309-315.

Tong H, Imahashi K, Steenbergen C and Murphy E (2002) Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res* 90:377-379.

Tong H, Rockman HA, Koch WJ, Steenbergen C and Murphy E (2004) G protein-coupled receptor internalization signaling is required for cardioprotection in ischemic preconditioning. *Circ Res* 94:1133-1141.

Townsend PA, Davidson SM, Clarke SJ, Khaliulin I, Carroll CJ, Scarabelli TM, Knight RA, Stephanou A, Latchman DS and Halestrap AP (2007) Urocortin prevents mitochondrial permeability transition in response to reperfusion injury indirectly by reducing oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H928-938.

Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM and Yellon DM (2004) Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 95:230-232.

Tsujita K, Shimomura H, Kaikita K, Kawano H, Hokamaki J, Nagayoshi Y, Yamashita T, Fukuda M, Nakamura Y, Sakamoto T, Yoshimura M and Ogawa H (2006) Long-term efficacy of edaravone in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 70:832-837.

Uchiyama T, Engelman RM, Maulik N and Das DK (2004) Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning. *Circulation* 109:3042-3049.

Vahlhaus C, Schulz R, Post H, Rose J and Heusch G (1998) Prevention of ischemic preconditioning only by combined inhibition of protein kinase C and protein tyrosine kinase in pigs. *J Mol Cell Cardiol* 30:197-209.

van der Vusse GJ, Glatz JF, Stam HC and Reneman RS (1992) Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev* 72:881-940.

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

Varanyuwatana P and Halestrap AP The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore (2011). *Mitochondrion* May 8 [Epub ahead of print]

Veenman L and Gavish M (2006) The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implications for drug development. *Pharmacol Ther* 110:503-524.

Vergely C and Rochette L (2003) Stress oxidant dans le domaine cardiovasculaire. *Medecine Thérapeutique Cardiologie* 1(3):31-9.

Venter H, Genade S, Mouton R, Huisamen B, Harper IS and Lochner A (1991) Myocardial membrane cholesterol: effects of ischaemia. *J Mol Cell Cardiol* 23:1271-1286.

Venturini I, Zeneroli ML, Corsi L, Avallone R, Farina F, Alho H, Baraldi C, Ferrarese C, Pecora N, Frigo M, Ardizzone G, Arrigo A, Pellicci R and Baraldi M (1998) Up-regulation of peripheral benzodiazepine receptor system in hepatocellular carcinoma. *Life Sci* 63:1269-1280.

Vidal-Puig AJ (2000) Uncoupling expectations. *Nat Genet* 26:387-388.

Vieira HL, Belzacq AS, Haouzi D, Bernassola F, Cohen I, Jacotot E, Ferri KF, El Hamel C, Bartle LM, Melino G, Brenner C, Goldmacher V and Kroemer G (2001) The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal. *Oncogene* 20:4305-4316.

Vysokikh MY and Brdiczka D (2003) The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 50:389-404.

Wang W, Fang H, Groom L, Cheng A, Zhang W, Liu J, Wang X, Li K, Han P, Zheng M, Yin J, Wang W, Mattson MP, Kao JP, Lakatta EG, Sheu SS, Ouyang K, Chen J, Dirksen RT and Cheng H (2008) Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 134:279-290.

Whelan RS, Kaplinskiy V and Kitsis RN (2010) Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 72:19-44.

Xuan YT, Guo Y, Han H, Zhu Y and Bolli R (2001) An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9050-9055.

Yan L, Vatner DE, Kim SJ, Ge H, Masurekar M, Massover WH, Yang G, Matsui Y, Sadoshima J and Vatner SF (2005) Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13807-13812.

Yang XC, Liu Y, Wang LF, Cui L, Wang T, Ge YG, Wang HS, Li WM, Xu L, Ni ZH, Liu SH, Zhang L, Jia HM, Vinten-Johansen J and Zhao ZQ (2007) Reduction in myocardial infarct size by postconditioning in patients after percutaneous coronary intervention. *J Invasive Cardiol* 19:424-430.

Yellon DM and Hausenloy DJ (2007) Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 357:1121-1135.

Yellon DM and Downey JM (2003) Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 83:1113-1151.

Yue Y, Qin Q, Cohen MV, Downey JM and Critz SD (2002) The relative order of mK(ATP) channels, free radicals and p38 MAPK in preconditioning's protective pathway in rat heart. *Cardiovasc Res* 55:681-689.

Zacks MA, Wen JJ, Vyatkina G, Bhatia V and Garg N (2005) An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *An Acad Bras Cienc* 77:695-715.

Zatta AJ, Kin H, Lee G, Wang N, Jiang R, Lust R, Reeves JG, Mykytenko J, Guyton RA, Zhao ZQ and Vinten-Johansen J (2006) Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovasc Res* 70:315-324.

Zhao K, Zhao GM, Wu D, Soong Y, Birk AV, Schiller PW and Szeto HH (2004) Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J Biol Chem* 279:34682-34690.

Zielonka J and Kalyanaraman B (2010) Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radic Biol Med* 48:983-1001.

Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S and Sollott SJ (2009) Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 83:213-225.

Zorov DB, Kobrinsky E, Juhaszova M and Sollott SJ (2004) Examining intracellular organelle function using fluorescent probes: from animalcules to quantum dots. *Circ Res* 95:239-252.

Zucchi R, Ronca F and Ronca-Testoni S (2001) Modulation of sarcoplasmic reticulum function: a new strategy in cardioprotection? *Pharmacol Ther* 89:47-65.

PROTECTION DU MYOCARDE ISCHEMIQUE

et

PORE GEANT MITOCHONDRIAL :

APPLICATIONS PHARMACOLOGIQUES

◆ Résumé de la thèse

Dans ce travail, nous avons mis au point un modèle *in vitro* d'hypoxie/réoxygénation sur des cardiomyocytes de rats adultes qui nous a permis de montrer qu'un seuil de production des espèces réactives de l'oxygène pendant l'hypoxie, plus particulièrement l'anion hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène, est nécessaire à l'ouverture du pore géant mitochondrial à la réoxygénation. Nous avons ensuite étudié grâce à ce modèle le mécanisme d'action de deux stratégies pharmacologiques cardioprotectrices.

◆ Mots clés

Cardiomyocytes adultes, Cardioprotection, Espèces Réactives d'Oxygène, Hypoxie/Réoxygénation, Mort Cellulaire, Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale

◆ Laboratoire de rattachement

Institut Mondor de Recherche Biomédicale
INSERM U955, équipe 03, Laboratoire de Pharmacologie
Faculté de Médecine de Paris-Est
8, rue du Général Sarrail
94010 Créteil.

◆ PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex