



HAL
open science

**Muscle squelettique et ischémie-reperfusion
expérimentale des membres : mécanismes impliqués dans
la protection ou les effets délétères de la cyclosporine et
facteurs limitant les conditionnements pharmacologique
et ischémique**

Julien Pottecher

► **To cite this version:**

Julien Pottecher. Muscle squelettique et ischémie-reperfusion expérimentale des membres : mécanismes impliqués dans la protection ou les effets délétères de la cyclosporine et facteurs limitant les conditionnements pharmacologique et ischémique. Santé publique et épidémiologie. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ119 . tel-00871846

HAL Id: tel-00871846

<https://theses.hal.science/tel-00871846>

Submitted on 10 Oct 2013

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.

Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Mitochondries, Stress Oxydant et Protection Musculaire – EA 3072

Année universitaire 2011/2012

N° attribué par la bibliothèque :

Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant

Domaine : Physiologie et Biologie des Organismes, Populations Interactions

**MUSCLE SQUELETTIQUE ET ISCHEMIE-REPERFUSION
EXPERIMENTALE DES MEMBRES : MECANISMES IMPLIQUES
DANS LA PROTECTION OU LES EFFETS DELETERES DE LA
CYCLOSPORINE ET FACTEURS LIMITANT LES
CONDITIONNEMENTS PHARMACOLOGIQUE ET ISCHEMIQUE**

Présentée et soutenue publiquement par

Julien POTTECHER

Le 17 Septembre 2012

Membres du jury :

Rapporteur Externe :	Professeur Pierre ABRAHAM	Angers
Rapporteur Externe :	Professeur Xavier CAPDEVILA	Montpellier
Rapporteur Interne :	Professeur Laurence KESSLER	Strasbourg
Examineur Externe :	Professeur Eric STEINMETZ	Dijon
Co-Directeur de Thèse :	Professeur Pierre DIEMUNSCH	Strasbourg
Directeur de Thèse :	Professeur Bernard GENY	Strasbourg

Remerciements

A mon épouse pour son soutien de tous les instants

A mes filles pour l'énergie qu'elles me procurent

A mes parents pour m'avoir guidé sur la voie de l'effort et des progrès

Au Professeur Pierre Diemunsch pour ses conseils précieux, son infatigable soif de savoir et son expérience dans les moments les plus cruciaux

Au Professeur Bernard Geny pour m'avoir fait confiance et m'avoir mené aux confins du fonctionnement énergétique cellulaire

Au Dr Max Guillot pour nos aurores de manips

Au Dr Anne-Laure Charles pour sa disponibilité, sa gentillesse et son dévouement

Au Dr Jamal Bouitbir pour sa patience, son enthousiasme et sa rigueur

Au Dr Joffrey Zoll pour ses conseils stratégiques

Au Dr Ziad Mansour et au Dr Anne Lejay pour leur « patte chirurgicale »

Au Dr Thien Nga Tran et au Dr Maryse Hengen pour leur aide efficace et précieuse

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	3
RESUME.....	8
ABSTRACT	10
ABBREVIATIONS	12
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	14
PREAMBULE	18
INTRODUCTION GENERALE	20
1. LE MUSCLE ET LA MITOCHONDRIE	21
1.1. Le muscle squelettique	21
1.2. Phosphorylation oxydative	29
1.3. Le couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique.....	30
1.4. Structure et distribution des mitochondries dans la cellule musculaire.....	33
1.5. Fonctionnement de la mitochondrie	35
1.6. Régulation transcriptionnelle mitochondriale	40
2. LE STRESS OXYDANT ET L'ISCHEMIE-REPERFUSION	46
2.1. Introduction	46
2.2. Différentes formes de radicaux libres.....	46
2.3. Source cellulaire des radicaux libres	47
2.4. Systèmes antioxydants.....	51
2.5. Dégâts cellulaires et mitohormesis	53
2.6. L'apoptose	57

3. ISCHÉMIE, REPERFUSION, EFFETS LOCAUX ET A DISTANCE	60
3.1. Ischémie.....	60
3.2. Reperfusion.....	62
3.3. Effets à distance de l'ischémie et de la reperfusion.....	67
4. CONDITIONNEMENTS	70
4.1. Conditionnements ischémiques	71
4.2. Conditionnement pharmacologique.....	82
5. DEUX CIRCONSTANCES DANS LESQUELLES LES CONDITIONNEMENTS PHARMACOLOGIQUE ET ISCHEMIQUE SONT MOINS EFFICACES : LE DIABETE ET L'ÂGE AVANCE.....	90
5.1. Diabète.....	90
5.2. Âge avancé	96
MATERIEL ET METHODES.....	97
1. MODELES UTILISES DURANT CETTE THESE	98
1.1. Animaux	98
1.2. Protocole anesthésique	99
1.3. Techniques opératoires	99
1.4. Protocole expérimental	100
2. TECHNIQUES	101
2.1. Protocole d'étude de la respiration mitochondriale.....	101
2.2. Mesure de l'expression musculaire de cyclophiline D par méthode de Western Blot	103
2.3. Détection des radicaux libres tissulaires.....	103
2.4. Mesure de la capacité de rétention calcique (CRC) sur fibres fantomisées	105
2.5. Mesure des concentrations plasmatiques de cyclosporine.....	106
3. STATISTIQUES	106
RESULTATS	107

1. Protocole 1 : Effets de la cyclosporine lors de l'ischémie-reperfusion des membres inférieurs induite par clampage aortique chez des rats jeunes indemnes de pathologie.	108
Protocole 2 : Effets de la cyclosporine lors de l'ischémie-reperfusion des membres inférieurs induite par clampage aortique chez des rats atteints de diabète de type I	109
Protocole 3 : Effets de la cyclosporine lors de l'ischémie-reperfusion d'un membre inférieur induite par application d'un garrot chez des rats âgés.....	110
DISCUSSION GENERALE	111
1. ISCHEMIE-REPERFUSION DES MEMBRES INFERIEURS ET	
CONDITIONNEMENTS ISCHEMIQUES.....	112
1.1 Pertinence du modèle expérimental.....	112
1.2 Conditionnement ischémique.	113
2. CYCLOSPORINE ET ISCHEMIE-REPERFUSION DES MEMBRES INFERIEURS ...	115
2.1 Conditionnement pharmacologique par cyclosporine chez l'animal indemne de pathologie	115
2.2. Facteurs pouvant limiter l'efficacité de la cyclosporine : diabète et âge.	121
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	130
BIBLIOGRAPHIE	132
ANNEXES.....	158

Publications issues de ce travail faisant l'objet de la thèse :

▪ ***Publications originales***

○ *Chapitre de Livre :*

- Guillot M, **Pottecher J**, Helms-Boisramé J, Meyer A, Charles A.L., Mansour Z, Zoll J, Geny B. Involvement of Inflammation on Skeletal Muscle Ischemia-Reperfusion Deleterious Effects. *In : Skeletal Muscle: Physiology, Classification and Disease*. Editor : Dr Mark Willems ; Nova Science Publishers, Inc.

▪ ***Articles soumis***

○ *Articles originaux :*

- **Pottecher J**, Guillot M, Belaidi E, Charles A.L., Lejay A, Gharib A, Diemunsch P, Geny B. Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling and ROS production and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg, en révision*
- **Pottecher J**, Guillot M, Mansour Z, Damgé C, Lejay A, Kemmel V, Bouitbir J, Charles AL, Zoll J, Diemunsch P, Geny B. Type I diabetes exacerbates ischemia-reperfusion induced mitochondrial injury and oxidative stress in rat skeletal muscle and abrogates cyclosporine A myoprotection. *Diabetologia, en cours de soumission*
- **Pottecher J**, Tran TN, Charles A.L., Hoang-Minh T, Hengen M, Kemmel V, Zoll J, Diemunsch P, Geny B. Cyclosporine A does not protect skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury in the aging rat but further exacerbates oxidative stress. *Aging en préparation*
- **Pottecher J**, Mansour Z, Guillot M, Charles A.L., Zoll J, Diemunsch P, Geny B. Why do ischemic and pharmacologic conditioning fail to protect myocardic and skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury in the clinical setting? *En préparation*

▪ ***Communications orales***

- **Pottecher J**, Belaidi E, Charles A-L, Guillot M, Bouitbir J, Collange O, Lejay A, Zoll J, Diemunsch P, Gharib A, Geny B. *Cyclosporine normalizes oxidative stress and partially protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion induced mitochondrial dysfunction: an involvement of cyclophillin D ?* Joint Congress of Federation of European Physiology Societies and Turkish Society of Physiological Sciences September 3-7 2011 Yeditepe – Istanbul / Turkey
- **Pottecher J**, Guillot M, Lang A-L, Bouitbir J, Mansour Z, Lejay A, Guilbert A-S, Thaveau F, Collange O, Zoll J, Diemunsch P, Geny B. *Effects of cyclosporin postconditioning on local and remote ischemia-reperfusion injury in rats undergoing*

aortic cross-clamping. 23rd ESICM Annual Congress – Barcelona, Spain – 9–13 October 2010

- Pottecher J, Guillot M, Lejay A, Charles A-L, Bouitbir J, Mansour Z, Collange O, Zoll J, Diemunsch P, Geny B. *Ischémie-reperfusion musculaire dans un modèle de chirurgie aortique chez le rat : effets mitochondriaux d'un postconditionnement par cyclosporine*. Congrès national de la SFAR septembre 2011
- Pottecher J, Guillot M, Dange C, Charles A-L, Bouitbir J, Mansour Z, Collange O, Zoll J, Diemunsch P, Geny B. *Ischémie-reperfusion musculaire dans un modèle de chirurgie aortique chez le rat : effets mitochondriaux du diabète de type I*. Congrès national de la SFAR septembre 2011

- **Communications affichées**
- Pottecher J, Dange C, Bouitbir J, Geny B, Diemunsch P. *Mitochondrial effects of insulin-dependent diabetes mellitus on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury during aortic cross-clamping*. ASA Annual Meeting Chicago October 15-19 2011
- Pottecher J, Guillot M, Charles A-L, Geny B, Diemunsch P. *Skeletal muscle ischemia-reperfusion in an experimental aortic cross-clamping model: mitochondrial effects of cyclosporin postconditioning*. ASA Annual Meeting Chicago October 15-19 2011

Publications associées à ce travail ne faisant pas l'objet de la thèse :

▪ **Publications originales**

○ *Articles originaux :*

- Mansour Z, Bouitbir J, Charles AL, Talha S, Kindo M, **Pottecher J**, Zoll J, Geny B. *Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping*. J Vasc Surg. 2012; 55(2):497-505.
- Mansour Z, Charles AL, Bouitbir J, **Pottecher J**, Kindo M, Mazzucotelli JP, Zoll J, Geny B. *Remote and local ischemic post-conditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia-reperfusion*. J Vasc Surg 2012; *in press*.
- Mansour Z, Kindo M, **Pottecher J**, Bouitbir J, Charles AL, Talha S, Zoll J, Geny B. *Reply: Time to delay clinical application of ischemic pre-conditioning during vascular surgery?* J Vasc Surg 2012; *in press*

RESUME

Le muscle strié squelettique subit de graves lésions d'ischémie-reperfusion (IR) au cours de la progression de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs et lors d'interventions chirurgicales qui nécessitent l'interruption transitoire du flux sanguin dans les artères des membres.

Il est possible de limiter ces lésions et notre équipe a pu démontrer que le pré- et le postconditionnement ischémiques limitaient les lésions d'IR en réduisant la dysfonction mitochondriale et la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS). Néanmoins pré- et postconditionnement ischémiques ne constituent pas encore la parade ultime aux lésions d'IR et ceci pour au moins deux raisons :

- (1) ils nécessitent d'occlure puis de rouvrir mécaniquement le vaisseau nourricier qui peut donc se trouver lésé expliquant peut être l'aggravation des lésions d'IR musculaire récemment mises en évidence par notre équipe chez la souris
- (2) l'application humaine des résultats très positifs du postconditionnement ischémique myocardique obtenus dans les modèles expérimentaux n'a pas apporté les bénéfices cliniques escomptés. Il est probable que les comorbidités des patients souffrant d'ischémie myocardique aiguë (diabète, âge, hypertension) s'opposent aux effets protecteurs du conditionnement.

Dans ce contexte, nos objectifs étaient de mettre à profit deux modèles expérimentaux d'IR des membres inférieurs par clampage aortique et garrotage unilatéral pour :

- (1) tester l'efficacité d'une alternative médicamenteuse au postconditionnement ischémique par l'utilisation de la cyclosporine A (CsA). En se liant à la cyclophiline D, la CsA empêche l'ouverture du pore de transition mitochondrial (mPTP) à un niveau très distal de la cascade d'évènements qui conduit à la nécrose après IR.
- (2) déterminer de quelle façon deux comorbidités fréquemment retrouvées chez des patients souffrant d'atteinte artérielle (le diabète et l'âge) influencent l'effet de la cyclosporine

Nos travaux démontrent que :

- 1) Les modèles expérimentaux d'IR des membres inférieurs par clampage aortique et garrotage unilatéral de patte (3 heures d'ischémie et 2 heures de reperfusion) permettent une altération reproductible de la respiration mitochondriale et une augmentation de la production de radicaux libres dans le muscle strié squelettique du rat sain.
- 2) Chez des rats Wistar sains et jeunes, la cyclosporine normalise le stress oxydant musculaire, normalise le couplage oxydation/phosphorylation mais ne restaure pas totalement la capacité oxydative maximale (V_{Max}). L'expression musculaire du

cofacteur de la cyclosporine (cyclophiline D) ainsi que la capacité de rétention calcique après traitement par cyclosporine sont réduites de moitié dans le muscle squelettique par rapport au myocarde et ces caractéristiques pourraient expliquer la protection partielle du muscle squelettique par rapport aux résultats publiés dans le myocarde.

3) Les rats Wistar (dont le diabète est induit par streptozotocine) présentent les caractéristiques d'un diabète de type 1 très sévère associant perte de poids, polyurie, polydipsie, hypertension artérielle, hyperglycémie spontanée et provoquée. On retrouve dans les muscles de ces animaux une atteinte importante de la chaîne respiratoire mitochondriale avec diminution de toutes les vitesses (-50%) et une augmentation du stress oxydant musculaire rapporté à la respiration mitochondriale. Les effets de l'ischémie-reperfusion sur la respiration mitochondriale et le stress oxydant musculaire sont plus marqués chez les animaux diabétiques que chez les animaux sains. La cyclosporine A ne confère aucun effet protecteur, que ce soit sur la respiration mitochondriale ou le stress oxydant local musculaire.

4) Chez le rat âgé (rats Wistar de 71 à 73 semaines), l'administration de cyclosporine ne confère aucune protection en termes de respiration mitochondriale ou de capacité de rétention calcique du muscle. Au contraire, elle s'accompagne d'une augmentation du stress oxydant local (muscle gastrocnémien) et à distance (cœur).

Avec les protocoles de conditionnement et aux doses que nous avons utilisées, la cyclosporine a des effets différents sur les conséquences musculaires de l'ischémie-reperfusion des membres inférieurs, dépendant de la pathologie sous-jacente des animaux étudiés. Il semble intéressant d'étudier l'effet dose-réponse de la cyclosporine A pour déterminer l'intervalle thérapeutique optimal, celui-ci pouvant être différent chez l'animal sain et pathologique. D'autre part, étant donné l'importance considérable du stress oxydant chez les animaux diabétiques et sénescents, la co-administration de cyclosporine et d'un antioxydant au moment de la reperfusion pourrait rétablir une protection.

ABSTRACT

Peripheral arterial disease and many surgical procedures (requiring vascular clamping or tourniquet application) induce severe skeletal muscle ischemia-reperfusion (IR) injuries.

Ischemic pre- and postconditioning can rescue skeletal muscles from IR injuries by alleviating mitochondrial dysfunction and reducing reactive oxygen species production. However, ischemic pre- and postconditioning are not the ultimate protection strategy for at least two reasons:

- (1) They require repetitive vascular clamping and unclamping, carrying the risk to worsen vessel injury. For instance, our team recently uncovered exacerbated skeletal muscle injuries in mice submitted to hind limb ischemia-reperfusion.
- (2) The clinical translation of ischemic postconditioning from bench to bedside failed in many circumstances. It is likely that comorbidities like diabetes melitus, hypertension or senescence inhibit many protective pathways of ischemic pre and postconditioning.

As a result, using experimental hind limb ischemia-reperfusion models, our goals were:

- (1) To test a pharmacologic substitute to ischemic postconditioning by using cyclosporine A, that acts on a very downstream step of IR injury cascade by binding to cyclophilin D and inhibiting mitochondrial transition pore opening. We wondered if cyclosporine could alleviate mitochondrial dysfunction and reduce ROS production in skeletal muscles submitted to IR.
- (2) To determine how diabetes and senescence would influence cyclosporine A protective effects.

Our studies stress three major points.

First, our hind limb ischemia-reperfusion models (consisting in 3 hours ischemia and two hours of reperfusion) provide a robust and reproducible mitochondrial respiration impairment (-30%) and a constant increase in ROS production in young healthy Wistar rats. In these animals, cyclosporine A normalizes oxidative stress but doesn't restore mitochondrial maximal oxidative capacity. Compared to myocardium, cyclophilin D expression and calcium retention capacity are reduced from 50% in hind limb skeletal muscle. This could account for the partial protection we observed.

Second, streptozotocin-treated rats manifested typical hallmark features of severe type 1 diabetes that significantly impaired mitochondrial respiratory chain complexes activities and increased ROS production per unit respiration rate. IR deleterious effects were more pronounced in streptozotocin-treated than in healthy rats and cyclosporine A was ineffective in preventing ischaemia-reperfusion-induced mitochondrial dysfunction and ROS overproduction.

Third, CsA was unable to rescue the mitochondrial respiratory chain in senescent animals since mitochondrial respiratory chain complexes activities remained significantly reduced. The expected protection by inhibition of mPTP opening did not even take place since

the calcium retention capacity was not increased in CsA-treated compared to vehicle-treated senescent rats. On the top of that, CsA treatment triggered an increased oxidative stress both locally and in remote organs since the non-ischemic hind limb and the heart experienced an increased ROS production

In conclusion, the protective effects of pharmacologic postconditioning with cyclosporine A seem to critically depend on the model under study. A variable and narrow dose-effect relationship is likely and makes it necessary to perform a dose finding study in every pathologic model. Considering the narrow relationships between mitochondrial protection and oxidative stress, combining cyclosporine A postconditioning with anti-oxidant therapy may restore a more robust protective effect but this hypothesis has to be validated.

ABBREVIATIONS

- Akt : protéine kinase B
- ATP : adénosine triphosphate
- Bax : Bcl-2 associated protein
- Bad : Bcl-2 associated death promoter
- Bcl-2 : b-cell lymphoma 2
- BNP : brain natriuretic peptide
- CMH : 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine
- CsA : cyclosporine A
- CyP-D : cyclophiline D
- DAG : diacylglycérol
- Debio-025 : D-3- MeAla-4-EtVal cyclosporine A
- DPP-IV : dipeptidyl-peptidase IV
- eNOS : NO synthase endothéliale
- EPO : érythropoïétine
- ERK : extracellular signal-regulated kinase
- GLP-1 : glucagon-like peptide-1
- GSK-3 β : glycogen synthase kinase 3 β
- H₂S : sulfure d'hydrogène
- JAK : janus kinase
- mK_{ATP} : canal potassique mitochondrial sensible à l'ATP
- MKP-1 : mitogen-activated protein kinase-phosphatase-1
- mPTP : pore de transition mitochondrial
- NAC : N-acétylcystéine
- NAG : N-acetyl- β -D-glucosaminidase
- NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- NFAT : nuclear factor of activated T-cells (facteur nucléaire des lymphocytes T activés)

NIM811 : N-methyl-4-isoleucine cyclosporine A

NO : monoxyde d'azote

PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1

PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha

PKC : protéine kinase C

PIP3K : phosphatidylinositol 3-kinase.

RISK : reperfusion injury survival kinase

ROS : radicaux libres de l'oxygène

SAFE : survivor activating factor enhancement

STAT-3 : signal transducer and activator of transcription-3

TNF- α : tumor necrosis factor α

tPA : activateur tissulaire du plasminogène

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures :

<u>Figure 1</u> : Organisation du muscle squelettique.	p.21
<u>Figure 2</u> : La structure du muscle squelettique: du muscle à l'unité contractile.	p.22
<u>Figure 3</u> : Structure du sarcomère.	p.23
<u>Figure 4</u> : La contraction musculaire nécessite de l'ATP et du Ca^{2+} .	p.24
<u>Figure 5</u> : Marquage au NADH sur une coupe transversale d'un muscle squelettique.	p.25
<u>Figure 6</u> : Section longitudinale des fibres rapides, intermédiaires et lentes d'un muscle triceps brachial d'une femme âgée de 25 ans.	p.27
<u>Figure 7</u> : Schéma général du cycle de Krebs.	p.29
<u>Figure 8</u> : Le couplage excitation contraction au niveau de la triade.	p.30
<u>Figure 9</u> : Structure d'une mitochondrie.	p.32
<u>Figure 10</u> : Chaîne de transport des électrons.	p.35
<u>Figure 11</u> : Structure de l'ATP synthase F_0F_1 -ATPase.	p.37
<u>Figure 12</u> : Schéma représentant les cibles de NRF1 et NRF2.	p.42
<u>Figure 13</u> : Schéma représentant la biogenèse mitochondriale.	p.43
<u>Figure 14</u> : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.	p.48
<u>Figure 15</u> : Localisation des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans la cellule musculaire.	p.52
<u>Figure 16</u> : Structure du mPTP.	p.55
<u>Figure 17</u> : Production de RLO, ouverture du mPTP et apoptose.	p.55
<u>Figure 18</u> : Schéma représentant la voie mitochondriale de l'apoptose.	p.57
<u>Figure 19</u> : Coupe histologique d'un muscle squelettique humain en ischémie.	p.61

<u>Figure 20</u> : Modifications de taux de Ca ²⁺ intracellulaire au cours de l'ischémie et de la reperfusion.	p.62
<u>Figure 21</u> : Evènements survenant lors de l'ischémie, et lors de la reperfusion.	p.63
<u>Figure 22</u> : Relation entre la mitochondrie, la chaîne respiratoire mitochondriale, le mPTP et l'apoptose.	p.64
<u>Figure 23</u> : Microscopie électronique de muscle squelettique humain après ischémie-reperfusion.	p.65
<u>Figure 24</u> : Microscopie électronique de mitochondries myocardiques de lapins.	p.65
<u>Figure 25</u> : Schéma des interactions des différents acteurs de l'inflammation locale et systémique.	p.66
<u>Figure 26</u> : Coupes histologiques au niveau du parenchyme pulmonaire de mouton.	p.67
<u>Figure 27</u> : Coupes histologiques au niveau du parenchyme pulmonaire de rats Wistar.	p.67
<u>Figure 28</u> : Coupes histologiques au niveau du parenchyme rénal de rats Wistar.	p.68
<u>Figure 29</u> : Microscopie électronique rénale après rhabdomyolyse chez le rat.	p.69
<u>Figure 30</u> : Les deux phases de protection du préconditionnement ischémique.	p.72
<u>Figure 31</u> : Schéma simplifié proposé pour le mécanisme du préconditionnement ischémique.	p.73
<u>Figure 32</u> : Quantification lésionnelle en cas d'ischémie, d'ischémie-reperfusion, et après postconditionnement.	p.76
<u>Figure 33</u> : Efficacité du postconditionnement selon la durée de l'ischémie.	p.77
<u>Figure 34</u> : Schéma simplifié proposé pour le mécanisme du postconditionnement ischémique.	p.78
<u>Figure 35</u> : Schéma simplifié proposé pour montrer les similitudes entre les mécanismes du pré et du postconditionnement ischémique.	p.80
<u>Figure 36</u> : Structure chimique de la cyclosporine	p.82
<u>Figure 37</u> : Mécanisme d'action des effets immunosuppresseurs de la cyclosporine	p.83
<u>Figure 38</u> : Production de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) par des cellules mésangiales humaines exposées à des concentrations croissantes de cyclosporine	p.85

<u>Figure 39</u> : Formation du pore de transition mitochondrial au cours de l'ischémie-reperfusion et effets de la cyclosporine	p.86
<u>Figure 40</u> : Voies empruntées par le conditionnement pharmacologique par les agents anesthésiques halogénés	p.87
<u>Figure 41</u> : Stress oxydant induit par l'hyperglycémie et mise en jeu des 4 voies métaboliques participant aux complications du diabète	p.91
<u>Figure 42</u> : Principales voies de signalisation empruntées par le préconditionnement et le postconditionnement pour limiter les lésions myocardiques d'IR	p.94
<u>Figure 43</u> : Exemple du relargage du calcium matriciel par les mitochondries après charge calcique croissante et traduisant l'ouverture du mPTP.	p.104
<u>Figure 44</u> : Courbe concentration-effet de la cyclosporine administrée par voie intrapéritonéale chez le rat	p.115
<u>Figure 45</u> : Charge calcique requise pour provoquer l'ouverture du mPTP myocardique	p.117
<u>Figure 46</u> : Taille de l'infarctus (en % de l'aire à risque) chez des animaux sains ou diabétiques soumis au postconditionnement ischémique (Isch-postC), pharmacologique (Sevo-postC) et traités ou non par insuline	p.123
<u>Figure 47</u> : Représentation de la surface myocardique infarctée chez des rats sains ou hyperglycémiques (HG) soumis à une IR myocardique	p.125

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Caractéristiques des fibres de type I et de type II des muscles squelettiques et leurs principales sources d'énergie. p.26

Tableau 2 : Identité moléculaire, origine et demi-vie des principaux radicaux libres de l'oxygène (RLO) pouvant influencer le muscle squelettique. p.46

Tableau 3 : Tableau non exhaustif des espèces sur lesquels le préconditionnement musculaire local a été expérimenté. p.71

Tableau 4 : Tableau non exhaustif des espèces sur lesquels le préconditionnement musculaire à distance a été expérimenté. p.71

Tableau 5 : Espèces sur lesquels le postconditionnement musculaire squelettique a été expérimenté. p.75

PREAMBULE

Qu'elle concerne le myocarde, le cerveau ou les membres inférieurs, l'ischémie compromet à très court terme la survie cellulaire, celle de l'organe et de l'organisme. Un pan entier de la médecine se consacre donc à prévenir la survenue de l'ischémie et, lorsque celle-ci survient, à la corriger de la façon la plus rapide et la plus efficace possible. Néanmoins, et de façon assez contre-intuitive, la restitution d'un flux dans des organes ischémiques c'est à dire leur reperfusion va elle-même induire des atteintes spécifiques responsables de près de la moitié de la zone infarctée dans les modèles animaux d'ischémie-reperfusion myocardique (1,2)

Paradoxalement, la reperfusion, vitale pour la survie de l'organe et de l'individu, va en fait aggraver les lésions ischémiques (1,2) avec une majoration de la nécrose et de l'apoptose cellulaires (3,4), une augmentation de l'inflammation locale et à distance (1,5,6) accompagnée d'une atteinte fonctionnelle des organes reperfusés et des organes distants. Ainsi faut-il considérer dans leur ensemble les conséquences du tarissement de la perfusion puis de sa restauration et de les envisager dans le cadre commun du syndrome d'ischémie-reperfusion (IR).

Le muscle strié squelettique subit de graves lésions d'IR au cours de la progression de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) et lors d'interventions chirurgicales qui nécessitent l'interruption transitoire du flux sanguin dans les artères des membres. De nombreuses interventions chirurgicales nécessitent un clampage temporaire de l'aorte abdominale ou la mise en place d'un garrot à la racine d'un membre. Dans ces conditions, les masses musculaires sont soumises à un stress d'IR intense dont les conséquences fonctionnelles sont à la fois locales (rhabdomyolyse, inflammation, apoptose, « no reflow phenomenon ») et systémiques (insuffisance rénale aiguë, syndrome de détresse respiratoire) qui rendent compte de la morbidité associée à ces interventions lourdes (5,7), bien que le muscle squelettique ne soit pas considéré comme un organe vital.

L'évaluation de la gravité des lésions ischémiques myocytaires peut être réalisée de multiples façons dont l'histologie est l'une des plus représentées. Néanmoins, l'altération histologique des myocytes traduit une atteinte avancée très souvent au-delà de toute ressource thérapeutique. Il nous a semblé pertinent d'explorer l'atteinte de la respiration mitochondriale myocytaire dans le cadre du syndrome d'IR. En effet, l'atteinte mitochondriale est un témoin très précoce et très sensible des lésions musculaires d'IR et elle est corrélée à l'atteinte fonctionnelle du muscle (8,9).

Il est possible de limiter les lésions liées à l'IR en conditionnant le muscle strié squelettique. Le conditionnement ischémique consiste à soumettre le muscle à de brefs stimuli d'ischémie et reperfusion avant (préconditionnement) ou juste après (postconditionnement) l'épisode ischémique prolongé. Notre équipe pu démontrer que le pré- (10,11) et le postconditionnement (12,13) ischémiques limitent les lésions d'IR et réduisent la dysfonction mitochondriale et la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) associée. Néanmoins ces deux types de conditionnement impliquent l'occlusion puis le déclampage mécanique du vaisseau nourricier qui peut s'en trouver lésé, surtout si le patient est déjà porteur de lésions d'athérosclérose (14,15). Le postconditionnement ischémique à distance par l'application d'un brassard sur un membre sain, reproduit les effets bénéfiques du postconditionnement ischémique local « classique » tout en évitant le caractère agressif du clampage artériel (16-19). Cependant, des données récentes de notre équipe indiquent que le

postconditionnement ischémique (local et à distance) peut être pris en défaut et qu'il pourrait même aggraver les lésions d'IR musculaire (20). Ces résultats nous ont orienté vers la recherche d'alternatives médicamenteuses au postconditionnement ischémique.

La cyclosporine A qui, en se fixant sur la cyclophiline D, empêche l'ouverture du pore de transition mitochondrial est un candidat tout à fait prometteur dans cette indication. Elle agit à un niveau très distal de la cascade d'événements qui conduit à la nécrose après IR. Son efficacité récemment démontrée dans le cadre de la revascularisation myocardique (12,21) permet d'entrevoir une application similaire dans le cadre de l'IR du muscle strié squelettique (16,22).

Néanmoins, les résultats très positifs du postconditionnement myocardique (ischémique et pharmacologique) obtenus dans les modèles expérimentaux n'ont pas été systématiquement retrouvés en clinique humaine (23,24). Une intense activité de recherche clinique est en cours chez l'homme (40 études sur le postconditionnement enregistrées sur le site ClinicalTrials.gov) afin de voir comment extrapoler les bénéfices observés dans les études expérimentales à l'être humain. Une hypothèse probable est que les comorbidités (7,14) des patients souffrant d'ischémie myocardique aiguë et/ou les médicaments pris concomitamment (25,26) s'opposent aux effets protecteurs du conditionnement.

Dans ce contexte, nos objectifs étaient les suivants :

- 1) Confirmer les modèles expérimentaux d'IR des membres inférieurs par clampage aortique et ligature des collatérales ainsi que le garrotage unilatéral d'un membre chez le rat.
- 2) Déterminer les effets de la cyclosporine sur la dysfonction mitochondriale et le stress oxydant musculaires et systémiques dans ces modèles et explorer les voies de signalisation empruntées, notamment pour ce qui concerne l'implication de la cyclophiline D.
- 3) Déterminer de quelle façon deux particularités de terrain fréquemment retrouvées chez des patients souffrant d'atteinte artérielle, le diabète et l'âge avancé influencent l'effet de la cyclosporine.

Nous aborderons dans un premier temps les rappels qui facilitent la compréhension des travaux menés au cours de la thèse. Ces rappels concernent le muscle squelettique, la mitochondrie, le stress oxydant, les phénomènes d'ischémie-reperfusion et les mécanismes du conditionnement musculaire. Ces rappels ont été développés en collaboration avec les membres de l'équipe de recherche "Mitochondries, stress oxydant et protection musculaire".

Dans une deuxième partie, nous reviendrons sur les matériels et méthodes utilisés dans les trois protocoles qui forment le corps de la thèse.

Nous aborderons ensuite la section des résultats, la discussion générale et enfin les perspectives de ces travaux.

INTRODUCTION GENERALE

1. LE MUSCLE ET LA MITOCHONDRIE

1.1. Le muscle squelettique

Les muscles forment l'ensemble de tissus le plus important de l'organisme. Ils représentent environ la moitié du poids du corps. Les muscles squelettiques, à eux seuls, forment environ 40% du poids du corps chez l'homme et 32% chez la femme. Chez les vertébrés, le rôle principal des muscles squelettiques est de permettre le déplacement dans l'espace. La contraction musculaire est à l'origine de la mise en mouvement des membres. Les muscles squelettiques montrent des particularités fonctionnelles importantes, notamment au niveau des vitesses de contraction, de la force développée et de la résistance à la fatigue. De plus, ils exposent une plasticité élevée en réponse aux contraintes environnementales, basée sur le potentiel de la fibre musculaire à subir des changements dans sa cytoarchitecture et dans sa composition en isoformes de protéines musculaires.

1.1.1. Organisation de l'appareil contractile

Les muscles squelettiques sont fixés sur le squelette osseux par leurs deux extrémités myotendineuses. Chaque muscle est composé de faisceaux de fibres musculaires, les cellules musculaires, qui s'étendent d'une extrémité à l'autre du muscle. Les cellules musculaires sont entourées d'une gaine conjonctive, l'endomysium. Elles sont rassemblées en plusieurs faisceaux enrobés d'une enveloppe commune à toutes les fibres : le pérимыsium. Il y a plusieurs faisceaux par muscle, compactés à l'intérieur d'une enveloppe aponévrotique : l'épимыsium. Le muscle est également entouré de fascias. Aux deux extrémités du muscle, le fascia fusionne avec l'endomysium qui entoure chaque cellule et forme les fibres tendineuses qui se rassemblent ensuite en tendons.

Après avoir traversé l'épимыsium, les vaisseaux sanguins qui assurent la vascularisation du muscle donnent naissance à un fin réseau de capillaires qui gagne le pérимыsium puis l'endomysium pour vasculariser chaque fibre musculaire. Les prolongements des nerfs gagnent également le pérимыsium. Ils se finissent en arborisation dont les ramifications se terminent dans la jonction neuromusculaire pour innover les différentes fibres musculaires (Figure 1).

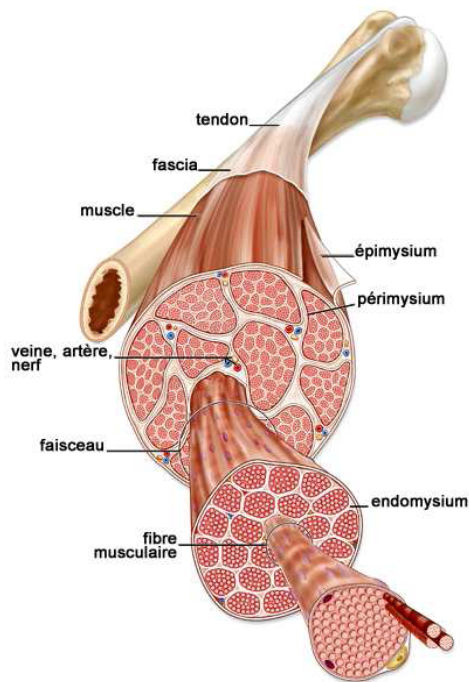
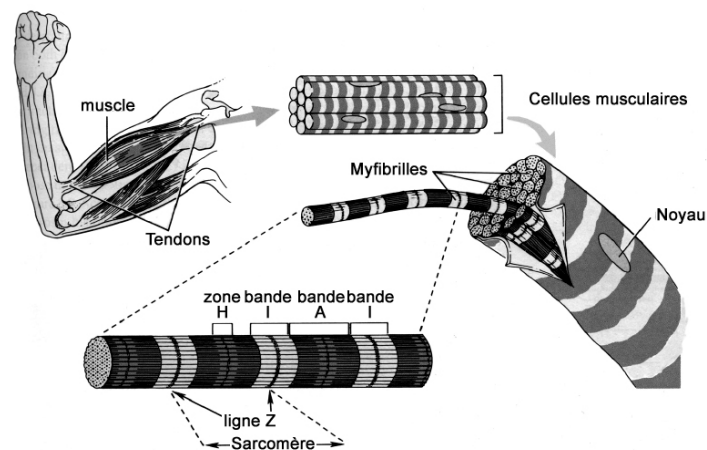


Figure 1: Organisation du muscle squelettique. Schéma adapté du site <http://academic.kellogg.cc.mi.us>

1.1.2. Organisation et fonctionnement du sarcomère

Chaque faisceau musculaire est formé d'un ensemble de fibres musculaires qui sont de longues cellules cylindriques dont le diamètre varie de 10 à 100 μm et la longueur de plusieurs centaines de μm à plusieurs dizaines de mm. C'est un syncytium résultant de la fusion de plusieurs cellules qui contient de nombreux noyaux situés à la périphérie, juste au-dessous de la membrane plasmique ou sarcolemme, le centre de la fibre étant occupé par les myofibrilles. Le cytoplasme des cellules musculaires (ou sarcoplasme) est occupé à 85%-90% par les myofibrilles, composées de sarcomères, les sous-unités contractiles du muscle (Figure 2A). Les sarcomères sont des assemblages de filaments fins et épais qui sont les protéines contractiles du muscle strié. En microscopie électronique, ces filaments apparaissent sous forme d'une alternance de bandes claires (bandes I : isotropes) et de bandes sombres (bandes A : anisotropes) (Figure 2 B). Un sarcomère est composé d'une bande A et de deux demies bandes I, séparées en leur centre par la ligne Z. Les bandes A sont composées de filaments épais de myosine qui chevauchent les filaments fins d'actine. Les bandes I sont dépourvues de myosine et sont composées des filaments fins d'actine.

A



B

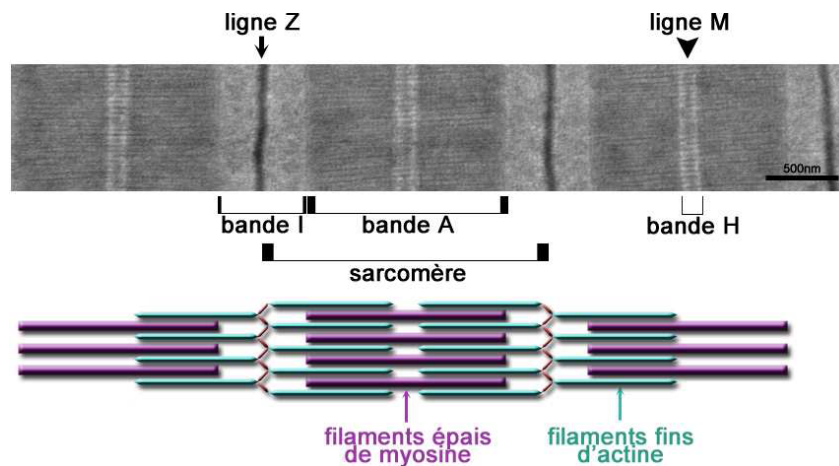


Figure 2: La structure du muscle squelettique: du muscle à l'unité contractile. A. La fonction de contraction du muscle est réalisée par les myofibrilles, l'appareil contractile des cellules musculaires, composées d'une succession de sarcomères. Adaptation de (Goll *et al.*) (27). B. Trois sarcomères d'une myofibrille de muscle squelettique de souris en coupe longitudinale observés au microscope électronique. Les filaments épais de la bande A sont constitués de myosine, les filaments fins de la bande I, d'actine. Adaptation de (Goll *et al.*) (27).

La myosine de la bande A est composée d'une chaîne légère en forme de bâtonnet flexible et de la queue de la chaîne lourde de myosine qui porte les têtes de myosine (Figure 3, en violet). La bande H correspond à la région où les filaments épais de myosine ne chevauchent pas les filaments fins d'actine. Au milieu de la bande H se trouve la ligne M, qui apparaît sous forme de trois à cinq lignes en fonction du type de fibre. La bande M est composée, entre autres, de myoméline (Figure 3, en jaune) et de protéine M (Figure 3, en vert), qui stabilisent la myosine en connectant les filaments entre eux. Chaque filament de myosine est entouré de six filaments d'actine (Figure 3, en turquoise). Ces filaments d'actine (actine F) sont des polymères d'actine globulaire (actine G), ils sont arrangés en double hélice et centrés sur un axe de tropomyosine à laquelle ils sont rattachés. Les filaments d'actine sont reliés à la ligne Z, elle-même composée d'un assemblage macromoléculaire où se trouvent entre autres les protéines α -actinine, téléthonine, g-filamine, myotiline, obscurine, titine (en rouge) et nébuline (en gris clair). La titine, avec ses 3000 kDa, est la plus grande protéine

connue. Elle s'étend sur la longueur d'un demi-sarcomère (soit sur 1,2 à 1,5 μm), son domaine N-terminal est dans la ligne Z et son C-terminal dans la ligne M. La titine est une protéine qui confère des propriétés élastiques aux sarcomères. Le complexe des troponines est ancré à intervalles réguliers sur la tropomyosine. Ce complexe est formé de la troponine C (TnC) qui lie le calcium (Ca^{2+}), de la troponine I (TnI, Inhibitrice) qui, au repos, masque les sites de fixation de la myosine sur l'actine, et de la troponine T (TnT) responsable de la liaison du complexe avec la tropomyosine.

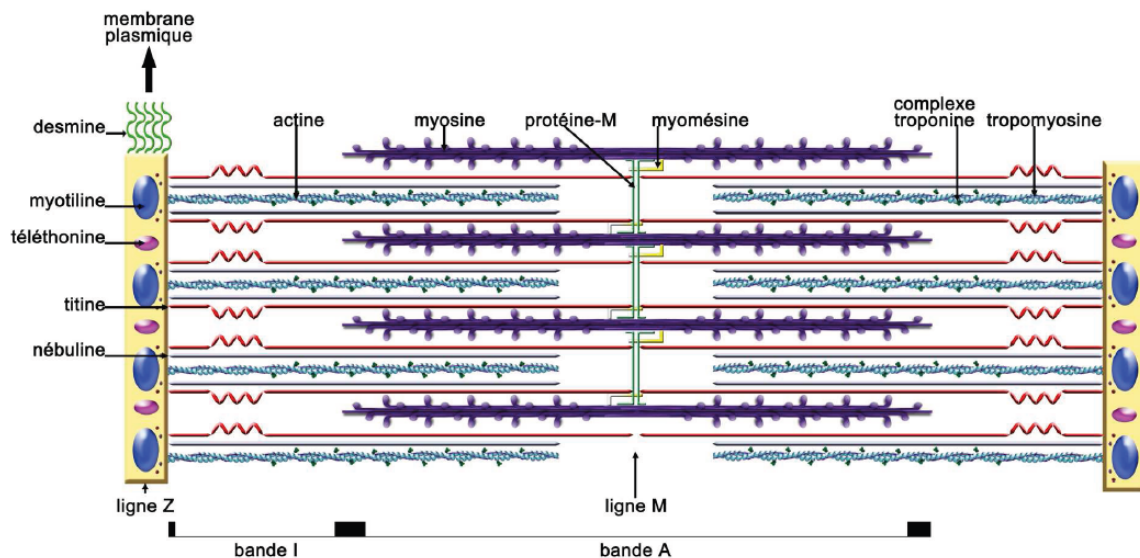


Figure 3: Structure du sarcomère. Représentation schématique de l'organisation des protéines principales du sarcomère. Les filaments d'actine sont ancrés à la ligne Z. L'extrémité N-terminale de la titine est dans la ligne Z et la protéine s'étend jusqu'à la ligne M. *Adapté du site*

www.massasoit-bio.net

Au repos, la tropomyosine et la TnI (Figure 4, en vert clair) masquent les sites de fixation des têtes de myosine sur l'actine. La contraction se produit lorsque la TnC (Figure 4, en noir), après avoir fixé du Ca^{2+} , change de conformation et déplace la TnI et la tropomyosine. Les têtes de myosine (en violet) ont alors accès à leurs sites de fixation sur l'actine (en turquoise). Elles hydrolysent une molécule d'ATP et se replient pour se rapprocher de leur site de fixation et ne libèrent le phosphate inorganique qu'une fois la liaison établie. Le relargage de l'ADP permet aux têtes de myosine de se replier complètement ce qui provoque le raccourcissement des sarcomères. Le décrochage des têtes de myosine est induit par la fixation d'un nouvel ATP et par la libération du Ca^{2+} de la TnC. Le sarcomère se rallonge, le muscle se relâche.

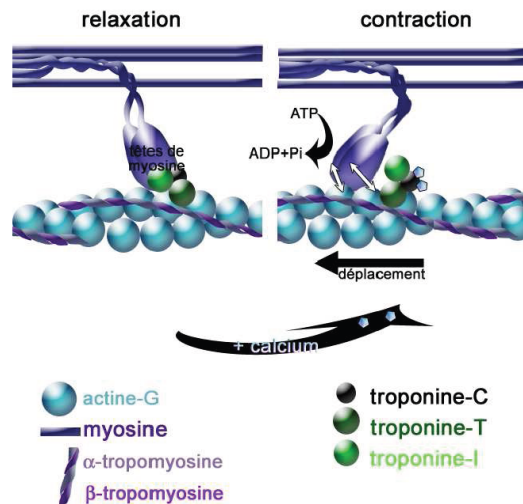


Figure 4: La contraction musculaire nécessite de l'ATP et du Ca^{2+} . La TnC ne démasque les sites de fixation de la myosine sur l'actine que lorsque la TnC a lié du Ca^{2+} et change de conformation. Une fois la tropomyosine déplacée avec le complexe troponine, la myosine accède à son site de fixation sur l'actine. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP permet le relâchement de la tête de myosine qui vient s'associer avec l'actine. La libération de l'ADP provoque le mouvement de la tête de myosine vers l'extérieur du sarcomère, ce qui raccourcit la myofibrille et réalise la contraction musculaire. Au repos, la myosine est liée à une molécule d'ATP. *Adapté du site www.biology.berkeley.edu*

1.1.3. Classification des fibres musculaires striées squelettiques

A l'intérieur d'un muscle, les fibres musculaires striées squelettiques ne sont pas toutes identiques. Elles possèdent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles variables. Plusieurs classifications ont été établies, basées sur la révélation des propriétés contractiles ou métaboliques. L'activité ATPasique des fibres a tout d'abord été utilisée pour les classer selon leur vitesse de contraction. La combinaison de plusieurs pH d'incubation des fibres selon la méthode de Brooke et Kaiser (28), a permis de distinguer 3 types de fibres :

- les fibres I appelées fibres lentes,
- les fibres IIA et IIB appelées fibres rapides.

D'autres auteurs ont combiné la révélation du type contractile par l'activité ATPasique, avec le type métabolique par l'analyse de l'activité du métabolisme oxydatif telle que la succinate déshydrogénase (Nemeth et Pette) (29). Enfin, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les chaînes lourdes de la myosine (MHC) a permis de déterminer un quatrième type de fibres de type intermédiaire, les fibres IIX.

La composition en fibres de type I ou de type II (Figure 5) est variable d'un muscle à l'autre et il existe une certaine corrélation entre le type de cellules musculaires striées et les propriétés contractiles du muscle. La majorité des muscles possède environ 50% de chaque sorte d'unités.

Mais certains muscles sont plus riches en fibres lentes (les muscles posturaux) et d'autres en fibres rapides (les muscles de l'activité gestuelle). La proportion de chaque espèce de fibres détermine, une fois l'âge adulte atteint, l'aptitude d'un mammifère à réaliser un certain type de

performance. L'entraînement peut modifier spécifiquement chaque type de fibre mais dans des proportions toutes relatives. En effet, le déterminisme génétique joue également un rôle important.

L'ensemble des cellules musculaires striées qui dépendent d'un même neurone moteur est appelé une unité motrice. Ces cellules ont une topographie dispersée au sein du muscle. Toutes les cellules musculaires d'une unité motrice sont d'un même type, et il semble que le type des cellules musculaires soit déterminé par la cellule nerveuse qui exerce une influence permanente sur elles.

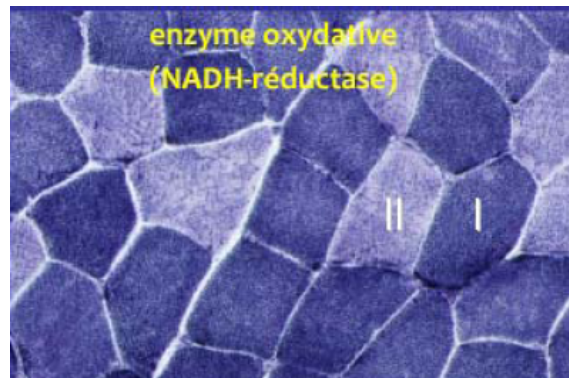


Figure 5 : Marquage au NADH sur une coupe transversale d'un muscle squelettique. Les fibres très colorées correspondent aux fibres de type I alors que les fibres peu colorées correspondent aux fibres de type II. *Adapté du site www4.utsouthwestern.edu*

1.1.3.1. Les fibres à contraction lente

La fibre de type I, également dénommée S.T. (slow twitch) est une fibre rouge, à contraction lente et à métabolisme essentiellement aérobie oxydatif (Tableau 1). A l'intérieur de cette fibre, l'ATP produit est essentiellement issue du processus de phosphorylation oxydative intra-mitochondriale (Figure 6). Elle a une forte teneur en myoglobine. Elle est entourée d'un riche réseau capillaire et elle est spécifiquement équipée pour un métabolisme aérobie et une activité prolongée à faible tension. La vitesse de contraction et la force développée sont faibles mais la fibre de type I est très peu fatigable (30). On retrouve ce type de fibres notamment chez les marathoniens.

Type de fibres/MHC	Fibre I ou ST	Fibre II A ou FT-A	Fibre II B ou FT-B
Couleur	Rouge	Blanche	
Composition intracellulaire dominante	Mitochondries +++ Myoglobine	Mitochondries +/- ATPase de la myosine	
Voie de synthèse de l'ATP	Aérobie	Aéro-anaérobie	Anaérobie
Capacité anaérobie	Faible	Moyenne	Elevée
Métabolisme glycolytique			
Vitesse de contraction	Lente	Rapide	
Résistance à la fatigue	Elevée	Moyenne	Faible
Force développée	Limitée	Moyenne	Importante
Taille motoneurone	Petite	Grande	
Source énergétique principale d'ATP	Glucose sanguin et acides gras libres Métabolisme oxydatif aérobie	Créatine phosphate Puis Glucose dérivé du glycogène musculaire et métabolisé par la glycolyse anaérobie	
Utilisation du glycogène musculaire	Lentement épuisé	Rapidement épuisé	
Effort type	Marathon	Sprint	

Tableau 1 : Caractéristiques des fibres de type I et de type II des muscles squelettiques et leurs principales sources d'énergie

1.1.3.2. Les fibres à contraction rapide

1.1.3.2.1. La fibre de type IIA

C'est une classification basée sur le polymorphisme des chaînes lourdes de myosine du muscle squelettique, également dénommée F.T.A (fast twitch A). C'est une fibre blanche rapide mais qui utilise à la fois un métabolisme oxydatif et glycolytique pour produire de l'ATP (Tableau 1).

Elle est riche en glycogène et en enzymes glycolytiques et dans une moindre mesure en mitochondries (Figure 6). Elle est moins oxydative que la fibre de type I. C'est une fibre relativement résistante à la fatigue, elle est le point de départ d'une activité phasique prolongée (31).

1.1.3.2.2. La fibre de type IIB

Elle est également dénommée F.T.B (fast twitch B). C'est une fibre blanche phasique. Son métabolisme est essentiellement anaérobie. Elle est pauvre en mitochondries et en enzymes oxydatives. Elle est riche en glycogène et possède une très forte activité glycolytique (Tableau 1). Elle est très sensible à la fatigue. Cette fibre est à l'origine d'une puissante activité physique développant une grande force mais de courte durée . On retrouve donc ce type de fibres notamment chez les sprinters.

On évoque également des fibres de type II X, aux caractéristiques (métabolisme oxydatif / glycolytique) intermédiaires entre les fibres de type II A et II B.

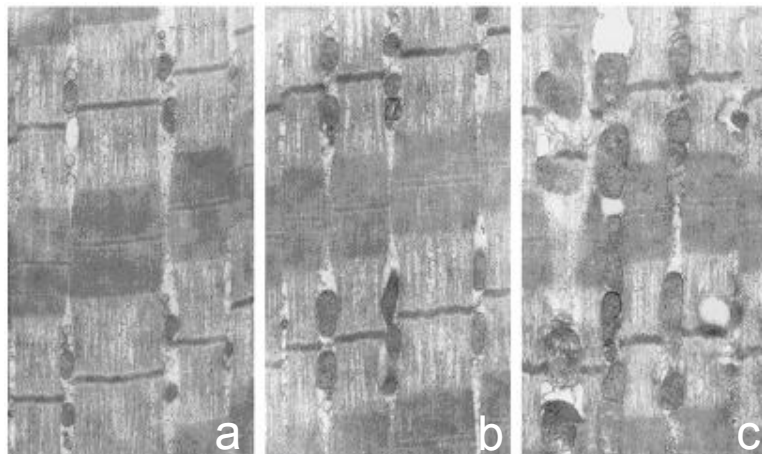


Figure 6: Section longitudinale des fibres rapides, intermédiaires et lentes d'un muscle triceps brachial d'une femme âgée de 25 ans. Ces trois types de muscles ont 2 mitochondries de part et d'autres de la bande I. **a)** la fibre rapide possède des petites mitochondries de 0.3 μm de diamètre. **b)** les fibres intermédiaires ont une taille intermédiaire avec une taille de 0.6 μm . **c)** les fibres lentes ont de grandes mitochondries avec un diamètre de 0.9 μm . D'après Ogata et al (1,2,32).

1.1.3.3. Les fibres intermédiaires

Appelées aussi fibres de transition, d'autres types de fibres musculaires sont trouvées à l'intérieur du muscle : les fibres II AB et les fibres II C. Ces fibres semblent davantage correspondre à des étapes de transition d'un type de fibre à un autre (Figure 6).

Les fibres musculaires présentent en effet cette particularité de pouvoir évoluer d'un type à un autre, et ce, en fonction de la nature du travail auquel le muscle est le plus fréquemment soumis. Les fibres de type II X, par exemple, sont retrouvées chez les jeunes sujets et réapparaissent lors d'une immobilisation prolongée (1,2,30).

La plupart des muscles squelettiques, spécialement chez l'Homme, sont mixtes et composés de fibres oxydatives et glycolytiques.

1.1.4. Les différents phénotypes métaboliques

Le muscle strié squelettique est constitué de cellules ou fibres musculaires hautement différenciées, compartimentées et spécialisées dans la contraction. Les myofibrilles assurent la contraction, le réticulum sarcoplasmique permet la régulation du calcium et les mitochondries, ainsi que les complexes glycolytiques, la synthèse d'ATP. Le muscle squelettique est ainsi constitué d'une variété de fibres ayant des propriétés fonctionnelles, structurales, biochimiques et métaboliques adaptées à leur activité contractile (3,4,33). Le muscle rapide glycolytique est adapté à un besoin énergétique intense et bref grâce à une disponibilité immédiate du stock d'énergie cytosolique (phosphocréatine et ATP), grâce à un effet tampon important et dépendant de la réaction catalysée par la créatine kinase et enfin grâce à une activité glycolytique importante (1,5,6,31). Il est également caractérisé par la prédominance de fibres contractiles rapides de type IIB (5,7,28), contenant peu de mitochondries et pauvres en myoglobine et en capillaires (ce qui leur donnent un aspect blanc). Elles sont par contre riches en glycogène. Ce type de muscle a donc un métabolisme essentiellement glycolytique basé sur d'importantes réserves énergétiques rapidement mobilisables, une fatigabilité importante et une récupération décalée dans le temps et assez lente. Les muscles lents à activité soutenue (muscle postural) ou cyclique (cœur) sont essentiellement composés de fibres à contraction lente de type I et à activité ATPasique lente. Ces muscles sont riches en myoglobine (aspect rouge), présentent un réseau capillaire bien développé, une faible réserve en phosphocréatine et un métabolisme essentiellement oxydatif puisque les phosphorylations oxydatives sont la source principale d'énergie chimique utilisée par les myofibrilles durant la contraction. Il est apte à soutenir un effort prolongé, ce qui implique un couplage efficace entre l'utilisation et le renouvellement énergétique et permet un flux énergétique stable et bien ajusté. Il existe également des phénotypes intermédiaires comme le muscle rapide oxydatif composé de fibres IIA, riches en mitochondries.

1.2. Phosphorylation oxydative

Les voies de dégradation des lipides et des hydrates de carbones se rejoignent au niveau de la mitochondrie avec l'acétyl CoA qui est métabolisé au cours du cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs (Figure 7) (8,9,34). À la fin du cycle, une molécule d'acétyl CoA fournira 2 molécules de CO₂, 3 molécules de NADH, 1 molécule de FADH₂ et une molécule d'ATP. Les transporteurs d'hydrogène et d'électrons NADH et FADH₂, réagissent ensuite avec les enzymes de la chaîne respiratoire pour réduire l'oxygène en eau et synthétiser de

l'ATP : c'est la phosphorylation oxydative, le processus majeur de fourniture d'énergie pour les fibres des muscles squelettiques et cardiaque. Cet aspect sera développé dans le chapitre suivant consacré à la mitochondrie.

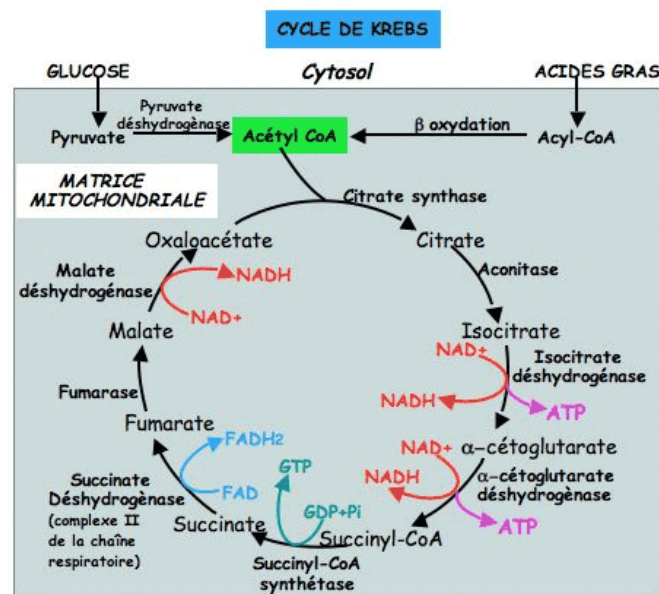


Figure 7 : Schéma général du cycle de Krebs. www.members.chello.nl

1.3. Le couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique.

A la jonction entre les tubules T et le réticulum sarcoplasmique, les deux membranes se trouvent face à face, et forment une structure appelée triade. Le couplage excitation-contraction (couplage-EC) qui prend place à la triade, est la transformation d'un signal électrique en travail mécanique via une libération massive de Ca^{2+} à partir du réticulum sarcoplasmique et vers le cytoplasme. Il est réalisé par un assemblage macromoléculaire : le complexe de relargage du calcium (CRC). Le CRC est composé, entre autre, de deux canaux calciques couplés physiquement : le récepteur des dihydropyridines (DHPR), un canal calcique voltage dépendant de la membrane plasmique du tubule transverse (Figure 8, en vert) et le récepteur de la ryanodine (RyR) dans la membrane du réticulum sarcoplasmique qui lui fait face (Figure 8, en orange).

La synapse entre le neurone moteur et la cellule musculaire est la jonction neuromusculaire. L'acétylcholine (ACh) libérée par le neurone moteur à la jonction neuromusculaire se fixe sur son récepteur au niveau de la membrane plasmique de la cellule musculaire ce qui provoque une entrée de Na^+ , dépolarisant ainsi la membrane. Cette dépolarisation se propage sur toute la surface de la cellule et jusqu'à l'intérieur de celle-ci grâce aux tubules T, les invaginations de la membrane plasmique. La dépolarisation produit un changement de conformation du DHPR qui induit l'ouverture du RyR par couplage physique direct. L'ouverture du RyR permet au Ca^{2+} de sortir du réticulum sarcoplasmique

selon son gradient électrochimique (gradient de concentration du Ca^{2+} : 100 μM dans le réticulum sarcoplasmique contre 100 nM dans le cytoplasme). Le calcium libéré va se fixer sur la TnC dans le complexe des troponines et ainsi déclencher la contraction musculaire. Le muscle se relâche lorsque le Ca^{2+} est repompé dans la citerne terminale du réticulum sarcoplasmique par la pompe calcium ATPase (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA) localisée dans toute la membrane de la citerne terminale du réticulum sarcoplasmique sauf dans la partie jonctionnelle, face au tubule-T.

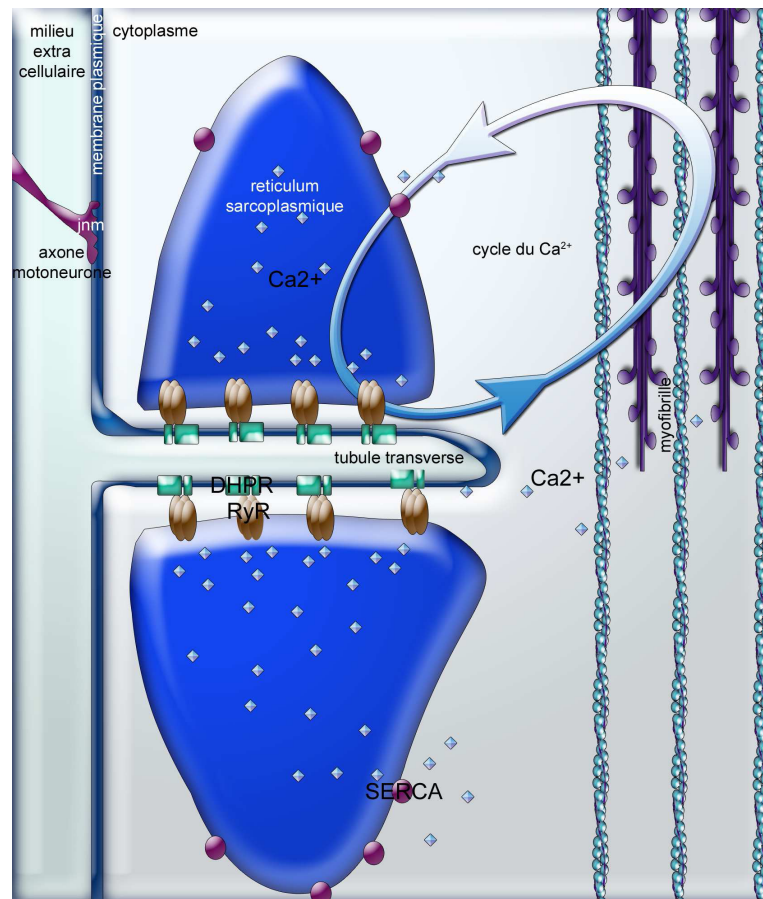


Figure 8: Le couplage excitation contraction au niveau de la triade.

Adapté du site www.jci.org

En résumé.

La production d'énergie aérobie du muscle squelettique est dépendante de la capacité à produire de l'énergie lors du processus de la phosphorylation oxydative qui se déroule à l'intérieur de la mitochondrie. La mitochondrie est un organite composé d'une multitude de complexes protéiques qui sont tous finement régulés en fonction des besoins et des conditions du milieu cellulaire. La mitochondrie qui a un rôle fondamental dans la production d'énergie est aussi un lieu privilégié de production de radicaux libres oxygénés qui sont à l'origine de réactions bénéfiques ou délétères pour l'équilibre de la cellule suite à un stress tel qu'un exercice ou un traitement avec des substances chimiques.

1.4. Structure et distribution des mitochondries dans la cellule musculaire

La mitochondrie est un organite riche en composants biochimiques dont le rôle majeur est la production d'énergie. Elle comporte plusieurs exemplaires de son propre ADN (mtADN) distinct de l'ADN nucléaire (35). Cependant, le mtADN encode seulement pour une fraction de 13 protéines fondamentales pour la fonction mitochondriale et plus particulièrement pour les complexes de la chaîne respiratoire (10,11,36). Les protéines restantes (environ 850) sont encodées dans le noyau et transportées dans la mitochondrie. En plus d'assurer l'approvisionnement cellulaire en énergie, les mitochondries ont d'autres rôles vitaux pour le bon fonctionnement de la cellule. Elles participent à l'homéostasie calcique, à la régulation du pH intracellulaire, à la synthèse d'hormones stéroïdes et des hèmes, ainsi qu'à la régulation de la thermogénèse. De plus, elles constituent un des principaux sites de production des radicaux libres qui semble jouer un rôle clé dans plusieurs voies de signalisation intracellulaire.

1.4.1. Structure

La mitochondrie est un organite hautement spécialisé dans la transformation d'énergie, elle est de forme longitudinale et contient deux membranes (Figure 9).

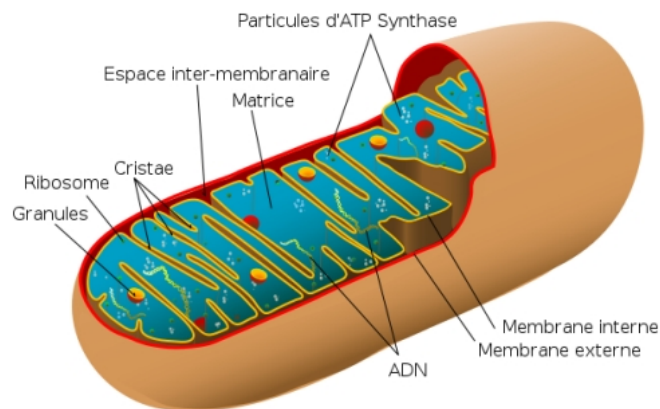


Figure 9 : Structure d'une mitochondrie. La mitochondrie est composée de deux membranes, externe et interne, délimitant un espace inter-membranaire et une matrice. Les replis caractéristiques de la membrane interne sont appelés crêtes mitochondriales ou cristae. *Adapté du site www.lewebpedagogique.com*

1.4.1.1. La membrane externe

C'est une membrane rigide dans laquelle un nombre important de protéines sont enchâssées. Ces protéines permettent les échanges entre le cytosol et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie en formant des pores qui autorisent, d'une part, la translocation de protéines (TOM), et d'autre part, permettent les échanges de métabolites de petit poids moléculaire via des porines. La porine, également appelée voltage dépendant anion channel (VDAC), est la principale voie par laquelle transitent les métabolites régulant la respiration mitochondriale. Les trois isoformes dénombrés chez les mammifères (VDAC1, VDAC2, VDAC3) présentent des différences de perméabilité et joueraient un rôle différent dans la régulation de la fonction mitochondriale (12,13,37).

1.4.1.2. L'espace inter-membranaire

L'espace inter-membranaire se situe entre les deux membranes et contient des protéines qui jouent un rôle majeur dans l'énergétique mitochondriale et la mort cellulaire (14,15,38).

La créatine kinase mitochondriale (mi-CK) occupe un rôle prépondérant dans le transfert d'énergie. Fixée sur la membrane interne, elle a un accès privilégié à l'ATP, généré dans la matrice mitochondriale et transporté dans l'espace inter-membranaire par l'adénine nucléotide translocase (ANT). La mi-CK, également couplée à la membrane externe, pourrait être impliquée dans la régulation de l'importation de créatine dans l'espace inter-membranaire et dans l'exportation de la phosphocréatine dans le cytosol (16-19,39).

1.4.1.3. La membrane interne

La membrane interne présente une perméabilité réduite et sélective, elle forme la barrière la plus distincte entre le cytosol et la matrice mitochondriale. Cette perméabilité sélective permet de maintenir un gradient de concentration pour les protéines, les ions et les métabolites. Des transporteurs permettent les échanges entre les compartiments et participent au bon fonctionnement de la mitochondrie :

- Les complexes de la chaîne respiratoire sont représentés par 5 complexes protéiques, dont l'ATP synthase, ancrés dans la membrane interne. Ils assurent le maintien du gradient de proton et la formation d'ATP.

- L'ANT est constituée de deux sous-unités de 32 kDa et d'un site unique de liaison à l'ATP ou l'ADP. Selon sa conformation, elle fait face, alternativement, à la matrice ou à l'espace inter-membranaire. L'ATP mitochondriale est échangée par l'ADP cytosolique dans un rapport 1:1. L'ANT est exprimé par trois isoformes : ANT1, ANT2 et ANT3. Chez l'Homme et le rat, l'ANT1 est l'isoforme exprimée de manière prédominante dans le muscle cardiaque et squelettique, l'ANT2 est ubiquitaire, exprimée dans tous les tissus en quantité variable en fonction de l'activité respiratoire du tissu. L'ANT3 a un faible niveau d'expression dans le cerveau, le foie, le rein, le cœur et les muscles squelettiques.

- Les protéines découplantes (UCPs) sont enchâssées dans la membrane interne et permettent le passage de protons de la matrice à l'espace inter-membranaire. Ce phénomène de fuite induit un couplage incomplet entre les phosphorylations et les oxydations, appelé respiration mitochondriale découplée. Une partie de l'énergie est ainsi perdue sous forme de chaleur. Concernant le rôle physiologique de ce découplage, il se pourrait que cette fuite des protons permette de diminuer la production des radicaux libres par une augmentation de l'oxydation

de l'ubiquinone, et donc minimise le stress oxydant et les dégâts inhérents au niveau de l'ADN (20,40). Les UCPs joueraient donc un rôle de protection contre le stress oxydant (12,21,41).

1.4.1.4. La matrice mitochondriale

La matrice est le compartiment interne de la mitochondrie délimité par la membrane interne, et contient des centaines d'enzymes nécessaires au cycle de Krebs et à la β -oxydation des acides gras, ainsi que l'ADN mitochondrial codant pour des protéines composant certaines sous-unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire, des ribosomes mitochondriaux, des tRNA, des rRNA et des enzymes nécessaires à l'expression de l'ADN.

1.4.2. Distribution des mitochondries dans la cellule musculaire

L'utilisation de sondes fluorescentes a permis de décrire la mitochondrie comme un réticulum ou un réseau dynamique et continu qui entre continuellement en fusion ou en fission (16,22,38). Cependant, une étude récente a montré que les mitochondries des cellules cardiaques adultes du rat en conditions physiologiques normales ne sont pas soumises aux processus de fusion et fission (23,24,42).

Ces analyses ont permis de regrouper les mitochondries en deux groupes : les mitochondries inter-fibrillaires et subsarcolemmales. Ces deux populations présentent des propriétés biochimiques et des niveaux d'activité enzymatique différents et semblent répondre différemment au stress métabolique (43). Les mitochondries sont ancrées dans la cellule grâce à des protéines du cytosquelette et peuvent se déplacer grâce à des protéines dites motrices telles que les myosines, la dynéine ou la kinésine.

Les mitochondries occupent environ 30 à 40 % du volume de la cellule cardiaque. Dans les cellules musculaires oxydatives, les mitochondries inter-myofibrillaires ont un arrangement cytoarchitectural assimilable à un cristal permettant d'optimiser le transfert d'énergie (44).

Les muscles squelettiques possèdent un contenu variable en mitochondries. Elles peuvent occuper 1% du volume cellulaire dans les muscles glycolytiques et jusqu'à 6 à 30 % dans les muscles oxydatifs.

1.5. Fonctionnement de la mitochondrie

1.5.1. La chaîne de transport des électrons

Les éléments clés constituant la mitochondrie sont d'une part, les réactions enzymatiques d'oxydation des substrats énergétiques et d'autre part, la chaîne de transport des électrons ou chaîne respiratoire. L'oxydation des substrats par le cycle de Krebs ou la β -oxydation entraîne la réduction du NAD^+ en NADH et du FAD^{2+} en FADH_2 . Ces intermédiaires sont appelés équivalents réducteurs et fournissent des électrons à la chaîne respiratoire. Cette dernière est composée de cinq complexes :

- le complexe I ou NADH déshydrogénase
- le complexe II ou succinate déshydrogénase
- le complexe III ou ubiquinol cytochrome c réductase
- le complexe IV ou cytochrome c oxydase
- le complexe V ou ATP synthase

Tous sont composés de plusieurs sous-unités protéiques. Seul le complexe II est entièrement codé dans le noyau tandis que les autres complexes résultent de l'association de protéines codées par les ADN nucléaire et mitochondrial (45).

1.5.2. La phosphorylation oxydative

Les électrons sont transportés par le NADH et le FADH₂, respectivement aux complexes I et II qui transfèrent l'électron à l'ubisemiquinone, cette dernière l'acheminant au complexe III. L'arrivée de l'électron au complexe IV constitue la fin de la chaîne d'oxydoréduction et entraîne la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Les réactions associées au passage de l'électron au niveau des complexes I, III et IV entraînent le passage d'un proton vers l'espace inter-membranaire à travers les complexes. Ce passage établit un gradient électrochimique de protons qui crée une force proton-motrice utilisée par le complexe V pour phosphoryler des molécules d'ADP en ATP, assurant le couplage de la chaîne des oxydoréductions avec la production d'ATP (Figure 10) (46).

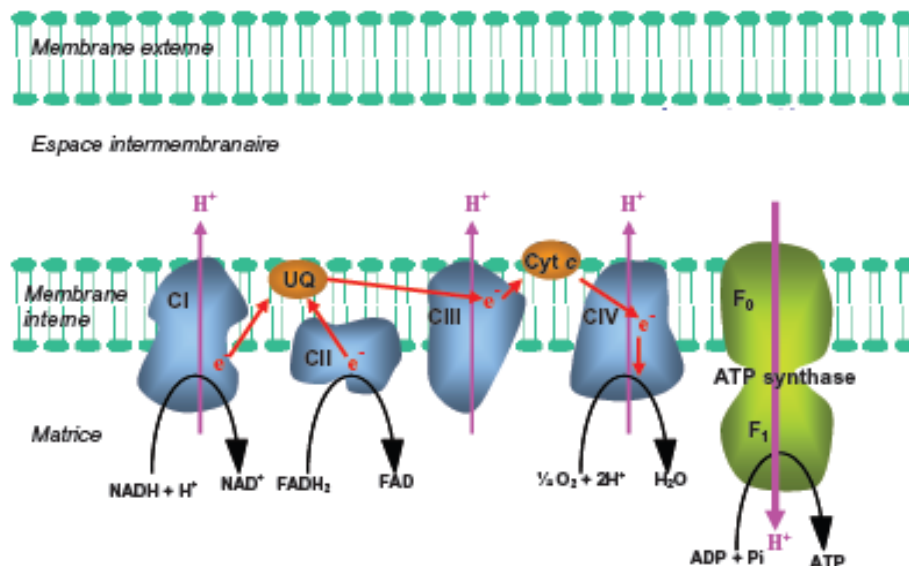


Figure 10 : Chaîne de transport des électrons. Les électrons sont apportés au niveau de la chaîne respiratoire par les équivalents réducteurs : NADH (complexe I) et FADH₂ (complexe II).

L'électron est ensuite amené au niveau du complexe IV où il est utilisé pour former de l'eau. Le passage de l'électron au niveau des complexes I, III et IV entraîne le passage de protons (H⁺) dans l'espace inter-membranaire et crée un gradient protonique qui va permettre la formation ATP lors du passage des protons au niveau de l'ATP synthase. Adapté de Stock *et al.* (46).

1.5.2.1. Complexe I : NADH déshydrogénase

C'est la première enzyme de la chaîne respiratoire. Elle catalyse le transfert de deux électrons du NADH à l'ubiquinone, couplé à la translocation de quatre protons au travers de la membrane, ce qui participe à la force proton-motrice (47). Cette enzyme est constituée d'environ 45 sous-unités, dont 38 sont codées par le génome nucléaire, tandis que 7 autres sont codées par le génome mitochondrial. Avec son poids moléculaire de 980 kDa environ, elle constitue l'un des plus gros complexes protéiques membranaires. Le domaine hydrophile de ce complexe contient le site de liaison du NADH, la flavine mononucléotide qui est le premier accepteur d'électrons, et neuf centres Fer/Soufre (FeS) constituant le centre catalytique de l'enzyme (47). Le système de pompage des protons est quant à lui localisé dans la partie membranaire du complexe (48).

1.5.2.2. Complexe II : Succinate déshydrogénase

Il joue un rôle important dans la mitochondrie puisqu'il fait à la fois partie de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs. Il est composé de quatre sous-unités (A à D). Les sous-unités A et B constituent le domaine hydrophile de l'enzyme dépassant dans la matrice tandis que les sous-unités C et D constituent le domaine d'ancrage du complexe dans la membrane interne mitochondriale. Les quatre gènes codant pour ces quatre sous-unités font partie du génome nucléaire. Ce complexe qui oxyde le succinate en fumarate peut cependant, dans certaines conditions, fonctionner dans le sens inverse. De plus, dans certains tissus tels que le rein, la quantité de complexes II est particulièrement élevée par rapport à certaines autres enzymes matricielles (comme la citrate synthase). Dans ce cas, la succinate déshydrogénase délivre aux ubiquinones une quantité d'électrons supérieure à ce que le cytochrome c peut transporter, ce qui favorise une suroxydation des ubiquinones. Ce phénomène peut entraîner un flux réverse d'électrons au travers du complexe I (49), entraînant une réduction plus importante de ce complexe, ce qui favorise la production de radicaux libres. Des défauts d'activité de ce complexe ont été corrélés au développement de pathologies telles que l'ataxie de Friedrich (50), la maladie de Huntington (51) ou certaines encéphalopathies infantiles rares (52). Des mutations de sous-unités du complexe II ont également été décrites à plusieurs reprises comme étant un facteur important de tumorigénèse (53).

1.5.2.3. Complexe III : Complexe b-c1 ou ubiquinone-cytochrome c réductase

Il contient quatre groupes prosthétiques redox actifs : 2 cytochromes b (bL et bH), le cytochrome c1 et un centre Fer/Soufre. Ce complexe est composé de 11 sous-unités protéiques parmi lesquelles les sous-unités III, IV et V constituent les groupes redox, les 8 autres sous-unités ne comportant pas de groupement prosthétique. La majorité de ces sous-unités est codée par le génome nucléaire, seule la sous-unité comprenant les cytochromes b est codée par le génome mitochondrial (54). Cette enzyme catalyse le transfert de deux électrons de l'ubiquinol au cytochrome c. Cette étape est associée au transfert de 4 protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire grâce au cycle Q décrit par Mitchell (55). Ainsi, des électrons dérivant de l'oxydation de l'ubiquinol sont recyclés par le site ubiquinol réductase de cette enzyme ce qui permet le pompage des protons (55).

1.5.2.4. Complexe IV : cytochrome c oxydase

Il appartient à la superfamille des oxydases à hème-cuivre. Son isoforme humaine est composée de 13 sous-unités dont trois (Cox I, Cox II et Cox III) sont codées par le génome mitochondrial (54). Les électrons cédés par le cytochrome c entrent dans ce complexe protéique par le centre cuivre CuA puis sont transférés successivement à l'hème a puis au site actif binucléaire où s'effectue la liaison de l'oxygène et sa réduction en eau (56). Durant cette étape, 4 protons sont consommés et 4 autres sont transloqués de la matrice vers l'espace inter-membranaire. Des défauts d'activité de cette enzyme ont été associés au développement de différentes myopathies (57).

1.5.2.5. ATP synthase

Elle est composée de deux sous-complexes (Figure 11). La partie F_0 est insérée dans la membrane interne mitochondriale et conduit les protons depuis l'espace inter-membranaire vers la matrice. Cette partie, chez les mammifères, est composée de 5 sous-unités (A6, b, c, d et Oligomycin Sensitivity Conferral Protein). Le segment F_1 est matriciel, au contact de la membrane interne et utilise le gradient de protons pour convertir l'ADP en ATP et vice versa. Il est composé de 5 sous-unités (α , β , γ , δ , ϵ dans un ratio 3, 3, 1, 1, 1). Des protéines accessoires (e, f, g et F6) sont également associées à ce complexe. Le fonctionnement de ce dernier repose sur les sous-unités c (au nombre de 10) de la partie F_0 qui, connectées à la sous-unité γ de F_1 , agissent comme un rotor qui utilise le passage des protons à travers le stator (sous-unités A6, b, d et OSCP) pour fonctionner. La sous-unité γ cause, quant à elle, un changement conformationnel dans le trimère circulaire de sous-unités α et β de la partie F_1 et permet ainsi successivement la liaison de l'ADP puis la réaction avec le phosphate inorganique pour générer l'ATP et enfin le relargage de l'ATP.

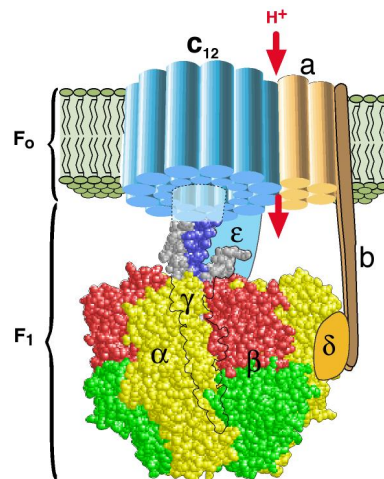


Figure 11 : Structure de l'ATP synthase F_0F_1 -ATPase. (Wang et Oster) (58).

1.5.3. Rendement de la phosphorylation oxydative

Les équivalents réduits, NADH, H^+ et $FADH_2$ sont respectivement oxydés au niveau des complexes I et II de la chaîne respiratoire. Court-circuitant le complexe I, le nombre de protons expulsés par molécule d'oxygène durant l'oxydation du $FADH_2$ est plus faible que celui de l'oxydation du NADH, H^+ . Ainsi, le rendement de la phosphorylation oxydative, qui

peut être mesuré par le rapport entre les flux d'ATP et d'oxygène (J_{ATP}/J_O), est plus faible avec $FADH_2$ qu'avec $NADH, H^+$. De ce fait, la différence essentielle entre le catabolisme du glucose et celui des acides gras tient à la proportion relative des équivalents réduits fournis à la chaîne respiratoire : le rapport $NADH, H^+$ sur $FADH_2$ est respectivement de 4 lors de l'oxydation du glucose et de 2 pour celle des acides gras. Cette différence est donc à l'origine de la perte de rendement de la phosphorylation oxydative pour les acides gras.

Le premier facteur du contrôle de la phosphorylation oxydative est la concentration d'ADP extra-mitochondriale (59). En effet, on observe une relation hyperbolique entre le niveau de respiration mitochondriale et cette concentration en ADP. Ceci implique que l'adénine nucléotide translocase (ANT), qui permet la sortie de l'ATP et l'entrée de l'ADP dans la mitochondrie, contribue également à la régulation de la respiration. Toutefois, l'ADP extra-mitochondriale n'est pas le seul paramètre contrôlant la phosphorylation oxydative. En effet, d'autres facteurs jouent des rôles déterminants :

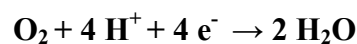
1°) la concentration extra-mitochondriale en phosphate inorganique (P_i)

2°) l'approvisionnement en H^+ , fourni par les différents substrats

3°) l'activité du cytochrome c oxydase (complexe IV) (60).

Dans les conditions de métabolisme basal, 90% de l' O_2 est consommé au niveau de la mitochondrie. De cette consommation mitochondriale, 80% sont utilisés pour la synthèse d'ATP et 20% lors de la fuite de protons. La fuite de protons est caractérisée par le retour passif de protons dans la matrice (proton leak) et ceci sans passer par l'ATP synthase donc sans générer d'ATP. Ces fuites membranaires diminuent la force protomotrice et induisent une baisse de l'efficacité de l'oxydation phosphorylante (61).

Le cytochrome c oxydase (Cox), accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire (62), est une enzyme cruciale pour la respiration mitochondriale. Elle fait partie du complexe IV de la chaîne respiratoire, et permet de catalyser la réaction suivante :



Cette réaction représente une étape participant à la limitation de la vitesse de la phosphorylation oxydative.

1.5.4. Régulation de la phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est régulée au niveau de sa vitesse de synthèse d'ATP, et donc de respiration, et au niveau de son efficacité.

Deux facteurs principaux peuvent être impliqués dans le contrôle de la respiration mitochondriale : les substrats de l'oxydation et les substrats et produits de la phosphorylation

(ADP et ATP).

1.5.4.1. Les substrats de l'oxydation

Une part importante du contrôle de la respiration est exercée au niveau de l'apport en coenzymes réduits ($NADH$ et $FADH_2$). Une augmentation de l'apport en substrats respiratoires stimule la respiration mitochondriale. Néanmoins cette stimulation de la respiration par l'augmentation de la concentration en substrats est tissu-dépendante. En effet,

une modification du rapport NADH/NAD^+ mitochondrial *via* un changement de la concentration en substrats respiratoires entraîne une augmentation de la vitesse de respiration et de la synthèse d'ATP sur mitochondries isolées de foie (63), et de cœur (64), mais ces résultats n'ont pas été retrouvés dans le muscle cardiaque *in vivo* (65), ni dans le muscle squelettique *in vivo* (66) ou *in situ* sur fibres perméabilisées (67). De la même manière, en fonction du substrat utilisé (pyruvate, acides gras), la vitesse maximale de respiration mitochondriale varie au sein d'un même muscle et n'atteint pas le même niveau en fonction du type de muscles (68).

1.5.4.2. ADP et ATP

Les premiers travaux sur mitochondries isolées menés par Lardy et Wellman en 1952 ont montré que la vitesse de respiration mitochondriale est fortement augmentée en présence d'un système de régénération de l'ADP (hexokinase + glucose) (69). Ces observations aboutirent à la notion de "contrôle respiratoire", défini comme étant le contrôle de la vitesse de transport des électrons le long de la chaîne respiratoire par la concentration cytosolique en ADP. La théorie chimiosmotique permet d'expliquer ce phénomène puisque l'ajout d'ADP stimule le fonctionnement de l'ATP synthase et induit ainsi une augmentation de la consommation du gradient de protons. La diminution de ce gradient stimule alors le fonctionnement des pompes à protons mitochondriales et donc la respiration.

1.6. Régulation transcriptionnelle mitochondriale

La mitochondrie possède son propre génome, mais celui-ci ne code que pour une partie des protéines de la chaîne respiratoire. Les autres protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire. Cette double origine des protéines mitochondriales nécessite une régulation fine et coordonnée de leur expression (70). Par conséquent, il existe des facteurs régulateurs clés codés par le génome nucléaire qui vont permettre d'une part la transcription du génome mitochondrial et d'autre part l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales.

1.6.1. L'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial (mtADN) humain est une molécule bicaténaire circulaire d'environ 16 kilobases dépourvue d'introns et d'histones. Chaque mitochondrie possède un nombre variable de copies (2 à 10) et une mutation de cet ADN peut être présente sur toutes les copies (homoplasmie) ou seulement sur une partie des copies (hétéroplasmie).

L'ADNmt code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale, 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomiques.

1.6.2. Contrôle transcriptionnel de la biogenèse mitochondriale

1.6.2.1. Peroxisome proliferator –activated receptor gamma co-activator 1 (PGC-1)

o *PGC-1 α*

La découverte de PGC1- α fut un évènement majeur dans la compréhension des mécanismes de la biogenèse mitochondriale. Le PGC1- α est considéré comme un des cofacteurs centraux de la régulation de la biogenèse mitochondriale (71). L'augmentation de l'expression de PGC1- α dans le muscle squelettique est induite par l'exercice aussi bien chez les rongeurs (72) que chez l'Homme (73).

La compréhension de la fonction de PGC1- α dans la biogenèse mitochondriale a été améliorée par l'utilisation de modèles animaux permettant un gain ou une perte de fonction de ce facteur.

Lin *et al.* (74) ont réalisé la surexpression de PGC1- α sous le contrôle du promoteur de la créatine kinase, spécifiquement dans les fibres rapides du muscle squelettique. Cette surexpression résulte en une conversion de fibres rapides IIB en fibres de type IIA ainsi qu'en fibres lentes de type I (20 et 10 % respectivement) dans le plantaris. A l'inverse, des souris déficientes pour PGC1- α présentent une diminution du nombre de mitochondries et une diminution des capacités oxydatives dans les muscles lents (75). Récemment, Handschin *et al.* (76) ont montré que des souris, chez lesquelles le PGC1- α est inactivé spécifiquement dans le muscle squelettique présentaient une conversion de fibres lentes en fibres rapides, et étaient moins résistantes à l'exercice avec des dommages au niveau des fibres musculaires suite à l'exercice.

Il a été également démontré que le PGC1- α induisait une surexpression de la Cox et du cytochrome c. Le PGC1- α pourrait également être associé à une intensification de la production de ROS. Or, une publication récente montre que l'expression des enzymes détoxifiantes s'accroît parallèlement avec celle de PGC1- α (77).

Mais les modifications post-traductionnelles occupent également une place prépondérante dans la régulation de cette activité. Il a été montré que la désacétylation de PGC1- α augmente son activité transactivatrice au niveau de gènes hépatiques impliqués dans la néoglucogénèse et au niveau de gènes impliqués dans le fonctionnement mitochondrial du tissu adipeux brun et du muscle squelettique (78). Ces travaux rapportent que la désacétylation de PGC1- α s'effectue par l'intermédiaire de la sirtuin-1 (SIRT1), un des sept orthologues chez les mammifères de la protéine Sir2 (*silent information regulator 2*) de *S. cerevisiae*, membre fondateur de la famille des sirtuins (79). La SIRT1 est une désacétylase dépendante du NAD⁺ qui exerce son activité enzymatique sur les histones mais également sur des régulateurs transcriptionnels, modulant par ce biais leur activité. Elle est ainsi impliquée dans de nombreux processus cellulaires. En particulier, SIRT1 est capable de moduler la longévité chez différents organismes. Certes SIRT1 n'a pas le PGC-1 pour seule cible. Il a notamment été démontré que les facteurs de transcription de la famille Forkhead de classe O (FoxO) sont capables de répondre à la présence d'un stress oxydant lorsqu'ils sont activés par une désacétylation attribuée à SIRT1 (80). Ils induisent alors le ralentissement des processus apoptotiques et favorisent la détoxification cellulaire par l'activation des gènes codant la superoxyde dismutase-2 (SOD2) et la catalase, mais ils n'ont en revanche jamais été identifiés, au contraire de PGC-1, comme intervenant dans l'énergétique cellulaire.

Enfin, le PGC-1 α serait plus impliqué dans la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique (70). Le resveratrol, un polyphénol présent dans le raisin noir et ses produits dérivés, est connu pour ses propriétés antioxydantes et il induit une activation de SIRT1 et PGC1- α (81).

o *PGC-1 β*

Ce co-activateur transcriptionnel présente une forte homologie de structure avec celle de PGC-1 α (82). Le PGC-1 β coactive en partie les mêmes facteurs de transcription que PGC-1 α pour induire l'expression de gènes cibles communs tels que les gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial (83). Cependant, PGC-1 β régule d'autres facteurs de transcription qui ne sont pas des cibles de PGC-1 α . Il semblerait que le rôle de PGC-1 α soit moins prépondérant que celui de PGC-1 β . Cependant, PGC-1 β possède la capacité d'interagir avec le nuclear respiratory factor-1 (NRF1) et donc est un régulateur potentiel de l'activité de facteur de transcription de NRF1 (84). De plus, la surexpression de PGC-1 β entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène et de la biogenèse mitochondriale dans le muscle (85). Enfin, le PGC-1 β semble jouer un rôle plus important dans le cœur que PGC-1 α au niveau de la biogenèse mitochondriale (86). Par ailleurs, il semble que l'exercice n'entraîne pas d'activation de PGC-1 β dans le muscle squelettique contrairement à PGC1- α (87).

1.6.2.2. Nuclear respiratory factors (NRFs)

Le NRF1 a été identifié pour la première fois par Evans et Scarpulla en 1989 (88) comme le principal activateur transcriptionnel du gène du cytochrome c de rat. Par la suite, des éléments de liaison à NRF1 ont été trouvés dans le promoteur de plusieurs gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que dans le promoteur de gènes impliqués dans la réplication de la transcription de l'ADN mitochondrial (89). Par son large rôle de régulateur transcriptionnel, NRF1 est un élément majeur des processus de biogenèse mitochondriale.

Le NRF2 se fixe sous forme de tétramère sur le promoteur de plusieurs sous-unités du cytochrome c oxydase et régule ainsi leur transcription (70). Les facteurs NRF1 et NRF2 régulent en aval deux facteurs impliqués dans la réplication et la transcription mitochondriale (facteur A de transcription mitochondriale : TFAM) permettant ainsi une expression coordonnée des gènes nucléaires et mitochondriaux afin d'assurer un fonctionnement mitochondrial correct.

Il a été montré que le NRF1 était particulièrement impliqué dans la régulation de l'expression de la Cox mais aussi dans la régulation de la voie de synthèse de l'hème. Le NRF2 est également impliqué dans la régulation de l'expression des gènes liés au métabolisme mitochondrial, notamment une sous-unité du complexe IV de la chaîne respiratoire (Cox4) (90). Cependant, la régulation de la synthèse des protéines mitochondriales par différents facteurs de transcription implique qu'il existe un facteur prépondérant qui contrôle à lui seul l'activité de ces différents facteurs de transcription.

Parmi l'ensemble des co-activateurs associés à PGC-1, NRF1 et NRF2 sont ceux qui sont le plus impliqués dans la régulation de l'expression des gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire. Le couple de co-activateurs NRF1 et NRF2 est ainsi associé à la régulation de gènes qui codent pour des protéines qui composent les complexes de la chaîne respiratoire et ce chez le rat, la souris mais également l'homme (90).

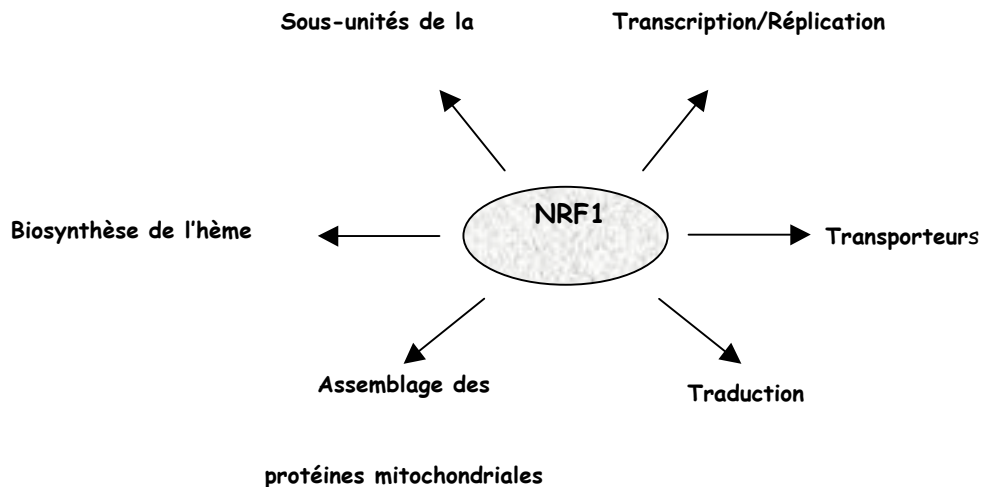


Figure 12 : Schéma représentant les cibles de NRF1 et NRF2. (Scarpulla) (90).

1.6.2.3. Le facteur de transcription mitochondriale A (TFAm)

Le facteur TFAm est également une protéine bi-fonctionnelle. Il assure un rôle de facteur de transcription (91) et il est indispensable au maintien et à la réplication du génome mitochondrial (92).

A présent, il est établi que le facteur mitochondrial TFAm (Transcription factor A, mitochondrial) ainsi que les facteurs NRF1 et 2 sont requis pour la réplication de l'ADN mitochondrial (93).

L'expression de ces facteurs est observée suite à une expression ectopique de PGC-1 α dans des cellules C₂C₁₂ mais le ou les partenaire(s) de PGC-1 α dans cette régulation transcriptionnelle sont encore mal connus (71). Cependant, il a été montré que NRF1 et NRF2 peuvent tous deux induire l'expression de TFAm (93) et l'équipe de Wu a mis en évidence qu'une interaction directe entre PGC-1 α et NRF1 permettait l'induction de l'expression de TFAm (71).

A son rôle essentiel dans la transcription mitochondriale, s'ajoute un rôle la stabilisation et la réplication de l'ADN mitochondriale (92).

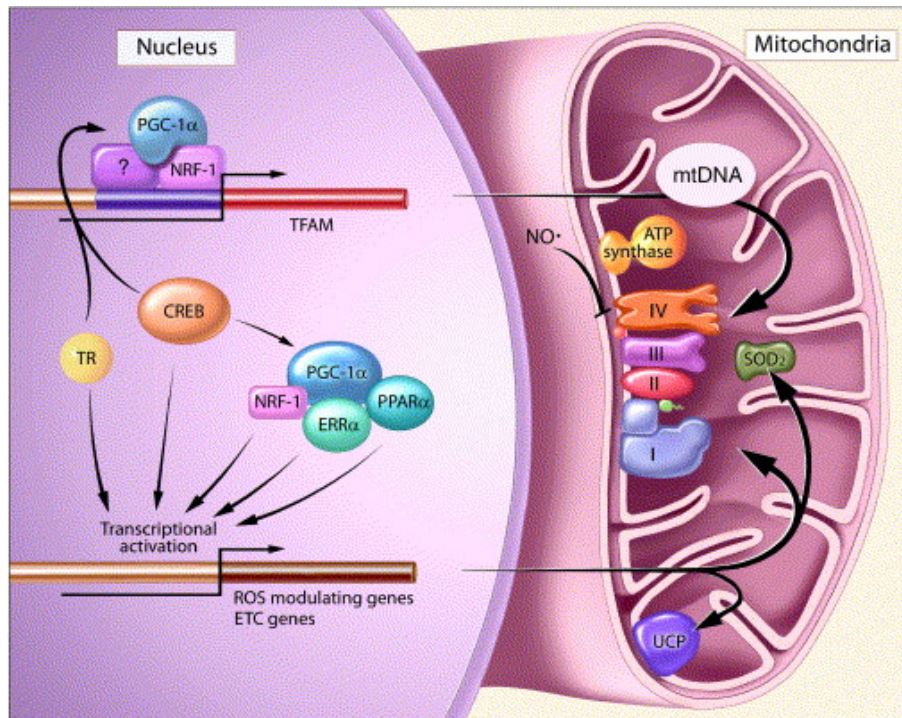


Figure 13 : Schéma représentant la biogénèse mitochondriale. (Scarpulla) (93).

En résumé.

La production d'énergie aérobie dans le muscle est dépendante de la capacité à produire de l'énergie lors du processus de la phosphorylation oxydative qui se déroule à l'intérieur de la mitochondrie. La mitochondrie est un organite composé d'une multitude de complexes protéiques qui sont tous finement régulés en fonction des besoins et des conditions du milieu cellulaire. La mitochondrie qui a un rôle fondamental dans la production d'énergie est aussi un lieu privilégié de production de radicaux libres oxygénés qui sont à l'origine de réactions délétères pour l'équilibre de la cellule.

La biogenèse mitochondriale est régulée par de nombreux co-activateurs, il semblerait cependant que les PGC-1 α et β aient un rôle prépondérant dans la régulation de l'activité de ces cofacteurs. Les cofacteurs PGC-1s se trouvent ainsi au centre d'un système complexe de régulation du métabolisme énergétique. Son action sur de nombreux co-activateurs permet de réguler l'expression de gènes liés à de nombreuses fonctions métaboliques impliquées dans la réponse aux besoins énergétiques cellulaires. Les PGC-1s se trouvent ainsi au centre de la régulation de l'apport en substrat et de leur utilisation au sein de la cellule. Les PGC-1s sont également au centre de la régulation de l'expression de protéines constituant de la chaîne respiratoire et donc régulent par ce biais l'utilisation des substrats et la synthèse de l'ATP. Par cette faculté, les PGC-1s apparaissent ainsi comme les acteurs centraux de l'adaptation du métabolisme énergétique aux besoins énergétiques cellulaires.

2. LE STRESS OXYDANT ET L'ISCHEMIE-REPERFUSION

2.1. Introduction

Les organismes multicellulaires possèdent tous des réseaux complexes de signalisation intra et extracellulaire qui contrôlent et harmonisent les fonctions cellulaires dans les différents processus physiologiques tels que l'organogénèse, l'intégrité et l'homéostasie tissulaire, et la réponse aux événements pathologiques.

Les radicaux libres de l'oxygène (ROS) ou espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species : ROS) produits par les cellules ont été traditionnellement considérées comme des produits toxiques du métabolisme. Le stress oxydant intracellulaire peut être défini comme un déséquilibre de la balance entre la production des ROS d'un côté et son élimination de l'autre. La capacité à éliminer les ROS est appelée « capacité antioxydante » de la cellule, et permet d'empêcher les lésions oxydatives. Une surproduction de ROS et/ou un déficit en systèmes protecteurs antioxydants est d'ailleurs fortement impliqué dans les mécanismes physiopathologiques de nombreuses maladies tels que le diabète, la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson.

2.2. Différentes formes de radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux ; ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule.

L'O₂ est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitales externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en anion superoxyde : O₂^{•-}, puis en peroxyde d'hydrogène : H₂O₂. Il est ainsi à l'origine de la formation des ROS.

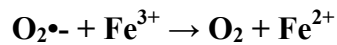
L'appellation ROS inclut les radicaux libres dérivés de l'oxygène : anion superoxyde (O₂^{•-}), radical hydroxyle (OH[•]) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

L'anion superoxyde (O₂^{•-}) est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. La dismutation de cet O₂^{•-} entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'H₂O₂ n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production.

Selon la réaction de Fenton, l'H₂O₂ se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe²⁺), en un ion OH⁻ et un radical hydroxyle (OH[•]) :



Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) qui régénère le Fe^{3+} en Fe^{2+} selon la réaction d'Haber-Weiss :



Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), d'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et de fer permet la production de radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$). L' $\text{OH}\cdot$, avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L' $\text{OH}\cdot$ apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS (Tableau 2).

ROS	Origine	Demi-vie (seconde)
Radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$)	Réaction de Fenton	10^{-9}
Anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	Chaîne respiratoire Xanthine oxydase NADPH oxydase	10^{-4}
Oxygène singlet ($^1\text{O}_2$)	Photolyse	10^{-3}
Radical peroxyde ($\text{ROO}\cdot$)	Peroxydation des lipides	0.1
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	Chaîne respiratoire Xanthine oxydase NADPH oxydase	1

Tableau 2 : Identité moléculaire, origine et demi-vie des principaux radicaux libres de l'oxygène (ROS) pouvant influencer le muscle squelettique. (Lawler *et al.*) (94).

2.3. Source cellulaire des radicaux libres

Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de ROS parmi lesquelles l'auto-oxydation des petites molécules, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes et les mitochondries.

2.3.1. La xanthine oxydase

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' $O_2^{\bullet-}$ (95).

2.3.2. La NADPH oxydase

La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (96). En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d' $O_2^{\bullet-}$ au niveau des vaisseaux. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (97).

2.3.3. Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (98). La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS (99). Il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum.

2.3.4. Les peroxysomes

Les peroxysomes sont une importante source de production d' H_2O_2 cellulaire (100). Toutefois, l' H_2O_2 est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d' H_2O_2 produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase.

2.3.5. La mitochondrie

La principale source de ROS est la mitochondrie et plus précisément au niveau de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires (101).

La chaîne respiratoire est une source permanente de ROS. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisée par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des ROS (102). Mais ces estimations sont réalisées à partir de mesure *in vitro* sur des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentration saturante en substrats. Il est vraisemblable que la production mitochondriale de ROS *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,4 à 0,8%) (103). Il existe deux sites de production de ROS : les complexes I et III (Figure 14).

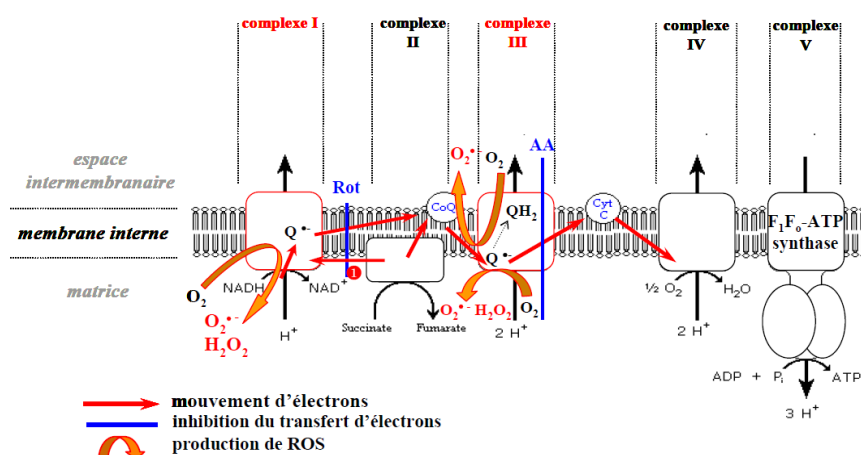


Figure 14 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire. Deux sites de production d'O₂•⁻ sont reconnus : le complexe I et le complexe III. L'utilisation de la roténone (Rot) et de l'antimycine A (AA) a permis de localiser la production de ROS au niveau de ces complexes et de mettre en évidence le flux inverse d'électrons remontant du complexe II au complexe I.

Adapté de Boveris *et al.* (102).

Le complexe III a longtemps été considéré comme le plus important site de production d'O₂•⁻ et le complexe I comme un acteur secondaire. Cependant, ces premières études utilisaient comme substrat respiratoire du succinate (fournisseur de FADH₂) combiné à de la roténone (inhibiteur du complexe I). Or, en ajoutant successivement le succinate puis la roténone, de récentes mesures ont permis de mettre en évidence l'existence d'un flux inverse d'électrons.

Ce flux d'électrons issus de l'oxydation du FADH₂ remonte du complexe II vers le complexe I atteignant ainsi le site de production de ROS du complexe I. Il a alors été clairement défini que la source majeure de ROS était le complexe I via ce flux inverse d'électrons (103). Ce flux d'électrons entraîne également la réduction du NAD⁺ en NADH (104).

Ceci implique que la production de ROS est directement dépendante des équivalents réduits fournis aux mitochondries. La quantité d'H₂O₂ produite en présence de substrat fournissant du FADH₂ au complexe II (succinate, flux inverse d'e⁻) est en effet plus importante qu'avec des substrats fournissant du NADH, H⁺ au complexe I (glutamate/malate ou pyruvate/malate, flux normal d'e⁻) (104).

Concernant la production de ROS liée au flux normal d'électrons, elle est plus élevée avec du glutamate/malate qu'avec du pyruvate/malate bien que ces deux substrats fournissent du NADH, H⁺ (105). Cette différence pourrait s'expliquer par les propriétés antioxydantes du pyruvate.

A ce jour, le site exact de la production de ROS du complexe I reste encore controversé.

Trois hypothèses sont émises : cette production aurait lieu au niveau :

1°) des quinones (Q)

2°) du groupe des flavines mononucléotides (FMN) (104)

3°) du groupe fer-soufre (Fe/S) (106)

Comme ces trois structures sont très proches les unes des autres et interagissent les unes avec les autres (107), il est difficile de dire laquelle intervient spécifiquement dans la production de ROS.

La production de ROS au niveau du complexe III, quant à elle, résulte de la réduction partielle de l'ubiquinone. L'électron libre provenant du transfert à travers la chaîne respiratoire s'apparie avec l'ubiquinone (Ub) formant le radical semi-ubiquinone (UbH•) qui est instable. Un deuxième électron est donc nécessaire pour le stabiliser et permettre le transfert de proton grâce à l'intermédiaire ubiquinol (UbH₂). Toutefois, il existe une probabilité pour que le radical semi-ubiquinone rencontre une molécule d'oxygène avant d'être stabilisé par le deuxième électron. La molécule d'oxygène va alors capter l'électron libre générant ainsi un anion superoxyde (108).

La production de ROS au niveau du complexe I a lieu uniquement dans la matrice alors que la production au niveau du complexe III a lieu dans l'espace matriciel ainsi que dans l'espace inter-membranaire (109).

L'O₂•- généré dans la matrice est éliminé dans ce compartiment par la superoxyde dismutase mitochondriale (Mn-SOD), l'H₂O₂ alors produit peut diffuser rapidement à travers la membrane jusqu'au cytoplasme. L'O₂•- produit dans l'espace inter-membranaire est soit :

1°) transformé par l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase cytoplasmique (Cu/Zn-SOD)

2°) détoxifié par le cytochrome c

3°) transféré dans le cytoplasme via un canal voltage dépendant VDAC

L'O₂•- est alors pris en charge par la Cu/Zn-SOD (110).

La vitesse de production de ROS est fonction du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et du degré de réduction des transporteurs d'électrons. Cependant, cette production radicalaire semble également être liée au potentiel redox et au potentiel de membrane ($\Delta\psi$). D'une part, l'augmentation du potentiel redox entraîne une augmentation de la production de ROS (111). D'autre part, il existe une relation directe entre la respiration mitochondriale, le $\Delta\psi$ et la production de ROS (112). Ainsi, une diminution du potentiel de membrane s'accompagne d'une augmentation de la respiration et d'une diminution de la production de ROS.

Puisque la consommation basale d'oxygène est associée à un potentiel de membrane élevé et donc à un état plus réduit des transporteurs d'électrons, la production de ROS dans ces conditions est la plus importante. Par contre, elle est drastiquement diminuée en condition d'oxydation phosphorylante (après ajout d'ADP). En effet, la présence d'ADP, stimulant la respiration, augmente l'oxydation des transporteurs d'électrons et ainsi diminue fortement le flux d'électrons s'échappant de la chaîne respiratoire pour réduire l'O₂ en O₂•- (107).

Néanmoins, la corrélation entre le potentiel de membrane et la production de ROS est à nuancer. La production de ROS liée à l'oxydation du NADH, H⁺ au niveau du complexe I ainsi que celle générée au niveau du complexe III sont peu sensibles aux variations du $\Delta\psi$ (112). Starkov & Fiskum en 2003 confirment ces données en observant une quantité

significative d' H_2O_2 produite en présence de substrats fournissant du NADH, H^+ même en absence de $\Delta\psi$ (30% de la valeur obtenue en $\Delta\psi$ maximal) (113). Ainsi, seul le flux inverse d'électrons est réellement sensible au $\Delta\psi$; une légère dépolarisation étant suffisante pour inhiber complètement la production de ROS par cette voie (7,14,114). Il existe donc deux mécanismes dans la production de ROS : un mécanisme dépendant du potentiel de membrane de la mitochondrie et un mécanisme indépendant de ce potentiel.

2.4. Systèmes antioxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (25,26,115).

2.4.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS (Figure 15).

2.4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Cette enzyme catalyse la dismutation de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD ou SOD1), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD ou SOD2) et une forme extracellulaire (EC-SOD ou SOD3). Il a été montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter-membranaire. La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouve dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries. Cependant, la Mn-SOD semble indispensable à la vie puisque sa mutation est non viable ; l'espérance de vie maximale pour des souris Mn-SOD^{-/-} n'est que de 22 jours pour certains types de mutations (27,116). Ceci n'est pas le cas pour la forme cytosolique bien que l'espérance de vie chez des souris transgéniques Cu/Zn-SOD^{-/-} soit plus faible que celle de souris Cu/Zn-SOD^{+/+} (130 semaines vs 180 semaines) (27,117).

2.4.1.2. Glutathion peroxydase (GPx) et reductase (GR)

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en H_2O et O_2 . Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (28,118). Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (29,118).

La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. 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 les mitochondries.

2.4.1.3. Catalase

La catalase est également responsable de l'élimination d' H_2O_2 par une transformation en H_2O et O_2 . Contrairement à la GPx, l'affinité de la catalase pour l' H_2O_2 est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues {Powers:1999up}{Mates:1999vl}. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol.

2.4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, le glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C (Figure 15).

2.4.2.1. Oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action pro-oxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss).

2.4.2.2. Glutathion

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (30,118). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (31,120).

2.4.2.3. Ubiquinones et cytochrome c

Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant. L'ubiquinol protège 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 ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (121).

Le cytochrome c présent dans l'espace inter-membranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre de l' $O_2^{\bullet-}$ produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l' H_2O (122).

2.4.2.4. Vitamine E et vitamine C

Les vitamines E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être des plus importantes dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique.

La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l' $O_2^{\bullet-}$ et l' OH^{\bullet} . Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E.

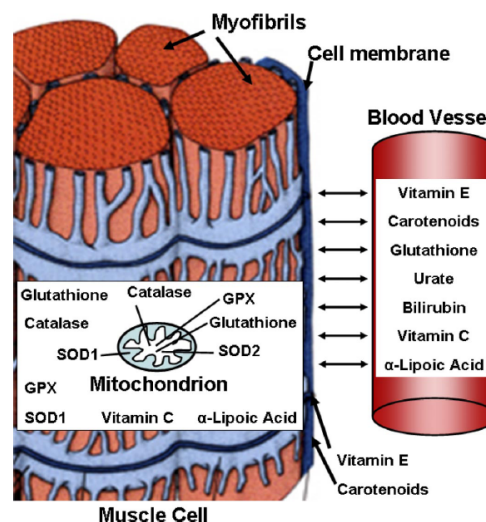


Figure 15 : Localisation des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans la cellule musculaire. GP_x, glutathione peroxidase; SOD1, superoxyde dismutase 1; SOD2, superoxyde dismutase 2. (Powers *et al.*) (115).

2.5. Dégâts cellulaires et mitohormesis

Les dommages induits par les ROS sont une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Les ROS initient également l'apoptose en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (mPTP).

2.5.1. Peroxydation lipidique

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés

(AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation. L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (123). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), l'acide thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique. Cependant, le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial par action directe sur les UCP et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale de ROS (41). Ce mécanisme pourrait être un moyen de réguler la production de ROS.

2.5.2. Oxydation des protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (124). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} , peuvent être classées en deux catégories :

1°) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique

2°) celles qui modifient les peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases...) (124). L'oxydation des protéines peut être un signal pour les "protéines de stress" (Heat Shock Protein, HSP) connus pour leur rôle cytoprotecteur. Ainsi, les membres de la famille de HSP70 ont un rôle de protéines chaperonnes. Elles prennent en charge les protéines dénaturées (participation à la restauration de la fonction de ces protéines) mais aussi les protéines en cours de maturation (participation à leur synthèse, à leur importation vers le réticulum endoplasmique et la mitochondrie). La synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS.

2.5.3. Dommage de l'ADN

Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, ces organites sont les premières cibles des ROS. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (125). Les mécanismes explicatifs proposés sont :

1°) l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial

2°) sa localisation proche de la membrane interne,

3°) des mécanismes de réparations frustrés

4°) une structure circulaire sans introns, augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (125).

L'idée d'un "cercle vicieux" ou d'une théorie avec un *feed-back* positif est avancée pour expliquer les altérations mitochondriales dans certaines pathologies : des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire pourraient augmenter la production de ROS et induire ainsi une augmentation progressive des mutations du génome mitochondrial et des protéines

synthétisées. Comme le génome mitochondrial code pour quelques sous-unités de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (sept sous-unités du complexe I, une du complexe III, trois du complexe IV et deux de l'ATP synthase), leur défaut d'expression pourrait exacerber la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire au profit de la production de ROS. Ainsi, plus la fuite d'électrons est importante, plus la formation de ROS provoquant de nombreuses mutations mitochondriales aggraverait ce phénomène (126).

Les fonctions de la mitochondrie sont donc particulièrement exposées aux dommages oxydatifs provoquant principalement une diminution de la synthèse d'ATP mais engageant également la cellule dans un programme de mort cellulaire par apoptose avec l'induction de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP).

2.5.4. Activation du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP)

Bien que la nature moléculaire du mPTP reste encore à ce jour inconnue, il apparaît que le mPTP est un complexe multiprotéique avec de nombreuses protéines candidates dont le VDAC, l'ANT, la cyclophiline D (Figure 16) (127), et le complexe I (128). La cyclosporine A, inhibiteur de référence du mPTP, retarde le processus d'apoptose (128) confirmant le rôle clé du mPTP dans la mort cellulaire.

Succinctement, l'ouverture du mPTP provoque un gonflement mitochondrial résultant de l'entrée dans la matrice de composés osmotiquement actifs. Suite à ce gonflement, la membrane externe peut se rompre et entraîner la sortie de molécules pro-apoptotiques comme la cytochrome c, et l'AIF (Apoptose Inducing Factor).

L'ouverture du mPTP est très finement régulée. Le calcium matriciel apparaît comme étant son inducteur le plus puissant, nécessaire et suffisant (129).

Les ROS agissent directement sur l'ouverture du mPTP, pore qui intervient dans le processus d'apoptose (Figure 17). Selon l'équipe de Vercesi, l'ouverture du mPTP induit par les ROS serait consécutive à l'oxydation d'un groupement thiol constituant ce pore (130).

Il se peut également que ce pore s'ouvre de façon transitoire conduisant à la diffusion d'ions de petite taille, comme le Ca^{2+} , dépendant du pH et déclenchant la fermeture du pore. Cette situation protégerait les cellules d'une lésion irréversible en évitant le gonflement et la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c (131).

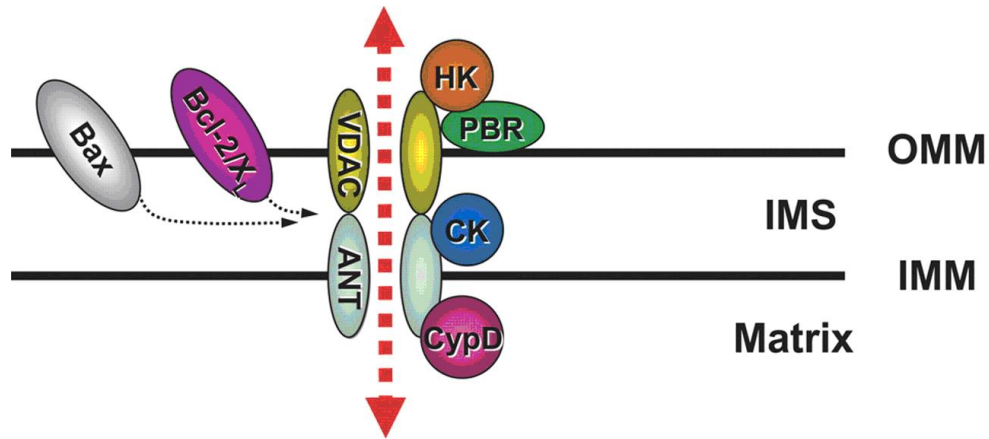


Figure 16 : Structure du mPTP. Il est formé par le complexe VDAC–ANT–Cyp-D. L’héxokinase II (HKII), la créatine kinase mitochondriale (m-CK), le récepteur au benzodiazépine (PBR), et la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, et Bax) sont considérés comme des éléments régulateurs de ce complexe.
<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/83/2/213/F1.expansion>

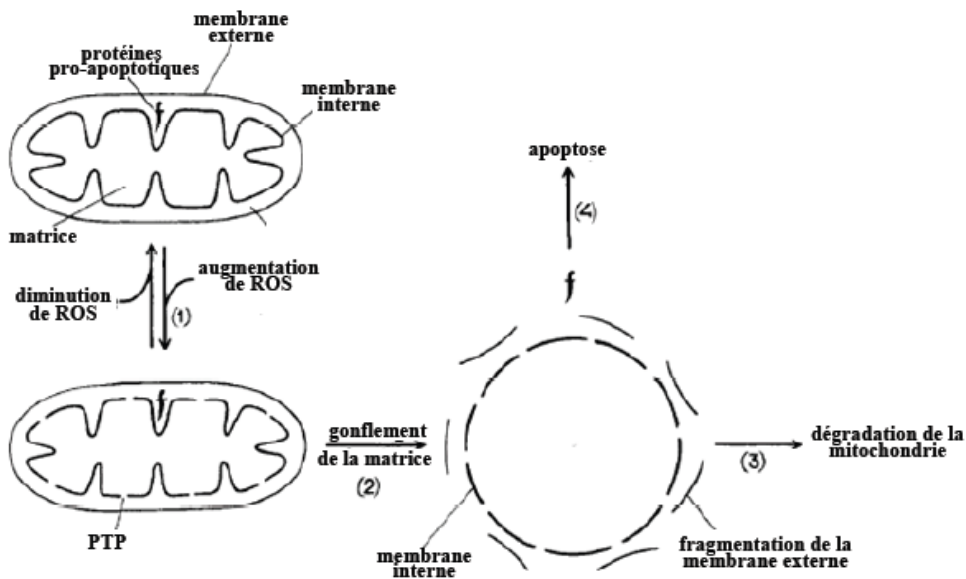


Figure 17 : Production de ROS, ouverture du mPTP et apoptose. (Skulachev *et al.*) (122).

- (1) L'augmentation de la production de ROS entraîne l'ouverture du pore de transition de perméabilité (mPTP).
- (2) Un déséquilibre osmotique entre la matrice et l'espace intermembranaire se crée, ayant pour conséquence le gonflement de la matrice et la fragmentation de la membrane externe
- (3) La mitochondrie est alors dégradée (sélection mitochondriale).
- (4) Les protéines pro-apoptotiques séquestrées dans l'espace intermembranaire sont libérées dans le cytosol initiant une cascade de réactions qui aboutit à l'apoptose (sélection cellulaire).

2.5.5. Mitohormesis

L'hormesis est défini comme l'activation des propriétés cellulaires protectrice et réparatrice induite par un stress physiologique modéré (132). Depuis quelques décennies, il était admis que l'augmentation des radicaux libres était le principal responsable du processus du vieillissement et de la diminution de la durée de vie des organismes (133). Durant ces années, un certain nombre d'études se sont efforcées de diminuer le stress oxydant à l'aide de molécules antioxydantes. Cependant, les résultats de ces études furent surprenants. En effet, elles ont démontré que les molécules antioxydantes avaient peu ou pas d'effets mais surtout que les ROS étaient essentiels à l'activation de voies de signalisation aboutissant à une augmentation de la durée de vie des organismes. Par ailleurs, il a été démontré qu'une supplémentation en molécules antioxydantes inhibe les effets bénéfiques de l'activité physique {GomezCabrera:2008tx}{Ristow:2009fs}. Par ailleurs, Piantadosi *et al.* ont démontré un lien entre la production de ROS mitochondriaux et la biogenèse mitochondriale (136). Ces différentes études ont permis de mettre à jour un nouveau concept nommé « mitohormesis ». En effet, la génération de ROS mitochondriaux peut activer la biogenèse mitochondriale et la défense contre ces radicaux libres. Ce concept nous permis d'avoir un autre regard sur les radicaux libres qui furent longtemps associés à des pathologies.

2.6. L'apoptose

On distingue 2 grandes voies de signalisation aboutissant à la mort cellulaire. La première, appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. La deuxième voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort.

Quel que soit le mode d'induction (intrinsèque ou extrinsèque), les caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont similaires, à savoir une réduction de la taille de la cellule, une condensation de la chromatine, un clivage des chromosomes, une rupture de la membrane plasmique et une transformation des organites cellulaires en vésicules appelées corps apoptotiques. Nous allons durant ce chapitre nous consacrer uniquement à la voie intrinsèque (mitochondriale) (Figure 18).

Depuis une dizaine d'années, il est clairement établi que la mitochondrie joue un rôle clé dans l'apoptose. Son intervention dans ce processus ne s'explique pas par une « simple perte de fonction » ayant pour conséquence un déficit énergétique, mais est reconnue plutôt comme un mécanisme actif s'accompagnant de profonds remaniements. On observe une modification de la perméabilité membranaire mitochondriale, liée à une dissipation du potentiel de membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), et la libération dans le cytoplasme de protéines apoptogènes comme le cytochrome c.

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment, lors d'un signal de mort, l'ouverture du pore de transition et la dissipation du $\Delta\Psi_m$ peuvent être impliquées dans l'induction du relargage de molécules apoptogènes (137).

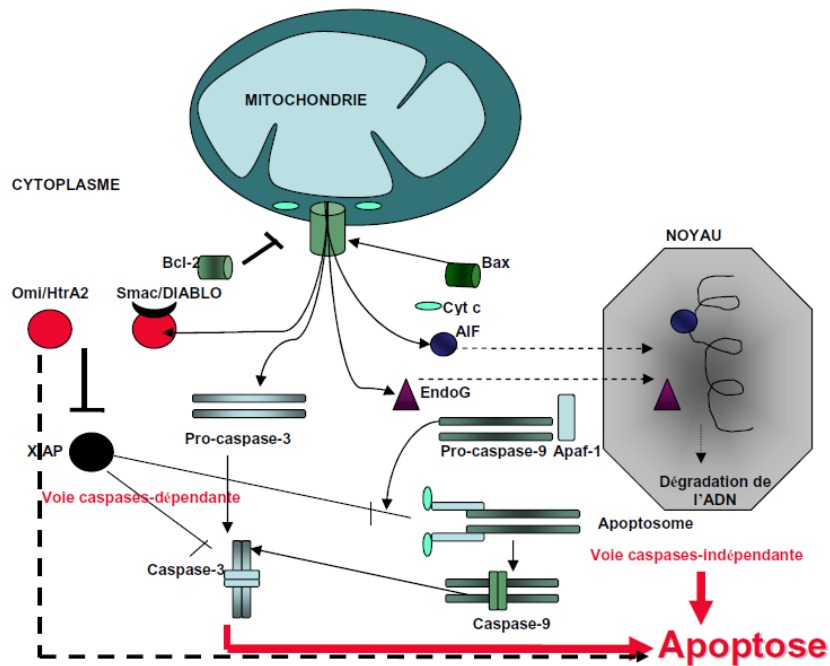


Figure 18 : Schéma représentant la voie intrinsèque (mitochondriale) de l'apoptose.

Adapté du site www.impactjournals.com

De nombreuses molécules participent à l'apoptose comme les caspases mais aussi le pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). Les caspases constituent deux groupes. D'un côté les caspases initiateuses (tels que les caspases 2, 8 et 9) qui clivent et activent plusieurs enzymes ou protéines impliquées dans l'apoptose. L'ouverture du mPTP semble être contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 (pour B cell leukemia/lymphoma-2). Cette famille regroupe des protéines pro-apoptotiques (comme Bax, Bad et Bid) et anti-apoptotiques (tels que Bcl-2 et Bcl-xL). L'activation intrinsèque de l'apoptose conduit à l'insertion de protéines pro-apoptotiques dans la membrane des mitochondries où elles s'oligomérisent. Ces complexes multimériques provoquent la rupture des membranes mitochondriales et l'ouverture du mPTP. La conséquence est d'une part la perte du gradient électrochimique entre la membrane interne et la matrice. D'autre part, des protéines pro-apoptotiques sont libérées dans le cytoplasme comme AIF (Apoptosis-Inducing Factor), Smac/DIABLO (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase, Direct Inhibitor of Apoptosis protein Binding protein with Low pI) et le cytochrome c.

Le cytochrome c libéré dans le cytoplasme s'associe à Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1). Le complexe ainsi formé ou apoptosome, clive et active la pro-caspase 9.

Il est important de noter que Bossy-Wetzel *et al.* ont décrit un système où la libération du cytochrome c et l'activation de caspases pouvaient avoir eu lieu sans aucune dissipation du $\Delta\Psi_m$ et dans lequel l'ouverture du mPTP est conséquente à la formation de l'apoptosome (127).

En conclusion,

L'émergence du rôle des ROS dans la modulation de la signalisation intracellulaire, et de ce fait dans celle de certaines fonctions cellulaires, est reconnue par de nombreux travaux réalisés ces quinze dernières années. Elle est étayée par des données bien établies : de nombreux ligands de récepteurs cellulaires génèrent la formation intracellulaire de ROS ; les molécules antioxydantes ou inhibant les systèmes enzymatiques pro-oxydants obèrent partiellement ou totalement ces effets ; l'addition par voie exogène de molécules pro-oxydantes reproduit partiellement ou totalement l'effet de la fixation des ligands à leur récepteur spécifique. Les études expérimentales poursuivent l'exploration des mécanismes impliquant les ROS dans la cellule, et font progresser les connaissances, malgré certains écueils liés à l'approche in vitro parmi lesquels : la difficulté de doser spécifiquement une espèce radicalaire donnée sans interférence d'une autre et d'apprécier les modifications de compartimentalisation cellulaire des ROS. Cependant, certaines questions restent sans réponse à l'heure actuelle et font l'objet d'études approfondies. Quelles sont, par exemple, les spécificités d'action des différents radicaux libres in vivo ? Le champ d'investigation est donc encore vaste, mais tout indique aujourd'hui que ces molécules simples mais très réactives que sont les ROS sont des modulateurs majeurs des fonctions cellulaires, de leur régulation en conditions physiologiques et des dysfonctionnements cellulaires à l'origine des pathologies.

3. ISCHÉMIE, REPERFUSION, EFFETS LOCAUX ET A DISTANCE

3.1. Ischémie

3.1.1. Circonstances de l'ischémie musculaire

L'ischémie musculaire squelettique est souvent la conséquence de l'interruption de la circulation sanguine au niveau du territoire musculaire concerné, ce qui prive les différents tissus de l'apport en oxygène et en éléments nutritifs. Ceci va entraîner la consommation des réserves d'oxygène se trouvant sur la myoglobine, et donc le passage à un métabolisme anaérobie ; par la suite, et à cause de l'interruption du débit sanguin et de l'absence de drainage veineux, une accumulation des produits du métabolisme se produit.

L'interruption du circuit de la circulation sanguine peut intervenir au niveau artériel, veineux, ou artério-veineux. Notre exposé s'intéresse à l'obstruction artérielle.

L'origine de l'ischémie peut être :

- un processus pathologique (embolie artérielle, thrombose artérielle aiguë par rupture de plaque athéroscléreuse),
- secondaire à un événement externe (compression artérielle extrinsèque suite à un processus tumoral ou bien suite à un accident traumatique),
- iatrogène (clampage artériel lors d'une intervention en chirurgie vasculaire ou cardiaque, application d'un garrot à la racine du membre en chirurgie orthopédique, transfert de lambeaux musculo-cutanés lors d'une intervention de chirurgie réparatrice, ou bien prélèvement pour une transplantation d'organe ou de membre). Les conséquences varient selon la durée de l'ischémie.

Les lésions ischémiques pures, non associées à des lésions de reperfusion, n'ont pas été étudiées au niveau du muscle squelettique. Par contre, Reimer *et al.* ont montré au niveau du myocarde de chien, l'existence du « Wavefront phenomenon » ou « phénomène d'onde de progression ischémique ». Il s'agit de l'apparition de dégâts nécrotiques musculaires proportionnels à la durée ischémique (138). Au niveau du muscle squelettique, la question a été étudiée en effectuant différents temps d'ischémie au niveau de plusieurs groupes musculaires avec un délai constant de reperfusion. Ainsi, Martou *et al.* (139) ont montré sur le muscle squelettique humain *in vitro*, dans un modèle de temps d'ischémie variable suivi de 2 heures de reperfusion, que la viabilité musculaire squelettique commence à être significativement altérée à partir de la troisième heure d'ischémie ($50,1 \pm 5,5\%$ de viabilité) et que l'altération s'aggrave avec la prolongation de la durée de l'ischémie ($18,8 \pm 3,6\%$ de viabilité après six heures d'ischémie).

3.1.2. Phénomènes moléculaires de l'ischémie

Au cours des phases précoces de l'ischémie, l'ATP est générée par la glycolyse (6). Il s'en suit une déplétion des réserves en glycogène, un métabolisme en anaérobie, et une acidose lactique locale (140). La déplétion en ATP qui en résulte réduit la fonction de la membrane cellulaire et provoque un œdème cellulaire. En effet, la cellule va essayer de corriger l'acidose à travers l'échangeur Na^+/H^+ , le cytoplasme va donc être saturé en ions Na^+ , provoquant un appel osmotique vers le cytoplasme. L'œdème cellulaire est aggravé par la dysfonction de l'échangeur Na^+/K^+ (ATP-dépendant) par manque d'ATP (Cour *et al.*) (141). Par la suite, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ s'active dans son mode inverse pour épurer les ions Na^+ du cytosol, provoquant *de facto* l'entrée d'ions Ca^{2+} . L'ischémie prolongée va aboutir à une accumulation accrue des ions Na^+ et Ca^{2+} au niveau du cytosol (141). L'acidose et l'accumulation de produits métaboliques toxiques vont activer des médiateurs chimiques et enzymatiques, incluant la phospholipase A2 et les lysozymes. La phospholipase A2 va métaboliser les phospholipides membranaires en acide arachidonique, un précurseur des médiateurs de l'inflammation, comme les leukotriènes et les prostaglandines, et donc entraîner un chimiotactisme leucocytaire (6). Les lysozymes, eux, vont digérer les cellules nécrotiques.

L'ischémie va également provoquer la production de cytokines, l'activation des kinines, du complément, et des voies de coagulation (140).

Grisotto *et al.* (142) ont étudié les effets de l'ischémie isolée (sans reperfusion) sur la membrane cellulaire des muscles squelettiques de rats. Après trois heures d'ischémie, l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire active la phospholipase C provoquant la libération de l'O-phosphoserine (OPS), un important constituant de la membrane cellulaire. Par contre, trois heures d'ischémie n'ont pas provoqué des changements des concentrations de glutathion (oxydé ou réduit) ou de malondialdéhyde.

La quantité de ROS produite dans le cytoplasme pendant l'ischémie reste habituellement dans les limites des défenses antioxydatives cellulaires. L'ischémie va initier la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase, et ainsi produire des réserves intracellulaires d'hypoxanthine.

Sur le plan histologique, Formigli *et al.* (143) ont étudié les lésions ischémiques *in vivo* au niveau du muscle squelettique humain (quadriceps) dans le cadre de cures chirurgicales d'anévrismes de l'aorte abdominale sous-rénale, nécessitant un clampage aortique responsable d'une ischémie des membres inférieurs. A la fin de l'ischémie, les auteurs ont montré une accumulation de granulocytes dans les capillaires sanguins provoquant leur occlusion, une marginalisation intra et extravasculaire des granulocytes, ainsi qu'une infiltration granulocytaire au niveau des fibres musculaires associée à un œdème du tissu conjonctif (Figure 19). Par contre, il n'y avait aucun changement de la structure de la fibre musculaire.

La microscopie électronique a détecté de petits corpuscules amorphes et denses (dépôts calciques) au niveau de la matrice mitochondriale.

L'ischémie pure a provoqué une altération importante de la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale des muscles squelettique chez le rat comme il a été démontré dans les travaux de Brandão *et al.* (144) et de Thaveau *et al.* (11).

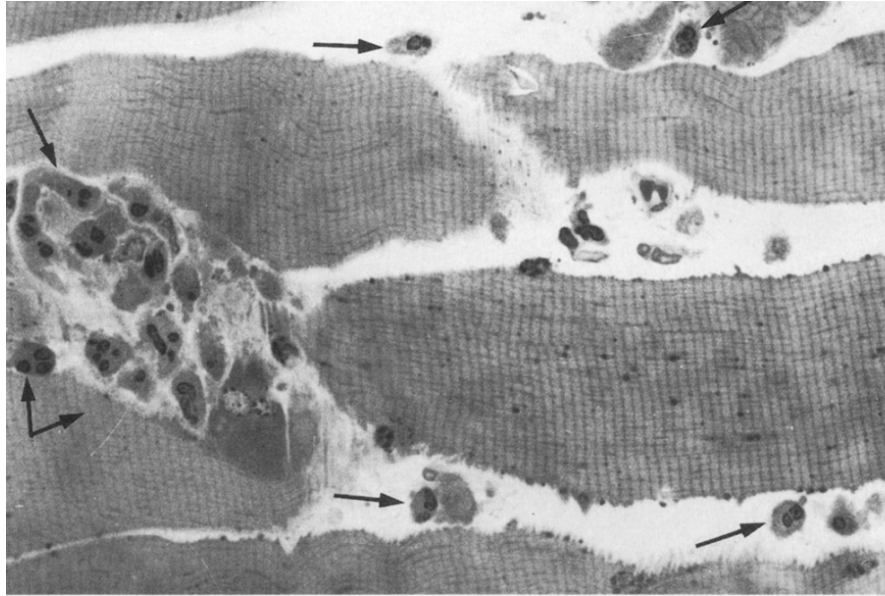


Figure 19. Coupe histologique d'un muscle squelettique humain en ischémie. Nombreux granulocytes (flèches) infiltrant l'interstitium. (Grossissement x 720). (Formigli *et al.*) (143).

3.2. Reperfusion

Comme les lésions provoquées par l'ischémie sont proportionnelles à sa durée, il a été proposé de limiter les effets délétères de l'ischémie de la façon la plus précoce possible. La diminution du temps de clampage artériel dans un contexte chirurgical est donc devenue primordiale, et la reperfusion lors d'un événement ischémique aigu s'est rapidement imposée comme une urgence thérapeutique.

En termes de limitation lésionnelle myocardique, Jennings et Reimer (145) ont montré dès 1983 l'intérêt de la reperfusion la plus précoce possible. Depuis, les méthodes de reperfusion se sont multipliées (revascularisation médicale, chirurgicale, percutanée, déclampage précoce, ré-implantations précoces, etc.) afin de renforcer l'arsenal thérapeutique et de pouvoir proposer la reperfusion dans les meilleurs délais.

Cependant et de façon contre-intuitive, la reperfusion elle-même s'accompagne d'une majoration de la nécrose cellulaire (146).

Les lésions de reperfusion ont été étudiées pour la première fois au niveau du myocarde de chien par Cerra *et al.* en 1975 (147). Les auteurs ont découvert que la restitution du flux sanguin dans le myocarde était accompagnée d'une nécrose hémorragique sous-endothéliale.

Au niveau cellulaire, la réoxygénation va certes interrompre les lésions induites par l'ischémie, mais elle va provoquer une série de lésions propres, dites « de reperfusion ». Au cours des premières minutes de reperfusion, la correction rapide de l'acidose par l'échangeur Na^+/H^+ et le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, ainsi que l'épuration de l'acide lactique, vont provoquer une activation inverse de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et donc augmenter le Ca^{2+} cytosolique (Cour *et al.*) (141). Piper *et al.* (148) proposent qu'ensuite le Na^+ va être épuré par des canaux Na^+ (consommant l'ATP de nouveau disponible). A ce moment-là, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ va refonctionner selon son mode normal pour épurer le Ca^{2+} cytosolique vers le milieu extracellulaire (Figure 20).

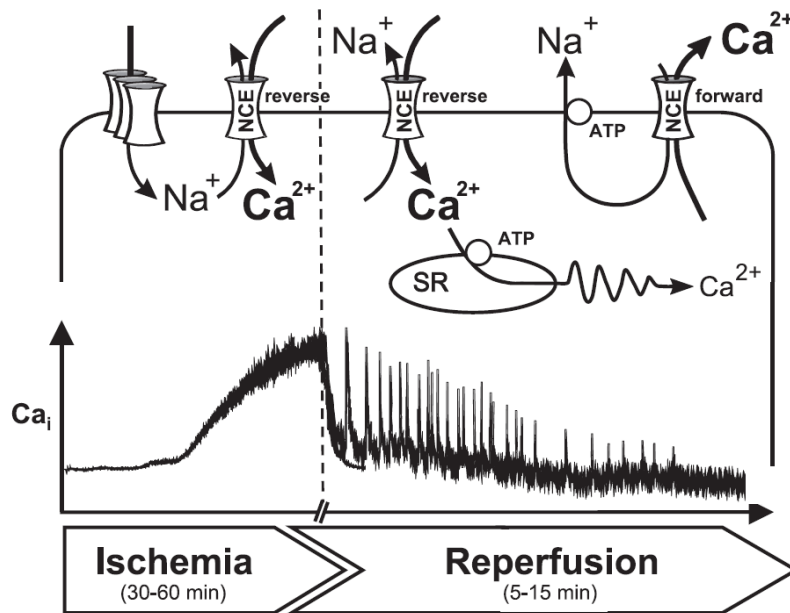


Figure 20 : Modifications de taux de Ca^{2+} intracellulaire au cours de l'ischémie et de la reperfusion. L'ischémie ainsi que les premières minutes de la reperfusion vont provoquer une accumulation du Ca^{2+} cytosolique. Au cas où la reperfusion a lieu à un stade où les lésions restent réversibles, la sortie du Na^+ (par disponibilité de l'ATP) va entraîner la sortie du Ca^{2+} jusqu'à normalisation du taux cytosolique. (Piper *et al.*)

Au niveau mitochondrial, Charles *et al.* (13) ont démontré que la chaîne respiratoire de muscle squelettique de rat a été atteinte par la reperfusion. La réoxygénation va tout de même générer un potentiel membranaire mitochondrial impliquant la synthèse de l'ATP, provoquant une surcharge cytosolique du Ca^{2+} , et par conséquent une accumulation du Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale (141), responsable des dépôts calciques (143).

La ré-oxygénation va provoquer également la production massive de ROS (140). Lors de la reperfusion, la xanthine oxydase produite pendant l'ischémie va catalyser la formation d'acide urique à partir de l'hypoxanthine, accompagnée de la formation de grandes quantités de ROS. Les ROS ainsi produits vont dépasser les défenses anti-oxidatives cellulaires, entraînant la peroxydation des acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire et des lésions tissulaires locales. La peroxydation des lipides est accompagnée de l'activation du complément, la libération d'acide arachidonique et la synthèse accrue des molécules d'adhésion endothéliale. Grisotto *et al.* (142) ont montré au niveau des cellules musculaires squelettiques de rat, que trois heures d'ischémie suivies de 45 minutes de reperfusion augmentaient les concentrations de glutathion oxydé et de malondialdéhyde, témoignant de la présence accrue de ROS et de la présence de lésions au niveau de la membrane cellulaire. L'activation leucocytaire et la dysfonction microvasculaire surviennent alors. La figure 21 résume les événements qui se succèdent lors de l'ischémie/reperfusion (6).

Tous ces facteurs vont provoquer un changement brusque de la perméabilité membranaire mitochondriale, dû à l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP), entraînant le découplage de la respiration cellulaire. Il est suivi par un collapsus énergétique incompatible avec la vie cellulaire, entraînant la libération des facteurs pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire mitochondrial vers le cytosol par rupture de la membrane mitochondriale externe. Il s'ensuit donc l'apoptose et la mort

cellulaire (141). Marin-Garcia *et al.* (149) ont proposé un schéma résumant la relation entre la mitochondrie, la chaîne respiratoire mitochondriale, le mPTP et l'apoptose (Figure 22).

La reperfusion peut également s'accompagner du « No-reflow phenomenon » ou « phénomène de l'absence de retour de flux ». Il a été décrit par May *et al.* en 1978 au niveau d'un lambeau libre musculo-cutané (150). Dans ce modèle de lambeau, le muscle squelettique, sa couverture cutané-graisseuse et son artère nourricière sont complètement détachés du pédicule vasculaire pour être implantés à distance, souvent pour combler une perte de substance. Les auteurs ont mis en évidence un œdème cellulaire, une agrégation intra-vasculaire et une fuite de liquide intravasculaire vers l'interstitium. Par conséquent, des lésions vasculaires progressives s'installent avec élargissement de la zone concernée par la baisse du débit sanguin local.

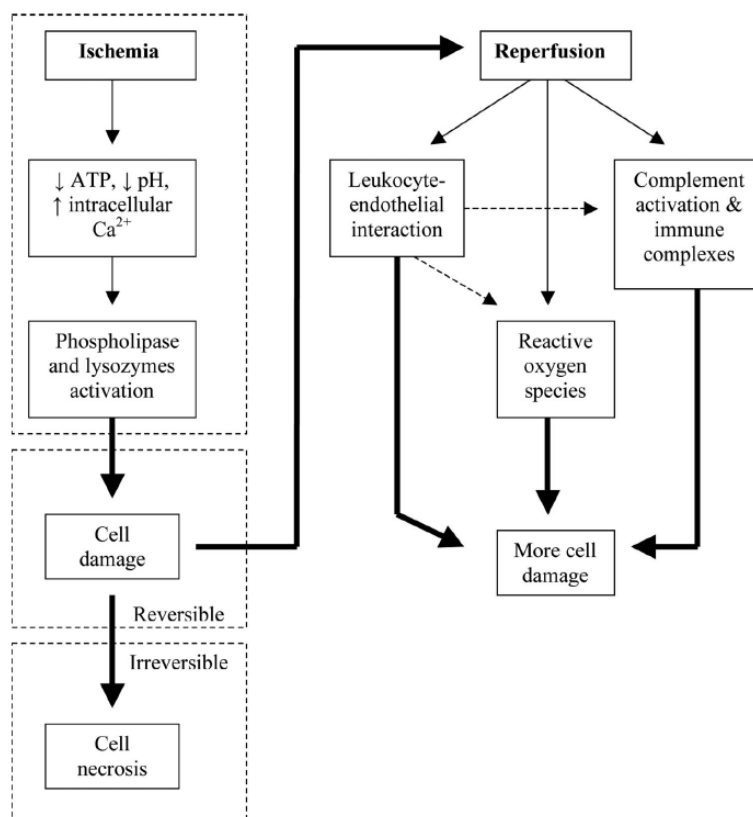


Figure 21. Série d'évènements survenant lors de l'ischémie, et lors de la reperfusion, si cette dernière est effectuée avant la nécrose cellulaire. (Khalil *et al.*) (6).

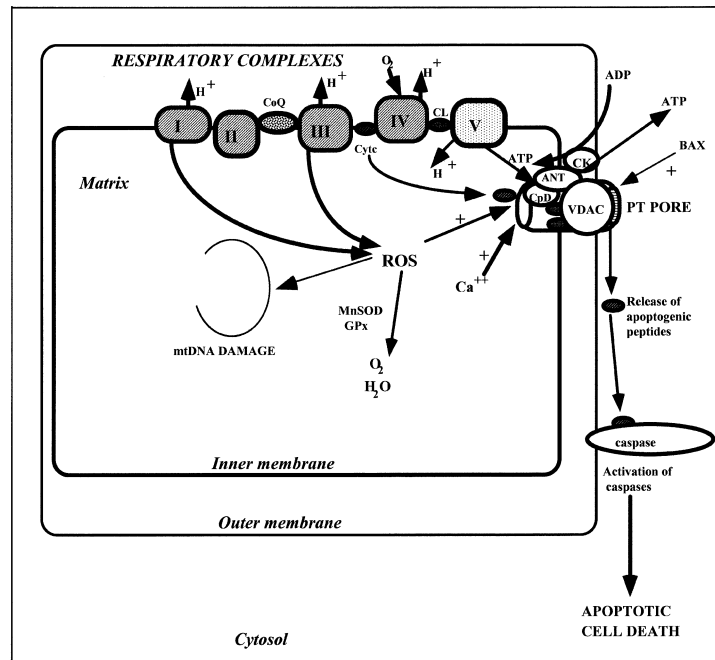


Figure 22 : Relation entre la mitochondrie, la chaîne respiratoire mitochondriale, le mPTP et l'apoptose. Les ROS, l'ATP, le Ca^{2+} lors de la reperfusion vont ouvrir le mPTP. Le largage de la caspase dans le cytosol s'en suit, résultant en l'apoptose cellulaire. (Marin-Garcia *et al.*) (149).

Sur le plan histologique, Formigli *et al.* (143) ont décrit au niveau du muscle squelettique humain, de nombreux granulocytes se situant aux mêmes endroits que lors de l'ischémie. Ils ont remarqué des altérations au niveau des fibres musculaires, marquées essentiellement par un élargissement des espaces intermyofibrillaires. La microscopie électronique a montré des granulocytes occluant les plus fins capillaires, contribuant au « No-reflow phenomenon ». Des altérations focales sévères au niveau des fibres et des tissus conjonctifs avoisinant ont été décrites avec un œdème diffus et une disparition des particules de glycogène. Une altération occasionnelle sévère a été remarquée dans 10% des cas étudiés, avec une désorganisation architecturale importante des myofibrilles et la présence de bâtonnets de disques Z (Figure 23) (143).

Concernant les mitochondries, les corpuscules amorphes et denses (dépôts calciques) au niveau de la matrice mitochondriale augmentent en taille et en nombre. Il existe également de l'œdème matriciel, ainsi que des ruptures au niveau de la membrane externe (Figure 24).

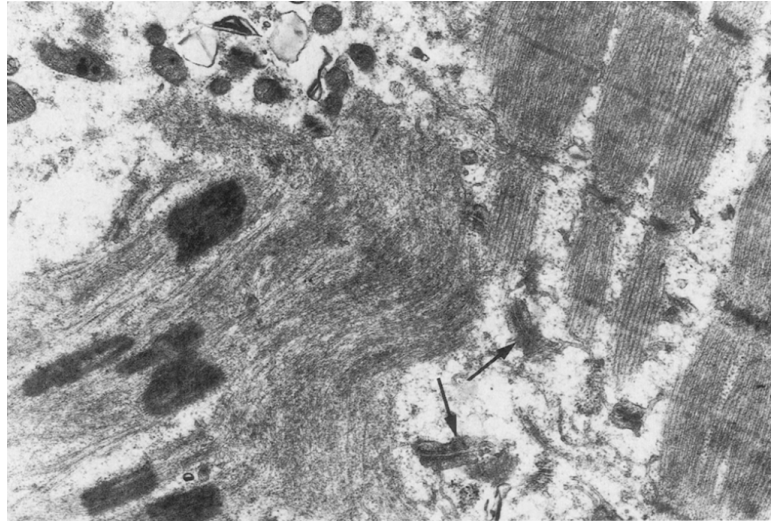


Figure 23. Microscopie électronique de muscle squelettique humain après ischémie-reperfusion.
 Désorganisation architecturale des myofibrilles, présence de bâtonnets des disques Z (flèches)
 (Magnification x 20.000). (Formigli *et al.*) (143).

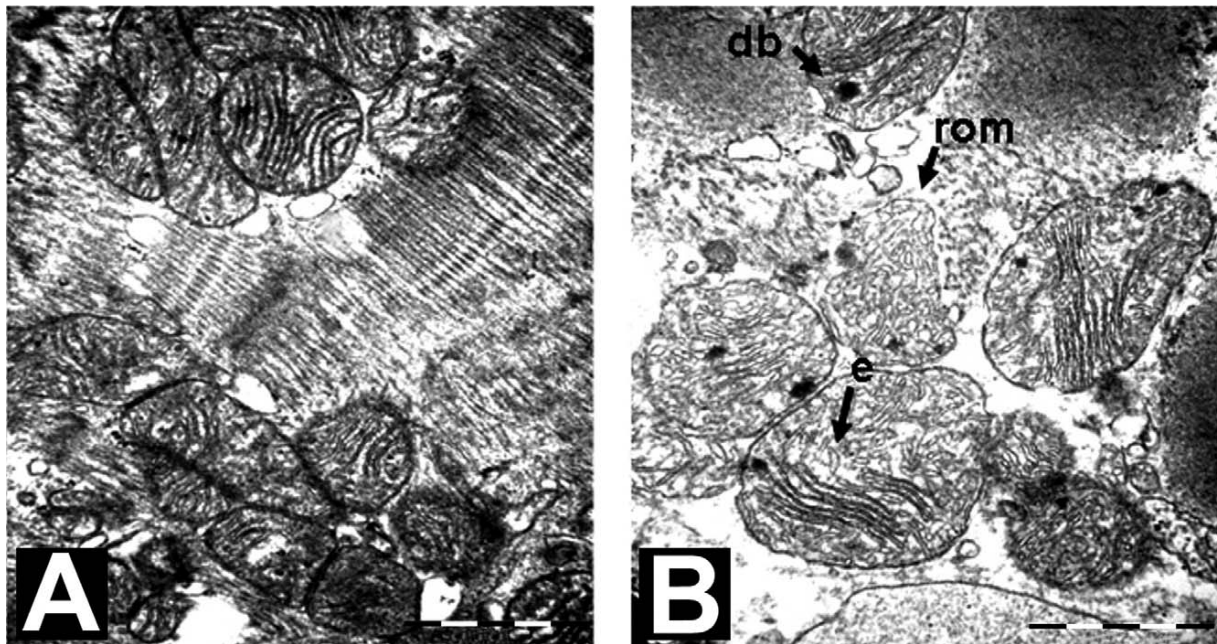


Figure 24. Microscopie électronique de mitochondries myocardiques de lapins.

A : Mitochondries de myocytes normales. B : Mitochondries myocardiques ayant subi les effets de l'ischémie et la reperfusion ; Dépôts calciques (dense bodies : db) au niveau de la matrice mitochondriale, œdème matriciel (edema : e), et rupture de la membrane externe (rupture of outer membrane : rom). (Cour *et al.*) (141).

3.3. Effets à distance de l'ischémie et de la reperfusion

3.3.1. Réponse inflammatoire systémique

Formigli *et al.* (143), dans le contexte d'une ischémie-reperfusion sur un muscle squelettique humain lors de chirurgie de l'aorte abdominale sous-rénale, ont montré l'implication locale des neutrophiles, mais également une participation immunitaire systémique par augmentation de l'activation du complément. Ils ont initié le concept de la réaction systémique après ischémie et reperfusion du muscle squelettique. Yassin *et al.* (151) ont démontré la génération d'une réaction systémique inflammatoire après ischémie et reperfusion des membres inférieurs chez l'homme, impliquant l'Interleukine-1 β (IL-1 β), le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), et l'Interleukine-6 (IL-6) (151), provoquant des réactions inflammatoires dans des organes à distance du territoire ischémié. Norwood *et al.* (140) ont étudié le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) dans le cadre de la chirurgie de l'aorte abdominale sous-rénale, pouvant progresser vers la défaillance multiviscérale (Multi Organ Failure : MOF). Le SIRS résulte de l'activation des médiateurs inflammatoires, largement représentés par les cytokines comme les IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, et le TNF- α . La réponse inflammatoire est aussi propagée par des médiateurs dérivés des lipides comme les prostaglandines, les leucotriènes, le thromboxane et le Platelet Activating Factor (PAF). Il semble donc qu'il y ait une activation du système immunitaire cellulaire (essentiellement les leucocytes) et humorale (le complément), l'endothélium vasculaire, les cascades de coagulation, les kinines, et l'histamine. Le temps de clampage aortique est corrélé avec les taux plasmatiques de complément activé (C3a, C5a). Les leucocytes activés au niveau du site de l'ischémie/reperfusion, vont provoquer une réaction inflammatoire locale, puis être transportés par le flux sanguin de la reperfusion vers la circulation systémique. Ces leucocytes vont être séquestrés préférentiellement au niveau des poumons (ce dernier jouant vraisemblablement le rôle de filtre), développant ainsi une réaction inflammatoire et des lésions pulmonaires. Les ROS produits localement au début de la reperfusion atteignent leur pic à la cinquième minute de la reperfusion et puis diminuent à la trentième minute de reperfusion ; ils provoquent la peroxydation des lipides membranaires qui vont être libérés dans la circulation. La figure 25 démontre la complexité des interactions des différents composants générant la réaction inflammatoire systémique.

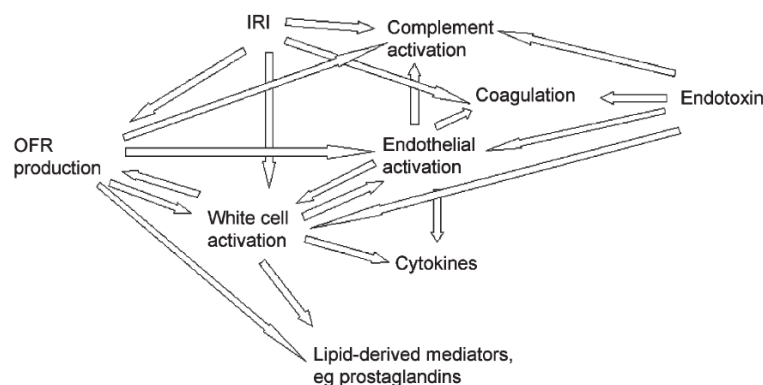


Figure 25 : Schéma des interactions des différents acteurs de l'inflammation locale et systémique. IRI : Ischemia-reperfusion injury. OFR : Oxygen Free Radicals (ROS). (Norwood *et al.*) (140).

3.3.2. Lésions pulmonaires

La réaction inflammatoire systémique après clampage aortique a été incriminée avec des preuves histologiques de séquestration leucocytaire au niveau du parenchyme pulmonaire (figure 26) (152) ; des lésions pulmonaires incluant des signes d'atélectasie alvéolaire, et d'épaississement des parois alvéolaires ont été décrites (figure 26) (153).

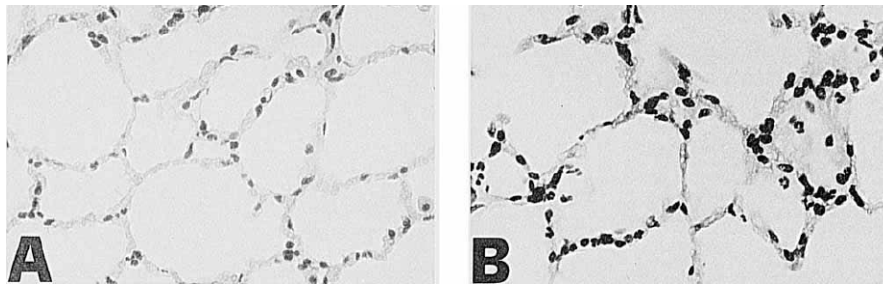


Figure 26 : Coupes histologiques au niveau du parenchyme pulmonaire de mouton. Les taches noires témoignent de la présence de leucocytes dans le parenchyme. A : Moutons contrôles ; B : Moutons ayant subi l'ischémie/reperfusion au niveau des pattes postérieures. (Klausner *et al.*).

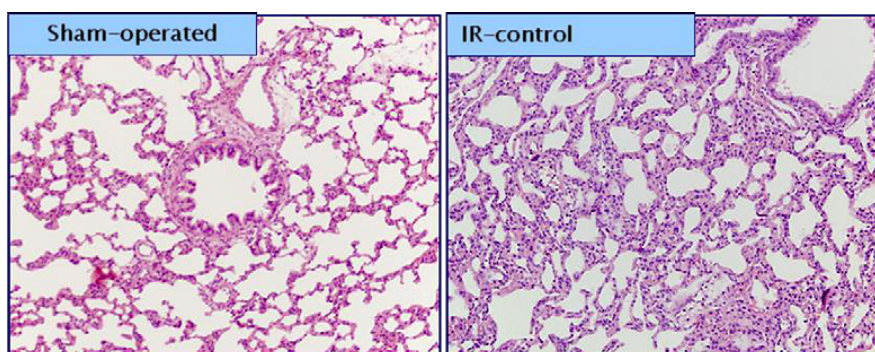


Figure 27 : Coupes histologiques au niveau du parenchyme pulmonaire de rats Wistar. Le parenchyme pulmonaire normal (Sham-operated) comparé au parenchyme pulmonaire après 3 heures d'ischémie des 2 pattes postérieures suivies de 4 heures de reperfusion (IR-control) ; ce dernier présente des signes d'atélectasie et d'épaississement alvéolaire. (Grossissement x 60).

(Gyurkovics *et al.*) (153).

Klausner *et al.* (152) ont expliqué les lésions pulmonaires à distance du site de l'ischémie/reperfusion par une augmentation de la perméabilité microvasculaire pulmonaire, une séquestration leucocytaire (preuves histologiques, et baisse du taux de leucocytes circulants) provoquant la production de Thromboxane A2 au niveau du parenchyme pulmonaire (mécanisme direct ou indirect), ainsi qu'une production de Leukotriène B4 et de ROS.

Adembri *et al.* (154) ont incriminé principalement l'élévation de l'IL-6 dans les lésions pulmonaires, constamment présente lors des chirurgies de l'aorte abdominale sous rénale chez l'homme. Ils démontrent que l'IL-6 est produite dans ce contexte par le muscle squelettique ayant subi l'ischémie et la reperfusion. Elle est responsable de la production de NO, provoquant une vasodilatation du lit vasculaire pulmonaire. Des perturbations dans les échanges gazeux pulmonaires ont été également notées, sans pouvoir les lier à l'IL-6.

3.3.3. Lésions rénales

Les reins présentent des lésions secondaires à distance du site de l'ischémie-reperfusion du muscle squelettique. Le syndrome inflammatoire est responsable en partie de ces lésions (155), et la rhabdomyolyse s'est avérée être un facteur indépendant des lésions rénales dans le même contexte (156). Yassin *et al.* (151) ont montré que l'ischémie des deux pattes postérieures pendant trois heures chez le rat, a provoqué des dysfonctions rénales à partir de la première heure de reperfusion. Des lésions histologiques ont été démontrées, comprenant des signes de lésions tubulaires aiguës, avec des cellules tubulaires œdématisées et vacuolées, et des précipitations de cylindres hyalins dans la lumière tubulaire (Figure 28) (153).

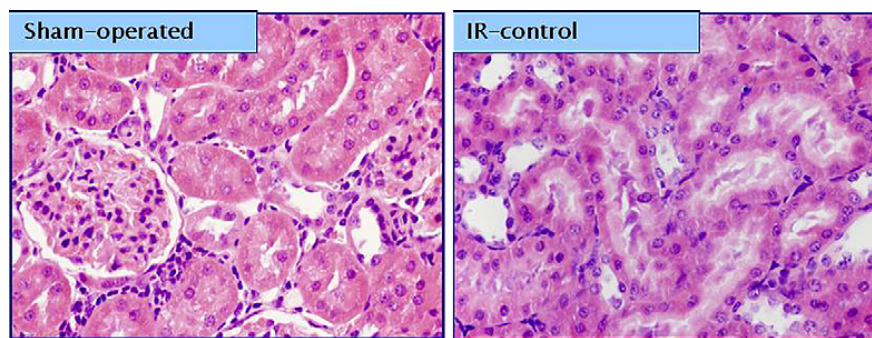


Figure 28 : Coupes histologiques au niveau du parenchyme rénal de rats Wistar. Le parenchyme rénal normal (Sham-operated) comparé au parenchyme rénal après 3 heures d'ischémie des 2 pattes postérieures suivies de 4 heures de reperfusion (IR-control) ; ce dernier présente des signes de lésions tubulaires aiguës, avec des cellules tubulaires œdématisées et vacuolées. (Grossissement x 60). (Gyurkovics *et al.*) (153).

Les lésions rénales ont été démontrées chez l'homme (155) ; elles peuvent s'expliquer par des changements de perfusion rénale (hypotension, baisse du débit cardiaque lors du clampage aortique), les effets d'agents néphrotoxiques, l'inflammation et les réactions neuroendocrines secondaires à la chirurgie, et la rhabdomyolyse.

Holt et Moore ont expliqué les mécanismes de l'insuffisance rénale aiguë dans le contexte de la rhabdomyolyse. Ils ont décrit l'obstruction tubulaire, les lésions tubulaires secondaires aux lésions oxydatives, et la vasoconstriction.

- L'obstruction tubulaire est due à la précipitation de la myoglobine (libérée suite aux lésions cellulaires musculaires squelettiques et relarguée lors de la reperfusion dans la circulation systémique) au niveau des tubes rénaux. La microscopie électronique montre la précipitation d'agrégats protéiques Myoglobine-Tamm-Horsfall dans les tubules (Figure 29).

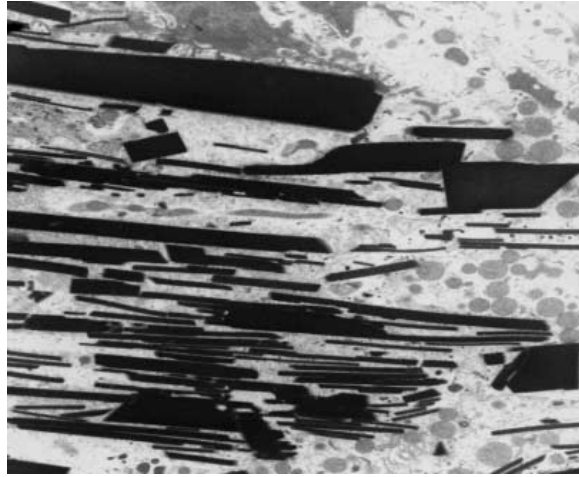
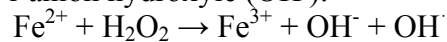


Figure 29 : Microscopie électronique rénale après rhabdomyolyse chez le rat. Présence de précipitations d'agrégats protéiques Myoglobine-Tamm-Horsfall dans les tubules rénaux.

(Holt et Moore) (157).

- La nécrose tubulaire (plus spécifiquement les cellules des tubes contournés proximaux) est vraisemblablement due au recyclage du fer de l'hème contenue dans la myoglobine. Selon la réaction de Fenton, la transformation de l'ion ferreux (Fe^{2+}) en ion ferrique (Fe^{3+}) génère l'anion hydroxyle (OH^-):



L'anion hydroxyle va peroxyder les lipides de la membrane cellulaire rénale et alors générer des lésions oxydatives.

L'œdème musculaire lors de la reperfusion va provoquer une hypovolémie du compartiment intravasculaire et diminuer alors le débit sanguin rénal. Il résulte une vasoconstriction rénale (secondaire à l'activation du système nerveux autonome et du système rénine-angiotensine-aldostérone) pour maintenir la volémie ; ceci participe aux lésions rénales.

4. CONDITIONNEMENTS

La reperfusion après un évènement ischémique s'avère être le seul moyen efficace pour lutter contre les lésions secondaires à l'ischémie. La reperfusion elle-même génère des lésions supplémentaires. Si la reperfusion est effectuée avant que les lésions ischémiques n'aient atteint un stade irréversible, l'étendue de la nécrose reste moins importante qu'en l'absence de reperfusion (146).

Depuis que ce concept a été accepté, il est devenu important de chercher des moyens de prévention à la fois des lésions ischémiques et des lésions de reperfusion.

Le conditionnement ischémique lutte contre ces deux types de lésions, il consiste à effectuer plusieurs cycles de brèves périodes d'ischémie suivies de brèves périodes de reperfusion, au

niveau du territoire ischémique concerné (conditionnement local) ou bien à distance de celui-ci (conditionnement à distance). Différents types de conditionnements ischémiques ont été décrits, selon le moment où le conditionnement ischémique est pratiqué par rapport à l'évènement ischémique (pré, per, ou postconditionnement). Chaque type de conditionnement ischémique possède un mode d'action sensiblement différent de l'autre, avec plusieurs voies de signalisation communes.

4.1. Conditionnements ischémiques

4.1.1. Préconditionnement ischémique

Le preconditionnement ischémique consiste à effectuer une série de brèves périodes d'ischémie et de brèves périodes de reperfusion avant un long évènement ischémique. Le concept a été décrit pour la première fois par Murry *et al.* (158) en 1986. Il s'agissait d'une étude sur le myocarde de chien, qui avait pour but de preconditionner le territoire myocardique irrigué par l'artère inter-ventriculaire antérieure subissant une ischémie prolongée et une reperfusion. Les auteurs ont découvert que le preconditionnement ischémique local protégeait le myocarde des lésions de l'ischémie et de reperfusion. Przyklenk *et al.* en 1993 (159) ont découvert que le preconditionnement ischémique à distance, en preconditionnant le territoire myocardique de l'artère circonflexe, protégeait le territoire ischémique de l'artère inter-ventriculaire antérieure.

Au niveau musculaire squelettique, Pang *et al.* (160) ont démontré en 1995 que le preconditionnement ischémique local protégeait le muscle squelettique du porc, et Addison *et al.* (17) ont démontré que le preconditionnement ischémique à distance était également efficace au niveau du muscle squelettique de porc.

Ces travaux pionniers ont entraîné une multitude d'études pré-cliniques menées sur différentes espèces animales pour le preconditionnement local musculaire cardiaque et squelettique. Le tableau 3 contient une liste non exhaustive des résultats de ces expériences. Le tableau 4 contient une liste non exhaustive des expériences menées sur différentes espèces pour tester le preconditionnement à distance.

Auteur	Espèce	Organe préconditionné	Effet
Martou <i>et al.</i> (139)	Homme	Muscle squelettique	Protection
Murry <i>et al.</i> (158)	Chien	Coeur	Protection
Pang <i>et al.</i> (160)	Porc	Latissimus dorsi, Gracilis	Protection
Eastlack <i>et al.</i> (161)	Lapin	Tibialis anterior	Protection
Carroll <i>et al.</i> (162)	Rats SD	Latissimus dorsi	Protection
Zahir <i>et al.</i>	Rats SD	Rectus abdominis	Protection
Saito <i>et al.</i> (163)	Rats SD	Gastrocnemius	Protection
Harralson <i>et al.</i> (164)	Rats SD	Latissimus dorsi	Protection
Schoen <i>et al.</i> (165)	Rats SD	Extensor digitorum longus	Protection
Schroeder <i>et al.</i> (166)	Rats Wistar	Extensor digitorum longus	Protection
Gurke <i>et al.</i> (167)	Rats Wistar	Extensor digitorum longus	Protection
Thaveau <i>et al.</i> (11)	Rats Wistar	Gastrocnemius	Protection

Tableau 3 : Tableau non exhaustif des espèces sur lesquels le préconditionnement musculaire local a été expérimenté. SD : Sprague-Dawley.

Auteur	Espèce	Organe préconditionné	Organe cible	Effet
Kharbanda <i>et al.</i> (168)	Homme	Avant-bras	Avant-bras controlatéral	Protection
Cheung <i>et al.</i> (169)	Homme	Cuisse	Cœur	Protection
Ali <i>et al.</i> (170)	Homme	Cuisse	Cœur, rein	Protection
Rahman <i>et al.</i> (171)	Homme	Bras	Cœur	Aucun effet
Przyklenk <i>et al.</i> (159)	Chien	Coeur, circonflexe	Coeur, IVA	Protection
Kharbanda <i>et al.</i> (168)	Porc	Patte postérieure	Coeur	Protection
Moses <i>et al.</i> (172)	Porc	Latissimus dorsi	Lambeau de Latissimus dorsi	Selon produit
Moses <i>et al.</i> (173)	Porc	Latissimus dorsi	Lambeau de Latissimus dorsi	Selon produit
Addison <i>et al.</i> (17)	Porc	Patte postérieure	Latissimus dorsi, gracilis, rectus abdominis	Protection
Harkin <i>et al.</i> (174)	Porc	Artères iliaques	Poumon	Protection
Birnbaum <i>et al.</i> (175)	Lapin	Gastrocnemien	Coeur	Protection
Kuntscher <i>et al.</i> (176)	Rats Wistar	Patte postérieure	Lambeau cutanéoadipeux	Protection
Lazaris <i>et al.</i> (177)	Rats Wistar	Patte postérieure	Rein	Protection

Tableau 4 : Tableau non exhaustif des espèces sur lesquels le préconditionnement musculaire à distance a été expérimenté.

Yellon et Downey (178) ont résumé les connaissances en préconditionnement ischémique, plus précisément au niveau musculaire cardiaque.

4.1.1.1. Durée de protection :

Il existe deux phases de protection (Figure 30). Une première phase de 4 heures, dite « classique » qui débute à la fin du préconditionnement, et au cours de laquelle la protection est maximale. Une deuxième phase ou SWOP (Second Window Of Protection) qui débute à la 24^{ème} heure après le préconditionnement et qui persiste jusqu'à la 72^{ème} heure, au cours de laquelle la protection est de moindre importance par rapport à la phase primaire (178).

4.1.1.2. Protocole du préconditionnement :

Le stimulus est un phénomène de « Tout ou Rien » (all or none phenomenon). Pang *et al.* (160) ont montré au niveau du muscle squelettique que le préconditionnement local n'est pas efficace s'il n'existe pas un minimum de trois cycles de préconditionnement. Li *et al.* (179) ont montré au niveau du myocarde que lorsque la protection est atteinte, elle reste identique quel que soit le nombre de cycles de préconditionnement.

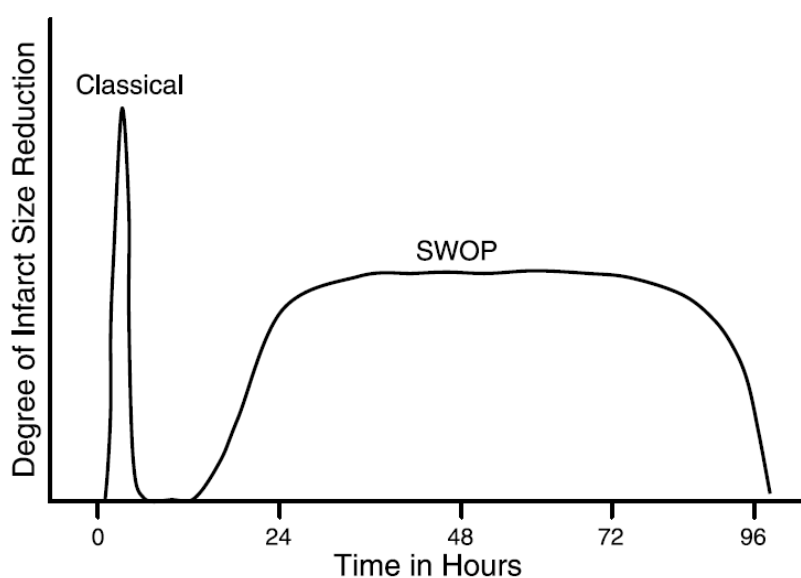


Figure 30. Les deux phases de protection du préconditionnement ischémique.

SWOP : Second Window Of Protection. (Yellon et Downey) (178).

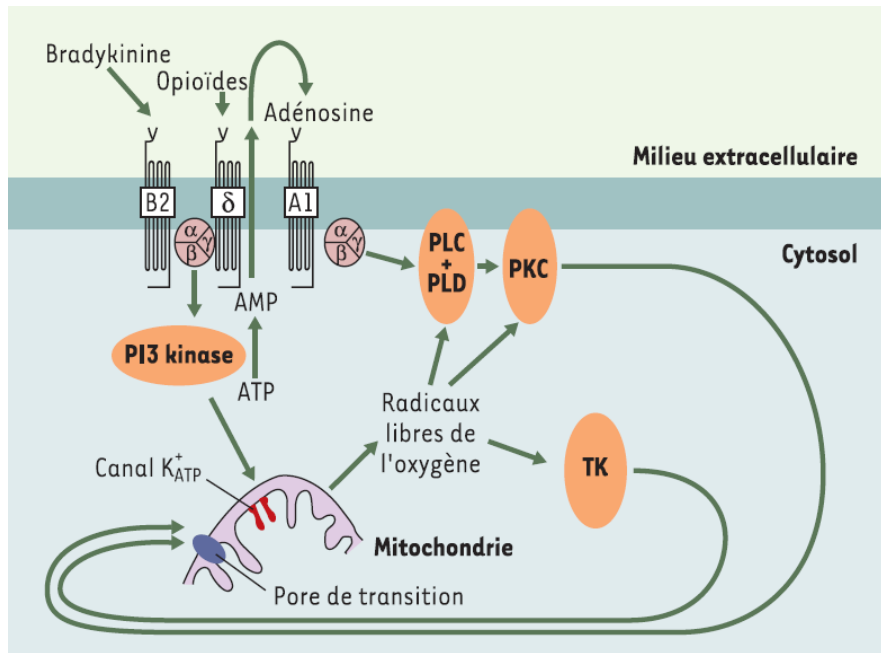


Figure 31 : Schéma simplifié proposé pour le mécanisme du préconditionnement ischémique.
 Les récepteurs δ -opioïdes, les récepteurs B2 de la bradykinine et les récepteurs A1 de l'adénosine, transmettent un message vers le cytosol, médié par la protéine kinase C (PKC), la Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) et la Tyrosine Kinase (TK), pour atteindre les mitochondries, induisant l'ouverture des canaux mitochondriaux K^+ -ATP dépendants (mK-ATP) et la fermeture des pores de transition de perméabilité mitochondriaux (mPTP). (Argaud et Ovize) (180).

4.1.1.3 Mécanismes du préconditionnement :

Plusieurs acteurs ont été proposés au niveau du myocarde (178). La figure 31 propose un schéma simplifié du mécanisme du préconditionnement. Des **inducteurs** récepteurs-dépendants ont été proposés comme l'adénosine, la bradykinine, les opioïdes, l'endothéline et l'angiotensine. D'autres inducteurs récepteurs-indépendants ont été également proposés comme les ROS, le monoxyde d'azote (NO) et le calcium. Des **médiateurs** intracellulaires pour la traduction des signaux ont été incriminés comme la Protéine Kinase C (PKC) recevant les signaux des récepteurs couplés avec les protéines G_i , la Tyrosine Kinase (TK) et les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK), ainsi que la Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase). Des **effecteurs** sont à la fin de la chaîne du préconditionnement, nous citons les plus importants, les canaux mitochondriaux K^+ -ATP dépendants (mK-ATP) et les pores de transition de perméabilité mitochondriaux (mPTP).

Nous nous attardons sur les deux principaux effecteurs :

- o *Les canaux mitochondriaux K^+ -ATP dépendants (mK-ATP) :*

Ces canaux potassiques se trouvent sur la membrane du réticulum sarcoplasmique et sur la membrane mitochondriale ; ils sont inhibés par des taux physiologiques d'ATP, d'où le terme ATP-dépendants (178). Ils sont également réactifs à plusieurs facteurs comme le pH, les acides gras, le NO, etc.

La mitochondrie produit de l'ATP en permettant aux ions H^+ de traverser de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale à travers l'ATP synthase, ainsi

phosphorylant l'ADP en ATP. L'entrée de l'ion H^+ par les canaux mK-ATP va court-circuiter l'ATP synthase et diminuer la production d'ATP. La protection par le biais des canaux mK-ATP est probablement due à l'entrée des ions H^+ . Donc, les mitochondries deviennent plus résistantes à l'entrée des ions Ca^{2+} (181), ce qui prévient les effets néfastes de ce dernier (voir section « reperfusion »).

Plusieurs moyens pharmacologiques pouvant ouvrir ou fermer les canaux mK-ATP ont été incriminés dans la protection contre l'ischémie-reperfusion, et par conséquent promouvoir ou éliminer l'effet protecteur du préconditionnement. Ainsi la kétamine, les barbituriques, le 5-hydroxydécanoate (5-HD) (182), et le glibenclamide (183), connus comme étant des agents provoquant la fermeture des canaux mK-ATP, sont capables d'inhiber les effets protecteurs du préconditionnement ischémique. L'isoflurane et le diazoxide (182) ainsi que l'adénosine et le nicorandil, des agents provoquant l'ouverture des canaux mK-ATP, sont capables de protéger des lésions de l'ischémie/reperfusion sans que le préconditionnement ischémique ait lieu.

- o *Les pores de transition de perméabilité mitochondriaux (mPTP)*

Ces pores, dont la composition n'est pas complètement élucidée, traversent les 2 membranes mitochondriales. Leur ouverture provoque une communication entre le cytosol et la matrice mitochondriale, permettant le passage de substances étrangères vers la matrice, provoquant la destruction mitochondriale. Halestrap *et al.* (184) ont proposé que la présence de ROS et de Ca^{2+} intracellulaire lors de la reperfusion provoque l'ouverture du mPTP. Cette ouverture est prévenue par l'introduction de la cyclosporine A qui se lie à la cyclophylène D (un composant du mPTP). Hausenloy *et al.* (185) ont démontré que la protection contre l'ischémie/reperfusion assurée par le préconditionnement ischémique, le diazoxide, ou l'adénosine, est inhibée par l'introduction d'atractyloside, un agent provoquant l'ouverture du mPTP. L'atractyloside ne possède pas d'effet sur la taille de l'infarctus en l'absence de préconditionnement. Argaud *et al.* (186) ont montré en 2004 que le préconditionnement ischémique, ainsi que la cyclosporine A inhibent l'ouverture du mPTP induite par une surcharge calcique, et réduit la taille de l'infarctus.

4.1.2. Postconditionnement ischémique

Le postconditionnement ischémique consiste à effectuer après un événement ischémique durable, une série de brèves périodes de reperfusion suivies de brèves périodes d'ischémie avant de permettre une reperfusion finale. Le postconditionnement ischémique possède l'avantage de pouvoir être appliqué après un événement ischémique aigu non programmé, ce qui est le cas de la majorité des syndromes ischémiques en pratique courante. En effet, le préconditionnement ischémique est effectué avant un événement ischémique programmé, comme par exemple la cure d'un anévrisme aortique nécessitant un clamage aortique provoquant l'ischémie dans le territoire vasculaire se trouvant en aval du site du clamage. Les syndromes ischémiques aigus, qu'ils soient au niveau cardiaque ou bien au niveau des membres, surviennent le plus souvent à l'extérieur des structures de soins. A l'arrivée de ces patients, le préconditionnement ischémique n'est plus praticable, mais la

reperfusion (médicale ou chirurgicale) s'impose pour tenter de limiter le plus possible les dégâts de l'ischémie.

Le concept du postconditionnement ischémique a été décrit pour la première fois par Zhao *et al.* (187) en 2003 au niveau du myocarde de chien, en postconditionnant le territoire myocardique irrigué par l'artère inter-ventriculaire antérieure soumis à une ischémie prolongée et une reperfusion. Les auteurs ont découvert que le postconditionnement ischémique local protège le myocarde des lésions de l'ischémie et de la reperfusion. Ils ont également comparé le postconditionnement au préconditionnement ischémique, et ont découvert une protection identique en termes de réduction de la taille d'infarctus myocardique, de préservation de la fonction endothéliale, de production locale de ROS, et de production de malondialdéhyde (MDA).

Loukogeorgakis *et al.* en 2007 (188) ont découvert que le postconditionnement ischémique à distance, en postconditionnant le bras controlatéral par rapport au bras ischémique, a protégé la fonction endothéliale artérielle chez l'homme. En comparaison avec le préconditionnement ischémique à distance, ils ont montré une protection identique, et une implication du mK-ATP dans la protection du postconditionnement.

Au niveau musculaire squelettique, McAllister *et al.* (22) ont démontré en 2008 que le postconditionnement ischémique local protège le muscle squelettique de porc. Eberlin *et al.* ont démontré en 2009 sur un modèle murin que le postconditionnement ischémique à distance est également efficace au niveau du muscle squelettique, mais leur protocole de postconditionnement n'était pas classique (ischémie de la patte controlatérale pendant deux heures après l'ischémie de deux heures de la patte ipsilatérale). Tsubota *et al.* (19) ont montré sur un modèle murin que le postconditionnement conventionnel à distance protège contre les lésions de l'ischémie/reperfusion, et que le mécanisme de protection passe par les récepteurs de l'adénosine.

Le postconditionnement ischémique local a été très largement étudié au niveau du myocarde de différentes espèces (y compris l'espèce humaine) ; Skychally *et al.* (189), dans une revue exhaustive, ont dressé des tableaux des différents protocoles de postconditionnement au niveau du myocarde, avec les résultats pour chaque espèce. Au niveau du muscle squelettique, le Tableau 5 résume les différents travaux publiés à ce jour.

Auteur	Espèce	Type de postconditionnement	Muscle postconditionné	Effet
McAllister <i>et al.</i> (22)	Porc	Local	Latissimus dorsi	Protection
Park <i>et al.</i> (190)	Rats SD	Local	Extensor digitorum longus	Protection
Gyurkovics <i>et al.</i> (153)	Rats Wistar	Local	Pattes postérieures	Protection
Eberlin <i>et al.</i> (191)	Souris C57/Bl6	A distance	Gastrocnemius	Protection
Tsubota <i>et al.</i> (19)	Souris C57/Bl6	A distance	Gastrocnemius	Protection

Tableau 5 : Espèces sur lesquels le postconditionnement musculaire squelettique a été expérimenté. SD : Sprague-Dawley.

Ces travaux ont permis une meilleure compréhension de différents mécanismes de protection cellulaire. Ovize *et al.* (146), ainsi que Vinten-Johansen *et al.* (192) et Van Vuuren *et al.* (193) ont résumé les connaissances sur le preconditionnement ischémique, plus précisément au niveau musculaire cardiaque. Malgré les différences avec les protocoles de preconditionnement, les ressemblances restent multiples.

4.1.2.1. Concept du postconditionnement :

Si le postconditionnement s'effectue avant d'atteindre les lésions létales de l'ischémie, il sera capable comme le preconditionnement de prévenir les lésions de reperfusion (Figure 32) (31,146).

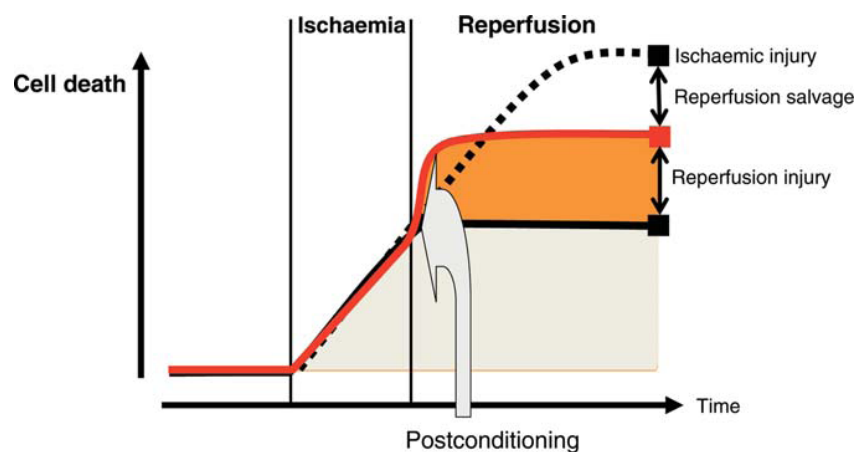


Figure 32 : Quantification lésionnelle (mort cellulaire) en cas d'ischémie, d'ischémie-reperfusion, et après postconditionnement. Après un événement ischémique prolongé, la reperfusion interrompt le processus néfaste de l'ischémie qui provoquerait la mort de toutes les cellules (courbe pointillée). Cependant elle va engendrer des lésions supplémentaires de reperfusion (courbe rouge) engendrant un surcroît de mort cellulaire par rapport à celle liée au seul processus ischémique. Le postconditionnement ischémique effectué en fin d'ischémie (courbe noire pleine) va prévenir la survenue des lésions de reperfusion (aire en orange). (Ovize *et al.*) .

4.1.2.2. Durée de l'ischémie :

La durée de l'ischémie est un déterminant essentiel de la taille de l'infarctissement. Elle détermine également l'efficacité du postconditionnement en termes de réduction de la nécrose (146). En d'autres termes, plus la durée d'ischémie augmente, plus le postconditionnement devient efficace en termes de réduction de la surface nécrosée par rapport à l'aire à risque. A l'inverse, si la durée de l'ischémie devient plus courte, le même protocole de postconditionnement au niveau de la même espèce devient moins efficace, allant jusqu'à avoir un effet délétère (Figure 33) lorsque la durée d'ischémie devient trop courte .

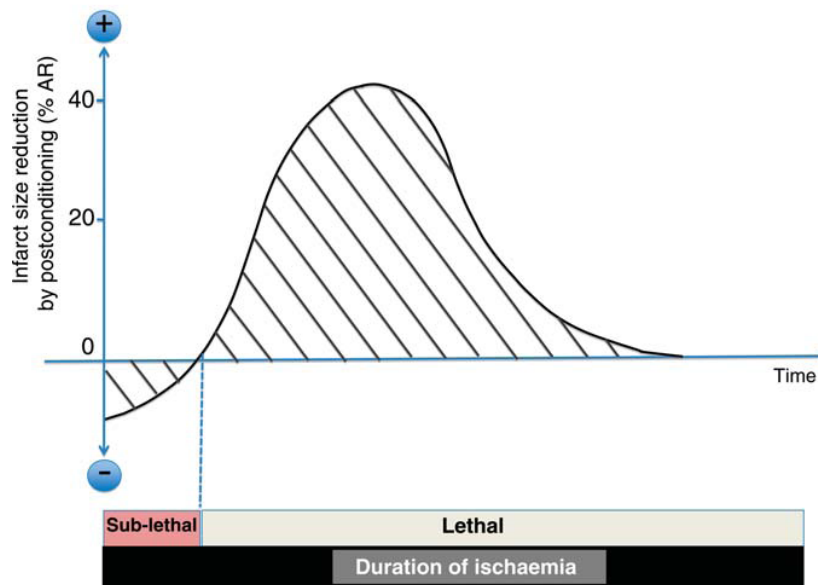


Figure 33 : Efficacité du postconditionnement selon la durée de l'ischémie. Lorsque l'ischémie ne génère pas un seuil lésionnel, le postconditionnement devient néfaste. A partir de ce seuil jusqu'au niveau lésionnel irréversible, le postconditionnement ischémique est bénéfique. (Ovize *et al.*) (146).

4.1.2.3. Protocole de postconditionnement :

A la différence du préconditionnement, les cycles du postconditionnement doivent être courts, de l'ordre de la seconde.

L'algorithme du postconditionnement dépend d'au moins trois facteurs :

- la durée entre la fin de l'ischémie et le début du postconditionnement,
- le nombre de cycles ischémiques,
- la durée des périodes de reperfusion lors du postconditionnement.

Les différents travaux effectués sur différentes espèces montrent que le postconditionnement doit être initié dans les plus brefs délais ; l'effet du postconditionnement est perdu s'il est débuté quelques minutes après la fin de l'ischémie (146). Il semblerait également qu'il existe des différences selon les espèces. Les espèces de petites tailles seraient moins protégées par le postconditionnement que celles de grandes tailles (Vinten-Johansen *et al.*) (194).

4.1.2.4. Mécanismes du postconditionnement :

Comme pour le préconditionnement, les mécanismes du postconditionnement ont été longuement étudiés, et différents algorithmes ont été proposés {VintenJohansen:2005gu}{vanVuuren:2008wj}{Cour:2011ds}{Ovize:2010fw}.

La figure 34 propose un schéma simplifié du mécanisme du postconditionnement (146).

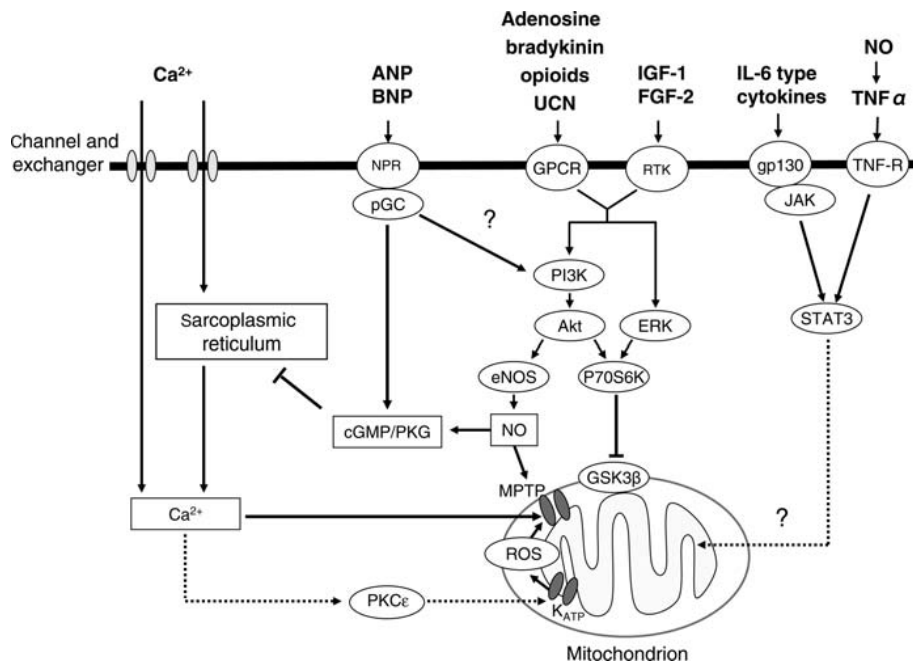


Figure 34 : Schéma simplifié proposé pour le mécanisme du postconditionnement ischémique.

Les récepteurs aux opioïdes, à la bradykinine et à l'adénosine, ainsi qu'à l'IGF, le TNF- α , l'IL-6, l'ANP, et le BNP, transmettent des messages vers le cytosol à travers différentes voies de signalisation pour atteindre les mitochondries et ouvrir les canaux mitochondriaux K⁺-ATP dépendants (mK-ATP) et fermer les pores de transition de perméabilité mitochondriaux (mPTP). (Ovize *et al.*) (146).

Des **inducteurs** récepteurs-dépendants ont été proposés comme l'adénosine, la bradykinine, et les opioïdes. D'autres inducteurs récepteurs-indépendants ont été également proposés comme les ROS, le monoxyde d'azote (NO) et l'acide.

Plusieurs **médiateurs** intra-cellulaires pour la traduction des signaux ont été incriminés.

- La voie RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase) : activée par les inducteurs récepteurs-dépendants, elle utiliserait la Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) et l'Extracellular Regulated Kinases 1 et 2 (ERK1/2) pour transmettre les signaux intra-cellulaires, et inhiber le mPTP via le NO et le Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK3 β).

- La voie SAFE (Survivor Activating Factor Enhancement) : c'est une voie alternative à la voie RISK. Activée par le TNF- α , elle utiliserait la JAK kinase pour phosphoryler le facteur de transcription STAT3.

- La Sphingosine Kinase (SPhK) : Elle génère la Sphingosine-1 Phosphate (S1P), régule la mitose cellulaire, l'apoptose, le réarrangement du cytosquelette, et la survie cellulaire. Elle pourra être stimulée par le TNF- α , et pourra rejoindre la voie RISK.

- Les Protéines Kinases C (PKC) et G (PKG) : elles reçoivent les signaux des récepteurs couplés avec les protéines G_i, la Tyrosine Kinase (TK) et les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK), ainsi que la Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase).

Des **effecteurs** sont à la fin de la chaîne du postconditionnement, les plus importants étant les canaux mitochondriaux K^+ -ATP dépendants (mK-ATP) et les pores de transition de perméabilité mitochondriaux (mPTP).

Nous nous attardons sur la mitochondrie, effecteur final et commun aux différentes voies de signalisation :

- o *Les canaux mitochondriaux K^+ -ATP dépendants (mK-ATP) :*

Les canaux mK-ATP sont incriminés dans le phénomène de protection, vu que leur inhibition (par le glibenclamide et le 5-hydroxydécanoate) a éliminé les effets bénéfiques du postconditionnement .

- o *Les pores de transition de perméabilité mitochondriaux (mPTP)*

Le mPTP a été plus largement étudié dans le postconditionnement. A part les différentes voies de signalisation amenant à la fermeture de ce pore et ainsi protégeant les cellules de l'apoptose, la relation entre les ROS et le mPTP est très importante et mérite d'être soulignée. Le traitement avec le N-acétyl-cystéine, un anti-oxydant, durant les trois premières minutes de la reperfusion abolit les effets bénéfiques du postconditionnement, alors qu'au-delà de ces trois minutes le postconditionnement reste bénéfique. Ceci témoigne de l'importance de la génération initiale de ROS dans le mécanisme de protection, probablement en activant le mK-ATP et la PKC. Il a été proposé que l'activation de la PKC ϵ pourrait ouvrir les canaux mK-ATP, provoquant ainsi l'augmentation de la formation du peroxyde d'oxygène (H_2O_2) mitochondrial, pouvant éventuellement fermer les mPTP.

Cour *et al.* (141), ont montré par le biais de la microscopie électronique que le postconditionnement, de la même manière que le préconditionnement, préserve la structure architecturale mitochondriale. Dans ce cas, les mitochondries restent identiques aux mitochondries shams, sans signes d'œdème, de dépôts calcaires, ou de rupture de la membrane externe (voir figure 24).

4.1.3. Perconditionnement ischémique

Le perconditionnement ischémique consiste à pratiquer au cours d'un évènement ischémique, une série de brèves périodes d'ischémie suivies de brèves périodes de reperfusion avant de permettre une reperfusion finale. En pratique, le perconditionnement ne peut se pratiquer qu'à distance.

Schmidt *et al.* (195), ont été les premiers à montrer en 2007 que le perconditionnement ischémique sur une patte de porc a permis de protéger le myocarde suite à une agression ischémique.

Récemment, Bøtker *et al.* (196), ont démontré lors d'une étude clinique contrôlée et randomisée, que le perconditionnement d'un bras lors d'un infarctus aigu du myocarde, effectué lors du transfert vers une structure de soin, protège le myocarde des effets délétères de l'ischémie/reperfusion (amélioration de la perfusion myocardique évaluée par caméra à émission de positons).

4.1.3.4. Préconditionnement ischémique versus postconditionnement ischémique

La principale différence entre le preconditionnement et le postconditionnement reste bien évidemment le moment de la pratique du conditionnement ischémique par rapport à la survenue de l'ischémie. Egalement, les cycles de postconditionnement sont plus courts (quantifiés en secondes), à la différence des cycles de preconditionnement qui sont plus longs (quantifiés en minutes).

Les similitudes entre ces types de conditionnement sont multiples. En termes de protection, Zhao *et al.* (187) ont été les premiers à comparer lors d'une même étude le preconditionnement et le postconditionnement. Ils ont découvert des résultats similaires en termes de protection myocardique (taille d'infarctissement, accumulation leucocytaire locale, fonction endothéliale, peroxydation lipidique, et production locale de ROS). En termes de mécanismes intracellulaires, Vinten-Johansen *et al.* (197) et Crisostomo *et al.* (198), ont trouvé de multiples similitudes au niveau des inducteurs, des médiateurs, et des effecteurs. La figure 35 présente un schéma simplifié des différentes similitudes (194).

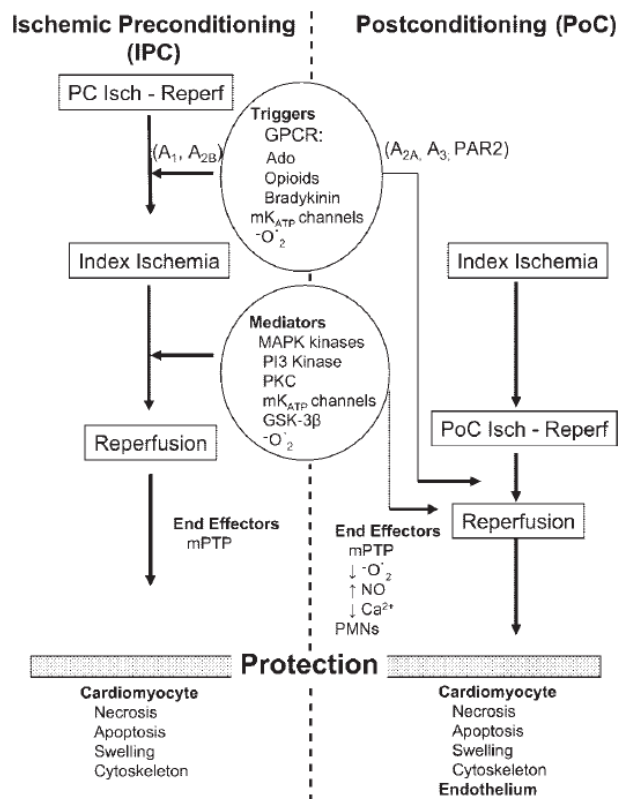


Figure 35 : Schéma simplifié proposé pour montrer les similitudes entre les mécanismes du pré et du postconditionnement ischémique, avec la différence des moments d'intervention des inducteurs et des médiateurs, et la similitude des effecteurs pour aboutir à la protection.

GPCR : G Protein-Coupled Receptors. A : récepteurs de l'adénosine. PAR2 : Protease-Activated Receptor 2. O₂⁻ : anion superoxyde. PMN : Polymorphonucléaires. (Vinten-Johansen *et al.*) (194).

4.2. Conditionnement pharmacologique

Par analogie avec le conditionnement ischémique, le conditionnement pharmacologique consiste en l'administration d'une molécule protectrice avant (préconditionnement pharmacologique) ou après (postconditionnement pharmacologique) un événement ischémique prolongé. Il a été mis en évidence initialement avec les ligands des récepteurs liés aux protéines G comme l'adénosine (199) et la bradykinine (200). Nous allons développer plus particulièrement le conditionnement pharmacologique par cyclosporine qui a fait l'objet de cette thèse et nous allons également aborder le conditionnement pharmacologique par les agents anesthésiques halogénés.

En effet, dans le contexte périopératoire, de nombreux médicaments de l'anesthésie possèdent des propriétés de pré et de postconditionnement myocardique. Ceci est vrai pour les agents anesthésiques halogénés ainsi que pour les morphinomimétiques. Par contre, d'autres médicaments tels que la kétamine (201), le thiopental (202) ou les bêta-bloquants (203) bloquent, dans certaines circonstances, les conditionnement ischémique et pharmacologique.

4.2.1. Conditionnement pharmacologique par cyclosporine

4.2.1.1. Structure chimique de la cyclosporine

La cyclosporine A (ou ciclosporine A, les deux orthographes étant couramment utilisées) est un polypeptide cyclique lipophile de onze acides aminés (Figure 36). Elle ne comporte que des acides aminés dextrogyres, particularité rare dans le monde vivant. Elle a initialement été isolée d'un champignon (*Tolypocladium inflatum gams*) des plages de Scandinavie dans le but d'isoler une nouvelle famille d'antibiotiques. Elle est dénuée de toute activité antibactérienne mais son activité immunosuppressive a été décrite par Jean-François Borel en 1976.

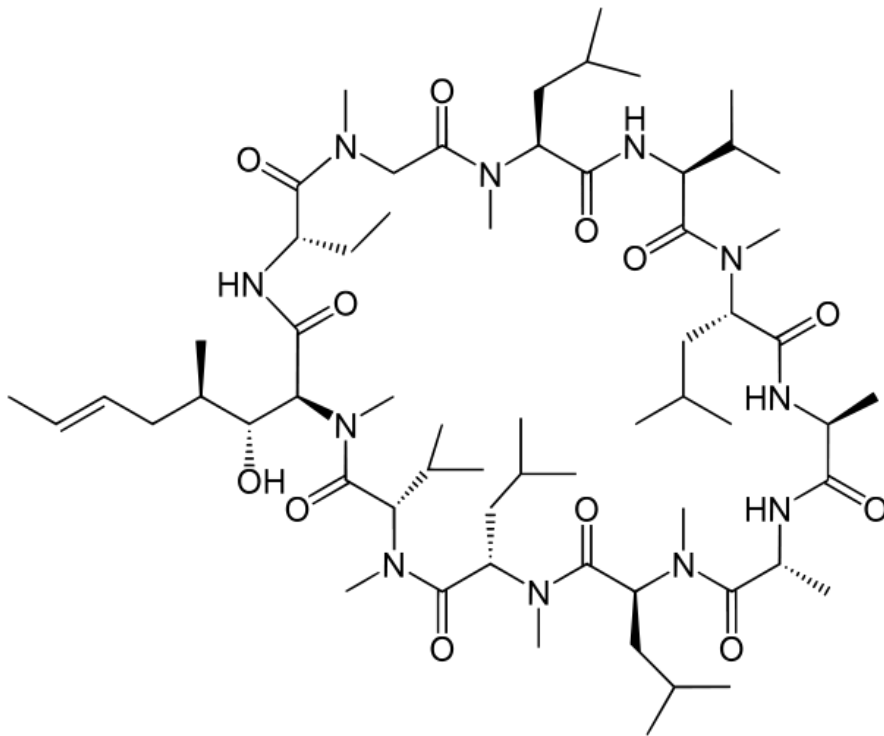


Figure 36 : Formule chimique de la cyclosporine

4.2.1.2. Effets pharmacologiques

La cible pharmacologique de la cyclosporine A est représentée par les cellules immunocompétentes. Dans les lymphocytes T, la cyclosporine se lie préférentiellement à la cyclophiline A cytosolique (la plus abondante des cyclophilines dans les cellules T). Le complexe cyclosporine-cyclophiline A inhibe ensuite la calcineurine et inhibe la déphosphorylation calcineurine-dépendante des facteurs de transcription NFAT (Nuclear factor of activated T-cells (facteur nucléaire des lymphocytes T activés)). Les NFAT (notamment ceux de la classe c) ne sont alors plus capables d'effectuer leur translocation dans le noyau et la cyclosporine s'oppose ainsi à l'activation de la transcription des gènes codant pour l'IL₂, l'IL₄ et CD40L (CD40 ligand)(14,17-19). Tous ces effets aboutissent à une diminution de l'efficacité des lymphocytes T effecteurs et donc des réactions immunitaires à médiation cellulaire ainsi qu'à l'inhibition de la libération de lymphokines. La cyclosporine stimule également la synthèse de TGF- β (transforming growth factor β).

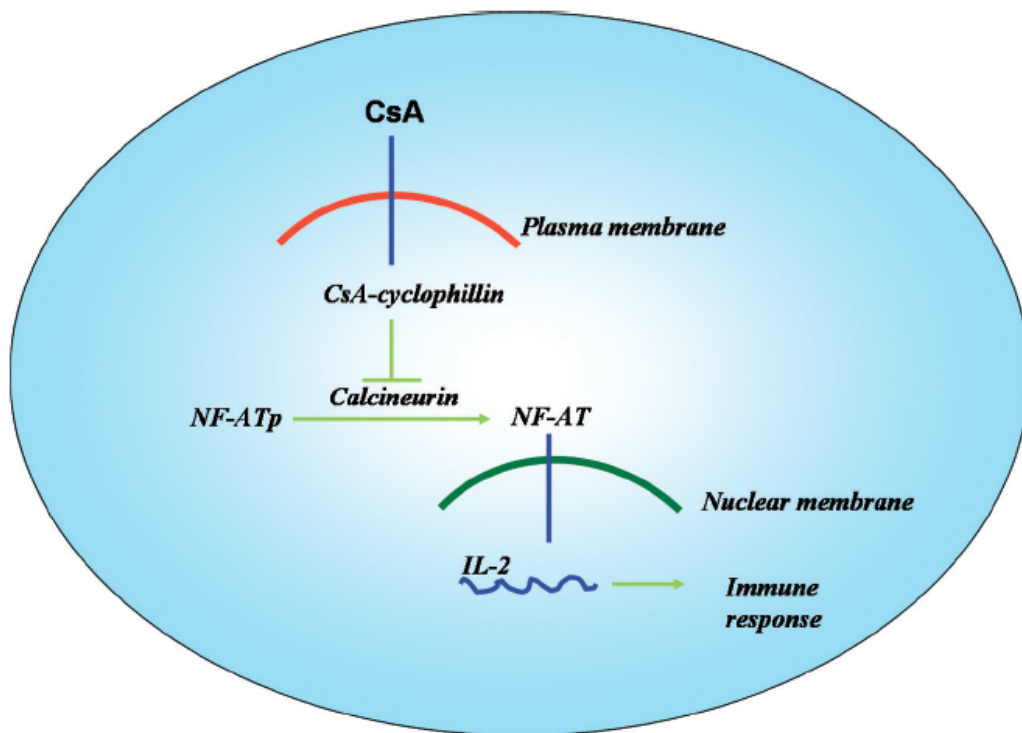


Figure 37 : Mécanismes d'action des effets immunosuppresseurs la cyclosporine (CsA). D'après Rezzani. (16,20). NF-AT : facteur nucléaire des lymphocytes T activés, NF-AT(12,16)p : forme phosphorylée du facteur nucléaire des lymphocytes T activés, IL-2 : interleukine 2.

La cyclosporine est fortement métabolisée par le foie par le cytochrome P450-3A4 ce qui explique en grande partie ses très nombreuses interactions médicamenteuses. Son élimination est essentiellement biliaire.

4.2.1.3. Effets cliniques

En clinique humaine, la cyclosporine est principalement utilisée pour induire une immunosuppression après transplantation d'organe (prévention du rejet de greffon et traitement du rejet chez des patients initialement traités par d'autres immunosuppresseurs). Elle est également prescrite dans le traitement préventif ou curatif de la maladie du greffon contre l'hôte après greffe de moelle osseuse. Hormis le domaine de la transplantation, la cyclosporine est également indiquée en dermatologie dans certaines formes graves de psoriasis ou de dermatite atopique. En rhumatologie, elle est exceptionnellement indiquée dans la polyarthrite rhumatoïde et certaines maladies apparentées. Enfin, elle a été étudiée dans le traitement de certaines maladies auto-immunes tel que le syndrome de Stevens-Johnson, la rectocolite hémorragique résistant aux corticoïdes et certaines uvéites.

4.2.1.4. Effets métaboliques

En se liant à la cyclophiline A, la cyclosporine peut diminuer la phosphorylation oxydative et l'activité du cycle de Krebs et ce de façon dose-dépendante (21,22). Pour certains auteurs, le rôle protecteur myocardique de la cyclosporine A administrée en préconditionnement pourrait impliquer une diminution du couplage phosphorylation/oxydation et donc permettre aux cardiomyocytes de tolérer la période ischémique en diminuant les besoins énergétiques.

4.2.1.5. Effets indésirables

Les effets indésirables de la cyclosporine sont connus de longue date mais ont été essentiellement rapportés lors d'administrations prolongées dans le cadre d'un traitement immunosuppresseur après transplantation d'organe. Les mécanismes impliqués sont essentiellement vasculaires avec une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote, une augmentation du stress oxydant endothélial (et notamment du 8 isoprostane) et une augmentation de la sensibilité aux agents vasoconstricteurs comme l'endothéline 1 (16,24). Les effets indésirables les plus fréquemment décrits sont la néphrotoxicité, la toxicité neurologique (convulsions, PRES(7,23)), les troubles du rythme cardiaque, l'hyperplasie gingivale et l'hypertrichose (14,26).

En revanche, les effets indésirables potentiels consécutifs à une administration aiguë telle que celle que nous avons pratiquée n'ont été rapportés que très rarement. Gill *et al.* ont utilisé le rapport NAG/créatinine comme marqueur spécifique d'atteinte tubulaire rénale dans un modèle porcin d'asphyxie néonatale. De faibles doses de cyclosporine amélioraient la perfusion rénale et n'entraînaient pas d'ascension du rapport NAG/créatinine. Par contre, une dose de 25mg/kg provoquait une augmentation significative de ce marqueur d'atteinte tubulaire, suggérant qu'il puisse exister une toxicité tubulaire aiguë en cas d'administration de doses très élevées. Cibulskyte *et al.* (139,204) ont étudié le profil pharmacocinétique ainsi que les effets sur la vascularisation rénale de plusieurs doses de cyclosporine par voie intraveineuse chez le porc (3, 6 et 9 mg/kg). Le débit de filtration glomérulaire ainsi que le débit sanguin rénal (évalué par IRM) restaient inchangés même après la dose la plus forte.

On peut néanmoins redouter les réactions anaphylactiques et d'histaminolibération non spécifique lors d'une administration intraveineuse rapide de cyclosporine (205,206). Ce mode d'administration rapide (10 min) est probablement pourvoyeur de plus d'hypertension artérielle, de plus de vasoconstriction rénale et d'anomalies plus sévères de l'angiogramme rénal par rapport à une administration lente sur 4 heures, ce qui explique probablement les recommandations de la monographie Vidal (207,208).

Des analogues synthétiques de la cyclosporine ont été développés comme le Debio-025 ou alisporivir et la N-méthyl-4-isoleucine cyclosporine (NIM811). Certains possèdent une plus grande affinité pour la Cyp-D (209,210) et d'autres sont dépourvus de site de fixation à la cyclophiline A cytosolique, ce qui empêche l'effet immunosuppresseur. Enfin, ces analogues synthétiques de la cyclosporine seraient dénués de néphrotoxicité (211,212).

4.2.1.6. Conditionnement pharmacologique

➤ *Effets sur la chaîne respiratoire mitochondriale et l'apoptose*

L'émulsion lipidique du crémophor EL qui sert d'excipient à la formulation intraveineuse de la cyclosporine (Sandimmun®) peut, à forte concentration, exercer un effet dépresseur sur le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale sans modifier le couplage phosphorylation/oxydation (9,213).

➤ Effets sur le stress oxydant

Les données concernant le stress oxydant sous traitement par cyclosporine sont disparates et contradictoires. Plusieurs facteurs confondants (ischémie-reperfusion liée à la transplantation d'organe, autres immunosuppresseurs associés) viennent également rendre l'interprétation des résultats difficile. Néanmoins, en administration chronique, il semble que la cyclosporine diminue l'activité de la glutathion peroxydase (enzyme antioxydante) mais diminue également le stress oxydant plasmatique, comme cela semble attesté par une diminution du malonyldialdéhyde (MDA)(214,215). Globalement, l'administration chronique de cyclosporine A semble augmenter le stress oxydant et l'administration d'antioxydants permet de réduire de façon significative une grande partie des effets indésirables rénaux, hépatiques et cardiaques (16,216). Lors d'une administration ponctuelle unique, les effets de la cyclosporine sur le stress oxydant, ne sont que très peu décrits mais des cellules mésangiales humaines en culture, exposées à une concentration de 10^{-7} M de cyclosporine produisent de fortes quantités de peroxyde d'hydrogène (217,218).

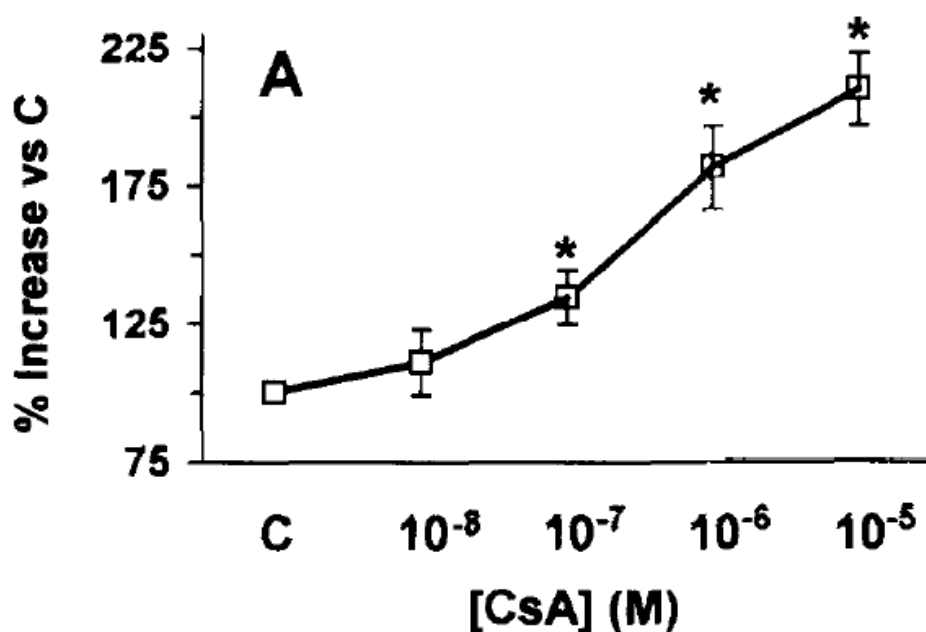


Figure 38 : Production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par des cellules mésangiales humaines exposées à des concentrations croissantes de cyclosporine pendant 15min à 37°C. Résultats exprimés en pourcentage par rapport à des cellules contrôle exposées à de l'éthanol à 0,01%. D'après Perez *et al.* (218,219).

4.2.1.7. Implication du pore de transition mitochondrial (mPTP)

Comme le mPTP constitue un effecteur très distal de la chaîne de protection, le cibler spécifiquement représente théoriquement une piste thérapeutique prometteuse puisque très en aval de tous les mécanismes protecteurs connus jusqu'alors. Il permet de fait de « court-circuiter » les voies de protection RISK et SAFE habituellement mises en jeu dans les mécanismes de pré- et de postconditionnement ischémiques. Dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le lapin, Argaud *et al.* ont effet mis en perspective l'inhibition de l'ouverture

du pore de transition mitochondrial (résistant à une charge calcique très importante) et la diminution des lésions cellulaires apoptotique ou nécrotique (220,221).

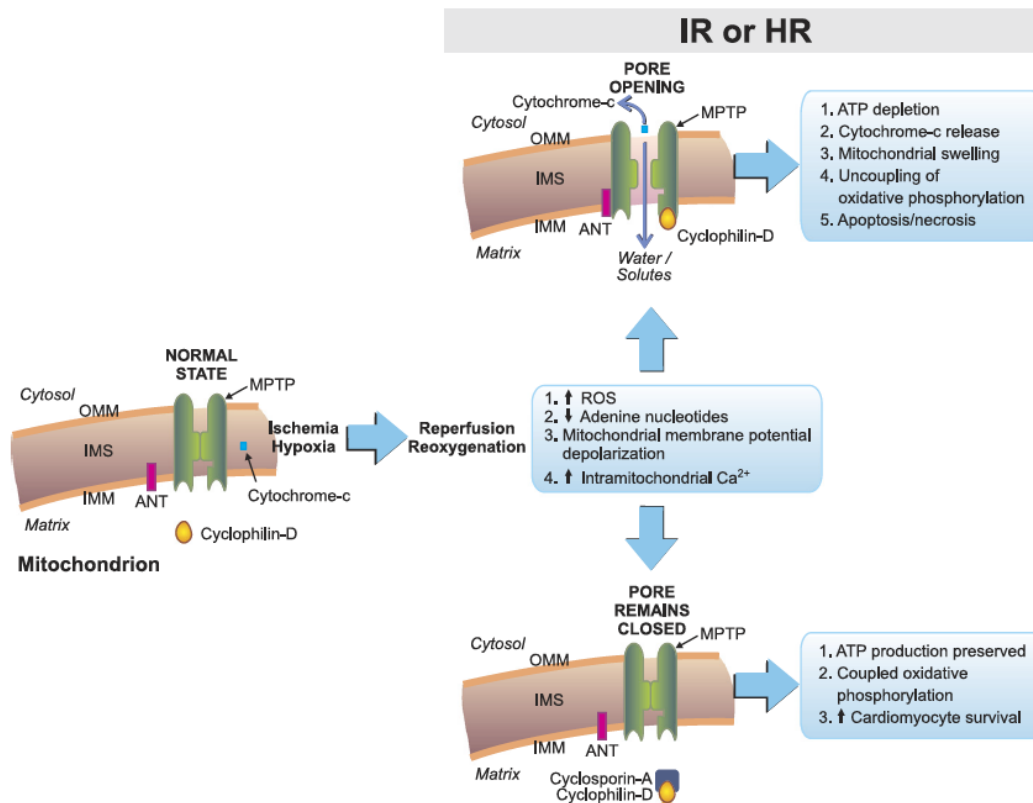


Figure 39 : Formation du pore de transition mitochondrial au cours de l'ischémie-reperfusion et effets de la cyclosporine. OMM : membrane mitochondriale externe, IMS : espace intermembranaire, IMM : membrane mitochondriale interne, ANT : adénine nucléotide translocator. D'après Gill *et al.* (222,223)

4.2.2. Conditionnement pharmacologique par les agents anesthésiques halogénés

Dès 1997, Kersten *et al.* (224) ont démontré que l'isoflurane administré à la posologie de 1 MAC (concentration alvéolaire minimale) réduisait la nécrose myocardique dans le cœur du chien soumis à une interruption du flux de une heure dans l'artère interventriculaire antérieure et ceci de façon équivalente à la protection conférée par le preconditionnement ischémique. Des effets protecteurs similaires ont également été mis en évidence avec le desflurane (225), le sévoflurane (226), le xénon et l'hélium (227). La protection myocardique conférée par le conditionnement pharmacologique halogéné s'applique que l'agent soit administré avant ou après le stimulus ischémique prolongé, réalisant alors un pré et un postconditionnement pharmacologiques.

Les mécanismes du postconditionnement pharmacologique par les halogénés partagent beaucoup de similarités avec les voies de signalisation empruntées par le pré et le postconditionnement ischémiques (228). Ainsi, l'activation de la PI3 kinase intervient à la fois dans le pré et le postconditionnement pharmacologique par isoflurane, empruntant ainsi la voie RISK décrite initialement dans le postconditionnement ischémique. Les canaux potassiques mitochondriaux sensibles à l'ATP (mK_{ATP}) sont également impliqués dans le postconditionnement pharmacologique par sévoflurane (229). Administré en postconditionnement à une MAC, l'isoflurane phosphoryle et donc inactive GSK-3 β en

empruntant la voie de la PI3 kinase (230) mais cette phosphorylation de peut également intervenir de façon directe (231). Enfin, administré sur des cardiomyocytes en culture, l'isoflurane active des voies anti-apoptotiques et inhibe les voies pro-apoptotiques de la même façon que le preconditionnement ischémique (232).

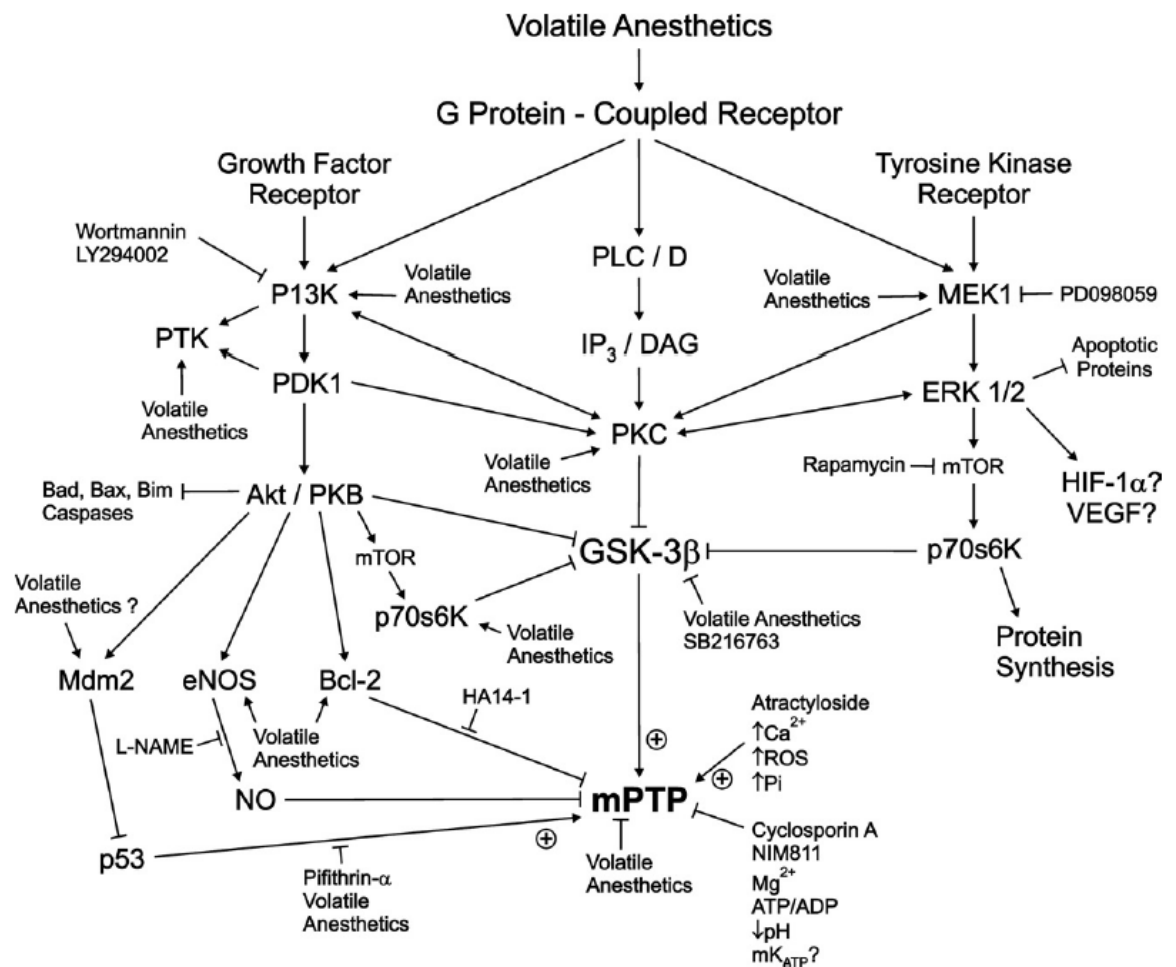


Figure 40 : Voies empruntées par le conditionnement pharmacologique par les agents anesthésiques halogénés (volatile anesthetics) L'activation et l'inhibition sont représentées respectivement par les sigles ↓ et ⊥. D'après Pagel *et al.* (228).

Postconditionnement ischémique et pharmacologique partagent également un certain nombre de contraintes. Ainsi, comme pour le postconditionnement ischémique, le postconditionnement pharmacologique par isoflurane nécessite un timing très précis pour être efficace. En effet, l'administration par inhalation doit être débutée quelques minutes avant la fin de l'ischémie pour que des concentrations plasmatiques suffisantes soient atteintes au moment de la reperfusion (233).

En résumé,

L'ischémie musculaire squelettique va provoquer des lésions locales irréversibles dont l'importance dépend du temps écoulé avant la reperfusion. La reperfusion, effectuée avant d'atteindre les lésions irréversibles, va limiter les lésions irréversibles du territoire de l'ischémie, mais va elle-même provoquer des lésions supplémentaires qui restent moins importantes au cas où elle n'a pas eu lieu. Ces lésions possèdent des mécanismes cellulaires complexes, impliquant la production de ROS et l'atteinte mitochondriale.

L'ischémie et la reperfusion musculaire squelettique provoquent également des lésions à distance par le biais d'une réaction inflammatoire systémique médiées par les cytokines inflammatoires et les leucocytes activés. Les poumons et les reins sont des sites privilégiés de ces lésions. Les reins subissent des lésions supplémentaires dues à la rhabdomyolyse. Le rôle de la mitochondrie dans le mécanisme de ces lésions reste méconnu.

Le conditionnement ischémique, local ou à distance, avant ou après l'évènement ischémique est capable de prévenir les lésions de l'ischémie et de la reperfusion par signalisation intracellulaire qui atteignent la mitochondrie pour la préserver en ouvrant les canaux mK-ATP et en fermant les mPTP. La cyclosporine et les agents anesthésiques halogénés sont à même de fournir un conditionnement pharmacologique dont les voies de transduction sont proches de celles empruntées par les conditionnements ischémiques.

5. DEUX CIRCONSTANCES DANS LESQUELLES LES CONDITIONNEMENTS PHARMACOLOGIQUE ET ISCHEMIQUE SONT MOINS EFFICACES : LE DIABETE ET L'ÂGE AVANCE

5.1. Diabète

Le patient diabétique soumis à un stress d'IR (myocardique ou musculaire) est exposé à une morbidité et à une mortalité cardiovasculaires plus élevées (234-236) que chez le patient non diabétique. Ceci s'explique d'une part du fait des comorbidités qui associent plusieurs facteurs de risque cardiovasculaires et d'autre part du fait de lésions myocardiques plus sévères après ischémie-reperfusion (237).

Concernant l'ischémie musculaire des membres inférieurs, la prévalence de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs est augmentée d'un facteur 2 à 4 (236) et le risque d'amputation est 40 fois plus important chez le patient diabétique (238). Non seulement la fréquence des complications augmente mais les formes cliniques sont également plus sévères avec plus d'occlusions de localisation sous-poplitée, plus de calcifications et un lit d'aval de moindre qualité avec moins de collatéralité (239).

5.1.1. Modifications structurelles après induction d'un diabète de type 1 chez le rat

5.1.1.1. Modèles expérimentaux de diabète

Les modèles animaux de diabète sont nombreux et peuvent concerner tout aussi bien le diabète de type 1 que de type 2 (240). Nous avons choisi l'étude du diabète de type 1 induit par une forte dose unique de streptozotocine. La streptozotocine, produite par *Streptomyces achromogenes* est une nitrosourée douée de propriétés antibiotiques et antinéoplasique. La streptozotocine s'accumule dans les cellules pancréatiques β via le transporteur du glucose GLUT2 et y exerce ses actions toxiques (alkylation et fragmentation de l'ADN, modification des macromolécules) qui conduisent à la destruction des cellules β (241). Ceci aboutit à l'apparition en quelques jours d'un diabète insulino-prive avec des modifications morphologiques et métaboliques que nous avons, comme d'autres, bien caractérisées. L'hyperglycémie n'est pas le seul effet attendu de la destruction des cellules β . En effet, l'insuline, hormone anabolisante par excellence, intervient dans de nombreuses voies métaboliques (glycogénogénèse, métabolisme lipidique, synthèse protéique, croissance, contractilité myocardique, régulation de l'apoptose...) Son action de transport du glucose fait en outre intervenir les voies RISK par l'intermédiaire de la PI3 kinase et de Akt. En situation d'insulinopénie, PI3-K et Akt sont moins phosphorylées, ce qui aboutit à une moindre inhibition de GSK-3 β (242). Ainsi, l'expression et l'activité de GSK-3 β (qui facilite

l'ouverture du mPTP) sont-elles deux fois plus importantes chez le rat diabétique que chez le rat sain (243).

La streptozotocine est préférée à l'alloxan pour provoquer un diabète de type 1 car sa durée d'action plus longue provoque une hyperglycémie plus durable, des complications métaboliques mieux reproductibles et moins de décès par cétose.

Comme d'autres auteurs (244), nous avons observé des modifications morphologiques (histologiques) et fonctionnelles (altération de la respiration mitochondriale, majoration du stress oxydant) très marquées dans les muscles gastrocnémiens chez nos animaux diabétiques. Elles sont probablement liées aux conséquences de l'hyperglycémie chronique mais nous ne pouvons pas éliminer une action toxique directe de la streptozotocine sur les fibres musculaires striées squelettiques (245,246). L'extrapolation de nos résultats à d'autres modèles animaux et, *a fortiori*, aux patients atteints de diabète de type 1 doit donc être extrêmement prudente.

5.1.1.2. Diabète et stress oxydant

Les sources potentielles de production de radicaux libres chez l'animal diabétique sont nombreuses (247). Elles incluent à des degrés divers l'auto-oxydation du glucose et la formation de produits de glycation avancée, des sources enzymatiques cytosoliques (NO synthase (248), xanthine oxydase et NADPH oxydase (249)) et enfin les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, le complexe I et surtout le complexe III (qui subit un défaut d'assemblage au début de la maladie diabétique chez le rat (250) représentent des sources majeures de production de radicaux libres (dont l'anion superoxyde).

Le stress oxydant est un élément clef de la physiopathologie des complications diabétiques. On sait en effet depuis les travaux de Nishikawa *et al.* (251) que l'hyperproduction mitochondriale d'anion superoxyde intervient dans les 4 principales voies moléculaires impliquées dans la physiopathologie des complications du diabète.

① Activation de la protéine kinase C (PKC) via la synthèse accrue de diacylglycérol (DAG). La stimulation de la PKC va induire des dégâts vasculaires avec une augmentation de la perméabilité microvasculaire, une dérégulation de la voie du NO, une augmentation de l'adhésion leucocytaire et, *in fine*, une atteinte du débit sanguin (252).

② Augmentation du flux dans la voie des hexosamines. Par l'effet combiné de l'hyperglycémie et de l'augmentation de l'anion superoxyde qui inhibe la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, une proportion importante du glucose circulant est dévié vers la voie des hexosamines dont le métabolite final est le UDP-N-acetylglucosamine (UDP-Glc-NAC). Celui-ci provoque la glycosylation d'un grand nombre de facteurs de transcriptions et modifie notamment l'expression de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1).

③ Augmentation du flux dans la voie des polyols. Celle-ci aboutit à l'augmentation de la conversion du glucose en sorbitol avec diminution simultanée du glutathion et de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Il résulte de la baisse de ces antioxydants majeurs et de l'augmentation de synthèse d'anion superoxyde une augmentation significative du niveau du stress oxydant.

④ Augmentation des produits de glycation avancée (AGE). Les AGE sont dérivés de l'auto-oxydation du glucose en glyoxal et méthylglyoxal. Ils interfèrent avec les protéines intracellulaires (récepteurs, facteurs de transcription) en modifiant leurs fonctions. Ceci

aboutit d'une part à une augmentation du stress oxydant cellulaire et d'autre part à une modification de l'expression génique, favorisant les mécanismes d'apoptose. Les AGE pourraient aussi largement contribuer à la dysfonction mitochondriale observée au cours du diabète (253).

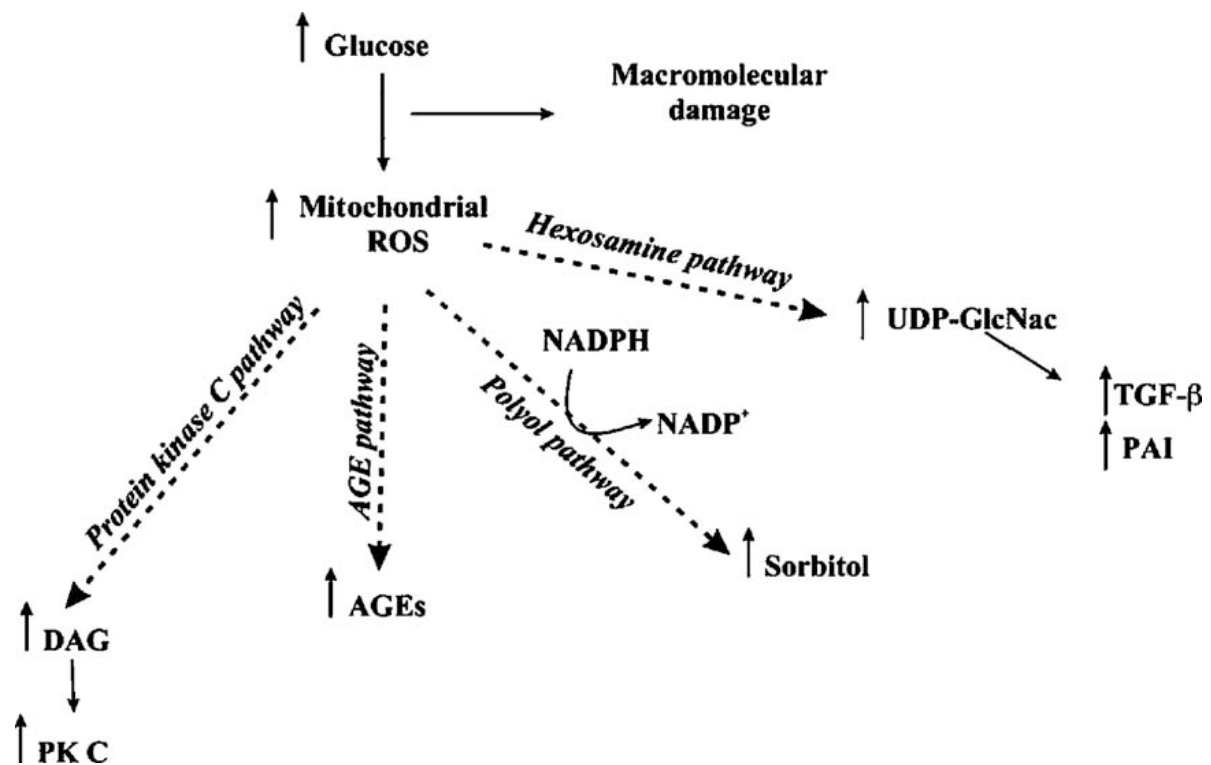


Figure 41 : Stress oxydant induit par l'hyperglycémie et mise en jeu des 4 voies métaboliques participant aux complications du diabète. D'après Rolo *et al.* (254)

L'augmentation du flux des donneurs d'électrons (NADH_2 et FADH_2) provoquée par l'hyperglycémie accélère le flux d'électrons au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ceci provoque l'hyperpolarisation de la mitochondrie et une inhibition partielle du transport d'électrons au niveau du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il en résulte une accumulation d'électrons au niveau du coenzyme Q dont la forme semiquinone réagit avec l'oxygène pour former l'anion superoxyde (254). De plus, l'assemblage des sous-unités du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale est défaillant au cours du diabète (250).

La mise en évidence d'une augmentation du stress oxydant systémique et tissulaire n'a pas été retrouvée par toutes les équipes, certaines ayant observé un stress oxydant inchangé voire moindre. Il semble néanmoins intéressant de réfléchir comme Herlein *et al.* à la quantité de radicaux libres produits par molécule d'oxygène consommée (255). En effet, dans le muscle squelettique de rats traités par streptozotocine, Herlein *et al.* observent une diminution à la fois de la respiration mitochondriale et du stress oxydant. Cependant, comme la respiration mitochondriale est plus abaissée que ne l'est la production de radicaux libres, la production radicalaire ramenée à la respiration mitochondriale est en fait augmentée en proportion. C'est donc cette méthodologie que nous avons retenue pour interpréter les modifications du stress oxydant chez nos animaux diabétiques.

5.1.1.3. Diabète et dysfonction mitochondriale

La dysfonction mitochondriale est intimement liée à la pathologie diabétique. Chez l'homme, Petersen *et al.* ont démontré qu'une diminution de la phosphorylation oxydative mitochondriale apparaît précocement dans les muscles de patients ayant des antécédents familiaux de diabète et ce avant même l'apparition des signes d'insulino-résistance (256). Des mitochondries isolées à partir de cardiomyocytes d'animaux rendus diabétiques par injection de streptozotocine ont une respiration mitochondriale réduite et une augmentation de la sensibilité du mPTP à la charge calcique (257). Même s'il n'y a pas forcément de lien de causalité, il existe un lien statistique fort entre le niveau d'hyperglycémie et l'inhibition de la respiration mitochondriale. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une corrélation inverse statistiquement significative entre la respiration mitochondriale basale (V_0) et la glycémie à jeun chez nos rats diabétiques. Chez des patients atteints de diabète de type II, Mogensen *et al.* ont également mis en évidence une relation statistiquement significative et une corrélation inverse entre la respiration mitochondriale et la concentration d'HbA1c, témoin de l'hyperglycémie chronique. L'atteinte mitochondriale du diabète semble être plus marquée dans certains tissus avec une atteinte franche des complexes I, II et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le foie, le myocarde et le muscle strié squelettique (253). Le pore de transition mitochondrial est également atteint avec un délai d'ouverture variable, une plus grande sensibilité à l'ouverture, du fait d'une oxydation plus importante de l'ANT (258), et une augmentation de la réponse à l'ouverture (259). Néanmoins, cette ouverture plus précoce du mPTP à une charge calcique croissante n'a pas été observée par tous les auteurs (260).

La dysfonction mitochondriale dans le muscle strié squelettique chez l'animal diabétique est en grande partie due au stress oxydant tissulaire local, mis en évidence par Bonnard *et al.* par l'augmentation parallèle de la carbonylation des protéines musculaires (261). Le stress oxydant majore le découplage mitochondrial et diminue l'expression de facteurs d'homéostasie mitochondriale (PGC-1 α). La restitution de l'euglycémie (par injections d'insuline chez des souris rendues diabétiques par streptozotocine) ainsi qu'un traitement antioxydant par NAC restaurent l'intégrité fonctionnelle des mitochondries musculaires (261).

Une diminution de la respiration mitochondriale ainsi qu'une augmentation du stress oxydant tissulaire ont également été mis en évidence dans le myocarde (262) et le muscle squelettique (263) humains chez des patients diabétiques.

5.1.2. Diabète et ischémie-reperfusion myocardique et musculaire squelettique

5.1.2.1. Données expérimentales

Après induction d'un diabète de type 1, les effets de l'IR sur les muscles myocardique et strié squelettique suivent une évolution en deux phases. Dans un premier temps (1 à 2 semaines), les rats dont le diabète est induit par streptozotocine semblent protégés avec une diminution de la dysfonction contractile et des arythmies post-reperfusion (264,265). Ceci a pu être mis en rapport avec une augmentation des défenses anti-oxydantes (protéines HSP90 et hème-oxygénase) liées à une augmentation de l'osmolalité plasmatique chez les animaux dont l'hyperglycémie était la plus marquée (264). Après un délai de plusieurs semaines

(variable selon les espèces et les modèles de diabète), apparaît l'effet inverse avec une augmentation de la sensibilité des muscles étudiés aux lésions d'IR. En effet, dans un modèle canin, la surface myocardique infarctée après IR était linéairement corrélée à la glycémie, que l'hyperglycémie soit induite par destruction des cellules β (3 semaines après injection d'alloxan et de streptozotocine) ou par perfusion intraveineuse de glucose (266).

5.1.1.2. Données cliniques

Les complications musculaires après IR chez le diabétique impliquent pour une large part des anomalies vasculaires caractérisées par un tonus vasoconstricteur plus intense, un stress oxydant et une inflammation endothéliale majorées (267)) mais également des anomalies du muscle strié squelettique lui-même. En effet, les études menées sur les muscles de sujets diabétiques retrouvent une atrophie importante (244), une capillarisation réduite ainsi qu'une réduction des enzymes du métabolisme oxydatif (268), impliquant la mitochondrie au premier chef (256,261). Même si le contrôle glycémique permet de limiter la progression des lésions microangiopathiques chez le patient diabétique, il ne réduit malheureusement ni la mortalité ni la morbidité cardiovasculaires après infarctus du myocarde ou revascularisation des membres inférieurs (269,270).

5.1.3. Diabète et postconditionnement

Plusieurs semaines après injection de streptozotocine, le myocarde de l'animal diabétique n'est plus conditionnable, comme cela a été démontré par Kertsen *et al.* dans un modèle de chien rendu diabétique par injections de streptozotocine et d'alloxan (266).

Les raisons invoquées sont diverses mais semblent principalement en rapport avec l'augmentation du stress oxydant et l'inefficacité de la voie RISK chez les animaux diabétiques.

5.1.3.1. Augmentation du stress oxydant systémique et local

Dans le cadre du diabète, le stress oxydant musculaire est majoré (255) et joue très probablement un rôle majeur dans l'induction des lésions de reperfusion après ischémie musculaire prolongée.

5.1.3.2. Inefficacité de la voie RISK chez les animaux diabétiques.

Il a été démontré par Gross *et al.* que l'expression de la protéine STAT-3 (qui intervient dans la voie SAFE) est réduite chez des souris diabétiques (271). D'autre part, nous avons déjà évoqué le fait que l'expression et l'activité de GSK-3 β (qui facilite l'ouverture du mPTP) sont deux fois plus importantes chez le rat diabétique que chez le rat sain (243). Dans deux modèles murins de diabète (type 1 et type 2) Przyklenk *et al.* ont démontré que le postconditionnement ischémique (3 cycles d'IR) ne permettait pas de réduire les lésions nécrotiques et apoptotiques liées à l'IR myocardique et ceci était lié à une absence de phosphorylation des kinases Akt, ERK1/2, P70S6 et GSK-3 β (272). Les auteurs mettaient également en évidence une augmentation des lésions nécrotiques lorsque le postconditionnement ischémique était plus intense (6 cycles d'IR). En revanche, la restitution

de l'euglycémie grâce à une greffe d'ilôts de Langerhans restaurait les effets bénéfiques du postconditionnement.

En l'absence de diabète, l'hyperglycémie seule abolit l'effet protecteur du preconditionnement ischémique (273) ainsi que celui du conditionnement pharmacologique par isoflurane (274). Les effets positifs du postconditionnement pharmacologique par érythropoïétine (EPO) observés chez les animaux sains disparaissent lorsqu'on propose ce même postconditionnement chez des rats diabétiques de type 1 (275). Chez les animaux sains et chez des rats atteints de syndrome d'insulino-résistance (high fat-diet), l'EPO augmentait la phosphorylation des kinases Akt et ERK1/2 ainsi que la phosphorylation de leur cible (GSK-3 β). Chez les rats dont le diabète était induit par streptozotocine, l'EPO ne conférait aucune protection et n'augmentait pas la phosphorylation des kinases Akt, ERK1/2 ni celle de GSK-3 β . L'administration d'un inhibiteur direct de GSK-3 β (SB216763) restaurait la protection myocardique. Il semble en effet que la chaîne de protection en aval de GSK-3 β soit encore fonctionnelle et que l'inhibition pharmacologique directe de GSK-3 β puisse restaurer l'effet protecteur du pré- et du postconditionnement (276).

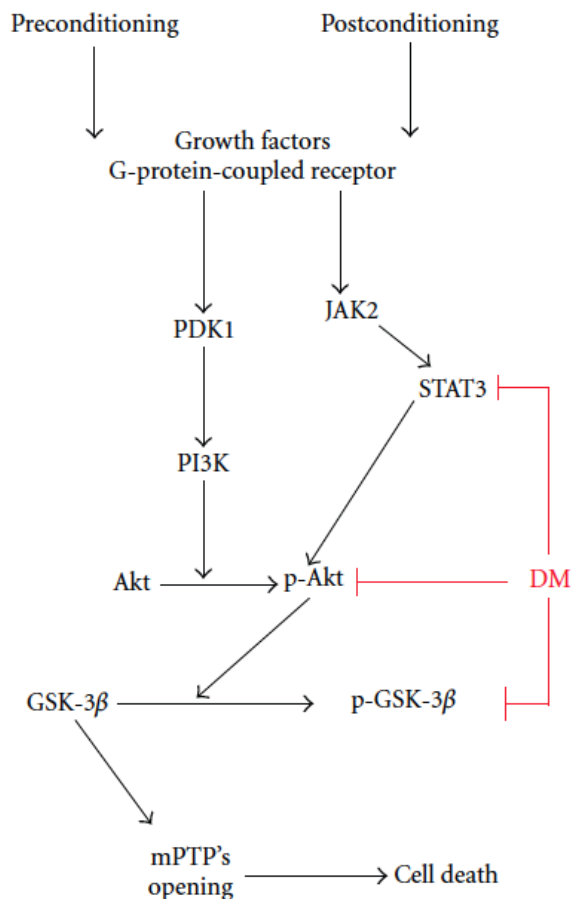


Figure 42 : Principales voies de signalisation empruntées par le preconditionnement et le postconditionnement pour limiter les lésions myocardiques d'IR. Les effets inhibiteurs du diabète (DM) sont également représentés en rouge. D'après Yin *et al.* (242).

5.2. Âge avancé

Nos sociétés occidentales modernes sont confrontées à un vieillissement de la population générale (277). Ces patients âgés, souffrant de pathologies multiples, polymédicamentés, sont opérés d'interventions chirurgicales complexes pour lesquelles l'âge ne constitue souvent plus un critère d'exclusion. Il est actuellement chose courante que des octogénaires soient opérés de chirurgie vasculaire majeure nécessitant des clampages proximaux ou d'interventions orthopédiques lourdes requérant la mise en place d'un garrot sur le segment proximal du membre opéré (278).

Ces deux types d'intervention génèrent des lésions d'IR musculaires qui, si elles sont habituellement bien tolérées chez le sujet jeune, peuvent avoir des conséquences locales et systémiques plus sévères chez les patients âgés. En effet, les fibres musculaires des sujets âgés sont moins résistantes aux stress mécanique ou ischémique et douées de propriétés de régénération moindres. La sarcopénie associée au grand âge est l'une des raisons qui expliquent cette susceptibilité accrue aux agressions. Pourraient également être impliquées les comorbidités qui accompagnent naturellement le processus du vieillissement telles que l'hypertension artérielle (279). Ainsi l'augmentation de la pulsatilité artérielle et la diminution de la réaction d'hyperhémie après occlusion artérielle (280) participeraient également à l'augmentation de la susceptibilité du muscle squelettique aux agressions de tout ordre chez le sujet âgé. Ces raisons locales, musculaires s'ajoutent aux modifications structurelles, étendues à tous les organes et associées au grand âge.

5.2.1. Modifications structurelles liées à l'âge

De nombreuses modifications fonctionnelles, métaboliques et anatomiques expliquent une sensibilité accrue des sujets âgés aux conséquences de l'ischémie-reperfusion musculaire. Il a été montré que de nombreux mécanismes de protection endogène sont moins opérants (diminution de l'expression des protéines de choc, diminution des molécules anti-oxydantes ainsi que des médiateurs des voies RISK et SAFE). D'autre part, les dommages infligés à l'ADN nucléaire s'accumulent, provoquant avec le temps de nombreuses mutations ponctuelles ainsi que le raccourcissement des sarcomères. Les protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale sont également affectées par ces mutations qui se manifestent au niveau phénotypique par une réduction de la fission mitochondriale, une augmentation du découplage mitochondrial et une augmentation de la synthèse de ROS dont le peroxyde d'hydrogène. L'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase et la diminution du glutathion réduit participent également à l'augmentation du stress oxydant chez le sujet âgé. L'ADN mitochondrial n'étant pas protégé par des histones, il est particulièrement sensible aux effets délétères des radicaux libres produits localement. A l'inverse de l'ADN nucléaire qui contient de nombreuses séquences non codantes, tout l'ADN mitochondrial est exprimé, expliquant que chaque atteinte du génome mitochondrial est susceptible de se manifester par une traduction patente sur le plan phénotypique.

Sur le plan métabolique, le métabolisme se fait préférentiellement à partir des hydrates de carbone plutôt qu'à partir des acides gras libres et les protéines subissent de nombreuses modifications post-translationnelles (glycation, oxydation).

Sur le plan anatomique, la sarcopénie est rencontrée de façon constante et associée à la fois une diminution du nombre et de la taille des fibres. Cette perte concerne essentiellement les fibres de type II.

MATERIEL ET METHODES

1. MODELES UTILISES DURANT CETTE THESE

L'ensemble des expérimentations animales de cette étude a été réalisé selon les recommandations en recherche animale en vigueur et après obtention des autorisations du comité d'éthique en recherche animale de l'Université de Strasbourg (CREMEAS n° AL/02/10/06/2009)

1.1. Animaux

1.1.1. Animaux jeunes et sains

Des rats Wistar mâles (250-350 g) ont été utilisés pour l'étude du postconditionnement pharmacologique par cyclosporine dans l'étude 1.

1.1.2. Animaux diabétiques

Nous avons induit un diabète de type 1 chez des rats mâles Wistar par injection intraveineuse de 65mg/kg de streptozotocine. La streptozotocine, produite par *Streptomyces achromogenes* est une nitrosourée douée de propriétés antibiotiques et antinéoplasique. La streptozotocine s'accumule dans les cellules pancréatiques β via le transporteur du glucose GLUT2 et y exerce ses actions toxiques (alkylation et fragmentation de l'ADN, modification des macromolécules) qui conduisent à la destruction des cellules β (195,204,241). Ceci aboutit à l'apparition en quelques jours d'un diabète insulino-prive. L'état diabétique était confirmé chez nos animaux lorsque la glycémie veineuse à la bandelette était supérieure à 16,7mmol/L (3g/L). Trente jours après induction du diabète, nous avons réalisé une épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale (2g de glucose par kg de poids corporel administré en gavage après un jeûne de 12 heures) chez 28 animaux traités par streptozotocine et 12 animaux injectés de sérum physiologique. La glycémie était ensuite déterminée par bandelette sur un prélèvement veineux à la queue 20, 40, 60, 120 and 180 min après gavage. Pour confirmer que nos animaux étaient porteurs des stigmates métaboliques du diabète de type 1, nous les avons ensuite placés 24h dans des cages métaboliques afin de quantifier les ingesta et la diurèse. Enfin, nous avons mesuré la pression artérielle de façon non invasive à la queue. Les cages métaboliques et les mesures de pression artérielle ont été réalisées de façon concomitante chez 28 animaux injectés de streptozotocine et 12 animaux injectés de sérum physiologique.

1.1.3. Animaux sénescents

Pour étudier les effets du vieillissement sur les effets protecteurs de la cyclosporine en situation d'IR des membres inférieurs, nous avons utilisé 16 rats mâles Wistar âgés de 71 à 73 semaines soit environ 18 mois et correspondant à un âge humain de 65 à 75 ans(281). Les caractéristiques morphologiques les plus notables étaient un surpoids important avec un poids moyen de $822\pm 18g$.

Tous les animaux ont été élevés dans un environnement thermique neutre ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), avec une période lumineuse de 12 heures par jour. La nutrition et l'hydratation étaient en libres accès.

1.2. Protocole anesthésique

Les animaux ont été installés dans une cage d'induction hermétique ventilée avec un mélange d'isoflurane à 4% (AERRANE[®], BAXTER S.A.S.) et d'oxygène. Après induction anesthésique, les animaux ont été placés sur des plaques chauffantes (MINERVE[®], Esternay, France) à 35°C . La ventilation spontanée était maintenue au travers d'un masque délivrant l'oxygène à des concentrations variables d'isoflurane, choisies selon le temps opératoire (2% lors des stimuli douloureux, et 1% lors des temps de latence). Le débit de gaz frais était maintenu entre 1 et 2L/min. L'adéquation du niveau d'anesthésie était testée avant chaque stimulus douloureux par la stimulation plantaire et la recherche d'un mouvement d'évitement (« *pedal reflex* »(274)).

1.3. Techniques opératoires

1.3.1. Technique chirurgicale d'ischémie bilatérale des membres inférieurs par clampage aortique sous-rénal

Après réalisation d'une laparotomie médiane, le péritoine postérieur a été ouvert et le paquet vasculaire cavo-aortique a été identifié. L'aorte abdominale sous-rénale a été disséquée et libérée de ses adhérences. Toutes les collatérales aortiques prenant naissance de l'aorte entre les artères rénales et la bifurcation aortique ont été coagulées par une sonde thermique (GEIGER[®], thermal cautery unit) puis sectionnées, évitant ainsi une vascularisation résiduelle des membres inférieures par collatéralité, très développée chez le rat.

1.3.2. Technique chirurgicale d'ischémie unilatérale d'un membre inférieur par application d'un garrot à la racine du membre

Dans le protocole des rats âgés, nous avons réalisé une ischémie unilatérale de la patte gauche par mise en place d'un garrot à la racine du membre sans dissection préalable des plans cutané ou musculo-aponévrotique. Le garrot consistait en une boucle de fil chirurgical et la tension était réalisée en imprimant au fil 20 tours de spires. Les temps d'ischémie et de reperfusion étaient respectivement de 3 et 2 heures. Dans ce protocole et conformément à nos observations préalables (282), la patte droite, non soumise au stress d'IR servait de patte contrôle.

Dans les deux modèles, l'ischémie était authentifiée par l'apparition d'une cyanose de la ou des patte(s) ainsi que l'élévation de la lactatémie capillaire (Lacate Pro® LT1710; Arkray, KGK, Japan) au-delà de 10mmol/L (283). Dans les deux protocoles également, la succession des phases comprenait 3 heures d'ischémie et deux heures de reperfusion.

A la fin des expérimentations, les pattes postérieures des animaux étaient disséquées, et un prélèvement musculaire sur les muscles gastrocnémiens des deux pattes était pratiqué. Pour l'étude des lésions à distance de l'ischémie-reperfusion, un prélèvement cardiaque était réalisé après thoracotomie médiane. Les animaux étaient euthanasiés par le prélèvement cardiaque.

Une partie des prélèvements était immédiatement immergée dans des solutions adéquates (selon la nature du prélèvement) à 4°C pour être utilisée pour les études sur la respiration mitochondriale. Une autre partie était congelée pour des études ultérieures concernant différents types de mesures.

1.4. Protocole expérimental

1.4.1. Effets du postconditionnement pharmacologique par cyclosporine chez le rat Wistar jeune et indemne de pathologie.

Pour cette première étude, nous avons constitué trois groupes de rats Wistar jeunes et indemnes de pathologie :

Les animaux du groupe Sham (n=8) ont subi 5h d'anesthésie générale et une laparotomie médiane sans autre geste réalisé. La laparotomie a été soigneusement suturée pour limiter la déshydratation.

Après laparotomie médiane, les animaux du groupe IR (n=10) ont été exposés à un clampage de l'aorte sous-rénale après ligature de toutes les collatérales entre les artères rénales et la bifurcation aortique. A trois heures d'ischémie faisaient suite deux heures de reperfusion.

Les animaux du groupe IR+CsA (n=9) ont été exposés au même protocole d'IR mais la reperfusion était précédée de deux injections intrapéritonéales de 10mg/kg cyclosporine (Sandimmun®, Novartis-Pharma SAS, Rueil-Malmaison, France) à 90 et 150 minutes d'ischémie.

Comme les techniques de mesure de la capacité de rétention calcique et de la cyclosporinémie nous sont devenues accessibles au cours de la thèse, nous avons également inclus 18 rats Shams supplémentaires : 7 ont été traités par cyclosporine et 11 n'ont eu aucun traitement.

1.4.2. Effets du postconditionnement pharmacologique par cyclosporine chez le rat Wistar rendu diabétique par injection de streptozotocine

Dans le protocole diabète, nous avons inclus 28 rats diabétiques randomisés en 8 rats Contrôle (dCON), 10 rats IR (dIR) et 10 rats IR+CsA (dIR+CsA). Les modalités de

réalisation de l'ischémie et de la reperfusion ainsi que l'administration de cyclosporine étaient strictement identiques à celles du protocole précédent. Nous avons également inclus 18 rats non diabétiques répartis en 8 rats Control (nCON, n=8) et 10 rats IR (nIR, n=10). Il est à noter que la dénomination des groupes non soumis à l'IR est Sham dans le premier protocole et Control dans le deuxième, ceci pour se conformer aux recommandations aux auteurs des revues dans lesquelles ces manuscrits sont soumis.

1.4.3. Effets du postconditionnement pharmacologique par cyclosporine chez le rat Wistar âgé

Dans ce dernier protocole, 16 rats âgés ont été répartis en 2 rats Sham, 7 rats IR soumis au garrotage de la patte gauche pendant 3 heures suivies de 2 heures de reperfusion et 7 rats IR+CsA. L'administration de cyclosporine était ici réalisée par voie intraveineuse (à la dose de 10mg/kg de Sandimmun®) et ceci 10 min avant la reperfusion.

Le protocole des rats âgés se distingue donc des deux précédents à la fois par le modèle d'ischémie appliquée (garrot unilatéral vs. clampage aortique), le mode d'administration de la cyclosporine (intraveineuse vs. intrapéritonéale) et le moment de l'injection (juste avant la reperfusion vs. au cours de l'ischémie).

2. TECHNIQUES

2.1. Protocole d'étude de la respiration mitochondriale

2.1.1. Solutions

Les solutions de pelage (S) et de respiration (R) utilisées reconstituent le contenu en ions intracellulaire de la fibre musculaire. Les solutions S et R ont une base commune : CaK₂EGTA 2,77 mM, K₂EGTA 7,23 mM (100 nM de Ca²⁺ libre), MgCl₂ 6,56 mM (1 mM de Mg²⁺ libre), imidazole 20 mM, taurine 20 mM, dithiothreitol 0,5 mM, K-sulfonate de méthane 50mM (160 mM de force ionique). Le pH des solutions a été ajusté à 7. La solution S contient également : Na₂ATP 5,7 mM et PCr 15 mM. La solution R contient quant à elle : 5 mM de glutamate, 2 mM de malate, 3 mM de phosphate, à laquelle est ajouté 2 mg/ml d'albumine bovin sérique (BSA).

Les mitochondries isolées nécessitent des tampons à pH ajusté à 7,4. Les tampons A (d'homogénéisation) et B (de survie) possèdent une base commune : Tris 50 mM, Sucrose 70 mM, et Mannitol 210 mM. Le tampon A contient également de l'EGTA à 1mM. Le tampon M contient 100 mM de KCl, 50 mM de Mops, 1 mM d'EGTA, 5 mM de Kpi, et 1 mg/ml de BSA.

2.1.2. Préparation des fibres

Après prélèvement musculaire (gastrocnémien ou myocarde ventriculaire gauche), l'échantillon tissulaire (30-50mg) est immédiatement placé dans la solution S à 4°C,

permettant ainsi de maintenir les fibres musculaires dans des conditions physiologiques. Ces fibres sont ensuite disséquées à l'aide de pinces de précision, sous loupe binoculaire. Cette étape est essentielle afin de permettre l'accès de la saponine aux membranes des fibres musculaires. Puis intervient l'étape de perméabilisation, les fibres étant placées dans un tube de solution S + saponine (50 µg/ml) sous agitation durant 30 minutes à 4°C (Kuznetsov *et al.*) [220]. Cette étape permet de détruire sélectivement le sarcolemme sans endommager les membranes mitochondriales, moins riches en cholestérol. Les fibres sont ensuite replacées dans un tube de solution S pendant 10 minutes, toujours sous agitation, afin d'éliminer la saponine. Finalement, elles sont placées dans des tubes contenant de la solution R (2x5 minutes), afin d'éliminer l'ATP, l'ADP et la PCr, tout en maintenant l'homéostasie cellulaire.

2.1.3. Protocole d'étude de la chaîne de respiration mitochondriale

Les analyses se font dans des chambres oxygraphiques thermostatées reliées à un bain-marie à 22,1°C pour les fibres musculaires perméabilisées, et à 25°C pour les mitochondries isolées (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Scotland). Pour mesurer la décroissance de la concentration d'oxygène dans les chambres, des électrodes de Clark sont utilisées, reliées à un logiciel qui analyse les variations de concentration en oxygène (Oxygen 571[®]). Ceci va permettre de calculer la vitesse de consommation d'oxygène pour les différentes chambres, qui constitue le reflet de l'activité de la chaîne de respiration mitochondriale. Différents substrats sont injectés pour activer les différents complexes de la chaîne de respiration mitochondriale :

- Initialement, les fibres musculaires sont placées dans la solution R tandis que les mitochondries isolées sont placées dans le Tampon M, contenant les substrats qui vont générer du NADH, équivalent réducteur qui donne des électrons au complexe I : glutamate (5 mM) et malate (2 mM). La consommation d'oxygène ainsi mesurée correspond à l'activité de base de la chaîne de respiration mitochondriale au travers des complexes I, III et IV (V_0).
- on injecte ensuite de l'ADP (2 mM), permettant une stimulation maximale de la chaîne de respiration mitochondriale à travers de ces complexes I, III et IV (V_{max}). Le rapport V_{max}/V_0 constitue l'ACR (acceptor control ratio) qui permet de quantifier le couplage phosphorylation/oxydation et donc l'efficacité de la phosphorylation oxydative (284).
- l'adjonction d'amytal (0,02 mM) va bloquer le complexe I et entraîner un arrêt du fonctionnement de la chaîne de respiration mitochondriale.
- l'adjonction de succinate (25 mM), substrat qui va générer du FADH₂ grâce à la succinate déshydrogénase, va permettre de stimuler la chaîne respiratoire à partir du complexe II, (activation des complexes II, III et IV (V_{succ})).
- l'adjonction du TMPD (0,5 mM) et de l'ascorbate (0,5 mM) stimule l'activité du complexe IV à son maximum, ce qui permet son étude indépendamment du fonctionnement des autres complexes (V_{TMPD}).

A la fin de la manipulation des muscles squelettiques, les fibres sont récupérées, déshydratées et pesées.

Toutes les vitesses sont exprimées en µmol O₂/min/g de fibres en poids sec.

2.2. Mesure de l'expression musculaire de cyclophiline D par méthode de Western Blot

La quantification de l'expression de cyclophiline D dans le muscle (squelettique et myocardique) a été rendue possible grâce à la collaboration de l'équipe du Pr Michel Ovize (Dr Elise Belaidi, Dr Abdallah Gharib, INSERM U1060, Laboratoire CarMeN, Université Lyon 1, France). Après prélèvements, les muscles ont été rapidement plongés dans l'azote liquide. A partir de ces prélèvements congelés, des lysats cellulaires (100 μ L pour 10mg de tissu) ont été réalisés à partir de tampons contenant : 1% NP-40, 20mM Tris-HCl, 138mM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM MgCl₂, 5% glycerol, 5mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 20mM NaF, 1mM DTT (pH 8), et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Le contenu protéique a été déterminé selon la méthode colorimétrique de Bradford à partir d'albumine sérique de boeuf (BSA) et dans un intervalle de concentrations de 0 à 1500 μ g/mL. Ceci a permis de recueillir une concentration constante de protéines à partir de chaque échantillon. Trente microgrammes d'échantillons protéiques musculaires ont ensuite été séparés par la technique de migration sur champ SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15%) et transférés sur des membranes de nitrocellulose. Après migration, les sites de fixation non spécifiques entre la membrane et les anticorps ont été bloqués par ajout de lait dilué à 5% dans du tampon TBS. Les membranes ont alors été incubées pendant 12 heures à 4°C en présence d'anticorps primaires de souris anti-cyclophiline D (1/4000, Merk chemicals, Nottingham, Royaume Uni) ou d'anticorps de lapin anti-actine (1/1000, Sigma Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France). Les membranes ont ensuite été lavées puis incubées en présence de peroxydase de raifort conjuguée à l'anticorps secondaire approprié (1/25000, Amersham GE Healthcare Europe GmbH, Saclay, France) pendant une heure à température ambiante. La révélation de la chimioluminescence a été réalisée avec le kit ECL (Enhanced ChemiLuminescence Western blot detection kit Amersham, GE Healthcare Europe GmbH, Saclay, France) selon les recommandations du fabricant. Le processus a été répété pour l'actine (protéine de structure servant de contrôle interne). La concentration de cyclophiline D a donc pu être indexée à celle de l'actine, permettant de normaliser les expériences. La densité optique des bandes protéiques a été déterminée grâce au logiciel image J (Image J software, NIH, Bethesda, Maryland, USA).

2.3. Détection des radicaux libres tissulaires

Nous avons utilisé successivement deux méthodes de détection des ROS tissulaires. En effet, l'acquisition d'un appareil de résonance paramagnétique électronique a permis l'utilisation de cette technique qui tend à devenir le gold standard dans le protocole des rats âgés.

2.3.1. Marquage des radicaux libres avec le dihydroéthidium

Des coupes de muscles congelés d'une épaisseur de 10 μ m réalisées au cryostat sont incubées pendant 30 minutes à 37°C avec la DHE (dihydroéthidium ; 2.5 μ M). La DHE produit une fluorescence rouge quand elle est oxydée en éthidium bromide par les ROS (285), essentiellement l'anion superoxyde. Les coupes sont ensuite montées dans du Vectashield® (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). On examine ensuite les coupes sous un

microscope à épifluorescence avec un objectif X20 (Nikon Eclipse E800). L'intensité de fluorescence est quantifiée grâce au logiciel Adobe Photoshop® et la production de radicaux libres exprimée en unité arbitraire de fluorescence.

Pour tenir compte de la réduction drastique des paramètres de respiration mitochondriale chez les animaux diabétiques et en accord avec une publication récente (255), nous avons indexé le stress oxydant quantifié par DHE aux vitesses de respiration mitochondriale.

2.3.2. Détection des ROS totaux par technique de résonance paramagnétique électronique (RPE)

La technique de RPE repose sur un double principe :

1. Il est possible de prolonger la durée de vie des ROS en les associant à une sonde moléculaire qui facilite leur détection
2. Soumis à un champ électromagnétique d'intensité connue et à une radiation micro-onde de fréquence et d'amplitudes connues, un échantillon tissulaire absorbe les radiations de façon proportionnelle à la quantité d'électrons non appariés qu'il contient (286).

Il devient alors possible de quantifier tous les radicaux libres (chacun ayant un spectre d'absorption déterminé) et pas seulement une espèce radicalaire (287).

Après prélèvement musculaire, l'échantillon tissulaire (20-30mg) est immédiatement placé dans la solution de Krebs, permettant ainsi de maintenir les fibres musculaires dans des conditions physiologiques. Ces fibres sont ensuite disséquées et coupées en fragments de 1 à 2 mm³, sous loupe binoculaire à 4°C. Les fragments tissulaires sont finalement rincés deux fois dans la solution de Krebs.

La solution tampon utilisée est du Krebs-Hepes. Il contient : NaCl 99 mM, KCl 4,69 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,03 mM, D(+) Glucose 5,6 mM, Na-Hepes 20 mM. Il a été ajouté à cette solution 25µM de déféroxamine et 5µM de DETC, afin d'éviter une auto-oxydation de la CMH par la solution de Krebs. La CMH (1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetraméthylpyrrolidine HCl) est une sonde moléculaire qui s'oxyde en présence des électrons non appariés des espèces réactives de l'oxygène, sous une forme stable dans le temps. C'est cette CMH oxydée que l'on va ensuite mesurer.

L'incubation du tissu avec la CMH est réalisée dans un incubateur thermo-régulé et sous atmosphère contrôlée (NOXYGEN[®], Allemagne). Les fragments tissulaires sont ainsi placés dans une plaque multi-puits, en présence de Krebs et de CMH (200µM). La plaque est mise à incuber pendant 30 minutes à 37°C, avec comme paramètres atmosphériques : N₂ 97,8%, O₂ 2,2% et +20mmHg de pression pour reproduire la pression partielle d'oxygène présente au niveau tissulaire. La quantification des ROS est réalisée sur un aliquot de 40µL de surnageant par résonance paramagnétique électronique thermorégulé à 15°C (Noxygen[®], Allemagne).

Ainsi, 40µl de surnageant sont prélevés sur la plaque et analysés par résonance paramagnétique électronique. Les paramètres de réglages permettant de détecter la CMH oxydée sont les suivants : center field g = 2, field sweep 60 G, microwave power 60 mW, modulation amplitude 2,48 G, conversion time 10,24 ms, time constant 40,96 ms.

La quantité de CMH oxydée, et donc la production des ROS, est mesurée par l'intensité du signal de résonance recueilli. A la fin de la manipulation, les fragments

tissulaires sont récupérés, déshydratés et pesés. La production des ROS est exprimée en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de fibres en poids sec.

2.4. Mesure de la capacité de rétention calcique (CRC) sur fibres fantomisées

L'IR provoque l'ouverture du mPTP alors qu'en se liant à la cyclophiline D, la cyclosporine inhibe ou le plus souvent retarde l'ouverture de ce pore. Le calcium matriciel est le principal facteur qui déclenche l'ouverture du mPTP. Déterminer la résistance du mPTP à une charge calcique croissante (ou capacité de rétention calcique) permet d'analyser la facilité avec lequel le pore s'ouvre ou au contraire, résiste et retarde les phénomènes de nécrose et d'apoptose.

Nous avons donc soumis les mitochondries de fibres musculaires perméabilisées (1 à 1,5 mg de poids sec) à une charge calcique croissante par ajouts itératifs de calcium (1mM dans 5 μL toutes les 2 min) dans le milieu extracellulaire (tampon CRC contenant Tris-Base 20mM ; saccharose 150mM ; KCl 50mM ; KH_2PO_4 2mM ; succinate 5mM ; EGTA 9mM ; pH 7,4). Un marqueur colorimétrique (le calcium green 1 μM ; excitation-emission, 500–530 nm) permet de quantifier le calcium extramitochondrial dans le milieu. A chaque ajout de calcium dans le milieu, le signal du calcium green augmente de façon abrupte puis décroît. En effet, tant que le mPTP reste fermé, les mitochondries emmagasinent le calcium dans l'espace matriciel permettant le retour des concentrations extra-mitochondriales de calcium à l'état de base. Lorsque le mPTP s'ouvre, les mitochondries relarguent le calcium emmagasiné de façon brutale, provoquant un pic de l'indicateur colorimétrique (Figure 43). La CRC est exprimée en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de poids sec.

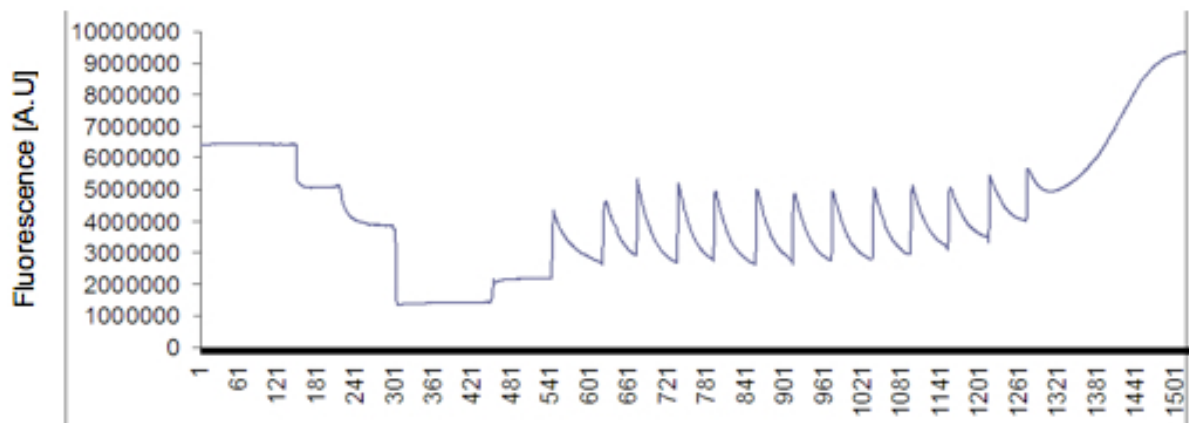


Figure 43 : Exemple du relargage du calcium matriciel par les mitochondries après charge calcique croissante et traduisant l'ouverture du mPTP.

Comme le calcium extra-mitochondrial peut interagir avec le matériel contractile des muscles (filaments de myosine) ainsi qu'avec le réticulum sarcoplasmique, il est nécessaire de fantomiser les muscles pour les en débarrasser. Les fibres ont donc dans un premier temps été perméabilisées à l'aide de la saponine puis lavées dans du tampon S. Ensuite, elles ont été incubées 30 minutes sous agitation à 4°C dans un tampon R+KCl (KCL 800mM ; CaK_2EGTA

2.77mM ; K₂EGTA 7.23mM ; MgCl₂ 1.38mM ; imidazole 20mM ; taurine 20mM ; dithiothreitol 0.5mM ; K-sulfonate de methane 90mM ; Na-sulfonate de methane 10mM ; glutamate 5mM ; malate 2mM ; K₂HPO₄ 3mM ; pH 7) pour extraire la myosine puis lavées trois fois 10 minutes dans du tampon CRC+BSA (Tris-Base 20mM ; saccharose 150mM ; KCl 50mM ; KH₂PO₄ 2mM ; succinate 5mM ; EGTA 9mM ; BSA 2mg/ml ; pH 7.4).

2.5. Mesure des concentrations plasmatiques de cyclosporine

Les concentrations plasmatiques de cyclosporine ont été établies après prélèvement de sang veineux jugulaire interne (protocole 3) ou ponction cardiaque directe (protocoles 1 et 2). La technique est celle de la spectrométrie de masse (HPLC-MS high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry) utilisée en pratique clinique humaine (kit **ONEMINUTE MassTox**®, Chromsystems, Munich, Germany sur un appareil Agilent 6410). Les résultats sont exprimés en µg/mL. La limite de détection est de 5µg/L et la courbe de concentration est linéaire de 25 à 2000µg/L.

3. STATISTIQUES

L'ensemble de l'analyse statistique a été effectué à l'aide des logiciels StatEl® (AdScience, Paris, France) et Prism 5® (GraphPad Software, San Diego, USA). Les moyennes des différents groupes ont été comparées par analyse de variance à une ou deux voies avec un post-test de Newman-Keuls. Les résultats de l'analyse de la respiration mitochondriale des muscles gastrocnémiens des 2 pattes d'un même animal dans le protocole 3 ont été comparés par le test t apparié de Student. Les données ont été rapportées sous forme de moyenne ± erreur standard (SEM). Seuls les résultats avec une valeur de p inférieure à 0,05 ont été considérés comme statistiquement significatifs.

RESULTATS

1. Protocole 1 : Effets de la cyclosporine lors de l'ischémie-reperfusion des membres inférieurs induite par clampage aortique chez des rats jeunes indemnes de pathologie. Annexe 1, page 159

Résumé

But de l'étude : La Cyclosporine A (CsA) réduit la lésion d'ischémie-reperfusion (IR) dans le muscle cardiaque. Le but de cette étude est de contrôler l'hypothèse selon laquelle la CsA réduirait le stress oxydant et la dysfonction mitochondriale dans le muscle squelettique après IR réalisée par clampage aortique.

Matériel et méthode : L'étude a porté sur 45 rats Wistar. Le groupe témoin n'a pas subi d'ischémie (témoin : n=8), le groupe ischémie-reperfusion (IR n=10) a subi un clampage aortique durant 3 heures suivi par 2 heures de reperfusion, et le groupe IR+CsA (n=9) a reçu en plus 20 mg/kg CsA *i.p.* avant la phase de reperfusion. Le couplage mitochondrial (ACR), l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et la production tissulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ont été déterminés dans les muscles gastrocnémiens par coloration au dihydroéthidium ainsi que l'expression musculaire de la cyclophiline D.

Dix-huit rats témoins supplémentaires ont permis de déterminer les taux sanguins de CsA, l'expression de la cyclophiline D et la capacité de rétention calcique (CRC, un marqueur de l'ouverture du pore de transition mitochondrial ou mPTP), à la fois dans le myocarde et le muscle gastrocnémien, avec et sans CsA.

Résultats : Par rapport au témoin, l'IR abaisse le couplage mitochondrial ($1,38 \pm 0,06$ vs. $1,98 \pm 0,20$; $p=0,0092$), augmente la production de ROS (3992 ± 706 vs. 1812 ± 332 A.U ; $p=0,033$) et abaisse la capacité oxydative maximale (V_{\max} : $4,08 \pm 0,38$ vs. $5,98 \pm 0,56$ $\mu\text{MO}_2/\text{min/g}$; $p=0,015$).

Malgré l'IR, le traitement par CsA restaure complètement le couplage mitochondrial ($1,93 \pm 0,12$; $p=0,023$ vs. IR) et normalise les ROS (1569 ± 348 A.U ; $p=0,0098$ vs IR). La V_{\max} est modérément augmentée ($5,02 \pm 0,39$ $\mu\text{MO}_2/\text{min/g}$; $p=0,33$ vs. IR ; $p = 0,35$ vs. témoin).

En comparaison avec le myocarde, le muscle gastrocnémien est caractérisé par un abaissement du contenu en cyclophiline D (-50%) associé à une ouverture plus précoce du mPTP (la CRC est augmentée de $10,85 \pm 1,35$ à $12,11 \pm 2,77$ $\mu\text{M.mg}^{-1}$ de poids sec ; $p=0,65$ et de $11,7 \pm 1,67$ à $37,65 \pm 11,41$ $\mu\text{M.mg}^{-1}$ de poids sec $p=0,0098$ dans les muscles gastrocnémien et cardiaque respectivement).

Conclusion : la CsA normalise la production de ROS durant le clampage aortique et restaure le couplage mitochondrial. La protection incomplète de la V_{\max} pourrait être en rapport avec une expression faible de la cyclophilin D dans le gastrocnémien empêchant la CsA de bloquer l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial.

Mots clés : chirurgie, vasculaire, ischémie-reperfusion, cyclosporine, muscle, mitochondrie espèce réactive de l'oxygène.

Protocole 2 : Effets de la cyclosporine lors de l'ischémie-reperfusion des membres inférieurs induite par clampage aortique chez des rats atteints de diabète de type I. Annexe 2, page 170

Résumé : 250 mots

But/hypothèse : Le diabète de type 1 est associé à une aggravation de l'artériopathie périphérique et la cyclosporine A est capable de protéger la mitochondrie musculaire squelettique de la lésion d'ischémie reperfusion (IR) chez des animaux non diabétiques. Les buts de cette étude ont été : 1)- de déterminer si le diabète aggrave les effets délétères de l'IR en augmentant la dysfonction mitochondriale et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et 2)- de déterminer si la cyclosporine A protège les muscles diabétiques soumis à une IR.

Méthode : Quarante-six rats Wistar ont été étudiés : les rats non diabétiques ont été randomisés en groupe contrôle (nC, n=8) ou groupe IR (3h de clampage aortique suivies par 2h de reperfusion, nIR, n=10). Des rats rendus diabétiques par traitement à la streptozotocine (n=28) ont été randomisés en groupe contrôle (dC, n=8), groupe IR (dIR, n=10) ou groupe IR plus cyclosporine A (dIR+CsA, n=10). La capacité oxydative maximale (V_{max}) et la contribution relative des complexes de la chaîne respiratoire I, II, III (V_{succ}) et IV (V_{TMPD}), ainsi que la production de ROS en utilisant la coloration par dihydroéthidium, ont été déterminées dans le muscle gastrocnémiens.

Résultats : Sans IR, V_{max} (-48±9%), V_{succ} (-51±9%) et V_{TMPD} (-49±6%) ont été abaissées et la production normalisée de ROS était augmentée, chez les rats traités par la streptozotocine en comparaison avec ceux traités par le vecteur ($p<0,05$). L'IR abaisse la respiration mitochondriale dans les deux groupes. Cependant en comparaison avec les contrôles non ischémiés, l'abaissement de V_{max} (-57±14% vs. -23±7%) et de V_{succ} (-60±7% vs. -11±6%) ainsi que l'augmentation de la production de ROS étaient plus importantes chez les rats traités par la streptozotocine que par ceux traités par le vecteur ($p<0,05$). La cyclosporine A n'a pas été capable de restaurer ni V_{max} ni V_{succ} , ni d'abaisser les ROS chez les rats traités par la streptozotocine soumis à l'IR.

Conclusion/Interprétation : Dans le muscle gastrocnémien de rat, le diabète de type 1 provoque une dysfonction mitochondriale et une surproduction de ROS, exacerbées après ischémie reperfusion et non corrigées par la cyclosporine A

Mots-clés : Diabète, ischémie, reperfusion, streptozotocine, mitochondrie, muscle squelettique.

Protocole 3 : Effets de la cyclosporine lors de l'ischémie-reperfusion d'un membre inférieur induite par application d'un garrot chez des rats âgés Annexe 3, page 196

Résumé :

But : Les muscles squelettiques des patients âgés sont sensibles aux lésions d'ischémie reperfusion (IR) après pose d'un garrot. Le but de cette étude est de tester l'hypothèse qu'un post-conditionnement pharmacologique par la cyclosporine A (CsA) pourrait protéger le muscle squelettique sénescant de la dysfonction mitochondriale et du stress oxydant induits par l'IR.

Méthode : Seize rats Wistar mâles sénescants (71-73 semaines) ont été randomisés en groupe contrôle (anesthésie générale 5h), groupe IR (3h de garrot sur la patte arrière gauche puis 2 h de reperfusion) ou groupe CsA+IR (10mg/kg de cyclosporine IV avant la reperfusion). La capacité oxydative maximale (V_{max}), l'acceptor control ratio (ACR) et les contributions relatives des complexes I, II, III (V_{succ}) et IV (V_{TMPD}) de la chaîne respiratoire, ainsi que la capacité de rétention du calcium (CRC) et la production tissulaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS), ont été déterminés dans les muscles gastrocnémiens des deux pattes. Nous avons également mesuré la concentration sanguine de CsA et la production mitochondriale de ROS.

Résultats : En comparaison avec la patte arrière non ischémisée l'IR de la patte arrière gauche induit une baisse significative de V_{max} , ACR, V_{succ} et CRC, non corrigée par la CsA. Au contraire, la CsA augmente la production de ROS à la fois localement et dans le myocarde.

Conclusion : Chez les rats sénescants le post-conditionnement pharmacologique par cyclosporine A s'avère incapable de protéger le muscle squelettique de la lésion d'IR consécutive à la pose d'un garrot mais exacerbe le stress oxydant.

DISCUSSION GENERALE

1. ISCHEMIE-REPERFUSION DES MEMBRES INFERIEURS ET CONDITIONNEMENTS ISCHEMIQUES

1.1 Pertinence du modèle expérimental

1.1.1. Ischémie-reperfusion bilatérale des membres inférieurs par clampage aortique

A la lumière de travaux effectués sur du tissu squelettique humain et soumis à différentes durées d'hypoxie et de réoxygénation (1,2,139,208), notre modèle de clampage aortique apparaît cliniquement pertinent. En effet, dans ce contexte, l'association de 3 heures d'ischémie et de 2 heures de reperfusion aboutit à une perte de viabilité de 50% des cellules myocytaires. C'est cette association de 3h d'ischémie et de 2h de reperfusion qu'ont choisi d'utiliser Martou *et al.* ainsi que de nombreuses équipes (dont la nôtre) pour mettre en évidence un effet protecteur des pré- et postconditionnements. Ce temps d'ischémie critique au-delà duquel le pool d'ATP est consommé et apparaissent des lésions musculaires se situe dans des marges comparables chez le chien (205,210) et le rat (207,212). Une durée de 3h dépasse la plupart des durées de clampage vasculaire pratiquées habituellement en chirurgie vasculaire, plastique ou orthopédique. Néanmoins, à la durée prévisible de clampage vasculaire peuvent s'ajouter des périodes de « no flow » ou de « low flow » dues à des complications précoces (vasospasme, thrombose aiguë). D'autre part, certaines techniques chirurgicales (chirurgie vasculaire assistée par robot, réimplantation de membre) imposent des durées d'ischémie qui peuvent dépasser les 3 heures.

En chirurgie vasculaire lourde, un délai de deux heures après déclampage aortique coïncide habituellement avec l'admission du patient en salle de surveillance post-interventionnelle ou en réanimation. C'est également le moment où les complications vitales du syndrome de reperfusion apparaissent (insuffisance rénale aiguë sur rhabdomyolyse, hyperkaliémie (209,213), syndrome de détresse respiratoire). C'est enfin une période particulièrement cruciale pour la mise en oeuvre d'une optimisation hémodynamique précoce destinée à améliorer la perfusion d'organes et le pronostic de ces patients à haut risque chirurgical (211,288).

1.1.2. Ischémie-reperfusion unilatérale d'un membre par garrotage de la patte

La technique du garrot est utilisée de façon régulière en chirurgie orthopédique. A titre d'exemple, une intervention aussi courante que la prothèse totale de genou, intervention pratiquée plus de 60 000 fois au Royaume Uni en 2010 (289) nécessite l'application d'un garrot à la racine de la cuisse. Bien que les durées recommandées ne doivent pas dépasser 60 à 90 minutes, certaines interventions nécessitent des mises place prolongées, notamment en cas de complication hémorragique.(290). Nous avons donc de façon intentionnelle, choisi une durée d'application du garrot de 3 heures et une reperfusion de 2 heures, reproduisant ainsi les

durées pratiquées dans le modèle de clampage aortique. Dans ces conditions, nous avons déjà observé dans l'équipe une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale (282). D'autres auteurs ont également mis en évidence une production accrue de ROS (290) dans les muscles gastrocnémiens chez le rat ainsi qu'une augmentation des marqueurs inflammatoires myocytaires et plasmatiques après deux heures de reperfusion chez l'homme (291).

Le garrot présente l'avantage de pouvoir utiliser la patte controlatérale (282) (non ischémique) comme contrôle, limitant ainsi le nombre d'animaux sacrifiés. L'inconvénient du garrot concerne cependant la non spécificité des lésions induites car en plus des lésions musculaires par obstruction artérielle s'ajoutent l'abolition du drainage veineux et la compression d'autres structures notamment nerveuses (292).

1.1.3. Lésions locales

En ce qui concerne les atteintes locales, nous avons pu établir que l'association de 3h d'ischémie et de 2h de reperfusion (I3R2) provoque de façon reproductible, une diminution de 30% de la capacité oxydative maximale (V_{Max}) du muscle gastrocnémien ainsi qu'une majoration du stress oxydant musculaire.

Il existe un lien entre l'atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale, le découplage, l'augmentation des ROS et l'ouverture du mPTP. En effet, lorsque la chaîne respiratoire mitochondriale est atteinte au niveau de l'un de ces complexes, le couplage entre la consommation d'oxygène et la production d'ATP diminue, plus d'électrons fuient et rejoignent les sites de production des ROS au niveau du complexe I et du complexe III (293).

La réaction inflammatoire consécutive à la reperfusion va également contribuer à pérenniser les lésions musculaires locales. Alors que la reperfusion d'un membre ischémié restaure l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules en souffrance, elle va également engendrer une réaction inflammatoire intense impliquant des médiateurs humoraux, cellulaires ainsi qu'une production majeure de ROS (5,294). Recrutés *in situ* par des molécules d'adhésion, les polynucléaires activés vont avoir un rôle d'amplification de la réponse inflammatoire ainsi qu'un effet cytotoxique au niveau des cellules musculaires ischémiées (par l'intermédiaire de l'anion superoxyde (12,220)) mais également au niveau des organes distants. La cytotoxicité s'exerce notamment par l'action de la myéloperoxydase, protéine lysosomale stockée dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles (22,222,288), qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène et du chlore en acide hypochloreux (HOCl).

1.2 Conditionnement ischémique.

Les résultats obtenus précédemment dans les travaux qui ont motivé la réalisation de cette thèse montrent bien que le pré-conditionnement ischémique est protecteur et fait intéressant, qu'il protège de façon équivalente les 2 pattes ischémiées, que ce pré-conditionnement soit réalisé localement ou à distance (18) Annexe 1. En effet, le préconditionnement ischémique (local et à distance) restaure la respiration mitochondriale au niveau des complexes I, II, III et IV et rétablit la balance pro/anti-apoptotique. Cette donnée

est originale pour le muscle squelettique et elle n'était jusqu'à présent rapportée qu'au niveau cardiaque.

Autre fait nouveau, avec le Dr Ziad Mansour, nous avons montré chez la souris qu'un post-conditionnement ischémique, aussi bien local qu'à distance, peut être délétère (20) Annexe 2. En effet, celui ci aggrave l'atteinte musculaire mitochondriale (réduction supplémentaire de la V_{Max} par rapport à l'IR seule), augmente le degré de stress oxydant (augmentation de la fluorescence DHE) et d'inflammation (augmentation de l'infiltration macrophagique). Cet élément nouveau laisse à penser que l'application clinique du post-conditionnement ischémique n'est pas aussi simple que ce que les premiers résultats expérimentaux laissaient espérer. Ces résultats inattendus nous ont incité à travailler dans la direction du conditionnement pharmacologique.

C'est ce conditionnement pharmacologique, par la cyclosporine, que nous allons aborder maintenant au cours de la discussion générale.

2. CYCLOSPORINE ET ISCHEMIE-REPERFUSION DES MEMBRES INFERIEURS

Les limites que nous avons évoquées dans le cadre de l'emploi du conditionnement ischémique nous ont amené à étudier un conditionnement pharmacologique.

En effet, outre sa facilité d'emploi, le conditionnement pharmacologique pourrait permettre d'agir tout à fait en distalité des cascades de signalisation intra-cellulaires et limiter largement les effets délétères de l'ischémie-reperfusion.

La cyclosporine semble être à ce titre un excellent candidat. En effet, la cyclosporine de par sa liaison à la CyD, devrait permettre de réduire la probabilité d'ouverture du port de transition mitochondrial, limitant ainsi le passage en apoptose de la cellule.

Nous avons donc décidé d'utiliser la cyclosporine dans 3 types de circonstances : chez le rat normal, chez qui la cyclosporine devrait être efficace, et chez des rats caractérisés par des facteurs limitant classiquement les effets protecteurs du conditionnement, qu'il soit ischémique ou pharmacologique. Il s'agit d'une part de rats diabétiques de type 1 et d'autre part de rats âgés.

2.1 Conditionnement pharmacologique par cyclosporine chez l'animal indemne de pathologie

Chez les animaux sains, l'administration intrapéritonéale de cyclosporine à la dose de 20mg/kg en deux injections successives pendant la phase d'ischémie ne procure qu'une protection partielle avec une normalisation du couplage de la phosphorylation oxydative et une diminution des ROS mais sans restitution de la capacité oxydative maximale.

Ces résultats doivent être discutés à la lumière des propriétés pharmacologiques de la cyclosporine, de son interaction avec la cyclophiline D et enfin de ses actions sur la chaîne respiratoire mitochondriale et le stress oxydant.

2.1.1. Dose, voie d'administration et effets pharmacologiques de la CsA

Les données publiées sur la cyclosporine A administrée en pré ou en postconditionnement sont disparates. Les voies d'administration, les formes galéniques ainsi que les doses sont variables. Nous avons choisi d'utiliser ici la voie intrapéritonéale qui est facile d'accès lors de la chirurgie aortique mais dont la biodisponibilité pourrait être plus aléatoire que la voie intraveineuse. Les dosages plasmatiques que nous avons réalisé indiquent finalement que cette voie permet d'obtenir des concentrations stables et reproductibles d'un animal à l'autre avec des concentrations plasmatiques proches de celles qui confèrent une protection myocardique chez l'homme (12,295).

La voie intraveineuse procure la meilleure biodisponibilité et des taux plasmatiques d'emblée élevés dès les premières secondes de la reperfusion. C'est la voie choisie par de nombreuses équipes qui travaillent sur le gros animal (22,288,296). Néanmoins, l'administration rapide de cyclosporine A expose au risque de réaction d'histaminolibération non spécifique et d'anaphylaxie (297,298) avec des conséquences hémodynamiques potentiellement délétères au moment où intervient la reperfusion des membres ischémiés. En pratique clinique d'immunosuppression, la cyclosporine est administrée sur une durée de 2 à 6 heures et sous strict contrôle de la pression artérielle.

Utilisant la même préparation de cyclosporine (Sandimmun®), Sullivan *et al.* ont élégamment établi que la dose qui conférait la protection maximale dans un modèle de traumatisme crânien chez le rat était de 20mg/kg par voie intrapéritonéale (297,298).

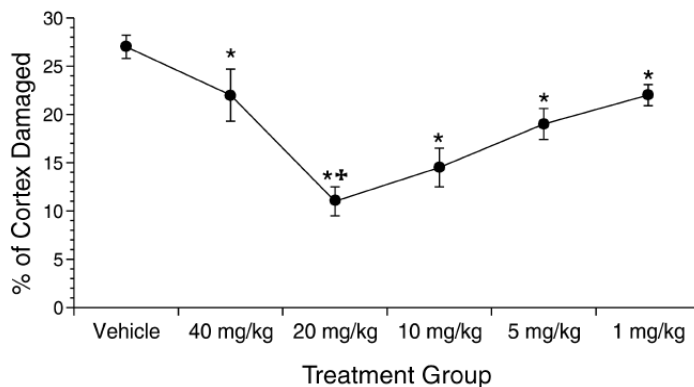


Figure 44 : Courbe concentration-effet de la cyclosporine administrée par voie intrapéritonéale chez le rat. D'après Sullivan *et al.* (298-300).

Par ailleurs, Léger *et al.* ont montré qu'une administration intrapéritonéale de 20mg/kg de Sandimmun® chez le rat limite les conséquences d'une ischémie cérébrale focale par occlusion de l'artère sylvienne (301,302).

2.1.2. Fenêtre thérapeutique temporelle

Dans leur modèle de traumatisme crânien chez le rat, Sullivan *et al.* ont également déterminé le moment d'administration le plus propice pour obtenir la protection la plus efficace. Les résultats démontrent que l'effet maximal est obtenu lorsque l'administration a lieu précocement (15 min après le traumatisme). La protection obtenue par ce « post-conditionnement » est aussi efficace que celle conférée par une administration pré-traumatique de la cyclosporine (303,304). Dans le premier protocole, nous avons pris le parti d'une administration intrapéritonéale pendant la phase d'ischémie, ce qui, *stricto sensu*, correspondrait à un perconditionnement. Mais nous pensons que le terme de postconditionnement est adapté puisque notre volonté était d'obtenir des concentrations plasmatiques élevées au moment de la reperfusion probablement garantes d'une efficacité du postconditionnement pharmacologique. Or les propriétés pharmacocinétiques de la cyclosporine intrapéritonéale nous ont imposé ce schéma d'administration pour obtenir des concentrations plasmatiques efficaces à la reperfusion (305).

Au total, les concentrations plasmatiques de CsA étaient *a priori* efficaces, (3470±174ng/mL) à la fin de la reperfusion. Ces concentrations sont proches de celles mesurées par Piot *et al.* après administration de 2,5mg/kg de cyclosporine au moment de la

revascularisation myocardique chez des patients souffrant de syndrome coronarien aigu (3000ng/mL)(12,15) et qui réduisaient la taille de l'infarctus myocardique.

D'autres hypothèses doivent donc être évoquées pour expliquer le caractère partiel de la protection. Mais auparavant nous discuterons des effets bénéfiques de la CsA.

2.1.3. La CsA restaure le couplage mitochondrial et diminue le stress oxydant

Les effets de la CsA sur le couplage mitochondrial sont peu décrits. Dans le monde végétal, les travaux de Vianello *et al.* ont montré que la CsA, à la concentration de 0,2µM, améliore le couplage mitochondrial sur la tige de pois (306). Dans notre protocole, le conditionnement pharmacologique par CsA produit deux effets simultanés : l'amélioration du couplage mitochondrial et la réduction de la production de ROS. Il est difficile de déterminer quel est l'élément initiateur. On peut en effet imaginer deux *scenarii*. Dans le premier cas de figure, la cyclosporine restaure le couplage mitochondrial, occasionnant une moindre fuite d'électrons et donc une réduction du stress oxydant. Dans le deuxième, la cyclosporine diminue le stress oxydant et donc les dommages infligés à la chaîne respiratoire mitochondriale et améliore ainsi le couplage phosphorylation oxydation.

Il faut néanmoins également garder à l'esprit que la CsA, dans certaines circonstances (dont l'âge avancé que nous avons exploré dans le troisième protocole), est aussi capable de majorer le stress oxydant.

2.1.4. La CsA ne protège que partiellement l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale

Bien que nous ayons observé une restauration du couplage mitochondrial avec la CsA, cette dernière n'a pas permis une restitution *ad integrum* du fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Quatre mécanismes pourraient permettre d'expliquer le caractère partiel de cette protection : l'effet délétère du cremophor *per se*, une non stimulation des facteurs d'adaptation à l'hypoxie, une quantité restreinte de CyD dans le muscle squelettique et la mise en jeu –au cours de l'IR- d'une autre voie de signalisation peu affectée par la CsA avec pour conséquences une correction du stress oxydant mais pas d'effet sur l'inflammation.

2.1.4.1 Effets du cremophor EL

Alors que les données animales initiales et les résultats des études humaines sont en faveur d'un effet bénéfique du postconditionnement pharmacologique par la cyclosporine, certains résultats récents tempèrent cet enthousiasme, y compris chez l'animal indemne de pathologie. Les déceptions proviennent de la cyclosporine elle-même ainsi que de son vecteur dans la forme galénique actuellement disponible. Ainsi, **l'émulsion lipidique du cremophor EL qui sert d'excipient à la formulation intraveineuse de la cyclosporine (Sandimmun®) peut, à forte concentration, exercer un effet dépressur sur le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale** sans modifier le couplage phosphorylation/oxydation (9,213). Par ailleurs, dans un modèle porcin d'ischémie-reperfusion myocardique, Karlsson *et al.* ont

mis en évidence une absence de réduction de la surface infarctée et une augmentation de l'expression de facteurs de transcription pro-apoptotique dans la zone entourant le territoire infarcté chez les animaux traités par cyclosporine (10mg/kg i.v.) (220,288,307). Il semble également exister une interaction entre le mode d'anesthésie utilisé et l'expression de facteurs pro-apoptotiques : en effet, c'est uniquement lorsque les porcs sont anesthésiés par isoflurane que la cyclosporine provoque une augmentation des facteurs de transcription pro-apoptotiques. Ce dernier résultat peut apparaître paradoxal, eu égard aux potentialités conditionnantes propres des agents halogénés.

Il paraît alors intéressant de s'intéresser à d'autres formulations de cyclosporine et de comparer l'efficacité de la cyclosporine et d'analogues synthétiques

Bien que dénué d'effet immunosuppresseur, le NIM811, analogue synthétique de la cyclosporine, procure la même protection myocardique que la cyclosporine lorsqu'il est utilisé en pré- et en postconditionnement pharmacologique (221,297,308). L'effet est lié à une fixation plus spécifique sur la cyclophiline D qui inhibe l'ouverture du pore de transition mitochondrial qui devient plus résistant à une charge calcique croissante. Administré en postconditionnement, le NIM811 était même plus puissant que la cyclosporine pour empêcher l'ouverture du pore de transition mitochondrial puisque la charge calcique requise pour l'ouverture était plus importante (Figure 45). Les hypothèses évoquées concernent la meilleure spécificité du NIM811 pour la cyclophiline D et d'éventuels effets indésirables médiés par la fixation de la cyclosporine A à la cyclophiline A cytosolique et donc à l'inhibition de la voie de la calcineurine (309,310).

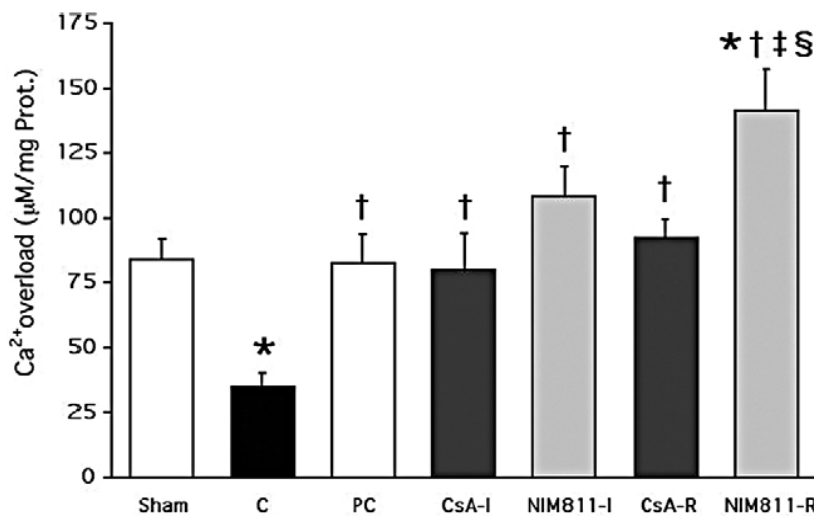


Figure 45 : Charge calcique requise pour provoquer l'ouverture du mPTP myocardique en absence d'IR (Sham), lors d'une IR seule (C), en situation de preconditionnement ischémique (PC), d'administration de cyclosporine en pré-(CsA-I) ou en postconditionnement (CsA-R) et lorsque l'analogue synthétique de la cyclosporine NIM811 est administré en pré- (NIM811-I) ou en postconditionnement (NIM811-R). * : p<0,01 vs Sham ; † : p<0,05 vs C ; § : p<0,005 vs CsA-R. D'après Argaud *et al.* En situation de postconditionnement, le NIM811 est plus puissant que la cyclosporine (2,308).

2.1.4.2. Absence de stimulation des facteurs d'adaptation à l'hypoxie

En situation d'ischémie-reperfusion, la cyclosporine A pourrait phosphoryler et donc déstabiliser HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1 α), empêchant *de facto* un

mécanisme majeur d'adaptation à l'hypoxie (5,311). Comme la cyclosporine se lie de façon non spécifique à toutes les cyclophilines, elle inhibe également la protection passant par la voie de la calcineurine. Dans un modèle d'ischémie-reperfusion des membres inférieurs ainsi que dans un modèle cellulaire de myocytes en culture, Guo *et al.* ont observé que les préconditionnements ischémique et hypoxique majoraient l'expression de la calcineurine (5,310). Dans leur modèle, l'administration de cyclosporine A abolissait d'une part la surexpression de calcineurine et d'autre part l'effet protecteur des préconditionnements non pharmacologiques étudiés. La mise au point d'analogues de la cyclosporine possédant une plus grande spécificité pour la cyclophiline D pourrait permettre d'inhiber de façon sélective l'ouverture du mPTP sans empêcher les mécanismes protecteurs qui empruntent la voie de la calcineurine (294,312).

2.1.4.3. Quantité restreinte de CyD dans le muscle squelettique

Parmi les composants du pore de transition mitochondrial, la cyclophiline D est le seul élément dont les études récentes ont montré le rôle régulateur majeur (10,223,313). Alors que des animaux totalement déficients en cyclophiline D (CyP-D *-/-*) sont partiellement protégés des lésions d'ischémie-reperfusion, la **cyclophiline semble paradoxalement indispensable à la mise en jeu des mécanismes de postconditionnement ischémique et pharmacologique** (314,315). En effet, chez des souris CyP-D^{-/-}, ni le pré-, ni le postconditionnement ischémique ne permettaient de réduire la taille de l'infarctus et l'injection intraveineuse de 10mg/kg de cyclosporine ne restaurait pas de protection. A l'inverse, dans des muscles dénervés qui surexpriment la cyclophiline D, l'effet inhibiteur de la cyclosporine sur l'ouverture du mPTP est fortement majoré (316-318). La cyclophiline D semble donc être indispensable à l'effet protecteur de la cyclosporine A. Comme le mPTP constitue un effecteur très distal de la chaîne de protection, le cibler spécifiquement représente théoriquement une piste thérapeutique prometteuse puisque très en aval de tous les mécanismes protecteurs connus jusqu'alors. Il permet de fait de « court-circuiter » les voies de protection RISK et SAFE habituellement mises en jeu dans les mécanismes de pré- et de postconditionnement ischémiques. Dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le lapin, Argaud *et al.* ont en effet mis en perspective l'inhibition de l'ouverture du pore de transition mitochondrial (résistant à une charge calcique très importante) et la diminution des lésions cellulaires apoptotique ou nécrotique (220,221).

2.1.4.4. Persistance d'un état inflammatoire insuffisamment modulé par la CsA

Bien que largement impliqué dans les effets délétères de l'IR, le **stress oxydant ne semble pas expliquer à lui seul les atteintes musculaires observées**. En effet, au cours de ce travail, il y a normalisation de la production de RLO malgré l'IR mais la protection mitochondriale n'est que partielle. Une implication de l'inflammation, non modulée suffisamment par la CsA, pourrait aussi participer au caractère limité de la protection musculaire. En effet, les inhibiteurs des calcineurines (CsA et FK 506) inhibent l'activation de NF- κ B médiée par le calcium dans des lymphocytes T de la lignée Jurkat (319). Ceci a également été mis en évidence dans le contexte de l'hypoxie-réoxygénation pulmonaire dans des cellules endothéliales humaines (320). Mais l'action anti-inflammatoire de la cyclosporine n'est pas aussi univoque, notamment dans l'IR musculaire. En effet, la calcineurine est impliquée dans les mécanismes protecteurs du postconditionnement ischémique (310). En se liant à la cyclophiline A cytosolique, la CsA inhibe la calcineurine, inhibant ainsi de nombreux mécanismes protecteurs mis en jeu lors du postconditionnement ischémique.

Lorsque Guo *et al.* administrent de la CsA à des rats soumis à un postconditionnement ischémique musculaire, ils observent une disparition des effets anti-inflammatoires du postconditionnement avec une augmentation du rapport poids humide/poids sec (traduisant l'œdème cellulaire) et une augmentation de la libération de LDH dans le plasma (reflet de la lyse membranaire).

2.2. Facteurs pouvant limiter l'efficacité de la cyclosporine : diabète et âge.

2.2.1. Conditionnement pharmacologique par cyclosporine chez l'animal diabétique

Les animaux rendus diabétiques par injection de streptozotocine inclus dans notre protocole présentaient les stigmates d'un diabète de type 1 sévère associant hyperglycémie, polyurie, polydipsie, perte de poids et hypertension artérielle. Chez ces animaux et en dehors de tout stress ischémique, les muscles gastrocnémiens présentaient de profondes altérations fonctionnelles, marquées par une diminution de toutes les vitesses des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi qu'une augmentation de la production de ROS indexée à la respiration mitochondriale.

Ces données d'atteintes musculaires mitochondriales lors du diabète sont classiques, par contre il est beaucoup moins connu, et a fortiori du moins prouvé, que le diabète majore les effets délétères de l'ischémie-reperfusion au niveau mitochondrial musculaire. De même, l'implication du stress oxydant dans cette majoration d'anomalies, restait à démontrer.

Enfin, s'il est établi que des facteurs tels que l'âge, l'HTA, l'augmentation du stress oxydant, le diabète, sont capable de limiter les effets du pré et du post-conditionnement ischémique, il reste à déterminer si ces facteurs limitants jouent un rôle analogue dans le cadre d'un conditionnement pharmacologique par la cyclosporine reste à déterminer. C'est l'objet des 2 travaux que nous allons présenter maintenant.

2.2.1.1. Le diabète majore les effets délétères de l'ischémie-reperfusion au niveau mitochondrial musculaire.

Les complications musculaires après IR chez le diabétique impliquent pour une large part des anomalies vasculaires caractérisées par un tonus vasoconstricteur plus intense, un stress oxydant et une inflammation endothéliale majorés (267) mais également des anomalies du muscle strié squelettique lui-même. En effet, les études menées sur les muscles de sujets diabétiques retrouvent une atrophie importante (146,244), une capillarisation réduite ainsi qu'une réduction des enzymes du métabolisme oxydatif (268), impliquant la mitochondrie au premier chef (146,256,261). Même si le contrôle glycémique permet de limiter la progression des lésions microangiopathiques chez le patient diabétique, il ne réduit malheureusement ni la mortalité ni la morbidité cardiovasculaires après infarctus du myocarde ou revascularisation des membres inférieurs (269,270).

Le stress oxydant joue très probablement un rôle majeur dans l'induction des lésions de reperfusion après ischémie musculaire prolongée. Ainsi Yang *et al.* ont-ils pu démontrer que le stress oxydant contribuait de façon majeure à l'exacerbation de la taille de l'infarctus chez des souris soumises à une hyperglycémie aiguë (249). Les auteurs ont également

retrouvé une corrélation entre la taille de l'infarctus et les concentrations plasmatiques de malondialdéhyde.

Lorsque ces souris diabétiques étaient soumises à une IR des membres inférieurs par clampage et déclampage aortiques, l'atteinte respiratoire mitochondriale était plus sévère et la production de radicaux libres plus importante que chez des animaux sains soumis au même stress.

Nos résultats sont originaux dans le sens où l'aggravation des lésions d'ischémie-reperfusion musculaires chez des animaux diabétiques n'a pas été publiée jusqu'alors.

2.2.1.2. La CsA agit en aval des mécanismes défailants chez l'animal diabétique : est elle efficace ?

Comme les voies de protection RISK et SAFE sont défailantes en cas de diabète, nous pensions, comme d'autres (321), qu'une action pharmacologique en aval de GSK-3 β pourrait protéger le muscle squelettique des lésions d'IR chez le rat diabétique. Cependant, l'administration intrapéritonéale de cyclosporine, si elle permettait d'obtenir des concentrations plasmatiques du médicament plus élevées que chez l'animal sain, ne permettait ni de normaliser les paramètres de la chaîne respiratoire mitochondriale ni de réduire le stress oxydant local.

Nous n'avons pas confirmé l'hypothèse que la CsA protège le muscle diabétique contre les effets délétères de l'ischémie-reperfusion. Ceci pourrait être lié aux propriétés pharmacocinétiques de la cyclosporine i.p., à une moindre expression de cyclophiline D dans le muscle strié diabétique ou à une moindre sensibilité du mPTP à la CsA dans le muscle strié squelettique.

- Une étude pharmacocinétique de la cyclosporine administrée par voie intraveineuse chez le chien diabétique (streptozotocine+alloxan) montre que la clairance de la cyclosporine A est multipliée par deux et que sa demi-vie biologique est réduite de moitié par rapport aux animaux sains (322). Ainsi, nous avons observé des concentrations plasmatiques plus élevées chez les animaux diabétiques par rapport aux animaux sains à la fin de la reperfusion (5537 ± 642 vs. 3471 ± 390 ng/mL ; $p < 0.01$). Il est imaginable que ces concentrations dépassent trop largement l'intervalle posologique dans lequel une protection est envisageable et que ne persistent que les effets indésirables potentiels de la CsA, notamment un stress oxydant majoré (323) et une inhibition de la protection conférée par la voie de la calcineurine (310). Cependant, le marquage DHE sur les biopsies musculaires ne montre pas une augmentation de la production musculaire d'anion superoxyde dans le groupe des animaux diabétiques traités par cyclosporine A et bien que d'autres évaluations du degré de stress oxydant pourraient être utiles, ce résultat n'est pas en faveur d'une production majeure de stress oxydant chez nos animaux traités par CsA.
- Dans ce contexte il sera intéressant d'étudier la sensibilité du mPTP au calcium et l'expression de la cyclophiline D dans le muscle strié diabétique. En effet, comme nous l'avons déjà évoqué, le pore de transition mitochondrial musculaire subit d'importantes modifications chez l'animal traité par STZ. On peut en particulier observer une réponse plus explosive après stimulation par

charge calcique croissante (259) et une oxydation plus importante de l'adénine nucléotide translocase (ANT, composant du mPTP) qui rend le mPTP plus sensible à l'ouverture provoquée par les ROS (258).

Il n'y a pas, à notre connaissance, de données concernant l'expression de la cyclophiline D dans le muscle strié diabétique mais on peut envisager que, comme chez l'animal sain, une accentuation de la réduction de CyD induite par le diabète pourrait participer à l'absence de protection induite par la CsA.

2.2.1.3 Est-il possible d'améliorer les effets bénéfiques du conditionnement en cas de diabète ?

➤ *Restauration de l'euglycémie*

La restauration de l'euglycémie à l'aide d'une perfusion d'insuline semble une stratégie thérapeutique prometteuse pour reproduire les effets bénéfiques du postconditionnement chez les animaux diabétiques. Dans un modèle murin de diabète de type 1, Przyklenk *et al.* ont pu restaurer un état d'insulinémie normale et d'euglycémie par greffe d'îlots de Langerhans chez des souris auparavant traitées par streptozotocine (STZ) (272). Chez ces souris greffées et par rapport aux souris STZ, la phosphorylation de ERK1/2 était rétablie tout comme l'effet protecteur myocardique du postconditionnement ischémique.

Le glibenclamide (Daonil®), sulfamide hypoglycémiant est une sulfonylurée de deuxième génération qui diminue la glycémie de façon aiguë par stimulation de la libération d'insuline par le pancréas, cet effet étant dépendant de la présence de cellules β actives dans les îlots pancréatiques. Le glibenclamide est un inhibiteur non spécifique du canal mK_{ATP} et inhibe l'effet protecteur myocardique du préconditionnement et du postconditionnement. Le glimepiride (Amarel®) est une sulfonylurée plus récente qui ne bloque pas le pré- et le postconditionnement ischémique myocardique. Elle pourrait même exercer un effet de conditionnement pharmacologique par l'activation de la voie Pi3K/Akt. La part prépondérante de la normalisation glycémique par rapport à une inhibition partielle du canal mK_{ATP} pourrait expliquer cet effet bénéfique (321).

Les effets de la metformine sur le pré- et le postconditionnement restent controversés. Les thiazolidinediones (pioglitazone et rosiglitazone) agissent en réduisant l'insulinorésistance. Elles sont des agonistes sélectifs des récepteurs nucléaires PPAR γ induisant une sensibilité accrue à l'insuline au niveau du foie, du muscle squelettique et du tissu adipeux. Elles pourraient exercer un rôle de préconditionnement pharmacologique sur le myocarde (324). Elles ont cependant été retirées de la pharmacopée en 2010 du fait d'un risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaires accru.

Les incrétines regroupent les agonistes des récepteurs du glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et les inhibiteurs de la dégradation du GLP-1 par l'intermédiaire de l'inhibition de la dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV). L'exénatide (Byetta®) par exemple, est un agoniste du GLP-1 qui augmente de façon glucose-dépendante la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques et diminue la synthèse de glucagon par les cellules α . La sitagliptine (Januvia®, Xelvia®) inhibe elle la DPP-IV et augmente les concentrations plasmatiques de GLP-1. Huisamen *et al.* ont récemment démontré qu'un traitement chronique par inhibiteurs de DPP-

IV était en mesure de réduire la taille de l'infarctus après ischémie-reperfusion myocardique chez le rat pré-diabétique (325).

Néanmoins, la restauration d'une euglycémie par apport d'insuline exogène ne procure pas systématiquement les effets protecteurs du postconditionnement. A cet égard, Drenger *et al.* ont observé l'inefficacité du postconditionnement ischémique et pharmacologique par sévoflurane chez des rats diabétiques (streptozotocine) dont la glycémie avait été corrigée par injections itératives d'insuline NPH avec un objectif de glycémie < 135mg/dL (326). De plus, les animaux diabétiques traités par insuline et soumis à une ischémie myocardique présentaient une zone myocardique infarctée plus étendue (Figure 51).

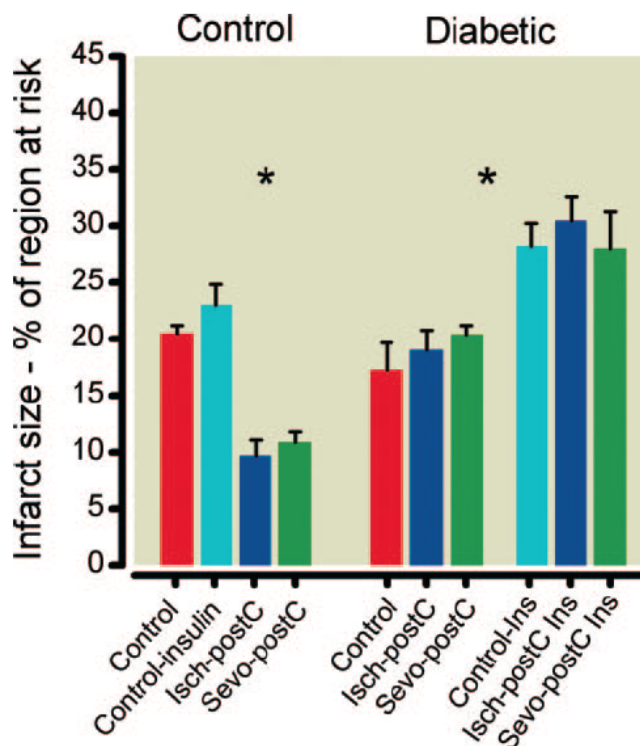


Figure 46 : Taille de l'infarctus (en % de l'aire à risque) chez des animaux sains ou diabétiques soumis au postconditionnement ischémique (Isch-postC), pharmacologique (Sevo-postC) et traités ou non par insuline. Les animaux diabétiques traités par insuline présentaient une aire infarctée plus importante que les animaux non traités. D'après Drenger *et al.* (326)

La différence d'effet observée entre les deux études pourrait être liée à la durée de l'hyperglycémie : courte dans l'étude de Przyklenk (2 semaines) et plus prolongée dans l'étude de Drenger (4 à 5 semaines). Il est possible que l'hyperglycémie prolongée induise des modifications structurelles (accumulation de produits de glycation avancée, augmentation du stress oxydant) qui ne soient plus réversibles par une insulinothérapie de courte durée.

C'est dire l'intérêt d'explorer d'autres approches thérapeutiques.

➤ *Majoration du stimulus de postconditionnement*

Certains auteurs évoquent l'hypothèse que le muscle du sujet diabétique (myocardique ou strié squelettique) puisse encore être conditionné mais à la condition qu'un stimulus plus intense soit appliqué. Dans un modèle de rats diabétiques de type 2 (Goto-Kakizaki), Tsang *et al.* ont

ainsi pu observer que 3 cycles de préconditionnement ischémique étaient nécessaires pour réduire la taille de l'infarctus myocardique alors qu'un seul cycle conférait une protection équivalente chez le rat sain (327). Parallèlement, chez les sujets diabétiques trois cycles de préconditionnement étaient indispensables pour phosphoryler Akt alors qu'un seul et deux cycles restaient sans effet. Des données obtenues sur des biopsies myocardiques humaines (auricule) semblent conforter l'hypothèse qu'un préconditionnement plus intense puisse protéger le myocarde des lésions d'ischémie-reperfusion (328).

Sur des auricules humaines, des résultats analogues ont été retrouvés par Lemoine et al (329). En effet, alors que le desflurane à la concentration de 3% permet d'améliorer significativement la force contractile d'auricules issues de patients non diabétiques soumises à un stress d'hypoxie-réoxygénation, seules des concentrations de 6 et 9% (plus proches de la MAC en oxygène pur) sont capables de procurer une protection équivalente sur des auricules issues de patients diabétiques de type 1 ou de type 2.

➤ *Association de plusieurs stimuli*

L'inefficacité de mesures protectrices uniques dans la plupart des modèles expérimentaux de diabète et dans une large majorité des études cliniques conduit naturellement à proposer l'utilisation simultanée de plusieurs agents protecteurs (2) en espérant une synergie d'action. L'association de plusieurs stimuli semble logique à l'instar de ce qui peut être observé dans l'approche thérapeutique multimodale de nombreuses pathologies. L'association d'un antioxydant comme la N-acétylcystéine au stimulus de conditionnement ischémique ou pharmacologique serait en mesure de restaurer une protection musculaire chez l'animal diabétique (330,331). En présence d'une hyperglycémie aiguë induite par perfusion de glucose, la simvastatine restaure l'effet protecteur myocardique du préconditionnement ischémique et ceci par l'intermédiaire de la voie de la NO-synthase (17,273). Il paraît donc intéressant d'activer des voies de protection complémentaires pour créer une synergie et restaurer une protection. Depuis les travaux de Krolikowski *et al.*, on sait que l'association d'un postconditionnement pharmacologique par halogéné (isoflurane) et cyclosporine est synergique chez l'animal sain (332). Ainsi, Huhn *et al.* ont associé un postconditionnement pharmacologique par sévoflurane à un autre postconditionnement pharmacologique par cyclosporine chez des rats soumis à une hyperglycémie aiguë et à occlusion coronaire (333).

Alors qu'aucun des deux agents postconditionnants administré séparément ne permettait de réduire la taille infarctée (et cela même en doublant les posologies), l'association du sévoflurane et de la cyclosporine s'avérait synergique et restaurait une protection du myocarde.

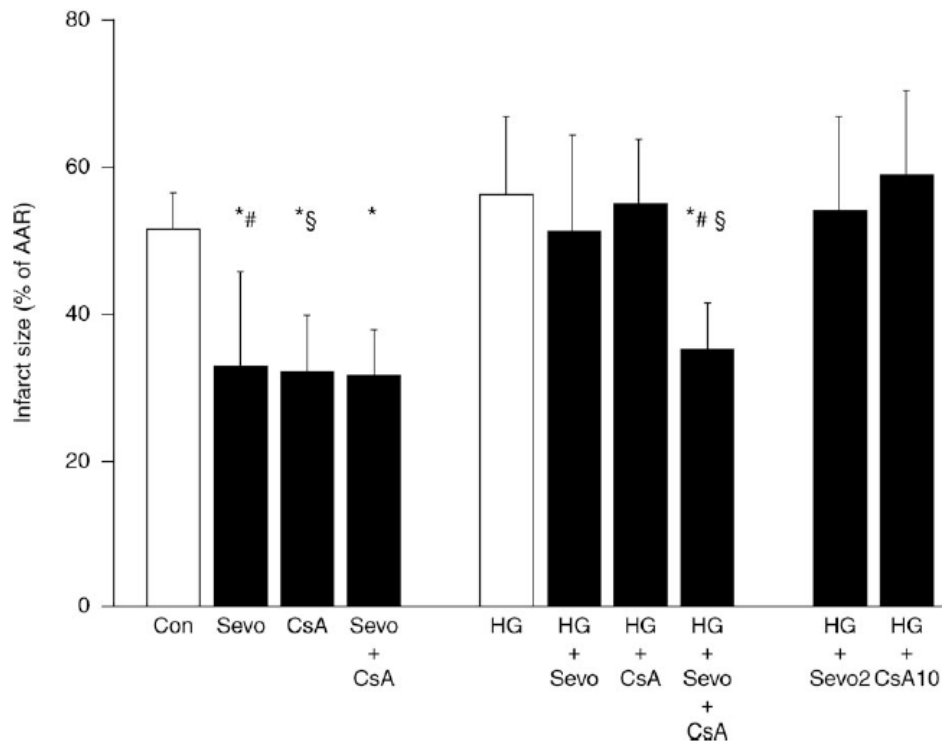


Figure 47 : représentation de la surface myocardique infarctée chez des rats sains ou hyperglycémiques (HG) soumis à une IR myocardique (barres noires) avec un postconditionnement pharmacologique par sévoflurane (Sevo) et cyclosporine A (CsA) à dose simple, doublée (Sevo2 et CsA10) ou associant les deux (Sevo+CsA). D'après Huhn *et al.* (333).

Ce résultat est particulièrement intéressant dans la perspective des données que nous avons observées au niveau du muscle squelettique chez des animaux dont le diabète était induit par streptozotocine. En effet, les animaux étaient dans la situation d'un double conditionnement par halogéné (isoflurane) et cyclosporine. Néanmoins, notre protocole diffère dans le sens où l'isoflurane était administré en continu et pas en postconditionnement et dans la mesure où l'hyperglycémie était liée à un état diabétique prolongé et pas à une perfusion ponctuelle de glucose.

2.2.2. Conditionnement pharmacologique par cyclosporine chez l'animal sénescent

Dans le groupe des animaux sénescents, nous avons modifié le protocole expérimental : l'ischémie d'un membre était induite par la technique du garrot unilatéral. Nous disposions ainsi chez un même animal d'une patte contrôle pour chaque patte ischémique. D'autre part, nous avons remplacé l'administration intrapéritonéale par une administration intraveineuse directe de 10mg/kg de cyclosporine A. Ceci nous a permis d'obtenir des concentrations plasmatiques de 5827 ± 498 ng/mL, supérieures à celles obtenues chez les rats sains mais comparables à celles obtenues chez les rats diabétiques. Enfin, nous avons utilisé une technique plus élaborée de mesure du stress oxydant tissulaire par résonance paramagnétique électronique, permettant une quantification des ROS totaux.

Des rats de 71 à 73 semaines correspondraient chez l'humain, à des patients âgés de 65 à 75 ans (281). Chez ces rats âgés, l'IR d'une patte réduit les vitesses des réactions de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le myocyte et diminue la capacité de rétention calcique par rapport au muscle de la patte controlatérale. Pour ce qui concerne le stress oxydant musculaire, il est augmenté non seulement dans la patte homolatérale mais également dans la patte controlatérale et de façon non significative dans le cœur.

L'administration de cyclosporine 10 min avant la reperfusion ne restaure pas la respiration mitochondriale ni n'augmente la capacité de rétention calcique dans la patte soumise à IR. Au contraire, elle augmente la production musculaire de radicaux libres de façon plus importante que l'IR seule, à la fois dans la patte ischémisée, dans la patte controlatérale et également au niveau du myocarde.

Ainsi, à l'inverse de ce que nous avons observé chez l'animal sain et l'animal diabétique, ces résultats du postconditionnement pharmacologique par cyclosporine chez le rat sénescent ne permettent pas de mettre en évidence une quelconque protection mais au contraire révèlent une aggravation du stress oxydant local et systémique. L'absence de protection a déjà été observée au niveau du cœur chez le rat âgé (334) mais les effets délétères d'un postconditionnement pharmacologique par cyclosporine n'ont, à notre connaissance, pas été publiés.

Plusieurs mécanismes semblent participer à **cette** absence de protection du muscle âgé par la cyclosporine : une sensibilité accrue des sujets âgés aux conséquences de l'ischémie-reperfusion musculaire, une toxicité accrue de la cyclosporine chez le rat âgé, une diminution de l'expression et de la phosphorylation de STAT3 et une impossibilité d'activer les kinases de la voie RISK.

2.2.2.1. Hypothèse d'une toxicité accrue de la cyclosporine chez le rat âgé favorisant une augmentation de la production de radicaux libres

Nos observations d'une augmentation du stress oxydant local et systémique chez le rat âgé traité par cyclosporine peuvent être analysés sur les plans pharmacologique, physiologique et toxicologique.

- Tout d'abord, les concentrations plasmatiques observées étaient élevées, supérieures aux concentrations plasmatiques de cyclosporine obtenues chez les rats sains chez lesquels une diminution du stress oxydant musculaire était observée. Il est donc

envisageable que ces fortes concentrations aient dépassé l'intervalle thérapeutique (335) et provoqué une toxicité musculaire. Nous n'avons pas de raison évidente *a priori* de réduire les posologies administrées chez les rats sénescents car les propriétés pharmacocinétiques de la cyclosporine sont très peu modifiées par le grand âge (336).

- Il semble également que l'activation et l'ouverture du mPTP soient facilitées dans les lymphocytes, le cerveau et le foie des rats âgés et que même si dans ces conditions, la cyclosporine retarde l'ouverture du mPTP confronté à une charge calcique, la CRC est plus basse chez les animaux âgés (337).
- Enfin, comme le stress oxydant est impliqué à la fois dans les processus de vieillissement (338) et de toxicité aiguë de la cyclosporine (16), nous devons considérer l'hypothèse selon laquelle l'association de l'âge avancé et de l'administration de cyclosporine a été synergique et a provoqué un stress oxydant tel qu'il a débordé les capacités anti-oxydantes musculaire et systémique. Cette hypothèse est soutenue par les résultats obtenus par Palomero *et al.* chez des rats âgés de 24 mois (339). En effet, chez ces animaux, un traitement d'une semaine par cyclosporine intrapéritonéale à la posologie de 10mg/kg provoquait un stress oxydant proportionnellement plus important chez les rats âgés par rapport aux rats jeunes. De plus, l'association âge et cyclosporine était synergique sur le plan statistique pour la diminution des enzymes anti-oxydantes et l'augmentation de la peroxydation lipidique. Pour les auteurs, la diminution des défenses anti-oxydantes associée à l'âge conduirait à une susceptibilité accrue aux effets toxiques de la cyclosporine chez les animaux sénescents.

Les données de la littérature sont disparates car s'il semble qu'en administration chronique la cyclosporine diminue l'activité de la glutathion peroxydase (enzyme antioxydante), elle diminue également le stress oxydant plasmatique, comme attesté par une diminution du malonyldialdéhyde (MDA) (214,215). Cependant, globalement, l'administration chronique de cyclosporine A semble augmenter le stress oxydant et l'administration d'antioxydants permet de réduire de façon significative une grande partie des effets indésirables rénaux, hépatiques et cardiaques (16,216).

Lors d'une administration ponctuelle unique, les effets de la cyclosporine sur le stress oxydant, ne sont que très peu décrits mais des cellules mésangiales humaines en culture, exposées à une concentration de 10^{-7} M de cyclosporine produisent de fortes quantités de peroxyde d'hydrogène (217,218).

Enfin, dans un modèle *ex vivo* de cœur de rat perfusé, Griffith *et al.* ont mis en évidence un effet protecteur de faibles concentrations de cyclosporine A (0,2 μ M) sur les conséquences mécaniques de l'ischémie-reperfusion myocardique alors que des concentrations plus élevées (1 μ M) abolissaient toute protection (4,335). La cyclosporine possède un poids moléculaire de 1202,61 g/mol. Avec des concentrations plasmatiques d'environ 3500ng/mL, nous étions à une concentration de 2,9 μ M soit près de 15 fois au dessus de la concentration protectrice de Griffith *et al.* Pour mémoire, les concentrations résiduelles plasmatiques recommandées chez l'homme lors d'une administration chronique sont de 100 à 400ng/mL.

2.2.2.2. Diminution de l'expression et de la phosphorylation de STAT3 et impossibilité d'activer les kinases de la voie RISK.

o Effets du postconditionnement ischémique

L'hypothèse selon laquelle la protection conférée par le pré- et le postconditionnement ischémique est inopérante chez le sujet âgé est étayée par des observations déjà anciennes. En effet, dès 1997, Abete *et al.* avaient montré que l'angor prodromal (équivalent clinique du préconditionnement ischémique) était protecteur chez les sujets de moins de 65 ans (réduction de la mortalité hospitalière, du choc cardiogénique et de l'insuffisance cardiaque) alors qu'il ne diminuait l'incidence d'aucune de ces complications chez les patients plus âgés (185,340). Chez le rat sénescence, Dow *et al.* (341) ont démontré que le postconditionnement ischémique réduit les troubles du rythme ventriculaires après ischémie-reperfusion myocardique. Cependant, dans un modèle de souris âgées, Boengler *et al.* (187,342) démontrent que le postconditionnement ischémique classique (3x10 sec) est inefficace alors qu'il confère une protection myocardique chez des souris jeunes. Dans ce travail, il est possible de rétablir un effet protecteur en modifiant le protocole de stimulation dans le sens d'une augmentation du nombre de cycles d'IR (5x5 sec.) L'hypothèse mécanistique proposée par les auteurs pour cette diminution de la protection par postconditionnement ischémique est une **diminution de l'expression et de la phosphorylation de STAT3**. Przyklenk *et al.* (343) confirment que le postconditionnement ischémique « classique » est incapable de réduire la taille de l'infarctus mais à l'inverse de Boengler, les auteurs ne parviennent pas à restaurer un effet protecteur. Les mécanismes suggérés pourraient impliquer une surexpression de protéines phosphatases MKP-1 (mitogen-activated protein kinase-phosphatase-1) qui déphosphorylent (et donc inactivent) les kinases de la voie RISK (ERK1/2, Akt et PI-3K).

➤ Effets des postconditionnements pharmacologiques

Liu *et al.* (334) ont récemment démontré que la cyclosporine n'était pas capable de limiter l'ouverture du pore de transition mitochondrial du cardiomyocyte chez des animaux sénescence alors même qu'elle conférait une protection et retardait l'ouverture du mPTP chez des rats jeunes. De la même manière, Chang *et al.* ont observé l'absence de protection myocardique lorsqu'un postconditionnement pharmacologique par isoflurane est appliqué chez des rats âgés (20 mois) alors même que ce traitement protège les cœurs de rats plus jeunes (3-4 mois) en réduisant la taille de l'infarctus expérimental (344). Ces mêmes auteurs montrent que le postconditionnement pharmacologique par isoflurane augmente la phosphorylation (et donc l'activation) des kinases de la voie RISK (ERK1/2, Akt et GSK-3β) chez les rats jeunes alors que la phosphorylation de ces kinases n'est pas modifiée chez les rats âgés. Il est donc possible que l'inefficacité du postconditionnement pharmacologique par cyclosporine et isoflurane chez le rat âgé soit liée pour partie au moins à une **impossibilité d'activer les kinases de la voie RISK**.

Nos résultats sont en accord avec ces travaux et ouvrent la voie à l'approfondissement des investigations mécanistiques dans la perspective d'applications cliniques. La réduction du stress oxydant par restriction calorique ou la pratique régulière de l'exercice pourraient ainsi restaurer une protection myocytaire chez l'animal âgé (338).

**CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Les études que nous avons menées avec un postconditionnement pharmacologique par cyclosporine dans trois populations animales différentes nous ont conduit à observer des résultats contrastés :

- o une protection partielle chez des animaux sains,
- o une absence de protection chez des animaux diabétiques et enfin
- o des effets délétères chez des animaux âgés.

Tout comme dans le postconditionnement ischémique, il semble que le postconditionnement pharmacologique ne fonctionne pas selon le mode du « tout ou rien » mais qu'il doit être adapté à la fois à la population visée et à l'intensité de l'ischémie expérimentale étudiée.

Pour le choix de la dose de cyclosporine à administrer, nous nous sommes fondés sur des études antérieures qui avaient mis en évidence une protection mais il semble indispensable d'établir dans notre modèle une courbe concentration-effet en testant plusieurs posologies. Avec des posologies croissantes, il est vraisemblable que les effets bénéfiques s'amenuisent alors que l'augmentation du stress oxydant et l'inhibition de la voie de la calcineurine deviennent prédominantes.

Le choix de la molécule même est tout à fait primordial. Le mPTP reste une cible particulièrement pertinente pour protéger le muscle squelettique des lésions d'ischémie-reperfusion mais la liaison non spécifique aux cyclophilines cytosoliques, dont la cyclophiline A, inhibe probablement une partie des effets bénéfiques liés à la fixation de la cyclosporine à la cyclophiline D. L'utilisation d'analogues synthétiques de la cyclosporine (Debio-025 ou NIM811), plus spécifiques de la cyclophiline D et dénués d'effets indésirables sur le rein, serait probablement plus appropriée.

Par ailleurs, nous n'avons pas exploré les mécanismes par lesquels le diabète et la sénescence modifient l'expression des ARN et protéines des voies RISK et SAFE dans les muscles de nos animaux. Pour des raisons d'accessibilité à la technique nous n'avons pas exploré la capacité de rétention calcique dans tous les groupes de nos animaux (notamment chez les animaux diabétiques).

Il serait encore particulièrement intéressant de voir si une administration aiguë de cyclosporine modifie la phosphorylation des kinases impliquées dans ces deux voies de signalisation majeures.

Enfin, comme de nombreux faisceaux d'arguments suggèrent que l'inefficacité de la cyclosporine implique une majoration du stress oxydant chez les animaux diabétiques et âgés, nous souhaiterions tester l'administration simultanée de la cyclosporine et d'une molécule antioxydante dans ces deux populations.

L'ensemble de nos résultats, s'ils sont confirmés par des observations à venir, ouvrent de nouvelles perspectives pour l'amélioration de la compréhension des conséquences de l'ischémie-reperfusion. Ils pourraient déboucher sur des suggestions thérapeutiques applicables en clinique humaine et plus particulièrement dans les deux populations ciblées par nos travaux : celle des sujets diabétiques et celle des sujets âgés, deux populations dont la croissance rapide constitue un problème de santé publique dans les pays occidentaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Inc; 2009Jul.1;47(1):32–40.
2. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med*. 2007Sep.13;357(11):1121–35.
3. Juhaszova M. Glycogen synthase kinase-3 mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest*. 2004Jun.1;113(11):1535–49.
4. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J. Pathol*. 2000Feb.;190(3):255–66.
5. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biochem*. 1998Feb.;179(1-2):169–87.
6. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plast. Reconstr. Surg*. 2006Mar.;117(3):1024–33.
7. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of Cardiovascular Risk Factors with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning. *Pharmacological Reviews*. 2007Nov.29;59(4):418–58.
8. HASSOUNA A, LOUBANI M, MATATA B, FOWLER A, STANDEN N, Galiñanes M. Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocardium. *Cardiovascular Research*. 2006Feb.1;69(2):450–8.
9. Pipinos II, Judge AR, Zhu Z, Selsby JT, Swanson SA, Johanning JM, et al. Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006Jul.15;41(2):262–9.
10. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2009Jun.;46(6):821–31.
11. Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, Chafke N, Kretz JG, Piquard F, et al. Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *Journal of Vascular Surgery*. 2007Sep.;46(3):541–7.
12. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med*. 2008Jul.31;359(5):473–81.

13. Charles AL, Guilbert AS, Bouitbir J, Goette-Di Marco P, Enache I, Zoll J, et al. Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg.* 2011Jan.24;98(4):511–6.
14. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* 2000May;47(2-3):119–25.
15. Chen HY, Navia JA, Shafique S, Kassab GS. Fluid–structure interaction in aortic cross-clamping: Implications for vessel injury. *Journal of Biomechanics.* 2010Jan.;43(2):221–7.
16. Rezzani R. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. *Histol. Histopathol.* 2006Mar.;21(3):301–16.
17. Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, Zhong A, Moses M, et al. Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003Oct.;285(4):H1435–43.
18. Mansour Z, Bouitbir J, Charles AL, Talha S, Kindo M, pottecher J, et al. Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping. *J. Vasc. Surg.* 2011Nov.3.
19. Tsubota H, Marui A, Esaki J, Bir SC, Ikeda T, Sakata R. Remote Postconditioning may Attenuate Ischaemia-Reperfusion Injury in the Murine Hindlimb Through Adenosine Receptor Activation. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* Elsevier Ltd; 2010Dec.1;40(6):804–9.
20. Mansour Z, Charles AL, Bouitbir J, pottecher J, Kindo M, Mazzucotelli J-P, et al. Remote and local ischemic postconditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia-reperfusion. *J. Vasc. Surg.* 2012Jul.13.
21. Niemann CU. Close Association Between the Reduction in Myocardial Energy Metabolism and Infarct Size: Dose-Response Assessment of Cyclosporine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2002Sep.1;302(3):1123–8.
22. McAllister SE, Ashrafpour H, Cahoon N, Huang N, Moses MA, Neligan PC, et al. Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2008Jun.11;295(2):R681–9.
23. Wu Q, Marescaux C, Wolff V, Jeung M-Y, Kessler R, Lauer V, et al. Tacrolimus-Associated Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome after Solid Organ Transplantation. *Eur Neurol.* 2010;64(3):169–77.
24. Ludman AJ, Yellon DM, Hausenloy DJ. Cardiac preconditioning for ischaemia: lost in translation. *Disease Models & Mechanisms.* 2010Jan.14;3(1-2):35–8.
25. Gill RS, Manouchehri N, Liu J-Q, Lee T-F, Cho WJ, Thiesen A, et al. Cyclosporine treatment improves cardiac function and systemic hemodynamics during resuscitation in a newborn piglet model of asphyxia. *Crit. Care Med.* 2012Apr.;40(4):1237–44.
26. Lucchinetti E, Bestmann L, Feng J, Freidank H, Clanachan AS, Finegan BA, et al.

- Remote ischemic preconditioning applied during isoflurane inhalation provides no benefit to the myocardium of patients undergoing on-pump coronary artery bypass graft surgery: lack of synergy or evidence of antagonism in cardioprotection? *Anesthesiology*. 2012Jan.31;116(2):296–310.
27. Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J. Anim. Sci.* 2008Apr.;86(14 Suppl):E19–35.
 28. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch. Neurol.* 1970Oct.;23(4):369–79.
 29. Nemeth P, Pette D. Succinate dehydrogenase activity in fibres classified by myosin ATPase in three hind limb muscles of rat. *The Journal of Physiology*. 1981Nov.;320:73–80.
 30. Schiaffino S. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010Aug.;199(4):451–63.
 31. Kushmerick MJ, Moerland TS, Wiseman RW. Mammalian skeletal muscle fibers distinguished by contents of phosphocreatine, ATP, and Pi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992Aug.15;89(16):7521–5.
 32. Ogata T, Yamasaki Y. Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers. *Anat. Rec.* 1997Jun.;248(2):214–23.
 33. Schiaffino S, Reggiani C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 1994Aug.;77(2):493–501.
 34. Krebs HA, Johnson WA. Acetopyruvic acid (alphagamma-diketovaleric acid) as an intermediate metabolite in animal tissues. *Biochem. J.* 1937May;31(5):772–9.
 35. Wiesner RJ, Kurowski TT, Zak R. Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.* 1992Sep.;6(9):1458–67.
 36. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 2005May;6(5):389–402.
 37. Anflous K, Blondel O, Bernard A, Khrestchatisky M, Ventura-Clapier R. Characterization of rat porin isoforms: cloning of a cardiac type-3 variant encoding an additional methionine at its putative N-terminal region. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998Jul.30;1399(1):47–50.
 38. Duchen MR. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol. Aspects Med.* 2004Aug.;25(4):365–451.
 39. Ventura-Clapier R, Kaasik A, Veksler V. Structural and functional adaptations of striated muscles to CK deficiency. *Mol. Cell. Biochem.* 2004Jan.;256-257(1-2):29–41.
 40. Brand MD. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* 2000Sep.;35(6-7):811–20.
 41. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, et al.

- Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*. 2002Jan.3;415(6867):96–9.
42. Béraud N, Pelloux S, Usson Y, Kuznetsov AV, Ronot X, Tourneur Y, et al. Mitochondrial dynamics in heart cells: very low amplitude high frequency fluctuations in adult cardiomyocytes and flow motion in non beating H1-1 cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2009Apr.;41(2):195–214.
 43. Lesnefsky EJ, Hoppel CL. Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003Dec.15;420(2):287–97.
 44. Vendelin M, Béraud N, Guerrero K, Andrienko T, Kuznetsov AV, Olivares J, et al. Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a “crystal-like” pattern. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2005Mar.;288(3):C757–67.
 45. Kirby DM, McFarland R, Ohtake A, Dunning C, Ryan MT, Wilson C, et al. Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS. *J. Med. Genet.* 2004Oct.;41(10):784–9.
 46. Stock D, Leslie AG, Walker JE. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*. 1999Nov.26;286(5445):1700–5.
 47. Sazanov LA. Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry*. 2007Mar.6;46(9):2275–88.
 48. Kao M-C, Di Bernardo S, Matsuno-Yagi A, Yagi T. Characterization and topology of the membrane domain Nqo10 subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry*. 2003Apr.22;42(15):4534–43.
 49. Favier J, Brière J-J, Strompf L, Amar L, Filali M, Jeunemaitre X, et al. Hereditary paraganglioma/pheochromocytoma and inherited succinate dehydrogenase deficiency. *Horm. Res.* 2005;63(4):171–9.
 50. Rötig A, de Lonlay P, Chretien D, Foury F, Koenig M, Sidi D, et al. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* 1997Oct.;17(2):215–7.
 51. Butterworth J, Yates CM, Reynolds GP. Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *J. Neurol. Sci.* 1985Feb.;67(2):161–71.
 52. Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Péquignot E, et al. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat. Genet.* 1995Oct.;11(2):144–9.
 53. Baysal BE. Role of mitochondrial mutations in cancer. *Endocr. Pathol.* 2006;17(3):203–12.
 54. Borisov VB. Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies. *Mol. Aspects Med.* 2002Oct.;23(5):385–412.

55. Mitchell P. The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Letters*. 1975Nov.15;59(2):137–9.
56. Abramson SB. Controversies in COX-2 inhibitor therapy. Introduction. *Clin. Exp. Rheumatol*. 2001Nov.;19(6 Suppl 25):S1–2.
57. Rahman S, Taanman JW, Cooper JM, Nelson I, Hargreaves I, Meunier B, et al. A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes defective assembly and myopathy. *Am. J. Hum. Genet*. 1999Oct.;65(4):1030–9.
58. Wang H, Oster G. Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature*. 1998Nov.19;396(6708):279–82.
59. Chance B. Reaction of oxygen with the respiratory chain in cells and tissues. *J. Gen. Physiol*. 1965Sep.;49(1):Suppl:163–95.
60. Tager JM, Wanders RJ, Groen AK, Kunz W, Bohnensack R, Küster U, et al. Control of mitochondrial respiration. *FEBS Letters*. 1983Jan.10;151(1):1–9.
61. Murphy MP. Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1989Nov.23;977(2):123–41.
62. Weibel ER, Taylor CR, Hoppeler H. The concept of symmorphosis: a testable hypothesis of structure-function relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991Nov.15;88(22):10357–61.
63. Koretsky AP, Balaban RS. Changes in pyridine nucleotide levels alter oxygen consumption and extra-mitochondrial phosphates in isolated mitochondria: a ³¹P-NMR and NAD(P)H fluorescence study. *Biochim. Biophys. Acta*. 1987Oct.7;893(3):398–408.
64. Moreno-Sánchez R, Hogue BA, Hansford RG. Influence of NAD-linked dehydrogenase activity on flux through oxidative phosphorylation. *Biochem. J*. 1990Jun.1;268(2):421–8.
65. Jöbsis FF, Stainsby WN. Oxidation of NADH during contractions of circulated mammalian skeletal muscle. *Respir Physiol*. 1968May;4(3):292–300.
66. Wendt IR, Chapman JB. Fluorometric studies of recovery metabolism of rat fast- and slow-twitch muscles. *Am. J. Physiol*. 1976Jun.;230(6):1644–9.
67. Kunz WS, Kuznetsov AV, Schulze W, Eichhorn K, Schild L, Striggow F, et al. Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers. *Biochim. Biophys. Acta*. 1993Aug.16;1144(1):46–53.
68. Ponsot E, Zoll J, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Richard R, et al. Mitochondrial tissue specificity of substrates utilization in rat cardiac and skeletal muscles. *J. Cell. Physiol*. 2005Jun.;203(3):479–86.
69. LARDY HA, WELLMAN H. Oxidative phosphorylations; rôle of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. *J. Biol. Chem*. 1952Mar.;195(1):215–24.
70. Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*. 2002Jun.7;1576(1-2):1–14.

71. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999Jul.9;98(1):115–24.
72. Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J*. 2002Dec.;16(14):1879–86.
73. Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, et al. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes*. 2003Dec.;52(12):2874–81.
74. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang C-Y, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 2002Aug.15;418(6899):797–801.
75. Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, et al. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol*. 2005Apr.;3(4):e101.
76. Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, et al. Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J. Biol. Chem*. 2007Oct.12;282(41):30014–21.
77. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006Oct.20;127(2):397–408.
78. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*. 2005Mar.3;434(7029):113–8.
79. Frye RA. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1999Jun.24;260(1):273–9.
80. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. 2004Mar.26;303(5666):2011–5.
81. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 2006Dec.15;127(6):1109–22.
82. Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem*. 2002Jan.18;277(3):1645–8.
83. Kressler D, Schreiber SN, Knutti D, Kralli A. The PGC-1-related protein PERC is a

- selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 2002Apr.19;277(16):13918–25.
84. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005Jun.;1(6):361–70.
 85. St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, et al. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 2003Jul.18;278(29):26597–603.
 86. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovascular Research.* 2008Jul.15;79(2):208–17.
 87. Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, et al. Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem. J.* 2003Jul.1;373(Pt 1):155–65.
 88. Evans MJ, Scarpulla RC. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J. Biol. Chem.* 1989Aug.25;264(24):14361–8.
 89. Garesse R, Vallejo CG. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene.* 2001Jan.24;263(1-2):1–16.
 90. Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological Reviews.* 2008Apr.;88(2):611–38.
 91. Fisher RP, Clayton DA. Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 1988Aug.;8(8):3496–509.
 92. Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum. Mol. Genet.* 2004May1;13(9):935–44.
 93. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1997Apr.;29(2):109–19.
 94. Lawler JM, Hu Z, Barnes WS. Effect of reactive oxygen species on K⁺ contractures in the rat diaphragm. *J. Appl. Physiol.* 1998Mar.;84(3):948–53.
 95. McKelvey TG, Höllwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U, Jones HP. Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am. J. Physiol.* 1988May;254(5 Pt 1):G753–60.
 96. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999Mar.1;93(5):1464–76.
 97. Krause K-H. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2004Oct.;57(5):S28–9.
 98. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology.* 2003Oct.15;552(Pt 2):335–44.

99. Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.* 1999Sep.15;342 Pt 3:481–96.
100. Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 1972Jul.;128(3):617–30.
101. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005Feb.25;120(4):483–95.
102. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 1973Jul.;134(3):707–16.
103. Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1997Feb.;29(1):89–95.
104. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* 2002Mar.;80(5):780–7.
105. Sanz A, Caro P, Barja G. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2004Dec.;36(6):545–52.
106. Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, et al. The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Letters.* 2001Sep.21;505(3):364–8.
107. Herrero A, Barja G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000Dec.;32(6):609–15.
108. Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985Mar.;237(2):408–14.
109. Chen Q. Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: CENTRAL ROLE OF COMPLEX III. *Journal of Biological Chemistry.* 2003Jul.3;278(38):36027–31.
110. Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.* 2003Feb.21;278(8):5557–63.
111. Ksenzenko M, Konstantinov AA, Khomutov GB, Tikhonov AN, Ruuge EK. Relationships between the effects of redox potential, alpha-thenoyltrifluoroacetone and malonate on O(2) and H₂O₂ generation by submitochondrial particles in the presence of succinate and antimycin. *FEBS Letters.* 1984Sep.17;175(1):105–8.
112. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters.* 1997Oct.13;416(1):15–8.
113. Starkov AA, Fiskum G. Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by

- membrane potential and NAD(P)H redox state. *J. Neurochem.* 2003Sep.;86(5):1101–7.
114. Votyakova TV, Reynolds IJ. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J. Neurochem.* 2001Oct.;79(2):266–77.
 115. Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine.* 2008Jan.15;44(2):193–201.
 116. Huang WC, Chen PC, Jou SB, Cheng JT. Protein kinase C and changes in manganese superoxide dismutase gene expression in cultured glial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001Oct.;28(10):822–5.
 117. Sentman M-L, Granström M, Jakobson H, Reaume A, Basu S, Marklund SL. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 2006Mar.17;281(11):6904–9.
 118. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 1999Nov.;32(8):595–603.
 119. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 1999Jul.;31(7):987–97.
 120. Ji LL, Wu E, Thomas DP. Effect of exercise training on antioxidant and metabolic functions in senescent rat skeletal muscle. *Gerontology.* 1991;37(6):317–25.
 121. Podda M, Weber C, Traber MG, Packer L. Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinols, and ubiquinones. *J. Lipid Res.* 1996Apr.;37(4):893–901.
 122. Skulachev VP. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Letters.* 1996Nov.11;397(1):7–10.
 123. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 1999Mar.8;424(1-2):83–95.
 124. Stadtman ER, Levine RL. Why have cells selected reactive oxygen species to regulate cell signaling events? *Hum Exp Toxicol.* 2002Feb.;21(2):83.
 125. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988Sep.;85(17):6465–7.
 126. Beckman KB, Ames BN. Mitochondrial aging: open questions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998Nov.20;854:118–27.
 127. Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* 1998Jan.2;17(1):37–49.
 128. Fontaine E, Ichas F, Bernardi P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* 1998Oct.2;273(40):25734–

- 40.
129. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiological Reviews*. 1999Oct.;79(4):1127–55.
130. Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci. Rep.* 1997Feb.;17(1):43–52.
131. Hausenloy D, Wynne A, Duchon M, Yellon D. Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation*. 2004Apr.13;109(14):1714–7.
132. Schwartz DR, Sack MN. Targeting the mitochondria to augment myocardial protection. *Curr Opin Pharmacol*. 2008Apr.;8(2):160–5.
133. HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956Jul.;11(3):298–300.
134. Gomez-Cabrera M-C, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008Jan.;87(1):142–9.
135. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009May26;106(21):8665–70.
136. Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A, Suliman HB. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ. Res.* 2008Nov.21;103(11):1232–40.
137. Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003Mar.;8(2):115–28.
138. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977Nov.;56(5):786–94.
139. Martou G, O'Blencs CA, Huang N, McAllister SE, Neligan PC, Ashrafpour H, et al. Development of an in vitro model for study of the efficacy of ischemic preconditioning in human skeletal muscle against ischemia-reperfusion injury. *Journal of Applied Physiology*. 2006Jul.27;101(5):1335–42.
140. Norwood MGA, Bown MJ, Sayers RD. Ischaemia-reperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm repair. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2004Sep.;28(3):234–45.
141. Cour M, Gomez L, Mewton N, Ovize M, Argaud L. Postconditioning: From the Bench to Bedside. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2011May9;16(2):117–30.
142. Grisotto PC, Santos dos AC, Coutinho-Netto J, Cherri J, Piccinato CE. Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats

- submitted to ischemia and reperfusion. *J. Surg. Res.* 2000Jul.;92(1):1–6.
143. Formigli L, Lombardo LD, Adembri C, Brunelleschi S, Ferrari E, Novelli GP. Neutrophils as mediators of human skeletal muscle ischemia-reperfusion syndrome. *Hum. Pathol.* 1992Jun.;23(6):627–34.
 144. Brandão ML, Roselino JES, Piccinato CE, Cherri J. Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J. Surg. Res.* 2003Mar.;110(1):235–40.
 145. Jennings RB, Reimer KA. Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation.* 1983Aug.;68(2 Pt 2):I25–36.
 146. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, et al. 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. *Cardiovascular Research.* 2010Jul.15;87(3):406–23.
 147. Cerra FB, Lajos TZ, Montes M, Siegel JH. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery.* 1975Jul.;78(1):95–104.
 148. Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular Research.* 2004Feb.15;61(3):365–71.
 149. Marín-García J, Goldenthal MJ. Mitochondria play a critical role in cardioprotection. *J. Card. Fail.* 2004Feb.;10(1):55–66.
 150. May JW, Chait LA, O'Brien BM, Hurley JV. The no-reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast. Reconstr. Surg.* 1978Feb.;61(2):256–67.
 151. M I Yassin M D Denis W Harkin M. Lower Limb Ischemia-Reperfusion Injury Triggers a Systemic Inflammatory Response and Multiple Organ Dysfunction. *World Journal of Surgery.* 2002Jan.31;26(1):115–21.
 152. Klausner JM, Anner H, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, et al. Lower torso ischemia-induced lung injury is leukocyte dependent. *Ann. Surg.* 1988Dec.;208(6):761–7.
 153. Gyurkovics E, Aranyi P, Stangl R, Onody P, Ferreira G, Lotz G, et al. Postconditioning of the lower limb--protection against the reperfusion syndrome. *J. Surg. Res.* 2011Jul.;169(1):139–47.
 154. Adembri CC, Kastamoniti EE, Bertolozzi II, Vanni SS, Dorigo WW, Coppo MM, et al. Pulmonary injury follows systemic inflammatory reaction in infrarenal aortic surgery. *Crit. Care Med.* 2004Apr.30;32(5):1170–7.
 155. Tallgren M, Niemi T, Pöyhiä R, Raininko E, Railo M, Salmenperä M, et al. Acute renal injury and dysfunction following elective abdominal aortic surgery. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* 2007May;33(5):550–5.
 156. Miller CC III, Villa MA, Sutton J, Lau D, Keyhani K, Estrera AL, et al. Serum Myoglobin and Renal Morbidity and Mortality following Thoracic and Thoraco-Abdominal Aortic Repair: Does Rhabdomyolysis Play a Role? *European Journal of*

- Vascular and Endovascular Surgery. 2009Apr.;37(4):388–94.
157. Holt SG, Moore KP. Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis. *Intensive Care Med.* 2001May;27(5):803–11.
 158. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986Nov.;74(5):1124–36.
 159. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic “preconditioning” protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation.* 1993Mar.;87(3):893–9.
 160. Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovascular Research.* Oxford University Press; 1995;29(6):782.
 161. Eastlack RK, Groppo ER, Hargens AR, Pedowitz RA. Ischemic-preconditioning does not prevent neuromuscular dysfunction after ischemia-reperfusion injury. *J. Orthop. Res.* 2004Jul.;22(4):918–23.
 162. Carroll CM, Carroll SM, Overgoor ML, Tobin G, Barker JH. Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle prior to flap elevation augments muscle-flap survival. *Plast. Reconstr. Surg.* 1997Jul.;100(1):58–65.
 163. Saito T, Komiyama T, Aramoto H, Miyata T, Shigematsu H. Ischemic preconditioning improves oxygenation of exercising muscle in vivo. *J. Surg. Res.* 2004Jul.;120(1):111–8.
 164. Harralson T, Grossi FV, Quan EE, Tecimer T, Perez-Abadia G, Anderson G, et al. Ischemic preconditioning of skeletal muscle: duration of late-phase protection. *Ann Plast Surg.* 2005Aug.;55(2):216–22.
 165. Schoen M, Rotter R, Gierer P, Gradl G, Strauss U, Jonas L, et al. Ischemic preconditioning prevents skeletal muscle tissue injury, but not nerve lesion upon tourniquet-induced ischemia. *J Trauma.* 2007Oct.;63(4):788–97.
 166. Schroeder CA, Lee HT, Shah PM, Babu SC, Thompson CI, Belloni FL. Preconditioning with ischemia or adenosine protects skeletal muscle from ischemic tissue reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 1996Jun.;63(1):29–34.
 167. Gürke L, Marx A, Sutter PM, Frenz A, Harder F, Seelig J, et al. Ischemic preconditioning--a new concept in orthopedic and reconstructive surgery. *J. Surg. Res.* 1996Feb.15;61(1):1–3.
 168. Kharbanda RK, Li J, Konstantinov IE, Cheung MMH, White PA, Frndova H, et al. Remote ischaemic preconditioning protects against cardiopulmonary bypass-induced tissue injury: a preclinical study. *Heart.* 2006Oct.;92(10):1506–11.
 169. Cheung MMH, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, Frndova H, Li J, et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *Journal of the American College of Cardiology.* 2006Jun.6;47(11):2277–82.
 170. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Reza Nouraei SA, Akthar AM, et al. Remote

- Ischemic Preconditioning Reduces Myocardial and Renal Injury After Elective Abdominal Aortic Aneurysm Repair: A Randomized Controlled Trial. *Circulation*. 2007Sep.11;116(11_suppl):I-98-I-105.
171. Rahman IA, Mascaro JG, Steeds RP, Frenneaux MP, Nightingale P, Gosling P, et al. Remote ischemic preconditioning in human coronary artery bypass surgery: from promise to disappointment? *Circulation*. 2010Sep.14;122(11 Suppl):S53-9.
 172. Moses MA. Mitochondrial KATP channels in hindlimb remote ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2004Oct.14;288(2):H559-67.
 173. Moses MA, Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Huang N, McAllister SE, et al. Inducing late phase of infarct protection in skeletal muscle by remote preconditioning: efficacy and mechanism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2005Dec.;289(6):R1609-17.
 174. Harkin DW, Barros D'Sa AAB, McCallion K, Hoper M, Campbell FC. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia—reperfusion protects against acute lung injury. *Journal of Vascular Surgery*. 2002Jun.;35(6):1264-73.
 175. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation*. 1997Sep.2;96(5):1641-6.
 176. Küntscher MV, Schirmbeck EU, Menke H, Klar E, Gebhard MM, Germann G. Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model. *Plast. Reconstr. Surg*. 2002Jun.;109(7):2398-404.
 177. Lazaris AM, Maheras AN, Vasdekis SN, Karkaletsis KG, Charalambopoulos A, Kakisis JD, et al. Protective effect of remote ischemic preconditioning in renal ischemia/reperfusion injury, in a model of thoracoabdominal aorta approach. *J. Surg. Res*. 2009Jun.15;154(2):267-73.
 178. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiological Reviews*. 2003Oct.;83(4):1113-51.
 179. Li GC, Vasquez JA, Gallagher KP, Lucchesi BR. Myocardial protection with preconditioning. *Circulation*. 1990Aug.;82(2):609-19.
 180. Argaud L, Ovize M. Comment utiliser le paradigme de préconditionnement ischémique pour protéger le myocarde ? *Med Sci (Paris)*. 2004May;20(5):521-5.
 181. Wang L, Cherednichenko G, Hernandez L, Halow J, Camacho SA, Figueredo V, et al. Preconditioning limits mitochondrial Ca²⁺ during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2001May;280(5):H2321-8.
 182. Han J, Kim N, Joo H, Kim E. Ketamine abolishes ischemic preconditioning through inhibition of K(ATP) channels in rabbit hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2002Jul.;283(1):H13-21.
 183. Miura T, Goto M, Miki T, Sakamoto J, Shimamoto K, Iimura O. Glibenclamide, a blocker of ATP-sensitive potassium channels, abolishes infarct size limitation by

- preconditioning in rabbits anesthetized with xylazine/pentobarbital but not with pentobarbital alone. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995Apr.;25(4):531–8.
184. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998Aug.10;1366(1-2):79–94.
 185. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovascular Research.* 2002Aug.15;55(3):534–43.
 186. Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Béjui F, et al. Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovascular Research.* 2004Jan.1;61(1):115–22.
 187. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003Aug.;285(2):H579–88.
 188. Loukogeorgakis SP, Williams R, Panagiotidou AT, Kolvekar SK, Donald A, Cole TJ, et al. Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism. *Circulation.* 2007Sep.18;116(12):1386–95.
 189. Skyschally A, van Caster P, Iliodromitis EK, Schulz R, Kremastinos DT, Heusch G. Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. *Basic Res Cardiol.* 2009Sep.;104(5):469–83.
 190. Park JW, Kang JW, Jeon WJ, Na HS. Postconditioning protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Microsurgery.* 2010;:NA–NA.
 191. Eberlin KR, McCormack MC, Nguyen JT, Tatlidede HS, Randolph MA, Austen WG. Sequential limb ischemia demonstrates remote postconditioning protection of murine skeletal muscle. *Plast. Reconstr. Surg.* 2009Feb.;123(2 Suppl):8S–16S.
 192. Vinten-Johansen J, Zhao Z-Q, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F. Postconditioning--A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2005Jul.;100(4):295–310.
 193. van Vuuren D, Lochner A. Ischaemic postconditioning: from bench to bedside ... *Cardiovasc J Afr.* 2008Nov.;19(6):311–20.
 194. Vinten-Johansen J, Zhao Z-Q, Jiang R, Zatta AJ, Dobson GP. Preconditioning and postconditioning: innate cardioprotection from ischemia-reperfusion injury. *J. Appl. Physiol.* 2007Oct.;103(4):1441–8.
 195. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, Shimizu M, Li J, Cheung M, et al. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007Apr.;292(4):H1883–90.
 196. Bøtker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Bøttcher M, Kaltoft AK, Terkelsen CJ, et al.

- Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet*. 2010Feb.27;375(9716):727–34.
197. Vinten-Johansen J, Shi W. Preconditioning and Postconditioning: Current Knowledge, Knowledge Gaps, Barriers to Adoption, and Future Directions. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2011Aug.4;16(3-4):260–6.
 198. Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, Tsai BM, Morrell ED, Meldrum DR. Preconditioning versus postconditioning: mechanisms and therapeutic potentials. *Journal of the American College of Surgeons*. 2006May;202(5):797–812.
 199. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*. 1991Jul.;84(1):350–6.
 200. Yang X-M, Krieg T, Cui L, Downey JM, Cohen MV. NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2004Mar.;36(3):411–21.
 201. Müllenheim J, Frassdorf J, Preckel B, Thämer V, Schlack W. Ketamine, but not S(+)-ketamine, blocks ischemic preconditioning in rabbit hearts in vivo. *Anesthesiology*. 2001Apr.;94(4):630–6.
 202. Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Garcia C, Schaub MC. Differential effects of anesthetics on mitochondrial K(ATP) channel activity and cardiomyocyte protection. *Anesthesiology*. 2002Jul.;97(1):15–23.
 203. Lange M, Smul TM, Blomeyer CA, Redel A, Klotz K-N, Roewer N, et al. Role of the beta1-adrenergic pathway in anesthetic and ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rabbit heart in vivo. *Anesthesiology*. 2006Sep.;105(3):503–10.
 204. CIBULSKYTE D, PEDERSEN M, JAKOBSEN P, HANSEN H, MORTENSEN J. Pharmacokinetic characterization of a pig model of ciclosporin A nephrotoxicity following intravenous administration. *Pharmacological Research*. 2007Oct.;56(4):311–7.
 205. Heppenstall RB, Balderston R, Goodwin C. Pathophysiologic effects distal to a tourniquet in the dog. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 1979Apr.;19(4):234–8.
 206. Volcheck GW, Van Dellen RG. Anaphylaxis to intravenous cyclosporine and tolerance to oral cyclosporine: case report and review. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 1998Feb.;80(2):159–63.
 207. Dick F, Li J, Giraud M-N, Kalka C, Schmidli J, Tevaearai H. Basic control of reperfusion effectively protects against reperfusion injury in a realistic rodent model of acute limb ischemia. *Circulation*. 2008Nov.4;118(19):1920–8.
 208. Finn WF, McCormack AJ, Sullivan BA, Hak LJ, Clark RL. Influence of the rate of infusion on cyclosporine nephrotoxicity in the rat. *Ren Fail*. 1989;11(1):3–15.
 209. Bosch X, Poch E, Grau JM. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *N. Engl. J.*

- Med. 2009Jul.2;361(1):62–72.
210. Landrieu I, Hanouille X, Bonachera F, Hamel A, Sibille N, Yin Y, et al. Structural Basis for the Non-Immunosuppressive Character of the Cyclosporin A Analogue Debio 025. *Biochemistry*. 2010Jun.8;49(22):4679–86.
 211. Pearse R, Dawson D, Fawcett J, Rhodes A, Grounds RM, Bennett ED. Early goal-directed therapy after major surgery reduces complications and duration of hospital stay. A randomised, controlled trial [ISRCTN38797445]. *Crit Care*. 2005;9(6):R687–93.
 212. Rosenwirth B, Billich A, Datema R, Donatsch P, Hammerschmid F, Harrison R, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporine analog. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994Aug.;38(8):1763–72.
 213. Sanchez H, Zoll J, Bigard X, Veksler V, Mettaufer B, Lampert E, et al. Effect of cyclosporin A and its vehicle on cardiac and skeletal muscle mitochondria: relationship to efficacy of the respiratory chain. *British Journal of Pharmacology*. 2001Jul.;133(6):781–8.
 214. Aird WC. Endothelium in health and disease. *Pharmacol Rep*. 2008Jan.;60(1):139–43.
 215. Kędzierska K, Sporniak-Tutak K, Bober J, Safranow K, Olszewska M, Jakubowska K, et al. Oxidative Stress Indices in Rats Under Immunosuppression. *Transplantation Proceedings*. 2011Dec.;43(10):3939–45.
 216. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J. Immunol*. 2007May15;178(10):6017–22.
 217. Perez RL, Roman J. Fibrin enhances the expression of IL-1 beta by human peripheral blood mononuclear cells. Implications in pulmonary inflammation. *J. Immunol*. 1995Feb.15;154(4):1879–87.
 218. Pérez de Lema G, Arribas I, Prieto A, Parra T, de Arriba G, Rodríguez-Puyol D, et al. Cyclosporin A-induced hydrogen peroxide synthesis by cultured human mesangial cells is blocked by exogenous antioxidants. *Life Sci*. 1998;62(19):1745–53.
 219. Qi J, Kreutzer DL. Fibrin activation of vascular endothelial cells. Induction of IL-8 expression. *J. Immunol*. 1995Jul.15;155(2):867–76.
 220. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2004Sep.30;288(2):R345–53.
 221. Argaud L. Postconditioning Inhibits Mitochondrial Permeability Transition. *Circulation*. 2005Jan.18;111(2):194–7.
 222. Nguyen HX. Null mutation of myeloperoxidase in mice prevents mechanical activation of neutrophil lysis of muscle cell membranes in vitro and in vivo. *The Journal of Physiology*. 2005Mar.3;565(2):403–13.
 223. Gill RS, Bigam DL, Cheung P-Y. The Role of Cyclosporine in the Treatment of

- Myocardial Reperfusion Injury. *Shock*. 2012Apr.;37(4):341–7.
224. Kersten JR, Schmelting TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology*. 1997Aug.;87(2):361–70.
 225. Piriou V, Chiari P, Gateau-Roesch O, Argaud L, Muntean D, Salles D, et al. Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology*. 2004Mar.;100(3):581–8.
 226. Obal D, Preckel B, Scharbatke H, Müllenheim J, Höterkes F, Thämer V, et al. One MAC of sevoflurane provides protection against reperfusion injury in the rat heart in vivo. *British Journal of Anaesthesia*. 2001Dec.;87(6):905–11.
 227. Pagel PS, Krolikowski JG, Shim YH, Venkatapuram S, Kersten JR, Weihrauch D, et al. Noble gases without anesthetic properties protect myocardium against infarction by activating prosurvival signaling kinases and inhibiting mitochondrial permeability transition in vivo. *Anesthesia & Analgesia*. 2007Sep.;105(3):562–9.
 228. Pagel PS. Postconditioning by Volatile Anesthetics: Salvaging Ischemic Myocardium at Reperfusion by Activation of Prosurvival Signaling. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2008Oct.;22(5):753–65.
 229. Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Scharbatke H, Preckel B, Schlack W. The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo. *Anesthesia & Analgesia*. 2005Nov.;101(5):1252–60.
 230. Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, Pasch T, Perriard J-C, Zaugg M. Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta. *Anesthesiology*. 2005Nov.;103(5):987–95.
 231. Pagel PS, Krolikowski JG, Neff DA, Weihrauch D, Bienengraeber M, Kersten JR, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase enhances isoflurane-induced protection against myocardial infarction during early reperfusion in vivo. *Anesthesia & Analgesia*. 2006May;102(5):1348–54.
 232. Jamnicki-Abegg M, Weihrauch D, Pagel PS, Kersten JR, Bosnjak ZJ, Warltier DC, et al. Isoflurane inhibits cardiac myocyte apoptosis during oxidative and inflammatory stress by activating Akt and enhancing Bcl-2 expression. *Anesthesiology*. 2005Nov.;103(5):1006–14.
 233. Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier DC. Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology*. 2005Jan.;102(1):102–9.
 234. Aguilar D. Newly Diagnosed and Previously Known Diabetes Mellitus and 1-Year Outcomes of Acute Myocardial Infarction: The Valsartan in Acute Myocardial Infarction (VALIANT) Trial. *Circulation*. 2004Sep.21;110(12):1572–8.
 235. Donahoe SM, Stewart GC, McCabe CH, Mohanavelu S, Murphy SA, Cannon CP, et

- al. Diabetes and mortality following acute coronary syndromes. *JAMA*. 2007Aug.15;298(7):765–75.
236. American Diabetes Association. Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes Care*. 2003Dec.;26(12):3333–41.
237. Marso SP, Miller T, Rutherford BD, Gibbons RJ, Qureshi M, Kalynych A, et al. Comparison of Myocardial Reperfusion in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention in ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction With Versus Without Diabetes Mellitus (from the EMERALD Trial). *The American Journal of Cardiology*. 2007Jul.;100(2):206–10.
238. Nathan D. Long-term complications of diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med*. 1993;328(23):1676–85.
239. Jude EB, Eleftheriadou I, Tentolouris N. Peripheral arterial disease in diabetes - a review. *Diabetic Medicine*. 2010Jan.;27(1):4–14.
240. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo*. 2009Mar.;23(2):245–58.
241. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2007Dec.18;51(2):216–26.
242. Yin X, Zheng Y, Zhai X, Zhao X, Cai L. Diabetic Inhibition of Preconditioning- and Postconditioning-Mediated Myocardial Protection against Ischemia/Reperfusion Injury. *Experimental Diabetes Research*. 2012;2012:1–9.
243. Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *British Journal of Pharmacology*. 2009Mar.9;156(6):885–98.
244. Kelleher AR, Fairchild TJ, Keslacy S. STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF- κ B canonical cascade activation. *Acta Diabetol*. 2010Jul.17;47(4):315–23.
245. Johnston APW, Campbell JE, Found JG, Riddell MC, Hawke TJ. Streptozotocin induces G2 arrest in skeletal muscle myoblasts and impairs muscle growth in vivo. *AJP: Cell Physiology*. 2006Nov.1;292(3):C1033–40.
246. Krause MP, Riddell MC, Gordon CS, Imam SA, Cafarelli E, Hawke TJ. Diabetic myopathy differs between Ins2Akita \pm and streptozotocin-induced Type 1 diabetic models. *Journal of Applied Physiology*. 2009May4;106(5):1650–9.
247. Ceriello A. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004May1;24(5):816–23.
248. Brodsky SV, Gao S, Li H, Goligorsky MS. Hyperglycemic switch from mitochondrial nitric oxide to superoxide production in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2002Nov.;283(5):H2130–9.
249. Yang Z, Laubach VE, French BA, Kron IL. Acute hyperglycemia enhances oxidative stress and exacerbates myocardial infarction by activating nicotinamide adenine

- dinucleotide phosphate oxidase during reperfusion. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2009Mar.;137(3):723–9.
250. Munusamy S, Saba H, Mitchell T, Megyesi JK, Brock RW, MacMillan-Crow L. Alteration of renal respiratory Complex-III during experimental type-1 diabetes. *BMC Endocr Disord*. 2009;9(1):2.
 251. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000Apr.13;404(6779):787–90.
 252. Sheetz MJ, King GL. Molecular Understanding of Hyperglycemia's Adverse Effects for Diabetic Complications. *JAMA*. 2002Nov.26;288(20):2579–88.
 253. Remor AP, de Matos FJ, Ghisoni K, da Silva TL, Eidt G, Búrigo M, et al. Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: Involvement of advanced glycosylated end products. *BBA - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V; 2011Nov.1;1812(11):1460–71.
 254. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006Apr.;212(2):167–78.
 255. Herlein JA, Fink BD, Henry DM, Yorek MA, Teesch LM, Sivitz WI. Mitochondrial superoxide and coenzyme Q in insulin-deficient rats: increased electron leak. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011Dec.5;301(6):R1616–24.
 256. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med. Mass Medical Soc*; 2004;350(7):664–71.
 257. Oliveira PJ, Seiça R, Coxito PM, Rolo AP, Palmeira CM, Santos MS, et al. Enhanced permeability transition explains the reduced calcium uptake in cardiac mitochondria from streptozotocin-induced diabetic rats. *FEBS Letters*. 2003Nov.20;554(3):511–4.
 258. Sloan RC, Moukdar F, Frasier CR, Patel HD, Bostian PA, Lust RM, et al. Mitochondrial permeability transition in the diabetic heart: Contributions of thiol redox state and mitochondrial calcium to augmented reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Ltd; 2012May1;52(5):1009–18.
 259. Kristal BS, Matsuda M, Yu BP. Abnormalities in the mitochondrial permeability transition in diabetic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1996May15;222(2):519–23.
 260. Lumini-Oliveira J, Ascensão A, Pereira CV, Magalhães S, Marques F, Oliveira PJ, et al. Long-term hyperglycaemia decreases gastrocnemius susceptibility to permeability transition. *European Journal of Clinical Investigation*. 2010Apr.;40(4):319–29.
 261. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseume E, Chauvin M-A, Morio B, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J. Clin. Invest*. 2008Jan.10.
 262. Anderson EJ, Kypson AP, Rodriguez E, Anderson CA, Lehr EJ, Neuffer PD. Substrate-Specific Derangements in Mitochondrial Metabolism and Redox Balance in

- the Atrium of the Type 2 Diabetic Human Heart. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009Nov.;54(20):1891–8.
263. Mogensen M, Sahlin K, Fernstrom M, Glinborg D, Vind BF, Beck-Nielsen H, et al. Mitochondrial Respiration Is Decreased in Skeletal Muscle of Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2007Mar.27;56(6):1592–9.
 264. Chen H, Shen W-L, Wang X-H, Chen H-Z, Gu J-Z, Fu J, et al. PARADOXICALLY ENHANCED HEART TOLERANCE TO ISCHAEMIA IN TYPE 1 DIABETES AND ROLE OF INCREASED OSMOLARITY. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006Oct.;33(10):910–6.
 265. Tosaki A, Engelman DT, Engelman RM, Das DK. The evolution of diabetic response to ischemia/reperfusion and preconditioning in isolated working rat hearts. *Cardiovascular Research*. Oxford University Press; 1996;31(4):526.
 266. Kersten JR, Toller WG, Warltier DC, 5. Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2000Mar.31;278(4):H1218–24.
 267. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002May15;287(19):2570–81.
 268. Py G, Lambert K, Milhavet O, Eydoux N, Pr eacute faut C, Mercier J. Effects of streptozotocin-induced diabetes on markers of skeletal muscle metabolism and monocarboxylate transporter 1 to monocarboxylate transporter 4 transporters. *Metabolism*. 2002Jul.;51(7):807–13.
 269. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ*. 1998Sep.12;317(7160):703–13.
 270. ADVANCE Collaborative Group, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med*. 2008Jun.12;358(24):2560–72.
 271. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. Diabetes Abolishes Morphine-Induced Cardioprotection via Multiple Pathways Upstream of Glycogen Synthase Kinase-3. *Diabetes*. 2007Jan.1;56(1):127–36.
 272. Przyklenk K, Maynard M, Greiner DL, Whittaker P. Cardioprotection with postconditioning: loss of efficacy in murine models of type-2 and type-1 diabetes. *Antioxid. Redox Signal*. 2011Mar.1;14(5):781–90.
 273. Gu W, Kehl F, Krolkowski JG, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. Simvastatin restores ischemic preconditioning in the presence of hyperglycemia through a nitric oxide-mediated mechanism. *Anesthesiology*. 2008Apr.;108(4):634–42.
 274. Raphael J, Gozal Y, Navot N, Zuo Z. Hyperglycemia inhibits anesthetic-induced postconditioning in the rabbit heart via modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and endothelial nitric oxide synthase signaling. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2010Apr.;55(4):348–57.
 275. Ghaboura N, Tamareille S, Ducluzeau P-H, Grimaud L, Loufrani L, Croué A, et al.

- Diabetes mellitus abrogates erythropoietin-induced cardioprotection against ischemic-reperfusion injury by alteration of the RISK/GSK-3 β signaling. *Basic Res Cardiol.* 2010Oct.28;106(1):147–62.
276. Yadav HN, Singh M, Sharma PL. Involvement of GSK-3 β in attenuation of the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in diabetic rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* 2010May30;343(1-2):75–81.
277. Winker MA. Aging in the 21st century: a call for papers. *Arch. Neurol.* 2002Apr.;59(4):518–9.
278. Hernández-Vaquero D, Fernández-Carreira JM, Pérez-Hernández D, Fernández-Lombardía J, García-Sandoval MA. Total knee arthroplasty in the elderly. Is there an age limit? *J Arthroplasty.* 2006Apr.;21(3):358–61.
279. Mitchell GF. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. *J. Appl. Physiol.* 2008Nov.;105(5):1652–60.
280. Bertoldi D, Parzy E, Fromes Y, Wary C, Leroy-Willig A, Carlier PG. New insight into abnormal muscle vasodilatory responses in aged hypertensive rats by in vivo nuclear magnetic resonance imaging of perfusion. *J. Vasc. Res.* 2006;43(2):149–56.
281. Sniecinski R, Liu H. Reduced efficacy of volatile anesthetic preconditioning with advanced age in isolated rat myocardium. *Anesthesiology.* 2004Mar.;100(3):589–97.
282. Thaveau F, Zoll J, Bouitbir J, Ribera F, Di Marco P, Chakfe N, et al. Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J. Surg. Res.* 2009Jul.;155(1):65–9.
283. Noll E, Bouitbir J, Collange O, Zoll J, Charles AL, Thaveau F, et al. Local but not Systemic Capillary Lactate is a Reperfusion Biomarker in Experimental Acute Limb Ischaemia. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* Elsevier Ltd; 2012Jan.7;:1–2.
284. Zoll J. ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *Journal of Applied Physiology.* 2006Apr.6;101(2):385–91.
285. Mülsch A, Oelze M, Klöss S, Mollnau H, Töpfer A, Smolenski A, et al. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation.* 2001May1;103(17):2188–94.
286. Swartz HM, Khan N, Khramtsov VV. Use of Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy to Evaluate the Redox State In Vivo. *Antioxid. Redox Signal.* 2007Oct.;9(10):1757–72.
287. Vergely C, Maupoil V, Clermont G, Bril A, Rochette L. Identification and quantification of free radicals during myocardial ischemia and reperfusion using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003Dec.15;420(2):209–16.
288. Karlsson LO, Zhou A-X, Larsson E, Aström-Olsson K, Månsson C, Akyürek LM, et

- al. Cyclosporine does not reduce myocardial infarct size in a porcine ischemia-reperfusion model. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2010May31;15(2):182–9.
289. Alcelik I, Pollock RD, Sukeik M, Bettany-Saltikov J, Armstrong PM, Fisser P. A comparison of outcomes with and without a tourniquet in total knee arthroplasty: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Arthroplasty*. 2012Mar.;27(3):331–40.
290. Tran TP, Tu H, Pipinos II, Muelleman RL, Albadawi H, Li Y-L. Tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscles: Involvement of superoxide. *Eur. J. Pharmacol.* 2011Jan.10;650(1):328–34.
291. Huda R, Solanki DR, Mathru M. Inflammatory and redox responses to ischaemia/reperfusion in human skeletal muscle. *Clin. Sci.* 2004Nov.;107(5):497–503.
292. Crawford RS, Hashmi FF, Jones JE, Albadawi H, McCormack M, Eberlin K, et al. A novel model of acute murine hindlimb ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007Feb.;292(2):H830–7.
293. Brown GC, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004Jul.23;1658(1-2):44–9.
294. Dube H, Selwood D, Malouitre S, Capano M, Simone MI, Crompton M. A mitochondrial-targeted cyclosporin A with high binding affinity for cyclophilin D yields improved cytoprotection of cardiomyocytes. *Biochem. J.* 2012Jan.16;441(3):901–7.
295. Lille ST, Lefler SR, Mowlavi A, Suchy H, Boyle EM, Farr AL, et al. Inhibition of the initial wave of NF-kappaB activity in rat muscle reduces ischemia/reperfusion injury. *Muscle Nerve.* 2001Apr.;24(4):534–41.
296. Ascer E, Mohan C, Gennaro M, Cupo S. Interleukin-1 and thromboxane release after skeletal muscle ischemia and reperfusion. *Ann Vasc Surg.* 1992Jan.;6(1):69–73.
297. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2002Feb.;282(2):C227–41.
298. Sullivan PG, Rabchevsky AG, Hicks RR, Gibson TR, Fletcher-Turner A, Scheff SW. Dose-response curve and optimal dosing regimen of cyclosporin A after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience.* 2000;101(2):289–95.
299. Troitzsch D, Vogt S, Abdul-Khaliq H, Moosdorf R. Muscle tissue oxygen tension and oxidative metabolism during ischemia and reperfusion. *J. Surg. Res.* 2005Sep.;128(1):9–14.
300. Hess ML, Manson NH. Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 1984Oct.31;16(11):969–85.
301. Baudry N, Laemmel E, Vicaut E. In vivo reactive oxygen species production induced by ischemia in muscle arterioles of mice: involvement of xanthine oxidase and

- mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008Feb.;294(2):H821–8.
302. Leger P-L, De Paulis D, Branco S, Bonnin P, Couture-Lepetit E, Baud O, et al. Evaluation of cyclosporine A in a stroke model in the immature rat brain. *Experimental Neurology*. 2011Jul.;230(1):58–66.
303. Makris KI, Nella AA, Zhu Z, Swanson SA, Casale GP, Gutti TL, et al. Mitochondriopathy of Peripheral Arterial Disease. *Vascular*. 2007Dec.1;15(6):336–43.
304. Scheff SW, Sullivan PG. Cyclosporin A significantly ameliorates cortical damage following experimental traumatic brain injury in rodents. *J. Neurotrauma*. 1999Sep.;16(9):783–92.
305. Luke DR, Brunner LJ, Vadiiei K. Bioavailability assessment of cyclosporine in the rat. Influence of route of administration. *Drug Metab. Dispos.* 1990Mar.;18(2):158–62.
306. Vianello A, Macri F, Braidot E, Mokhova EN. Effect of cyclosporin A on energy coupling in pea stem mitochondria. *FEBS Letters*. 1995Sep.11;371(3):258–60.
307. Eberlin KR, McCormack MC, Nguyen JT, Tatlidede HS, Randolph MA, Austen WG Jr. Ischemic Preconditioning of Skeletal Muscle Mitigates Remote Injury and Mortality. *Journal of Surgical Research*. 2008Jul.;148(1):24–30.
308. Argaud L, GATEAUROESCH O, MUNTEAN D, CHALABREYSSE L, LOUFOUAT J, ROBERT D, et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2005Feb.;38(2):367–74.
309. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2006May;1757(5-6):509–17.
310. Guo X-S, Li Y-Z, Liu X-H, Zhang Z-Y, Liu F-Y, Hu W-C. Calcineurin Mediates the Protective Effect of Postconditioning on Skeletal Muscle. *Shock*. 2011Sep.;36(3):312–6.
311. D'Angelo G, Duplan E, Vigne P, Frelin C. Cyclosporin A prevents the hypoxic adaptation by activating hypoxia-inducible factor-1alpha Pro-564 hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 2003Apr.25;278(17):15406–11.
312. Qi WN. Reperfusion injury in skeletal muscle is reduced in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Journal of Applied Physiology*. 2004May14;97(4):1323–8.
313. Chan RK, Verna N, Afnan J, Zhang M, Ibrahim S, Carroll MC, et al. Attenuation of skeletal muscle reperfusion injury with intravenous 12 amino acid peptides that bind to pathogenic IgM. *Surgery*. 2006Feb.;139(2):236–43.
314. Weiser MR, Williams JP, Moore FD, Kobzik L, Ma M, Hechtman HB, et al. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *J. Exp. Med.* 1996May1;183(5):2343–8.
315. LIM S, DAVIDSON S, HAUSENLOY D, YELLON D. Preconditioning and

- postconditioning: The essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research*. 2007Aug.1;75(3):530–5.
316. Chan RK, Ibrahim SI, Takahashi K, Kwon E, McCormack M, Ezekowitz A, et al. The differing roles of the classical and mannose-binding lectin complement pathways in the events following skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J. Immunol*. 2006Dec.1;177(11):8080–5.
 317. Csukly K. Muscle denervation promotes opening of the permeability transition pore and increases the expression of cyclophilin D. *The Journal of Physiology*. 2006Feb.16;574(1):319–27.
 318. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock*. 2004May;21(5):401–9.
 319. Hughes K, Antonsson A, Grundström T. Calmodulin dependence of NFkappaB activation. *FEBS Letters*. 1998Dec.11;441(1):132–6.
 320. Farivar AS, Mackinnon-Patterson BC, Barnes AD, McCourtie AS, Mulligan MS. Cyclosporine Modulates the Response to Hypoxia-Reoxygenation in Pulmonary Artery Endothelial Cells. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2005Mar.;79(3):1010–6.
 321. Miki T, Itoh T, Sunaga D, Miura T. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular Diabetology*. 2012;11(1):67.
 322. Alkharfy KM. Influence of Overt Diabetes Mellitus on Cyclosporine Pharmacokinetics in a Canine Model. *Experimental Diabetes Research*. 2009;2009:1–6.
 323. Huhn R, Heinen A, Hollmann MW, Schlack W, Preckel B, Weber NC. Cyclosporine A administered during reperfusion fails to restore cardioprotection in prediabetic Zucker obese rats in vivo. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. Elsevier Ltd; 2010Dec.1;20(10):706–12.
 324. Ye Y, Perez-Polo JR, Aguilar D, Birnbaum Y. The potential effects of anti-diabetic medications on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 2011Nov.;106(6):925–52.
 325. Huisamen B, Genis A, Marais E, Lochner A. Pre-treatment with a DPP-4 Inhibitor is Infarct Sparing in Hearts from Obese, Pre-diabetic Rats. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010Nov.19;25(1):13–20.
 326. Drenger B, Ostrovsky IA, Barak M, Nechemia-Arbely Y, Ziv E, Axelrod JH. Diabetes blockade of sevoflurane postconditioning is not restored by insulin in the rat heart: phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated inhibition. *Anesthesiology*. 2011Jun.;114(6):1364–72.
 327. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Carr RD, Yellon DM. Preconditioning the diabetic heart: the importance of Akt phosphorylation. *Diabetes*. 2005Aug.;54(8):2360–4.
 328. Sivaraman V, Hausenloy DJ, Wynne AM, Yellon DM. Preconditioning the diabetic

- human myocardium. *J. Cell. Mol. Med.* 2010Jun.;14(6B):1740–6.
329. Lemoine S, Durand C, Zhu L, Ivasceau C, Lepage O, Babatasi G, et al. Desflurane-induced postconditioning of diabetic human right atrial myocardium in vitro. *Diabetes & Metabolism.* 2010Feb.;36(1):21–8.
330. Liu K-X, Xia Z. Potential synergy of antioxidant N-acetylcysteine and insulin in restoring sevoflurane postconditioning cardioprotection in diabetes. *Anesthesiology.* 2012Feb.;116(2):488–9–authorreply489–90.
331. Wang T, Qiao S, Lei S, Liu Y, Ng KFJ, Xu A, et al. N-acetylcysteine and allopurinol synergistically enhance cardiac adiponectin content and reduce myocardial reperfusion injury in diabetic rats. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e23967.
332. Krolkowski JG, Bienengraeber M, Weihrauch D, Wartier DC, Kersten JR, Pagel PS. Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial KATP channels. *Anesthesia & Analgesia.* 2005Dec.;101(6):1590–6.
333. Huhn R, Heinen A, Weber NC, Hollmann MW, Schlack W, Preckel B. Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore. *British Journal of Anaesthesia.* 2008Mar.16;100(4):465–71.
334. LIU L, ZHU J, BRINK PR, GLASS PSA, REBECCHI MJ. Age-associated differences in the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by cyclosporine A. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica.* 2011Apr.11;55(5):622–30.
335. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 1993Dec.;25(12):1461–9.
336. Molpeceres J, Chacón M, Guzmán M, Aberturas MR, Berges L. Dependency of cyclosporine tissue distribution and metabolism on the age and gender of rats after a single intravenous dose. *Int J Pharm.* 2000Mar.20;197(1-2):129–41.
337. Mather M, Rottenberg H. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000Jul.5;273(2):603–8.
338. Boengler K, Schulz R, Heusch G. Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovascular Research.* 2009Jun.25;83(2):247–61.
339. Palomero J, Galán AI, Muñoz ME, Tuñón MJ, González-Gallego J, Jiménez R. Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin A in rats. Changes in liver glutathione and antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine.* 2001Apr.15;30(8):836–45.
340. Abete P, Ferrara N, Cacciatore F, Madrid A, Bianco S, Calabrese C, et al. Angina-induced protection against myocardial infarction in adult and elderly patients: a loss of preconditioning mechanism in the aging heart? *JAC.* 1997Oct.;30(4):947–54.
341. Dow J, Bhandari A, Kloner RA. Ischemic Postconditioning's Benefit on Reperfusion Ventricular Arrhythmias Is Maintained in the Senescent Heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics.* 2008Jun.1;13(2):141–8.

342. Boengler K, Buechert A, Heinen Y, Roeskes C, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, et al. Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice. *Circ. Res.* 2008Jan.4;102(1):131–5.
343. Przyklenk K, Maynard M, Darling CE, Whittaker P. Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with post-conditioning. *Journal of the American College of Cardiology.* 2008Apr.8;51(14):1393–8.
344. CHANG DJ, CHANG CH, KIM JS, HONG YW, LEE WK, SHIM YH. Isoflurane-induced post-conditioning in senescent hearts is attenuated by failure to activate reperfusion injury salvage kinase pathway. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica.* 2012May9;;n/a–n/a.

ANNEXES

Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping

Julien Pottecher, MD, PhD,^{a,b} Max Guillot, MD,^{b,c} Elise Belaidi, PhD,^d Anne-Laure Charles, PhD,^{b,c} Anne Lejay, MD,^{b,f} Abdallah Gharib, PhD,^d Pierre Diemunsch, MD, PhD,^{a,b} and Bernard Geny, MD, PhD,^{b,c} *Strasbourg and Lyon, France*

Objective: By binding to cyclophilin D, cyclosporine A (CsA) inhibits mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening and prevents mitochondrial dysfunction and ultimately cell death after ischemia-reperfusion (IR) injury in cardiac muscle. This study tested whether CsA would decrease skeletal muscle oxidative stress and mitochondrial dysfunctions after aortic cross-clamping related IR.

Methods: Forty-five Wistar rats were investigated. The sham group (n = 8) had aortic exposure but no ischemia, the IR group (n = 10) had aortic cross-clamping for 3 hours followed by 2 hours of reperfusion, and the IR+CsA group (n = 9) had two intraperitoneal injections of 10 mg of CsA at 90 and 150 minutes of ischemia before reperfusion. Mitochondrial coupling (acceptor control ratio) and mitochondrial respiratory chain complexes' activities were measured. Reactive oxygen species (ROS) production, cyclophilin D expression, and muscle inflammation were determined using dihydroethidium staining, Western blot, and immunohistochemistry, respectively. An additional 18 sham rats were investigated to determine CsA blood levels and the effects of CsA on mitochondrial respiration and calcium retention capacity, a marker of mPTP opening, both in myocardium and gastrocnemius with and without CsA.

Results: Compared with sham, IR decreased mitochondrial coupling (1.38 ± 0.06 vs 1.98 ± 0.20 ; $P = .0092$), increased ROS production (3992 ± 706 arbitrary units [AU] vs 1812 ± 322 AU; $P = .033$), was associated with macrophage infiltration, and decreased maximal oxidative capacity (V_{\max} : 4.08 ± 0.38 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ vs 5.98 ± 0.56 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$; $P = .015$). Despite IR, CsA treatment totally restored mitochondrial coupling (1.93 ± 0.12 ; $P = .023$ vs IR), normalized ROS (1569 ± 348 AU; $P = .0098$ vs IR), and decreased inflammation. The V_{\max} was slightly enhanced (5.02 ± 0.39 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$; $P = .33$ vs IR; $P = .35$ vs sham). Compared with myocardium, gastrocnemius muscle was characterized by a decreased cyclophilin D content (-50%) associated with an earlier opening of mPTP (calcium retention capacity increased from 10.85 ± 1.35 $\mu\text{M}/\text{mg}$ dry weight [DW] to 12.11 ± 2.77 $\mu\text{M}/\text{mg}$ DW; $P = .65$; and from 11.07 ± 1.67 to 37.65 ± 11.41 $\mu\text{M}/\text{mg}$ DW; $P = .0098$ in gastrocnemius and heart, respectively).

Conclusions: Cyclosporine A normalized ROS production, decreased inflammation, and restored mitochondrial coupling during aortic cross-clamping. Incomplete V_{\max} protection might be due to low cyclophilin D expression in gastrocnemius, preventing CsA from blocking mPTP opening. (J Vasc Surg 2013;■:1-9.)

Clinical Relevance: Aortic cross-clamping increases reactive oxygen species production and impairs skeletal muscle mitochondrial function. Even subtle muscle impairments may increase morbidity after abdominal aortic aneurysm repair, supporting a need for muscle protection during vascular surgery. Albeit its protective effects might be related to muscle content in cyclophilin D, this study demonstrates that cyclosporine A significantly alleviates ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. Because cyclosporine A can be used safely in humans, it might be an alternative or a synergistic therapeutic approach to ischemic preconditioning in order to reduce mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species production in vascular patients undergoing aortic cross-clamping.

From Pôle Anesthésie Réanimation Chirurgicale, SAMU, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg,^a Equipe d'Accueil 3072, Institut de Physiologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg,^b and Service de Réanimation Médicale, Hôpital de Hautepierre,^c Strasbourg; Inserm U1060, Laboratoire CarMeN, Université Lyon 1, Lyon^d; and Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Pôle de Pathologie Thoracique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg,^e and Service de Chirurgie Cardiovasculaire, Pôle de Cardiologie, Hôpitaux Universitaires, CHRU de Strasbourg,^f Strasbourg.

Author conflict of interest: none.

Additional material for this article may be found online at www.jvascsurg.org.

Reprint requests: Professeur Bernard Geny, Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles et Equipe d'Accueil 3072, Université et Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France (e-mail: Bernard.geny@chru-strasbourg.fr).

The editors and reviewers of this article have no relevant financial relationships to disclose per the JVS policy that requires reviewers to decline review of any manuscript for which they may have a conflict of interest.

0741-5214/\$36.00

Copyright © 2013 by the Society for Vascular Surgery.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2012.09.020>

Open abdominal aortic aneurysm repair is a surgical intervention commonly carried out in high-risk surgical patients with advanced cardiovascular disease and complicated outcomes.¹ It requires aortic cross-clamping, which induces skeletal muscle ischemia-reperfusion (IR) injury that largely participates in perioperative and long-term morbidity.^{2,3} Several mechanisms are involved in these alterations, with key factors being increased reactive oxygen species (ROS) production and impaired mitochondrial function. Particularly, the mitochondrion is a central player in cell survival. Indeed, mitochondria are the source of adenosine triphosphate (ATP) storage, the main core of ROS generation⁴ and the mainstay of apoptosis regulation. At the same time, the mitochondria are an early target of IR mechanisms. Indeed, ROS overproduction mediates IR-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscles.⁵ Molecular pathways then converge to a mitochondrial key target, the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), whose opening causes both cell necrosis and apoptosis.⁶

In order to rescue skeletal muscle from infarction, local and remote ischemic preconditioning equivalently protected muscles' mitochondrial function against IR-induced injury.⁷ Ischemic postconditioning, characterized by repeated cycles of IR performed at the onset of reperfusion, was also thought to be protective, but recent data suggest it should be used with caution.^{8,9} Furthermore, repetitive vascular clamping in atherosclerotic patients is neither always feasible nor devoid of side effects,¹⁰ so there is obviously a need for an alternative approach.

Pharmacologic conditioning is an option, and cyclosporine A (CsA), a potent mPTP opening inhibitor, is extremely powerful in protecting cardiomyocytes from IR.¹¹ Indeed, CsA binds to cyclophilin D and inhibits mPTP opening, preventing mitochondrial dysfunction, oxidative phosphorylation uncoupling, and ultimately cell death.¹² Cyclophilins are ubiquitous proteins, highly conserved during evolution and identified in the genomes of mammals, plants, insect, fungi, and bacteria.¹³ This suggests that CsA effects should also be observed in a variety of tissues, including human tissues. Other intracellular mechanisms also could be at play. Thus, reduced ROS production and reduced inflammation potentially might participate in CsA biologic effects.¹⁴ Recently, Askar and Bozkurt¹⁵ administered CsA before femoral occlusion and observed decreased numbers of rolling, sticking, and transmigrating neutrophils in skeletal muscles submitted to 4 hours of ischemia and 24 hours of reperfusion. Importantly, acute CsA administration should not be associated with deleterious effects linked to persistent immunosuppression. Thus, short-term CsA does not affect cutaneous or musculo-fascial wound healing in clinically relevant dose.¹⁶

The aim of this study was to test the hypothesis that, by preventing mPTP opening, CsA would preserve mitochondrial coupling and mitochondrial complex activities, and decrease ROS production and inflammation in gastrocnemius muscles submitted to IR. To obtain further insight into the mechanisms involved in CsA effects, we also investigated whether cyclophilin D expression and mPTP

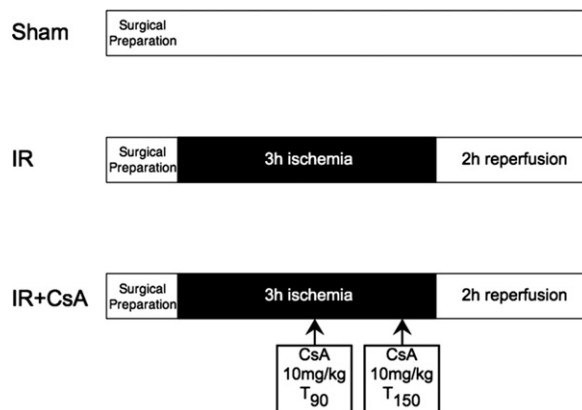


Fig 1. Experimental design. Sham animals (*Sham*; $n = 8$) underwent 5 hours of general anesthesia and were sham operated. Ischemia-reperfusion animals (*IR*; $n = 10$) underwent 3 hours of ischemia induced by infrarenal aortic occlusion, followed by 2 hours of reperfusion. Cyclosporine-conditioned rats (*IR+CsA*; $n = 9$) also underwent 3 hours of ischemia, but complete reperfusion was preceded by two intraperitoneal cyclosporine A (CsA) injections (10 mg/kg each) at 90 and 150 minutes of ischemia.

opening might differ in myocardium and gastrocnemius muscles.

METHODS

Procedures were conducted in accordance with U.S. National Institutes of Health guidelines.

Animals. Experiments were performed on adult male Wistar rats (Dépre, Saint Doulchard, France) weighing 250 to 300 g. Animals were housed in a neutral temperature environment ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) on a 12:12 hour photoperiod and were provided food and water ad libitum.

Preoperative management. Rats were anesthetized with a gas mixture containing 4% isoflurane and oxygen, in a hermetic anesthetic induction cage (Aerrane; CSP, Cournon, France). Spontaneous ventilation was allowed through an oxygen-delivering mask, with different concentrations of isoflurane depending on the surgical phase (2% during painful stimuli and 1% during latent periods). The rat's temperature was maintained constant at 37°C using blanket control (homeothermic blanket control unit; MINERVE, Esternay, France) and monitored with rectal probe.

Surgical procedure and experimental design. Twenty-seven rats were divided into three groups (Fig 1). The sham group ($n = 8$) underwent 5 hours of isoflurane anesthesia. A midline laparotomy was performed. The posterior peritoneum was cut to expose the abdominal aorta and the inferior vena cava. Infrarenal abdominal aorta was dissected and liberated from adjacent adhesions in all animals.

The IR group ($n = 10$) underwent 3 hours of ischemia induced by infrarenal aortic occlusion and collateral vessels ligation, followed by 2 hours of reperfusion. The aorta was temporally occluded using a DeBakey cross-action bulldog clamp, and all arterial collaterals located between the renal

arteries and the aortic bifurcation were coagulated and cut using a thermal cautery (Geiger thermal cautery unit; Geiger Medical Technologies, Council Bluffs, Iowa), as previously reported.^{7,8} After aortic clamping, the abdomen was tightly closed to prevent dehydration. Ischemia was clinically characterized by cyanosis and lack of arterial pulse distal to the clamp. It was also ascertained by capillary lactate measurements on the right foot before unclamping (Lactate Pro device, LT1710; Arkray, KGK, Kyoto, Japan).¹⁷ Lactates are end products of cellular anaerobic energetic metabolism, a key biomarker of tissue hypoxia. Using the same aortic clamping model, we observed increased lactates and decreased skeletal muscle mitochondrial function, objectifying the degree of limb ischemia.^{7,8}

The CsA-conditioned rats (IR+CsA; n = 9) also underwent 3 hours of ischemia, but complete reperfusion was preceded by two intraperitoneal 10 mg/kg CsA injections (Sandimmun; Novartis-Pharma SAS, Rueil-Malmaison, France) at 90 and 150 minutes of ischemia. Dose, administration route, and timing were selected based on CsA pharmacokinetic properties and protective doses in rats.^{18,19} Translated to IR protocols, an optimal CsA level was expected at the time of reperfusion, albeit a further increase might occur until the end of the experiment.^{18,20}

We additionally included 18 sham rats (seven treated with CsA, 11 untreated) to determine the effects of the same CsA injections on mitochondrial respiration and calcium retention capacity (CRC), a marker of mPTP opening. In the two groups, CRC was assessed in both myocardium and gastrocnemius muscles, and mitochondrial respiration was determined in gastrocnemius muscle.

Blood CsA assay. Blood samples (500 μ L) from additional CsA-treated sham rats were drawn from the internal jugular vein on ethylenediaminetetraacetic acid tubes after 3 hours of general anesthesia when blood CsA near peaked and analyzed using the MassTox reagent kit (Chromsystems, Munich, Germany) as described in the Appendix (online only).

Tissue processing. At the end of the experiment, white superficial gastrocnemius muscles were excised and cleaned of adipose and connective tissue. One part was kept on ice and immediately used for studying mitochondrial respiration in skinned fibers. Delay between excision and beginning of analysis remained <20 minutes, thus avoiding secondary ischemia. The second part was immediately frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen and stored for subsequent analysis.

Study of muscle mitochondrial respiration in skinned fibers. Mitochondrial respiration was studied in saponin-skinned fibers, as previously described.⁹ Measuring oxygen consumption *ex vivo* in skinned fibers is a unique way to determine the functional oxidative capacity of skeletal muscle, allowing the study of the entire mitochondrial population within its cellular environment.

Briefly, fibers were separated, then permeabilized, in a bath of solution containing 50 μ g/mL saponin for 30 minutes at 4°C, under shaking. The permeabilized fibers then were washed for 10 minutes under shaking in order to

remove saponin. Fibers were placed in a bath with the respiratory solution for 5 minutes twice in order to remove any phosphates. Finally, oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type electrode in a 3-mL oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Scotland).

Basal oxygen consumption (V_0), and maximal fiber respiration (V_{max}) rates were measured at 22.1°C under continuous stirring in the presence of saturating amount of adenosine diphosphate (ADP) as a phosphate acceptor. Relative contributions of the respiratory chain complexes I, III, and IV to the global mitochondrial respiratory rates also were determined. When V_{max} was recorded, electron flow went through complexes I, III, and IV. Complex I was blocked with amobarbital (Amytal; 0.02 mM), and complex II was stimulated with succinate (25 mM). Mitochondrial respiration then allowed determination of complex II, III, and IV activities (V_{succ}). N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD; 0.5 mM) and ascorbate (0.5 mM) were added as artificial electron donors to cytochrome c. Under these conditions, the activity of cytochrome c oxidase (complex IV) was determined as an isolated step of the respiratory chain ($V_{TMPD/Asc}$). Mitochondrial coupling (coupling of phosphorylation to oxidation) was determined by calculating the acceptor control ratio (ACR), the ratio between ADP-stimulated respiration (V_{max}) over basal respiration (without ADP) with glutamate and malate as substrate (V_0). Fibers were then harvested and dried for 15 minutes at 150°C. Respiration rates are expressed as μ mol O_2 /min/g dry weight (DW).

Dihydroethidium staining. To detect the presence of ROS in skeletal muscles, serial sections (10 μ m thick) were cut on a cryostat microtome and incubated with dihydroethidium (DHE), which produces red fluorescence when oxidized to ethidium bromide by ROS including superoxide anion (see Appendix, online only).

Immunohistochemical procedure. To detect gastrocnemius inflammation, we used monocyte macrophage-2 (Millipore, Billerica, Mass) antibody on 10- μ m-thick serial sections of muscles (see Appendix, online only).⁹

Study of cyclophilin D expression in gastrocnemius and myocardium. Cyclophilin D expression (relative to β -actin) was measured by Western blot (Appendix, online only).

Calcium retention capacity measurements in gastrocnemius and myocardium. The resistance of mPTP to opening after matrix Ca^{2+} challenge was determined in permeabilized "ghost" muscle fibers, characterized by a lack of myosin, allowing Ca^{2+} uptake only by mitochondria and prepared as described in the Appendix (online only). The amount of Ca^{2+} necessary to trigger a massive Ca^{2+} release was used as an indicator of the susceptibility of mPTP to Ca^{2+} overload and expressed as μ M/mg DW. The Ca^{2+} concentration was calculated from a standard curve relating $[Ca^{2+}]$ to the fluorescence of calcium green.

Statistical analysis. All data are expressed as mean \pm standard error of the mean and analyzed using the Prism database (GraphPad Prism 5; Graph Pad Software, San

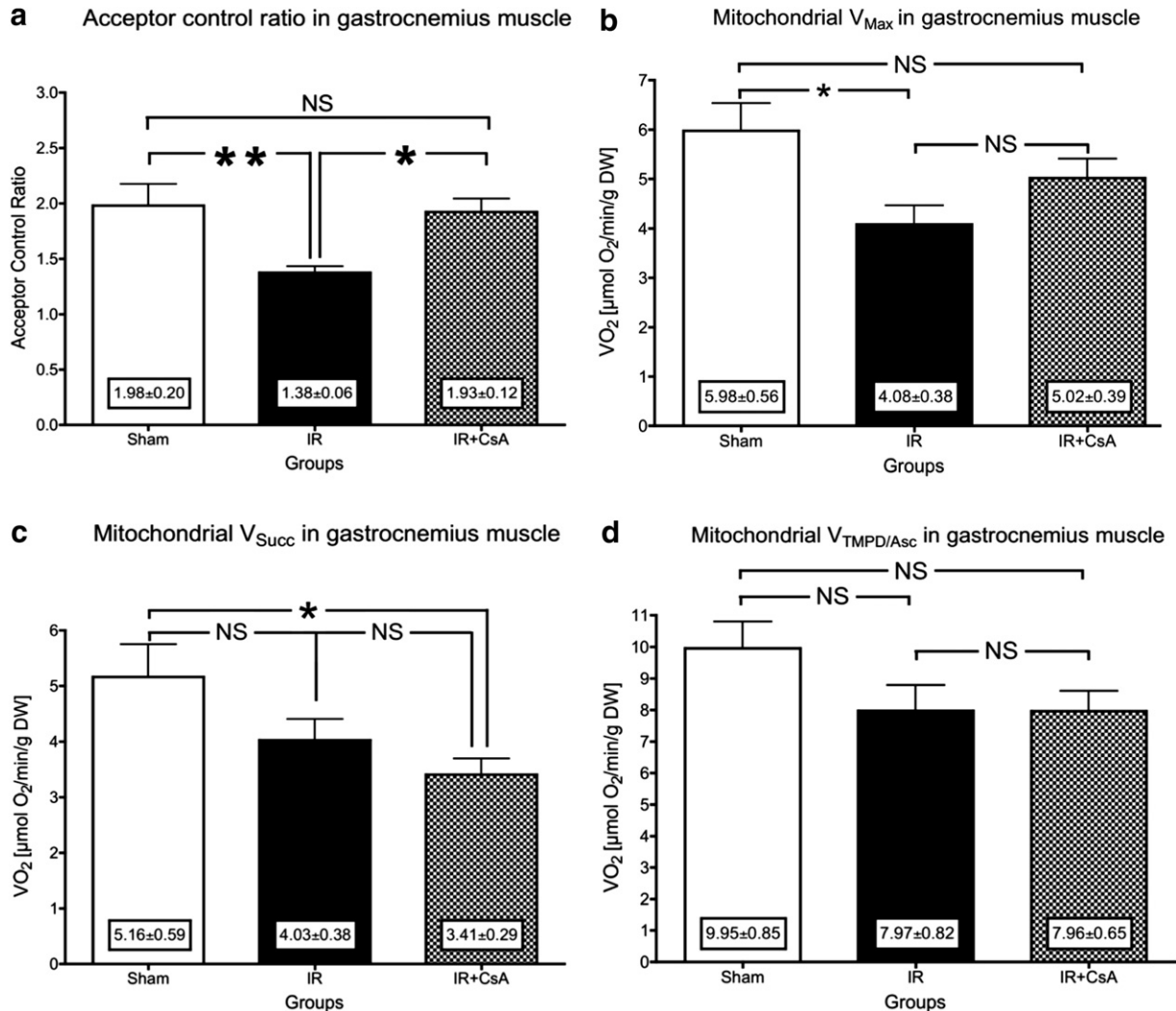


Fig 2. Effects of ischemia-reperfusion (IR) and cyclosporine A (IR+CsA) on mitochondrial coupling and respiratory chain complexes activities. **a**, Acceptor control ratio (ACR). **b**, Maximal fiber mitochondrial respiration rates, complexes I, III, and IV (V_{max}). **c**, Combined activity of mitochondrial complexes II, III, and IV (V_{succ}). **d**, Complex IV activity ($V_{TMPD/Asc}$). NS, Not significant. * $P < .05$; ** $P < .01$.

Diego, Calif). One-way analysis of variance was used in all groups, with post-test analysis between groups using the Newman-Keuls test correcting for multiple comparisons. $P < .05$ (two-tailed) was considered significant. As previously observed, eight to 10 rats per group were required to demonstrate a 30% reduction in mitochondrial function after IR.⁷⁻⁹

RESULTS

Effects of aortic cross-clamping and reperfusion on skeletal muscle mitochondrial function, ROS production, inflammation, and cyclophilin D content. As expected, capillary lactate measurements revealed that aortic cross-clamping significantly increased anaerobic

metabolism in the IR group compared with the sham group (16.6 ± 1.0 mmol/L vs 2.7 ± 0.4 mmol/L, respectively; $P < .0001$).

IR decreased muscle mitochondrial coupling and respiratory chain complexes activities. The ACR was significantly reduced (from 1.98 ± 0.20 to 1.38 ± 0.06 ; -30%; $P = .0092$; Fig 2, a). The V_0 tended to decrease after IR from 3.16 ± 0.34 to 2.96 ± 0.28 μ mol O_2 /min/g DW in sham and IR, respectively. The V_{max} was significantly decreased (from 5.98 ± 0.56 μ mol O_2 /min/g DW to 4.08 ± 0.38 μ mol O_2 /min/g DW; 32%, $P = .015$; Fig 2, b) after 3 hours ischemia and 2 hours reperfusion in gastrocnemius muscle. V_{succ} and $V_{TMPD/Asc}$ decreases were not statistically significant after IR (Fig 2, c and d).

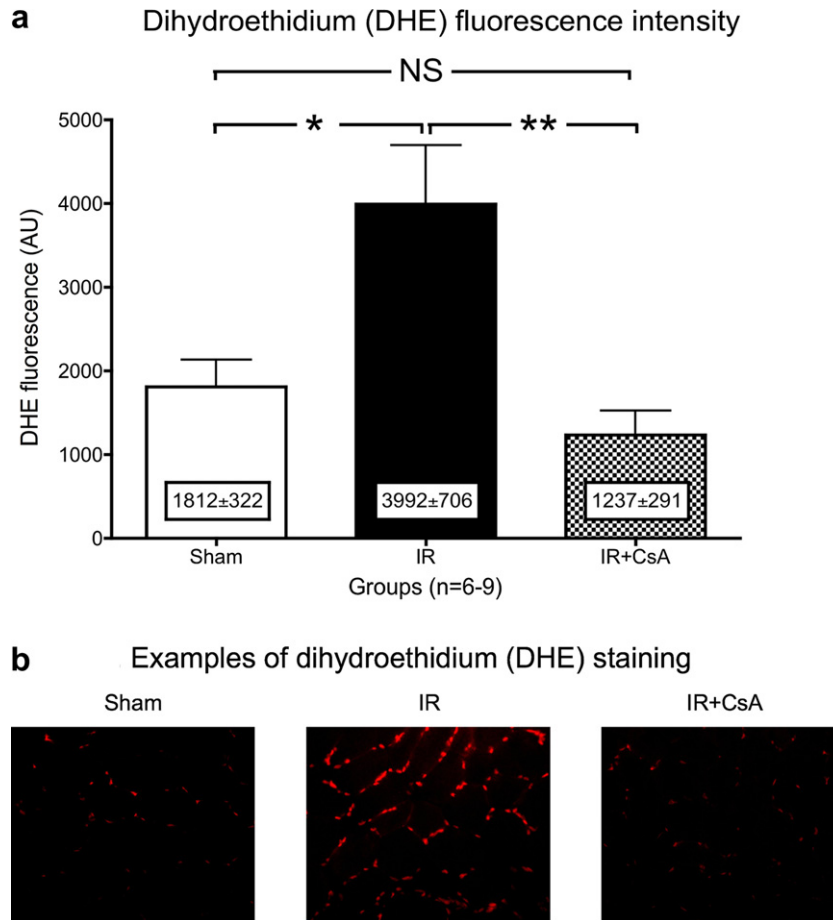


Fig 3. Skeletal muscle production of reactive oxygen species in sham, after ischemia-reperfusion (IR), and after cyclosporine A (IR+CsA). **a**, Dihydroethidium (DHE) fluorescence intensity (arbitrary units [AU]). **b**, Examples of DHE staining. NS, Not significant. * $P < .05$; ** $P < .01$.

IR increased muscle ROS production and inflammation. Hind limb IR led to a significant increase in DHE fluorescence in gastrocnemius sections (from 1812 ± 322 arbitrary units [AU] to 3992 ± 706 AU; +120%; $P = .033$), reflecting an increase in ROS, including superoxide anion generation (Fig 3). Similarly, IR increased macrophage infiltration (Fig 4).

IR did not significantly affect muscle cyclophilin D expression. Cyclophilin D expression (relative to β -actin) in gastrocnemius muscle was not significantly different in IR vs sham animals (1.29 ± 0.14 vs 1.63 ± 0.24 ; $P = .29$).

Effects of CsA in sham rats and on IR-induced deleterious effects

Effects of CsA on normal gastrocnemius muscles. In the additional CsA-treated sham rats, mitochondrial respiratory chain complex activities were not significantly different from their respective values in untreated sham animals (Table, online only).

Cyclosporine A preserved mitochondrial respiratory chain coupling and partly protected complex I activity against IR. Acknowledging that CsA absorption might be modulated by surgical exposure and peritoneal inflammation, in sham, blood CsA concentration was 2420 ± 147 $\mu\text{g/L}$ after 3 hours of general anesthesia. This likely allowed potential biologic effects, as inferred from previous data in the cardiac IR setting.²⁰

Accordingly, CsA conditioning significantly improved the ACR (from 1.38 ± 0.06 to 1.93 ± 0.12 ; $P = .023$ vs IR) and restored its value close to the nonischemic control (1.98 ± 0.20 ; $P = .95$ vs sham; Fig 2, a). Indeed, V_0 tended to be reduced (2.69 ± 0.25 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g DW}$), and V_{max} (5.02 ± 0.39 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g DW}$) tended to be increased compared with the IR group (4.08 ± 0.38 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g DW}$; $P = .33$ vs IR; Fig 2, b).

Concerning V_{succ} , IR alone induced a nonsignificant decrease. Combining IR and CsA rendered the V_{succ} decrease significant compared with control (Fig 2, c). However, V_{succ} was similar when comparing IR and IR+CsA, thus supporting that the decreased activity in

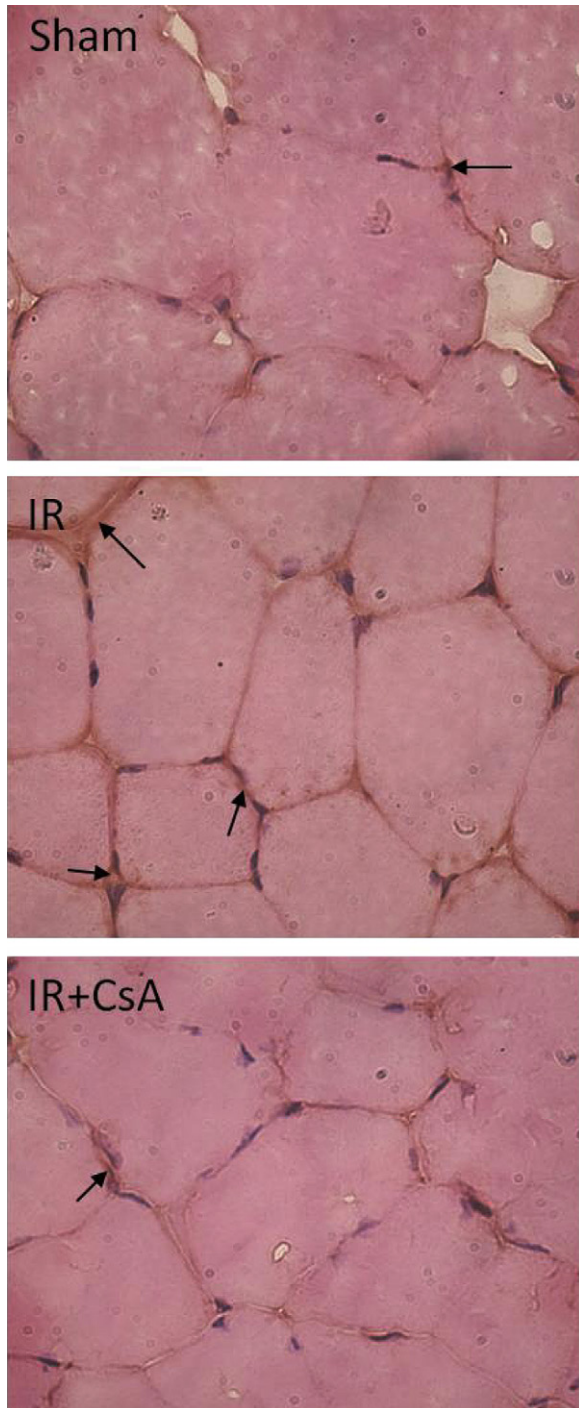


Fig 4. Effects of ischemia-reperfusion (*IR*) and cyclosporine A (*IR+CsA*) on inflammation. Immunohistochemical demonstration of the distribution of macrophages. *Black arrows* indicate the presence of macrophages (original magnification, $\times 400$).

complexes II, III, and/or complex IV after *IR+CsA* was mainly due to *IR*.

Similarly, *CsA* conditioning alone did not induce a significant change in $V_{TMPD/Asc}$ compared with *IR* (Fig 2, *d*).

Taken together, because *CsA* did not increase complex II, III, and IV activities, the beneficial effects observed for V_{max} should be due mainly to an effect on complex I.

Cyclosporine A reduced muscle ROS production and inflammation. The *CsA* conditioning decreased DHE fluorescence in gastrocnemius sections (from 3992 ± 706 AU to 1569 ± 348 AU; $P = .0098$; Fig 3), indicating decreased generation of ROS and therefore decreased oxidative stress in skeletal muscles submitted to *IR*. Macrophage infiltration was also reduced by *CsA* administration (Fig 4).

Mechanisms of *CsA* effects: implication of cyclophilin D content and CRC

Cyclophilin D expression in heart and gastrocnemius muscles. Cyclophilin D expression relative to β -actin was twice as large in myocardium compared with gastrocnemius in sham rats (5.52 ± 0.86 AU vs 2.19 ± 0.38 AU; $P = .009$; Fig 5, *a*).

Functional implication of reduced cyclophilin D content in gastrocnemius: *CsA* reduces CRC in heart but not in gastrocnemius muscle. To investigate whether the decreased level of cyclophilin D expression in gastrocnemius was functional, we tested the resistance of mPTP to opening after matrix Ca^{2+} challenge in heart and gastrocnemius with or without *CsA*. As expected, the Ca^{2+} load required to open the mPTP was significantly increased by *CsA* treatment in myocardium (from 11.07 ± 1.67 μM Ca^{2+}/mg DW to 37.65 ± 11.41 μM Ca^{2+}/mg DW; $P = .0098$). Conversely, the Ca^{2+} load required to open the gastrocnemius mPTP was not different with and without *CsA* (from 10.85 ± 1.35 μM Ca^{2+}/mg DW to 12.11 ± 2.77 μM Ca^{2+}/mg DW; $P = .65$; Fig 5, *b* and *c*), supporting that *CsA* did not modify gastrocnemius mPTP sensitivity to calcium load.

DISCUSSION

This study confirms that *IR* impairs skeletal muscle mitochondrial coupling and respiratory complex activities and increases oxidative stress. Furthermore, after aortic cross-clamping, *CsA* normalizes mitochondrial coupling, ROS production, and macrophage infiltration. *CsA* also partially restores mitochondrial respiratory chain complex activities, likely in relation with gastrocnemius cyclophilin D content.

Human skeletal muscle withstands 2.5 hours of warm global ischemia before histologic injuries appear²¹ and muscular ATP pool is exhausted.²² However, in surgical clinical practice, although 3 hours of aortic clamping time is longer than in most surgical procedures, aortic clamp may be prolonged in robot-assisted laparoscopy and/or by unpredictable complications such as arterial thrombosis and vasospasm. Knowing that even subtle muscle impairments may increase morbidity after abdominal aortic aneurysm repair,² muscle protection during vascular surgery appears mandatory.

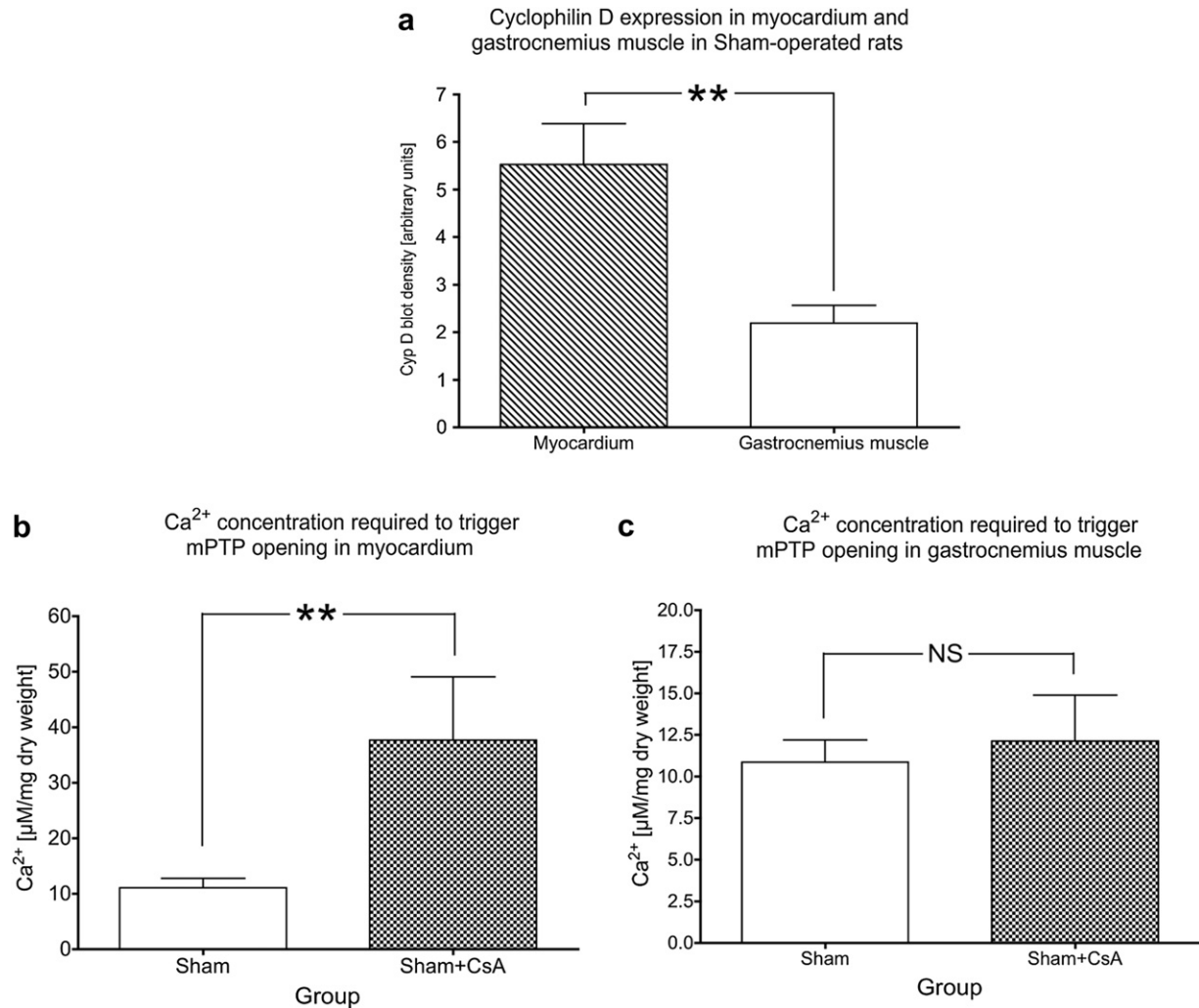


Fig 5. Cyclophilin D expression and Ca^{2+} concentration required to trigger mitochondrial permeability transition pore (*mPTP*) opening in sham heart and gastrocnemius muscles. **a**, Cyclophilin D expression in myocardium and gastrocnemius muscles. **b**, Ca^{2+} concentration required to trigger mPTP opening in myocardium. **c**, Ca^{2+} concentration required to trigger mPTP opening in gastrocnemius muscle. CsA, Cyclosporine A; NS, not significant. $**P < .01$.

Aortic cross-clamping significantly impaired both mitochondrial coupling and mitochondrial oxidative capacity, supporting that mitochondrial respiratory chain dysfunction is a sensitive marker of IR injury. Hind limb IR also increased ROS production, as inferred from the enhanced DHE staining in IR muscle. Similarly, IR increased muscle inflammation. These data, in line with previous results,^{5,8} further support that mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress and inflammation are key factors involved in IR mechanisms.

Several therapies, including controlled reperfusion^{23,24} and ischemic preconditioning^{7,25} and postconditioning,^{8,26} have been shown effective in protecting hind limbs against IR-deleterious effects. Sometimes difficult to apply, such approaches might be associated with or perhaps replaced by easier to perform pharmacologic approaches. Thus, there is a general agreement that pharmacologic

conditioning with CsA is effective in protecting the myocardium from IR injury.^{11,20}

In our study, CsA totally restored mitochondrial coupling. Accordingly, rats fed with CsA 10 mg/kg/d and 25 mg/kg/d for 3 weeks significantly decreased their gastrocnemius V_0 (-40% and -45% , respectively), and CsA dose dependently increased the ACR in gastrocnemius muscles.²⁷ Changes in V_0 were less marked here, perhaps because of the shorter duration of the experiments, but our results are in line with these data.²⁷

Reduced oxidative stress likely participated in CsA beneficial effects, as other protective approaches such as ischemic postconditioning also decrease IR-induced ROS production and muscle mitochondrial dysfunction.^{5,8} Accordingly, a constant cross-talk takes place between the coupling of phosphorylation to oxidation and mitochondrial ROS generation.²⁸ Mitochondrial

dysfunction and ROS generation feed off each other, perpetuating a vicious circle that eventually leads to cell death. As the mitochondrial respiratory chain is disrupted, coupling decreases and more electrons leak; these are involved in the generation of ROS leading to oxidative stress and mPTP opening. In particular, mitochondrial complexes I and III are the main sources of ROS production during IR. However, when glutamate and malate are used as mitochondrial substrates, the major site of ROS production is complex I through reverse flux of electrons from complex II to complex I.²⁹ If CsA preserves complex I function, it prevents further ROS release from this mitochondrial complex. Accordingly, CsA clearly reduced ROS production. This is consistent with a previous study demonstrating that CsA improved ATP generation and decreased muscle myeloperoxidase activity after 4 hours of ischemia and 2 hours of reperfusion.¹⁵ This fact, along with mitochondrial properties of skeletal muscle being preserved in heart transplant recipients, suggests that CsA was not harmful.³⁰

Finally, there are interactions between CsA and inflammation in skeletal muscle. The CsA has been shown to decrease muscular neutrophil infiltration during IR.¹⁵ Accordingly, CsA reduced macrophage infiltration in our study.

Interestingly, however, despite its beneficial effects on mitochondrial coupling and ROS production, CsA only partially protected skeletal muscle maximal oxidative capacity. Several factors might limit CsA efficiency.

CsA vehicle can specifically decrease complex I activity without altering mitochondrial coupling.³¹ Complex I activity of the mitochondrial respiratory chain largely participates in V_{max} , and incomplete restoration of V_{max} might partly be explained by a potential deleterious effect of CsA vehicle on complex I. Nevertheless, such data were obtained in vitro using a concentration range much higher than that used in our study. Compared with peak CsA values observed 3 hours after administration in late heart transplant recipients (808 ± 295 ng/mL), our blood CsA concentrations appeared higher.³² However, they were well within the effective ranges previously demonstrated to protect myocardium from IR injury.²⁰ Furthermore, our additional experiment showed that similar CsA doses did not affect gastrocnemius mitochondrial function. Thus, an alternative explanation should be explored.

CsA cardioprotection is obtained through its binding and inhibition of cyclophilin D, a mitochondrial protein favoring mPTP opening and therefore apoptosis. It is conceivable that CsA protection depends on cyclophilin D content in muscle cells.^{33,34} To further investigate the mechanisms of CsA protective effects, we determined the expression of cyclophilin D in both skeletal and cardiac muscles and measured their CRC, a marker of mPTP opening. Gastrocnemius cyclophilin D expression was decreased compared with myocardium. This was associated with functional changes. Indeed, CsA significantly delayed myocardial mPTP opening in response to Ca^{2+} load but failed to delay gastrocnemius mPTP opening. Accordingly, the inhibitory effect of CsA on mPTP opening was greater in case of

increased cyclophilin D content in denervated muscle.³³ Thus, CsA protection might depend on cyclophilin D expression in muscle, possibly explaining CsA prevention of infarction flaps in pig latissimus dorsi muscle characterized by a high level of cyclophilin D expression.^{26,35}

Another potential mechanism explaining our results may be inferred from the actions of CsA upon B- and T-cell activation. The CsA upregulates immunoglobulin production in preactivated B cells,³⁶ but CsA inhibits calcineurin-dependent nuclear factor of activated T cell dephosphorylation and interrupts the transcription of genes coding for interleukin-2, interleukin-4, and CD40 ligand. This decreases the efficacy of T-cell-dependent immune defenses³⁷ and deserves further study.

CONCLUSIONS

The CsA normalized ROS production during aortic cross-clamping and restored mitochondrial coupling. Incomplete V_{max} protection might be due to low cyclophilin D expression in gastrocnemius, preventing CsA from blocking mPTP opening. Although controversial, combining CsA and ischemic conditioning might be a promising alternative because they can have additive effects.³⁸⁻⁴⁰ This new therapeutic approach might warrant being proposed to patients undergoing prolonged vascular surgery procedures in order to reduce skeletal muscle impairment and therefore patient morbidity.

We thank Fabienne Goupilleau, Isabelle Bentz, and Anne-Marie Medina for their expert biologic and secretarial assistance. We are grateful to Tran Thien-Nga for performing CRC experiments and to Zoll Joffrey and Ovize Michel for improving the manuscript. We also thank ADIRAL for help in funding the study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: JP, MG, BG
 Analysis and interpretation: JP, MG, EB, AC, AL, AG, PD, BG
 Data collection: JP, MG, EB, AC, AL
 Writing the article: JP, AG, BG
 Critical revision of the article: JP, MG, EB, AC, AL, AG, PD, BG
 Final approval of the article: JP, MG, EB, AC, AL, AG, PD, BG
 Statistical analysis: JP
 Obtained funding: BG
 Overall responsibility: JP, BG

REFERENCES

1. Lovegrove RE, Javid M, Magee TR, Galland RB. A meta-analysis of 21,178 patients undergoing open or endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 2008;95:677-84.
2. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Reza Nouraei SA, Akthar AM, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 2007;116:198-105.

3. Miller CC III, Villa MA, Sutton J, Lau D, Keyhani K, Estrera AL, et al. Serum myoglobin and renal morbidity and mortality following thoracic and thoraco-abdominal aortic repair: does rhabdomyolysis play a role? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009;37:388-94.
4. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:509-17.
5. Tran TP, Tu H, Pipinos II, Muellemann RL, Albadawi H, Li Y-L. Tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscles: involvement of superoxide. *Eur J Pharmacol* 2011;650:328-34.
6. Javadov S, Karmazyn M, Escobales N. Mitochondrial permeability transition pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;330:670-8.
7. Mansour Z, Bouitbir J, Charles AL, Talha S, Kindo M, Pottecher J, et al. Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg* 2012;55:497-505.
8. Charles AL, Guilbert AS, Bouitbir J, Goette-Di Marco P, Enache I, Zoll J, et al. Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg* 2011;98:511-6.
9. Mansour Z, Charles AL, Bouitbir J, Pottecher J, Kindo M, Mazzucotelli J-P, et al. Remote and local ischemic postconditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia-reperfusion. *J Vasc Surg* 2012;56:774-82.
10. Chen HY, Navia JA, Shafique S, Kassab GS. Fluid-structure interaction in aortic cross-clamping: implications for vessel injury. *J Biomech* 2010;43:221-7.
11. Cour M, Gomez L, Mewton N, Ovize M, Argaud L. Postconditioning: from the bench to bedside. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2011;16:117-30.
12. Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 2009;83:213-25.
13. Giorgio V, Soriano ME, Basso E, Bisetto E, Lippe G, Forte MA, et al. Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797:1113-8.
14. Farivar AS, Mackinnon-Patterson BC, Barnes AD, McCourtie AS, Mulligan MS. Cyclosporine modulates the response to hypoxia-reoxygenation in pulmonary artery endothelial cells. *Ann Thorac Surg* 2005;79:1010-6.
15. Askar IM, Bozkurt M. Protective effects of immunosuppressants and steroids against ischemia-reperfusion injury in cremaster muscle flap at microcirculatory level. *Microsurgery* 2002;22:361-6.
16. Eisinger DR, Sheil AG. A comparison of the effects of cyclosporin A and standard agents on primary wound healing in the rat. *Surg Gynecol Obstet* 1985;160:135-8.
17. Noll E, Bouitbir J, Collange O, Zoll J, Charles AL, Thaveau F, et al. Local but not systemic capillary lactate is a reperfusion biomarker in experimental acute limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012;7:1-2.
18. Luke DR, Brunner LJ, Vadieli K. Bioavailability assessment of cyclosporine in the rat. Influence of route of administration. *Drug Metab Dispos* 1990;18:158-62.
19. Sullivan PG, Rabchevsky AG, Hicks RR, Gibson TR, Fletcher-Turner A, Scheff SW. Dose-response curve and optimal dosing regimen of cyclosporin A after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience* 2000;101:289-95.
20. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2008;359:473-81.
21. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002;10:620-30.
22. Eckert P, Schnackerz K. Ischemic tolerance of human skeletal muscle. *Ann Plast Surg* 1991;26:77-84.
23. Dick F, Li J, Giraud M-N, Kalka C, Schmidli J, Tevacaari H. Basic control of reperfusion effectively protects against reperfusion injury in a realistic rodent model of acute limb ischemia. *Circulation* 2008;118:1920-8.
24. Beyersdorf F, Schlensak C. Controlled reperfusion after acute and persistent limb ischemia. *Semin Vasc Surg* 2009;22:52-7.
25. Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, Chafke N, Kretz JG, Piquard F, et al. Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 2007;46:541-7.
26. McAllister SE, Ashrafpour H, Cahoon N, Huang N, Moses MA, Neligan PC, et al. Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R681-9.
27. Sanchez H, Bigard X, Veksler V, Mettauer B, Lampert E, Lonsdorfer J, et al. Immunosuppressive treatment affects cardiac and skeletal muscle mitochondria by the toxic effect of vehicle. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:323-31.
28. Brown GC, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* 2004;1658:44-9.
29. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002;80:780-7.
30. Zoll J, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Fortin D, Veksler V, et al. Preserved response of mitochondrial function to short-term endurance training in skeletal muscle of heart transplant recipients. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:126-32.
31. Sanchez H, Zoll J, Bigard X, Veksler V, Mettauer B, Lampert E, et al. Effect of cyclosporin A and its vehicle on cardiac and skeletal muscle mitochondria: relationship to efficacy of the respiratory chain. *Br J Pharmacol* 2001;133:781-8.
32. Piquard F, Geny B, Hardy H, Chakfé N, Mettauer B, Charloix A, et al. Lack of acute cyclosporine nephrotoxicity in late heart-transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:507-9.
33. Csukly K, Ascah A, Matas J, Gardiner PF, Fontaine E, Burelle Y. Muscle denervation promotes opening of the permeability transition pore and increases the expression of cyclophilin D. *J Physiol* 2006;574:319-27.
34. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005;434:652-8.
35. Sayd T, Morzel M, Chambon C, Franck M, Figwer P, Larzul C, et al. Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: implications on meat color development. *J Agric Food Chem* 2006;54:2732-7.
36. Kim HS, Raskova J, Degiannis D, Raska K. Effects of cyclosporine and rapamycin on immunoglobulin production by preactivated human B cells. *Clin Exp Immunol* 1994;96:508-12.
37. Nabel GJ. A transformed view of cyclosporine. *Nature* 1999;397:471-2.
38. Ganote CE, Armstrong SC. 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* 2003;35:749-59.
39. Badalzadeh R, Mohammadi M, Najafi M, Ahmadiasl N, Farajnia S, Ebrahimi H. The additive effects of ischemic postconditioning and cyclosporine-A on nitric oxide activity and functions of diabetic myocardium injured by ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2012;17:181-9.
40. Guo X-S, Li Y-Z, Liu X-H, Zhang Z-Y, Liu F-Y, Hu W-C. Calcineurin mediates the protective effect of postconditioning on skeletal muscle. *Shock* 2011;36:312-6.

Submitted May 17, 2012; accepted Sep 15, 2012.

Additional material for this article may be found online at www.jvascsurg.org.

APPENDIX (online only)**Methods**

Blood cyclosporine concentrations. The ONE-MINUTE MassTox reagent kit (Chromsystems, Munich, Germany) was used for the analysis of cyclosporine A (CsA). Whole blood concentrations of cyclosporine were qualified by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry with an Agilent 6410 apparatus (Agilent Technologies, Santa Carla, Calif). A mixture of 50 μ L of sample (control or calibrator), 25 μ L of reconstituted internal standard mix containing d_{12} -cyclosporine, and 100 μ L of extraction buffer was vortexed for 10 seconds and incubated for 2 minutes at room temperature. Then 250 μ L of precipitated reagent was added, vortexed, and centrifuged for 5 minutes at 1500g.

Then, 30 μ L of the supernatant was injected in the liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The mass transitions were monitored at a mass-to-charge ratio of 1220 and 1203 for cyclosporine and 1232 and 1215 for d_{12} -cyclosporine. The cycle time was 1.3 minutes injection to injection.

A standard curve was constructed by plotting the peak area ratios against the theoretical whole blood concentrations of cyclosporine. The lower limit of detection was 5 ng/mL. Concentrations were linear over the range from 25 to 2000 μ g/L. The intra- and interday precision values for the concentrations were all <10.0%, and the accuracy ranged from 95% to 105% of the nominal value.

Dihydroethidium staining. To detect the presence of reactive oxygen species, mainly superoxide anion, in skeletal muscles, serial sections (10 μ m thick) were cut on a cryostat microtome and thaw mounted onto glass slides. After air drying, slides were incubated for 30 minutes at 37°C with 2.5 μ M dihydroethidium in phosphate-buffered saline. Dihydroethidium produces red fluorescence when oxidized to ethidium bromide by superoxide anion.^{1,2} After staining, sections were rinsed, air dried, mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, Calif), and coverslipped. The sections were examined under an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E800; Nikon Instruments, Amsterdam, The Netherlands) with a 20 \times epifluorescence objective, and emission signal was recorded with a Zeiss 573- to 637-nm filter. We analyzed micrographs using Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems, San Jose, Calif) in order to determine fluorescence intensity (arbitrary units) in regions of interest. For each animal, 20 photographs were taken in randomly determined regions of the same muscle. A region of interest of red fluorescence was determined, and the optimal sensitivity and specificity for contouring were defined so as to build a script. This script was applied to the 20 photographs, and the number of pixels in each was recorded. We excluded values above the 90th and under the 10th percentile and used the mean value.

Immunohistochemical procedure. To detect inflammation in the gastrocnemius, we used monocyte macrophage-2 antibody on serial sections (10- μ m thick) of

muscles.³ Briefly, muscle sections were air dried and then fixed in paraformaldehyde 4% for 3 minutes. The sections were placed in a 2% solution of hydrogen peroxide for 5 minutes, which served to reduce endogenous or pseudo-peroxidase background staining. Primary antibody was used at predetermined optimal dilutions. A standard indirect immunoperoxidase procedure using biotinylated goat anti-rat antibody (Millipore, Billerica, Mass) and streptavidin-horseradish peroxidase (Millipore) was used to detect binding of monocyte macrophage-2. The slides were developed by diaminobenzidine substrate. Tissues were counterstained briefly with hematoxylin-eosin before mounting.

Study of cyclophilin D expression in myocardium and gastrocnemius. At the end of reperfusion, hearts and gastrocnemius muscles (n = 5 per group) were rapidly removed and frozen in liquid nitrogen. Total lysates were prepared by homogenizing tissue lysis buffer (100 μ L per 10 mg of tissue) containing 1% nonyl phenoxypolyethoxyethanol, 20 mM Tris-HCl, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5% glycerol, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM NaF, and 1 mM dithiothreitol (pH 8), supplemented with a cocktail of protease inhibitors. Protein content was evaluated using colorimetric Bradford technique in a range from 0 to 1500 μ g/mL of bovine serum albumin (BSA). Thirty micrograms of heart protein samples were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis on gradient gels (15% acrylamide) and transferred to nitrocellulose membranes. Blots were blocked with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline. Membranes then were incubated in Tris-buffered saline-Tween 20 (0.5%)–1% nonfat milk (4°C overnight) with mouse CyP D antibody (1/4000; Merck Chemicals, Nottingham, UK) or rabbit actin antibody (1/1000; Sigma Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France). Blots were washed and incubated with horseradish peroxidase conjugated to appropriate anti-immunoglobulin G (1/25000; Amersham GE Healthcare Europe GmbH, Saclay, France) for 1 hour at room temperature. Enhanced chemiluminescence was performed with the ECL Western blot detection kit (Amersham GE Healthcare Europe GmbH) according to the manufacturer's instructions, and blots were exposed to hyperfilm. Equal loading was evaluated by actin staining. Density of protein bands was computerized (Image J software; National Institutes of Health, Bethesda, Md).

Calcium retention capacity measurements in gastrocnemius and myocardium. Fiber bundles were first permeabilized with saponin and washed once in buffer S. Fibers then were incubated for 30 minutes with agitation at 4°C in buffer R + KCl (KCl 800 mM, CaK₂ ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) 2.77 mM, K₂EGTA 7.23 mM, MgCl₂ 1.38 mM, imidazole 20 mM, taurine 20 mM, dithiothreitol 0.5 mM, K-sulfonate of methane 90 mM, Na-sulfonate of methane 10 mM, glutamate 5 mM, malate 2 mM, K₂HPO₄ 3 mM; pH 7) to extract myosin and washed three times in calcium retention capacity (CRC) + BSA buffer for 10 minutes each (Tris-base 20 mM, saccharose 150 mM, KCl

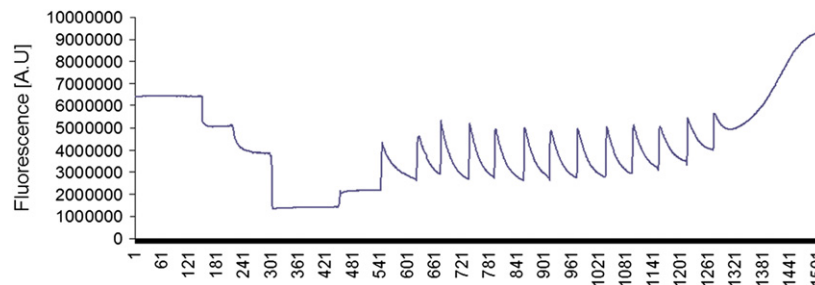


Fig 6 (online only). Typical example of Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening recording in mitochondria of ghost fibers. AU, Arbitrary unit.

50 mM, KH_2PO_4 2 mM, succinate 5 mM, EGTA 9 mM, BSA 2 mg/mL; pH 7.4).

Ca^{2+} challenge. To determine sensitivity to mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening, we submitted mitochondria within permeabilized fibers to progressive Ca^{2+} loading of the matrix under energized conditions.^{4,5} Binding of exogenous Ca^{2+} to the contractile filaments, as well as Ca^{2+} uptake by the sarcoplasmic reticulum, could interfere with measurement of mitochondrial Ca^{2+} uptake and release. To avoid these potential problems, we determined CRC in ghost fibers. For these CRC measurements, ghost fibers (1.0-1.5 mg dry fiber weight) were incubated at 24°C in a quartz tank with continuous magnetic stirring in 1 mL of CRC buffer (Tris-base 20 mM, saccharose 150 mM, KCl 50 mM, KH_2PO_4 2 mM, succinate 5 mM, EGTA 9 mM; pH 7.4). Five microliters of Ca^{2+} (1 mM) pulses were given every 5 minutes for skeletal muscle and every 2 minutes for heart fibers. Each pulse was recorded as a peak of extramitochondrial Ca^{2+} concentration using the fluorescent probe calcium green (1 μM ; excitation emission, 500-530 nm). Ca^{2+} is then very rapidly taken up by the mitochondria, resulting in a return of extramitochondrial Ca^{2+} concentration to near baseline level. Following sufficient Ca^{2+} loading, extramitochondrial Ca^{2+} concentration abruptly increases, indicating a massive release of Ca^{2+} by mitochondria due to mPTP opening. A typical example of Ca^{2+} -induced mPTP opening recording in mitochondria of ghost fibers is given in Fig 6 (online only).

RESULTS

Results are given in the Table (online only).

Table (online only). Mitochondrial respiratory chain complexes' activities in sham rats treated or not treated with cyclosporine A

Mitochondrial respiration parameter	Group		P value
	Untreated sham rats (n = 11)	CsA-treated sham rats (n = 7)	
V_{max}	6.60 ± 0.53	6.31 ± 0.50	.72
V_{succ}	4.40 ± 0.41	4.05 ± 0.26	.56
$V_{\text{TMPD/Asc}}$	10.96 ± 0.96	9.13 ± 1.04	.24

CsA, Cyclosporine A; V_{max} , maximal oxidative capacity; V_{succ} , complex II, III, and IV activities; $V_{\text{TMPD/Asc}}$, complex IV activity.

REFERENCES

- Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 2007;49:717-27.
- Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, et al. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation* 2001;103:2188-94.
- Mansour Z, Charles AL, Bouitbir J, Pottecher J, Kindo M, Mazzucotelli JP, et al. Remote and local ischemic post-conditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia-reperfusion. *J Vasc Surg* 2012;56:774-82.
- Paillard M, Gomez L, Augeul L, Loufouat J, Lesnefsky EJ, Ovize M. Postconditioning inhibits mPTP opening independent of oxidative phosphorylation and membrane potential. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:902-9.
- Picard M, Csukly K, Robillard ME, Godin R, Aschah A, Bourcier-Lucas C, et al. Resistance to Ca^{2+} -induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R659-68.

Type I diabetes exacerbates ischemia-reperfusion induced mitochondrial injury and oxidative stress in rat skeletal muscle and abrogates cyclosporine A myoprotection

Julien Pottecher^{1,2}, M.D.; Thien Nga Tran^{1,2}, Jamal Bouitbir^{2,8}, Ph.D.; Max Guillot^{2,3}, M.D.; Christiane Damgé^{2,4}, M.D., Ph.D.; Anne Lejay^{2,5}, M.D.; Véronique Kemmel^{6,7}, M.D., Ph.D.; Anne-Laure Charles^{2,8}, Ph.D.; Joffrey Zoll^{2,8}, Ph.D.; Pierre Diemunsch^{1,2}, M.D., Ph.D.; Bernard Geny^{2,8}, M.D., Ph.D.

1. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Pôle Anesthésie Réanimation Chirurgicale SAMU, Strasbourg, France

2. Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, Institut de Physiologie, Equipe d'Accueil EA3072 "Mitochondrie, stress oxydant et protection musculaire", Strasbourg, France

3. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Service de Réanimation Médicale, Strasbourg, France

4. Maison du Diabète, 3 rue de Lausanne, Strasbourg, France

5. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Chirurgie Vasculaire, Strasbourg, France

6. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Strasbourg, France

7. Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, Unité de Physiopathologie et Médecine Translationnelle, Equipe d'Accueil EA4438, Strasbourg, France

8. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Strasbourg, France

Corresponding author: Prof. Bernard Geny, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Nouvel Hôpital Civil, Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles

1 place de l'Hôpital

67091 Strasbourg Cedex, France

Mail: bernard.geny@chru-strasbourg.fr

Phone: +33 3 69 55 06 60 or 03 69 55 08 79

Fax: +33 3 69 55 18 26

Word count: Abstract: (<250) words

Main text: 3771 words

ABSTRACT (250 words)

AIMS/HYPOTHESIS: type 1 diabetes is associated with increased severity of peripheral arterial disease and cyclosporine A has been shown to rescue skeletal muscle mitochondria from ischemia-reperfusion (IR) injury in non-diabetic animals. The aims of this study were 1) to determine whether diabetes worsens IR deleterious effects through increased mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species (ROS) production and 2) whether cyclosporine A protects diabetic muscles submitted to IR.

METHODS: Forty-six wistar rats were investigated: non-diabetic rats were randomized to control (nC, n=8) or to IR (3h aortic cross-clamping followed by 2h of reperfusion, nIR, n=10). Streptozotocin-treated diabetic rats (n=28) were randomized to control (dC, n=8), IR (dIR, n=10) or to IR plus cyclosporine A (dIR+CsA, n=10). Maximal oxidative capacity (V_{Max}) and relative contribution of the respiratory chain complexes I, II, III (V_{Succ}) and IV (V_{TMPD}), together with ROS production using dihydroethidium staining were determined in gastrocnemius muscles.

RESULTS:

Without IR, V_{max} ($-48\pm 9\%$), V_{succ} ($-51\pm 9\%$) and V_{TMPD} ($-49\pm 6\%$) were decreased and normalized ROS production was increased in streptozotocin compared to vehicle-treated rats ($p<0.05$). IR decreased mitochondrial respiration in both groups. However, relative to their non-ischaemic controls, the reductions in V_{max} ($-57\pm 14\%$ vs. $-23\pm 7\%$) and V_{succ} ($-60\pm 7\%$ vs. $-11\pm 6\%$) and the increase in ROS production were larger in streptozotocin than in vehicle-treated rats ($p<0.05$). Cyclosporine A was neither able to restore V_{max} or V_{succ} , nor to decrease ROS in streptozotocin-treated rats submitted to IR.

CONCLUSIONS/INTERPRETATION:

In rat gastrocnemius, type 1 diabetes induced mitochondrial dysfunction and ROS overproduction that were exacerbated after IR and not corrected by cyclosporine A.

Keywords: Diabetes mellitus, Ischaemia, Reperfusion, Streptozotocin, Mitochondria, Skeletal Muscle

Abbreviations: (alphabetical order)

AGE: advanced glycation endproducts

CsA : cyclosporine A

DHE: dihydroethidium

IR: ischaemia-reperfusion

PAD: peripheral arterial disease

ROS: reactive oxygen species

INTRODUCTION

Peripheral arterial disease (PAD) represents a real burden in the diabetic population. Recent studies report a 2- to 4-fold increase in the prevalence and severity of PAD in diabetic patients [1]. Not only does diabetes modify the clinical presentation of PAD (with more infra-popliteal vascular occlusions, decreased distal runoff and more vascular calcifications than non-diabetic patients) but patients with diabetes mellitus also experience more frequent symptomatic forms of PAD with intermittent claudication, acute vascular occlusions and amputations [2]. As a result, the risk of amputation is 40-fold greater in patients suffering from diabetes [3] and the risk of peri-procedural cardiovascular morbidity after revascularization procedures is increased.

The reasons for increased severity of PAD in diabetic patients are numerous and likely equally imply vascular and muscular alterations.

Vascular abnormalities include impaired endothelial-dependent vasodilation, increased generation of arterial vasoconstrictors (endothelin 1), increased systemic inflammation (encompassing increased transcription of NF κ B and increased blood cytokines concentrations) and increased oxidative stress [4]. Indeed, systemic oxidative stress might contribute to the onset, progression and pathological consequences of PAD during diabetes mellitus. For instance, superoxide anion directly quenches nitric oxide by forming peroxynitrite ion and uncouples endothelial nitric oxide synthase, impairing endothelial-dependent vasodilation. Formation of intracellular advanced glycation endproducts (AGE) alters protein functions and initiates pathologic processes by impairing mitochondrial function, stimulating cytokines and reactive oxygen species production. Diabetic state also triggers increased susceptibility to free radical injury [5].

As it represents up to 40% of total body weight in mammals, skeletal muscle stands for the main tissue of peripheral glucose disposal. Due to its functional importance, skeletal muscle is also a tissue particularly dependent on oxidative phosphorylation and mitochondrial energetics. Muscular alterations in diabetes include fiber atrophy [6], reduced capillarization, deregulated angiogenesis, altered myosin phenotype and reduction in muscular oxidative enzymes [7]. Skeletal muscle mitochondrial dysfunction seems to be a primitive event in diabetes mellitus, preceding hyperglycemia in patients with family history of type 2 diabetes [8] and associated with a 30% reduction in oxidative phosphorylation.

Increased limb loss after arterial revascularization may consequently be explained in the diabetic patient by skeletal muscle defect. Specifically, mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells may contribute to the high failure rate of surgical revascularization [9]. In a previous work performed in leptin receptor deficient mice (mimicking type 2 diabetes), Entabi *et al.* established that ischaemia-reperfusion histological injury and skeletal muscle viability were not worse in diabetic animals compared to healthy controls [10] despite increased local TNF α levels. Ischaemia reperfusion of the myocardium induced a similar degree of myocyte necrosis in diabetic and non-diabetic animals [11]. However, mitochondrial dysfunction might be more sensitive and reveal severe metabolic alterations well before cell necrosis occurs [12]. The question therefore arises as to whether reactive oxygen species (ROS) production relative to oxidative phosphorylation would be increased in diabetic animals submitted to ischaemia-reperfusion [13].

About therapy, there are few data concerning skeletal muscle dysfunction during diabetes. In accordance with clinical findings, restoring euglycemia with acute insulin treatment, although physiologically rational and theoretically appealing, failed to restore cardioprotection in the setting of experimental ischaemia-reperfusion [14]. Other therapeutic strategies like ischemic pre- or postconditioning have been tested to rescue the diabetic muscle from ischaemia-reperfusion injury. Unfortunately, ischemic preconditioning was not efficient in the diabetic myocardium due to a dysfunctional mitoK_{ATP} channel [15]. Yet, the transduction pathway downstream was still efficient and pharmacological conditioning downstream the mitoK_{ATP} channel is still effective in rescuing the myocardium in diabetic humans [15]. So, there may be a role for pharmaceutical agents that act on a very downstream effector of the mitochondrial death pathway.

In this view, cyclosporine A (CsA) might be interesting since it has been shown to reduce myocardial and skeletal muscle injuries in the setting of ischaemia-reperfusion [16, 17]. Further, in healthy animals, CsA inhibited IR-induced superoxide anion production and partially protected mitochondrial respiratory chain [18].

The aims of this study were therefore 1) to determine whether type I diabetes exacerbates the deleterious effects of hindlimb ischaemia-reperfusion, increasing skeletal muscle mitochondrial dysfunction and ROS and 2) to investigate the potential beneficial effects of CsA on muscle mitochondrial respiratory chain *via* a decreased oxidative stress.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed on adult male Wistar rats (Depré, France) weighing 250-300g. Animals were housed in a neutral temperature environment ($22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$) on a 12:12 hour photoperiod and were provided food (standard rat chow) and water *ad libitum*. The investigation conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The study was approved by the institutional animal care committee (CREMEAS n° AL/02/10/06/2009).

Induction of diabetes

In 28 rats, type 1 diabetes was induced by IV 65mg/kg streptozotocin injection in the penile vein. Animals were considered diabetic when blood glucose was above 16.7mmol/L 8 days after induction of diabetes. Non-diabetic, vehicle-treated animals (n=18) received intravenous saline injection at the same time.

Metabolic parameters

Thirty days after diabetes induction, an oral glucose-tolerance test was performed in the 28 actually diabetic rats and 12 non-diabetic animals. This test consisted in a 2g/kg loading dose given by oral gavage after a 12 hours fasting period. Subsequent glucose concentrations were determined on tail vein blood at 20, 40, 60, 120 and 180 min after gavage.

Forty-two days after diabetes induction, these 28 diabetic and 12 non-diabetic rats were housed in metabolic cages for two days. The first day was considered an acclimatization period and, during the second day, blood glucose concentrations, food and water intake and urine volume were recorded over 24 hours.

Arterial pressure

Systolic arterial blood pressure was measured by the tail cuff technique (LE5002 Storage pressure Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain) in conscious animals (22 diabetic and 12 non-diabetic) two to four days preceding ischaemia-reperfusion experiments.

Surgical preparation and procedure

As previously described [19], a midline laparotomy was performed under isoflurane anesthesia, infra-renal abdominal aorta was dissected and liberated from adjacent adhesions. All arterial collaterals located between the renal arteries and the aortic bifurcation were coagulated and cut using a thermal cautery (Geiger®, thermal cautery unit).

Experimental design

Diabetic rats

Seven weeks after streptozotocin injection, twenty-eight diabetic rats were randomly assigned in three groups, as shown in [Figure 1](#): the control group (dCON, n = 8) underwent 5 hours of isoflurane anesthesia and the surgical manipulation -excepted hind-limb ischaemia- was similar to that in the ischaemia-reperfusion group.

The ischaemia-reperfusion group (dIR, n = 10) underwent 3 hours of ischaemia induced by infra-renal aortic occlusion and collateral vessels ligation, followed by 2 hours of reperfusion. Ischaemia was clinically characterized by cyanosis and lack of arterial pulse distal to the clamp. It was also ascertained by capillary lactates measurement on the right foot before unclamping (Lactate Pro device, LT1710; Arkray, KGK, Japan [20, 21]).

CsA-conditioned rats (dIR + CsA, n= 10) also underwent 3 hours of ischaemia but complete reperfusion was preceded by two intraperitoneal CsA injections (10mg/kg each) (Sandimmun®, Novartis-Pharma SAS, Rueil-Malmaison, France) at 90min and 150min of ischaemia. Dose and administration route were selected based on previous studies [22, 23].

Non-diabetic rats

Eighteen vehicle-treated, non-diabetic rats were randomized in Control (nCON, n=8) and ischaemia-reperfusion groups (nIR, n=10). Experimental design was similar in diabetic and non-diabetic animals.

Blood cyclosporine A assay

In CsA-treated rats, blood samples (500µL) were drawn from intra-cardiac puncture on EDTA tubes at the end of the protocol (end of reperfusion). Blood CsA concentration was determined using HPLC-MS analysis, as performed in routine clinical human assays (see ESM) and expressed in µg/L.

Study of muscle mitochondrial respiration in skinned fibers

The mitochondrial respiration was studied in saponin-skinned fibers of white GC (glycolytic muscle), as previously described[24]. Measuring oxygen consumption *ex vivo* in skinned fibers is a unique way to determine the functional oxidative capacity of the skeletal muscle, allowing the study of the entire mitochondrial population within its cellular environment. Briefly, fibers were separated. Then, they were permeabilized, in a bath of solution S containing 50µg/ml saponin for 30 minutes at 4°C, under shaking. After, permeabilized fibers were washed for 10 minutes under shaking, in order to remove saponin. Fibers were then placed in a bath with the respiratory solution for 5 minutes twice, in order to remove any phosphates. Finally, oxygen consumption was measured polarographically by using a Clark-type electrode in a 3ml oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Scotland). Basal oxygen consumption (V_0), and maximal fiber respiration (V_{Max}) rates were measured at 22.1°C under continuous stirring in the presence of saturating amount of ADP as a phosphate acceptor. Relative contribution of the respiratory chain complexes I, III and IV to the global mitochondrial respiratory rates were also determined. When V_{Max} was recorded, electron flow went through complexes I, III and IV. Complex I was blocked with amytal (0.02 mM) and complex II was stimulated with succinate (25 mM). Mitochondrial respiration in these conditions allowed to determine complexes II, III, IV activities (V_{Succ}). After that, N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD, 0.5 mM) and ascorbate (0.5mM) were added as an artificial electron donor to cytochrome c. In these conditions, the activity of cytochrome c oxydase (complexe IV) was determined as an isolated step of the respiratory chain (V_{TMPD}). Fibers were then harvested and dried for 15 minutes at 150°C. Respiration rates were expressed as µM O₂/min/g dry weight.

Dihydroethidium Staining

As previously described to detect the presence of ROS in skeletal muscles, serial sections (10 µm-thick) were cut on a cryostat microtome and incubated with dihydroethidium (DHE) that produces red fluorescence when oxidized to ethidium bromide (EtBr) by ROS, including superoxide anion [12]. To assess ROS production in each skeletal muscle section, we determined the mean fluorescence intensity (arbitrary units) in 25 regions of interest under 20x epifluorescence magnification.

Reactive oxygen species production per unit respiration

As previously suggested, ROS production by diabetic skeletal muscle mitochondria might be confounded by concurrent changes in respiration rates, providing unchanged raw, unadjusted ROS levels [25], but increased ROS generation when considered relative to electron transport [13]. Consequently, to calculate ROS production per unit respiration rate, the mean DHE fluorescence intensity [arbitrary unit] in a gastrocnemius muscle section was divided by the mitochondrial respiration rate fueled with glutamate plus malate (V_{Max} , [$\mu\text{MO}_2/\text{min}/\text{g}$ dry weight]) from skinned fibers of the same muscle. We also measured the superoxide anion production per unit respiration in mitochondria fueled with complex II substrate (succinate) and complex IV substrate (TMPD) by calculating the $\text{DHE}/V_{\text{Succ}}$ and $\text{DHE}/V_{\text{TMPD}}$ ratios respectively.

Statistics

All data are expressed as means \pm standard error of the means and were analyzed using Prism software (GraphPad Prism 5, Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Differences between treatment groups were analyzed with two-way analysis of variance (ANOVA), simultaneously testing diabetic status and ischaemia, with post hoc Newman-Keuls correction. Within group differences were analyzed with Student t test and one-way ANOVA. A p-value less than 0.05 was considered significant.

Results

A) Effects of Type I diabetes on skeletal muscle mitochondrial respiratory chain complex activities and reactive oxygen species production

1. Streptozotocin-treated rats displayed a metabolic profile mimicking type 1 diabetes

Streptozotocin-treated rats manifested typical hallmark features of type 1 diabetes, associating polyuria, polydipsia, decreased body weight (despite polyphagia) compared to vehicle-treated, non-diabetic rats (Table 1). During the oral glucose tolerance test, blood glucose concentrations exceeded the upper limit of detection in three animals so that final comparison was made between 25 streptozotocin-treated and 12 non-diabetic rats (Figure 2). This revealed that both the absolute and the relative maximal increases in blood glucose were higher in the streptozotocin-treated than in the non-diabetic rats ($+319\pm 9\text{mg/dL}$ vs. $+73\pm 4\text{mg/dL}$ and $309\pm 24\%$ vs. $200\pm 4\%$, respectively; $p<0.001$).

Baseline heart rate was similar in both groups but streptozotocin-treated rats suffered from mild arterial hypertension compared to non-diabetic rats (Table 1).

2. Diabetes impaired mitochondrial respiration and increased ROS production

a. Diabetes decreased all skeletal muscle mitochondrial respiratory chain complexes activities

Diabetes induced a significant decrease in V_{Max} ($-48\pm 9\%$), V_{Succ} ($-51\pm 9\%$) and V_{TMPD} ($-49\pm 6\%$) in streptozotocin-treated rats, as compared to vehicle-treated animals (Table 3). Conversely, V_0 was not significantly different.

b. Diabetes induced a significant increase in superoxide anion production per unit respiration rate

In streptozotocin-treated rats, diabetes did not induce a significant increase in raw reactive oxygen species production (ascertained by a non-significant increase in DHE fluorescence) compared to vehicle-treated animals (Table 3).

Conversely, ROS production per unit respiration rate was significantly increased in streptozotocin-treated compared to vehicle-treated rats. This held true when skinned fibers mitochondria were either fueled with glutamate plus malate (increased DHE/ V_{Max} ratios) or with succinate (increased DHE/ V_{Succ} ratio, Table 3).

B) Effects of ischaemia-reperfusion on skeletal muscle mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species production in streptozotocin-treated rats.

1. Ischaemia-reperfusion effects on capillary lactates, heart rate and glycemia

Capillary lactate measurements on the right foot at baseline were not significantly different in non-diabetic and diabetic animals (2.6 ± 0.4 vs. 2.8 ± 0.3 respectively, $p=\text{NS}$) and increased similarly in both groups at the end of the 3h ischaemia (18.9 ± 0.9 vs. 17.7 ± 0.5 respectively, $p=\text{NS}$).

Perioperative heart rate changes were not statistically different between diabetic and non-diabetic animals at baseline, at the end of ischaemia and after 2 hours of reperfusion (Table 2).

In non-diabetic rats, ischaemia and reperfusion induced acute hyperglycemia that became significant at the end of reperfusion ($256\pm 24\text{mg/dL}$) compared to the measurements performed at the induction of general anesthesia ($151\pm 4\text{mg/dL}$, $p<0.05$). These high values at the end of reperfusion were non significantly different from fasting blood glucose in

streptozotocin-treated rats ($248 \pm 26 \text{ mg/dL}$; $p=0.89$). Two streptozotocin-treated rats died after aortic unclamping (and were therefore excluded from mitochondrial analysis) in IR and IR+CsA groups, leaving eight diabetic rats in these two treatment groups.

2. Ischaemia-reperfusion decreased mitochondrial chain activity in both non-diabetic and diabetic animals but mitochondrial damage was worse in diabetic animals

Ischaemia-reperfusion induced a significant decrease in maximal fiber respiration (V_{Max}) in both streptozotocin-treated ($-57 \pm 14\%$; $p=0.024$) and vehicle-treated rats ($-23 \pm 7\%$; $p=0.040$), **Figure 3a** but the relative reduction in V_{Max} was significantly larger in streptozotocin-treated rats, **Figure 4a**. The reduction in maximal mitochondrial respiration was proportional to the intensity of the ischemic injury since V_{Max} negatively correlated with the maximal capillary lactate measurement on the right foot in both streptozotocin-treated ($r^2=0.30$; $p=0.007$) and vehicle-treated, non-diabetic rats ($r^2=0.35$; $p=0.0023$). On the contrary, while ischaemia-reperfusion didn't significantly alter V_{Succ} in vehicle-treated animals compared to their non-ischemic controls ($-11 \pm 6\%$; $p=0.36$), it induced a significant decrease in streptozotocin-treated animals (**Figure 3b**) compared to their non-ischemic diabetic controls ($-60 \pm 7\%$; $p=0.0090$) **Figure 4b**. Ischaemia-reperfusion didn't alter V_{TMPD} in either streptozotocin or vehicle-treated rats, **Figures 3c and 4c**. Taken together, the aforementioned results support that ischaemia-reperfusion impaired mitochondrial respiration in healthy animals and proportionally impaired mitochondrial function in streptozotocin-treated rats to a greater extent.

3. Ischaemia-reperfusion increased ROS production in both non-diabetic and diabetic animals but oxidative stress was enhanced in diabetic animals

In vehicle-treated animals, ischaemia-reperfusion induced a significant increase in DHE fluorescence from 1534 ± 241 to 3765 ± 407 AU; $p=0.0004$. Conversely, raw DHE fluorescence was not significantly increased in streptozotocin-treated rats after ischaemia-reperfusion (from 3107 ± 918 to 4218 ± 882 AU; $p=0.40$, **Table 4**).

The ROS production per unit respiration rate in mitochondria fueled with glutamate plus malate was significantly increased after ischaemia-reperfusion in both streptozotocin-treated and vehicle-treated rats (**Figure 5**). The increase in ROS production normalized to V_{Max} after ischaemia-reperfusion was not significantly larger in diabetic than in non-diabetic animals (interaction in two-way ANOVA; $p=\text{NS}$, **Figure 5a**).

The ROS production per unit respiration rate in mitochondria fueled with complex II substrate (succinate) was significantly increased after ischaemia-reperfusion in both streptozotocin-treated and vehicle-treated rats. However, the increase in superoxide production normalized to V_{succ} after ischaemia-reperfusion was significantly larger in diabetic than in non-diabetic animals (significant interaction in two-way ANOVA; $p=0.004$, **Figure 5b**).

Taken together, these results suggest that ROS production in gastrocnemius was enhanced after ischaemia-reperfusion in streptozotocin-treated rats when considered relative to electron transport.

C. Cyclosporine A failed to prevent mitochondrial respiratory chain dysfunction and increased oxidative stress after ischaemia-reperfusion in diabetic animals

Blood cyclosporine concentrations were $5537 \pm 642 \mu\text{g/L}$ at the time of sampling (end of reperfusion).

As depicted in [Table 4](#), cyclosporine A treatment was unable to provide mitochondrial protection in streptozotocin-treated rats exposed to ischaemia-reperfusion. Indeed, neither V_0 , nor V_{max} , nor V_{succ} were restored to non-ischemic levels after cyclosporine A treatment. Moreover, cyclosporine A neither decreased raw nor adjusted ROS production in gastrocnemius muscles from streptozotocin-treated rats submitted to ischaemia-reperfusion.

DISCUSSION

Main results

The main results of this study are 1) that streptozotocin-induced type 1 diabetes significantly impaired mitochondrial respiratory chain complexes activities and increased reactive oxygen species production, 2) for the first time that ischaemia-reperfusion deleterious effects were more pronounced in streptozotocin-treated than in healthy rats and 3) that cyclosporine A was ineffective in preventing ischaemia-reperfusion-induced mitochondrial dysfunction and ROS overproduction.

Mitochondrial alterations in type 1 diabetes

As previously demonstrated, long-term hyperglycemia induced a significant reduction in complex I, II and III activities in skeletal muscle [26]. In accordance with our previous report [27] and results observed by Bonnard *et al.* [9], we found that streptozotocin-treated rats demonstrated a profound reduction in V_0 and V_{Max} (>50% compared to healthy controls). In addition, we observed a significant (60%) decrease in succinate dehydrogenase activity.

In diabetic rats submitted to ischaemia-reperfusion, we noticed a close relationship between gastrocnemius mitochondrial basal oxygen consumption (V_0) and fasting blood glucose, suggesting that the functional impairment of mitochondrial function was tightly linked with hyperglycemia. In patients with type II diabetes, Mogensen *et al.* [28] also demonstrated that mitochondrial respiration negatively correlated with HbA1C, the latter reflecting prolonged elevation in blood glucose concentrations.

These functional deficits associated with diabetes are mirrored by morphological alterations. For instance, in diet-induced insulin deficient mice, Bonnard *et al.* demonstrated that diabetic state resulted in altered mitochondrial biogenesis, structure and function (complex I-linked respiration) in gastrocnemius muscle [9]. Previous study in streptozotocin-treated mice also indicated that mitochondrial density was reduced and that mitochondrial morphology was profoundly altered (reduced number of cristae and decreased electron density of the matrix) [9].

Oxidative stress in type 1 diabetes and ischaemia-reperfusion

Potential sources of increased oxidative stress in diabetic animals are numerous [29]. They include non-enzymatic auto-oxidation of glucose and generation of advanced glycation endproducts [26], enzymatic sources originating from nitric oxide synthase, NADPH oxidase and xanthine oxidase and last, ROS production from the mitochondrial respiratory chain [30]. Indeed, complexes I and III were demonstrated to account for the main source of superoxide anion within the mitochondrion [31]. Our experimental protocol did not allow us to exactly pinpoint which of the five respiratory complexes (I-V) demonstrated the most severe alteration associated with diabetes but many indices converge to mitochondrial complex III. In the early stages of diabetes, mitochondrial complex III undergoes assembly defects that leads to decreased complex III activity (-65%) and increased superoxide generation in rat kidney [32].

In our experimental conditions, oxygen consumption is proportional to electron transport, depending on the substrate that fuels mitochondria: glutamate plus malate or

succinate. In their previous work, Herlein *et al.* observed that superoxide anion production was greater in diabetic mitochondria respiring on the complex I (glutamate plus malate) and complex II (succinate) substrates when considered in relation to electron transport activity [13] although the raw superoxide was not significantly different. Moreover, the reduction in ROS generation when transitioning from state 4 (V_0) to state 3 (V_{Max}) respiration, was less in diabetic *vs.* non-diabetic rats. Our results are in line with these findings and give credence to the assumption that oxidative stress is actually increased in streptozotocin-treated animals. This is all the more important as antioxidant defences are not increased in gastrocnemius from diabetic animals [25]. The link between mitochondrial chain dysfunction and increased oxidative stress in diabetes may reside in a disordered electron transport chain, inducing an increased proton leak, mainly at complex I.

Oxidative stress probable plays a crucial role in mediating hyperglycemia-induced worsening of reperfusion injury. In mice submitted to acute hyperglycemia, Yang *et al.* demonstrated that oxidative stress contributed importantly to the hyperglycemic exacerbation of myocardial infarct size [33] showing that infarct size was correlated with plasma malondialdehyde concentration. They also demonstrated that hyperglycemia-induced oxidative stress involved NADPH oxidase.

Diabetes and worsening of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury

Apart an increased oxidative stress at baseline in streptozotocin-treated rats, our results also indicate that IR-induced ROS production is largely increased in diabetic *vs.* healthy animals. This finding has already been observed in the heart of diabetic animals [34, 33] and may pave the way to other pathophysiological mechanisms at work explaining the increased sensitivity of diabetic skeletal muscle to IR injury. Indeed, by increasing oxidative stress, IR can stimulate protein kinase C resulting in increased microvascular permeability and leukocyte adherence to endothelial cells [35]. Enhanced oxidative stress also activates the hexosamine pathway, resulting in increased plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and transforming growth factor β (TGF- β) expressions that favour microthrombi and no reflow phenomenon in microvessels [30]. Combined influence of hyperglycemia and ROS overproduction in IR diabetic rats also trigger the polyol pathway flux that burns up major antioxidants (glutathione and NADPH) in skeletal muscles, enhancing their sensitivity to oxidative stress and perpetuating a vicious circle [36]. Sustained levels of ROS after IR in diabetic animals also abrogate numerous endogenous protective pathways like heme oxygenase 1 [37] and signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) [38].

Streptozotocin-treated rats were insulinopenic [39] and this feature may contribute to exacerbated skeletal injury after IR. Indeed, insulin participates in maintaining endogenous protective pathways like the PI3K-Akt and the STAT3 pathways. In insulinopenic diabetes, the phosphorylation of PI3K, Akt and STAT-3 are reduced, resulting in increasing glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) activity that promotes mPTP opening [40]. Last, factors favouring mitochondrial biogenesis like peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α (PGC-1 α) are reduced during diabetes and may impair mitochondrial recovery [9].

Cyclosporine A does not rescue skeletal muscle from ischaemia-reperfusion injury in streptozotocin-treated rats

Contrary to what we previously found in healthy animals (*manuscript under revision*), acute cyclosporine A treatment was unable to rescue ischaemia-reperfusion-induced mitochondrial dysfunction and to lower oxidative stress in gastrocnemius muscle from diabetic rats. In our study, the measured blood CsA concentrations were well within the effective ranges previously demonstrated to protect myocardium from IR injury in man [16]. Hyperglycemia might induce a loss of endogenous and pharmacological protective mechanisms against ischaemia-reperfusion but the intensity and/or duration of conditioning stimuli may also prove important to rescue diabetic tissues from ischaemia-reperfusion injury. For instance, in a similar model of streptozotocin-treated rats, Köskoy *et al.* demonstrated that chronic pretreatment with simvastatin (6 weeks) decreased muscle necrosis, reduced tissue edema and myeloperoxidase infiltration after bilateral hindlimb ischaemia-reperfusion [41]. This is in contrast with the absence of protection we observed with acute administration of cyclosporine A. In rats submitted to myocardial ischaemia-reperfusion injury, transient hyperglycemia (target blood glucose: 22 mmol/L) also abolished intravenous cyclosporine A-induced cardioprotection [42], even when the cyclosporine A doses were doubled. However, the combination of cyclosporine A and sevoflurane postconditioning provided an infarct-sparing effect against hyperglycemia.

The reasons for cyclosporine A conditioning failure in our experiments should be discussed in the light of recent findings. Cyclosporin A binds to cyclophilin D and inhibits the mitochondrial transition pore (mPTP) opening, preventing mitochondrial dysfunction, oxidative phosphorylation uncoupling and ultimately cell death. Previous experiments in streptozotocin-treated rats indicated that the mitochondrial permeability transition was greatly altered with variable delay induction and enhanced magnitude of response (12% swelling increase in diabetic rats compared to control)[43]. Moreover, Sloan *et al.* recently demonstrated thiol-dependent modifications of the mPTP components in streptozotocin-treated rat myocardium [44]. Indeed, the adenine nucleotide translocase, a key component of the mPTP, was actually more oxidized, providing a greater sensitivity to pore opening, which was reversed by antioxidants. The greater oxidative stress burden associated with mitochondria-derived ROS overproduction and reduced ROS scavenging capacities in diabetic muscles may therefore explain the inability of cyclosporine to inhibit mPTP opening in streptozotocin-treated rats.

Strengths and weaknesses of the study

Experimental model under study was a pharmacologic model of type 1 diabetes whose effects on skeletal muscle, apart from chronic hyperglycaemia, could be due to a direct action on muscle fibers [45, 46].

CONCLUSION

Type 1 diabetes was associated with profound mitochondrial respiratory chain alterations and reactive oxygen species overproduction in rat skeletal muscle that were exacerbated in ischaemia-reperfusion conditions. This could account for the high failure rate of surgical revascularizations in diabetic patients suffering from peripheral arterial disease. Acute cyclosporine A treatment, given at the onset of reperfusion, failed to protect mitochondrial dysfunction and to reduce reactive oxygen species burden in diabetic muscles submitted to ischaemia-reperfusion. Future studies should focus on co-administration of

cyclosporine A and antioxidants since increased oxidation of the mitochondrial transition pore might explain this protection failure.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We are greatly indebted to Miss Fabienne Goupilleau and Isabelle Bentz, for their extensive animal model knowledge and invaluable technical assistance.

DUALITY OF INTEREST:

The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

REFERENCES

1. American Diabetes Association (2003) Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes Care* 26(12):3333–3341
2. Jude EB, Eleftheriadou I, Tentolouris N (2010) Peripheral arterial disease in diabetes - a review. *Diabetic Medicine* 27(1):4–14
3. Nathan D (1993) Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328(23):1676–1685
4. Beckman JA, Creager MA, Libby P (2002) Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 287(19):2570–2581
5. Galiñanes M (2004) Role of clinical pathologies in myocardial injury following ischaemia and reperfusion. *Cardiovascular Research* 61(3):512–521
6. Kelleher AR, Fairchild TJ, Keslacy S (2010) STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF- κ B canonical cascade activation. *Acta Diabetol* 47(4):315–323
7. Py G, Lambert K, Milhavet O, Eydoux N, Pr eacute faut C, Mercier J (2002) Effects of streptozotocin-induced diabetes on markers of skeletal muscle metabolism and monocarboxylate transporter 1 to monocarboxylate transporter 4 transporters. *Metabolism* 51(7):807–813
8. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI (2004) Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 350(7):664–671
9. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaux E, Chauvin M-A, Morio B, Vidal H, Rieusset J (2008) Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest.* doi: 10.1172/JCI32601

10. Entabi F, Albadawi H, Stone DH, Sroufe R, Conrad MF, Watkins MT (2007) Hind Limb Ischemia-Reperfusion in the Leptin Receptor Deficient (db/db) Mouse. *Journal of Surgical Research* 139(1):97–105
11. Ghosh S, Standen NB, Galiñanes M (2001) Failure to precondition pathological human myocardium. *JAC* 37(3):711–718
12. Charles AL, Guilbert AS, Bouitbir J, Goette-Di Marco P, Enache I, Zoll J, Piquard F, Geny B (2011) Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg* 98(4):511–516
13. Herlein JA, Fink BD, Henry DM, Yorek MA, Teesch LM, Sivitz WI (2011) Mitochondrial superoxide and coenzyme Q in insulin-deficient rats: increased electron leak. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301(6):R1616–R1624
14. Drenger B, Ostrovsky IA, Barak M, Nechemia-Arbely Y, Ziv E, Axelrod JH (2011) Diabetes blockade of sevoflurane postconditioning is not restored by insulin in the rat heart: phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated inhibition. *Anesthesiology* 114(6):1364–1372
15. HASSOUNA A, LOUBANI M, MATATA B, FOWLER A, STANDEN N, Galiñanes M (2006) Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocardium. *Cardiovascular Research* 69(2):450–458
16. Piot C, Croisille P, Staat P, et al (2008) Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 359(5):473–481
17. McAllister SE, Ashrafpour H, Cahoon N, Huang N, Moses MA, Neligan PC, Forrest CR, Lipa JE, Pang CY (2008) Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295(2):R681–R689
18. Pottecher J, Guillot M, Charles A, Geny B Skeletal Muscle Ischemia-reperfusion in an Experimental Aortic Cross-clamping Model: Mitochondrial Effects of Cyclosporin Postconditioning. asaabstracts.com
19. Mansour Z, Bouitbir J, Charles AL, Talha S, Kindo M, pottecher J, Zoll J, Geny B (2011) Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg*. doi: 10.1016/j.jvs.2011.07.084
20. Collange O, Charton A, Greib N, Joshi GP, Schaeffer R, Diemunsch PA (2010) Correlation Between Arterial and Capillary Lactate Measurements in a Porcine Hemorrhagic Shock Model. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 68(1):32–34
21. Noll E, Bouitbir J, Collange O, Zoll J, Charles AL, Thaveau F, Diemunsch P, Geny B (2012) Local but not Systemic Capillary Lactate is a Reperfusion Biomarker in Experimental Acute Limb Ischaemia. *European Journal of Vascular and*

Endovascular Surgery 1–2

22. Hwang JH, Lee JH, Lee K-H, Bae EJ, Sung DK, Chang YS, Park WS (2010) Cyclosporine A attenuates hypoxic–ischemic brain injury in newborn rats. *Brain Research* 1359:208–215
23. Leger P-L, De Paulis D, Branco S, Bonnin P, Couture-Lepetit E, Baud O, Renolleau S, Ovize M, Gharib A, Charriaut-Marlangue C (2011) Evaluation of cyclosporine A in a stroke model in the immature rat brain. *Experimental Neurology* 230(1):58–66
24. Zoll J (2006) ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *Journal of Applied Physiology* 101(2):385–391
25. Herlein JA, Fink BD, O'Malley Y, Sivitz WI (2008) Superoxide and Respiratory Coupling in Mitochondria of Insulin-Deficient Diabetic Rats. *Endocrinology* 150(1):46–55
26. Remor AP, de Matos FJ, Ghisoni K, et al (2011) Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: Involvement of advanced glycosylated end products. *BBA - Molecular Basis of Disease* 1812(11):1460–1471
27. Rouyer O, Zoll J, Daussin F, Damge C, Helms P, Talha S, Rasseneur L, Piquard F, Geny B (2007) Muscle: Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on skeletal muscle oxidative function and exercise capacity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental Physiology* 92(6):1047–1056
28. Mogensen M, Sahlin K, Fernstrom M, Glintborg D, Vind BF, Beck-Nielsen H, Hojlund K (2007) Mitochondrial Respiration Is Decreased in Skeletal Muscle of Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 56(6):1592–1599
29. Ceriello A (2004) Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24(5):816–823
30. Rolo AP, Palmeira CM (2006) Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212(2):167–178
31. Chen Q (2003) Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: CENTRAL ROLE OF COMPLEX III. *Journal of Biological Chemistry* 278(38):36027–36031
32. Munusamy S, Saba H, Mitchell T, Megyesi JK, Brock RW, MacMillan-Crow L (2009) Alteration of renal respiratory Complex-III during experimental type-1 diabetes. *BMC Endocr Disord* 9(1):2
33. Yang Z, Laubach VE, French BA, Kron IL (2009) Acute hyperglycemia enhances oxidative stress and exacerbates myocardial infarction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase during reperfusion. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 137(3):723–729
34. Kersten JR, Toller WG, Warltier DC, 5 (2000) Diabetes abolishes ischemic

preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(4):H1218–H1224

35. Sheetz MJ, King GL (2002) Molecular Understanding of Hyperglycemia's Adverse Effects for Diabetic Complications. *JAMA* 288(20):2579–2588
36. Miki T, Itoh T, Sunaga D, Miura T (2012) Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular Diabetology* 11(1):67
37. Di Filippo C, Marfella R, Cuzzocrea S, Piegari E, Petronella P, Giugliano D, Rossi F, D'Amico M (2005) Hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rat increases infarct size associated with low levels of myocardial HO-1 during ischemia/reperfusion. *Diabetes* 54(3):803–810
38. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ (2007) Diabetes Abolishes Morphine-Induced Cardioprotection via Multiple Pathways Upstream of Glycogen Synthase Kinase-3. *Diabetes* 56(1):127–136
39. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E (2009) The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* 23(2):245–258
40. Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A (2009) Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *British Journal of Pharmacology* 156(6):885–898
41. Köksoy C, Oziş E, Çakmak A, Yazgan U, Okcu-Heper A, Köksoy A, Demirpençe E, Deniz Dinçer U (2007) Simvastatin pretreatment reduces the severity of limb ischemia in an experimental diabetes model. *Journal of Vascular Surgery* 45(3):590–596
42. Huhn R, Heinen A, Weber NC, Hollmann MW, Schlack W, Preckel B (2008) Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore. *British Journal of Anaesthesia* 100(4):465–471
43. Kristal BS, Matsuda M, Yu BP (1996) Abnormalities in the mitochondrial permeability transition in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 222(2):519–523
44. Sloan RC, Moukdar F, Frasier CR, Patel HD, Bostian PA, Lust RM, Brown DA (2012) Mitochondrial permeability transition in the diabetic heart: Contributions of thiol redox state and mitochondrial calcium to augmented reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52(5):1009–1018
45. Johnston APW, Campbell JE, Found JG, Riddell MC, Hawke TJ (2006) Streptozotocin induces G2 arrest in skeletal muscle myoblasts and impairs muscle growth in vivo. *AJP: Cell Physiology* 292(3):C1033–C1040
46. Krause MP, Riddell MC, Gordon CS, Imam SA, Cafarelli E, Hawke TJ (2009) Diabetic myopathy differs between Ins2Akita^{+/-} and streptozotocin-induced Type 1 diabetic models. *Journal of Applied Physiology* 106(5):1650–1659

TABLES**Table 1:** Metabolic profile in vehicle-treated (non-diabetic) and streptozotocin-treated (diabetic) animals 42 days after treatment injection

Metabolic parameter \ Groups	Non diabetic rats (n=12)	Diabetic rats (n=28)	p value
Body weight (g)	357±7	296±4	< 10 ⁻⁵
Fasting blood glucose (mmol.L ⁻¹)	3.9±0.1	13.8±1.5	< 10 ⁻⁴
Food intake (g.24h ⁻¹)	20±1,5	39±1	< 10 ⁻⁵
Water intake (mL.24h ⁻¹)	26±3	174±6	< 10 ⁻⁵
Urine volume (mL.24h ⁻¹)	12±1	164±5	< 10 ⁻⁵
Systolic arterial pressure [mmHg]	140±3	164±5	< 10 ⁻⁴

Table 2: Perioperative heart rates in streptozotocin-treated and vehicle-treated rats

Group		Heart rate (beats/min)		
		Baseline	End ischemia	End reperfusion
Non-diabetic	CON	443±15	433±21	428±20
	IR	435±18	433±23	432±20
Diabetic	CON	454±4	457±7	457±7
	IR	443±7	464±5	467±7

Table 3: Mitochondrial complexes activities, absolute and normalized reactive oxygen species production in streptozotocine-treated vs. vehicle-treated animals under control conditions.

Group		Vehicle-treated rats (Non-diabetic) n=8	Streptozotocin-treated rats (Diabetic) n=8	p
Mitochondrial respiration parameter				
V_0 [$\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]		2.55±0.38	1.73±0.39	0.16
V_{max} [$\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]		5.60±0.38	2.93±0.51	0.0009
V_{succ} [$\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]		4.72±0.49	2.33±0.42	0.0028
V_{TMPD} [$\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]		10.87±0.83	5.50±0.68	0.0003
Absolute ROS production DHE fluorescence [AU]		1534±241	3107±918	0.10
ROS production per unit respiration	DHE/ V_0 [AU/ $\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]	614±48	2329±745	0.028
	DHE/ V_{max} [AU/ $\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]	271±32	1302±381	0.0125
	DHE/ V_{succ} [AU/ $\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]	348±59	1759±564	0.0193
	DHE/ V_{TMPD} [AU/ $\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]	151±29	570±130	0.0052

ACR : acceptor control ratio ; ROS : reactive oxygen species ; DHE : dihydroethidium ; DW : dry weight

Table 4: Mitochondrial complexes activities, absolute and normalized reactive oxygen species production in streptozotocine-treated rats submitted to control (CON), ischemia-reperfusion (IR) and ischemia-reperfusion plus cyclosporine A (IR+CsA)

Group		CON n=8	IR n=8	IR+CsA n=8	ANOVA p
Mitochondrial respiration parameter					
V_0 [$\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]		1.73 \pm 0.39	0.70 \pm 0.30	1.29 \pm 0.22	0.088
V_{max} [$\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]		2.93 \pm 0.51	1.26 \pm 0.41*	1.67 \pm 0.38	0.037
V_{succ} [$\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]		2.33 \pm 0.42	0.94 \pm 0.17*	1.05 \pm 0.26*	0.0065
V_{TMPD} [$\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]		5.50 \pm 0.68	5.21 \pm 0.87	4.09 \pm 0.44	0.30
Absolute ROS production DHE fluorescence [AU]		3107 \pm 918	4218 \pm 882	3481 \pm 1105	0.73
ROS production per unit respiration	DHE/ V_0 [AU/ $\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]	2329 \pm 745	11180 \pm 2950	9187 \pm 7073	0.42
	DHE/ V_{max} [AU/ $\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]	1302 \pm 381	7158 \pm 3078	2705 \pm 825	0.084
	DHE/ V_{succ} [AU/ $\mu\text{M O}_2/\text{min/g DW}$]	1759 \pm 564	4805 \pm 693	7671 \pm 3924	0.27
	DHE/ V_{TMPD}	570 \pm 130	1010 \pm 297	894 \pm 274	0.46

ROS : reactive oxygen species ; DHE : dihydroethidium ; DW : dry weight ; * : $p < 0.05$ vs CON

Figures

Figure 1: Experimental protocol

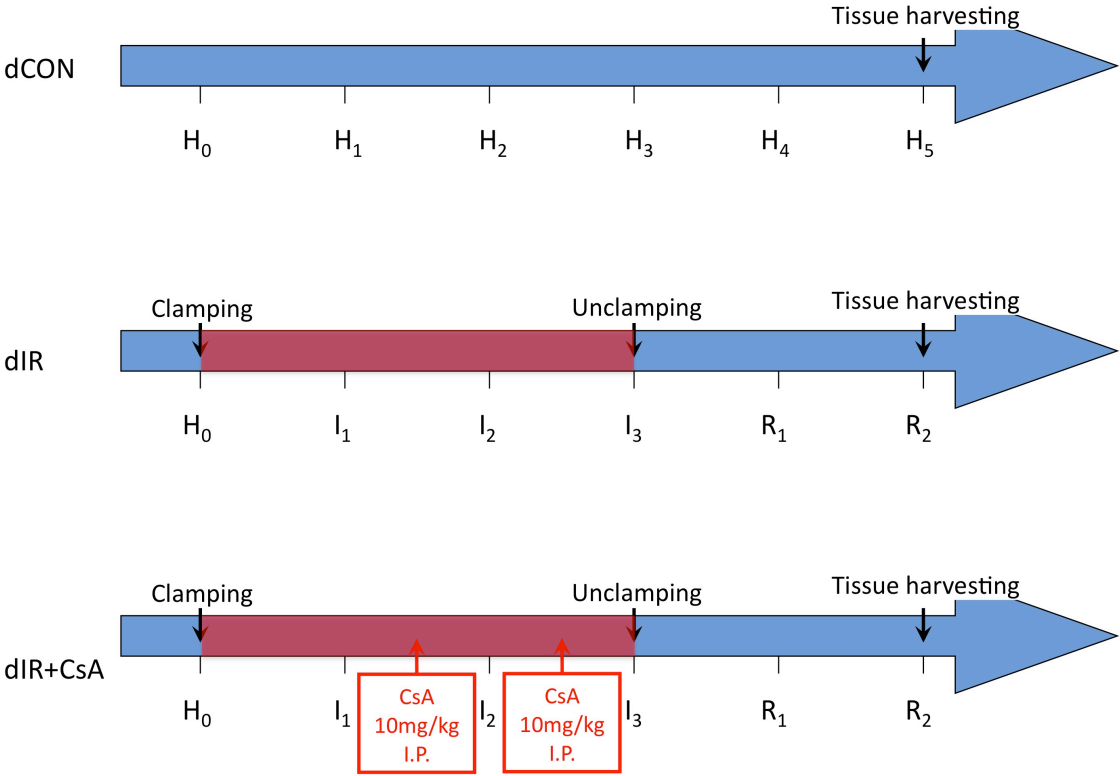


Figure 2: Time course of blood glucose in streptozotocin-treated and vehicle-treated rats during an oral glucose tolerance test

Time course of blood glucose in streptozotocin-treated and vehicle-treated rats during an oral glucose tolerance test

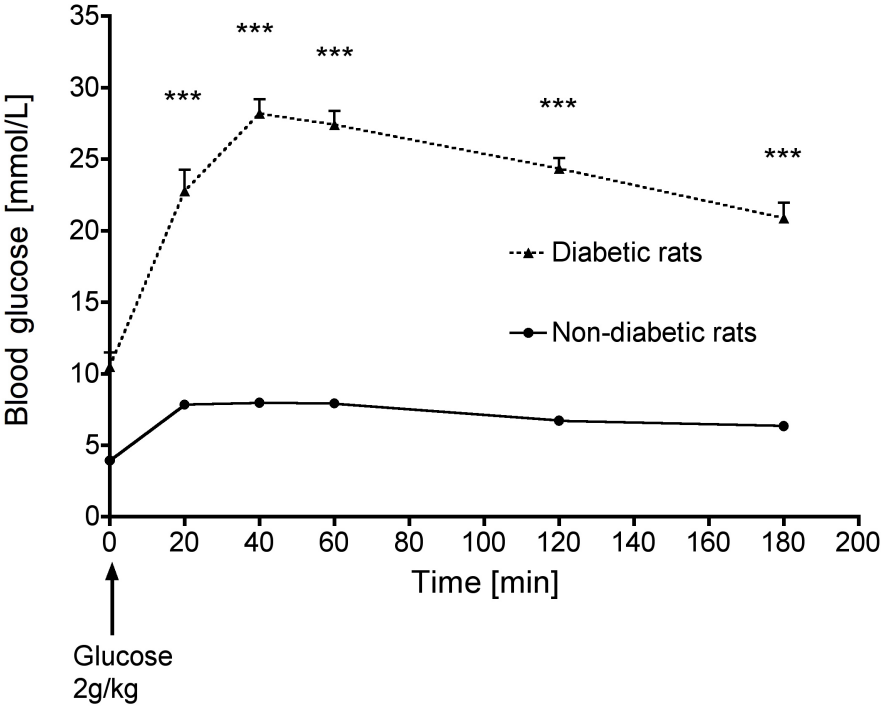


Figure 3: Combined influence of diabetes and ischemia-reperfusion on mitochondrial respiration parameters

Figure 3

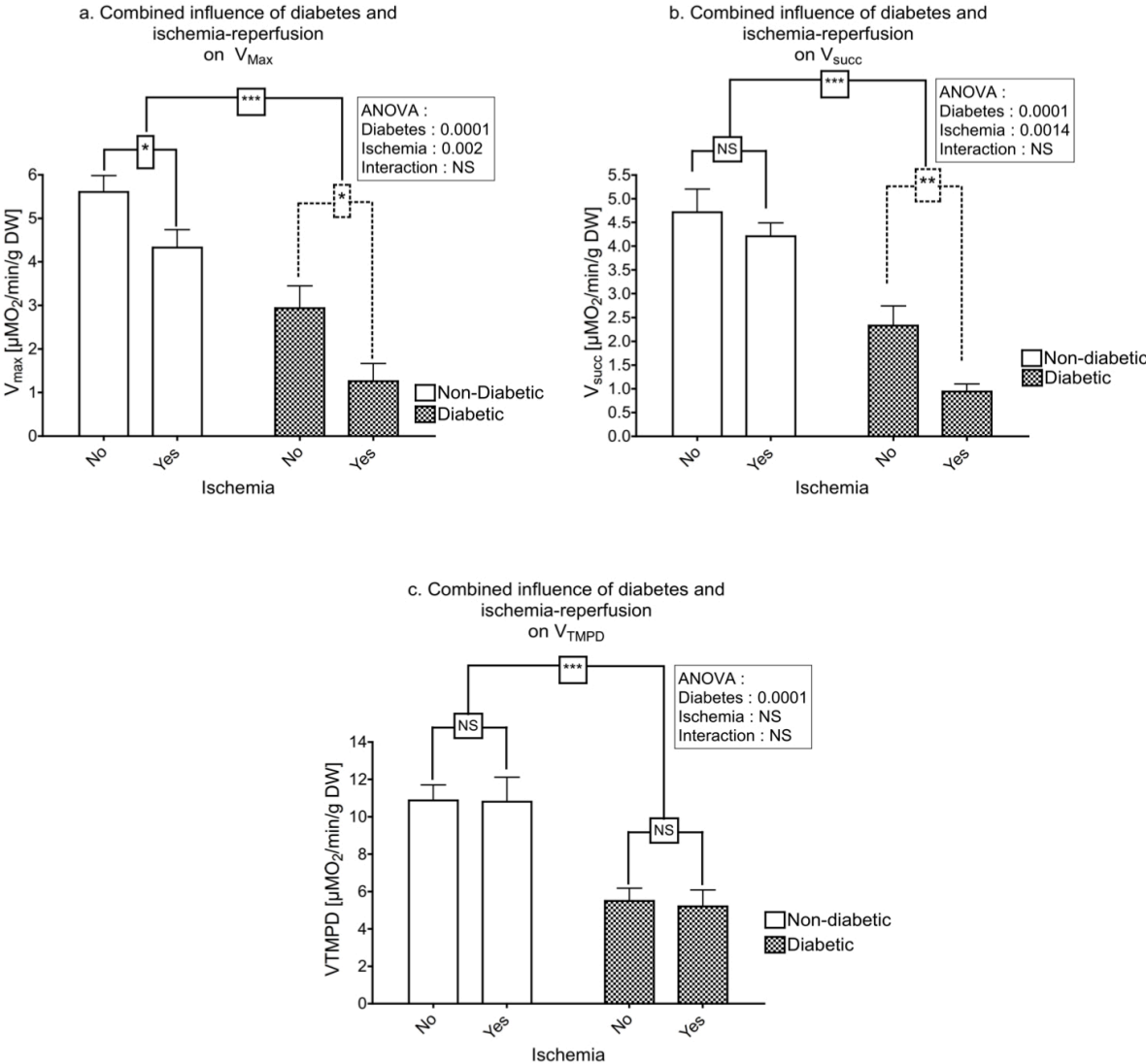
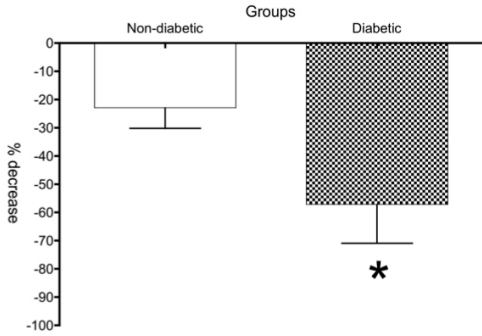


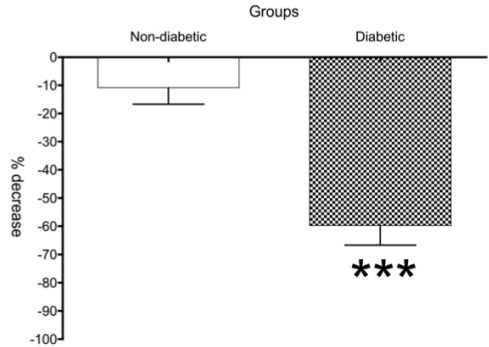
Figure 4: Variations in mitochondrial respiration parameters during ischaemia-reperfusion in vehicle and streptozotocin-treated rats relative to their respective controls.

Figure 4

a. Variation in V_{Max} during ischemia-reperfusion in vehicle and streptozotocin-treated rats, relative to their respective controls



b. Variation in V_{Succ} during ischemia-reperfusion in vehicle and streptozotocin-treated rats, relative to their respective controls



c. Variation in V_{TMPD} during ischemia-reperfusion in vehicle and streptozotocin-treated rats, relative to their respective controls

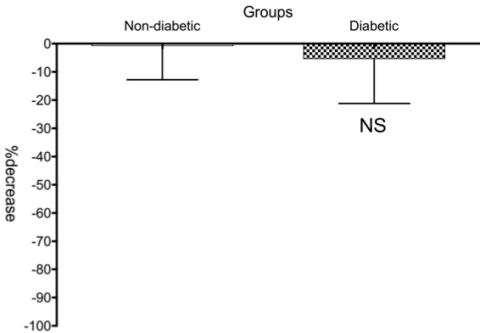
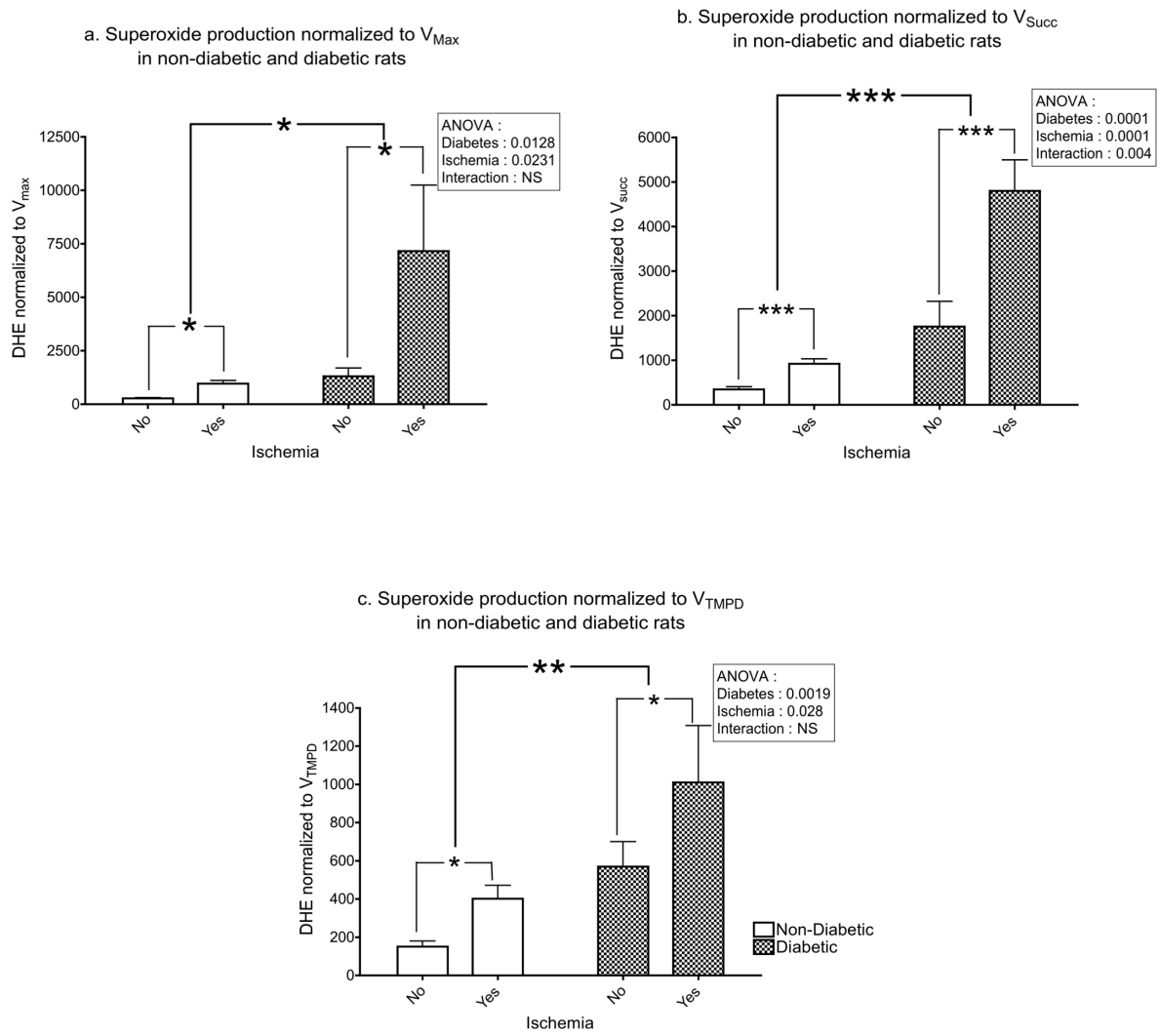


Figure 5: Combined influence of diabetes and ischemia-reperfusion on superoxide anion production normalized to oxygen consumption

Figure 5



* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

Cyclosporine A does not protect skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury in the aging rat but further exacerbates oxidative stress

Julien Pottecher^{1,2}, M.D.; Thiên-Nga Tran^{1,2}, M.D.; Anne-Laure Charles^{2,3}, Ph.D.; Tam Hoang Minh^{2,4}, M.D.; Maryse Hengen^{1,2}, M.D.; Véronique Kemmel^{5,6}, M.D.,Ph.D.; Joffrey Zoll^{2,3}, Ph.D.; Pierre Diemunsch^{1,2}, M.D., Ph.D.; Bernard Geny^{2,3}, M.D., Ph.D

1. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Pôle Anesthésie Réanimation Chirurgicale SAMU, Strasbourg, France

2. Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, Institut de Physiologie, Equipe d'Accueil EA3072 "Mitochondrie, stress oxydant et protection musculaire", Strasbourg, France

3. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Strasbourg, France

4. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Chirurgie Cardio-Vasculaire, Strasbourg, France

5. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Strasbourg, France

6. Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, Unité de Physiopathologie et Médecine Translationnelle, Equipe d'Accueil EA4438, Strasbourg, France

Corresponding author: Prof. Bernard Geny, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Nouvel Hôpital Civil, Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles
1 place de l'Hôpital
67091 Strasbourg Cedex, France
Mail: bernard.geny@chru-strasbourg.fr
Phone: +33 3 69 55 06 60 or 03 69 55 08 79
Fax: +33 3 69 55 18 26

Word count: Abstract: 200 words

Main text: 3348 words

ABSTRACT

Aims: Skeletal muscles from aging patients are prone to ischemia-reperfusion (IR) injury after tourniquet application. The objective of this study was to test the hypothesis that pharmacologic postconditioning with cyclosporine A (CsA) would protect senescent skeletal muscle from IR-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress.

Methods: Sixteen senescent (71-73 weeks old) male Wistar rats were randomized to Sham (5 h general anesthesia), IR (3h tourniquet application on the left hindlimb and 2h reperfusion) or CsA+IR (10mg/kg cyclosporine IV before reperfusion). Maximal oxidative capacity (V_{Max}), acceptor control ratio (ACR) and relative contribution of the respiratory chain complexes I, II, III (V_{Succ}) and IV (V_{TMPD}), together with calcium retention capacity (CRC) and tissue reactive oxygen species (ROS) production were determined in gastrocnemius muscles from both legs. We also determined blood CsA concentrations and myocardial ROS production.

Results: IR of the left hind limb induced a significant reduction in V_{Max} , ACR, V_{Succ} and CRC compared to the non-ischemic hind-limb that were not corrected by CsA. On the contrary, CsA increased ROS production both locally and in the myocardium.

Conclusion: Pharmacologic postconditioning with cyclosporine A could not rescue skeletal muscles from IR injury associated with tourniquet application but further exacerbated oxidative stress in senescent rats.

INTRODUCTION

Due to an irreversible demographic shift, developed countries are faced with an increasing aging population [1] and surgical patients are getting older and older. With increasing medical knowledge and improved perioperative care, some of these frail patients will nowadays undergo complex orthopedic or vascular surgical procedures that would have been contraindicated ten years before. Indeed, many elderly patients above 80 yo undergo major vascular procedures with arterial clamping [2,3] or major joint arthroplasty under pneumatic tourniquet [4,5]. Both types of surgeries trigger ischemia-reperfusion injury (IR) to skeletal muscle involving inflammation[6], oxidative stress [7] and mitochondrial dysfunction [8]. If young and fit patients easily tolerate skeletal muscle IR without significant morbidity or functional impairment, elderly patients will suffer more serious consequences. Indeed, skeletal muscles from aged individuals are more prone to IR [9] and characterized by impaired regeneration after injury [10,11]. This may be due in part to the prevailing sarcopenia that goes along with aging and impairs defense mechanisms against injury [12,13]. Moreover, elderly patients present with coexisting morbidities like hypertension, diabetes and peripheral arterial disease that aggravate reperfusion injury in skeletal muscles. For instance, excessive pressure pulsatility in elderly hypertensive patients increases angiotensin II, oxidative stress, NF κ -B activation and end organ damage [14]. As a result, reactive hyperemia after vascular occlusion is blunted in elderly patients [15]. Tissues from aged individuals are also submitted to increased oxidative stress in basal conditions. Indeed, mutated proteins from mitochondrial respiratory chain not only participate in aged-induced mitochondrial dysfunction but also lead to excessive reactive oxygen species (ROS) production [16]. Reperfusion injury associated with vascular unclamping [17] or tourniquet deflation [18] will further increase skeletal muscle and remote organs [19] oxidative stress. When tourniquet application or vascular clamping exceeds the recommended safe duration of

60-90 min, as in complex procedures or intractable bleeding, oxidative stress overwhelms defense mechanisms and triggers life-threatening complications in the frail elderly patient [20,21]. Application of short bouts of ischemia with 5 min tourniquet inflation/deflation cycles before longer tourniquet application achieves ischemic preconditioning and provides muscular protection with decreased oxidative stress in young (22 yo) healthy patients [22]. However, caution should be taken in the elderly frail patient. First, ischemic preconditioning may not be applied in emergent procedures. Second, some recent findings indicate that cardiac ischemic preconditioning may prove inefficient with aging due to enhanced protein kinases dephosphorylation that interrupt the protective cascade of ischemic preconditioning [23]. Some protection could however be gained by increasing the intensity of the conditioning stimulus [24]. Last, the weakened senescent skeletal muscle may not withstand additional ischemic stress appended to tourniquet application. Indeed, recent findings from our group indicate that ischemic postconditioning may worsen IR injury in skeletal muscles after tourniquet-induced ischemia in mice [25]. Moreover, ischemic conditioning aggravates tourniquet-induced peripheral nerve lesion [26]. A pharmacologic alternative could be a good replacement for ischemic preconditioning in the senescent muscle submitted to IR. For instance, cyclosporine A (CsA) is a good candidate. Through binding to mitochondrial cyclophilin D (Cyp-D), CsA inhibits mitochondrial pore opening and by doing so, intervenes on a very downstream effector of the IR death pathway [27]. CsA given intravenously at the onset of reperfusion was recently shown to protect myocardial [28] and skeletal muscle [29] from IR-induced injury. The objective of this research project was to test the hypothesis that pharmacologic postconditioning with CsA, given at the onset of reperfusion, would protect senescent skeletal muscle from IR-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress by delaying mPTP opening.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Experiments were performed on 16 senescent (71-73 weeks old) male Wistar rats (Depré, France) weighing 822 ± 18 g. Seventy weeks old rats correspond to 65-75 years old human beings [30]. Animals were housed in a neutral temperature environment ($22^{\circ} \pm 2$ °C) on a 12:12 hour photoperiod and were provided food (standard rat chow) and water *ad libitum*. The investigation conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The study was approved by the institutional animal care committee (CREMEAS n° AL/02/10/06/2009)

Induction of skeletal muscle ischemia-reperfusion

Rats were placed in a hermetic anaesthetic induction cage, ventilated with gas mixture of 4% isoflurane (AERRANE[®], BAXTER S.A.S.) and oxygen. After induction, rats were placed on heating blankets (MINERVE[®], Esternay, France) with a pre-selected 37°C temperature maintained during the whole procedure. Spontaneous ventilation was allowed through an oxygen-delivering mask, with different concentrations of isoflurane depending on the surgical stage (2% during painful stimuli, and 1% during latent periods). Depth of anaesthesia was checked by paw pinch before more noxious stimuli. Heart rate and rectal temperature were monitored continuously and recorded. After neck skin dissection, a 24G intravenous line was inserted in the right jugular vein to infuse CsA and to perform blood sampling at the end of the experiment.

Experimental design

A tourniquet was placed around the left groin without any skin incision, the right limb serving as a control in every animal [31]. Rats were randomized into 3 groups (Figure 1). The Sham group (Sham, n=2) was sham operated and had no ischemia, adding up four non-ischemic legs. After 3 hours of anaesthesia, 0.4mL of NaCl 0.9% were injected in the right jugular vein. The ischemia-reperfusion group (IR group, n=7) had a 3-hour ischemic assault in left hind limb by tourniquet application (simple garrot, tightened by twisting a rod 20 times) on the root of the limb. Ischaemia was clinically characterized by cyanosis and lack of arterial pulse distal to the clamp. It was also ascertained by capillary lactates measurement on the left foot before unclamping (Lactate Pro device, LT1710; Arkray, KGK, Japan) [32,33]. At the end of ischaemia, 0.4mL of NaCl 0.9% were injected in the right jugular vein. Then, a 2-hour reperfusion period was allowed before gastrocnemius muscle harvesting in both hindlimbs.

In the cyclosporine posconditioning/ischemia-reperfusion group (CsA+IR group, n=7), 10mg/kg undiluted CsA (Sandimmun®, Novartis-Pharma SAS, Rueil-Malmaison, France) was injected in the right jugular vein with 0.5mL insulin syringe (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and flushed with additional 0.2mL NaCl 0.9% at the end of ischaemia. Dose was chosen based on previous experiments performed in rats [34,35], rabbits [36] and swine [29,37] with the same CsA dose.

At the end of the experiment, left ventricle, right and left gastrocnemius muscle were dissected, adipose and connective tissues were excised and mitochondrial respiration studies were immediately performed.

Blood cyclosporine A assay

In CsA-treated rats, blood samples (500 μ L) were drawn from the right jugular vein on EDTA tubes at the end of the protocol (end of reperfusion). Blood CsA concentration was determined using HPLC-MS analysis, as performed in routine clinical human assays (see ESM) and expressed in μ g/L.

Study of muscle mitochondrial respiratory chain complexes activities

Measuring oxygen consumption in skinned fibres is a unique technique to determine the functional oxidative capacity of the myocardial and skeletal muscles in their cellular environment. Briefly, fibers were separated. Then, they were permeabilized, in a bath of solution S containing 50 μ g/ml saponin for 30 minutes at 4°C, under shaking. After, permeabilized fibers were washed for 10 minutes under shaking, in order to remove saponin. Fibers were then placed in a bath with the respiratory solution for 5 minutes twice, in order to remove any phosphates. Finally, oxygen consumption was measured polarographically by using a Clark-type electrode in a 3ml oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Scotland). Basal oxygen consumption (V_0), and maximal fiber respiration (V_{max}) rates were measured at 22.1°C under continuous stirring in the presence of saturating amount of ADP as a phosphate acceptor. The coupling of phosphorylation to oxidation was determined by calculating the acceptor control ratio (ACR) as the ratio between ADP-stimulated respiration (V_{max}) over basal respiration (without ADP) with glutamate and malate as substrate (V_0) [38]. Relative contribution of the respiratory chain complexes I, III and IV to the global mitochondrial respiratory rates were also determined. When V_{max} was recorded, electron flow went through complexes I, III and IV. Complex I was blocked with amytal (0.02 mM) and complex II was stimulated with succinate (25 mM). Mitochondrial respiration in these conditions allowed to determine complexes II, III, IV activities (V_{succ}). After that, N, N', N'',

N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD, 0.5 mM) and ascorbate (0.5mM) were added as an artificial electron donor to cytochrome c. In these conditions, the activity of cytochrome c oxydase (complexe IV) was determined as an isolated step of the respiratory chain ($V_{\text{TMPD/Asc}}$). Fibers were then harvested and dried for 15 minutes at 150°C. Respiration rates were expressed as $\mu\text{M O}_2/\text{min/g}$ dry weight.

Study of intramuscular ROS production with electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy

Immediately after harvesting, gastrocnemius and left ventricular muscles (20-30 mg) were placed in Krebs solution containing: NaCl 99 mM, KCl 4.69 mM, CaCl_2 2.5 mM, MgSO_4 1.2 mM, NaHCO_3 25 mM, KH_2PO_4 1.03 mM, D(+) Glucose 5.6 mM, Na-Hepes 20 mM, 25 μM de deferoxamine 25 μM and DETC 5 μM . This Krebs solution allowed preservation of muscle fibers in a physiologic environment at 4°C before they were dissected under binocular magnifier and cut into 1 to 2 mm³ slices. Muscle slices were finally rinsed twice in Krebs solution.

Because of the short-lived nature of ROS, we used a stable spin label to assess oxidative stress in muscles: 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine HCl (CMH). Such spin labels offer the opportunity to detect any free radical compound with unpaired electron in a very precise fashion, especially when ROS production takes place during a short time frame. The ROS detection principle with EPR spectroscopy is based on the interaction between a magnetic field of known strength and electromagnetic moment of the free radicals under the influence of microwave irradiation [39]. The resulting microwave absorption is proportional to the amount of unpaired electrons in the sample. The aspect of the spectra obtained provides information about the nature of the trapped radical [40].

Muscle fragments were incubated 30 min in Krebs and CMH (200 μ M) in a thermo-regulated incubator (37°C) under controlled pressure (20mmHg) and gas mix (N₂: 97.8%, O₂: 2.8%) to mimic tissular environment (Noxygen®, Germany). ROS concentrations were then determined with EPR spectroscopy (Bruker Win-EPR®, Bruker Analytik, GmbH) in 40 μ L aliquots from muscle fibers supernatants using the following parameters: microwave power: 60mW, center field: 2g, field sweep: 60G, modulation of amplitude: 2.48 G, conversion time 10.24 ms, time constant 40.96 ms. At the end of the experiment, muscle fragments were gathered, dehydrated and weighted. As a result, ROS production was expressed in μ Mol/min/mg dry weight.

Calcium retention capacity (CRC) measurements in gastrocnemius and myocardium

The resistance of the mPTP to opening following matrix Ca²⁺ challenge was determined in permeabilized “ghost” muscle fibers prepared as follows.

Fiber bundles were first permeabilized with saponin and washed once in buffer S. Fibers were then incubated for 30 min with agitation at 4°C in buffer R+KCl (KCl 800mM ; CaK₂EGTA 2.77mM ; K₂EGTA 7.23mM ; MgCl₂ 1.38mM ; imidazole 20mM ; taurine 20mM ; dithiothreitol 0.5mM ; K-sulfonate of methane 90mM ; Na-sulfonate of methane 10mM; glutamate 5mM ; malate 2mM ; K₂HPO₄ 3mM ; pH 7) to extract myosin, and washed three times in CRC+BSA buffer for 10 min each (Tris-Base 20mM ; saccharose 150mM ; KCl 50mM ; KH₂PO₄ 2mM ; succinate 5mM; EGTA 9mM; BSA 2mg/ml ; pH 7.4).

Ca²⁺ challenge: To determine sensitivity to mPTP opening, we submitted mitochondria within permeabilized fibers to progressive Ca²⁺ loading of the matrix under energized conditions [41,42]. Binding of exogenous Ca²⁺ to the contractile filaments, as well as Ca²⁺ uptake by the sarcoplasmic reticulum, could interfere with the measurement of mitochondrial Ca²⁺ uptake

and release. To avoid these potential problems, we determined CRC in ghost fibers. For these CRC measurements, ghost fibers (1.0–1.5 mg dry fiber weight) were incubated at 24°C in a quartz tank with continuous magnetic stirring in 1mL of CRC buffer (Tris-Base 20mM ; saccharose 150mM ; KCl 50mM ; KH₂PO₄ 2mM ; succinate 5mM ; EGTA 9mM ; pH 7,4). Five µl of Ca²⁺ (1mM) pulses were performed every 5min (for skeletal muscle) and every 2 min for heart fibers. Each pulse was recorded as a peak of extra-mitochondrial Ca²⁺ concentration using the fluorescent probe calcium green (1µM; excitation-emission, 500–530 nm). Ca²⁺ is then very rapidly taken up by the mitochondria resulting in a return of extra-mitochondrial Ca²⁺ concentration to near baseline level. Following sufficient Ca²⁺ loading, extra-mitochondrial Ca²⁺ concentration abruptly increases indicating a massive release of Ca²⁺ by mitochondria due to mPTP opening. The amount of Ca²⁺ necessary to trigger a massive Ca²⁺ release was used here as an indicator of the susceptibility of mPTP to Ca²⁺ overload, and expressed as µM.mg⁻¹ dry weight. Ca²⁺ concentration was calculated from a standard curve relating [Ca²⁺] to the fluorescence of calcium green.

Statistics

All data are expressed as means ± standard error of the means and were analyzed using Prism software (GraphPad Prism 5, Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Differences between treatment groups were analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA), with post hoc Newman-Keuls correction. Within group differences were analyzed with paired Student t test (when comparing right and left hind limbs from the same animal) and one-way ANOVA. A p-value less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Tourniquet inflation provided a similar ischemic insult to both CsA-treated and vehicle-treated senescent rats.

Heart rate in the different phases of the protocol (ischemia and reperfusion) was not significantly different in the IR and CsA+IR study groups.

Compared to the controlateral non-ischemic hind limb, capillary lactate measurement in the left hind limb increased in a similar way in IR (from 1.9 ± 0.3 to 9.5 ± 1.7 mmol/L) and IR+CsA (from 1.4 ± 0.2 to 11.6 ± 1.9 mmol/L) study groups.

The single i.v. 10mg/kg Sandimmun® injection performed just before reperfusion induced blood cyclosporine concentrations of 5827 ± 498 µg/L at the end of reperfusion in CsA-treated animals.

In senescent animals submitted to unilateral skeletal muscle IR, mitochondrial respiration in the non-ischemic hind limb was not statistically different from that of sham animals

Maximal oxidative capacity (V_{Max}) was not significantly between the Sham group (5.44 ± 0.54 µMolO₂/min/g dry weight) and in the non-ischemic limbs of the IR (7.34 ± 1.50 µMolO₂/min/g dry weight) and CsA+IR (7.79 ± 1.62 µMolO₂/min/g dry weight) study groups (ANOVA $p=0.60$).

Likewise, V_{succ} and V_{TMPD} were not statistically different between the Sham group (4.96 ± 0.31 and 8.90 ± 1.27 µMolO₂/min/g dry weight respectively) and the non-ischemic limb of both IR (6.14 ± 1.07 and 9.76 ± 1.68 µMolO₂/min/g dry weight respectively) and IR+CsA (6.48 ± 1.38 and 10.67 ± 2.50 µMolO₂/min/g dry weight respectively) study groups (ANOVA $p=0.71$ and $p=0.86$ respectively for V_{succ} and V_{TMPD}).

Skeletal muscle IR induced by tourniquet application triggered a significant decrease in mitochondrial respiratory chain function and an early opening of the mPTP that were not restored by cyclosporine A

In vehicle-treated senescent rats, IR of the left hind limb induced a significant decrease in mitochondrial V_{Max} , ACR and V_{Succ} compared to the contralateral non-ischemic hind limb (Figure 2). The picture was exactly the same in CsA-treated rats: cyclosporine treatment could not rescue mitochondrial respiratory chain since V_{Max} , ACR and V_{Succ} were decreased after IR to a similar range than in vehicle-treated animals.

In vehicle-treated rats, IR of the left hind limb induced a significant decrease in calcium retention capacity (CRC) compared to the non-ischemic contralateral leg, indicative of an earlier opening of the mPTP (Figure 3). In CsA-treated rats, cyclosporine treatment did not increase CRC and could not delay mPTP opening.

Mitochondrial respiration in myocardium was not significantly different between vehicle-treated and CsA-treated senescent rats (Table 1).

Cyclosporine A induced a significant increase in local and remote oxidative stress

In gastrocnemius muscles from Sham-operated animals, ROS production was low and reproducible in both hind limbs. Ischemia-reperfusion induced a significant increase in muscular ROS production in both hind limbs (155% increase compared to Sham group) that was further amplified in CsA-treated animals (64% increase compared to IR group) (Figure 4).

Ischemia reperfusion of the left hind limb induced a non-significant increase in ROS production in myocardium from senescent rats (Figure 5). However, myocardial ROS

production in CsA treated animals was significantly increased compared to both Sham (+188%) and IR study groups (+84%).

DISCUSSION

Our unilateral IR model of the left hind limb in senescent rat provided similar mitochondrial respiration results that those we observed in younger rats [31]. Indeed, both W_{Max} and V_{Succ} in the non-ischemic hindlimb were within a comparable range of values. Moreover, our results also corroborate the validity of the contralateral leg as a control to study mitochondrial respiration during skeletal muscle ischemia-reperfusion since V_{Max} and V_{Succ} values were not significantly different between Sham and the non-ischemic hind limbs of both IR groups. Nevertheless, the ischemic insult appeared more severe in senescent rats with a more profound decrease in V_{Max} and V_{Succ} after IR.

What is more striking is the inability of intravenous CsA to provide muscular protection and the tendency to induce further oxidative damage in CsA-treated rats. In young healthy rats, we had previously demonstrated that intraperitoneal CsA administered during bilateral hind limb IR (clamping of the abdominal aorta) was able to provide partial skeletal muscle protection [Pottecher et al. submitted]. Indeed, CsA restored mitochondrial respiratory coupling and reduced ROS production (quantified by dihydroethidium staining) in gastrocnemius muscles submitted to IR. In the present study, CsA was unable to rescue the mitochondrial respiratory chain in senescent animals since V_{Max} , V_{Succ} and ACR remained significantly reduced. The expected protection by inhibition of mPTP opening did not even take place since the calcium retention capacity was not increased in CsA-treated compared to vehicle-treated senescent rats. On the top of that, CsA treatment triggered an increased oxidative stress both locally and in remote organs since the non-ischemic hind-limb and the heart experienced an increased ROS production. Taken together, our results suggest that the cyclosporine A treatment that was meant to provide protection and salvage skeletal muscle from tourniquet-induced IR, had in fact the opposite effect.

Our unexpected findings have to be discussed in the light of pharmacokinetic, physiologic and toxicologic data. First, although the cyclosporine dose was carefully chosen based on the positive results of previously published studies, it provided high plasmatic concentrations (statistically higher than previously observed in young healthy rats) that may lie above the therapeutic range. This was not expected since the pharmacokinetic properties of a single intravenous CsA dose is hardly altered in the aged rat [43]. As the pharmacologic window of cyclosporine A is bell-shaped [44], adverse events may have taken over and eradicated the potential protective effects. Second, CsA was unable to delay IR-induced mPTP opening in our senescent rats. Such results were already observed by Mather et al. [45] who demonstrated that aging enhanced mPTP activation and opening in lymphocytes, brain and liver. Indeed, cyclosporine allowed the accumulation of large amount of calcium in aged mice, albeit less than that obtained in young mice. In skeletal muscle, Marzetti et al. demonstrated that Cyp-D expression was increased in senescent rats [46], which could account for an early opening of the mPTP at baseline but not for the CsA lack of efficacy. Third, CsA exacerbated IR-induced oxidative stress in both ischemic and non-ischemic organs. Although possible, methodological flaws are unlikely since EPR spectroscopy is considered a robust technique of ROS assay [39,40,47] and randomization of our experiments precluded systematic order error. Increased oxidative stress is involved in both the aging process [23] and CsA toxic effects [48]. We have to consider the hypothesis that the combined influence of senescence and CsA treatment was synergic and triggered an overwhelming oxidative stress. In 24 months old rats, Palomero et al. observed that CsA treatment (10mg/kg ip for one week) induced oxidative stress to a greater extent in aged vs. young rats livers [49]. Indeed, the interaction of age and CsA treatment was found to be significant for a decrease in antioxidant enzymes and an increase in lipid peroxides.

According to the authors, a decreased antioxidant defense associated with age would lead to a higher susceptibility to CsA toxic effects in senescent animals.

CONCLUSION

In senescent rats, pharmacologic postconditioning with cyclosporine A did not protect skeletal muscles from ischemia-reperfusion injury associated with tourniquet application but instead exacerbated local and remote oxidative stress.

REFERENCES

1. Winker MA. Aging in the 21st century: a call for papers. *Arch. Neurol.* 59(4), 518–519 (2002).
2. Tosato F, Pilon F, Danieli D, Campanile F, Zaramella M, Milite D. Surgery for acute lower limb ischemia in the elderly population: results of a comparative study. *Ann Vasc Surg.* 25(7), 947–953 (2011).
3. Ballotta E, Da Giau G, Militello C, Terranova O, Piccoli A. Major elective surgery for vascular disease in patients aged 80 or more: perioperative (30-day) outcomes. *Ann Vasc Surg.* 21(6), 772–779 (2007).
4. Hernández-Vaquero D, Fernández-Carreira JM, Pérez-Hernández D, Fernández-Lombardía J, García-Sandoval MA. Total knee arthroplasty in the elderly. Is there an age limit? *J Arthroplasty.* 21(3), 358–361 (2006).
5. Alcelik I, Pollock RD, Sukeik M, Bettany-Saltikov J, Armstrong PM, Fisser P. A comparison of outcomes with and without a tourniquet in total knee arthroplasty: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Arthroplasty.* 27(3), 331–340 (2012).
6. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biochem.* 179(1-2), 169–187 (1998).
7. Vega VL, Mardones L, Maldonado M, *et al.* Xanthine oxidase released from reperfused hind limbs mediate kupffer cell activation, neutrophil sequestration, and hepatic oxidative stress in rats subjected to tourniquet shock. *Shock.* 14(5), 565–571 (2000).
8. Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, *et al.* Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *Journal of Vascular Surgery.* 46(3), 541–547 (2007).
9. Brooks SV, Faulkner JA. Contraction-induced injury: recovery of skeletal muscles in young and old mice. *Am. J. Physiol.* 258(3 Pt 1), C436–42 (1990).
10. Rader EP, Faulkner JA. Effect of aging on the recovery following contraction-induced injury in muscles of female mice. *J. Appl. Physiol.* 101(3), 887–892 (2006).
11. Hammers DW, Merritt EK, Matheny RW, *et al.* Functional deficits and insulin-like growth factor-I gene expression following tourniquet-induced injury of skeletal muscle in young and old rats. *J. Appl. Physiol.* 105(4), 1274–1281 (2008).
12. Volpi E, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB, Wolfe RR. Basal muscle amino acid kinetics and protein synthesis in healthy young and older men. *JAMA.* 286(10), 1206–1212 (2001).
13. Jang YC, Lustgarten MS, Liu Y, *et al.* Increased superoxide in vivo accelerates age-associated muscle atrophy through mitochondrial dysfunction and neuromuscular junction degeneration. *FASEB J.* 24(5), 1376–1390 (2010).
14. Mitchell GF. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. *J. Appl. Physiol.* 105(5),

1652–1660 (2008).

15. Bertoldi D, Parzy E, Fromes Y, Wary C, Leroy-Willig A, Carlier PG. New insight into abnormal muscle vasodilatory responses in aged hypertensive rats by in vivo nuclear magnetic resonance imaging of perfusion. *J. Vasc. Res.* 43(2), 149–156 (2006).
16. Wenzel P, Schuhmacher S, Kienhöfer J, *et al.* Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. *Cardiovascular Research.* 80(2), 280–289 (2008).
17. Charles AL, Guilbert AS, Bouitbir J, *et al.* Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg.* 98(4), 511–516 (2011).
18. Tran TP, Tu H, Pipinos II, Muelleman RL, Albadawi H, Li Y-L. Tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscles: Involvement of superoxide. *Eur. J. Pharmacol.* 650(1), 328–334 (2011).
19. Huda R, Solanki DR, Mathru M. Inflammatory and redox responses to ischaemia/reperfusion in human skeletal muscle. *Clin. Sci.* 107(5), 497–503 (2004).
20. Walters TJ, Kragh JF, Kauvar DS, Baer DG. The combined influence of hemorrhage and tourniquet application on the recovery of muscle function in rats. *J Orthop Trauma.* 22(1), 47–51 (2008).
21. Hancock HM, Stannard A, Burkhardt GE, *et al.* Hemorrhagic shock worsens neuromuscular recovery in a porcine model of hind limb vascular injury and ischemia-reperfusion. *YMVA.* 53(4), 1052–1062 (2011).
22. Koca K, Yurttas Y, Cayci T, *et al.* The Role of Preconditioning and N-Acetylcysteine on Oxidative Stress Resulting From Tourniquet-Induced Ischemia-Reperfusion in Arthroscopic Knee Surgery. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care.* 70(3), 717–723 (2011).
23. Boengler K, Schulz R, Heusch G. Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovascular Research.* 83(2), 247–261 (2009).
24. Boengler K, Buechert A, Heinen Y, *et al.* Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice. *Circ. Res.* 102(1), 131–135 (2008).
25. Mansour Z, Charles AL, Bouitbir J, *et al.* Remote and local ischemic postconditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia-reperfusion. *J. Vasc. Surg.* (2012).
26. Schoen M, Rotter R, Gierer P, *et al.* Ischemic preconditioning prevents skeletal muscle tissue injury, but not nerve lesion upon tourniquet-induced ischemia. *J Trauma.* 63(4), 788–797 (2007).
27. Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research.* 83(2), 213–225 (2009).
28. Piot C, Croisille P, Staat P, *et al.* Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 359(5), 473–481 (2008).

29. McAllister SE, Ashrafpour H, Cahoon N, *et al.* Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 295(2), R681–R689 (2008).
30. Sniecinski R, Liu H. Reduced efficacy of volatile anesthetic preconditioning with advanced age in isolated rat myocardium. *Anesthesiology*. 100(3), 589–597 (2004).
31. Thaveau F, Zoll J, Bouitbir J, *et al.* Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J. Surg. Res.* 155(1), 65–69 (2009).
32. Collange O, Charton A, Greib N, Joshi GP, Schaeffer R, Diemunsch PA. Correlation Between Arterial and Capillary Lactate Measurements in a Porcine Hemorrhagic Shock Model. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 68(1), 32–34 (2010).
33. Noll E, Bouitbir J, Collange O, *et al.* Local but not Systemic Capillary Lactate is a Reperfusion Biomarker in Experimental Acute Limb Ischaemia. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 1–2 (2012).
34. LIU L, ZHU J, BRINK PR, GLASS PSA, REBECCHI MJ. Age-associated differences in the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by cyclosporine A. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 55(5), 622–630 (2011).
35. Huhn R, Heinen A, Hollmann MW, Schlack W, Preckel B, Weber NC. Cyclosporine A administered during reperfusion fails to restore cardioprotection in prediabetic Zucker obese rats in vivo. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 20(10), 706–712 (2010).
36. Argaud L, GATEAUROESCH O, MUNTEAN D, *et al.* Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 38(2), 367–374 (2005).
37. Gill RS, Manouchehri N, Liu J-Q, *et al.* Cyclosporine treatment improves cardiac function and systemic hemodynamics during resuscitation in a newborn piglet model of asphyxia. *Crit. Care Med.* 40(4), 1237–1244 (2012).
38. Zoll J. ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *Journal of Applied Physiology*. 101(2), 385–391 (2006).
39. Swartz HM, Khan N, Khramtsov VV. Use of Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy to Evaluate the Redox State In Vivo. *Antioxid. Redox Signal.* 9(10), 1757–1772 (2007).
40. Vergely C, Maupoil V, Clermont G, Bril A, Rochette L. Identification and quantification of free radicals during myocardial ischemia and reperfusion using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* 420(2), 209–216 (2003).
41. Paillard M, Gomez L, Augeul L, Loufouat J, Lesnefsky EJ, Ovize M. Postconditioning inhibits mPTP opening independent of oxidative phosphorylation and membrane potential. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 46(6), 902–909 (2009).
42. Picard M, Csukly K, Robillard M-E, *et al.* Resistance to Ca²⁺-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative

- muscles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295(2), R659–68 (2008).
43. Molpeceres J, Chacón M, Guzmán M, Aberturas MR, Berges L. Dependency of cyclosporine tissue distribution and metabolism on the age and gender of rats after a single intravenous dose. *Int J Pharm.* 197(1-2), 129–141 (2000).
 44. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 25(12), 1461–1469 (1993).
 45. Mather M, Rottenberg H. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273(2), 603–608 (2000).
 46. Marzetti E, Wohlgemuth SE, Lees HA, Chung H-Y, Giovannini S, Leeuwenburgh C. Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle. *Mech. Ageing Dev.* 129(9), 542–549 (2008).
 47. Kohno M. Applications of electron spin resonance spectrometry for reactive oxygen species and reactive nitrogen species research. *J Clin Biochem Nutr.* 47(1), 1–11 (2010).
 48. Rezzani R. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. *Histol. Histopathol.* 21(3), 301–316 (2006).
 49. Palomero J, Galán AI, Muñoz ME, Tuñón MJ, González-Gallego J, Jiménez R. Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin A in rats. Changes in liver glutathione and antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine.* 30(8), 836–845 (2001).

TABLES

Table 1: Mitochondrial respiration variables in myocardium from vehicle and CsA-treated senescent rats

Group Variable	IR	CsA+IR	P value
V _{Max}	16.69±1.62	21.96±2.54	0.11
ACR	3.27±0.25	3.16±0.20	0.74
V _{Succ}	13.31±1.33	18.03±2.27	0.10
V _{TMPD}	18.24±2.09	23.53±3.12	0.18

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Experimental design

- o Sham: Sham animals underwent 5 hours of general anesthesia and were sham operated.
- o IR: Ischemia-reperfusion animals underwent 3 hours of left hind limb tourniquet ischemia (dark bar), followed by 2 hours of reperfusion (open bar). The right, non-ischemic hind limb served as a control.
- o CsA+IR: Cyclosporine post-conditioned animals underwent the same IR protocol but reperfusion was preceded by intravenous 10mg/kg cyclosporine A (CsA) injection.

Figure 2a: Maximal oxygen consumption (V_{Max}) in gastrocnemius muscles from ischemic and non-ischemic hind limbs in senescent rats treated or not with cyclosporine A

Mitochondrial substrates are glutamate and malate.

Results are expressed as means \pm SEM.

IR non-ischemic: non-ischemic (right) hind limb in ischemia-reperfusion animals

IR ischemic: ischemic (left) hind limb in ischemia-reperfusion animals

CsA+IR non ischemic: non-ischemic (right) hind limb in cyclosporine-postconditioned animals animals

CsA+IR ischemic: ischemic (left) hind limb in cyclosporine-postconditioned animals animals

* : $P < 0,05$; NS: non significant

Figure 2b: Acceptor control ratio (ACR) in gastrocnemius muscles from ischemic and non-ischemic hind limbs in senescent rats treated or not with cyclosporine A

Figure 2c: V_{Succ} in gastrocnemius muscles from ischemic and non-ischemic hind limbs in senescent rats treated or not with cyclosporine A

Figure 2d: V_{TMPD} in gastrocnemius muscles from ischemic and non-ischemic hind limbs in senescent rats treated or not with cyclosporine A

Figure 3: Calcium retention capacity (CRC) in gastrocnemius muscles from ischemic and non-ischemic hind limbs in senescent rats treated or not with cyclosporine A

Figure 4: Reactive oxygen species (ROS) production in in gastrocnemius muscles from ischemic and non-ischemic hind limbs in senescent rats treated or not with cyclosporine A

Figure 5: Reactive oxygen species (ROS) production in myocardium from senescent rats treated or not with cyclosporine A

FIGURES

Figure 1:

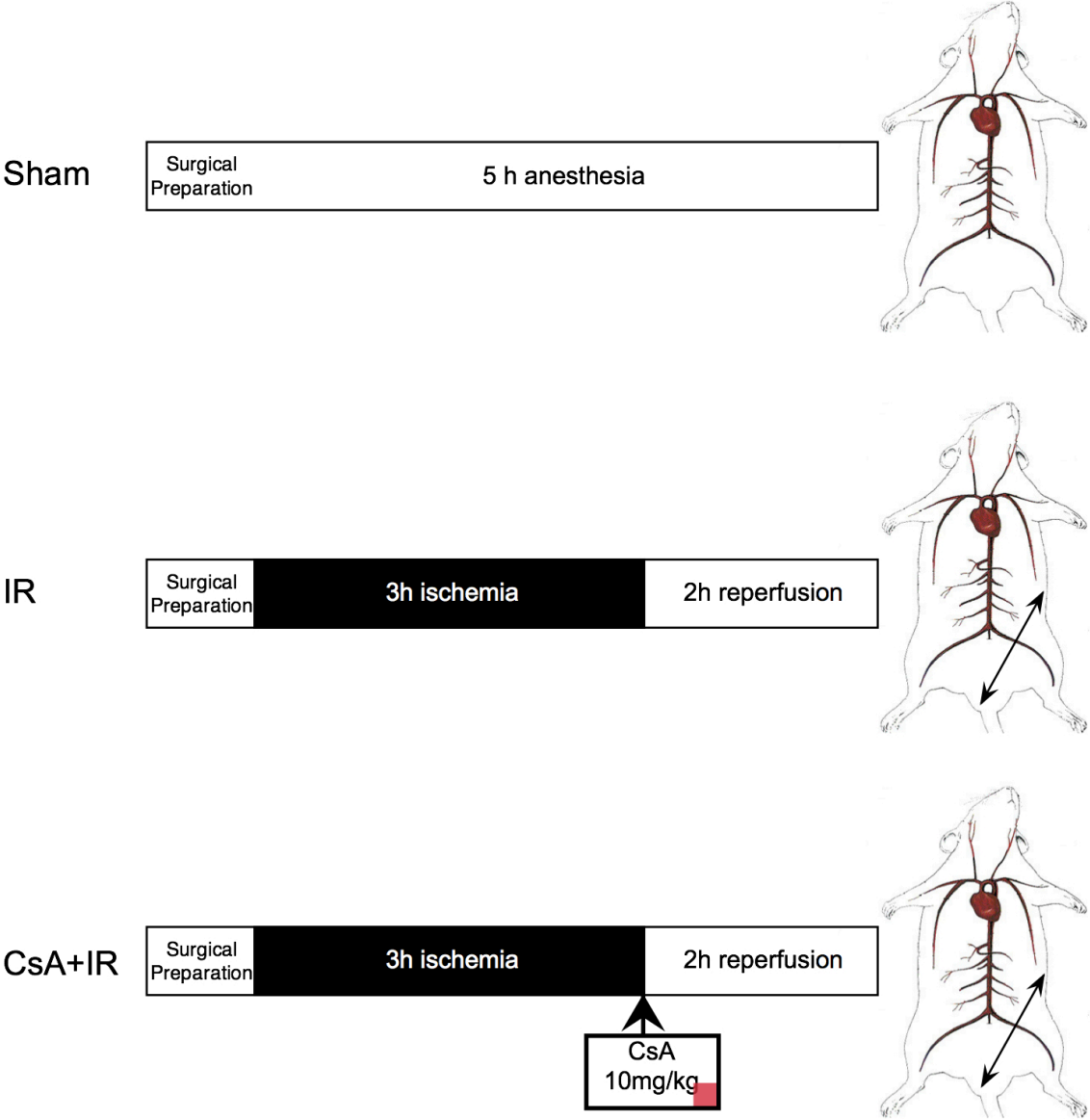
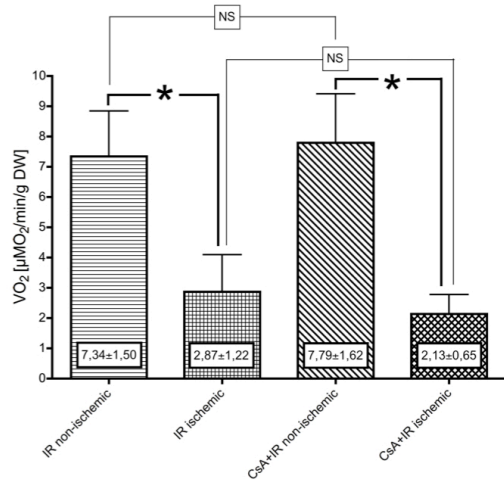
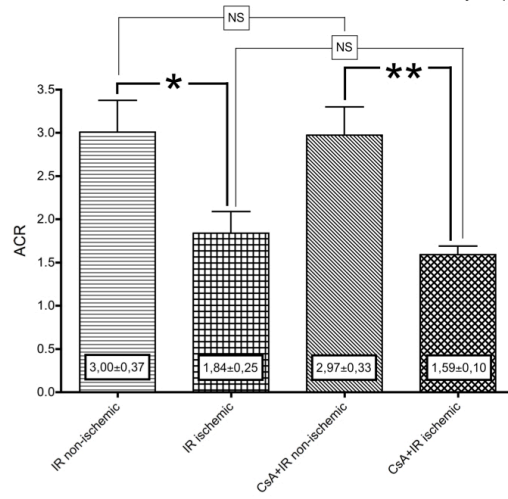


Figure 2:

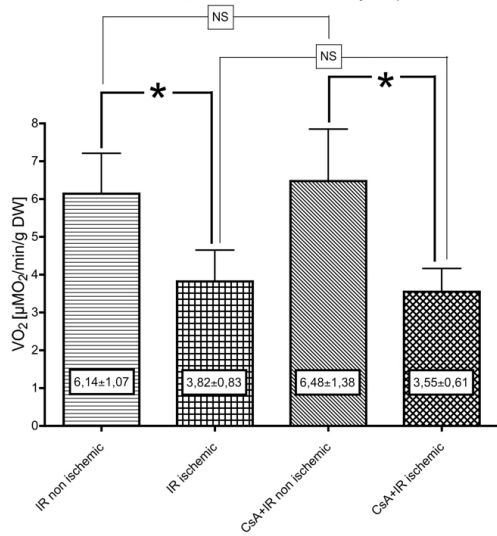
a. V_{Max} in gastrocnemius muscles from ischemic and non-ischemic hind limbs in senescent rats treated or not with cyclosporine A



b. Acceptor control ratio in gastrocnemius muscles from ischemic and non-ischemic hind limbs in senescent rats treated or not with cyclosporine A



c. V_{Succ} in gastrocnemius muscles from ischemic and non-ischemic hind limbs in senescent rats treated or not with cyclosporine A



d. V_{TMPD} in gastrocnemius muscles from ischemic and non-ischemic hind limbs in senescent rats treated or not with cyclosporine A

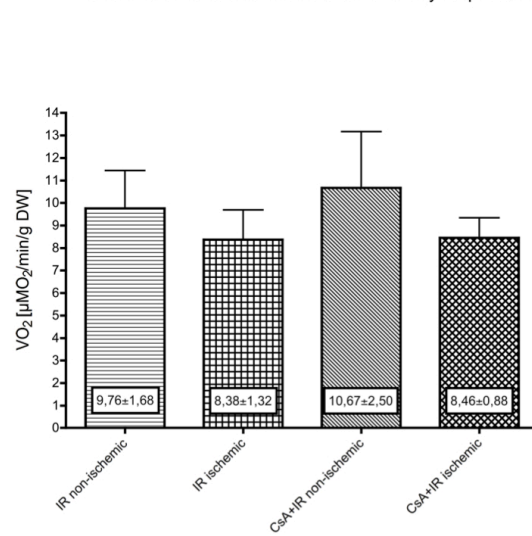


Figure 3:

Calcium retention capacity (CRC) in gastrocnemius muscles from ischemic and non-ischemic hind limbs in senescent rats treated or not with cyclosporine A

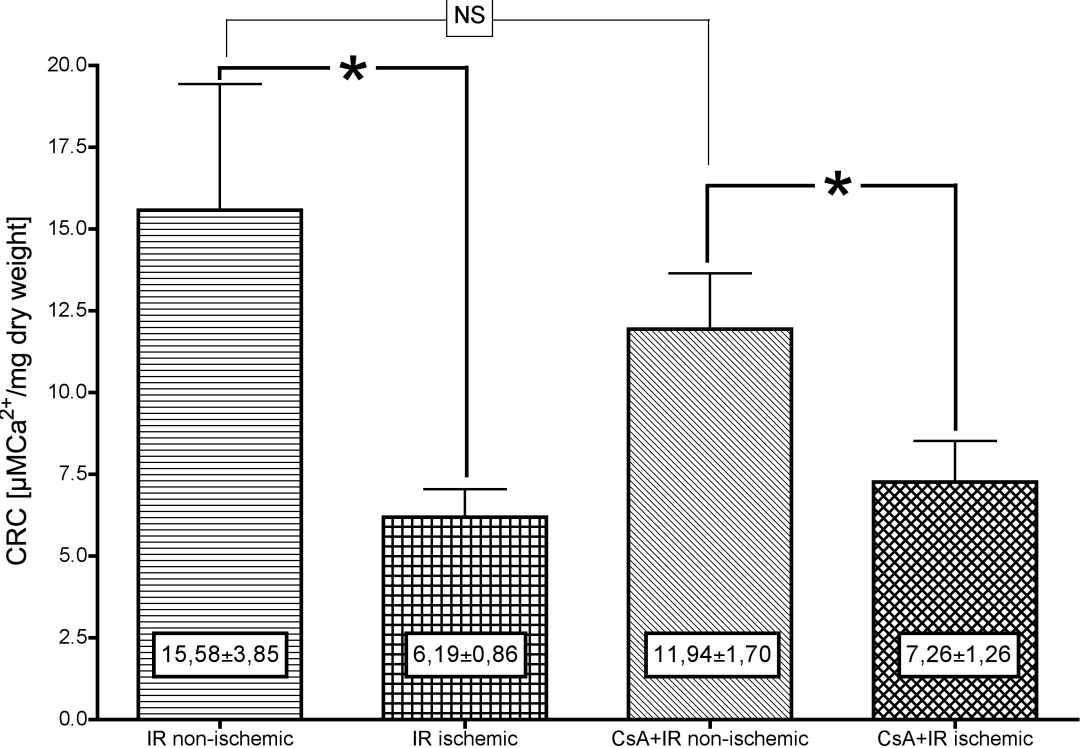


Figure 4:

Reactive oxygen species (ROS) production in gastrocnemius muscles from ischemic and non-ischemic hind limbs in senescent rats treated or not with cyclosporine A

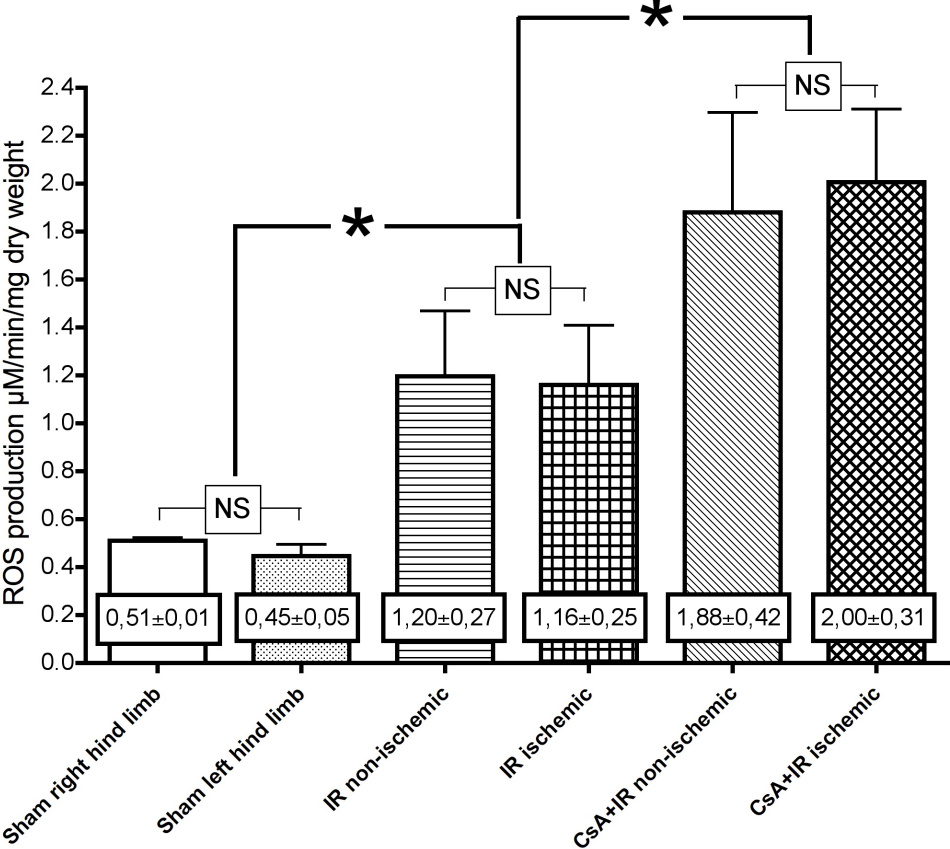


Figure 5:

Reactive oxygen species (ROS) production in myocardium from senescent rats treated or not with cyclosporine A

