



**HAL**  
open science

# Compartimentation intracellulaire du métabolisme énergétique dans les différentes chambres cardiaques : quelle implication en rythmologie ?

Mathilde Chapolard

## ► To cite this version:

Mathilde Chapolard. Compartimentation intracellulaire du métabolisme énergétique dans les différentes chambres cardiaques : quelle implication en rythmologie ?. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0391 . tel-01152713

**HAL Id: tel-01152713**

**<https://theses.hal.science/tel-01152713v1>**

Submitted on 18 May 2015

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Mathilde CHAPOLARD

**Compartimentation intracellulaire du métabolisme  
énergétique dans les différentes chambres cardiaques :  
Quelle implication en rythmologie ?**

Sous la direction de : Véronique DESCHODT-ARSAC

Soutenue le 9 décembre 2014

Membres du jury :

Mme. VENTURA-CLAPIER, Renée  
M. ZOLL, Joefrey  
Mme. GUZUN, Rita  
M. DOS SANTOS, Pierre  
M. JAÏS, Pierre  
M. ROSSIGNOL, Rodrigue  
M. FAUCONNIER, Jérémie  
Mme. DESCHODT-ARSAC, Véronique

DR (CNRS, Université Paris-Sud)  
MCU-PH (Université de Strasbourg)  
MCU-PH (Université de Grenoble)  
PU-PH (Université de Bordeaux)  
PU-PH (Université de Bordeaux)  
CR (Université de Bordeaux)  
CR (Université Montpellier 1)  
MCU (Université de Bordeaux)

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Président  
Membre Invité  
Membre Invité  
Encadrante



---

## **Compartimentation intracellulaire du métabolisme énergétique dans les différentes chambres cardiaques : Quelle implication en rythmologie ?**

**Résumé :** Les pathologies cardiovasculaires sont responsables d'un grand nombre de décès dans le monde aujourd'hui, dont plus de la moitié trouve son origine dans des anomalies rythmiques. Les phénomènes de dépolarisation et de repolarisation rythmiques des cardiomyocytes, à l'origine de l'activité contractile rythmique du myocarde, mettent en jeu des processus cellulaires consommateurs d'énergie et les mitochondries. Dans cette thèse, la régulation de la fonction mitochondriale a été étudiée lors de l'induction d'arythmies ventriculaires sur cœurs isolés perfusés de rats. Les résultats montrent que l'évolution de la consommation d'oxygène du myocarde est un paramètre important dans la réponse aux arythmies. L'inhibition des myosines ATPases par la blebbistatine induit sur la durée une diminution de la susceptibilité vis-à-vis des arythmies. Les acteurs impliqués dans les différents types de réponses mitochondriales ont été caractérisés sur fibres perméabilisées. Nous montrons que la régulation de la fonction mitochondriale varie en fonction de la chambre cardiaque considérée. Les mesures de Km de la respiration mitochondriale, ainsi que l'étude des principaux mécanismes de transfert énergétiques, mettent en évidence des différences marquées entre les différentes chambres cardiaques. Les résultats de nos travaux suggèrent que le remodelage myocardique observé en réponse aux modifications de charge, et/ou lors du développement des pathologies du myocarde sont susceptibles de favoriser la constitution d'un substrat arythmogène, propre à chaque chambre, et impliquant des perturbations des mécanismes de transfert énergétique.

**Mots clés :** Rythmologie cardiaque, Arythmies, cœur, ventricule, oreillette, énergétique, mitochondrie, phosphotransferts, Adenylate kinase, appareil contractile, myosine ATPase.

---

## **Intracellular compartmentation in cardiac energetics in ventricles and atria : Implications in cardiac electrical dysfunctions.**

**Abstract :** Cardiovascular disease is the first cause of mortality in the whole world. Half of this mortality is due to heart failure, a progressive deterioration of cardiac contraction, which can be caused by electrical dyssynchrony. Implication of heart energetics on susceptibility to arrhythmia is therefore of particular interest to better understand the overall effect as well as the relative importance of the potential partners on developed pathologies. In this thesis, energetic regulation of mitochondria was studied in perfused hearts paced to induce arrhythmia. Myocardial oxygen consumption was shown as a crucial parameter in the response to rhythm troubles. Inhibitions of ATPase myofibrils by blebbistatin or AK-phosphotransfer by Ap5a did not produce same responses of mitochondrial compartment. When inhibited by Blebb, most of hearts presented less ectopic beats highlighting an anti-arrhythmic profile in this case of myofibrils inhibition. Energetic parameters involved in mitochondrial responses were characterized in skinned fibres. Mitochondria regulation was different between ventricle and atria, with a less sensitivity of mitochondria in atria compared to ventricle. Mechanisms of energy transfer between supply and demand were different between ventricle and atria. The role of AK-phosphotransfer was described as a determining parameter for atria energy maintenance, whereas ventricle presented a functional efficacy of CK pathway to regulate adenine nucleotide turnover. As suggested by these results, the role of adenylic nucleotides channeling could be considered as a mechanism used to counteract altered cardiac energetics that potentially sustained electrical pathologies.

**Keywords :** Arrhythmia, heart, ventricle, atria, energetic, mitochondria, phosphotransfer, contraction, adenylate kinase, myosine ATPase

---

**IHU Liryc – CRCTB Inserm U1045**  
L'Institut de Rythmologie et de Modélisation cardiaque  
Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux  
PTIB – Hôpital X. Arnanan  
Avenue du Haut Levêque  
33604 Pessac

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES EQUATIONS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTES DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b> .....	<b>11</b>
<b>1 PRÉAMBULE</b> .....	<b>15</b>
<b>2 INTRODUCTION</b> .....	<b>20</b>
2.1 GÉNÉRALITÉS SUR QUELQUES PARTICULARITÉS DE LA BIOÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE .....	20
2.2 BASES EN ANATOMIE FONCTIONNELLE DU CŒUR .....	21
2.2.1 <i>Préambule</i> .....	21
2.2.2 <i>Ultrastructure cardiaque</i> .....	22
2.2.3 <i>Les voies de conduction de la dépolarisation</i> .....	23
2.3 BIOÉNERGÉTIQUE DU MYOCARDE .....	24
2.3.1 <i>Module « producteur d'énergie » : énergétique mitochondriale</i> .....	25
2.3.1.1 Préambule .....	25
2.3.1.2 Les différentes voies métaboliques .....	25
2.3.1.2.1 Oxydation des acides gras .....	26
2.3.1.2.2 Métabolisme du glucose .....	28
2.3.1.2.3 Le cycle de Krebs .....	29
2.3.1.2.4 Le métabolisme des acides aminés .....	30
2.3.1.3 La phosphorylation oxydative mitochondriale .....	31
2.3.2 <i>Modules « consommateur d'énergie »</i> .....	35
2.3.2.1 Préambule .....	35
2.3.2.2 Appareil contractile .....	36
2.3.3 <i>La régulation des flux énergétiques et le transfert énergétique entre les sites de production et d'utilisation</i> .....	37
2.3.3.1 Activation parallèle par le calcium .....	37
2.3.3.2 Compartimentation intracellulaire du métabolisme énergétique du myocarde .....	38
2.3.3.2.1 Le transfert énergétique par la navette Cr/PCr .....	39
2.3.3.2.2 Le transfert énergétique par le système de l'adénylate kinase .....	42
2.3.3.2.3 Le rôle du cytosquelette et de la compartimentation du métabolisme énergétique du myocarde en Unités Énergétiques Intracellulaires .....	43
2.4 IMPLICATIONS DE LA BIOÉNERGÉTIQUE DANS LES PATHOLOGIES CARDIAQUES .....	46
2.4.1 <i>Bioénergétique et insuffisance cardiaque</i> .....	46
2.4.2 <i>Mitochondries et troubles du rythme</i> .....	47
2.4.2.1 Hypothèse d'une dépolarisation membranaire mitochondriale .....	47
2.4.2.1.1 Stress oxydant et arythmies .....	48

2.4.2.1.2	Canaux ioniques mitochondriaux et arythmies .....	48
2.4.2.2	Hypothèse d'une dérégulation de la balance énergétique.....	49
2.4.2.3	Implications de l'appareil contractile dans les troubles du rythme.....	50
2.4.3	<i>Implication du transfert énergétique dans les troubles du rythme</i> .....	51
2.4.3.1	Implication du système de la créatine kinase .....	51
2.4.3.2	Implication du système de l'adénylate kinase.....	52
<b>3</b>	<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>60</b>
4.1	PERFUSION DE CŒUR <i>EX VIVO</i> SELON LA TECHNIQUE LANGENDORFF.....	60
4.1.1	<i>Préparation et montage du cœur ex vivo</i> .....	60
4.1.2	<i>Evaluation du travail cardiaque</i> .....	62
4.1.3	<i>Mesure de la consommation en oxygène</i> .....	62
4.1.4	<i>Mesure de l'activité électrique cardiaque</i> .....	64
4.1.5	<i>Mesure du potentiel redox myocardique</i> .....	65
4.1.6	<i>Protocole de détermination des seuils de susceptibilité à la fibrillation</i> .....	67
4.1.7	<i>Analyse des ECG de surface</i> .....	67
4.1.8	<i>Pharmacologie</i> .....	68
4.2	TECHNIQUE DE FIBRES PERMÉABILISÉES .....	70
4.2.1	<i>Préparation des fibres perméabilisées</i> .....	70
4.2.2	<i>Mesure de la respiration mitochondriale</i> .....	71
4.2.2.1	Mesure de l'intégrité membranaire .....	72
4.2.2.2	Evaluation du fonctionnement des différents complexes de la chaîne respiratoire .....	73
4.2.2.3	Mesures des affinités apparentes de la respiration mitochondriale pour les nucléotides adényliques ...	74
4.2.3	<i>Mesure des activités ATPasiques tissulaires</i> .....	76
4.2.4	<i>Etude de la compartimentation bioénergétique in situ</i> .....	76
4.2.4.1	Préparation des fibres perméabilisées et trypsinisées .....	76
4.2.4.2	Dosage des flux de nucléotides adényliques entre l'appareil contractile et la mitochondrie .....	77
4.2.4.3	Evaluation de l'impact de l'accumulation d'ATP sur la respiration mitochondriale .....	78
4.2.5	<i>Etablissement des gammes : poids sec/ poids frais et poids frais/mg de protéine</i> .....	79
4.2.5.1	Relation du poids sec en fonction du poids frais de fibres .....	79
4.2.5.2	Relation du poids frais en fonction de la quantité de protéines .....	80
4.3	QUANTIFICATION ET QUALIFICATION PROTÉIQUE .....	81
4.3.1	<i>Extraction protéique</i> .....	81
4.3.2	<i>Dosage des protéines par la méthode Bradford</i> .....	81
4.3.3	<i>Mesure de l'activité enzymatique de la Citrate synthase</i> .....	82
4.3.4	<i>Etude protéomique</i> .....	83
4.4	ANALYSES STATISTIQUES .....	84
<b>5</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>87</b>
5.1	CONSÉQUENCES FONCTIONNELLES DU DÉCOUPLAGE BIOÉNERGÉTIQUE DE L'APPAREIL CONTRACTILE ET LA MITOCHONDRIE	87

5.1.1	<i>Conséquences hémodynamiques du découplage bioénergétique</i> .....	87
5.1.2	<i>Evaluation de la susceptibilité à l'arythmie</i> .....	92
5.1.2.1	Susceptibilité des cœurs perfusés à développer des arythmies.....	92
5.1.2.2	Effet du rendement cardiaque sur la susceptibilité à l'arythmie.....	96
5.1.3	<i>Respiration durant la fibrillation</i> .....	97
5.2	EFFETS MÉCANISTIQUES DU DÉCOUPLAGE DE L'APPAREIL CONTRACTILE ET LA MITOCHONDRIE.....	101
5.2.1	<i>Différences des paramètres bioénergétiques dans les différents tissus cardiaques</i> .....	101
5.2.1.1	Masse mitochondriale.....	101
5.2.1.2	Complexes de la chaîne respiratoire.....	102
5.2.1.3	Stimulation de la respiration mitochondriale par l'ADP.....	103
5.2.2	<i>Compartmentation bioénergétique et flux des nucléotides</i> .....	105
5.2.2.1	Implications de l'activité ATPasique.....	105
5.2.2.2	Effet des inhibiteurs de la signalisation énergétique.....	106
5.2.2.2.1	Inhibition des myosines ATPases.....	108
5.2.2.2.2	Modulation des phosphotransferts énergétiques : Créatine Kinase et Adénylate Kinase.....	109
5.2.2.3	Système de compartimentation via le cytosquelette cellulaire.....	111
5.3	ANALYSE PROTÉOMIQUE DES DIFFÉRENTS TISSUS CARDIAQUES.....	116
5.3.1	<i>Différences protéomiques régionales du métabolisme des substrats</i> .....	117
5.3.1.1	Métabolisme des sucres.....	117
5.3.1.1.1	La glycolyse.....	117
5.3.1.1.2	Le devenir du pyruvate.....	119
5.3.1.2	Métabolisme des acides gras.....	120
5.3.1.2.1	Le transport mitochondrial des acides gras (Tableau 12).....	121
5.3.1.2.2	La $\beta$ -oxydation (Tableau 12).....	121
5.3.2	<i>Différences protéomiques régionales des oxydations phosphorylantes</i> .....	121
5.3.2.1	Cycle de Krebs.....	121
5.3.2.2	La chaîne respiratoire.....	122
5.3.2.3	Le stress oxydant.....	126
5.3.3	<i>Différences protéomiques régionales des canaux et échangeurs mitochondriaux</i> .....	126
5.3.4	<i>Différences protéomiques régionales de l'architecture cellulaire</i> .....	128
5.3.4.1	Filaments d'actine ou microfilaments.....	128
5.3.4.2	Sarcomères.....	129
5.3.4.3	Filaments intermédiaires.....	131
5.3.4.4	Microtubules.....	132
<b>6</b>	<b>DISCUSSION, CONCLUSIONS, PERSPECTIVES</b> .....	<b>137</b>
6.1	RÉPONSES ÉNERGÉTIQUES MITOCHONDRIALES ET SUSCEPTIBILITÉ AUX ARYTHMIES VENTRICULAIRES.....	139
6.2	RÉGULATION ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE PAR LES DIFFÉRENTS ACTEURS DU SYSTÈME.....	143



---

6.2.1	<i>La biogénèse mitochondriale est probablement différente dans ventricules et oreillettes.....</i>	143
6.2.2	<i>L'équipement en chaîne respiratoire mitochondriale n'est pas significativement différent entre ventricule et oreillette gauches .....</i>	144
6.2.3	<i>La régulation de la fonction mitochondriale est différente entre les ventricules et les oreillettes...</i>	144
6.2.4	<i>Il existe un impact de l'architecture cellulaire sur l'origine des différences de régulation de la fonction mitochondriale entre les oreillettes et les ventricules. ....</i>	145
6.3	APPLICATION À DES MODÈLES DE RATS PATHOLOGIQUES, PERSPECTIVES.....	147
6.4	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	149
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>153</b>
<b>8</b>	<b>ANNEXE .....</b>	<b>167</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Présentation des différentes chambres cardiaques.....	21
Figure 2 : Images microscopiques de cellules atriales et ventriculaires.....	22
Figure 3 : Image de microscopie électronique (grossissement x6000) de trois cellules de Purkinje .....	23
Figure 4 : Propagation de l'activation électrique au niveau cardiaque .....	24
Figure 5 : Métabolisme des substrats dans un cœur sain.....	26
Figure 6 : La bêta-oxydation mitochondriale .....	27
Figure 7 : La glycolyse et ses régulations .....	29
Figure 8 : Le cycle de Krebs et ses régulations .....	30
Figure 9 : Implications des acides aminés dans le métabolisme .....	31
Figure 10 : Les complexes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase .....	34
Figure 11 : Le cycle de contraction des myofilaments.....	36
Figure 12 : Schéma de l'activation parallèle des modules producteurs et consommateurs d'énergie au sein des cardiomyocytes.....	38
Figure 13 : Navette de phosphotransfert Cr/PCr .....	39
Figure 14 : Schéma des réactions en chaîne du transfert des groupes phosphorylés catalysées par l'AK.....	42
Figure 15 : Compartimentation des nucléotides adényliques entre les modules énergétiques.....	44
Figure 16 : Schéma des ICEUs présentés dans les cardiomyocytes.....	45
Figure 17 : Montage de perfusion de cœur en mode Langendorff. ....	61
Figure 18 : Evaluation du travail cardiaque. ....	62
Figure 19 : Mesure de la consommation en oxygène.....	63
Figure 20 : Mesure de l'activité électrique cardiaque .....	64
Figure 21 : Spectres caractéristiques d'excitation et d'émission des flavoprotéines et du pool total de NAD(P)H obtenus sur cœur isolé perfusé et mitochondries isolées. ....	66
Figure 22 : Suivi de l'évolution du potentiel redox .....	67
Figure 23 : Protocole de stimulation de cœur perfusé .....	69
Figure 24 : Protocole de préparation de fibres isolées perméabilisées et/ou de fibres isolées perméabilisées trypsinées. ....	70
Figure 25 : Tracé oxygraphique d'un test d'intégrité membranaire mitochondriale. ....	72
Figure 26 : Tracé oxygraphique de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. ....	73
Figure 27 : Tracé oxygraphique d'une stimulation de la respiration mitochondriale par l'ADP exogène et définissant des courbes de type Michaelis-Menten. ....	75
Figure 28 : Schéma des systèmes enzymatiques rapporteurs de la quantité d'ADP ou d'ATP par suivi spectrophométrique.....	78
Figure 29 : Relation du poids sec en fonction du poids frais des fibres perméabilisées des différents tissus cardiaques .....	79
Figure 30 : Relation de la concentration protéique en fonction du poids frais des fibres perméabilisées des différents tissus cardiaques .....	80
Figure 31 : Gamme étalon pour le dosage protéique par la méthode colorimétrique Bradford.....	82
Figure 32 : Evolution du travail, de la consommation en oxygène et du rendement cardiaque .....	89
Figure 33 : Evolution de la pression aortique.....	90
Figure 34 : Evolution du potentiel Redox cardiaque .....	91
Figure 35 : Effets de 5 secondes de stimulation électrique sur les fréquences dominantes des ECG de surface. 92	
Figure 36 : Effets de 5 secondes de stimulation électrique sur l'indice de régularité (I.R) .....	94
Figure 37 : Nombre d'ectopies ventriculaires lors des phases de récupération entre deux séquences de stimulation électrique.....	95
Figure 38 : Rendement cardiaque avant les différentes stimulations électriques .....	97
Figure 39 : Evolution de la respiration pendant et après une stimulation électrique de 30 secondes. ....	98

---

Figure 40 : Paramètres de la variation de la $MVO_2$ pendant et après une stimulation électrique de 30 secondes. ....	99
Figure 41 : Masse mitochondriale des différentes régions cardiaques.....	101
Figure 42 : Affinités apparentes de la respiration mitochondriale pour l'ADP exogène dans les différents tissus cardiaques. ....	104
Figure 43 : Activité ATPasique non mitochondriale des compartiments cardiaques gauches. ....	105
Figure 44 : Paramètres respiratoires mitochondriaux lors d'une stimulation à l'ATP exogène des fibres perméabilisées des compartiments cardiaques gauches. ....	106
Figure 45 : Impacts de la modulation bioénergétique sur les efficacités catalytiques mitochondriales lors d'une stimulation à l'ADP exogène et endogène de fibres perméabilisées des compartiments cardiaques gauches.....	108
Figure 46 : Impacts des différents systèmes de compartimentation bioénergétique sur l'efficacité catalytique mitochondriale lors d'une stimulation à l'ADP exogène.....	113
Figure 47 : Impacts de la déstructuration du cytosquelette cellulaire sur la production de nucléotides des fibres perméabilisées des compartiments cardiaques gauches.....	114
Figure 48 : Profil général des quantités de protéines dans chaque tissu cardiaque par rapport au VG. ....	134

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les syndromes mitochondriaux et leurs manifestations cardiovasculaires. ....	47
Tableau 2 : Paramètres hémodynamiques des cœurs perfusés en mode Langendorff. ....	88
Tableau 3 : Effets de la durée de stimulation électrique sur la distribution des fréquences dominantes. ....	93
Tableau 4 : Effets de la durée de stimulation électrique sur l'indice de régularité (I.R) ....	95
Tableau 5: Activités des complexes de la chaîne respiratoire des fibres perméabilisées récoltées dans les différents tissus cardiaques. ....	103
Tableau 6 : Impacts de la modulation bioénergétique sur les paramètres respiratoires mitochondriaux de fibres perméabilisées des compartiments cardiaques gauches, stimulée à l'ADP exogène. ....	107
Tableau 7 : Impacts de la modulation bioénergétique sur les paramètres respiratoires mitochondriaux de fibres perméabilisées des compartiments cardiaques gauches, stimulée à l'ADP endogène. ....	107
Tableau 8 : Impacts des différents systèmes de compartimentation bioénergétique sur les paramètres respiratoires mitochondriaux lors d'une stimulation à l'ADP exogène. ....	112
Tableau 9 : Impacts de la modulation bioénergétique sur l'activité ATPasique non mitochondriale des fibres perméabilisées des compartiments cardiaques gauches. ....	112
Tableau 10 : Protéines caractéristiques de la glycolyse. ....	118
Tableau 11 : Protéines impliquées dans le devenir du pyruvate. ....	119
Tableau 12 : Protéines impliquées dans le transport des acides gras et la bêta-oxydation. ....	120
Tableau 13 : Protéines impliquées dans le cycle de Krebs. ....	122
Tableau 14 : Protéines impliquées dans le complexe I de la chaîne respiratoire. ....	124
Tableau 15 : Protéines impliquées dans la chaîne respiratoire. ....	125
Tableau 16 : Protéines impliquées dans le stress oxydant. ....	126
Tableau 17 : Protéines membranaires mitochondriales et/ou impliquées dans le phospho-tranfert. ....	127
Tableau 18 : Protéines impliquées dans les filaments d'actine. ....	129
Tableau 19 : Protéines impliquées dans les sarcomères. ....	131
Tableau 20 : Protéines impliquées dans les filaments intermédiaires et les microtubules. ....	133

## LISTE DES EQUATIONS

Équation 1 : Consommation globale d'oxygène du myocarde .....	63
Équation 2 : Potentiel redox cardiaque .....	66
Équation 3 : Equation Michaelis-Menten .....	74
Équation 4 : Concentration protéique .....	81
Équation 5 : Réactions enzymatique de la citrate synthase et du DTNB .....	82
Équation 6 : Activité spécifique de la citrate synthase.....	83

## LISTES DES ABRÉVIATIONS

<b>ADP</b>	Adénosine DiPhosphate
<b>AK</b>	Adénylate Kinase
<b>AMP</b>	Adénosine MonoPhosphate
<b>AMPc</b>	Adénosine Monophosphate cyclique
<b>AMPK</b>	Adénosine Monophosphate Kinase
<b>ANT</b>	Adenine Nucleotide Translocator
<b>Ap5a</b>	Diadénosine Pentaphosphate
<b>ATP</b>	Adénosine TriPhosphate
<b>ATPase</b>	Adénosine TriPhosphatase
<b>Blebb</b>	Blebbistatine
<b>CEC</b>	Couplage Excitation-Contraction
<b>CICR</b>	Calcium Induced Calcium Release
<b>CK</b>	Créatine Kinase
<b>CO<sub>2</sub></b>	DiOxyde de Carbone
<b>CoA</b>	Co-enzyme A
<b>COX</b>	Cytochrome Oxydase
<b>CPT</b>	Carnitine PalmitoylTransférase
<b>Cr</b>	Créatine
<b>ΔGp</b>	Energie libre de l'hydrolyse de l'ATP
<b>ΔΨ<sub>m</sub></b>	Potentiel de membrane mitochondriale
<b>ECG</b>	ElectroCardioGramme
<b>FA</b>	Fibrillation Auriculaire
<b>FADH</b>	Flavine Adénine Dinucléotide
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavine Adénine Dinucléotide réduit
<b>FAT</b>	Transporteur des acides gras
<b>FFA</b>	Free Fatty Acids
<b>FMN</b>	MonoNucléotide Flavinique
<b>FV</b>	Fibrillation Ventriculaire
<b>G3PDH</b>	Glycéraldéhyde 3-Phosphate Déshydrogénase
<b>G 6-P</b>	Glucose 6-phosphate
<b>GLUT</b>	Transporteur de Glucose
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>HK</b>	Hexokinase
<b>ICEU</b>	IntraCellular Energetic Units
<b>KO</b>	Knock Out
<b>MEM</b>	Membrane Externe Mitochondriale
<b>MIM</b>	Membrane Interne Mitochondriale
<b>MCT</b>	Transporteur des acides monocarboxyliques
<b>mPTP</b>	Mitochondrial Permeability Transition Pore
<b>NAD</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide

<b>NADH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
<b>NADP</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide Phosphate
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide Phosphate réduit
<b>NAV</b>	Nœud Atrio-ventriculaire
<b>NCX</b>	Echangeur Sodium-Calcium
<b>NS</b>	Nœud Sinusal
<b>O<sub>2</sub></b>	DiOxygène
<b>OD</b>	Oreillette Droite
<b>OG</b>	Oreillette Gauche
<b>PCr</b>	Phospho-Créatine
<b>PDH</b>	Pyruvate Déshydrogénase
<b>PEP</b>	Phosphoénol Pyruvate
<b>PK</b>	Pyruvate Kinase
<b>PKA</b>	Pyruvate Kinase AMPc-dépendante
<b>PKF</b>	Phosphofructokinase
<b>Pi</b>	Phosphate Inorganique
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>RyR</b>	Ryanodine Receptor
<b>SarcK<sub>ATP</sub></b>	Canaux potassiques ATP-dépendant de la membrane sarcolemmale
<b>SERCA</b>	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase
<b>Sp</b>	Septum
<b>TCA</b>	Cycle de l'Acide Citrique ou cycle de Krebs
<b>VD</b>	Ventricule Droit
<b>VDAC</b>	Voltage Dependant Anion Channel
<b>VG</b>	Ventricule Gauche

## LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### Articles dans des revues à comité de lecture:

#### **Publications s'inscrivant dans la thématique de la thèse**

Deschodt-Arsac, V., Calmettes, G., Gouspillou, G., **Chapolard, M.**, Raffard, G., Rouland, R., Jais, P., Haissaguerre, M., Dos Santos, P., and Diolez, P. (2013). Non-invasive integrative analysis of contraction energetics in intact beating heart. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 4–10.

**M. Chapolard**, P. Pasdois, F. Vaillant, D. Detaille, P. Jais, P. Dos Santos, P. Diolez, V. Deschodt-Arsac Adaptation of kinetic properties as a function of atrial and ventricular cardiac muscle mitochondria in response to modulations of energy demand. Soumis à *Pflugers Archives*. En cours de réécriture et complémentation de résultats.

#### **Autres publications**

Courboulin, A., Tremblay, V.L., Barrier, M., Meloche, J., Jacob, M.H., **Chapolard, M.**, Bissier, M., Paulin, R., Lambert, C., Provencher, S., et al. (2011). Krüppel-like factor 5 contributes to pulmonary artery smooth muscle proliferation and resistance to apoptosis in human pulmonary arterial hypertension. *Respir Res.* 2011 Sep 27;12:128. doi: 10.1186/1465-9921-12-128.

Fortin, P.-Y., Genevois, C., **Chapolard, M.**, Santalucía, T., Planas, A.M., and Couillaud, F. (2014). Dual-reporter in vivo imaging of transient and inducible heat-shock promoter activation. *Biomed Opt Express.* 2014 Jan 13;5(2):457-67. doi: 10.1364/BOE.5.000457. eCollection 2014.

### Communications orales :

**Chapolard, M**, Pasdois P., Vaillant V., Detaille D., Arsac L., Dos Santos P., Diolez P., Deschodt-Arsac V. In vitro study of nucleotide adenylic compartmentation in the four cardiac chambers. Printemps de la cardiologie. Société française de cardiologie. Strasbourg, Avril 2014.

J'ai pu également être **modératrice de la session** « club des jeunes du GRRC » pour ce congrès de la Société Française de Cardiologie

### Communications affichées:

#### **Communications s'inscrivant dans la thématique de la thèse:**

**Chapolard, M**, Pasdois P, Jais P., Dos Santos P., Diolez P., Deschodt-Arsac V. La compartimentation des nucléotides adényliques pourraient expliquer les différences d'arythmogénicité entre oreillettes et ventricules. Journée de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé. Université de Bordeaux. Arcachon, Avril 2014.

**Chapolard, M**; Vaillant, F; Jais, P; Haissaguerre, M; Dos Santos, P; Diolez, P; Deschodt-Arsac, V. (2013). Mitochondrial sensitivity to ADP in permeabilized fibers changed as a function of cardiac muscle compartments: left/right atria and ventricles of sheep heart. **Présentation poster ayant donné un résumé publié.** Conference: Joint Annual Meeting of the ASPET/BPS at Experimental Biology (EB); FASEB JOURNAL Volume: 27 Meeting Abstract: 1011.3 Published: APR 2013.



**Chapolard, M**, Vaillant F, Pasdois P., Jaïs P., Haïssaguerre M., Dos Santos P., Diolez P., Deschodt-Arsac V. Mitochondrial sensitivity to ADP in permeabilized fibers changed as a function of cardiac muscle compartments: left/right atria and ventricles of sheep heart. Société française de cardiologie. Marseille, Avril 2013.

**Autres Communications:**

Deschodt-Arsac V., Calmettes, G., **Chapolard M.**, Arsac L.M., Dos Santos P., Diolez P. Impaired response to calcium transients is compensated by improved inherent energetic homeostasis in chronic hypoxic hearts. ISHR - Frontiers in CardioVascular Biology 2014. European Society of Cardiology, Barcelone, Juillet 2014.

Pasdois P. Walton R., Arsac L., **Chapolard M.**, Vaillant F., Detaille D., Deschodt-Arsac, V. Dos Santos, P; Bernus O., Diolez, P; Jais P. Ventricular Arrhythmia Complexity is linked to mitochondrial function Role of the mitochondrial permeability transition pore. Heart Rythm, San Francisco, Avril 2014.

Deschodt-Arsac, V; Calmettes, G; Vaillant, F; **Chapolard, M**; Muller, B; Diolez, P. (2013). Specific mitochondrial adaptation to chronic hypoxia counteracts effects of acute hypoxia in perfused rats beating hearts. **Présentation ayant donné un résumé publié** Conference: Joint Annual Meeting of the ASPET/BPS at Experimental Biology (EB); FASEB JOURNAL Volume: 27 Meeting Abstract: 1184.2 Published: APR 2013.

Diolez, PH; Deschodt-Arsac, V; **Chapolard, M**; Hocini, M; Jais, P; Haissaguerre, M. (2012). Non-invasive integrative analysis of cardiac energetics, translation to human heart in vivo. **Communication ayant donné un résumé publié.** Conference: Experimental Biology Meeting; FASEB JOURNAL Volume: 26 Published: San Diego, APR 2012.

Courboulin, A; **Chapolard, M**; Jacob, MH; Richard, D; Bonnet, S. (2011). The Uncoupling Protein 2: The New Metabolic Switch in Human Pulmonary Arterial Hypertension. **Communication ayant donné un résumé publié.** CIRCULATION Volume: 124 Issue: 21 Supplement: S Meeting Abstract: A16628 Published: NOV 22 2011.

Barrier, M; Courboulin, A; **Chapolard, M**; Jacob, MH; Bissierier, M; Lambert, C; Bonnet, S. (2011). A Novel Approach to Measure Distal Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension: Microfil (R) Perfused Lungs and CT-Scan Analysis in Different Pulmonary Hypertension Models. **Communication ayant donné un résumé publié.** CIRCULATION Volume: 124 Issue: 21 Supplement: S Meeting Abstract: A16433 Published: NOV 22 2011.



# PRÉAMBULE

# 1 PRÉAMBULE

La fonction première du myocarde est d'assurer le pompage du sang non oxygéné vers les poumons et du sang oxygéné vers les tissus périphériques en assurant un débit apte à satisfaire leurs besoins métaboliques. Cette fonction, vitale par excellence, est assurée par la contraction rythmique et incessante du myocarde qui fait de cet organe le site d'une activité métabolique intense, susceptible de varier brutalement en fonction des besoins de l'organisme tout entier. Le cœur peut donc être assimilé à une pompe, générant une pression, et sa fonction caractérisée par l'activité mécanique qu'il développe. Il tire l'énergie nécessaire à l'accomplissement de ce travail mécanique de l'oxydation de divers « substrats énergétiques » au premier rang desquels figurent les acides gras, le glucose et le lactate. C'est à cette fin que la circulation coronaire apporte, au niveau des myofibrilles, l'oxygène et des proportions variables de substrats énergétiques.

**Le « cahier des charges » que le myocarde doit respecter fait de lui un organe particulier sur le plan bioénergétique.** Nous pouvons relever ici, comme mentionné plus haut, qu'il est, par nécessité vitale, le siège d'une activité métabolique élevée et incessante. De plus, cette activité, quasi exclusivement aérobie, est susceptible de varier brutalement sur une large échelle pouvant amener le myocarde à augmenter d'un facteur 6 son débit (voir paragraphe 2.3).

La compréhension des mécanismes du contrôle de l'adéquation entre les besoins énergétiques du myocarde et la production d'ATP a été à la base d'efforts de recherches considérables, acharnés, animés et sources de nombreuses controverses. L'étude de l'implication de l'organisation intracellulaire très précise et compartimentée du cardiomyocyte, mettant en étroite relation, physique et fonctionnelle, des modules producteurs d'ATP (les mitochondries) et des modules consommateurs d'ATP (les myofibrilles et les pompes ioniques), grâce à des systèmes de transfert de l'énergie des sites producteurs vers les sites consommateurs et vice versa (les systèmes de la créatine kinase et de l'adénylate kinase) a été au centre de nombre de ces études (Ingwall, 2009; Saks et al., 2006). Ces recherches sont stimulées par de nombreux enjeux relatifs à leur intérêt potentiel dans diverses problématiques de santé publique. En effet, les concepts issus de ces recherches ont déjà abouti à des développements dans certains domaines pouvant donner lieu à des nouvelles modalités de prise en charge thérapeutique. Il s'agit essentiellement de l'insuffisance cardiaque et des lésions myocardiques induites par l'ischémie-reperfusion.

Le travail présenté ici est une tentative d'élargissement de perspectives visant à étudier l'implication potentielle des phénomènes de compartimentation intracellulaire du métabolisme énergétique et des processus de son contrôle en rythmologie.

Les pathologies cardiovasculaires sont responsables de plus d'un tiers des décès dans le monde, dont plus de 700 000 en Europe chaque année. Plus de la moitié de ces décès trouve son origine dans des anomalies rythmiques liées à des pathologies chroniques du cœur, incluant l'insuffisance cardiaque, l'ischémie myocardique chronique, ou diverses perturbations des conditions de charge engendrant, à des degrés divers, des anomalies structurales des différentes chambres cardiaques (remodelage, fibrose, hypertrophie, dilatation...) pouvant faire le lit de perturbations énergétiques.

L'activité contractile rythmique du myocarde est assurée par des phénomènes de couplage excitation-contraction mettant en jeu des processus consommateurs d'énergie, lors de la phase de contraction, comme lors de la phase de relaxation. Nous pouvons donc formuler l'hypothèse que des perturbations structurales du myocarde sont susceptibles d'engendrer des perturbations de l'organisation intracellulaire du cardiomyocyte, faisant le lit de perturbations des processus de production et de consommation de l'ATP et des mécanismes de transfert énergétique qui pourraient, en retour, favoriser l'induction ou l'entretien d'anomalies rythmiques. Symétriquement, nous pouvons également formuler l'hypothèse que des perturbations du rythme cardiaque, à l'instar des perturbations des conditions de pré ou de post charge, sont susceptibles d'induire des perturbations structurales du myocarde et/ou de l'homéostasie énergétique intracellulaire engendrant, en retour et par des mécanismes directs ou indirects, la pérennisation d'un « substrat » arythmogène.

Dans ce contexte, la question centrale ayant motivé ces travaux de thèse est la suivante : « **La régulation de la fonction mitochondriale est-elle modifiée lors de perturbations du rythme cardiaque ?** », et « dans le cas probable de dérégulation mitochondriale, **quels seraient les « acteurs » impliqués ?** ». Puisque des troubles du rythme cardiaque sont susceptibles de perturber l'ensemble du fonctionnement du myocarde, ces questions nous ont poussés à étudier les réponses spécifiques de chacun des compartiments cardiaques, oreillettes et ventricules. Plus que la « simple » description de l'adéquation entre production et consommation énergétiques, ce travail a donc eu pour objectif **d'étudier les relations étroites entre producteur, consommateur et mécanismes de transfert énergétiques, incluant les processus de compartimentation au niveau de cœurs sains, en conditions contrôle comme lors de l'induction d'arythmies.**

Ce manuscrit retrace l'ensemble du cheminement intellectuel et expérimental qui a permis d'établir les premières hypothèses mécanistiques relatives à notre problématique : l'implication des perturbations de la bioénergétique cardiaque en rythmologie.

Il comprend 4 grandes parties :

- Une introduction exposant les parties théoriques, incluant les données générales sur le métabolisme énergétique du myocarde et allant jusqu'à la description des différents acteurs du système énergétique cardiaque et leur modalités d'intégration. Cette partie présente l'état de l'art concernant les potentielles implications de ces acteurs dans les troubles du rythme cardiaque.

- L'ensemble des techniques et méthodes utilisées lors de ce travail de thèse, l'objectif étant de décrire précisément les techniques utilisées, partant du cœur isolé perfusé et descendant à niveaux d'intégration inférieurs : fibres perméabilisées de chacun des compartiments cardiaques (ventricules, oreillettes et septum ventriculaire) et étude protéomique.

- Les principaux résultats de nos travaux.

- Enfin, une discussion de nos résultats avec en dernier lieu les perspectives en découlant. Les travaux actuels et ainsi que nos perspectives de recherche ouvrent sur un possible transfert de ces travaux vers la clinique, dans l'objectif de potentielles applications thérapeutiques en rythmologie.



# **INTRODUCTION**



## 2 INTRODUCTION

### 2.1 Généralités sur quelques particularités de la bioénergétique cardiaque

La fonction physiologique du cœur est de générer, par le phénomène de contraction, l'énergie nécessaire pour la circulation du sang dans le réseau vasculaire de la circulation systémique (fonction du ventricule gauche) et de la circulation pulmonaire (fonction du ventricule droit). La circulation coronaire, premier réseau branché sur l'aorte ascendante, juste au-dessus des valvules aortiques, apporte au myocarde l'oxygène et les substrats nécessaires à son propre métabolisme. Balaban en 2006 a montré, *in vivo*, par spectroscopie de résonance magnétique du phosphore 31 (RMN <sup>31</sup>P), que le myocarde normal est en mesure d'assurer une homéostasie énergétique remarquable. Il n'observait aucune modification mesurable de la concentration intracellulaire en ATP ou en phosphocréatine (PCr) sur une gamme relativement large de travail (Balaban, 2006), illustrant une parfaite adéquation entre la synthèse d'ATP au niveau des sites de production, le transfert de l'énergie chimique au niveau des sites d'utilisation, et les besoins énergétiques des sites utilisateurs. Étudié en ce sens, le système énergétique cardiaque peut être défini à partir de différents modules, produisant ou consommant une certaine quantité d'énergie et étant traversés par un « flux énergétique commun ».

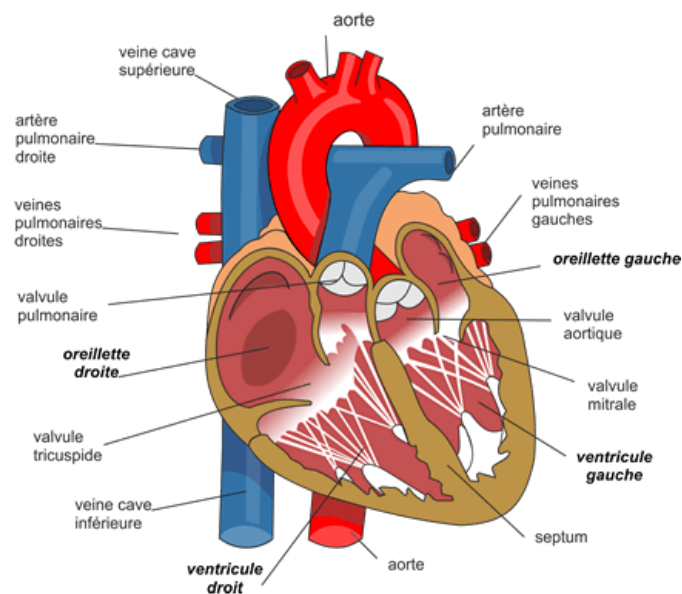
L'étude de la régulation des flux énergétiques au sein d'un myocarde débute au début du 20<sup>ème</sup> siècle (voir notamment la revue de Saks et al. en 2012 qui décrit le développement de ces données historiques). Deux physiologistes, Otto Frank et Ernest Starling, mettent en évidence, sur fibres en contraction isométrique, que la tension active du muscle, générée après stimulation, croît en fonction de la pré-charge exercée (réserve de Starling). Extrapolée au niveau ventriculaire, la loi de Frank-Starling (Frank, 1895; Patterson and Starling, 1914) illustre la relation qui existe entre l'étirement des fibres musculaires et leur performance contractile (relation force – longueur) : un muscle isolé se contracte d'autant plus puissamment qu'il est au préalable lesté d'un poids plus important. Pour le cœur, cette loi exprime le rapport entre la tension de paroi en diastole, établie par les conditions de remplissage, et la performance systolique fournie : la force contractile du ventricule dépend directement de la tension des fibres myocardiques en fin de diastole ; elle est donc liée au volume télédiastolique. Cette relation force – longueur suit une pente ascendante jusqu'à un plateau au-delà duquel la performance décroît : une augmentation de volume ne conduit plus qu'à une augmentation des pressions de remplissage, mais non à une amélioration de la performance systolique (Patterson et al., 1914; Starling and Visscher, 1927). Par la suite, Starling et Visscher identifient une relation strictement linéaire entre le travail cardiaque et la consommation en oxygène du myocarde (Starling

and Visscher, 1927). Parallèlement, Engelhardt puis Kalckar reconnaissent un couplage entre consommation d'oxygène et synthèse d'ATP (Prebble, 2010). Les bases de la bioénergétique cardiaque sont alors posées, décrivant une relation étroite entre la respiration mitochondriale et les différents acteurs de la fonction contractile dotés d'une activité ATPasique. Néanmoins, un siècle après ces travaux fondateurs, le mécanisme exact du contrôle de la respiration mitochondriale par l'activité mécanique, et *vice versa*, demeure un sujet de débats acharnés.

## 2.2 Bases en anatomie fonctionnelle du cœur

### 2.2.1 Préambule

Le cœur est formé de plusieurs cavités, oreillettes et ventricules, droit et gauche (Figure 1). L'ensemble de ces cavités est composé d'un tissu musculaire, organisé en fibres musculaires très structurées et richement irriguées permettant au myocarde de répondre de manière efficace et rapide aux variations de demande énergétique de l'organisme. Les caractéristiques cellulaires, physiques ou électrophysiologiques de ces différents tissus sont différentes. Pourtant la plupart des études bioénergétiques menées sur le myocarde, se basent, pour l'immense majorité d'entre elles, sur des données obtenues à partir des ventricules, principalement le ventricule gauche.



**Figure 1 : Présentation des différentes chambres cardiaques**

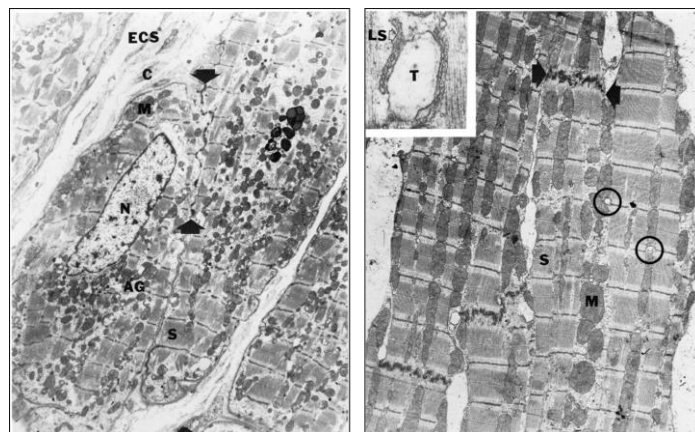
(Image provenant du site internet de la Fédération Française de Cardiologie)

Le cœur possède plusieurs cavités (oreillette et ventricule) permettant l'apport d'oxygène et des nutriments nécessaire à l'organisme. Le ventricule droit a pour fonction d'alimenter la circulation pulmonaire (artère pulmonaire) et le ventricule gauche la circulation systémique (aorte). Le réseau coronaire, quant à lui, branché sur l'aorte ascendante, permet d'alimenter le myocarde en oxygène et nutriment.

## 2.2.2 Ultrastructure cardiaque

Les parois des chambres cardiaques sont composées de cardiomyocytes dont l'agencement spatial et les ultrastructures anatomiques varient entre oreillettes, ventricules et cellules de Purkinje (Legato, 1973). Les cellules atriales sont décrites comme des cellules elliptiques de 6 à 8  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et de 20  $\mu\text{m}$  de long. Les cellules ventriculaires sont plus étroites avec des branchements fréquents, elles mesurent de 15 à 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et 100  $\mu\text{m}$  de long. Les cellules de Purkinje sont quant à elles plus larges (diamètre de 80  $\mu\text{m}$ ).

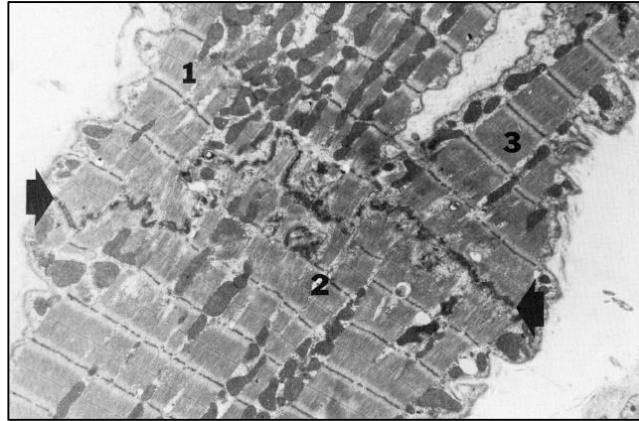
Un système de tubules transverses n'est retrouvé que dans le tissu ventriculaire (Figure 2). Tous les types de cellules présentent un réticulum sarcoplasmique abondant et bien développé. Pourtant les tissus cardiaques ont une organisation intracellulaire très différente. Les cellules atriales présentent des disques intercalaires courts et orientés horizontalement le long des cellules. Elles possèdent également des disques perpendiculaires courts mais moins fréquents. Dans ce tissu, les connections intercellulaires latérales sont bien visibles. Le tissu ventriculaire, lui, est plus organisé avec des disques intercalaires présents horizontalement le long des cellules et des zones spécifiques perpendiculaires à l'axe des myofilaments. Contrairement au tissu auriculaire, les connections intercellulaires latérales sont très peu fréquentes et très courtes. Les disques intercalaires entre les cellules de Purkinje sont en oblique et forment des « zigzags » (Figure 3) et les connections cellules-cellules sont très abondantes.



**Figure 2 : Images microscopiques de cellules atriales et ventriculaires**

(Image tirée de Legato, 1973).

Sur l'image de **gauche** (grossissement x9600), quatre cellules atriales sont visibles. Le compartiment extracellulaire (**ECS**) contient du collagène (**C**). Le noyau (**N**), proche des granules atriaux et les rangées de sarcomère sont visibles à l'intérieur de la cellule. Les mitochondries (**M**) sont abondantes. Sur l'image de **droite** (grossissement x7400, encart x62000), sont visibles des disques intercalaires proches de cellules ventriculaires. Les rangées ordonnées de sarcomères et de mitochondries sont caractéristiques de ce tissu ventriculaire. Sur la partie haute et gauche de cette image, nous observons une triade, composée d'une vésicule de tubule transverse bordé de sacs latéraux (**LS**).



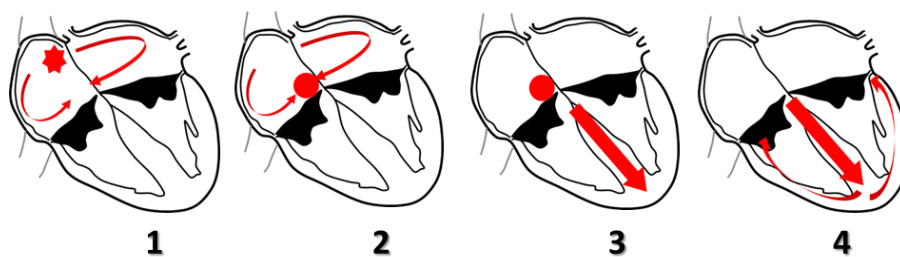
**Figure 3 : Image de microscopie électronique (grossissement x6000) de trois cellules de Purkinje**  
 (Image tirée de Legato, 1973).  
 Les trois cellules de Purkinje (1, 2 et 3) sont unies au disque intercalaire (flèche à gauche de l'image) dans une configuration anatomique typique souvent observable dans ce type de cellules (modèle en Y).

Les particularités anatomiques permettent de livrer certaines informations utiles pour la compréhension de la spécialisation des chambres cardiaques. Certains gènes ont pu être identifiés comme jouant un rôle dans cette spécialisation et la conservation du phénotype des chambres cardiaques de cœur adulte de souris femelles (Tabibiazar et al., 2003). Sans entrer dans le détail, les résultats de cette étude transcriptomique révèlent une grande différence dans le niveau d'expression mais également l'épissage des gènes codant pour les protéines du cytosquelette cellulaire, de l'appareil contractile, des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique, ou encore des canaux, pompes et échangeurs ioniques. Ces résultats montrent que l'expression génique est corrélée avec les quantités d'isoformes des chaînes lourdes de myosine (MHC)  $\alpha$  et  $\beta$  sur cœurs de rats (Carnes et al., 2004). En plus de la variation de la quantité des MHC au cours de la croissance des rats, les chambres cardiaques présentent des différences régionales. L'appareil contractile n'est donc pas composé des mêmes protéines suivant la région du myocarde.

### ***2.2.3 Les voies de conduction de la dépolarisation***

Comme pour tous les muscles du corps, la contraction du myocarde est provoquée par la propagation d'une impulsion électrique le long des fibres musculaires cardiaques, induite par la dépolarisation des cellules musculaires. Dans le cœur, la dépolarisation prend normalement naissance dans les cellules du nœud sinusal (NS), situé au niveau du toit de l'oreillette droite, à proximité de l'abouchement de la veine cave supérieure. Elle se propage ensuite dans les oreillettes, provoquant leur contraction, ou systole auriculaire. L'onde de dépolarisation arrive alors au nœud auriculo-ventriculaire (NAV), seul point de passage possible pour le courant électrique entre les oreillettes et les ventricules. L'impulsion électrique emprunte ensuite le faisceau de His, qui est composé de deux

branches principales allant chacune dans un ventricule. Les fibres constituant ce faisceau, complétées par les fibres de Purkinje, grâce à leur conduction rapide, propagent l'impulsion électrique en plusieurs points des ventricules, et permettent ainsi une dépolarisation synchrone de l'ensemble des parois ventriculaires droite et gauche ; cette contraction constitue la phase de systole ventriculaire. Du point de vue de la fonction contractile, l'arrivée de l'onde de dépolarisation, au niveau ventriculaire, déclenche la contraction de la chambre myocardique qui se fait en deux phases : une première phase isométrique, suivie d'une deuxième phase, hétérométrique, contemporaine de l'éjection. Il s'en suit une phase de relaxation contemporaine de la repolarisation cellulaire et précédant la phase de remplissage.



**Figure 4 : Propagation de l'activation électrique au niveau cardiaque**

L'activité électrique prend sa source dans le nœud sinusal sous la forme d'une onde de dépolarisation (1), se propage à travers les oreillettes pour converger vers le nœud atrio-ventriculaire (2). La dépolarisation gagne les ventricules en se propageant le long du septum interventriculaire en suivant le faisceau de His et ses branches (3), pour remonter le long des parois libres ventriculaires (4).

### 2.3 Bioénergétique du myocarde

Comme évoqué en préambule de ce manuscrit, le « cahier des charges » que doit satisfaire le myocarde fait de lui un organe particulier. A titre d'illustration, lors d'un exercice musculaire intense, la consommation en oxygène de l'organisme est plus de dix fois la consommation au repos obligeant ainsi le cœur à multiplier par six son activité métabolique afin d'assurer l'augmentation requise du débit cardiaque. L'activité bioénergétique du myocarde étant quasi exclusivement aérobie, le contrôle de l'utilisation des substrats énergétiques et de la phosphorylation oxydative au niveau des cardiomyocytes sont, sans doute plus qu'au niveau de tout autre organe, des processus essentiels à la vie. Un calcul simple permet de mieux appréhender l'importance vitale, des processus de contrôle et d'intégration de l'utilisation des substrats énergétiques, de la respiration mitochondriale, du métabolisme des phosphates à haute énergie et de l'activité mécanique du myocarde. La vitesse d'utilisation de l'ATP par le myocarde varie entre  $0,66 \mu\text{mol/s/g}$  tissu au repos et  $2,35 \mu\text{mol/s/g}$  tissu en conditions de travail élevées (Kobayashi and Neely, 1979). Le contenu intramyocytaire en ATP et en PCr se situent, respectivement, aux alentours de 10 mM et 25 mM. Cela signifie que pour une vitesse moyenne d'utilisation de l'ATP de  $1 \mu\text{mol/s/g}$  tissu, le pool d'ATP intracellulaire doit être resynthétisé

douze fois par minute (Polimeni and Buraczewski, 1988). Même si l'on additionne le pool de PCr au pool d'ATP, le pool de phosphates à haute énergie est renouvelé 3 à 4 fois par minute pour un coeur au « repos ». En d'autres termes, les réserves intracellulaires en phosphates à haute énergie permettent au coeur de ne battre que quinze secondes. Ceci illustre pourquoi la synthèse d'ATP doit être contrôlée avec beaucoup de précision. L'existence de cette relation directe, nécessaire, entre le travail mécanique du myocarde (développement d'une pression) et sa consommation d'énergie chimique (reflétée par la consommation en oxygène) a été montrée expérimentalement, il y a bientôt 50 ans par les travaux devenus classiques de Neely (Neely et al., 1967).

Ces considérations donnent un relief particulier aux observations de Balaban, rapportées plus haut, montrant la parfaite stabilité *in vivo* du statut bioénergétique du myocarde sur des plages de travail étendues (Balaban, 2006).

### **2.3.1 Module « producteur d'énergie » : énergétique mitochondriale**

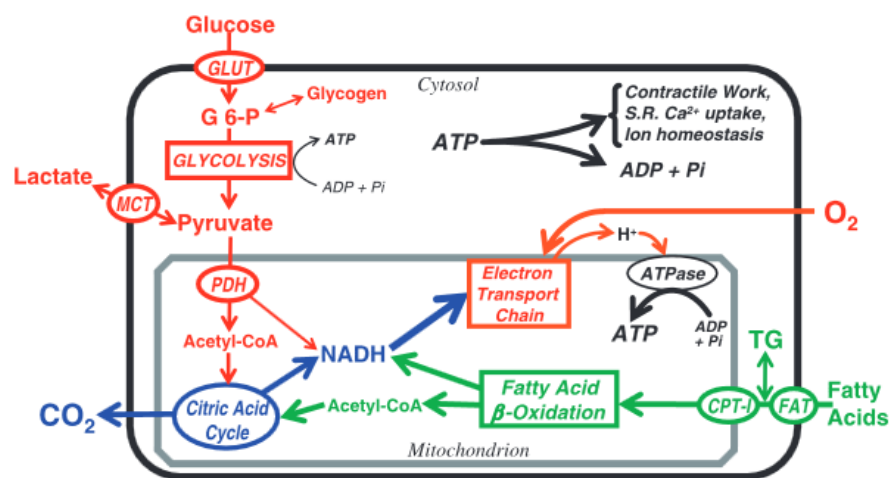
#### **2.3.1.1 Préambule**

La production d'énergie chimique, et par là même les mitochondries occupent une place prédominante dans l'énergétique musculaire du fait des relations qu'elles entretiennent à la fois avec les différentes voies métaboliques cellulaires et les processus consommateurs d'énergie. Pour maintenir le travail mécanique, le coeur dispose de différentes voies métaboliques (majoritairement la  $\beta$ -oxydation et le cycle de Krebs) dont le rôle est de convertir l'énergie chimique contenue dans différents substrats (lipides, glucides) en produisant des cofacteurs réduits : le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NADH) et le Flavine Adénine Dinucléotide (FADH<sub>2</sub>). En conditions normales, au « repos », 80% de l'ATP synthétisés par le myocarde le sont aux dépens de l'oxydation des acides gras.

#### **2.3.1.2 Les différentes voies métaboliques**

Un certain nombre d'études tend à montrer une spécificité des tissus musculaires au niveau de l'utilisation des substrats métaboliques. Parmi elles, Ponsot et al. en 2005 ont étudié les caractéristiques mitochondriales, la vitesse de respiration mitochondriale maximale stimulée par l'ADP et l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour les substrats à concentration saturante d'ADP, sur fibres isolées perméabilisées de muscles squelettiques (gastrocnemius et soleus) et cardiaque (ventricule gauche). Bien que les résultats concernant les vitesses de respiration mitochondriale ne soient pas rapportés à la masse mitochondriale, les spécificités d'utilisation des substrats sont claires (Ponsot et al., 2005). L'examen de l'efficacité catalytique de la respiration mitochondriale pour l'ADP (rapport  $V_{\max}/K_m^{\text{app}}$ ) indique que la  $\beta$ -oxydation dans le ventricule gauche

est plus efficace que dans les autres tissus, permettant ainsi d'atteindre la respiration mitochondriale maximale pour des concentrations de palmitoyl-carnitine plus faibles. Il en est de même lorsque le substrat est le pyruvate. Cette étude démontre ainsi une différence entre l'activité oxydative des mitochondries de fibres issues de muscles dits « glycolytiques » et celles issues de ventricule gauche. Les mitochondries de ventricule gauche développeraient des capacités plus élevées pour utiliser les voies oxydatives des acides gras et du pyruvate, mettant alors en évidence la spécificité métabolique du tissu mitochondrial cardiaque (Ponsot et al., 2005). Les cellules cardiaques ont de plus été décrites comme possédant une forte « flexibilité métabolique » (Taegtmeyer et al., 2004) ce qui permet au cœur de s'adapter en utilisant le « carburant » le plus efficace lors des augmentations importantes de travail.



**Figure 5 : Métabolisme des substrats dans un cœur sain**

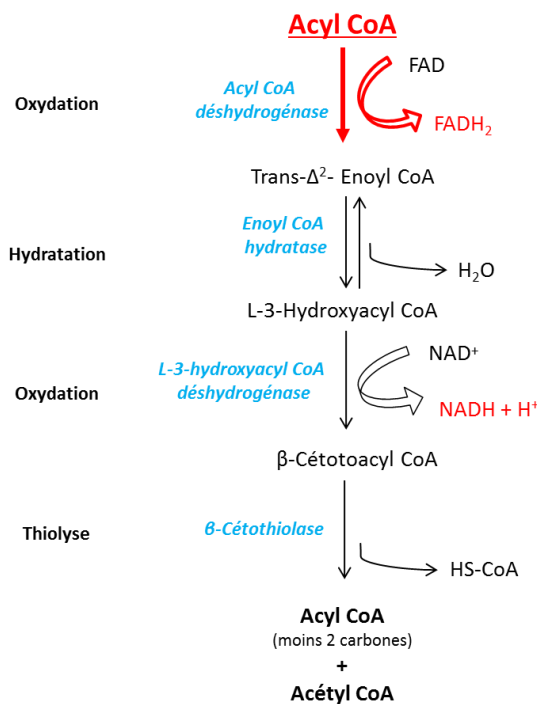
Schéma illustrant l'utilisation des substrats énergétiques par le myocarde (Stanley et al., 2005), avec la glycolyse (en rouge) et l'oxydation des acides gras (en vert) qui convergent vers le cycle de Krebs (en bleu), puis la chaîne respiratoire mitochondriale (en rouge) et aboutissant à la production d'ATP. Dans la cellule cardiaque, l'hydrolyse de l'ATP alimente les différents consommateurs d'énergie (appareil contractile, pompe SERCA et autres pompes ioniques). GLUT : Transporteur de glucose ; G 6-P : Glucose 6-phosphate ; MCT : Transporteur des acides monocarboxyliques ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; CPT-1 : Carnitine palmitoyltransférase 1 ; FAT : Transporteur des acides gras.

### 2.3.1.2.1 Oxydation des acides gras

La  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras est la principale source de formation de l'ATP au niveau du myocarde (Stanley et al., 2005). Les acides gras issus de la circulation sanguine, pénètrent dans les cellules pour être oxydés principalement par la mitochondrie dans les tissus musculaires cardiaques. Dans le cytosol, les acides gras sont estérifiés du coenzyme A (CoA) en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase, en consommant une molécule d'ATP et produisant une molécule d'AMP et deux molécules de phosphate inorganique (Pi). L'activation des acides gras par ajout du groupement acyl

permet son transport à travers les membranes mitochondriales externe (MME) et interne (MMI), catalysée par les carnitine acyltransférase I (MME) et II (MMI) et la carnitine.

Dans la matrice mitochondriale, l'acyl-CoA entre dans l'hélice de Lynen aboutissant à la production de co-enzymes d'oxydoréduction type NADH et FADH<sub>2</sub>. Les acides gras activés sont pris en charge par différentes isoformes de l'acyl déshydrogénase, première enzyme de l'hélice de Lynen, suivant leur nombre de carbones : isoformes pour les chaînes courtes, moyennes, longues ou très longues. La dégradation d'un acyl-CoA de 16 carbones (exemple du palmitoyl-CoA) aboutit à la formation de 8 acétyl-CoA, 7 FADH<sub>2</sub>, 7 NADH et 7 protons, assurant ainsi la fourniture en équivalents réduits et acétyl-CoA nécessaires à l'activation de la chaîne respiratoire et l'initiation du cycle de Krebs, respectivement. Les enzymes mitochondriales de la  $\beta$ -oxydation responsables de cette production d'intermédiaires énergétiques sont l'acyl-CoA déshydrogénase et la L-3-hydroxyacyl-CoA. La première enzyme oxyde l'acyl-CoA en trans- $\Delta^2$ -énoyl-CoA en réduisant le FAD. La seconde enzyme catalyse l'oxydation du L-3-hydroxyacyl-CoA en  $\beta$ -cétotoacyl-CoA en produisant une molécule de NADH (Figure 5).



**Figure 6 : La bêta-oxydation mitochondriale**

Au niveau du myocarde, la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras est la principale source de formation de l'ATP. Les acides gras provenant de la circulation sanguine, sont estérifiés dans le cytosol des myocytes, du coenzyme A (CoA) en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase. Leur activation par ajout du groupement acyl permet leur transport à travers les membranes mitochondriales externe et interne, afin d'intégrer le cycle de Krebs.

Le métabolisme des acides gras est très finement régulé par les besoins énergétiques cellulaires et les conditions environnementales (Stanley et al., 2005). Dans des conditions énergétiques défavorables, l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMP favorise l'activation de l'AMP



Kinase (AMPK) dont une des protéines cibles est l'acétyl-CoA carboxylase, induisant son inhibition et donc une réduction de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (Zordoky et al., 2014). De plus, le système hormonal et la sécrétion d'insuline, de glucagon ou encore d'adrénaline modulent les vitesses de dégradation des acides gras (Zhang et al., 2010).

#### 2.3.1.2.2 Métabolisme du glucose

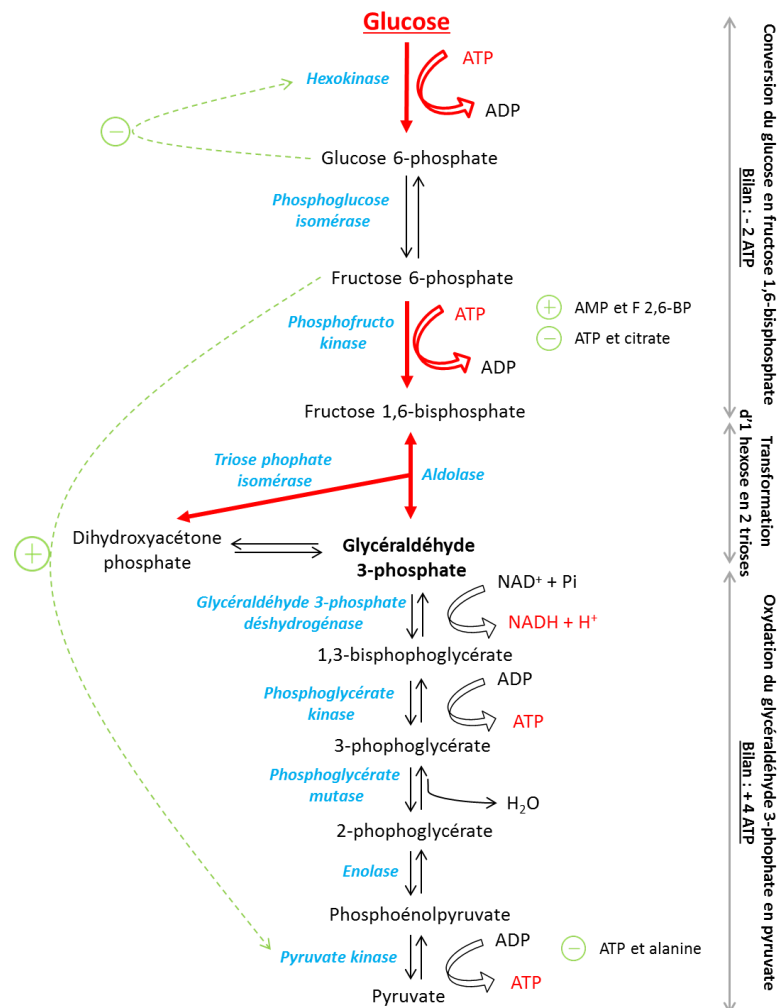
La glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas s'effectue dans le cytoplasme cellulaire. Cette voie métabolique anaérobie produit deux molécules d'ATP et deux molécules de NADH pour la transformation d'une molécule de glucose en pyruvate.

Le glucose provient de l'espace extracellulaire et pénètre dans le cytosol par un transport facilité. Ce transport est assuré par la famille des protéines transmembranaires GLUT (Transporteur de Glucose). L'isoforme GLUT4 est exprimée préférentiellement dans les muscles squelettique et cardiaque, ainsi que dans le tissu adipeux (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1991). Leur recrutement à la membrane plasmique est, entre autre, stimulé par l'insuline permettant donc une augmentation du transport du glucose vers le cytoplasme cellulaire (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1991).

L'activité enzymatique de la glycolyse possède un rôle majeur dans la régulation énergétique. Une des enzymes importante dans la régulation du métabolisme cardiaque est la première enzyme de la glycolyse, l'hexokinase (HK). Cette enzyme phosphoryle une molécule de glucose en glucose 6-phosphate (G-6-P) en hydrolysant une molécule d'ATP. Les différentes isoformes de l'HK sont exprimées dans la majorité des tissus dont le cœur et peuvent être inhibées par le G-6-P, les concentrations cellulaires en phosphate et le pH de la cellule (Mayer et al., 1966; Vowles and Easterby, 1979). Une autre enzyme clef dans la régulation du métabolisme cardiaque est la phosphofructokinase (PFK). Comme l'HK, la PFK phosphoryle le fructose 6-phosphate (F6P) en fructose 1,6-bisphosphate (F1,6BP) en utilisant une molécule d'ATP. L'activité de la PFK est liée à l'état énergétique cellulaire. La PFK est stimulée par l'AMP et inhibée par l'ATP et le citrate (Depre et al., 1998). Durant la cinquième étape de la glycolyse, deux molécules de NADH sont produites par la cinquième enzyme, la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (G3PDH), catalysant la réaction de transformation de la glyceraldéhyde 3-phosphate en 1,3-bisphosphoglycérate.

Les sixième et neuvième (dernière) étapes de la glycolyse, catalysées respectivement par la phosphoglycérate kinase et la pyruvate kinase, sont toutes deux associées à la production de deux molécules d'ATP par molécule de glucose oxydée. La pyruvate kinase (PK), catalysant la dernière étape de la glycolyse, présente trois isoformes distinctes dont la PK-M qui est spécifique au muscle. La PK-M

possède un épissage alternatif aboutissant à deux enzymes musculaires, possédant des activités enzymatiques différentes. La PK catalyse la production de pyruvate à partir d'une molécule de phosphoénolpyruvate (PEP) et d'une molécule d'ADP. Cette enzyme est stimulée par le F1,6BP et par la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA). Une forte quantité d'ATP ou encore l'alanine inhibe la production de pyruvate par inhibition de la PK (Peltier et al., 2005). Le pyruvate produit par la glycolyse est ensuite principalement transporté dans la mitochondrie, où il est oxydé par le cycle de Krebs.



**Figure 7 : La glycolyse et ses régulations**

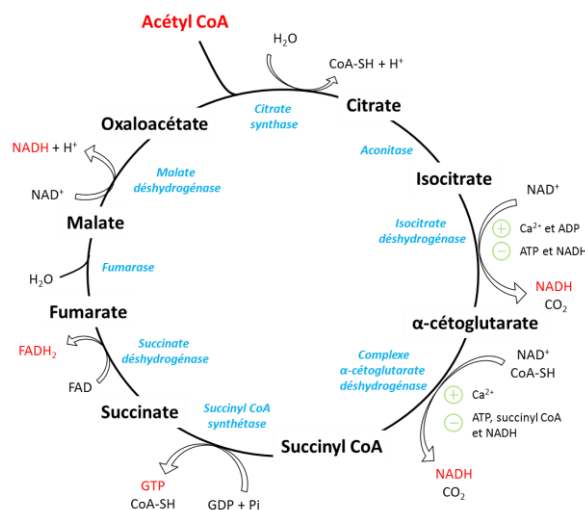
La glycolyse est une voie métabolique anaérobie très régulée, se produisant dans le cytosol des myocytes. Elle aboutit à la production de deux molécules d'ATP et deux molécules de NADH pour la transformation d'une molécule de glucose en pyruvate.

### 2.3.1.2.3 Le cycle de Krebs

Les deux voies métaboliques majeures au niveau cardiaque, *id est* la glycolyse et l'oxydation des acides gras, permettent la formation d'acétyl-CoA qui sera utilisé pour le fonctionnement du cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique (TCA). Le métabolisme des acides aminés permet également la

production d'intermédiaires qui seront, eux aussi, utilisés pour le cycle de Krebs (via l'anaplérose). Cette voie métabolique cyclique comporte huit étapes se déroulant dans la matrice mitochondriale. L'oxydation de l'acétyl CoA résulte d'un stockage d'énergie sous forme de co-enzymes d'oxydo-réduction, avec pour bilan la formation de trois molécules de NADH, une molécule de FADH<sub>2</sub> et une molécule de GTP.

Les enzymes assurant le transfert des électrons de haute énergie au NAD<sup>+</sup> sont l'isocitrate déshydrogénase (3<sup>ème</sup> étape du cycle de Krebs), le complexe de l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase (4<sup>ème</sup> étape du cycle de Krebs) et la malate déshydrogénase (dernière étape du cycle de Krebs). Les activités des 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> étapes du cycle de Krebs sont fortement régulées, notamment par le calcium (Kohlhaas and Maack, 2013). Lors de la 5<sup>ème</sup> étape du cycle de Krebs, la succinyl-CoA déshydrogénase produit une molécule de GTP hautement chargée en énergie, et lors de la 6<sup>ème</sup> étape du cycle de Krebs, la succinate déshydrogénase, transfère des électrons sur le FAD.



**Figure 8 : Le cycle de Krebs et ses régulations**

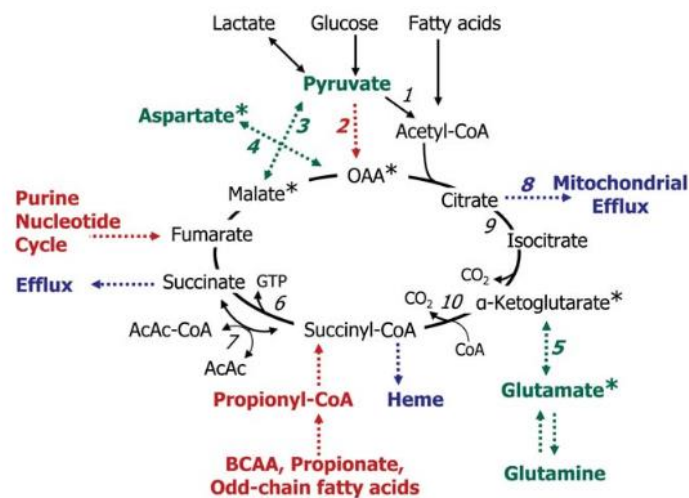
Au niveau cardiaque, la glycolyse et l'oxydation des acides gras, permettent l'apport d'acétyl-CoA qui sera utilisé pour le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs est une voie métabolique cyclique. Il est composé de huit étapes, dont les réactions enzymatiques se déroulent dans la matrice mitochondriale. L'acétyl CoA est oxydé permettant le stockage d'énergie sous forme de co-enzymes d'oxydo-réduction, avec pour bilan la formation de trois molécules de NADH, une molécule de FADH<sub>2</sub> et une molécule de GTP. Les co-enzymes d'oxydoréduction sont ensuite nécessaires au fonctionnement de certains complexes de la chaîne respiratoire.

#### 2.3.1.2.4 Le métabolisme des acides aminés

Les acides aminés constituent les « briques primaires » nécessaires à la synthèse protéique. Cependant de plus en plus d'études mettent en relief leur importance dans l'énergétique cellulaire (Gibala et al., 2000). La désamination oxydative des acides aminés intervient différemment chez les espèces vivantes, en fonction des régimes alimentaires et dépend donc de l'apport protéique de

l'alimentation. Il y a une balance entre synthèse protéique et dégradation protéique. Chez l'Homme la désamination oxydative représente environ 10 % de l'apport énergétique global et pourrait être accentuée dans certains cas pathologiques (Des Rosiers et al., 2011).

Les acides animés sont impliqués comme précurseurs carbonés afin de maintenir les pools d'intermédiaires du cycle de Krebs (voies anaplérotiques, Figure 9). Leur rôle énergétique est donc d'assurer un soutien pour les phosphorylations oxydatives (Des Rosiers et al., 2011). De plus, il est décrit que la membrane mitochondriale interne possède des co-transporteurs faisant intervenir le glutamate et permettant la modulation des potentiels membranaires (Kauppinen et al., 1983).



**Figure 9 : Implications des acides animés dans le métabolisme**

(Schéma tiré de la revue de Des Rosiers et al., 2011).

Les lignes en pointillés indiquent les réactions issues des acides aminés, participant aux entrées (en rouge), aux « sorties » (bleu) ou à ces deux voies (vert) dans/du cycle de Krebs. Les astérisques indiquent les intermédiaires du cycle de Krebs et les acides aminés qui participent spécifiquement à la navette malate-aspartate.

### 2.3.1.3 La phosphorylation oxydative mitochondriale

Le cycle de Krebs fournit des équivalents réducteurs à la chaîne respiratoire mitochondriale. Le principe de « phosphorylations oxydatives mitochondriales » repose sur l'oxydation du NADH et du FADH<sub>2</sub> par une chaîne de transport d'électrons au travers de la membrane interne mitochondriale, appelée chaîne respiratoire. Un couplage s'effectue alors selon la théorie chimiosmotique de Peter Mitchell (Mitchell and Moyle, 1967) entre la production d'ATP et le flux de protons, origine du terme phosphorylation oxydative.

Dans les cellules eucaryotes, la mitochondrie possède deux membranes séparées par un espace appelé espace intermembranaire mitochondrial. Contrairement à la membrane externe mitochondriale, la membrane interne est imperméable aux ions. Cette propriété est responsable d'une différence de concentrations ioniques de part et d'autre de cette membrane, à l'origine du potentiel de membrane mitochondrial. Enchâssés dans cette membrane mitochondriale interne, se trouvent quatre complexes protéiques appartenant à la chaîne respiratoire.

Le premier complexe de la chaîne respiratoire, complexe I ou NADH-Q oxydoréductase est un très gros complexe protéique. Chez les mammifères, il est constitué de 42 sous-unités différentes, d'un mononucléotide flavinique (FMN) receveur d'électrons, de plusieurs centres fer-soufre permettant le transfert de ces mêmes électrons et d'au moins 3 molécules ubiquinone liées appelée coenzyme Q. La flavine FMN du complexe I reçoit les électrons à haut potentiel du NADH matriciel, permettant le déclenchement du transfert de ces derniers à travers le complexe initiant la translocation de 4 protons par paires d'électrons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire mitochondriale. En outre le gradient électrochimique à travers la membrane interne mitochondriale, le transfert des électrons à travers le complexe I conduit à la réduction d'ubiquinone mobile présente dans la membrane mitochondriale interne et formant des pools d'ubiquinol intra-membranaire.

Le complexe II ou succinate déshydrogénase est une flavoenzyme dont l'activité enzymatique principale consiste à enrichir le pool d'ubiquinol intramembranaire à partir des électrons du FADH<sub>2</sub>. Chez les mammifères, ce complexe du cycle de Krebs est composé de 4 sous-unités dont 2 possèdent des centres fer-soufre impliqués dans l'activité enzymatique du complexe et les 2 autres participent au transfert des électrons du FADH<sub>2</sub> vers les ubiquinones mobiles. Ce complexe est ancré dans la partie matricielle de la membrane mitochondriale interne par un cytochrome de type b. Il est à noter que deux autres flavoenzymes sont impliquées dans l'enrichissement du pool d'ubiquinol de la membrane mitochondriale interne : l'acyl-CoA déshydrogénase de la matrice mitochondriale (actrice dans la  $\beta$ -oxydation) et la glycérol 3-phosphate déshydrogénase ancrée dans la membrane interne mitochondriale (le versant de l'espace inter-membranaire).

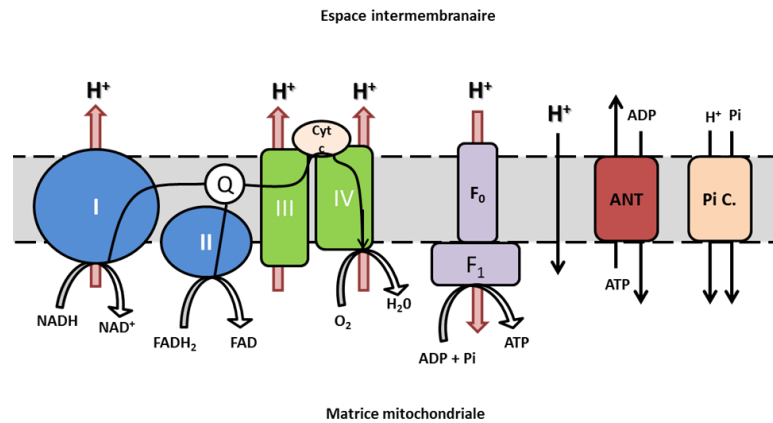
Le complexe III de la chaîne respiratoire, appelé Q-cytochrome c oxydoréductase ou cytochrome b1 transfère les électrons du pool d'ubiquinol vers le cytochrome c. Chez les mammifères, ce complexe est un dimère, dont chaque monomère est constitué de 11 sous-unités protéiques, 3 hèmes et un centre fer-soufre. Trois de ses sous-unités renferment 4 centres d'oxydoréductions permettant un transfert des électrons : les cytochromes b et c et la protéine de Rieske. La réaction d'oxydoréduction du complexe III ou cycle Q est couplée à une translocation de 4 protons à travers la membrane mitochondriale interne. Le complexe III, comme le complexe I, contribue à la création du gradient de protons de la membrane mitochondriale.

Le cytochrome c recevant les électrons du complexe III, est une protéine mobile. En effet, cette petite protéine est située dans l'espace inter-membranaire mitochondriale et grâce à un hème ferrique peut transporter un électron à la fois. Le cytochrome c transfère des électrons du complexe III au complexe IV.

Le complexe IV, appelé cytochrome oxydase (COX) ou encore cytochrome aa<sub>3</sub>, est le complexe final de la chaîne respiratoire. En effet, les électrons transférés tout le long de la membrane mitochondriale et provenant du NADH et du FADH<sub>2</sub>, permettent la réduction de l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O grâce à ce complexe. Chez les mammifères, la COX est un dimère. Chaque monomère est constitué de 13 sous-unités dont 3 principales (I, II et III). La COX catalyse le transfert de 4 électrons provenant du cytochrome c vers l'O<sub>2</sub>, impliquant la translocation d'un proton pour chaque électron transféré. La réduction d'une molécule d'O<sub>2</sub> induit donc le passage de 4 protons vers l'espace inter-membranaire mitochondrial.

La chaîne respiratoire se résume donc à un transfert d'électrons à travers des complexes protéiques. Les électrons servent finalement à la réduction de molécule d'oxygène moléculaire, dit consommation d'oxygène. Ce transfert électrogénique est accompagné de nombreuses translocations de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire, créant ainsi un gradient de protons constituant la force proton-motrice utilisée par l'ATP synthétase lors de la synthèse d'ATP (Figure 10).

La force proton-motrice générée par la chaîne respiratoire permet une synthèse d'ATP par retour des protons dans la matrice mitochondriale (Figure 10). Cette réaction enzymatique est catalysée par l'ATP synthétase, appelée aussi F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase ou parfois complexe V. Ce complexe enzymatique de la membrane interne mitochondriale possède deux régions à fonction distinctes : F<sub>0</sub> est une région transmembranaire hébergeant le canal à protons ; F<sub>1</sub> est une région assurant la fonction de synthèse dans la matrice mitochondriale. La synthèse d'ATP est contrôlée par la force proton-motrice et nécessite un retour matriciel de 4 protons via la région F<sub>0</sub>.



**Figure 10 : Les complexes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase**

Les chiffres I, II, III et IV représentent les différents complexes de la chaîne respiratoire. F<sub>0</sub> et F<sub>1</sub> : domaines membranaires de l'ATP synthétase ; ANT : transporteur des nucléotides adényliques ; Pi C. : transporteur du phosphate inorganique, cyt c : cytochrome c.

L'énergie fournie par la phosphorylation oxydative est donc la résultante du métabolisme des glucides, des acides gras et des acides animés, par la production de coenzymes à haut potentiel, le NADH et le FADH<sub>2</sub>. Le couplage de la phosphorylation de l'ADP par molécule d'oxygène réduite est traduit par le rapport phosphorylation sur oxydation (rapport P/O). Lorsque le NADH est substrat de la chaîne respiratoire, 10 protons sont exportés dans l'espace inter-membranaire, le rapport P/O est de 2,5. Lorsque que le substrat de la chaîne respiratoire est le FADH<sub>2</sub>, le complexe I n'est alors pas mis en jeu, 6 protons sont exportés dans l'espace inter-membranaire, impliquant un rapport P/O est de 1,5.

Le rendement de ce système, couplant une vitesse d'oxydation à une vitesse de phosphorylation n'est cependant pas de 100 %. En effet, certains protons préalablement expulsés dans l'espace inter-membranaire sous l'action de la chaîne respiratoire reviennent dans l'espace matriciel sans passer par le canal F<sub>0</sub> de l'ATP synthétase. Ce phénomène, identifié pour la première fois dans des mitochondries isolées à partir de tissu adipeux brun et de foie (Nicholls, 1974), est aujourd'hui bien connu sous le nom de fuites de protons (Brown, 1992). Les fuites de protons basales sont causées par la perméabilité de la membrane à ces ions (Brand, 1990). L'Adénosine Nucleotide Tanslocator (ANT) joue un rôle important dans ces types de fuites mais l'activité des pompes ioniques de la membrane interne mitochondriale jouerait un rôle également important. Il existe un autre type de fuites, appelées fuites inductibles, causées par différentes protéines potentiellement régulées qui facilitent le transport des protons au travers de la membrane interne. Ces fuites de protons, en l'absence de régulation des fuites de protons inductibles, sont sous la dépendance directe du potentiel de membrane mitochondrial (Brand et al., 1994).

Une des caractéristiques des cellules musculaires, dont les cellules myocardiques, est leur besoin en énergie variable dans des proportions très importantes. Pour faire face à cette importante augmentation de la demande en énergie, la cellule musculaire dispose de navettes (Cr/PCr) qui vont permettre de faciliter le transfert d'énergie aux sites nécessitant un apport en énergie. Pour cela, l'ATP issu des phosphorylations oxydatives mitochondriales est exporté de l'espace matriciel vers l'espace inter-membranaire grâce à l'activité du transporteur des nucléotides adényliques (ANT). Il est alors utilisé par l'isoforme mitochondriale de la créatine kinase (CK) afin de phosphoryler la créatine (Cr) en phospho-créatine (PCr). La PCr sort alors de l'espace intermembranaire par l'intermédiaire de la porine VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) et est prise en charge par l'isoforme cytosolique de la CK. L'existence d'une compartimentation intracellulaire de cette isoforme de la CK cytosolique va ainsi permettre l'établissement de navettes dont le rôle est de transférer l'ATP produit au niveau mitochondrial jusqu'aux sites où il sera consommé (Wallimann et al., 1992), appelés sites consommateurs.

Dans les cardiomyocytes, ce sont majoritairement les ATPases de la myosine des myofibrilles et les pompes ioniques impliquées dans les mouvements calciques, comme la SERCA (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) ou encore des canaux ioniques ATP-dépendant, qui définissent le « module » consommateur d'énergie.

### **2.3.2 Modules « consommateur d'énergie »**

#### **2.3.2.1 Préambule**

Les cardiomyocytes se contractent en réponse à un potentiel d'action, ce phénomène est appelé couplage excitation-contraction (CEC). L'excitation d'une cellule musculaire repose sur les variations des concentrations calciques intracellulaires. Elle met en jeu plusieurs canaux calciques membranaires et un organe de stockage des ions calciques, le réticulum sarcoplasmique. Le point de départ de l'excitation des cellules cardiaques est l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendant de type L permettant une entrée de calcium dans la cellule, et ainsi une première augmentation de la concentration calcique cytoplasmique. Cette augmentation active alors des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique, les RyR (Récepteurs à la Ryanodine). Ce phénomène est appelé CICR (Calcium Induced Calcium Release) car il induit une sortie massive de calcium du réticulum, produisant une très forte augmentation de la concentration calcique cytosolique, suffisante pour initier la contraction par démasquage des sites de liaison des ponts acto-myosiques.

Contrairement à la libération du calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique, sa recapture est un phénomène actif consommateur d'énergie. En effet, la pompe calcique SERCA transporte deux

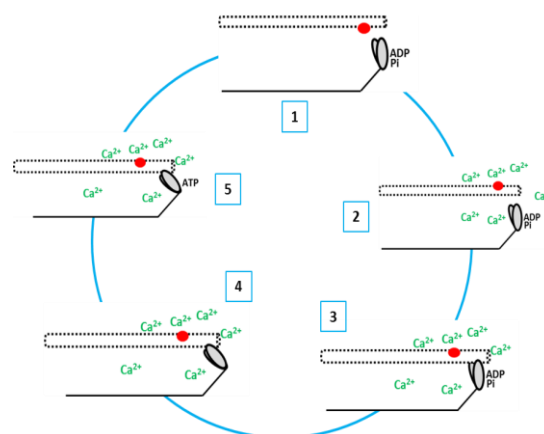


ions calciques par molécule d'ATP du cytosol vers le réticulum sarcoplasmique. Une fois dans le réticulum, le calcium est chélaté par plusieurs protéines comme la calséquestrine par exemple. Ce processus actif participe à environ 80% de la diminution de la concentration calcique cytoplasmique observé lors de la relaxation du cardiomyocyte, le reste étant assuré par la NCX (échangeur sodium-calcium) ou à nouveau une Calcium-ATPase de la membrane plasmique ou mitochondriale (Dedkova and Blatter, 2008; Laurita and Rosenbaum, 2008).

### 2.3.2.2 Appareil contractile

Comme mentionné plus haut, l'appareil contractile est le consommateur principal d'énergie dans les cellules cardiaques. La contraction cardiaque met en jeu plusieurs protéines régulatrices. Les deux protéines principales sont l'actine et la myosine dont la liaison conduit à la contraction.

Avant la propagation du potentiel d'action, lorsque la concentration calcique est faible, le filament de tropomyosine recouvre en partie les sites d'accroche des molécules d'actine les rendant inaccessibles aux têtes de myosine. Lorsque la concentration calcique augmente, la fixation du calcium sur la troponine C induit un changement de conformation de la troponine qui déplace la tropomyosine et démasque les sites de fixation des têtes de myosines sur l'actine, permettant ainsi la formation des ponts actomyosiques. L'actine et la myosine se lient, l'affinité de cette dernière pour l'ADP et le phosphate inorganique diminue. La tête de myosine libérée de l'ADP et du Pi accomplit une rotation de 45°, générant une force contractile par glissement du filament de myosine sur l'actine. Puis l'ATP se lie à la tête de myosine, où il est hydrolysé, induisant la rupture des ponts actomyosiques et un retour de la tête de myosine à son angle d'origine (Figure 11).



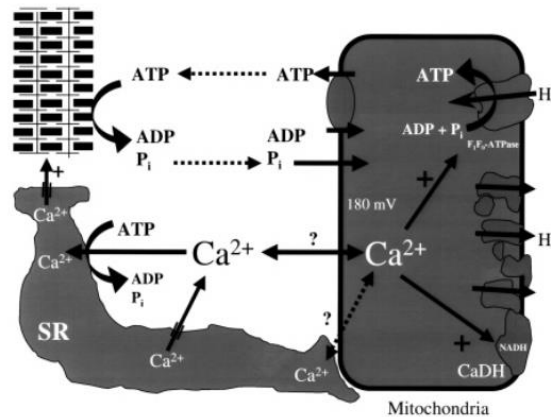
**Figure 11 : Le cycle de contraction des myofilaments**

L'hydrolyse de l'ATP en ADP et Pi entraîne un changement conformationnel de la myosine (1). L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire induit le démasquage du site de liaison de la myosine sur l'actine (2), et donc l'association de la tête de myosine sur le filament d'actine (3). La libération de l'ADP et du Pi stabilise la liaison actine/myosine et provoque un changement de conformation de la myosine avec flexion de sa tête, entraînant l'actine et donc le raccourcissement du sarcomère (4). La liaison d'une nouvelle molécule d'ATP sur la tête de la myosine, dissocie la liaison entre l'actine et la myosine (5). Et le cycle recommence.

### **2.3.3 La régulation des flux énergétiques et le transfert énergétique entre les sites de production et d'utilisation**

#### **2.3.3.1 Activation parallèle par le calcium**

La contraction cardiaque est rythmée par la fonction électrophysiologique qui régule les mouvements ioniques et notamment calciques. Le calcium est d'ailleurs décrit comme ayant un rôle central dans la physiologie du muscle cardiaque dans des conditions où : (i) les variations de la concentration cytosolique de calcium changent en fonction de la charge de travail (voir notamment «*Heart Physiology From Cell to Circulation* », Opie L.H., Lippincott Williams & Wilkins, 2004), (ii) le calcium active des déshydrogénases mitochondriales (isocitrate déshydrogénase et  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase) (Denton and McCormack, 1990; McCormack and Denton, 1990), induit des phosphorylations cellulaires (Bell et al., 2006) et active des ATPases cellulaires comme la SERCA (Kaasik et al., 2004; Kuum et al., 2009)., (iii) les mouvements transitoires de calcium cytosolique sont liés aux variations de concentrations calciques mitochondriales (Liu & O'Rourke, 2009). L'un des effecteurs principaux responsable de l'activation du cœur est donc l'ion calcique (McCormack and Denton, 1990; Territo et al., 2001) qui serait décrit de fait comme un acteur essentiel du maintien de l'homéostasie énergétique de cet organe. Le modèle classique permettant de caractériser cette homéostasie métabolique (Bers, 2002; Balaban, 2002) fut abordé par le modèle du « feedback contrôle » par l'ADP et le Pi, modèle issu d'études sur mitochondries isolées (Chance & Williams, 1956). Ce modèle est difficile à transférer sur organe entier du fait du maintien des concentrations des intermédiaires énergétiques (ATP, ADP, Pi) sur une gamme large de travail cardiaque (Neely *et al.*, 1972; Kantor *et al.*, 1986; Katz *et al.*, 1989; Weiss *et al.*, 1990). Un autre modèle fut proposé dès les années 90 (Denton & McCormack, 1990; McCormack *et al.*, 1990), basé sur une activation parallèle par le calcium des modules producteur et consommateur d'énergie. Ce modèle est utilisé aujourd'hui afin d'expliquer la régulation parfaite du système énergétique cardiaque. Depuis les années 2000, plusieurs équipes ont démontré expérimentalement l'existence d'une « activation parallèle » (schématisée Figure 12) des deux modules (demande et production d'énergie) au sein des cellules cardiaques sur cœurs battants (Balaban, 2002, 2009; Bers, 2002; Dioloz et al., 2007; Korzeniewski et al., 2008; Kuznetsov et al., 2012).



**Figure 12 : Schéma de l'activation parallèle des modules producteurs et consommateurs d'énergie au sein des cardiomyocytes**

Le calcium est proposé pour être un activateur de l'appareil contractile et la mitochondrie de façon concomitante (Balaban, 2002). SR : Réticulum Sarcoplasmique ; CaDH : Déshydrogénases dépendante du calcium.

Par son rôle dans l'activation parallèle du système énergétique, le calcium intervient au niveau de l'homéostasie intrinsèque cardiaque révélant ainsi un lien étroit entre le couplage excitation-contraction et la bioénergétique mitochondriale (Maack and O'Rourke, 2007). Des controverses sont toutefois encore d'actualité quant à la dynamique des flux calciques au sein de la mitochondrie (Dedkova and Blatter, 2008) : oscillations battements par battements ou transitoires calciques lents.

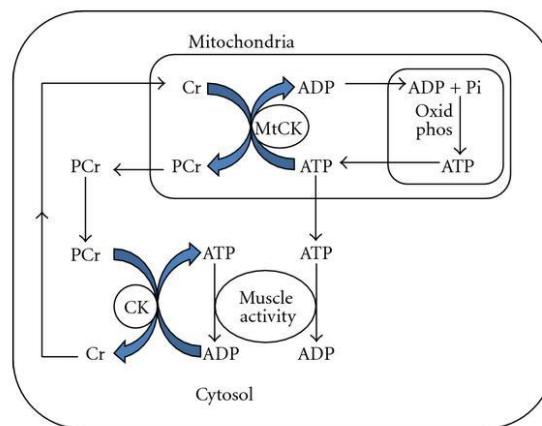
### 2.3.3.2 Compartimentation intracellulaire du métabolisme énergétique du myocarde

La régulation énergétique cardiaque n'est cependant pas décrite uniquement par ce modèle d'activation parallèle par le calcium, et notamment par ses effets directs sur chacun des modules producteur et consommateur d'énergie. Dans le cas d'une activation du système par effet Frank-Starling par exemple (Saks et al., 2006) ou par addition de drogues de type « calcium sensitizer » (Deschodt-Arsac et al., 2010), le travail cardiaque augmente sans élévation significative du calcium intracellulaire. La balance énergétique entre les modules producteur et consommateur inclut donc un système de régulation plus complexe que la simple activation parallèle, intégrant des effets indirects de l'effecteur plus spécifiquement sur le module producteur (Deschodt-Arsac et al., 2010, 2013).

La littérature sur ce sujet rapporte notamment de nombreuses observations et arguments, intégrant l'organisation « physique et fonctionnelle » très précise du cardiomyocyte, faisant intervenir le cytosquelette et les systèmes de transferts énergétiques. Les cardiomyocytes présentent une compartimentation intracellulaire du métabolisme énergétique montrant que d'autres mécanismes pourraient intervenir dans la stabilité bioénergétique du myocarde sur des plages de travail très étendues.

### 2.3.3.2.1 Le transfert énergétique par la navette Cr/PCr

Dans les cellules musculaires, le système de phosphotransfert dépendant de la créatine kinase, repose sur la phosphorylation de la créatine (Cr) en phosphocréatine (PCr) par la créatine kinase (CK). Ce transfert d'énergie (ou navette Cr/PCr) permet d'apporter le phosphate à haute énergie généré par la mitochondrie aux ATPases cytosoliques, comme les myosines ATPases (Figure 13) (Hoerter et al., 1994; Ventura-Clapier et al., 1998). Il existe plusieurs isoformes cytosoliques de CK présentes dans les différents tissus : CK-BB (*Brain type*) présente dans les structures cérébrales, CK-MM (*Muscle type*) présente dans les tissus musculaires et CK-MB dont l'expression est ubiquitaire. En plus de ces trois isoformes cytosoliques, deux isoformes mitochondriales sont identifiées : mtCK présente soit de façon ubiquitaire, soit spécifiquement dans myocarde. Les tissus musculaires possèdent un profil d'expression de la CK différent : les muscles squelettiques hébergent 98% de MM-CK et 1% de MB-CK, alors que le tissu cardiaque possède 70% de MM-CK et 25 à 30% de MB-CK.



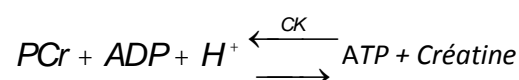
**Figure 13 : Navette de phosphotransfert Cr/PCr**

(Figure tirée de Baird et al., 2012)

La navette Cr/PCr permet une rephosphorylation de la créatine (Cr) dans la mitochondrie grâce à l'ATP produit par les phosphorylations oxydatives, réaction catalysée par la créatine kinase mitochondriale (mtCK). Puis l'utilisation de la PCr par la créatine kinase (CK) permet un apport énergétique en ATP à l'appareil contractile.

Il est établi depuis maintenant plus de cinquante ans que la phosphorylcréatine est le principal "réservoir" en phosphate à haute énergie dans le muscle strié (Cain and Davies, 1962).

L'utilisation de la PCr pour rephosphoryler l'ADP est catalysée par la créatine kinase selon le schéma réactionnel:



Grâce à la technique de transfert de saturation, la vitesse de la réaction de rephosphorylation de l'ADP à partir de la PCr a pu être mesurée chez plusieurs espèces (Bittl and Ingwall, 1985; Neubauer et

al., 1988). Ces mesures établissent que la vitesse de synthèse de l'ATP par la voie de la CK est environ 10 fois supérieure à la vitesse de synthèse par les autres voies (phosphorylation oxydative + glycolyse + utilisation de nucléobases, nucléotides, ou nucléotides préformés + synthèse de novo). Ainsi, par le biais d'une rephosphorylation rapide de l'ADP à partir de la PCr, la concentration en ATP est maintenue constante aux dépens de la concentration en PCr.

Le rôle physiologique joué par la navette Cr/PCr au niveau des mécanismes bioénergétiques de la contraction musculaire a été un sujet de débats intenses entre physiologistes et biochimistes (Hill, 1950). L'identification de l'isoenzyme de la créatine kinase (Jacobs et al., 1964), la possibilité de stimuler la respiration mitochondriale par la créatine (Bessman and Fonyo, 1966), et la proposition d'une compartimentation des nucléotides adényliques (Gudbjarnason et al., 1970), ont conduit au concept de système de transport de l'énergie par la créatine kinase, baptisé par les anglo-saxons "phosphocreatine shuttle" (navette phosphocréatine) en raison de sa capacité à transférer rapidement les substrats du métabolisme énergétique des sites de production aux sites d'utilisation et inversement (Saks et al., 1978; Wyss et al., 1992).

Dans ce système de transport (ou de transfert) de l'énergie, l'isoforme mitochondriale de la créatine kinase (CKmt) située sur la face externe de la membrane mitochondriale interne, couple la production de PCr à la phosphorylation oxydative (Jacobus and Diffley, 1986; Jacobus and Lehninger, 1973). En effet, une fois synthétisé par la phosphorylation oxydative, l'ATP est exporté de l'espace matriciel vers l'espace intermembranaire grâce à l'activité de l'Adenine Nucleotide Translocator (ANT) puis est hydrolysé par la CKmit afin de phosphoryler la créatine en PCr. Cette PCr sort alors de l'espace intermembranaire par l'intermédiaire de la porine (ou VDAC; Voltage Dependent Anion Channel) et est prise en charge par l'isoforme cytosolique de la CK. L'ADP généré, est transporté au niveau de la matrice mitochondriale par l'ANT (Gellerich and Saks, 1982; Moreadith and Jacobus, 1982).

A l'autre bout du système de transfert, des isoenzymes de la créatine kinase (MM, MB, BB) sont liés au réticulum sarcoplasmique (Baskin and Deamer, 1970; Sharov et al., 1977), au sarcolemme (Saks et al., 1977) et à la bande M des myofibrilles (CKmyo) (Krause and Jacobus, 1992; Mani and Kay, 1976; Morimoto and Harrington, 1972; Saks et al., 1996; Turner et al., 1973). A ces différents niveaux, l'ADP est rephosphorylé par la CK pour produire l'ATP nécessaire au processus de transports ioniques et à la contraction.

La navette Cr/PCr explique la différence d'affinités de la respiration mitochondriale pour l'ADP ( $K_m^{ADP}$ ) observée expérimentalement entre les mitochondries isolées et les fibres perméabilisées. En effet, les  $K_m^{ADP}$  mesurés sont plus faibles pour les mitochondries isolées (environ 20  $\mu\text{M}$ ) que pour les fibres perméabilisées (environ 300  $\mu\text{M}$  pour le ventricule gauche). Ces différences sont en partie expliquées par le fait que le fonctionnement de cette navette et le couplage fonctionnel entre l'ANT et la CKmt affranchi le myocarde des contraintes de diffusion de l'ADP imposées par la membrane

mitochondriale externe. Il a été montré que lors du développement post-partum, le  $K_m^{ADP}$  du muscle cardiaque diminue progressivement, parallèlement à l'augmentation de l'expression de la CK, décrivant un couplage CKmt/ANT progressif (Tiivel et al., 2000). De ce fait, le système Cr/PCr induit une compartimentation des nucléotides adényliques, favorisant leur diffusion (Guzun et al., 2009). De plus, l'addition de créatine augmente la respiration mitochondriale stimulée par l'ATP dans le muscle cardiaque (Kay et al., 2000). Le phosphotransfert Cr/PCr canalise donc les flux énergétiques entre la demande et la production énergétique.

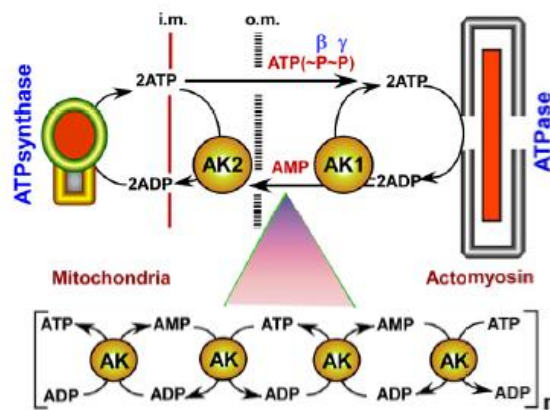
L'inhibition ou l'ablation de la CK dans des modèles pharmacologiques *ex vivo* ou transgéniques *in vivo* respectivement sont viables. Cependant, ils induisent une forte diminution de la réserve contractile du myocarde qui n'est donc pas mobilisable pour faire face à des conditions de stress et qui est susceptible de faire le lit du développement d'une insuffisance cardiaque (Dos Santos et al., 2000). Étudié dans un modèle transgénique de souris knock-out (KO) pour la CK, en absence de CK, le système glycolytique prend le relais afin de rétablir la balance énergétique mais n'assure pas le contrôle de toutes les cibles de la CK. En effet, dans des conditions d'effort sans CK, la glycolyse active bien la pompe SERCA mais ne semble pas agir au niveau des myosines ATPase (Boehm et al., 2000).

Plusieurs études récentes se sont donc penchées sur la question du rôle physiologique du système Cr/PCr au sein du tissu cardiaque. Certaines d'entre elles évoquent de possibles mécanismes de compensation dans les cœurs KO. Pour contourner et étudier cette question, Lygate *et al* proposent un modèle de souris KO pour la GAMT (Guanidinoacétate méthyltransférase), enzyme essentielle dans la biosynthèse de la créatine (Lygate et al., 2013a). Ils n'observent, chez ce modèle, ni changement des capacités d'exercices de ces souris, ni apparition d'une insuffisance cardiaque. La question reste donc posée du niveau d'implication, cause ou conséquence, de l'altération du fonctionnement du système de la créatine kinase lors de la dysfonction contractile observée lors de l'insuffisance cardiaque systolique (Taegtmeyer and Ingwall, 2013).

Des différences de régulation du métabolisme énergétiques ont été observées entre les différentes chambres myocardiques dont les significations physiologiques ne sont pas clairement élucidées (Anflous et al., 1997). Les oreillettes cardiaques affichent un  $K_m^{app}(ADP)$  identique à celui des ventricules (oreillettes : 350  $\mu$ M en moyenne et ventricules : 300  $\mu$ M en moyenne). L'affinité de la respiration mitochondriale pour l'ADP est divisée par 3 en présence de créatine (environ 110  $\mu$ M) dans les ventricules mais ne varie pas dans les oreillettes, ce qui permet de déduire des différences de couplage CKmt-ANT dans les tissus auriculaire et ventriculaire, alors que l'activité de CK-MM est identique dans les deux chambres cardiaques. Les auteurs de cette étude proposent que le phosphotransfert soit assuré par l'Adénylate kinase (AK) au sein du tissu auriculaire.

### 2.3.3.2.2 Le transfert énergétique par le système de l'adénylate kinase

Le phosphotransfert dépendant de l'adénylate kinase (AK) assure également le transfert d'énergie entre la demande et la production d'énergie dans le myocarde. La Figure 14 présente les réactions catalysées par l'AK en fonction de sa localisation dans un compartiment cellulaire donné. Cette enzyme facilite le transfert et l'utilisation des groupements phosphorylés  $\gamma$  et  $\beta$  de l'ATP par une réaction en chaîne. Dzeja et Terzic, dans une revue de 2009, font l'état des rôles de l'AK et donc de l'AMP (Dzeja and Terzic, 2009). Il a été montré que l'AK est impliquée dans l'énergétique musculaire (squelettique et cardiaque), dans la sécrétion hormonale, la déficience de certains organes, le développement tumoral, l'apport d'énergie au noyau cellulaire ou encore la motilité cellulaire.



**Figure 14 : Schéma des réactions en chaîne du transfert des groupes phosphorylés catalysées par l'AK**

(Figure tirée de Dzeja and Terzic, 2009).

L'AK présente dans les compartiments mitochondriaux et myofibrillaires est capable de transférer l'énergie de l'ATP. Le transfert de l'ATP et de l'AMP entre sites producteur et consommateur d'énergie inclut un certain nombre de mécanismes permettant la « propagation » du flux énergétique. AK : Adénylate kinase; i.m.: Membrane interne mitochondriale; o.m. : Membrane externe mitochondriale.

Comme pour la CK, la localisation tissulaire et intracellulaire de l'AK définit plusieurs isoformes de cette enzyme. Les isoformes les plus courantes ont été listées chez l'Homme (Panayiotou et al., 2014) :

- AK1 : est une isoforme cytosolique présente dans tous les tissus. Elle utilise tous les types de nucléotides triphosphates pour phosphoryler l'AMP. Une mutation d'AK1 chez l'Homme entraîne une anémie sévère.
- AK2 : concentrée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, est présente dans le foie, le cœur, muscle squelettique, les reins et les poumons. Cette isoforme utilise également tous les types de nucléotides triphosphates pour phosphoryler l'AMP. Une mutation de l'AK2 chez l'Homme entraîne une déficience immunitaire. De plus, l'AK2 est décrite comme appartenant à

une « nouvelle voie apoptotique » en se complexant avec le FADD (Fas-associated protein with Death Domain) et la caspase 10 (Lee et al., 2007).

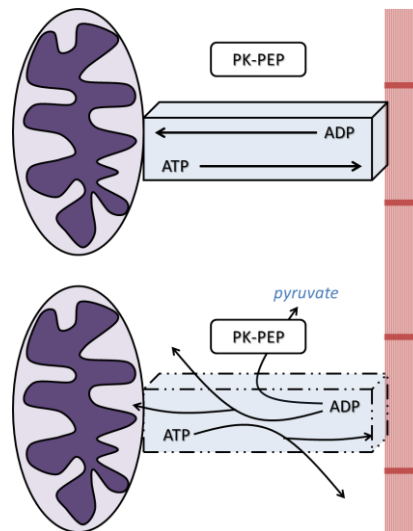
- AK3 : présente dans le foie, le cœur, les muscles squelettiques et les reins, est localisée dans la matrice mitochondriale. L'AK3 utilise le GTP et l'ITP comme substrats pour la phosphorylation de l'AMP.
- AK4 : présente dans le foie, le cœur, le cerveau et les reins, est également retrouvée dans la matrice mitochondriale. Les substrats préférentiels de l'AK4 sont l'ATP et le GTP. Elle est capable d'interagir avec l'ANT et module indirectement la prolifération et la mort cellulaire (Kong et al., 2013; Liu et al., 2009).

L'implication de l'AK dans la bioénergétique cardiaque est très souvent évoquée. A l'origine, des expériences d'ablation de l'expression génétique chez la levure ont montré un défaut d'export des nucléotides hors de la mitochondrie (Bandlow et al., 1998). Depuis, il a été montré qu'elle participe également de 10 à 20% au phosphotransfert chez la souris (Kay et al., 2000). L'AK est aussi impliquée dans la régulation des concentrations en AMP intracellulaires. De plus, elle active indirectement l'ANT, par des mécanismes allostériques de liaison entre l'AMP et l'ANT, ayant ainsi potentiellement un impact sur le  $\Delta G_p$  cytosolique (Nadtochiy et al., 2006). Pour finir, de plus en plus d'études montrent l'implication de l'AK dans la régulation des canaux potassiques ATP-dépendant ( $K_{ATP}$ ), ces derniers étant des senseurs du statut énergétique cellulaire (Carrasco et al., 2001; Elvir-Mairena et al., 1996; Olson et al., 1996).

#### 2.3.3.2.3 Le rôle du cytosquelette et de la compartimentation du métabolisme énergétique du myocarde en Unités Énergétiques Intracellulaires

Certains auteurs, et notamment l'équipe de Valdur Saks, ont proposé que la canalisation effectuée par les navettes CK et AK, pouvait être potentialisée par le cytosquelette. Ce système de canalisation de diffusion facilitée peut être représenté par une canalisation assurant un échange bidirectionnel des nucléotides adényliques entre le module de production et le module de consommation d'énergie. Il a été observé sur des fibres perméabilisées, qu'une partie de l'ADP endogène produit par les ATPases était inaccessible à un système enzymatique exogène dont la fonction est de phosphoryler l'ADP en ATP (Figure 15).





**Figure 15 : Compartmentation des nucléotides adényliques entre les modules énergétiques.**

**En haut :** Le système est compartimenté entre le module producteur (c'est-à-dire la mitochondrie) et le module consommateur (c'est-à-dire les myosines ATPases) d'énergie. Le flux des nucléotides adényliques reste donc inaccessible à des systèmes enzymatiques exogènes de pièges de l'ADP, PK-PEP (Pyruvate kinase-Phosphoénolpyruvate). **En bas :** Le système n'est pas compartimenté entre le module producteur (la mitochondrie) et le module consommateur (l'appareil contractile) d'énergie. Les flux de nucléotides adényliques ne sont donc pas facilités et l'ADP devient accessible à des systèmes enzymatiques exogènes piégeant l'ADP (PK-PEP).

Ainsi il semble que les échanges énergétiques entre les mitochondries et les ATPases de la myosine soient en quelque sorte « encapsulés » dans un canal qui serait physiquement réalisé par le cytosquelette. En effet dans des conditions expérimentales de perméabilisation des fibres cardiaques par la trypsine, responsable de la protéolyse des protéines constituant le cytosquelette, l'efficacité du système PK/PEP augmente considérablement, indiquant la perte de canalisation (Seppet et al., 2006). Des expériences sur « cardiomyocytes fantômes » (Saks et al., 1998), modèle de cardiomyocytes dans lesquels la myosine a été hydrolysée, ou sur cellules HL-1 non battantes (Seppet et al., 2006) ne présentant pas de structures en sarcomères, montrent le même résultat. L'accès de l'ADP est facilité pour les systèmes PK/PEP dans ces modèles. Ce phénomène est expliqué par une absence de canalisation des nucléotides. Dès 2005, Anmann montrait que l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ADP diminuait lorsque les ATPases sont stimulées par le calcium dans des fibres perméabilisées. De plus, ce résultat n'était pas reproductible dans les « ghost fibers », fibres dépourvues des myosines (Anmann et al., 2005). La même équipe identifie la  $\beta$ -tubuline comme étant l'élément du cytosquelette participant à cette canalisation de l'ATP et de l'ADP (Gonzalez-Granillo et al., 2012; Guzun et al., 2014). Le cytosquelette jouerait ainsi un rôle dans la régulation bioénergétique en modulant le degré de canalisation des nucléotides entre les sites producteurs et consommateurs.



## 2.4 Implications de la bioénergétique dans les pathologies cardiaques

### 2.4.1 Bioénergétique et insuffisance cardiaque

Les ventricules et les oreillettes semblent présenter un métabolisme énergétique et des mécanismes de phosphotransferts différents. Ces différences suggèrent que dans des conditions pathologiques favorables au développement des troubles du rythme par exemple, les régulations des systèmes énergétiques de l'oreillette et du ventricule soient probablement différentes.

Dans les cas d'insuffisance cardiaque chez l'Homme, il est couramment observé une diminution de la masse mitochondriale dans les tissus cardiaques. Chez le patient, l'idée d'une relation étroite entre niveau énergétique et qualité de travail cardiaque est d'ailleurs évoquée depuis de nombreuses années (Olson and Piatnek, 1959; Olson and Schwartz, 1951). Le fait que le cœur pathologique soit incapable de maintenir ses concentrations en intermédiaires énergétiques est donc assez logique. La spectroscopie en résonance magnétique est une technique idéale pour évaluer ces concentrations. En utilisant cette technique, l'équipe de S. Neubauer a plusieurs fois mis en évidence une quantité d'énergie disponible diminuée dans des cas de pathologies cardiaques chez des groupes de patients, caractérisée par de faibles rapports [PCr]/[ATP] (Holloway et al., 2011; Ingwall and Weiss, 2004). Ce plus faible statut énergétique dans la cellule cardiaque pathologique a été associé récemment chez l'Homme, à des défauts du système de phosphorylation et de la respiration dépendante du complexe I, mais aussi de la  $\beta$ -oxydation (Lemieux et al., 2011). Une étude menée sur fibres isolées perméabilisées obtenues à partir d'un modèle d'hypertension artérielle pulmonaire secondaire à une hypoxie chronique (correspondant à une élévation de la post-charge du ventricule droit) (Nouette-Gaulain et al., 2005) a montré également une diminution de la masse mitochondriale ventriculaire, associée à qu'un défaut d'oxydation phosphorylante au bout de 21 jours d'hypoxie. Cependant le ventricule droit, contrairement au ventricule gauche, conserve sa capacité oxydative après 14 jours d'hypoxie. Ce type de remodelage énergétique régional a également été observé sur un modèle d'infarctus du myocarde de rat (Laser et al., 1996). L'infarctus induit des différences d'expression des isoformes de la CK, la mi-CK diminuant dans toutes les chambres cardiaques excepté l'oreillette droite. Contrairement aux ventricules, dans les oreillettes et le septum, la MM-CK est diminuée par rapport au contrôle. Le transfert énergétique pourrait donc être perturbé de façon différente dans chaque chambre cardiaque et la navette Cr/PCr plus ou moins efficace. Ceci implique l'existence d'un remodelage, adaptatif ou « maladaptatif », variant en fonction de l'inducteur de la pathologie et de la chambre cardiaque considérée.

## 2.4.2 Mitochondries et troubles du rythme

Les maladies mitochondriales ont une prévalence de 1 naissance sur 5000. Ce groupe de pathologies multi-systémiques est la conséquence de mutations au niveau de l'ADN nucléaire ou mitochondrial (Meyers et al., 2013). Ces maladies touchent plusieurs organes et ne sont donc pas totalement considérées comme des pathologies du système cardiovasculaire. Les manifestations cardiaques typiques sont des cardiomyopathies hypertrophiques et dilatées, des arythmies ou encore des insuffisances cardiaques, comme résumé dans le Tableau 1 (Meyers et al., 2013).

Syndrome	Cardiovascular Manifestations
Barth syndrome (lethal infantile cardiomyopathy)	Dilated cardiomyopathy and left ventricular hypertrabeculation
Chronic progressive external ophthalmoplegia	Arrhythmia
Leigh syndrome (subacute necrotizing encephalomyelopathy)	Cardiomyopathy and arrhythmia
Kearns-Sayre syndrome	Arrhythmia
Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes	Dilated cardiomyopathy and left ventricular hypertrabeculation
Myoclonic epilepsy and ragged red fibers	Cardiomyopathy and arrhythmia
Maternally inherited diabetes and deafness	Left ventricular hypertrabeculation and arrhythmia
Neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa	Cardiomyopathy
Maternally inherited Leigh syndrome	Cardiomyopathy

**Tableau 1 : Les syndromes mitochondriales et leurs manifestations cardiovasculaires.**

(Tableau tirée de Meyers et al., 2013)

Les maladies mitochondriales sont retrouvées lors d'1 naissance sur 5000. Les manifestations cardiaques typiques sont présentés dans ce tableau, avec plusieurs implications de troubles du rythme cardiaque, comme pour le syndrome de Kearns-Sayre ou encore du MERRF.

### 2.4.2.1 Hypothèse d'une dépolarisation membranaire mitochondriale

Ce n'est que très récemment que l'implication de la mitochondrie dans les arythmies cardiaques a été évoquée. Les hypothèses proposées sont encore controversées mais les observations de base font consensus. Deux grands domaines complémentaires sont investigués pour mieux appréhender le rôle du compartiment mitochondrial dans les arythmies : une implication très ciblée de l'électrophysiologie mitochondriale et une implication des voies de signalisation influencées par le statut énergétique.

Il est généralement admis que des altérations de l'état redox et de la balance énergétique cellulaire induisent une dépolarisation de la membrane interne mitochondriale (Akar and O'Rourke, 2011). Plusieurs approches pharmacologiques, visant à prévenir la forte dépolarisation des membranes mitochondriales, ont permis de diminuer la susceptibilité du myocarde vis-à-vis des arythmies ventriculaires (Akar and O'Rourke, 2011). Ces auteurs proposent que le développement d'arythmies

ventriculaires dans le contexte de l'ischémie-reperfusion soit influencé par deux facteurs décrits ci-après.

#### 2.4.2.1.1 Stress oxydant et arythmies

Le stress oxydant est responsable des oscillations du potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), induisant une instabilité métabolique et la modulation de l'activité des canaux mitochondriaux. Ainsi, les diminutions locales du potentiel phosphate favoriseraient l'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendant de la membrane sarcolemmale (SarcK<sub>ATP</sub>), induisant des perturbations électrophysiologiques. L'activation des canaux SarcK<sub>ATP</sub> favorise l'induction des arythmies ventriculaires en conditions d'ischémie-reperfusion (Nakaya, 2014). L'ouverture de ces canaux augmente la dispersion de la repolarisation et la réduction de la période réfractaire des cardiomyocytes. Plusieurs études relatent de même l'effet anti-arythmique de la prévention de l'ouverture des SarcK<sub>ATP</sub> sur des cœurs de rats (Gonca and Bozdogan, 2010; Vajda et al., 2007), mais également chez l'Homme (Aronson et al., 2003).

Les questions de l'origine et de l'impact du stress oxydant sont posées (Aggarwal and Makielski, 2013; Jeong et al., 2012). Chez certains patients en insuffisance cardiaque et présentant donc un facteur de risque très élevé pour le développement de troubles du rythme, une diminution du rapport glutathion réduit (GSH) sur glutathion oxydé (GSSG) est observée. Le maintien de ce rapport joue un rôle prédominant dans les défenses anti-oxydantes des cardiomyocytes. En effet, l'utilisation d'un agent pharmacologique permettant d'oxyder massivement le GSH induit des oscillations du  $\Delta\Psi_m$  et favorise l'apparition des arythmies ventriculaires (Brown et al., 2010). Ainsi, le développement de stratégies permettant de maintenir le pool de glutathion sous sa forme réduite pourrait peut-être diminuer le risque arythmique.

#### 2.4.2.1.2 Canaux ioniques mitochondriaux et arythmies

Les canaux ioniques mitochondriaux eux-mêmes auraient un rôle prépondérant dans la régulation du  $\Delta\Psi_m$  et seraient une cible du stress-oxydant (Akar and O'Rourke, 2011). Ainsi, l'utilisation d'un agent pharmacologique (comme le 4'-chlorodiazepam) bloquant l'Inner Membrane Anion Channel (IMAC), diminue significativement le nombre d'épisodes d'arythmies ventriculaires lors de la phase de reperfusion suivant une période d'ischémie longue (Akar et al., 2005). Il a été proposé récemment qu'un autre canal mitochondrial, le pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP) soit impliqué dans le développement des arythmies auriculaires et ventriculaires chez l'Homme (Montaigne et al., 2013). Ce canal non spécifique localisé dans la membrane interne mitochondriale joue un rôle critique dans la mort cellulaire (Halestrap and Pasdois, 2009). Néanmoins, l'effet

bénéfique de son inhibition sur le développement d'épisodes arythmiques est encore controversé. Une étude menée au sein de notre laboratoire a toutefois montré que son inhibition par la cyclosporine A diminuait la complexité des arythmies ventriculaires (Pasdois et al., 2014 *en préparation*). L'ouverture des canaux SarcK<sub>ATP</sub> dissipe partiellement le  $\Delta\Psi_m$ , mais les effets anti-arythmiques sont observés uniquement lors de stimuli précis, s'avérant sans effet dans d'autres cas (Xie et al., 2014). Enfin, l'inhibition du canal calcique uniport (MCU, Mitochondrial Calcium Uniport) par le Ru360 préviendrait les dysfonctions électriques post-ischémiques lors de la reperfusion. Ici, le mécanisme proposé est une diminution de la surcharge calcique et donc une diminution de la susceptibilité d'ouverture du mPTP (García-Rivas et al., 2006). Néanmoins, la spécificité de cet inhibiteur a été questionnée, rendant difficile l'interprétation de ces résultats. En effet, il a été récemment démontré que le Ru360 inhibait le MCU, mais également les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Fernández-Sada et al., 2014).

#### **2.4.2.2 Hypothèse d'une dérégulation de la balance énergétique**

D'autres études ont proposé l'existence d'un lien entre le statut bioénergétique du myocarde et la durée de la fibrillation auriculaire (FA) dans un modèle canin. En effet, il semble que la durée de la FA soit inversement corrélée à la concentration intracellulaire d'ATP, à l'activité de la CK ou encore à l'activité de l'AK (Cha et al., 2003). Ces observations sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle le compartiment mitochondrial pourrait participer à la constitution d'un « substrat arythmogène ». Récemment, une étude réalisée sur des biopsies d'oreillettes droites de patients atteints de syndrome métabolique et présentant des épisodes de FA post-opératoire a considérablement renforcé cette hypothèse (Montaigne et al., 2013, 2014). Les auteurs ont montré, grâce à un modèle de fibres perméabilisées, que les patients présentant des altérations de la fonction mitochondriale avant l'intervention chirurgicale développaient, dans la majorité des cas, de la fibrillation auriculaire post-opératoire. Les anomalies observées étaient : une diminution de la respiration mitochondriale ; une sensibilisation du mPTP aux ions calcium ; une diminution de la respiration mitochondriale induite par l'ADP en présence de palmitoyl-carnitine ; et une sous-expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans les oxydations phosphorylantes. Les auteurs proposent une dérégulation énergétique générale impliquant la stimulation de la voie de l'AMP et favorisant l'ouverture des canaux SarcK<sub>ATP</sub>. Cette hypothèse avait également été formulée par un autre groupe de recherche de Salt Lake City, proposant ainsi que la susceptibilité du myocarde à développer des arythmies précoces était fonction de son statut énergétique (Shibayama et al., 2013). L'équipe de Shibayama a effectué un criblage métabolique sur des cœurs de chien après une fibrillation ventriculaire (FV). Ils ont ainsi identifié deux groupes de myocards : les cœurs partant tardivement en asystolie durant l'ischémie et les cœurs

partant précocement en asystolie durant l'ischémie. Les cœurs à départ tardif en asystolie présentent une concentration mitochondriale en phosphate inorganique plus élevée, ce qui conférerait une protection temporaire à la dépolarisation de la membrane mitochondriale (Shibayama et al., 2013; Zorov et al., 2009).

Les résultats de nombreuses études convergent pour montrer que le maintien du potentiel de membrane mitochondrial, en condition de stress, diminue significativement le risque d'occurrence des troubles du rythme cardiaque. Le stress oxydant et/ou une altération du statut énergétique du myocarde pourraient faciliter l'ouverture des  $\text{SarcK}_{\text{ATP}}$ , créant ainsi des conditions propices à l'établissement d'arythmies (Akar and O'Rourke, 2011; Brown and O'Rourke, 2010; Brown et al., 2010).

### **2.4.2.3 Implications de l'appareil contractile dans les troubles du rythme**

Des travaux antérieurs ont montré que le module de demande énergétique contrôlait très majoritairement le flux de contraction dans le myocarde sain (Diolez et al., 2007) indiquant ainsi qu'une modulation du travail cardiaque ne pourrait être significative qu'à partir du moment où l'appareil contractile était lui-même directement modulé (Deschodt-Arsac et al., 2013). L'étude des effets du levosimendan (sensibilisateur des myofibrilles au calcium) sur cœurs battants de cobayes, a clairement montré que cette drogue activait directement les myofilaments en augmentant leur sensibilité de la troponine C pour le calcium (Deschodt-Arsac et al., 2010). Il en résultait une augmentation du travail cardiaque, en l'absence de modification significative de la concentration intracellulaire en calcium et de la respiration myocardique des cœurs (Deschodt-Arsac et al., 2010). Pourtant la conséquence de cet effet sur le consommateur était une diminution significative de la concentration des intermédiaires énergétiques et donc une perturbation du statut bioénergétique cellulaire dans ces conditions. Du fait de la forte sensibilité du module producteur face aux modifications de l'état énergétique cellulaire, une activation mitochondriale par rétrocontrôle était également démontrée. Ce résultat implique qu'une perturbation « mécanique » de la contraction peut indirectement impacter le module producteur (Deschodt-Arsac et al., 2013) et suggère ainsi que le module consommateur peut indirectement réguler la fonction mitochondriale.

La blebbistatine est un inhibiteur spécifique des myosines II (Limouze et al., 2004). À des concentrations de l'ordre du micromolaire, cette molécule est capable de diminuer l'activité ATPasique des  $\beta$ -myosines cardiaques et des myosines présentes dans le muscle squelettique (Limouze et al., 2004), et d'inhiber l'interaction actine-myosine (Dou et al., 2007). Cet inhibiteur est très souvent utilisé afin d'arrêter la contraction de cœurs perfusés pour l'étude de l'électrophysiologie cardiaque par cartographie optique où l'absence de mouvements du myocarde est absolument nécessaire à

l'obtention de données. L'utilisation de cette molécule est justifiée par son absence d'effets sur : (i) l'influx intracellulaire du calcium et donc sur les systèmes impliqués dans le couplage E-C dont l'activation dépend du calcium (Dou et al., 2007) ; (ii) l'activité électrique du myocarde, les paramètres électrocardiographiques, les périodes réfractaires ou encore les motifs d'activations électrophysiologiques des oreillettes et des ventricules (Brack et al., 2013; Fedorov et al., 2007). La blebbistatine utilisée comme inhibiteur de l'appareil contractile, pourrait ainsi renseigner sur les rôles du module consommateur dans des cas de troubles du rythme. Plus précisément, en comparant des situations avec et sans blebbistatine, il pourrait être possible de quantifier les changements de réponses mitochondriales en fonction de l'utilisation ou non du module consommateur d'énergie lors d'épisodes arythmiques. Pourtant, les effets de la blebbistatine sur la physiologie cardiaque restent très controversés. En effet, certaines études récentes utilisent la blebbistatine plus spécifiquement comme un désensibilisateur calcique. Il a été montré, que l'application de blebbistatine diminue la susceptibilité des cœurs à partir en tachycardie ventriculaire dans les cas d'infarctus du myocarde chez la souris (Venkataraman et al., 2013). La blebbistatine a également prouvé son efficacité anti-arythmique sur un modèle transgénique de souris ayant une cardiomyopathie hypertrophique résultante d'une mutation de la troponine T. Chez ces souris, la susceptibilité exacerbée des myofilaments aux ions calcium, se traduit par un score arythmique très élevé. Dans une autre étude, la blebbistatine reverse le phénotype QRS long de ces souris mutantes (Huke et al., 2013). Par ailleurs, Kanlop et al., ont démontré que malgré l'absence d'effet sur les transitoires calciques à l'origine du couplage E-C, des phénomènes d'activité électrique chaotique ont été observés sur oreillettes isolées de rat en présence de blebbistatine (Kanlop and Sakai, 2010). La question de l'action de la blebbistatine sur les troubles du rythme est donc également posée.

La blebbistatine permet donc de moduler la demande énergétique par des mécanismes qui ne sont pas entièrement élucidés. Deux hypothèses principales ont été proposées : une désensibilisation calcique et/ou l'inhibition des myosines ATPases. Cependant si la demande en énergie est un facteur contribuant au développement des problèmes de rythmologie cardiaque, il est raisonnable d'évaluer également dans le même contexte l'impact de la dérégulation du phosphotransfert, système intracellulaire assurant la communication entre la demande et la production d'énergie.

### ***2.4.3 Implication du transfert énergétique dans les troubles du rythme***

#### ***2.4.3.1 Implication du système de la créatine kinase***

La compartimentation du métabolisme énergétique est souvent perturbée dans les cœurs pathologiques, notamment au niveau des ICEUs (Seppet et al., 2005). Le remodelage hypertrophique ventriculaire secondaire à une augmentation chronique de la post-charge est associé à une diminution



de la quantité de la desmine et une augmentation de la tubuline (Wilding et al., 2006). L'altération du couplage miCK-ANT en découplant est associée à une modification de l'affinité de la respiration mitochondriale pour l'ADP. La conséquence potentielle est une accumulation d'ADP qui diminue notamment le rapport [ATP]/[ADP]. Des études en spectroscopie  $^{31}\text{P}$  permettent de quantifier ces diminutions du rapport [PCr]/[ATP] sur cœurs *ex vivo* et *in vivo* issues de pathologies cardiaques. Ces études mettent en évidence chez l'Homme des diminutions du flux de créatine kinase calculé à partir de la technique de transfert de saturation (travaux de l'équipe de P.A. Bottomley, notamment Bottomley et al., 2013) mais également la plupart des travaux de Neubauer, dont le très récent Lygate and Neubauer, 2014), mais elles restent encore à la base de discussions acharnées, puisque certains des travaux (de ces auteurs notamment) mettent en évidence une absence de modification de l'énergétique chez des souris KO en créatine (Lygate et al., 2013a). L'accumulation d'ADP entraîne également des inhibitions des ATPases telles que par exemple, une inhibition de la SERCA. Celle-ci réduirait la recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique entraînant une surcharge calcique intracellulaire, candidate potentielle de déclenchements de périodes d'arythmies ventriculaires (Kojima et al., 1994; Stefenelli et al., 1990, 1992) et/ou contribuant très probablement au maintien de ces troubles du fait de dysfonctionnements associés dans les courants ioniques (notamment  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) du sarcolemme (Akar and O'Rourke, 2011; Brown and O'Rourke, 2010).

#### **2.4.3.2 Implication du système de l'adénylate kinase**

Bien que la CK et la navette Cr/PCr soit essentielle pour la bioénergétique cardiaque et qu'une diminution de la réserve énergétique suite à des dysfonctions de ce système de phosphotransfert puisse être observé, la suppression de la créatine kinase n'entraîne peu voire pas de dysfonction ventriculaire. Ce résultat suggère fortement que d'autres systèmes de phosphotransfert pourraient « prendre le relais » pour maintenir la fonction cardiaque et transférer l'énergie des sites producteurs aux sites consommateurs. Un des candidats décrit est le mécanisme de phosphotransfert Adenylate Kinase (AK). Dans le cœur, l'AK a été montrée, notamment par Dzeja PP et ses collaborateurs, comme impliquée dans un certain nombre de fonctions énergétiques (contrôle de la phosphorylation oxydative; export des nucléotides de la mitochondrie Dzeja et al., 1985; régulation des canaux potassiques Dzeja and Terzic, 1998). Plus récemment, ces auteurs ont mis en évidence le rôle du phosphotransfert AK dans le cœur pathologique lorsque le phosphotransfert CK est déficient, montrant notamment que cette compensation était éliminée lorsque de l'Ap5a (diadénosine pentophosphate appartenant à la famille des diadénosines polyphosphates (ApnA)) était appliqué (Dzeja et al., 1999). Toutefois ce rôle compensatoire semble rester partiel, puisque le « turnover d'ATP » atteint ne serait que de 60% dans les cœurs malades comparés aux situations saines. Même si peu d'études se sont centrées sur la relation entre troubles du rythme et mécanismes de

phosphotransferts AK, la durée des épisodes de fibrillations atriales semble corrélée aux activités de l'AK, supportant le fait que la capacité à maintenir l'énergétique cardiaque pourrait être un substrat pour les fibrillations atriales et les pathologies cardiaques en découlant. Des travaux sur modèle de souris transgéniques KO AK1 ont mis en évidence que l'homéostasie énergétique était fortement altérée (Janssen et al., 2000). Cette modification n'est pas associée à un quelconque changement au niveau de l'activation par phosphorylation de l'AMPK, contrairement aux souris contrôle (Hancock et al., 2006). Cette absence de phosphorylation de l'AMPK chez ces souris KO AK1 est cohérente avec la réduction observée de la production normale d'AMP. Ainsi l'absence d'AK1 dans le cœur, en compromettant l'énergétique, altère également la signalisation de cardioprotection lors d'ischémie-reperfusion, le phosphotransfert AK-dépendant préservant les pools de nucléotides lors de la reperfusion (Pucar et al., 2000, 2002).

L'ap5a a été montrée comme pro-arythmique, phénomène associé à une augmentation de la durée des potentiels d'action ventriculaire (Stavrou et al., 2001) et une réduction de la période réfractaire (Brandts et al., 2003). L'application de cette drogue, inhibitrice de l'AK, renforcerait ainsi le rôle potentiel du phosphotransfert AK dans « la lutte » contre les arythmies. Néanmoins, l'hydrolyse de l'ap5a dans l'espace extracellulaire activerait les récepteurs A1 de l'adénosine. Cette signalisation adénosine-dépendante pourrait donc mettre en doute les effets délétères électrophysiologiques directs et la vulnérabilité arythmique provoqué par la perfusion de l'ap5a plus que la simple inhibition du phosphotransfert et de ses effets (Brandts et al., 2003). Cependant les auteurs, conscients du manque d'informations sur l'internalisation de l'ap5a, n'excluent pas une inhibition intracellulaire de l'AK par l'ap5a, menant à l'inhibition des  $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$  (Elvir-Mairena et al., 1996).

Les différents résultats expérimentaux présentés suggèrent fortement que la régulation du phosphotransfert AK-dépendant est un facteur contribuant au maintien de la stabilité électrique du myocarde. Il semble donc important d'étudier plus finement son rôle notamment en montrant que des dérégulations de cette navette puissent augmenter significativement le risque arythmique.



# **OBJECTIFS**

### 3 OBJECTIFS

L'objectif des travaux de cette thèse était de parfaire la **compréhension de l'implication de l'homéostasie énergétique dans les phénomènes arythmiques cardiaques**. Dans le contexte actuel, il fait consensus que l'électrophysiologie des cellules cardiaques joue un rôle primordial dans la régulation de la conduction cardiaque normale. Plusieurs canaux impliqués dans le couplage excitation-contraction, comme les canaux  $K_{ATP}$  ainsi que les SERCA, ont une activité dépendante de l'état énergétique cellulaire. Dans ce travail de thèse, la régulation de la bioénergétique a été étudiée au niveau du myocarde des quatre chambres cardiaques en analysant les relations entre les différents compartiments, producteur et consommateurs énergétiques. Ce travail initie une approche translationnelle allant de l'organe entier isolé perfusé *in vitro* à la cellule isolée perméabilisée, permettant d'expliquer les adaptations/dysfonctions observés dans les troubles du rythme. Dans un objectif de précision, chacune des chambres cardiaques a été étudiée afin d'en préciser leur rôle dans ces processus et de proposer des voies thérapeutiques potentiellement intéressantes contre les troubles du rythme cardiaque.

Nous avons porté une attention particulière sur deux acteurs impliqués dans la compartimentation des nucléotides adényliques au sein des tissus cardiaques: les myosines ATPases et l'AK.

Les myosines ATPases (pouvant être inhibées par la blebbistatine) sont les consommatrices d'énergie les plus étudiées dans leur relation avec l'activité mitochondriale. L'activation parallèle du myocarde par le calcium notamment, permet de maintenir l'homéostasie énergétique cardiaque et conditionne la relation étroite entre respiration mitochondriale et activité ATPasique. Le statut énergétique cellulaire est donc influencé par l'activité contractile et produit un impact sur les propriétés électrophysiologiques des tissus.

L'adénylate kinase (inhibé par l'ap5a) est le système de transfert énergétique le moins décrit au sein du myocarde. Pourtant, il semble que le tissu atrial puisse en dépendre (Anflous et al., 1997). De plus, l'AK module l'activation des canaux  $SarK_{ATP}$ , la voie de l'AMPK et l'activation allostérique de l'ANT par l'AMP, facteurs influençant la stabilité électrique myocardique.

**La première partie de ce travail de thèse** a été réalisée *ex vivo* sur un modèle de cœur de rat sain perfusé en mode Langendorff. L'objectif principal de cette première partie était d'évaluer le rôle de la navette AK-dépendante et des myosines ATPases sur la susceptibilité du myocarde à développer des arythmies ventriculaires et/ou auriculaires.

Le travail mené dans le cadre de cette première partie a été affiné **dans la deuxième partie** par une caractérisation des différences régionales de la bioénergétique cardiaque. La technique des fibres

isolées et perméabilisées nous a permis de caractériser la bioénergétique de chaque chambre cardiaque et du septum interventriculaire. L'originalité de cette partie repose sur le fait que les hypothèses actuelles permettant de comprendre la compartimentation des nucléotides adényliques ne sont qu'en partie explorées pour chaque région cardiaque. De plus, les inhibitions induites dans la première partie de notre étude *ex vivo* ont été reproduites *in vitro* pour chaque région cardiaque et le septum interventriculaire, afin de mettre en évidence le lien entre la dérégulation énergétique induite par ces inhibiteurs et l'instabilité électrophysiologique du myocarde.

**La troisième partie de ce travail** de thèse a consisté en une analyse protéomique sur les quatre chambres cardiaques et le septum visant à apporter un éclairage sur les résultats obtenus lors de la deuxième partie. Ce criblage à grande échelle, nous a permis, au-delà de l'analyse descriptive très fine des pistes énergétiques explorées *ex vivo* et *in vitro*, d'avoir une vue d'ensemble de la composition protéique de chaque chambre cardiaque. De plus, des « candidats régionaux » décrits comme pro-fibrillatoires ont pu être mis en évidence nous permettant une analyse plus mécanistique des phénomènes présentés dans les première et seconde parties du manuscrit.



# **MATÉRIELS & MÉTHODES**



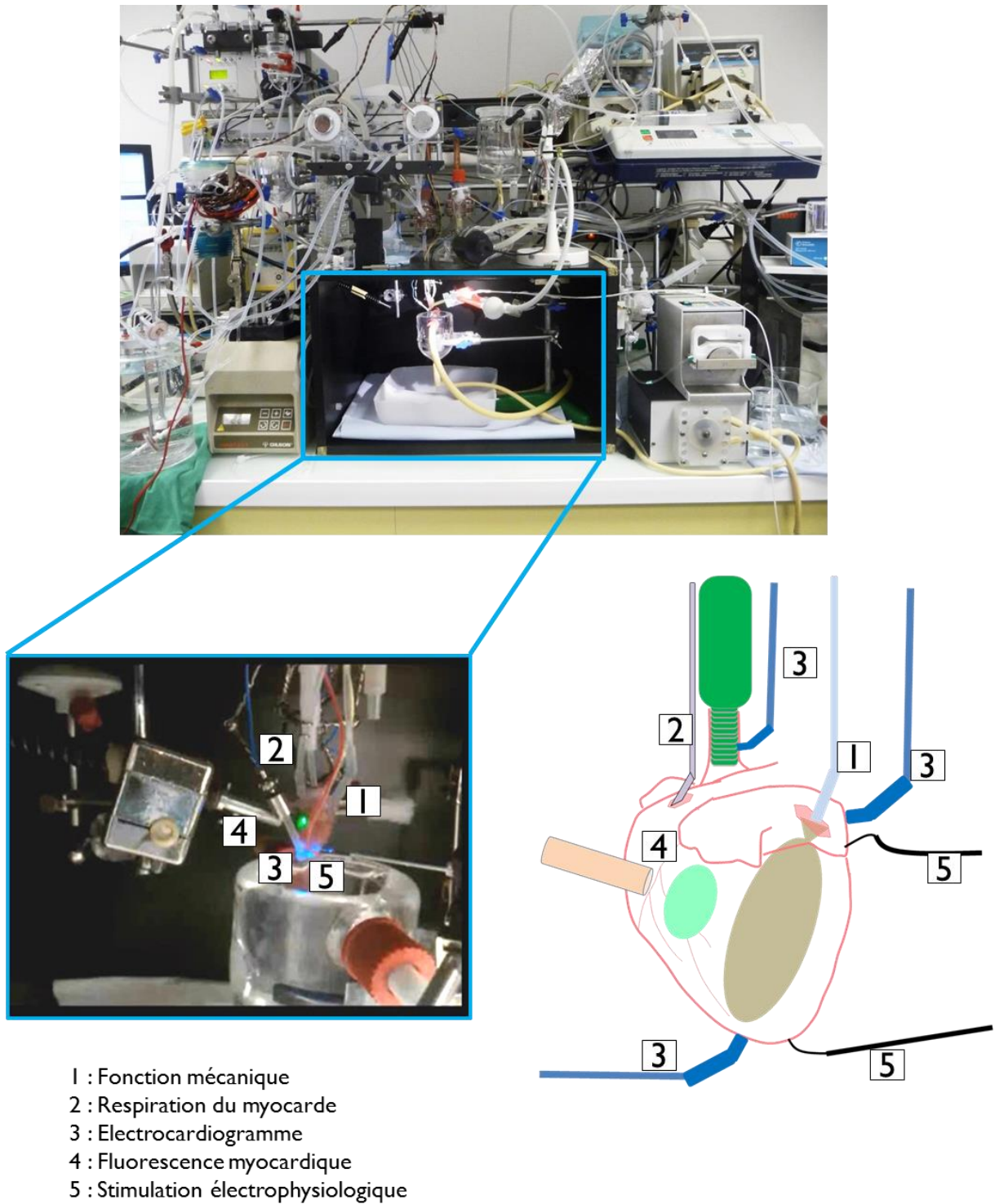
## 4 MATERIELS ET METHODES

### 4.1 Perfusion de cœur *ex vivo* selon la technique Langendorff

#### 4.1.1 Préparation et montage du cœur *ex vivo*

Des rats Wistar mâles (250-350g) sont pré-anesthésiés dans une boîte d'induction saturée en isoflurane (2.5 %), puis anesthésiés par une injection intra-péritonéale (100 mg/kg) de pentobarbital. Pour limiter la formation de caillots sanguins à la périphérie de l'aorte, une injection intra-péritonéale de 5000 U/kg d'héparine est également effectuée. Une thoracotomie bilatérale suivie d'une incision du diaphragme sont réalisés afin de récupérer le bloc cœur-poumon, qui est alors immergé dans une solution à 4°C de Krebs-Henseleit (voir composition ci-dessous) saturée en oxygène. Après avoir retiré les poumons, le thymus, l'œsophage ainsi que la trachée, l'aorte est dégagée et sectionnée transversalement au niveau de la crosse aortique. L'aorte est ensuite canulée et le myocarde est retroperfusé à flux constant, par une solution Krebs-Henseleit saturée en oxygène et à 37°C. La pression de perfusion est maintenue constante à une valeur minimum de 60 mmHg par une pompe péristaltique délivrant un flux variant de 10 à 15 ml/min en fonction de la préparation (Figure 17). L'artère pulmonaire est sectionnée à sa base afin de faciliter le drainage de l'effluent coronaire. Un ballonnet en latex relié à un capteur de pression (Figure 17) est placé dans le ventricule gauche en passant par l'oreillette gauche et gonflé afin de mesurer la pression développée en isovolumétrie par le ventricule gauche en continu. Le ballonnet est gonflé par injection d'eau distillée jusqu'à ce que la pression diastolique atteigne une valeur de 5 à 10 mmHg.

La solution Krebs-Henseleit est composée en mM de : NaCl 116 ; KCl 5 ; MgSO<sub>4</sub> 1,2 ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 ; NaHCO<sub>3</sub> 27 ; glucose 5,5 et CaCl<sub>2</sub> 1,8 ; pH 7.4 ajusté par bullage au carbogène (mix 95 % O<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub>).

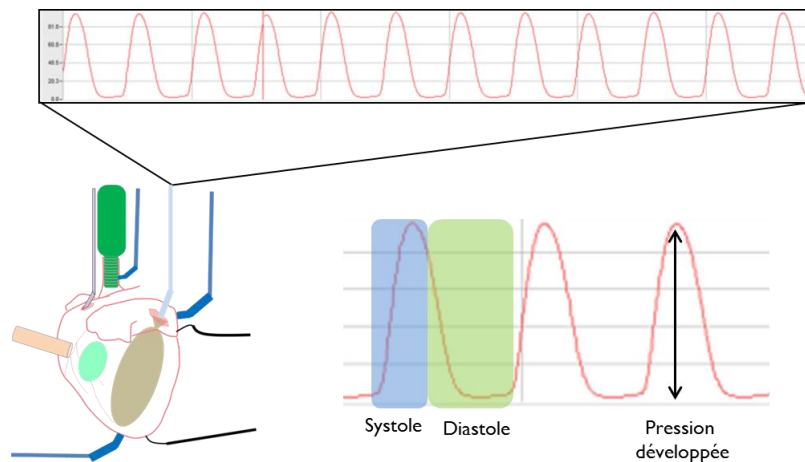


**Figure 17 : Montage de perfusion de cœur en mode Langendorff.**

Le montage de cœur isolé perfusé en mode Langendorff permet d'analyser des paramètres hémodynamiques comme la fonction mécanique grâce à un ballonnet inséré dans le ventricule gauche et relié à un capteur de pression (1), la respiration myocardique mesurée dans l'effluent coronaire de l'artère pulmonaire (2), l'ECG de surface enregistré à partir de deux électrodes placées à l'apex du cœur et sur l'oreillette droite (3), le potentiel redox myocardique par mesure fluorimétrique du ventricule gauche (4) ; et également de stimuler électriquement le myocarde par deux électrodes de stimulation placées sur l'oreillette droite et l'apex du myocarde (5).

### 4.1.2 Evaluation du travail cardiaque

Le Produit Pression-Fréquence (PPF) est un indicateur du travail cardiaque. Il est calculé par le logiciel d'acquisition (IOX2 Emka Technologies) qui effectue en temps réel le produit de la fréquence cardiaque par la pression développée en isovolumentrie par le ventricule gauche (Figure 18). En mode Langendorff et dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus la valeur du PPF est proche de 30 000 mmHg/min.

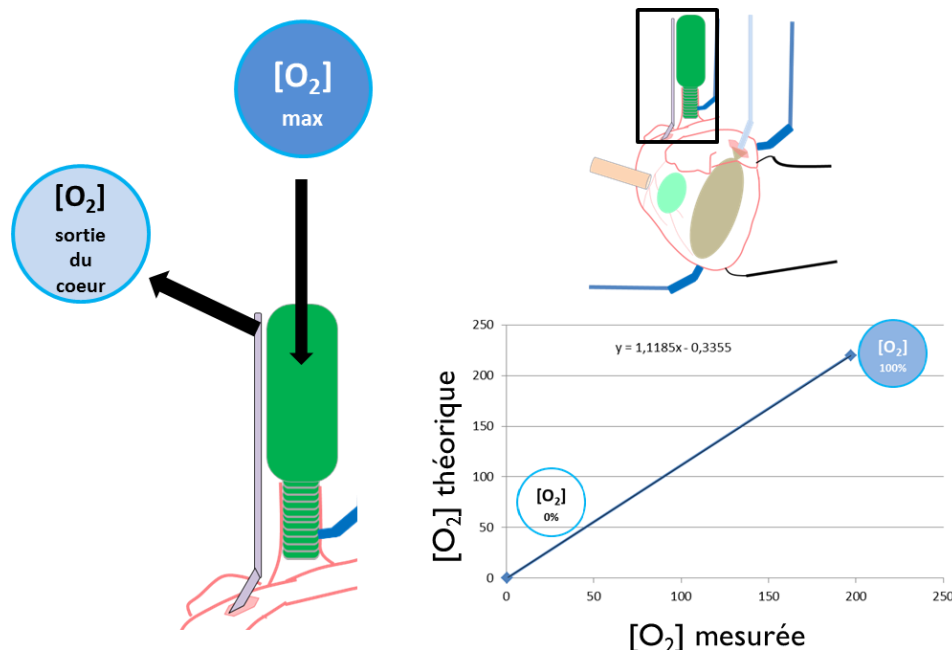


**Figure 18 : Evaluation du travail cardiaque.**

Le travail cardiaque est évalué grâce à un ballonnet placé dans le ventricule gauche et relié à un capteur de pression. Les données recueillies sont la pression développée par le ventricule gauche en systole, mais également le temps de relaxation du myocarde, c'est-à-dire la diastole.

### 4.1.3 Mesure de la consommation en oxygène

La consommation en oxygène du myocarde est obtenue par le calcul de la différence entre la quantité d'oxygène contenue dans la solution de Krebs-Henseleit (c'est-à-dire à l'entrée du myocarde) et la quantité d'oxygène présente dans l'effluent coronaire (c'est-à-dire à la sortie du myocarde). Les quantités d'oxygène dissoutes dans la solution de perfusion sont obtenues à l'aide d'une électrode de Clark montée à proximité de la canule de perfusion aortique (Figure 19).



**Figure 19 : Mesure de la consommation en oxygène**

La quantité d'oxygène consommée par le myocarde est évaluée par le calcul de la différence entre la concentration d'oxygène dans la solution de perfusion et celle de l'effluent coronaire, en fonction du débit coronaire cardiaque et du poids frais du myocarde. Pour cela, une calibration est effectuée afin de calculer le rapport entre les concentrations d'oxygène théorique et mesurée.

Le dispositif est étalonné à la fin de chaque protocole de perfusion. La procédure de calibration est effectuée en trois temps. Dans un premier temps, le degré de saturation en oxygène, à 37°C, de la solution de perfusion continuellement bulée par le carbogène, est évalué. Cette valeur représente le maximum. Dans un second temps, la quantité d'oxygène dissoute dans la solution de perfusion à 37°C et à pression atmosphérique est mesurée. Cette valeur représente le 100%. Sur la base de tables disponibles dans la littérature, la concentration en oxygène peut être estimée de l'ordre de 220  $\mu\text{mol/L}$ , dans une solution de Krebs-Henseleit à 37°C et à pression atmosphérique. Finalement une mesure est effectuée dans une solution de perfusion saturée par du dithionite de sodium afin de réduire chimiquement le dioxygène et ainsi obtenir une solution anoxique. Cette valeur représente le 0%. Lors de la perfusion du myocarde, une partie de l'effluent coronaire est collecté à l'aide d'un cathéter placé à la base de l'artère pulmonaire. Ce dernier est connecté à une électrode de Clark, elle-même reliée à une pompe péristaltique, aspirant l'effluent coronaire à une vitesse de 2 mL/min (Figure 19). La consommation myocardique est ainsi enregistrée par le logiciel d'acquisition à une fréquence d'échantillonnage de 1Hz (IOX2, Emka Technologies). La consommation globale d'oxygène du myocarde est exprimée en  $\mu\text{mol d'O}_2/\text{min/g}$  poids frais, selon l'équation :

$$MVO_2 = \frac{([O_2] \text{ solution de perfusion} - [O_2] \text{ effluent coronaire}) \times \text{débit coronaire}}{\text{Poids frais du myocarde}}$$

**Équation 1 : Consommation globale d'oxygène du myocarde**

avec,

**MVO<sub>2</sub>** : la consommation globale d'oxygène du myocarde, en  $\mu\text{mol d'O}_2/\text{min/g}$  poids frais ;

**[O<sub>2</sub>]<sub>solution de perfusion</sub>** : la concentration d'oxygène à l'entrée du myocarde, calculée en  $\mu\text{mol d'O}_2$  ;

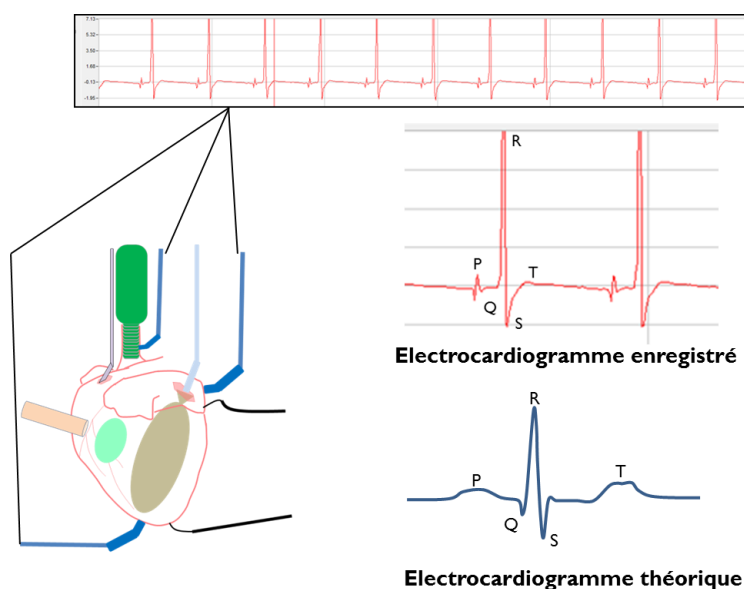
**[O<sub>2</sub>]<sub>effluent coronaire</sub>** : la concentration d'oxygène à la sortie du myocarde, calculée en  $\mu\text{mol d'O}_2$  ;

**Débit coronaire** : débit coronaire, mesurée manuellement à la sortie du myocarde durant le protocole de perfusion, en L/min.

**Poids frais du myocarde** : poids du myocarde après le protocole de perfusion, en g.

#### 4.1.4 Mesure de l'activité électrique cardiaque

Les signaux électriques de surface sont collectés à l'aide de deux électrodes unipolaires positionnées respectivement sur l'oreillette droite et l'apex du myocarde (Figure 20). Une référence est positionnée sur l'aorte, tissu électrophysiologiquement neutre, afin d'améliorer le rapport signal sur bruit. Les variations de potentiel électrique des myocytes enregistrées sont amplifiées mais non filtrées et affichées par le logiciel d'acquisition (IOX2, Emka Technologies). La Figure 20 montre un tracé caractéristique d'un électrocardiogramme enregistré pendant une phase de stabilisation d'un myocarde de rat. Plusieurs ondes sont reconnaissables : onde P (dépolarisation/contraction des oreillettes), complexe QRS (dépolarisation/contraction des ventricules), onde T (repolarisation/relaxation des ventricules), à noter que la relaxation auriculaire est masquée par le complexe QRS.



**Figure 20 : Mesure de l'activité électrique cardiaque**

L'activité électrique du myocarde est mesurée par l'enregistrement ECG du myocarde. L'onde P (dépolarisation/contraction des oreillettes), le complexe QRS (dépolarisation/contraction des ventricules), l'onde T (repolarisation/relaxation des ventricules) sont reconnaissables. Nous pouvons noter que la relaxation auriculaire est masquée par le complexe QRS.

### 4.1.5 Mesure du potentiel redox myocardique

L'utilisation de fibres optiques pour mesurer la fluorescence de chromophores intrinsèques ou extrinsèques à la surface d'un cœur isolé et perfusé est une technique déjà mise en œuvre dans plusieurs laboratoires. L'étude de la fluorescence des groupes nicotinamides réduits du NADH et NADPH (NAD(P)H) et de la fluorescence des groupes iso-alloxazoles oxydés des flavines constituant les flavoprotéines, est idéale pour suivre les modifications du potentiel redox cellulaire.

Pour réaliser cette étude, le Dr Pasdois a adapté un système de perfusion afin d'utiliser la fibre optique (SAFAS Monaco). Une enceinte protégée de la lumière est construite autour de la canule de perfusion. Il a été également nécessaire de développer dans la nouvelle chambre de perfusion, un système maintenant la fibre optique dans une position permettant au rayon incident d'irradier le myocarde avec un angle de 45° environ. Même si le système de normalisation mis au point par la société SAFAS permet de compenser les pertes de fluorescence causées par les mouvements du myocarde, ils sont limités par précaution. Finalement, le spectrofluorimètre couplé à la fibre optique permet de suivre en temps réel et simultanément le signal de fluorescence du pool total de NAD(P)H et des flavoprotéines, de façon non invasive en disposant la fibre optique à une distance de 1 cm de la surface du ventricule gauche.

La première étape a consisté à acquérir des spectres d'excitation et d'émission des flavines et du NAD(P)H à la surface d'un cœur perfusé de rat. La Figure 21 présente les spectres caractéristiques d'excitation et d'émission des flavoprotéines et du pool total de NAD(P)H obtenus sur cœur isolé perfusé. Dans cette étude, les couples de longueurs d'ondes utilisés correspondent à ceux définis par le groupe de Chance (Chance et al., 1979), c'est-à-dire  $\lambda^{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$  et  $\lambda^{\text{em}} = 460 \text{ nm}$  pour le pool total de NAD(P)H, et  $\lambda^{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$  et  $\lambda^{\text{em}} = 520 \text{ nm}$  pour les flavoprotéines. Le spectre d'excitation des flavines met en évidence une seconde plage centrée sur 340 nm, ce qui est en accord avec le recouvrement du spectre d'excitation des flavines avec le spectre d'émission du NAD(P)H.

Les paramètres d'acquisition *in situ* sont les suivants : une tension de 1200 volts aux bornes du tube photomultiplicateur (PM) pour l'étude de la fluorescence des flavoprotéines et de 1100 volts pour l'étude du NAD(P)H ; une bande passante de 10 nm ; un pas de 2 nm ; une distance fibre-échantillon de 1 cm ; un angle incident de 45° environ par rapport à la paroi du ventricule gauche.

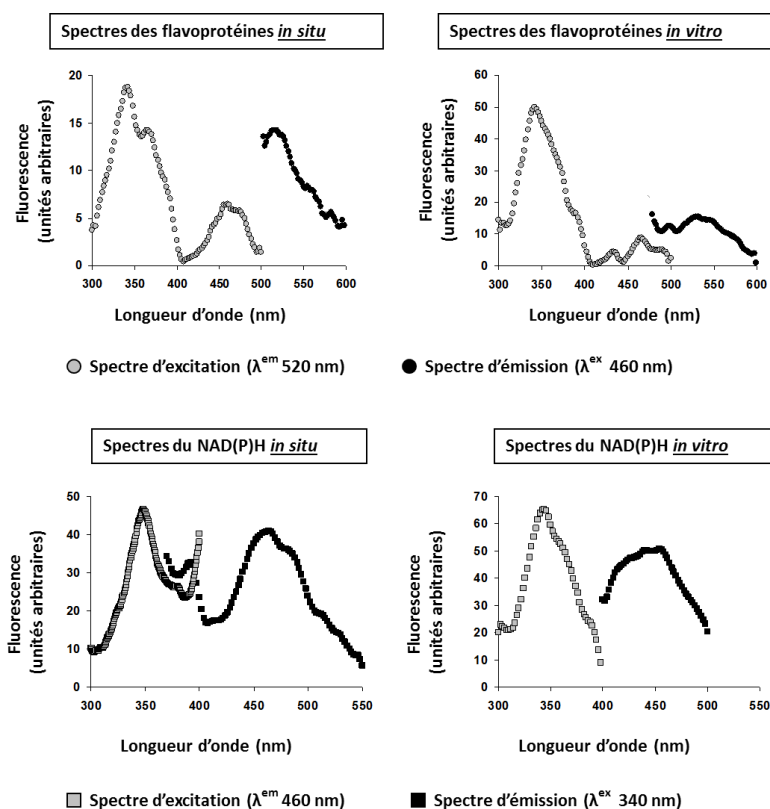
Pour l'étude du potentiel redox myocardique, les couples de longueur d'ondes suivantes ont donc été utilisés. L01 :  $\lambda^{\text{ex}} 340 / \lambda^{\text{em}} 340$  ; L02 :  $\lambda^{\text{ex}} 340 / \lambda^{\text{em}} 460$  ; L03 :  $\lambda^{\text{ex}} 460 / \lambda^{\text{em}} 460$  ; L04 :  $\lambda^{\text{ex}} 460 / \lambda^{\text{em}}$

520. Les couples L01 et L03 représentent les signaux de réflectance à l'excitation du NAD(P)H et des flavoprotéines, respectivement. Pour évaluer le potentiel redox, l'équation suivante est utilisée :

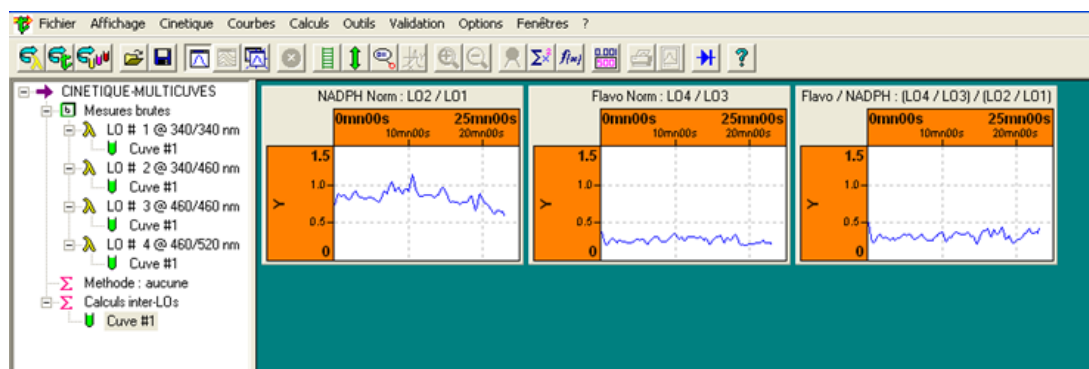
$$P_{redox} = \frac{(L04/L03)}{(L02/L01)}$$

**Équation 2 : Potentiel redox cardiaque**

$P_{Redox}$  représente le potentiel redox, le numérateur correspond à la fluorescence des flavoprotéines et le dénominateur à la fluorescence du pool de NAD(P)H. Dans les deux cas, la fluorescence émise par les chromophores intrinsèques est normalisée par la réflectance à l'excitation. Pour exemple, une diminution de la fluorescence du NAD(P)H peut avoir pour origine une modification physiologique (c'est-à-dire une activation de la chaîne respiratoire mitochondriale) ou une origine physique (c'est-à-dire une modification de la densité du tissu ou de la courbure du myocarde à cause du mouvement). Dans le premier cas, la réflectance à l'excitation n'est pas modifiée alors que dans la deuxième situation, la réflectance à l'excitation peut être augmentée ou diminuée. Ainsi, en utilisant le rapport de la fluorescence émise sur la réflectance à l'excitation, les artefacts liés au changement des propriétés physiques du système biologique étudié sont en partie corrigés.



L'évolution du potentiel redox est enregistrée à une fréquence d'échantillonnage de 0,25 Hz grâce au logiciel d'acquisition en mode multi-longueur d'ondes (SAFAS Monaco). Une fenêtre de calcul permet de définir les équations à utiliser pendant l'expérimentation et offre la possibilité de suivre l'évolution du potentiel redox (Equation 2) en temps réel pendant le rythme sinusal et l'arythmie du ventricule gauche (Figure 22).



**Figure 22 : Suivi de l'évolution du potentiel redox**

Impression d'écran du logiciel d'acquisition SAFAS Monaco, permettant le suivi de l'évolution du potentiel redox en temps réel. Les deux premières fenêtres correspondent à la fluorescence des deux chromophores intrinsèques (NAD(P)H et flavoprotéines) normalisés à la réflectance à l'excitation. La dernière fenêtre est le potentiel redox.

#### **4.1.6 Protocole de détermination des seuils de susceptibilité à la fibrillation**

Afin de déterminer la susceptibilité du myocarde à développer une arythmie ventriculaire, un protocole de stimulation électrique est mis en place. Après stabilisation myocardique de 15 minutes, trois épisodes de stimulation d'une durée croissante (c'est-à-dire 5, 10 et 15 secondes) et espacés de 10 minutes chacun sont appliqués sur le myocarde (Figure 23). Les stimulations sont effectuées par l'intermédiaire de deux électrodes positionnées respectivement au niveau de l'apex et de l'oreillette droite (Figure 17). Le boîtier de stimulation délivre une stimulation électrique d'une durée de 1 ms à une fréquence de 30 Hz et un courant constant de 8 mA.

Si une arythmie soutenue se déclenche après la stimulation électrique, elle est enregistrée durant deux minutes, puis une désynchronisation du myocarde est effectuée par perfusion d'une solution de KCl à 50 mmol/L.

#### **4.1.7 Analyse des ECG de surface**

Les ECG de surface ont été utilisés afin d'évaluer l'impact d'une drogue sur la complexité de l'arythmie ventriculaire. La section 4.1.6 présente le protocole qui a été utilisé afin d'induire de l'arythmie ventriculaire dans le myocarde de rat. Brièvement, un stimulus électrique à haute

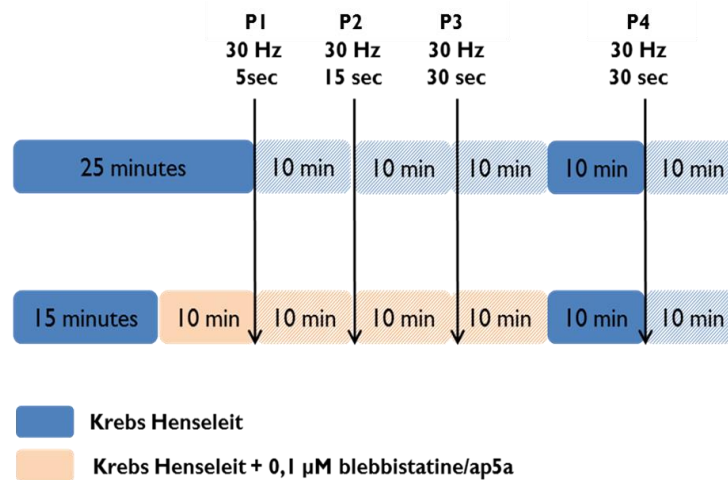


fréquence est appliqué sur le myocarde afin de perturber l'activité électrique normale. Un tel stimulus est suffisant pour désorganiser l'activité électrique et provoqué de l'arythmie. Les ECG de surface sont continuellement enregistrés pendant la période arythmique et sont utilisés pour en évaluer sa complexité. 120 secondes de signal ECG enregistrées à la fin du stimulus électrique, sont extraites. Les données ainsi récoltées sont prises en charge par un logiciel (PV wave) qui analyse les données brutes du signal ECG par pas de 4 secondes, effectuant à chaque pas une transformé de Fourier rapide, générant ainsi par séquence arythmique, 30 spectres de Fourier. Le même logiciel cherche simultanément, sur chacun des spectres générés, la fréquence dominante (FD) et calcul l'indice de régularité (I.R). La FD d'un spectre de Fourier correspond au pic dont l'intensité est la plus haute. L'indice de régularité (I.R) est calculé par le rapport de l'aire sous le pic de la fréquence dominante divisée par l'aire totale du spectre. Ainsi, une faible valeur de l'I.R indique un degré important de complexité car l'énergie totale du spectre (ici représentée par une aire) est fortement distribuée sur toute la bande de fréquence analysée. Au contraire, une forte valeur de l'I.R indique un faible degré de complexité car l'énergie totale du spectre est principalement contenue sous le pic à la FD. Finalement la valeur de l'I.R est utilisée pour établir une classification du type d'arythmies ventriculaires. Lorsque la valeur de l'I.R est inférieure à 0,15, nous avons considéré que le signal ECG enregistré correspond principalement à de la fibrillation ventriculaire. Une valeur de l'I.R supérieure à 0,2 correspond principalement à de la tachycardie ventriculaire qui peut être polymorphe (I.R inférieur 0,4) ou monomorphe (I.R supérieur à 0,4).

#### **4.1.8 Pharmacologie**

Afin de tester l'influence des partenaires bioénergétiques, trois groupes de myocarde ont été étudiés : un groupe contrôle (n=13), un groupe Blebbistatine (n=12) et un groupe Ap5a (n=12). A des concentrations de l'ordre du  $\mu\text{mol/L}$ , la blebbistatine inhibe les myosines ATPases (Limouze et al., 2004), impliquant ainsi une réduction de la demande bioénergétique. Le phosphotransfert assuré par l'AK est inhibé par un analogue de l'ATP, l'ap5a (Valentine et al., 1989). Pour étudier le rôle de ces deux partenaires énergétiques dans les troubles du rythme, 0,1  $\mu\text{mol/L}$  de chacun de ces inhibiteurs sont ajoutés au perfusât à l'entrée de la canule aortique après 15 minutes de stabilisation des myocards. Ces faibles concentrations permettent d'induire une faible inhibition de la demande énergétique, suffisante cependant pour qu'il puisse être possible de quantifier une réponse du système énergétique, plus spécifiquement du module producteur d'énergie (compartiment mitochondrial). Parallèlement à l'addition de chacune de ces drogues et après 10 minutes de stabilisation sous drogues, le protocole de stimulation décrit précédemment est réalisé (Section 4.1.6).

Durant toute la durée du protocole (Figure 23), le travail cardiaque, la consommation globale du myocarde, l'activité électrique, ainsi que les modifications du potentiel redox sont enregistrés.



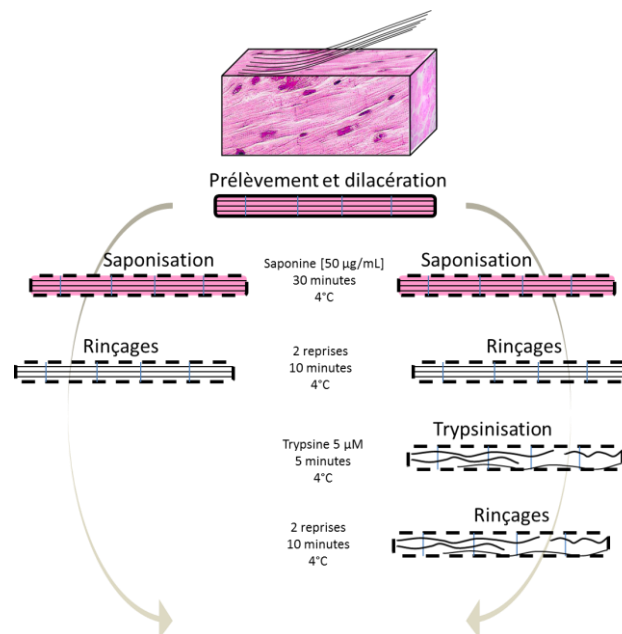
**Figure 23 : Protocole de stimulation de cœur perfusé**

Les cœurs sont perfusés durant 15 minutes en situation de référence (solution Krebs-Henseleit), suivis de 10 minutes de perfusion « pharmacologique » (solution Krebs-Henseleit + 0,1 µM Blebb/ap5a). Les séquences de stimulation électrique (P1, P2, P3 et P4) sont à durée variable (respectivement 5,15 et 30 secondes) mais séparées de 10 minutes de récupération. Après la troisième stimulation et les dix minutes de récupération qui s'en suivent, les perfusions « pharmacologiques » sont arrêtées pour revenir sur une solution de perfusion classique durant dix minutes. Puis une dernière stimulation est effectuée. Les arythmies développées par les myocards suite aux stimulations électriques sont maintenues durant deux minutes puis les cœurs sont resynchronisés par un bolus de KCl.

## 4.2 Technique de fibres perméabilisées

### 4.2.1 Préparation des fibres perméabilisées

Le protocole de préparation des fibres perméabilisées a été transmis par R. Guzun, de l'équipe de V. Saks (Saks et al., 1998), lors d'une formation réalisée en début de doctorat au Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée (LBFA), Université de Grenoble 1. Cette technique a dès lors, été utilisée au sein de l'IHU Liryc (Figure 24).



**Figure 24 : Protocole de préparation de fibres isolées perméabilisées et/ou de fibres isolées perméabilisées trypsinées.**

Les tissus cardiaques sont pelés afin de récupérer des fibres musculaires. Après une dilacération des fibres entre elles, les fibres sont perméabilisées par saponification. Deux rinçages successifs permettent d'éliminer le détergent. Pour la trypsinisation, les fibres sont ensuite traitées à la trypsin puis rincées à deux reprises.

Des rats mâles Wistar (200-250g) sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (2,5%). Les cœurs sont immédiatement prélevés (voir section 4.1.1), et plongés dans une solution de préservation (solution A) froide composée de (en mM) CaK<sub>2</sub>EGTA 2,77 ; K<sub>2</sub>EGTA 7,23 ; imidazole 20 ; DTT 0,5 ; MgCl<sub>2</sub> 6,56 ; MES 53,3 ; taurine 20 ; Na<sub>2</sub>-ATP 5,3 ; Na<sub>2</sub>-Phosphocreatine 15 ; BSA 0.2 % ; pH 7,1 à température ambiante (KOH). Toute la procédure de dissection des différentes régions cardiaques est effectuée dans la solution A, riche en intermédiaires énergétiques favorisant ainsi la relaxation des fibres myocardiques. Après avoir retiré les vaisseaux pulmonaires et la graisse à proximité des oreillettes, les oreillettes et les ventricules sont séparés. Des fibres ventriculaires de la paroi libre de l'endocarde sont pelées. L'oreillette gauche est séparée de l'oreillette droite comprenant le septum auriculaire, et les fibres du septum ventriculaire proviennent de l'apex sans distinction droite-gauche. Toutes les fibres musculaires sont dissociées avec soin les unes des autres sous loupe binoculaire, puis perméabilisées

en présence de saponine (50 µg/mL) durant 30 minutes à 4°C, sous agitation. Cette étape de perméabilisation douce s'effectue grâce au pouvoir détergent de la saponine. La saponine se complexe avec les molécules de cholestérol et déstabilise ainsi les membranes lipidiques. La membrane sarcolemmal contient une forte quantité de cholestérol et la membrane mitochondriale externe en contient une quantité moins importante. La sélectivité de la saponine pour le cholestérol permet de perméabiliser la membrane plasmique mais de conserver l'intégrité de la membrane externe mitochondriale. La membrane plasmique des myocytes devient alors perméable et il devient possible d'accéder directement à la fonction mitochondriale. Il est important de noter que cette approche expérimentale permet de préserver l'architecture intra-cellulaire, ceci étant notamment très important pour la régulation mitochondriale (Seppet et al., 2005). Suite à la perméabilisation, les fibres sont rincées à deux reprises dans de la MiR05 (Mitochondrial Respiration Media, composition recommandée par Oroboros Instrument, Autriche), une solution dépourvue d'intermédiaires énergétiques contenant (en mM) EGTA 0,5 ; MgCl<sub>2</sub> 3 ; K-lactobionate 60 ; taurine 20 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 ; HEPES 20 ; sucrose 110 ; 1 g/l BSA ; pH 7,1 à température ambiante (KOH). Cette étape de rinçage (2 fois 10 minutes, à 4°C, sous agitation) permet de stopper la perméabilisation et d'éliminer la majorité des intermédiaires énergétiques contenus dans le cytoplasme des fibres musculaires. Les concentrations des intermédiaires énergétiques cytosoliques peuvent alors être imposées et contrôlées durant les expériences d'oxygraphie. Les fibres sont conservées dans une solution MiR05 à 4°C et seront utilisées 5 h maximum après leur prélèvement.

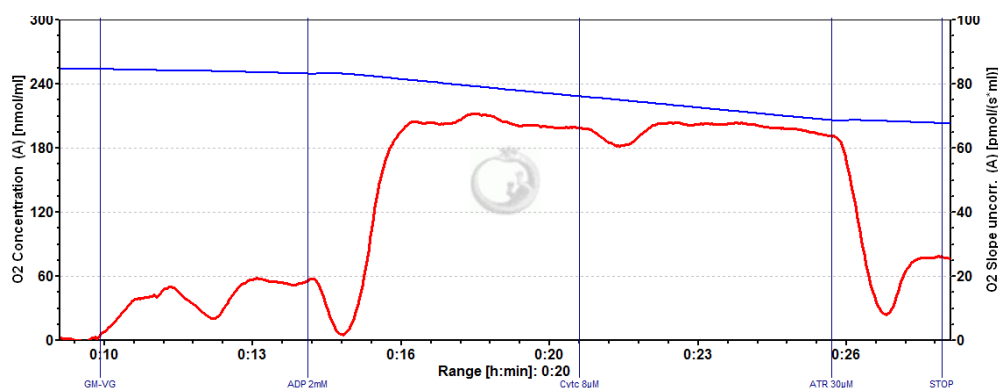
#### **4.2.2 Mesure de la respiration mitochondriale**

L'oxygraphie est une technique permettant de mesurer, en temps réel, une quantité d'O<sub>2</sub> dissoute dans une solution. Son principe repose sur un potentiel redox imposé par une tension de 0,7 V entre une cathode en platine et une anode en argent. Ces deux éléments baignent dans une solution d'électrolyte (ici une solution de KCl), l'ensemble isolé de la solution de mesure par une membrane (souvent en PTFE, polytétrafluoroéthylène, appelé aussi téflon) hydrophobe perméable à l'O<sub>2</sub>. Grâce à la différence de potentiel imposée aux bornes de la cathode et de l'anode lors de la diffusion de l'O<sub>2</sub> à travers la membrane, ces dernières sont ionisées en hydrogène par la cathode, générant un courant au niveau de l'anode. Ce courant est directement proportionnel à la concentration en oxygène. Son amplification et sa numérisation permettent de suivre au cours du temps la respiration mitochondriale de diverses préparations biologiques, comme les mitochondries isolées, les fibres perméabilisées, des cellules isolées ou encore du tissu intact.

Dans le laboratoire, la respiration mitochondriale des fibres perméabilisées est enregistrée par mesure oxygraphique haute-résolution (OROBOROS High Resolution Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Autriche). Les expériences sont effectuées à 25°C dans 2 mL de MiRO5 supplémentée par 5 mM de glutamate et 2 mM de malate, sous agitation continue (300 rpm). Après l'équilibration en oxygène du milieu, les fibres sont introduites dans la chambre de mesure. La chambre de mesure est ensuite isolée du milieu extérieur à l'aide d'un bouchon étanche.

#### 4.2.2.1 Mesure de l'intégrité membranaire

Cette étape représente un contrôle interne au bon déroulement du protocole de perméabilisation. La perméabilisation des myocytes cardiaques ne doit pas être accompagnée d'une détérioration des membranes mitochondriales, ceci aurait pour conséquence une altération de la fonction mitochondriale. Dans un premier temps, la respiration basale (c'est-à-dire avec substrats respiratoires uniquement) est enregistrée. Celle-ci est mesurée en présence de glutamate et de malate qui permettent de fournir des électrons à la NADH - coenzyme Q oxydoréductase (c'est-à-dire au complexe I ; Figure 25) ; à noter que l'addition de malate permet de « mettre en marche » le cycle de Krebs et donc l'apport de NADH au complexe I. Dans ces conditions, la respiration basale doit être relativement faible (0,2 pmol d'O<sub>2</sub>/sec/U de CS). L'addition de 2 mM d'ADP stimule la production d'ATP par l'ATP synthétase et donc le couplage électrochimique entre la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP. Une injection de 4 μM de cytochrome c permet d'évaluer l'intégrité de la membrane mitochondriale externe. En effet, si une addition exogène de cytochrome c stimule la respiration mitochondriale, cela révèle un accès à l'espace intermembranaire mitochondriale. S'en suit un ajout d'atractyloside 30 μM, inhibiteur de l'ANT, permettant d'interrompre le transfert des nucléotides du cytosol vers la matrice mitochondriale et révélant l'état de la membrane interne mitochondriale. La respiration mitochondriale stimulée par l'ADP est alors inhibée.

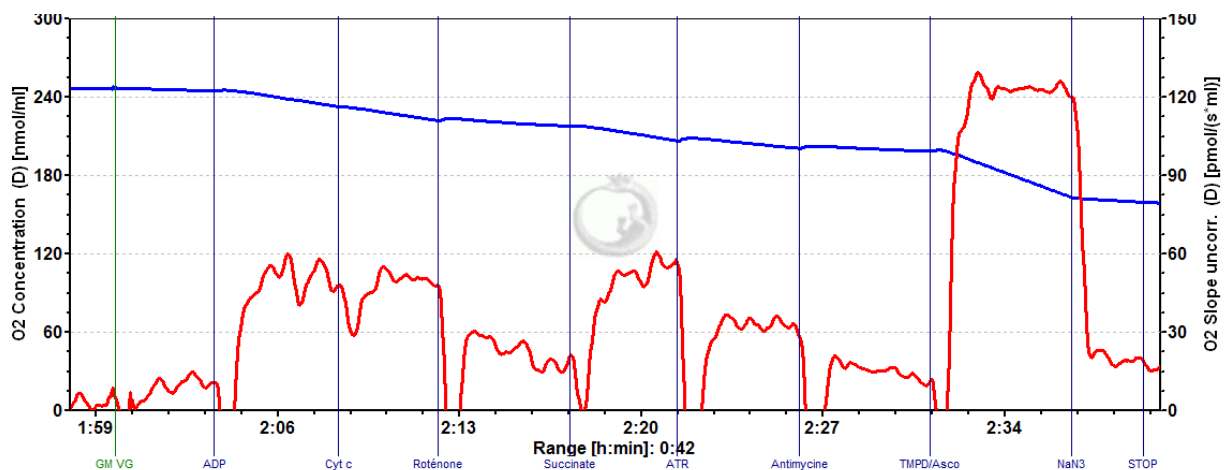


**Figure 25 : Tracé oxygraphique d'un test d'intégrité membranaire mitochondriale.**

Les tracés oxygraphiques sont représentés par la concentration d'oxygène présente dans la chambre expérimentale (trace bleue) et sa dérivée au cours du temps (trace rouge). Les fibres perméabilisées de ventricule gauche sont mises en présence de glutamate et malate (GM-VG), puis d'ADP (ADP 2mM), de cytochrome c (Cytc 8μM) et d'atractyloside (ATR 30μM), respectivement.

#### 4.2.2.2 Evaluation du fonctionnement des différents complexes de la chaîne respiratoire

Une étude d'oxygraphie sur fibres perméabilisées a été entreprise afin d'évaluer le fonctionnement des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce travail a été effectué par Paul Charron et a fait l'étude de son stage de Master2 (Figure 26). La stratégie choisie se base sur une approche pharmacologique sélectionnant les inhibiteurs spécifiques des différents composants de la chaîne respiratoire. Les fibres perméabilisées sont plongées dans les cuves d'oxygraphie dans une solution MIR05 à 25°C sous agitation. Dans un premier temps, une vitesse basale est mesurée en présence de 2 mmol/L de malate et 5 mmol/L de glutamate. Le malate est un des substrats directs d'une enzyme du cycle de Krebs, la malate déshydrogénase et son apport permettent donc une entrée de squelette carboné dans le cycle de Krebs. Afin de stimuler la chaîne respiratoire, un ajout de glutamate est également nécessaire permettant un apport de NADH. Le NADH va alors être réduit par le complexe I de la chaîne respiratoire, transférant une paire d'électrons aux ubiquinones initiant le transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire. Comme le montre la Figure 10 de la section 2.3.1.3 de l'introduction, le transfert d'électrons le long des complexes de la chaîne respiratoire est couplé à un transfert vectoriel de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire mitochondrial. Cette accumulation de protons constitue la différence de potentiel électrochimique en protons, qui est utilisée par le complexe V pour effectuer la synthèse d'ATP.



**Figure 26 : Tracé oxygraphique de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.**

Les tracés oxygraphiques sont représentés par la concentration d'oxygène présente dans la chambre expérimentale (**trace bleue**) et sa dérivée au cours du temps (**trace rouge**). Les fibres perméabilisées de ventricule gauche sont mises en présence de glutamate et malate (**GM VG**), puis d'ADP (**ADP**), de cytochrome c (**Cytc**), roténone (**Roténone**), succinate (**Succinate**), d'atractyloside (**ATR**), d'antimycine A (**antimycine**), de TMPD et d'ascorbate (**TMPD/Asco**) et de sodium azide (**NaN3**).

Dans un second temps, un apport saturant en ADP (2 mmol/L) permet un retour de proton de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale, permettant alors le fonctionnement de la chaîne respiratoire dans son intégralité. L'intégrité de la membrane externe est vérifiée par ajout de 8 µmol/L de cytochrome c (voir Section 4.2.2.1). Le complexe I est inhibé par addition de 2,5 µmol/L de roténone, inhibiteur spécifique de ce complexe. Le complexe II est alors étudié par ajout de succinate (5 mmol/L), intermédiaire du cycle de Krebs et permettant un apport de FADH<sub>2</sub>, transporteur d'électrons spécifique du complexe II. L'ANT est ensuite inhibé par ajout de 30 µmol/L d'atractyloside afin de vérifier l'intégrité de la membrane interne (voir section 2. B.2.). Après l'obtention d'un état stationnaire en présence d'atractyloside, le complexe III est inhibé par ajout de 5 µmol/L d'antimycine A, révélant la respiration due aux fuites des protons à travers la membrane interne mitochondriale. Cette vitesse de respiration est également un bon indicateur de l'intégrité de la membrane interne mitochondriale. L'activité du complexe IV est étudiée en présence de TMPD, N,N,N',N'-tetraméthyl-1,4-phenylenediamine (0,5 µmol/L) et d'ascorbate (2 mmol/L) assurant la réduction du cytochrome c sans dissociation de ce dernier du complexe IV. Finalement ce dernier complexe de la chaîne respiratoire est lui aussi inhibé par l'ajout d'azide de sodium (100 mmol/L). La respiration résiduelle non mitochondriale est alors révélée, décrite comme ayant pour origine principale le stress oxydant mitochondrial.

#### **4.2.2.3 Mesures des affinités apparentes de la respiration mitochondriale pour les nucléotides adényliques**

Des cinétiques de la respiration mitochondriale stimulée par des concentrations croissantes d'ADP ou d'ATP sont effectuées. La Figure 27 présente une trace typique de la stimulation de la respiration mitochondriale par l'ADP exogène. Le système biologique étudié se comporte comme un système Michaelien. En effet, l'utilisation d'une régression non-linéaire de type Michaelis-Menten donne un coefficient de régression très élevé indiquant le comportement Michaelien de la respiration mitochondriale vis-à-vis de doses croissantes de nucléotides adényliques. Les courbes type Michaelis-Menten obtenues permettent de déterminer informatiquement deux paramètres (équation 3): l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ADP ( $K_m^{app(ADP)}$ ) ou l'ATP ( $K_m^{app(ATP)}$ ) et les respirations maximales théoriques correspondantes respectivement aux  $V_{max(ADP)}$  et  $V_{max(ATP)}$ .

$$y = \frac{V_{max} * x}{K_m + x}$$

**Équation 3 : Equation Michaelis-Menten**

Avec,

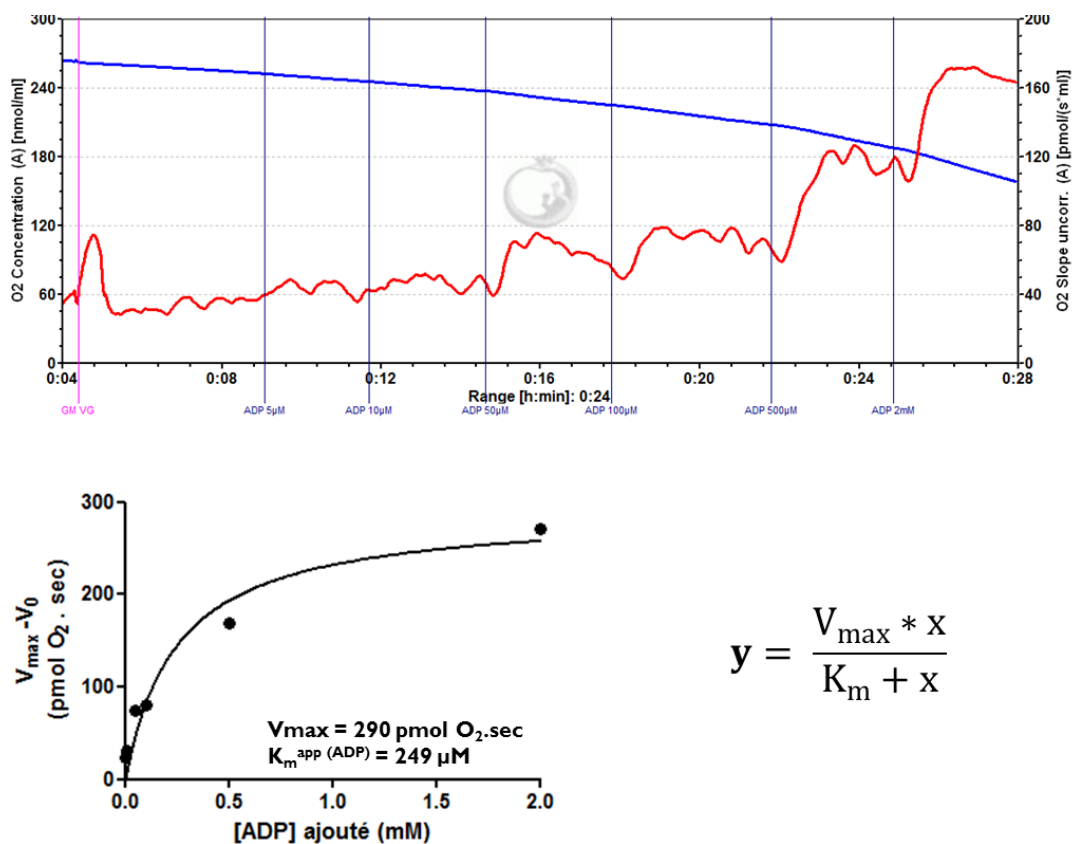
**y** : vitesse de respiration mitochondriale ;

**x** : concentration de nucléotides adényliques ;

**V<sub>max</sub>** : vitesse de respiration mitochondriale maximale atteinte pour des concentrations saturantes de nucléotides adényliques, est déterminée informatiquement ;

**K<sub>m</sub>** : constante de Michaelis, correspondant à la concentration nucléotides adényliques nécessaire pour atteindre la moitié de la V<sub>max</sub>, est déterminée informatiquement.

Nous avons pu constater que les concentrations de nucléotides adényliques publiées dans la littérature et utilisées pour atteindre une stimulation maximale de la respiration mitochondriale, n'étaient pas suffisantes pour certains tissus, notamment les oreillettes. Les paramètres des courbes sont déterminés par un logiciel informatique (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA), n'imposant pas d'atteindre expérimentalement la V<sub>max</sub> puisque ce paramètre est extrapolé directement par le logiciel.



**Figure 27 : Tracé oxygraphique d'une stimulation de la respiration mitochondriale par l'ADP exogène et définissant des courbes de type Michaelis-Menten.**

Les tracés oxygraphiques sont représentés par la concentration d'oxygène présente dans la chambre expérimentale (trace bleue) et sa dérivée au cours du temps (trace rouge). Les fibres perméabilisées de ventricule gauche sont mises en présence de glutamate et malate (GM VG), puis concentrations croissantes d'ADP (5, 10, 50, 100, 500 et 2000 µM). L'évolution de la respiration est michaelienne et permet de déterminer informatiquement la vitesse maximale de respiration (V<sub>max</sub>) et l'affinité de la respiration mitochondriale pour l'ADP (K<sub>m</sub><sup>app</sup>(ADP)).



### **4.2.3 Mesure des activités ATPasiques tissulaires**

Les mesures des activités ATPasiques sont déterminées à l'aide de deux stratégies expérimentales différentes. La première stratégie consiste à coupler une fibre optique (Safas, Monaco) à l'oxygraphe Oroboros afin de pouvoir suivre simultanément la respiration mitochondriale et le système biologique rapporteur de l'activité ATPasique. Ce montage de fibre optique couplée à l'Oroboros permet d'enregistrer simultanément l'oxydation du NADH et de monitorer l'inhibition de la respiration mitochondriale. La seconde stratégie consiste à suivre l'absorbance à 340 nm de l'échantillon étudié par spectrophotométrie (Carry50).

Les deux protocoles proposent de mesurer l'activité ATPasique non mitochondriale des fibres perméabilisées à l'aide d'un système rapporteur non réversible. En effet, les mitochondries sont inhibées par un cocktail contenant 10 µg/mL d'oligomycine, 1 µmol/L de roténone et 30 µmol/L d'atractyloside. Cette étape permet de s'affranchir d'une compétition entre l'utilisation de l'ADP endogène par la mitochondrie et par notre système rapporteur (Figure 28). Après avoir introduit les fibres musculaires isolées perméabilisées dans la solution de travail, sont ajoutés 28 U/mL de pyruvate kinase, 5 mmol/L de phosphoenol pyruvate, 10 U/mL de lactate déshydrogénase et 300 µmol/L de NADH. Afin de démarrer la réaction enzymatique, 2 mmol/L d'ATP sont additionnés. L'ATP est hydrolysé par les ATPases non mitochondriales (majoritairement les myosines ATPases) présentes dans les fibres perméabilisées, fournissant de l'ADP au système rapporteur stimulant ainsi l'oxydation du NADH. Cette réaction est suivie par fluorométrie ( $\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ ). Dans des expériences parallèles, les effets de la blebbistatine (25 µmol/L) et de l'ap5a (50 µmol/L) sur l'activité ATPasique non mitochondriale sont testés.

### **4.2.4 Etude de la compartimentation bioénergétique in situ**

#### **4.2.4.1 Préparation des fibres perméabilisées et trypsinisées**

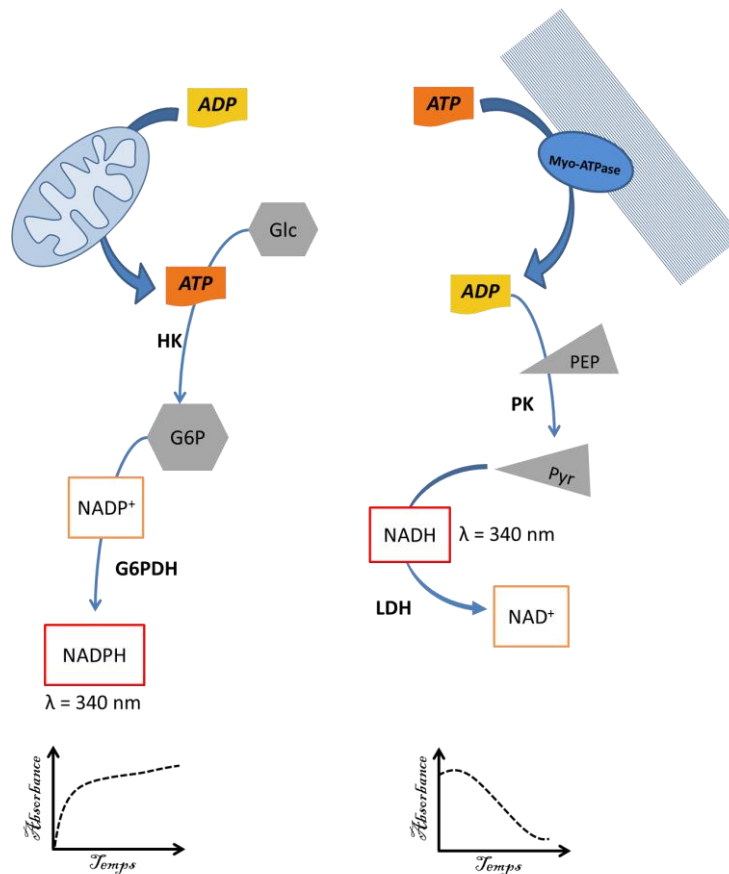
Afin d'évaluer la compartimentation présente entre les sites producteurs et consommateurs d'énergie, une stratégie de déstructuration du cytosquelette est choisie (Appaix et al., 2003; Gonzalez-Granillo et al., 2012; Kuznetsov et al., 1996). Pour cela, un traitement à la trypsine, visant à hydrolyser les liaisons peptidiques impliquant un acide aminé basique (c'est-à-dire lysine ou arginine), est effectué directement après l'étape de perméabilisation des fibres musculaires. Cette procédure est effectuée à une concentration de 5 µmol/L de trypsine, dans la solution A durant 5 minutes à 4°C. Afin de stopper cette hydrolyse douce, les fibres sont rincées à deux reprises dans la solution Mir05 (10 minutes à 4°C) (Figure 24).

Afin de vérifier l'état des membranes mitochondriales après la trypsinisation, une mesure de l'intégrité membranaire (voir section 4.2.2.1) est effectuée.

#### **4.2.4.2 Dosage des flux de nucléotides adényliques entre l'appareil contractile et la mitochondrie**

Les flux de nucléotides adényliques entre l'appareil contractile et le compartiment mitochondrial sont mesurés, en temps réel par spectrophotométrie (Cary50). Pour cela, les fibres perméabilisées sont mises en cuvette de détection (3 mL) dans une solution Mir05 à 25°C, sous agitation constante. Pour doser l'ATP, le système rapporteur NADP<sup>+</sup> (0,4 mmol/L), glucose (5 mmol/L), G6PDH (0,5 U/mL) et HK (1 U/mL) est utilisée. Des concentrations croissantes d'ADP sont ajoutées dans la cuvette et les changements d'absorbance à 340 nm de l'échantillon sont enregistrés (Figure 28).

Des expériences comparables sont effectuées pour doser l'ADP produit par le système. Pour cela, les fibres perméabilisées sont placées dans la cuvette de mesure en présence d'un tampon composé de Mir05 supplémentée par du PEP (5 mmol/L), de LDH (10 U/mL), de PK (20 U/mL) ainsi que de NADH (0,2 mmol/L). Des concentrations croissantes d'ATP sont successivement ajoutées dans le but d'enregistrer la production d'ADP (Figure 28). Des expériences contrôles sont effectuées afin de soustraire les contaminations nucléotidiques présentes dans l'ATP ou l'ADP.



**Figure 28 : Schéma des systèmes enzymatiques rapporteurs de la quantité d'ADP ou d'ATP par suivi spectrophométrique.**

**A gauche :** Le dosage de la formation de l'ATP se fait par le système rapporteur glucose-hexokinase. L'ADP fournie est phosphorylé en ATP. La réaction enzymatique de la phosphorylation du glucose (Glc) se fait par l'utilisation de l'ATP formé et via l'hexokinase (HK). Le glucose-6-phosphate (G6P) produit permet de former du NADPH via la glucose-6-P déshydrogénase (G6PDH). La formation du NADPH est suivie par augmentation de son absorbance.

**A droite :** Le dosage de l'hydrolyse de l'ATP est fait par le système rapporteur phosphoénolpyruvate-pyruvate kinase. La réaction enzymatique de la formation du pyruvate (Pyr) se fait par l'utilisation de l'ADP formé et de phosphoénolpyruvate (PEP) et via la pyruvate kinase (PK). Le pyruvate produit permet de former du NAD<sup>+</sup>, à partir de NADH et via la lactate déshydrogénase (LDH). La consommation de NADH est suivie au cours du temps par diminution de son absorbance.

#### 4.2.4.3 Evaluation de l'impact de l'accumulation d'ATP sur la respiration mitochondriale

Afin de définir l'impact de l'inhibition du recyclage de l'ATP par l'appareil contractile (c'est-à-dire par addition de blebbistatine) sur la fonction mitochondriale, un système exogène de recyclage à l'ATP est utilisé. Dans cette expérience, les fibres perméabilisées sont mises dans les cuves d'oxygraphie, dans une solution MiRO5 en présence de glutamate (5 mmol/L), de malate (2 mmol/L), d'hexokinase (1 U/mL) et de glucose (5 mmol/L). Le système hexokinase/glucose est utilisé comme consommateur d'ATP (système de recyclage de l'ATP), afin de limiter l'accumulation d'ATP dans le milieu, à proximité des mitochondries. En présence ou non de blebbistatine (25  $\mu$ mol/L), des additions croissantes d'ADP (50, 100, 250, 500 et 2000  $\mu$ mol/L) sont réalisées. Les  $V_{\max(\text{ADP})}$  et  $K_m^{\text{app}(\text{ADP})}$  sont calculés comme indiqué dans la section 4.2.2.3).

### 4.2.5 Etablissement des gammes : poids sec/ poids frais et poids frais/mg de protéine

Les mesures sur fibres perméabilisées sont généralement rapportées au poids sec de fibres utilisées lors des mesures. En fin d'expériences, les fibres sont égouttées puis placées dans un papier d'aluminium permettant leur séchage pendant 1 semaine à température ambiante. Cependant, certaines mesures peuvent être exprimées par rapport aux mg de protéines présents dans l'échantillon testé. Afin d'avoir la relation entre le poids sec et le poids frais des fibres perméabilisées, ainsi que la relation entre le poids frais et la quantité de protéine présente dans les fibres perméabilisées, deux gammes sont réalisées pour chacun des différents tissus cardiaques.

#### 4.2.5.1 Relation du poids sec en fonction du poids frais de fibres

Les fibres sont extraites (voir section 4.2.1) et isolées à différents poids, correspondant au poids frais. Elles sont ensuite égouttées puis enfermées dans un papier d'aluminium durant une semaine à température ambiante. Une fois séchées, les fibres sont pesées à nouveau et le poids sec mesuré (Figure 29).

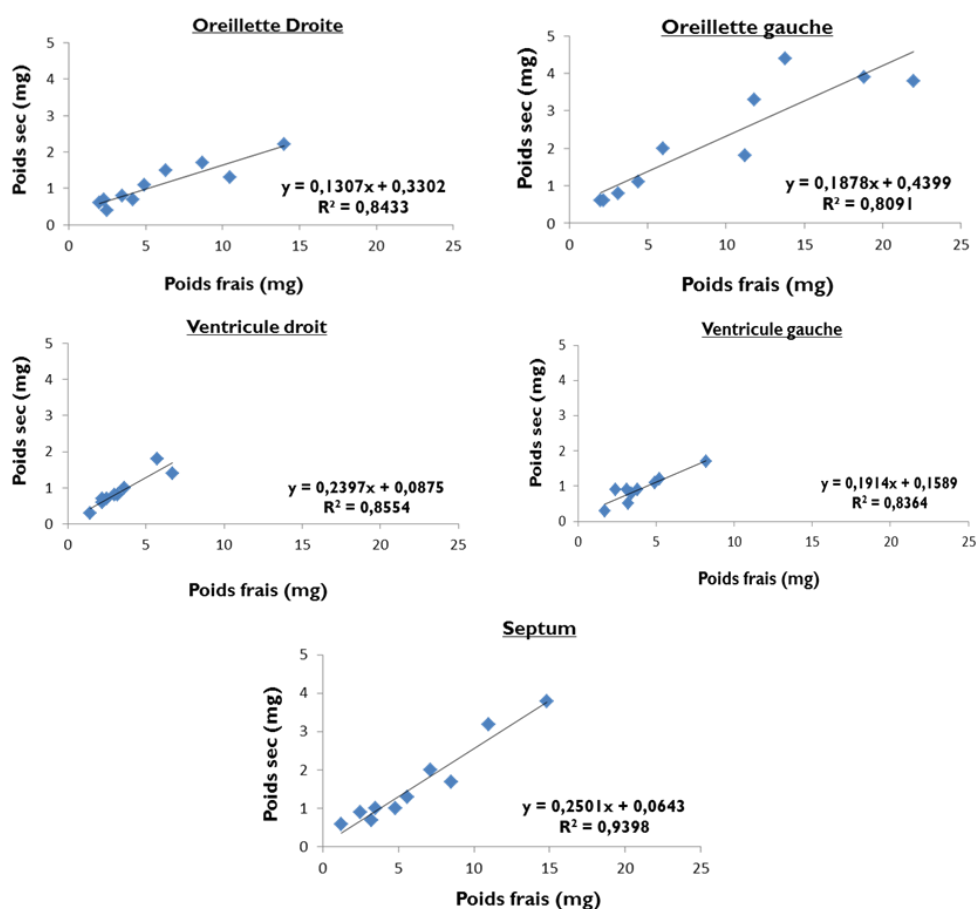


Figure 29 : Relation du poids sec en fonction du poids frais des fibres perméabilisées des différents tissus cardiaques

#### 4.2.5.2 Relation du poids frais en fonction de la quantité de protéines

Les fibres sont extraites (voir section 4.2.1) et isolées à différents poids frais. Elles sont ensuite égouttées puis congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les fibres congelées sont ensuite pulvérisées dans un mortier sous azote liquide. La poudre de tissu est reprise à 200 mg/mL dans du tampon de lyse (LBF, voir composition dans la section 4.3.1). Ensuite, le protocole de dosage des protéines décrit en section 4.3.2 est appliqué (Figure 30).

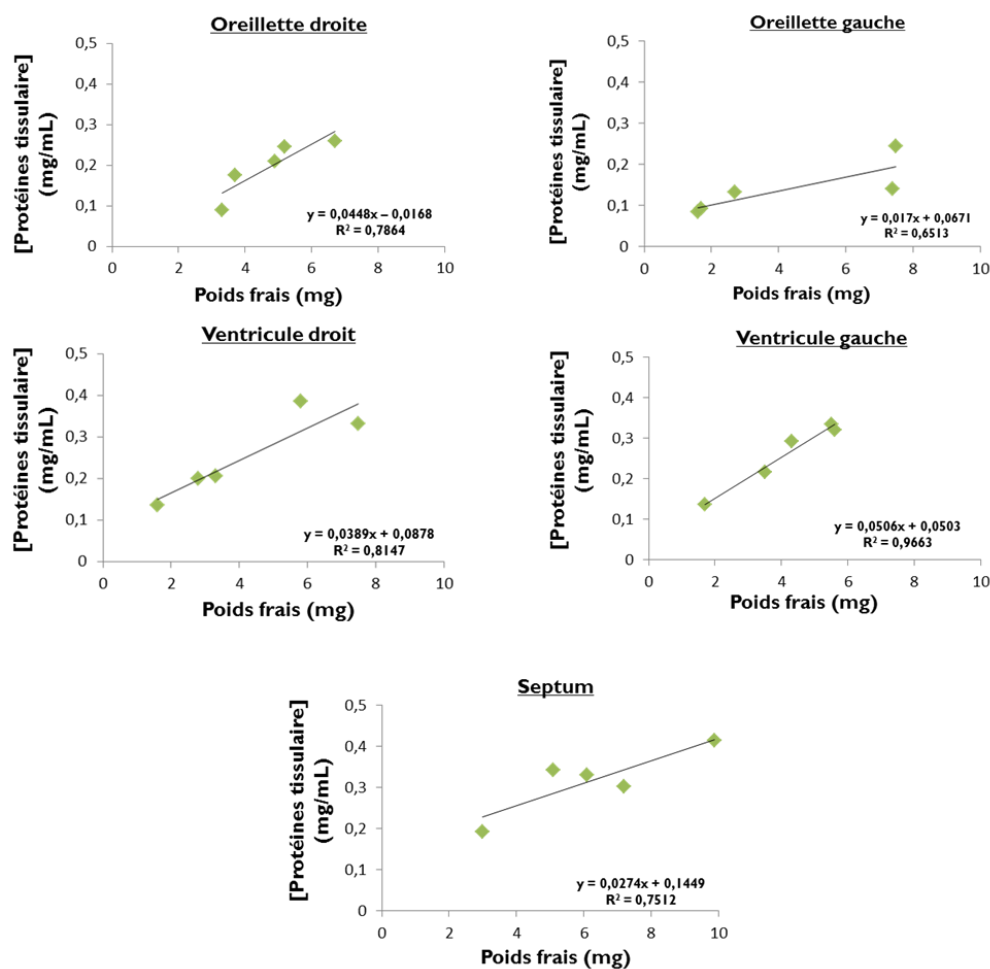


Figure 30 : Relation de la concentration protéique en fonction du poids frais des fibres perméabilisées des différents tissus cardiaques

### 4.3 Quantification et qualification protéique

#### 4.3.1 Extraction protéique

Des cœurs de rats sont récupérés et les parties cardiaques d'intérêt sont extraites (voir section 4.2.1). Ici, les tissus sont directement plongés dans l'azote liquide après isolation. L'extraction protéique s'effectue en deux étapes : une extraction mécanique suivie d'une extraction chimique. La première étape consiste en un broyage mécanique à l'aide d'un mortier et d'un pilon, maintenus à -196°C. Une fois la poudre de tissu obtenue, elle est suspendue à une concentration de 40 mg/mL dans un tampon de lyse (tampon LBF) contenant (en mmol/L) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 ; EDTA 1 ; DTT 0,05 ; Triton-100X 0,5% et supplémentée par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma, Cocktail N°3 dilution au 100<sup>ème</sup>) ; pH 7,2 à température ambiante (KOH). Après une incubation de 5 minutes sur glace, le tissu resuspendu est centrifugé 10 minutes à 700g. Le surnageant est récupéré et conservé à -80°C avant utilisation.

#### 4.3.2 Dosage des protéines par la méthode Bradford

Les protéines extraites (voir section 4.3.1) sont systématiquement dosées par colorimétrie à l'aide de la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Le principe de cette méthode repose sur la particularité du bleu de Coomassie à changer de couleur (absorbance à 595 nm) lors de sa liaison à certains acides aminés basiques (arginine, histidine ou lysine) et les résidus hydrophobes d'autres acides aminés. La lecture de cette absorbance est faite à 570 nm (lecteur de microplaques multitechniques Chameleon, HIDEX). Une gamme étalon est faite avec une solution stock d'albumine de sérum bovin (BSA) diluée en concentration connue dans du tampon LBF (Figure 31). Chaque échantillon est dilué au 40<sup>ème</sup> avant d'être déposé sur plaque multipuit. Une incubation de 10 minutes à température ambiante est réalisée avant lecture. Les mesures sont effectuées en triplicate. Après avoir moyenné les trois valeurs obtenues, la concentration protéique est déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\text{Concentration protéique} = \frac{DO * F^{\text{dilution}}}{a}$$

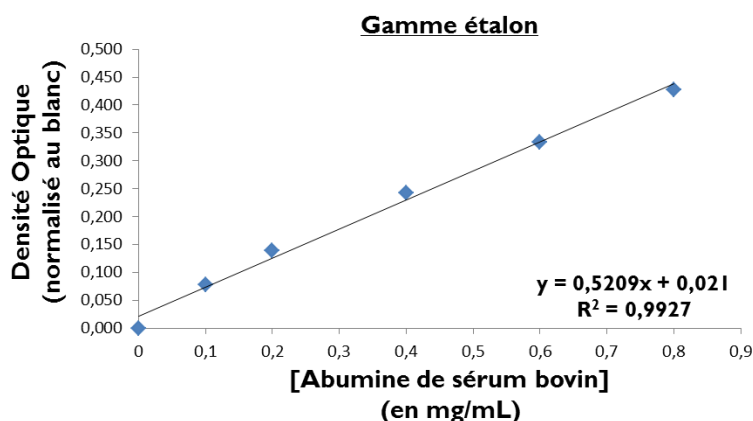
**Équation 4 : Concentration protéique**

Avec,

**DO** : densité optique à 570 nm ;

**F<sup>dilution</sup>** : facteur de dilution de l'échantillon ;

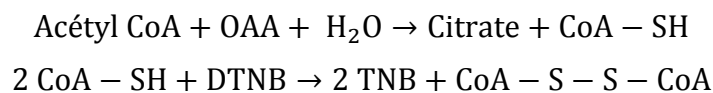
**a** : coefficient directeur de la courbe étalon.



**Figure 31 : Gamme étalon pour le dosage protéique par la méthode colorimétrique Bradford.**

### 4.3.3 Mesure de l'activité enzymatique de la Citrate synthase

La citrate synthase est localisée dans la matrice mitochondriale. Son activité spécifique est utilisée comme indicateur de la masse mitochondriale dans les tissus étudiés. Cette enzyme mitochondriale appartient au cycle de Krebs et catalyse la transformation de l'oxaloacétate (OAA), l'acétyl-CoA et d'une molécule d'eau en CoA réduit et citrate.



**Équation 5 : Réactions enzymatique de la citrate synthase et du DTNB**

Le principe de la mesure de son activité consiste à faire réagir un des produits de sa réaction enzymatique, le CoA-SH avec de l'acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou DTNB. Le DTNB clive les ponts disulfures du CoA-SH, aboutissant à la formation de trinitrobenzène (TNB), dont la couleur jaune absorbe à 412 nm (Équation 5). Le tampon de mesure est composé de (en mmol/L) Tris 50 (mis à pH 7,4 avec du HCl) ; DTNB 0,15 et Triton X-100 0,3 %. Les échantillons (1mg/mL) sont dilués au 20<sup>ème</sup> dans le tampon de mesure en présence de 0,5 mmol/L d'acétyl-CoA, suivi d'une incubation de 2 minutes à température ambiante et protégé de la lumière. Pour démarrer la cinétique, 0,5 mmol/L d'OAA sont ajoutés. Une cinétique est effectuée par mesure de l'absorbance à 405 nm (Lecteur de microplaques multitechniques Chameleon, HIDEX) durant 2,5 minutes à des intervalles de lecture de 5 secondes. Ces mesures sont effectuées en triplicate.

Pour déterminer l'activité spécifique de la citrate synthase de l'échantillon étudié, quatre volumes d'homogénats (5 ; 7,5 ; 10 et 15 µl) sont testés. Une régression linéaire des quatre valeurs d'activité

permet de déterminer l'activité de la citrate synthase, exprimée en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéine, de l'échantillon testé selon l'équation :

$$AS^{CS} = \frac{\Delta DO}{\epsilon^{TNB} \times \text{mg de protéine}}$$

**Équation 6 : Activité spécifique de la citrate synthase**

Avec,

**AS<sup>CS</sup>** : activité spécifique de la citrate synthase en  $\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéine ;

**$\Delta DO$**  : variation de densité optique à 412 nm, ce qui correspond au coefficient directeur de la cinétique, en  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  ;

**$\epsilon^{TNB}$**  : coefficient d'extinction molaire du TNB, qui est de  $13,6 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  ;

**mg de protéine** : quantité de protéine présente dans l'échantillon testé en  $\text{mg}/\text{mL}$ .

Pour la citrate synthase, une unité (U) d'activité correspond à la réduction d'une micromole de DTNB par minute. Des gammes de mg de protéine tissulaire en fonction du poids sec de fibres et de poids secs en fonction du poids frais ont été réalisées (voir Sections 4.2.4 et 4.2.5). Ainsi l'activité obtenue a été multipliée par ce coefficient afin de la convertir en  $\text{mU}/\text{mg}$  poids sec.

#### **4.3.4 Etude protéomique**

L'étude protéomique sur les différents tissus a été prise en charge par la Plateforme Génomique Fonctionnelle de Bordeaux (PGFB) dirigée par le Pr. Marc Bonneux. Les échantillons ont été réceptionnés et analysés par le Dr. Stéphane Claverol. Les extraits protéiques sont préparés comme indiqué dans la section 4.3.1 à une concentration d'1  $\text{mg}/\text{mL}$  puis analysés en LC-MS/MS. Les peptides sont séparés par chromatographie en phase liquide (LC), puis les séquences des peptides sont déterminées par deux analyseurs placés en séries (MS/MS). Les séquences peptidiques identifiées sont comparées à une base de données (UniProt) permettant de définir la liste des protéines qualitativement présentes dans les échantillons. Une analyse semi-quantitative comparative est effectuée par la PGFB, permettant de chiffrer statistiquement les différences entre les protéines recensées dans un compartiment cardiaque (ventricule droit, septum et oreillettes droite et gauche) et le ventricule gauche. Chaque protéine trouvée statistiquement différente est alors classée suivant ces grandes fonctions biologiques.



#### 4.4 Analyses statistiques

Les résultats issus de nos différents protocoles expérimentaux sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  SEM. Le traitement statistique a été réalisé à partir d'un logiciel spécifique (Prism 6, GraphPad Software, Inc). Suivant les objectifs de l'étude et le type d'échantillons testés, nous avons réalisé différents tests de comparaison. Le test de Student (t-test) a été utilisé afin de tester statistiquement l'hypothèse d'égalité de deux variables aléatoires suivant une loi normale mais de variance inconnue. L'utilisation de ce test nous a permis de comparer soit deux groupes indépendants (groupe de cœurs Blebb *versus* groupe de cœurs Ap5a par exemple), soit un groupe à mesures répétées (un groupe de cœurs observé durant les étapes successives du protocole de stimulation électrique).

Des tests d'analyse de variance (Anova simple et à mesures répétées) ont également été réalisés notamment lors de l'étude protéomique, afin de comparer le ventricule gauche aux autres compartiments cardiaques (VD, OG, OD, Septum), mais également afin d'obtenir une analyse semi-quantitative des protéines d'intérêt entre compartiments. Lorsque cela a été nécessaire, le test « pos hoc » de Fisher a pu être utilisé.

Le seuil de significativité dans toutes nos études a été défini à  $p < 0,05$ .



# RÉSULTATS

## 5 RESULTATS

### 5.1 Conséquences fonctionnelles du découplage bioénergétique de l'appareil contractile et la mitochondrie

L'objectif principal de ce travail a été d'explorer les interactions fonctionnelles entre le compartiment mitochondrial et les modules agissant dans la contraction cardiaque dans chacun des compartiments cardiaques (ventricules, oreillettes et septum). Le muscle cardiaque doit en effet s'adapter en permanence à des modulations de son activité dans des conditions physiologiques, extra-physiologiques, voire lors de pathologies du rythme, et chacun des compartiments peut révéler une réponse spécifique face à de telles modulations. La première partie des résultats est axée sur la compréhension des mécanismes de la régulation de la fonction mitochondriale dans un système intégré : le cœur battant. Pour cela, le modèle de cœur isolé et perfusé selon la méthode Langendorff a été utilisé pour étudier la réponse à la perturbation de la signalisation énergétique. Trois groupes de cœurs ont été étudiés : un groupe contrôle (Contrôle, n = 13), un groupe Blebbistatine (Blebb, n = 12) et un groupe Ap5a (Ap5a, n = 12). Dans cette première partie, la stratégie pharmacologique adoptée visait à évaluer l'impact d'une inhibition partielle des myosines ATPases (par la blebbistatine) et de l'inhibition du phosphotransfert AK-dépendant (par l'ap5a) sur la fonction contractile, la consommation d'oxygène et l'ECG de surface. La blebbistatine et l'ap5a sont ajoutées au milieu de perfusion, suite à une période de stabilisation (situation de référence), afin d'obtenir les réponses qualitatives et quantitatives de chacun des modules impliqués dans l'énergétique cellulaire (voir partie Matériels et Méthodes, section 4.1).

#### 5.1.1 Conséquences hémodynamiques du découplage bioénergétique

L'objectif de ces expérimentations était d'induire une inhibition partielle d'un module consommateur d'ATP (c'est-à-dire les myofibrilles) ou d'un module régénérateur d'ATP (c'est-à-dire l'adénylate kinase) afin de quantifier l'impact de l'inhibition de ces modules sur la susceptibilité du myocarde à développer une arythmie ventriculaire et/ou auriculaire induite par une stimulation électrique (voir Section 4.1.6).

Le Tableau 2 regroupe l'ensemble des données recueillies au cours de ces expérimentations sur cœurs battants perfusés en mode Langendorff. Les groupes étaient homogènes au niveau de leur masse, comme au niveau des fréquences cardiaques (FC) et des pressions développées par le ventricule gauche (PDVG) lors de la situation de référence (perfusion sans inhibiteur).

Le produit pression fréquence (PPF), utilisé comme indice du travail cardiaque sur cœurs perfusés en mode Langendorff (Dos Santos et al., 2000), ainsi que la consommation d'oxygène myocardique (MVO<sub>2</sub>, Mixed Veinous Oxygene), étaient également similaires entre les différents groupes.

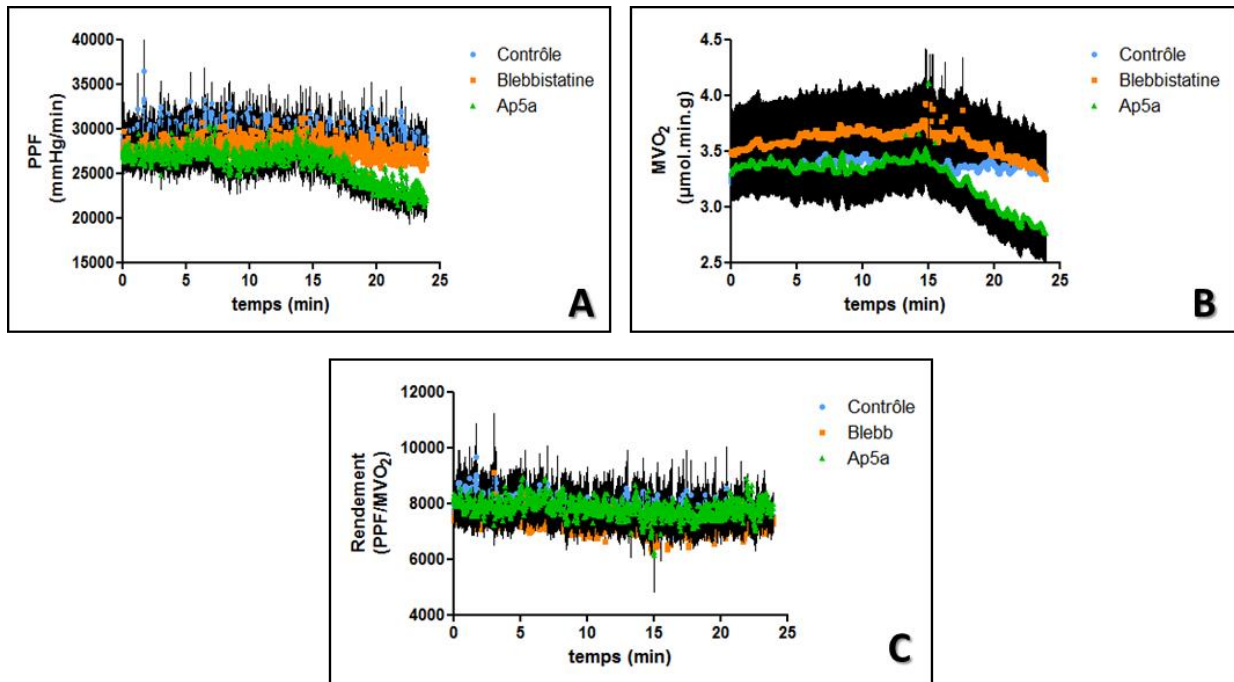
	Situation de référence (t = 15min)			Pharmacologie (t = 25 min)		
	Contrôle	Blebb	Ap5a	Contrôle	Blebb	Ap5a
n	13	12	12	13	12	12
Poids des cœurs (g)	1,06 ± 0,09	1,06 ± 0,08	1,22 ± 0,12			
FC (bpm)	278 ± 9	287 ± 11	292 ± 16	283 ± 9	276 ± 10	275 ± 8
PDVG (mmHg)	67 ± 13	67 ± 13	77 ± 15	64 ± 13	64 ± 13	70 ± 16
P. Fin Dias (mmHg)	1,33 ± 1,43	1,42 ± 0,98	1,41 ± 0,99	0,09 ± 1,80	-1,01 ± 1,10	1,09 ± 1,31
PPF (mmHg/min)	24994 ± 2899	24984 ± 2430	25191 ± 2572	24540 ± 2824	22728 ± 2229	21326 ± 2156
MVO <sub>2</sub> (μmol/min/g poids frais)	3,37 ± 0,36	3,69 ± 0,37	3,42 ± 0,33	3,41 ± 0,36	3,27 ± 0,32	2,78 ± 0,26
Rendement (PPF/MVO <sub>2</sub> )	7832 ± 923	7113 ± 744	7647 ± 812	7488 ± 744	7195 ± 718	8017 ± 842
P. A. (mmHg)	58 ± 3	56 ± 1	56 ± 2	62 ± 5	69 ± 5 *	46 ± 1 ***

**Tableau 2 : Paramètres hémodynamiques des cœurs perfusés en mode Langendorff.**

Les paramètres hémodynamiques ont été analysés dans les trois groupes (**Contrôle**, **Blebb** et **Ap5a**) avant (**Situation de référence** à gauche) et après addition de 0,1 μM de blebbistatine (Blebb), 0,1 μM d'ap5a (Ap5a) ou sans drogue (**Contrôle**) (**Pharmacologie** à droite). Chaque valeur est moyennée sur les deux dernières minutes de perfusion (fréquence d'échantillonnage 1 Hz). Le nombre de cœurs (n), le poids des cœurs, la fréquence cardiaque (FC), la pression développée par le ventricule gauche (PDVG), la pression en fin de diastole (**P. fin Dias**), un index du travail cardiaque (PPF), la consommation d'oxygène du myocarde (MVO<sub>2</sub>), le rendement cardiaque (**Rendement**), ainsi que la pression aortique (**P. A.**) sont présentés ici. \* p<0,05 et \*\*\* p<0,001 en comparaison au groupe Contrôle.

Les fonctions contractiles et mitochondriales ont été analysées après une perfusion de 0,1 μmol/L de blebbistatine (inhibition spécifique des myosines ATPases) ou de 0,1 μmol/L d'ap5a (inhibition de l'adénylate kinase) (Tableau 2, Pharmacologie).

Les fréquences cardiaques enregistrées après l'inhibition par la blebbistatine ou par l'ap5a ne sont pas différentes comparées aux valeurs recueillies lors de la situation de référence. Une diminution du PPF est observée dans les deux groupes pharmacologiques, en comparaison du groupe Contrôle (Tableau 2) accompagnée dans chaque groupe, d'une tendance à la baisse de la PDVG s'accompagnant d'une très légère diminution non significative de la pression en fin de diastole (P. fin dias.) (Tableau 2).

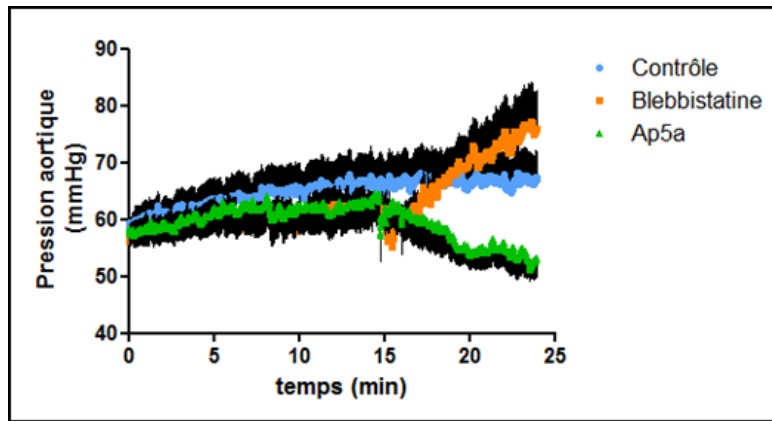


**Figure 32 : Evolution du travail, de la consommation en oxygène et du rendement cardiaque**

L'indice du travail cardiaque (A) et la consommation d'oxygène des myocards (B), ainsi que le rendement cardiaque (C) sont suivis durant les 15 minutes de perfusion en situation de référence et les 10 minutes de perfusion pharmacologique (Contrôle, Blebb et Ap5a). Chaque point correspond à la moyenne des valeurs des différents groupes et les barres d'erreurs sont la SEM.

Les variations relatives des paramètres de contraction cardiaque (Tableau 2 et Figure 32A) ont été suivies au cours du temps. En condition basale, dans le groupe de cœurs Contrôle, une perfusion de 10 minutes n'induit pas de variation du PPF (2 %). L'inhibition des myosines ATPases par la Blebb induit une diminution de 9 % du PPF et l'inhibition du phosphotransfert AK-dépendant par l'ap5a induit une diminution du PPF de 15 % en moyenne sur les cœurs testés. Au niveau de la consommation d'oxygène, des diminutions significatives sont observées dans les deux groupes avec inhibiteurs : de 13 % dans le groupe Blebb et de 19 % dans le groupe Ap5a. (Tableau 2 et Figure 32B).

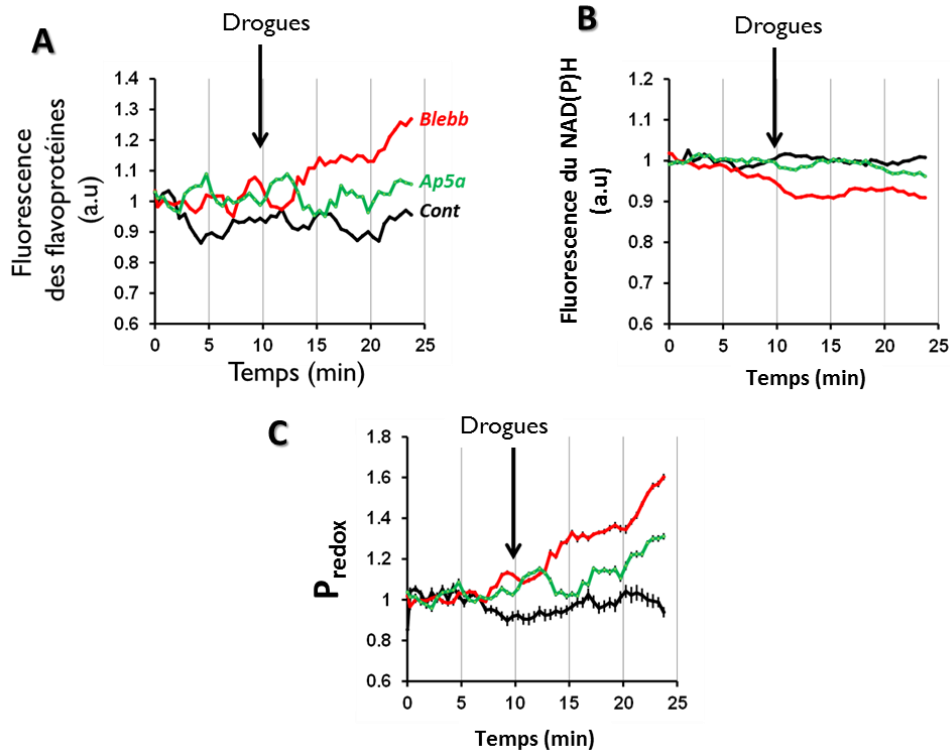
Les effets des drogues sur le PPF et la MVO<sub>2</sub> n'induisent pas de modifications significatives du rendement cardiaque au cours du temps (Tableau 2 et Figure 32C). Ceci est en accord avec la démonstration de l'existence d'une relation linéaire entre la performance cardiaque et la consommation d'oxygène du myocarde. Néanmoins, un paramètre hémodynamique varie fortement au cours du temps, il s'agit de la pression aortique (Tableau 2 et Figure 33). Au cours des 25 minutes de perfusion, la pression aortique a augmenté de 7 % dans le groupe Contrôle. La blebbistatine a induit une augmentation significative plus importante de la pression aortique (+ 23 %,  $p < 0,01$  versus Contrôle), alors qu'au contraire, une diminution significative de 18 % est enregistrée dans le groupe Ap5a ( $p < 0,001$  versus Contrôle) après 10 minutes de perfusion avec l'inhibiteur.



**Figure 33 : Evolution de la pression aortique**

La pression aortique est suivie durant les 15 minutes de perfusion en situation de référence et les 10 minutes de perfusion pharmacologique (**Contrôle, Blebb et Ap5a**). Chaque point correspond à la moyenne des valeurs des différents groupes et les barres d'erreurs sont la SEM.

L'évaluation du potentiel Redox est effectuée par le suivi du rapport de la fluorescence des flavoprotéines sur la fluorescence du NAD(P)H (Figure 34). Une perfusion de 25 minutes ne change pas le potentiel redox des myocardes du groupe Contrôle. Cependant, après 15 minutes de perfusion avec les drogues, une augmentation de 60 % du rapport est observée dans le groupe Blebb et de 30 % dans le groupe Ap5a (Figure 34C). Les modifications de ce rapport indiquent que les changements de fluorescence du NAD(P)H et des flavoprotéines ne sont pas symétriques. Ceci est surprenant car nous avons démontré avec le même système qu'une relation linéaire existait entre ces deux chromophores intrinsèques dans le myocarde. De plus, sur la base des effets de la blebbistatine et de l'ap5a sur la  $MVO_2$ , nous pensons observer une réduction du pool total de NAD(P)H et non son oxydation. Ceci indique que le compartiment mitochondrial comporte un degré de flexibilité différent lorsqu'il est étudié *in situ* et *in vitro*. Ce type d'étude *in situ* semble indiquer qu'une diminution de la consommation d'oxygène myocardique ne reflète pas nécessairement une réduction de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale.



**Figure 34 : Evolution du potentiel Redox cardiaque**

Le potentiel redox cardiaque a été évalué par l'enregistrement de l'autofluorescence de deux chromophores intrinsèques, les flavoprotéines et le pool de NADH et de NADPH. L'autofluorescence des flavoprotéines (A) et du NAD(P)H (B), normalisée par leurs réflectances respectives à l'excitation, est suivie simultanément durant les 10 minutes de perfusion en situation de référence et les 15 minutes de perfusion pharmacologique (Contrôle, Blebb et Ap5a). Le potentiel redox a été calculé (Section 2. A.5.) (C) pour les trois groupes. Chaque point correspond à la moyenne des valeurs des différents groupes et les barres d'erreurs sont la SEM.

**En résumé**, nous avons ainsi pu constater dans cette première partie de notre étude sur cœurs battants *ex vivo* que, dans ces conditions expérimentales et pour des concentrations identiques, l'ap5a, inhibiteur de l'AK, induit des modifications physiologiques plus marquées que la blebbistatine, inhibiteur des myosines ATPases, sans toutefois observer de changement du rendement cardiaque pour l'une ou l'autre de ces drogues (Figure 32C).

La blebbistatine est responsable d'une plus forte augmentation du potentiel redox que l'ap5a. Ce résultat est important, puisqu'il pourrait, combiné à celui observé au niveau de la consommation d'oxygène myocardique, orienter notre réflexion vers un changement de régulation de l'activité mitochondriale dans les cas d'inhibition partielle du module de demande énergétique. Enfin, une modification du tonus vasculaire est apparue, avec un effet vasoconstricteur de la blebbistatine sur le réseau coronaire, alors que l'ap5a a un effet vasodilatateur.

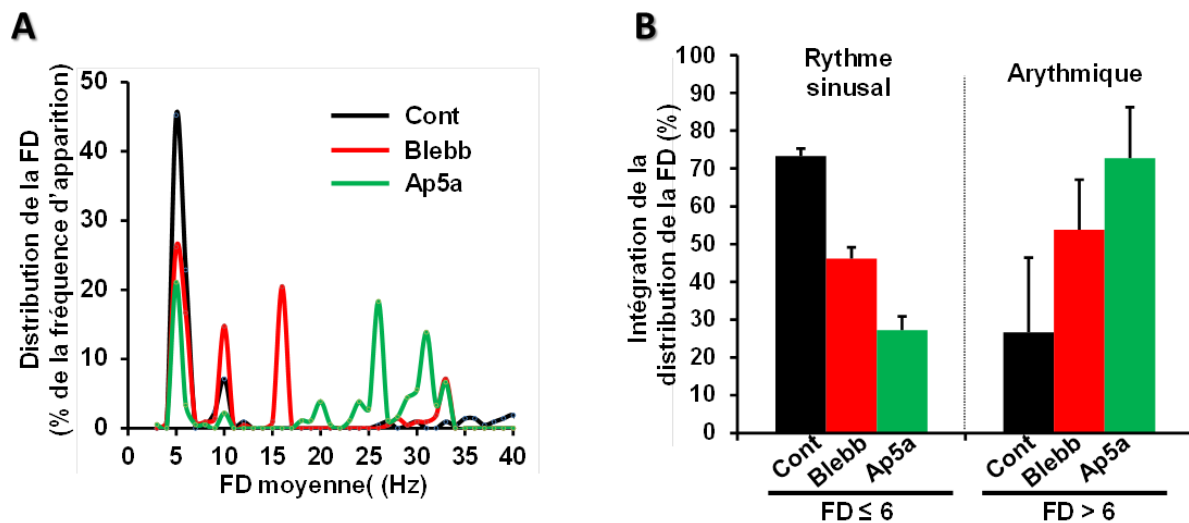


### 5.1.2 Evaluation de la susceptibilité à l'arythmie

La seconde partie du travail effectué sur les cœurs perfusés en mode Langendorff a été de quantifier leurs susceptibilités aux arythmies ventriculaires en présence ou en absence des deux inhibiteurs.

#### 5.1.2.1 Susceptibilité des cœurs perfusés à développer des arythmies

La susceptibilité des myocards à développer des arythmies est évaluée par l'étude de la réponse myocardique à des stimulations électriques de durées croissantes. Pour cela, les ECG de surface enregistrés pendant les 120 secondes qui suivent la fin de la stimulation électrique, subissent une transformée de Fourier rapide (TFR) (voir Section 4.1.7). Les spectres obtenus par la TFR permettent d'avoir la fréquence dominante moyenne et l'indice de régularité moyen pour chaque épisode arythmique. La distribution des fréquences dominantes (FD) des ECG de surface est alors analysée (Figure 35A) afin de définir la proportion des myocards développant un trouble du rythme ( $FD > 6$ ) et ceux retrouvant un rythme sinusal ( $FD \leq 6$ ) suite à la stimulation électrique (Figure 35B).



**Figure 35 : Effets de 5 secondes de stimulation électrique sur les fréquences dominantes des ECG de surface.**

Les ECG de surface enregistrés sur les cœurs isolés perfusés des trois groupes (**Contrôle**, **Blebb** et **Ap5a**) durant les deux minutes qui suivent une stimulation électrique de 5 secondes, ont été analysés afin d'évaluer la susceptibilité des myocards de chacun des groupes, aux arythmies ventriculaires. La figure A est une représentation graphique de la fréquence d'apparition d'une fréquence dominante comprise entre 0 et 40 Hz (intervalle 1 Hz) pour chacun des épisodes arythmiques enregistrés dans chacun des groupes. Les fréquences dominantes moyennes sont classées en deux groupes :  $FD \leq 6$  Hz (représentant le myocarde en rythme sinusal) et  $FD > 6$  Hz (représentant les myocards arythmiques). Ainsi la sommation de la fréquence d'apparition de tous les événements ayant une fréquence dominante moyenne inférieure ou égale à 6 est représentée dans un histogramme (B). Les valeurs des histogrammes sont les moyennes des sommations et les barres d'erreurs correspondent à la sommation des erreurs relatives (e.g. delta R / R) calculées pour chacune des sommations.

Après 5 secondes de stimulation, la répartition des fréquences dominantes est différente en fonction des groupes pharmacologiques (Tableau 3). En effet, dans le groupe Contrôle, 73 % des

myocardes ne développent pas d'arythmies. La blebbistatine diminue significativement ce pourcentage ( $p < 0,001$ ), avec quasiment la moitié des myocardes développant une arythmie à la suite de 5 secondes de stimulation électrique. L'ap5a inverse les pourcentages observés pour le groupe Contrôle, avec 27 % des myocardes conservant un rythme sinusal contre 73 % des cœurs développant une arythmie.

La distribution des fréquences dominantes est différente dans les trois groupes après 15 secondes de stimulation électrique. Cependant les profils des distributions obtenus après 15 secondes de stimulation sont les mêmes que ceux obtenus à 30 secondes de stimulation électrique (Tableau 3). Suite aux stimulations électriques de 15 et 30 secondes, la moitié des myocardes du groupe Contrôle partent en arythmies et l'autre moitié retrouve un rythme sinusal. La tendance anti-arythmique observée dans ce groupe à 5 secondes de stimulation électrique est donc estompée lorsque la durée de la stimulation augmente. Les myocardes du groupe Blebb suivent les mêmes profils que le groupe Contrôle après 15 et 30 secondes de stimulation électrique. Enfin, le groupe Ap5a est le seul groupe où la tendance pro-arythmique reste marquée quelle que soit la durée de stimulation électrique, et de façon significative à 15 secondes de stimulation ( $p < 0,01$ ) par rapport au groupe Contrôle.

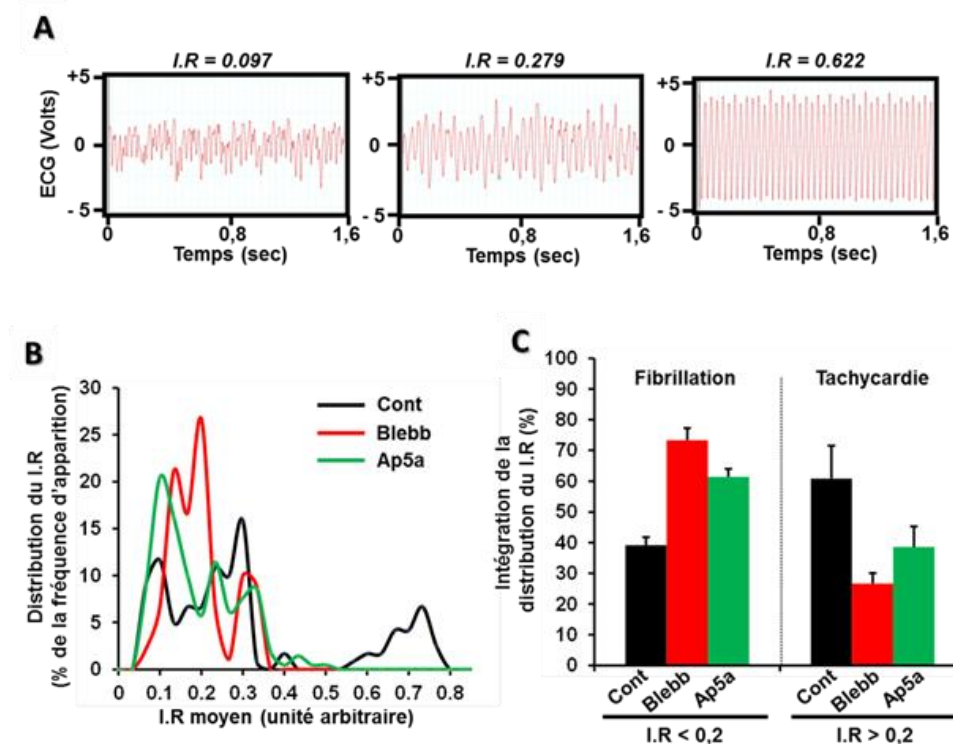
Durée de la stimulation	Contrôle		Blebb		Ap5a	
	% de myocarde avec <b>FD ≤ 6</b>	% de myocarde avec <b>FD &gt; 6</b>	% de myocarde avec <b>FD ≤ 6</b>	% de myocarde avec <b>FD &gt; 6</b>	% de myocarde avec <b>FD ≤ 6</b>	% de myocarde avec <b>FD &gt; 6</b>
5 secondes	73 ± 2	27 ± 20	46 ± 3 ***	54 ± 13	27 ± 4 ***	73 ± 13
15 secondes	45 ± 3	55 ± 23	37 ± 3	63 ± 14	34 ± 1 **	66 ± 14
30 secondes	42 ± 3	58 ± 19	31 ± 4	67 ± 20	34 ± 3	60 ± 11

**Tableau 3 : Effets de la durée de stimulation électrique sur la distribution des fréquences dominantes.**

Les ECG de surface enregistrés sur les cœurs isolés perfusés des trois groupes (**Contrôle, Blebb et Ap5a**) durant les deux minutes qui suivent une stimulation électrique (**de 5, 10 et 15 secondes**), ont été analysés afin d'évaluer la susceptibilité des myocardes de chacun des groupes, aux arythmies ventriculaires. Les fréquences dominantes moyennes sont classées en deux groupes :  $FD \leq 6$  Hz (représentant le myocarde en rythme sinusal) et  $FD > 6$  Hz (représentant les myocardes arythmiques). Ainsi la sommation de la fréquence d'apparition de tous les événements ayant une fréquence dominante moyenne inférieure ou égale à 6 est représentée dans ce tableau. Les valeurs du tableau sont les moyennes des sommations et les barres d'erreurs correspondent à la sommation des erreurs relatives (e.g. delta R / R) calculées pour chacune des sommations. \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$  versus Contrôle

L'indice de régularité (I.R) permet d'évaluer le degré de complexité d'un signal ECG (Figure 36), renseignant sur le type d'arythmies développées. Plus cet indice est proche de 1, plus le signal ECG est organisé; et plus cet indice est proche de 0, plus le signal ECG est désorganisé, révélant une fibrillation (Figure 36A). L'I.R définit donc le type d'arythmie développées par les myocardes après les

stimulations électriques :  $I.R < 0,2$  révèle une fibrillation et  $I.R > 0,2$  révèle une tachycardie (Figure 36B et C). Dans cette étude, l'indice de régularité n'a été calculé que pour les myocards développant de l'arythmie ventriculaire, c'est-à-dire présentant une FD supérieure à 6.



**Figure 36 : Effets de 5 secondes de stimulation électrique sur l'indice de régularité (I.R)**

L'indice de régularité des ECG de surface enregistrés sur les cœurs isolés perfusés des trois groupes (**Contrôle, Blebb et Ap5a**) durant les deux minutes d'arythmies déclenchées par la stimulation électrique de 5 secondes, est présenté dans cette figure. Un exemple de trois types de signaux ECG enregistrés pendant l'arythmie ainsi que les valeurs moyennes de l'indice de régularité (I.R) les caractérisant sont présentés (A). Plus l'I.R est proche de 1, plus l'ECG est organisé; et plus l'I.R est proche de 0, plus l'ECG est désorganisé, révélant une arythmie ventriculaire (A). La figure B représente la distribution du pourcentage de la fréquence d'apparition d'un indice de régularité (I.R) moyen donné pour chacun des événements enregistrés, pour chacun des groupes, suite à une stimulation électrique de 5 secondes. Les I.R sont classées en deux groupes :  $I.R < 0,2$  (représentant les myocards arythmiques en fibrillation ventriculaire) et  $I.R > 0,2$  (représentant les myocards arythmiques en tachycardie ventriculaire). Ainsi, la sommation de la fréquence d'apparition de tous les événements ayant un indice de régularité moyen inférieur ou égale à 0,2 est représentée dans un histogramme (C). La même sommation a été réalisée pour les événements ayant un indice de régularité moyen supérieur à 0,2 (C). Les valeurs des histogrammes et les barres sont les moyennes des sommations et les barres d'erreurs correspondent à la sommation des erreurs relatives (e.g.  $\Delta R / R$ ) calculées pour chacune des sommations.

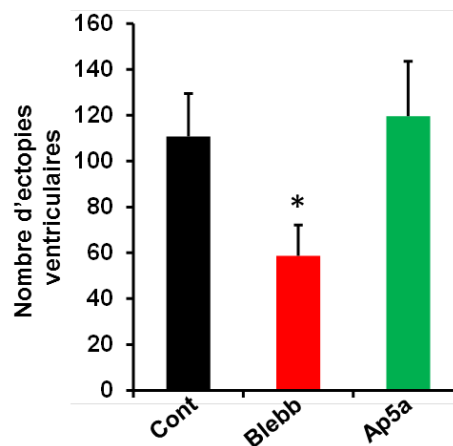
Après 5 secondes de stimulation, les myocards arythmiques du groupe Contrôle développent de la fibrillation, ainsi que de la tachycardie monomorphe et polymorphe, contrairement au groupes Blebb et Ap5a qui développent principalement de la fibrillation ventriculaire (Tableau 4). Les myocards Contrôle, partant en tachycardie après 5 secondes de stimulation, développent préférentiellement des fibrillations après 15 et 30 secondes de stimulation électrique. En présence de blebbistatine, les myocards développant des fibrillations suite à 5 secondes de stimulation, ne présentent plus cette tendance après 15 et 30 secondes de stimulation. Le groupe Ap5a est le seul groupe à conserver sa tendance à développer des fibrillations quelle que soit la durée de la stimulation.

Durée de la stimulation	Contrôle		Blebb		Ap5a	
	% de myocarde avec I.R.<0,2	% de myocarde avec I.R.>0,2	% de myocarde avec I.R.<0,2	% de myocarde avec I.R.>0,2	% de myocarde avec I.R.<0,2	% de myocarde avec I.R.>0,2
5 secondes	39 ± 3	61 ± 11	73 ± 4 ***	27 ± 3 *	61 ± 3 ***	39 ± 7
15 secondes	63 ± 11	37 ± 9	49 ± 3	51 ± 11	76 ± 3	24 ± 10
30 secondes	65 ± 2	35 ± 24	39 ± 3 ***	59 ± 6	58 ± 3	42 ± 6

**Tableau 4 : Effets de la durée de stimulation électrique sur l'indice de régularité (I.R)**

Les signaux ECG de surface enregistrés sur les cœurs isolés perfusés des trois groupes (**Contrôle, Blebb et Ap5a**) durant les deux minutes d'arythmies déclenchées par la stimulation électrique (**de 5, 15 et 30 secondes**), ont été classés en fonction de leur indice de régularité. Les I.R ont été classés en deux groupes: **I.R.<0,2** (représentant les myocards développant de la fibrillation ventriculaire) et **I.R.>0,2** (représentant les myocards développant de la tachycardie ventriculaire monomorphe et polymorphe). Le tableau montre la fréquence d'apparition des I.R exprimés en % pour chaque groupe. Les valeurs du tableau sont les moyennes des sommations et les barres d'erreurs correspondent à la sommation des erreurs relatives (e.g. delta R / R) calculées pour chacune des sommations. \* $p<0,05$  et \*\*\* $p<0,001$  versus Contrôle.

Suite à l'analyse des épisodes arythmiques des ECG de surface enregistrés pendant la période arythmique, la stabilité électrophysiologique des cœurs suite à la défibrillation (c'est-à-dire bolus de KCl) et pendant la phase de stabilisation entre deux séquences de stimulation a été estimée (Figure 37). La stabilité électrophysiologique est définie par le calcul du nombre d'ectopies ventriculaires spontanées développées lors de la période de récupération. De manière intéressante, la blebbistatine réduit significativement ce nombre d'ectopies sur les trois périodes de stabilisation entre les séquences de stimulation électrique ( $p<0,05$ ).



**Figure 37 : Nombre d'ectopies ventriculaires lors des phases de récupération entre deux séquences de stimulation électrique.**

Les ECG de surface sont enregistrés sur les cœurs isolés perfusés des trois groupes (**Contrôle, Blebb et Ap5a**) pendant huit minutes durant la phase de récupération suite aux stimulations électriques (**de 5, 15 et 30 secondes**). Les ectopies ventriculaires sont dénombrées dans les trois groupes. Les valeurs des histogrammes sont les moyennes et les barres d'erreurs sont représentées par la SEM. \* $p<0,05$  versus contrôle.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de préciser les impacts d'inhibitions de la demande énergétique et du phosphotransfert médié par l'AK sur la rythmologie cardiaque. La blebbistatine, bien qu'induisant des arythmies sur un nombre plus important de cœurs suite à une stimulation électrique de 5 secondes, semble permettre une stabilisation de l'activité électrique myocardique lors de stimulations répétées plus longue comparée au groupe Contrôle. De même, le nombre d'ectopies enregistrées durant les phases de récupération cardiaque est sensiblement inférieur en présence de cette drogue amenant l'hypothèse d'un effet protecteur de celle-ci dans le cas de dysfonctionnement répété et/ou prolongé du rythme. Les deux drogues (Blebb et Ap5a), qui ont donc des cibles intracellulaires différentes, induisent des réponses différentes des cœurs pendant les inductions de phase arythmique mais également en rythme sinusal. Cela permet de penser que les rôles respectifs de la demande énergétique et du phosphotransfert AK ne sont pas identiques au niveau du fonctionnement du système énergétique cardiaque, notamment celui du ventricule gauche dans le cas de cœurs perfusés en mode Langendorff. Ces différences de comportements face à l'induction d'arythmies ont été mis en relation avec les paramètres du travail et de la respiration cardiaques avant les épisodes de stimulation afin d'en évaluer leurs effets sur la régulation mitochondriale notamment.

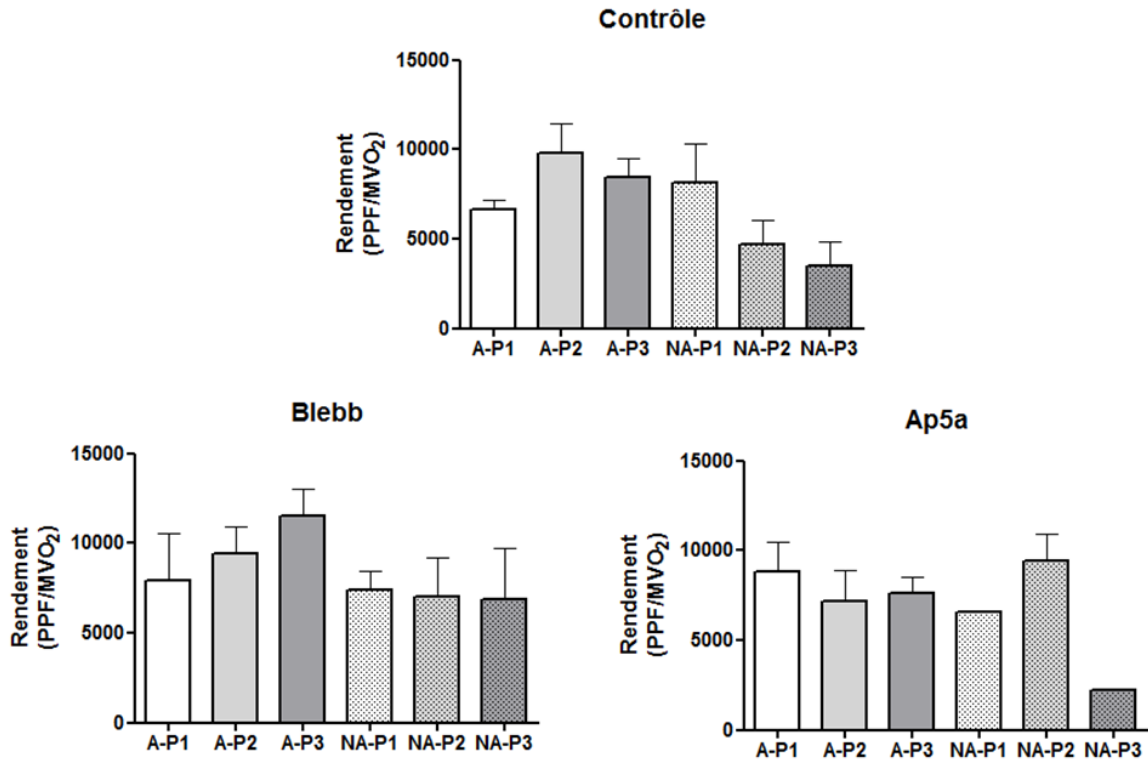
### **5.1.2.2 Effet du rendement cardiaque sur la susceptibilité à l'arythmie**

Les corrélations entre l'évolution du PPF et de la  $MVO_2$ , et le déclenchement des arythmies ont été analysées par l'étude du rendement cardiaque de deux classes de myocardiés (Figure 38) : la classe des cœurs pour lesquels la stimulation électrique aboutit à une arythmie soutenue d'au moins deux minutes (A ou Arythmique) et la classe des cœurs ne développant pas d'arythmies suite à la stimulation électrique (NA ou Non Arythmique).

Dans le groupe Contrôle, le rendement cardiaque avant la première stimulation (pré-P1) révèle une disparité dans les deux classes, avec un rendement plus faible pour la classe A. Puis, les deux classes se distinguent avec un rendement en pré-P2 et pré-P3 aux alentours de 9000 pour la classe A et chutant en dessous de 5000 pour la classe NA (Figure 38). Ceci semble indiquer l'existence, au moins dans le groupe Contrôle, d'un lien entre la performance cardiaque et la susceptibilité du myocarde à développer un trouble du rythme suite à une augmentation brutale de la demande énergétique.

Dans le groupe Blebb, le rendement des deux classes évolue à l'inverse des classes Contrôle. En effet, dans la classe NA, le rendement ne change pas avant chacune des stimulations, restant à une valeur moyenne de 7000. A l'inverse, le rendement des cœurs de la classe A augmente de 20 % avant chaque stimulation (Figure 38).

Enfin, dans le groupe Ap5a, le rendement ne varie pas de manière significative, se caractérisant par une valeur de 8000 quelle que soit la période étudiée (pré-P1, pré-P2 et pré-P3). Néanmoins, le nombre de myocards de la classe NA étant très faible, aucune conclusion ne peut être tirée.

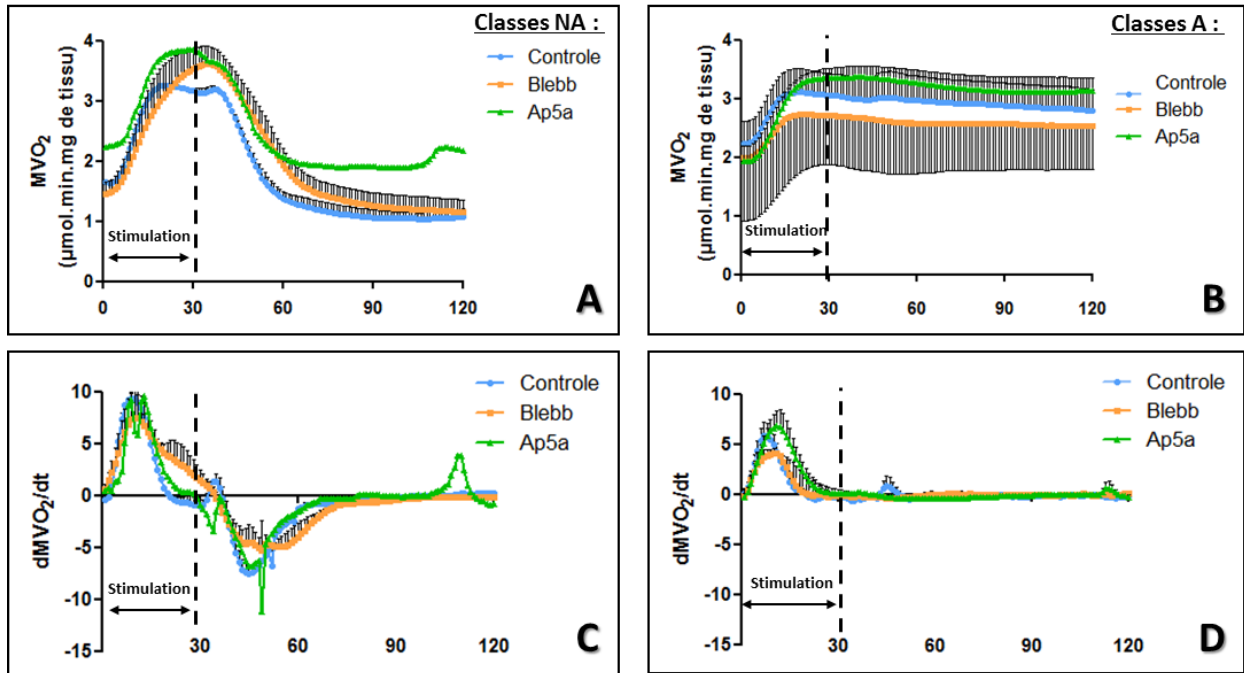


**Figure 38 : Rendement cardiaque avant les différentes stimulations électriques**

Le rendement des myocards est analysé avant chaque stimulation (P1, P2 et P3), sur les classes de myocards arythmiques (A) et non arythmiques (NA), des trois groupes (Contrôle n=7, Blebb n=6 et Ap5a n=6). Les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM.

### 5.1.3 Respiration durant la fibrillation

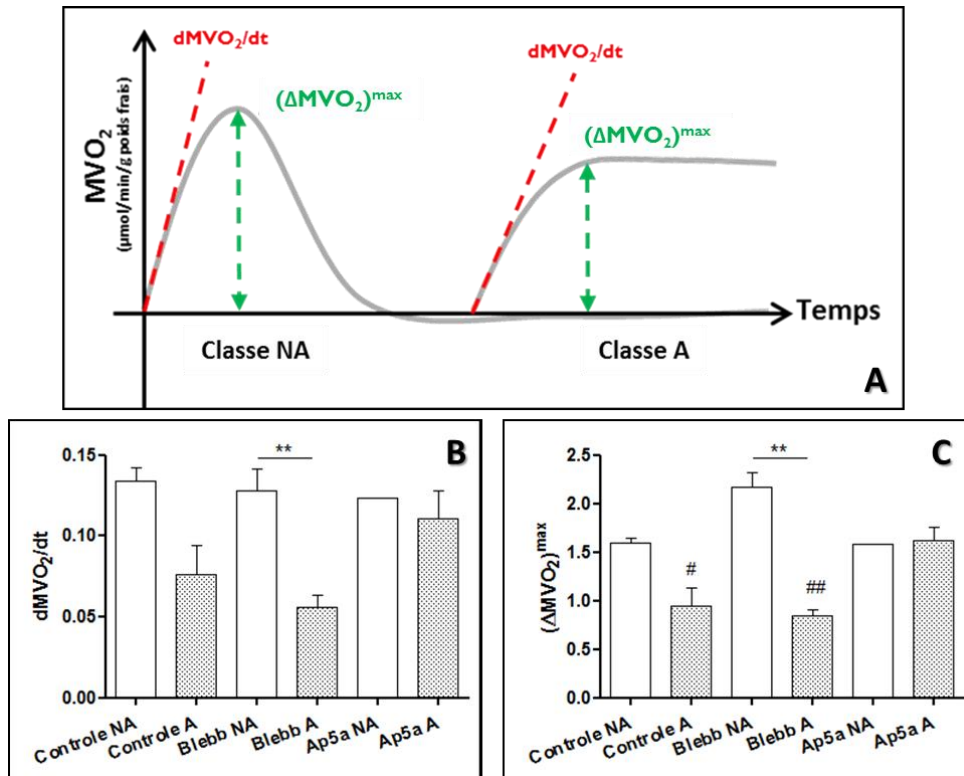
La gestion de la respiration myocardique semble être un élément important dans la susceptibilité des myocards à développer de l'arythmie après une stimulation électrique. L'évolution de la respiration myocardique suite à une stimulation électrique pourrait être un paramètre reflétant la capacité d'adaptation myocardique et probablement sa résistance au développement des troubles du rythme. Pour cela, la respiration a été examinée durant la stimulation électrique puis pendant les deux minutes suivant cette stimulation. Les cœurs sont classés sur les mêmes schémas que précédemment, en fonction de leur appartenance à la classe A et NA (Figure 39A et B).



**Figure 39 : Evolution de la respiration pendant et après une stimulation électrique de 30 secondes.**

La  $MVO_2$  des myocards (A et B) et la dérivée première de la  $MVO_2$  (C et D) sont analysées pendant et après une stimulation de 30 secondes (**Stimulation**), pour chaque groupe (**Contrôle**, **Blebb** et **Ap5a**) et chaque classe : classe des cœurs résistant à l'arythmie (A et C) et développant de l'arythmie (B et D). Chaque point correspond à la moyenne des valeurs des différents groupes et les barres d'erreurs sont représentées par la SEM.

Les Figure 39C et D montrent deux profils distincts de l'évolution de la  $MVO_2$ , qui semble être une fonction du développement ou non d'une arythmie ventriculaire. Pour les classes A, la dérivée première de la consommation d'oxygène myocardique est composée de trois phases alors que pour les classes NA une réponse biphasique est observée. Les myocards des classes NA augmentent brutalement leur consommation d'oxygène suite à la stimulation électrique puis présentent une diminution progressive de celle-ci lorsque la stimulation électrique s'arrête pour atteindre une consommation d'oxygène équivalente à celle enregistrée avant la stimulation électrique. Les résultats sont différents pour les myocards de la classe A. Ces cœurs présentent également un pic d'augmentation de la consommation d'oxygène durant la phase de stimulation, mais stabilisent leurs consommations d'oxygène rapidement après l'arrêt de la stimulation, celle-ci étant de ce fait supérieure à la consommation d'oxygène enregistrée avant la période de stimulation (Figure 39D).



**Figure 40 : Paramètres de la variation de la MVO<sub>2</sub> pendant et après une stimulation électrique de 30 secondes.**

Deux paramètres sont extraits de la variation de la MVO<sub>2</sub> (A): la vitesse d'augmentation de la respiration durant la stimulation ou  $dMVO_2/dt$  (B) et la respiration maximale atteinte ou  $(\Delta MVO_2)^{max}$  (C). Chaque valeur correspond à la moyenne des valeurs des différents groupes (Contrôle, Blebb et Ap5a), pour les deux différentes classes (NA ou Non Arythmique et A ou Arythmique) de myocards, et les barres d'erreurs sont représentées par la SEM.  $**p<0,01$  classe A versus classe NA et  $\#p<0,05$   $##p<0,01$  versus Ap5a-A.

Deux paramètres ont été calculés afin de caractériser les courbes de MVO<sub>2</sub> obtenues dans chacun des groupes et classes de myocards. Ces paramètres sont la vitesse d'augmentation de la consommation d'oxygène pendant la stimulation électrique ( $dMVO_2/dt$ ; Figure 40A et B) et la consommation maximale d'oxygène induite par le protocole de stimulation ( $(\Delta MVO_2)^{max}$ ; Figure 40A et C). Dans le groupe Contrôle, la classe NA montre une vitesse d'élévation de la respiration et une valeur maximale de respiration, supérieures à la classe A. Ces profils sont significatifs dans le groupe Blebb ( $p<0,01$ ). Dans le groupe Ap5a, la classe NA n'étant constituée que d'un seul myocarde, aucune conclusion ne peut être formulée en ce qui concerne le comportement de la consommation d'oxygène myocardique. En revanche, la classe A de ce groupe se caractérise par une vitesse de stimulation de la respiration ainsi que par une respiration maximale (Contrôle  $p<0,05$  et Blebb  $p<0,01$ ) supérieures à la classe A des groupes Contrôle et Blebb.



Cette analyse *ex vivo* des réponses contractiles et respiratoires face à des inductions d'arythmies ventriculaires, tend à montrer que la **gestion de la consommation d'oxygène du myocarde** est un paramètre à prendre en compte lors de la réalisation d'études visant à établir le profil de sensibilité des myocards aux arythmies ventriculaires. En effet, l'adaptation de la réponse respiratoire semble indiquer le profil pro- ou anti-arythmique du myocarde. La consommation globale d'oxygène du myocarde (MVO<sub>2</sub>) est une mesure macroscopique de la fonction mitochondriale. Ainsi, nous pourrions envisager que plus la capacité du myocarde à s'adapter à une augmentation brutale de la demande énergétique est importante, plus il sera résistant au développement de troubles du rythme induit par une stimulation électrique. Le « désordre » ionique intracellulaire provoqué par la stimulation électrique, comme une surcharge calcique par exemple, a un coût énergétique important. Il est possible que la capacité de synthèse d'ATP du compartiment mitochondrial ait un impact majeur sur la vitesse de résorption du « désordre » ionique intracellulaire secondaire à la stimulation électrique. De ce fait, une meilleure compréhension des mécanismes régulant la synthèse d'ATP mitochondrial pourrait apporter de nouvelles hypothèses mécanistiques expliquant pourquoi un myocarde est plus ou moins arythmique en condition de stress.

La fonction mitochondriale est également contrôlée par le maintien de la balance énergétique du système. A la vue des résultats précédents en présence de blebbistatine et d'ap5a, nous pouvons supposer que des inhibitions de l'appareil contractile et du phosphotransfert AK n'aient pas les mêmes répercussions sur le producteur d'énergie, plus précisément le compartiment mitochondrial. L'inhibition des ATPases myofibrillaires dans le cas de cœurs perfusés en présence de blebbistatine ne modifierait pas significativement la qualité de la réponse mitochondriale par rapport aux cœurs Contrôle, contrairement à une situation dans laquelle le phosphotransfert AK est inhibé.

La deuxième partie du manuscrit est basée sur l'analyse de la régulation de la fonction mitochondriale dans un modèle *in vitro* de fibres isolées et perméabilisées. Cette étude a permis de proposer des hypothèses mécanistiques permettant de mieux comprendre pourquoi le myocarde peut être plus ou moins résistant au développement d'une arythmie ventriculaire. Dans la mesure où les pathologies du rythme cardiaque ont été décrites comme pouvant se développer dans les quatre chambres cardiaques, l'étude a été effectuée sur des fibres cardiaques provenant des oreillettes et des ventricules droits et gauches. L'impact du découplage entre l'appareil contractile et le compartiment mitochondrial a été plus particulièrement étudié en utilisant la blebbistatine et l'ap5a.

## 5.2 Effets mécanistiques du découplage de l'appareil contractile et la mitochondrie

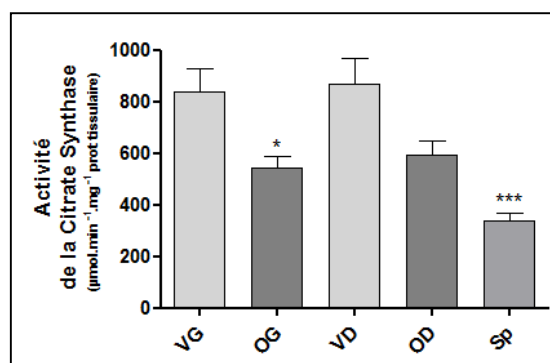
L'étude *in vitro* fait appel à la technique d'oxygraphie haute résolution, permettant de mesurer la consommation d'oxygène de fibres perméabilisées (voir Partie Matériels et Méthodes, Section 4.2). Dans un premier temps, la fonction mitochondriale myocytaire a été caractérisée dans chacun des compartiments cardiaques. Pour cela, la masse mitochondriale, le fonctionnement des différents complexes de la chaîne respiratoire, les vitesses maximales de consommation d'oxygène, ainsi que l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ADP ont été mesurés sur des fibres musculaires perméabilisées de ventricules, oreillettes et septum cardiaques.

### 5.2.1 Différences des paramètres bioénergétiques dans les différents tissus cardiaques

#### 5.2.1.1 Masse mitochondriale

La masse mitochondriale a été déterminée enzymatiquement (voir Partie Matériels et Méthodes, Section 4.3.3) par l'enregistrement de l'activité spécifique de la citrate synthase, enzyme du cycle de Krebs, qui représente un « gold standard » pour évaluer la masse mitochondriale dans un tissu.

Dans les cœurs des rats contrôles sains, l'activité de la citrate synthase dans les ventricules sont comparables (Figure 41). Les deux oreillettes présentent une masse mitochondriale identique mais significativement moins élevée que les ventricules ( $p < 0,05$  OG *versus* VG). Le septum, quant à lui, présente la plus basse masse mitochondriale du myocarde ( $p < 0,001$  *versus* VG). La masse mitochondriale n'est donc pas équivalente entre les différentes régions du myocarde.



**Figure 41 : Masse mitochondriale des différentes régions cardiaques.**

L'activité spécifique de la citrate synthase est mesurée à partir d'un homogénat tissulaire du ventricule gauche (VG), ventricule droit (VD), septum ventriculaire (Sp), oreillette droite (OD) ou oreillette gauche (OG). Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM. Les tests statistiques proviennent de t-test utilisant le VG comme référence pour les comparaisons statistiques : \* $p < 0,05$  et \*\*\* $p < 0,001$  *versus* VG.

### **5.2.1.2 Complexes de la chaîne respiratoire**

Le fonctionnement de la chaîne respiratoire repose sur les activités de plusieurs complexes enzymatiques dont la coopération assure la réduction de l'oxygène moléculaire, se caractérisant au niveau microscopique par une consommation d'oxygène.

La respiration dépendante des complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire est identique dans les deux ventricules et l'oreillette gauche (Tableau 5). L'activité relative de ces complexes est néanmoins plus importante dans le septum et l'oreillette droite. Dans les cinq régions cardiaques, le RCR du complexe I (Respiratory Control Ratio I ou RCR I) est proche de 4,5.

L'activité des complexes II, III et IV est différente entre les cinq compartiments cardiaques. En présence de succinate et lorsque le complexe I est inhibé par la roténone, l'OG possède la plus faible respiration associée au Complexe II, par rapport aux ventricules et au septum et à l'oreillette droite (Tableau 5). Le RCR est également calculé pour le complexe II (RCR II). Il atteint en moyenne 1,75 pour la majorité des tissus, excepté pour l'OG où il est de 1,57 ( $p < 0,05$  versus VG).

L'activité du complexe IV (Cytochrome oxydase) est plus basse pour l'OG que pour les ventricules, ainsi que pour l'oreillette droite et le septum.

Les fuites de protons à travers la membrane interne mitochondriale sont également évaluées. Le VD est le tissu le moins découplé dans un cœur sain, suivi du VG et de l'OG, puis l'oreillette droite et le septum.

Dans le cœur, sans différences significatives, le ventricule droit présente une respiration non mitochondriale relative plus faible que les compartiments cardiaques gauches et que l'oreillette droite et le septum.

	VG	OG	VD	OD	Sp
<b>Complexes I, III et IV</b> : $V_{G+M}^{ADP} - V_{Antim A}$ (pmol O <sub>2</sub> . sec.U de CS)	0,49 ± 0,10	0,36 ± 0,06	0,48 ± 0,10	0,96 ± 0,17 *	0,89 ± 0,21
<b>Complexes II, III et IV</b> : $V_{succ}^{ADP} - V_{Antim A}$ (pmol O <sub>2</sub> . sec.U de CS)	0,42 ± 0,08	0,30 ± 0,05	0,43 ± 0,10	0,77 ± 0,12 *	0,75 ± 0,16
<b>Complexe IV</b> : $V_{TPD+Asc} - V_{Antim A}$ (pmol O <sub>2</sub> . sec.U de CS)	1,20 ± 0,28	0,72 ± 0,15	1,09 ± 0,17	1,93 ± 0,28	2,29 ± 0,46
<b>Fuites</b> : $V_{ATR}$ (pmol O <sub>2</sub> . sec.U de CS)	0,34 ± 0,07	0,31 ± 0,06	0,32 ± 0,08	0,65 ± 0,11 *	0,63 ± 0,15
<b>Respiration non mitochondriale</b> : $V_{KCN}$ ((pmol O <sub>2</sub> . sec.mg de protéines tissulaires)	0,21 ± 0,10	0,24 ± 0,07	0,14 ± 0,02	0,45 ± 0,12	0,41 ± 0,09
<b>RCR I</b> $V_{G+M}^{ADP} / V_{G+M}$	4,99 ± 1,05	4,04 ± 0,52	4,23 ± 0,54	4,84 ± 0,99	4,00 ± 0,30
<b>RCR II</b> $V_{succ}^{ADP} / V_{ATR}$	1,75 ± 0,05	1,57 ± 0,05 *	1,80 ± 0,08	1,74 ± 0,11	1,82 ± 0,19

**Tableau 5: Activités des complexes de la chaîne respiratoire des fibres perméabilisées récoltées dans les différents tissus cardiaques.**

L'activité de chaque complexe de la chaîne respiratoire est mesurée par oxygraphie sur fibres perméabilisées à l'aide d'une approche pharmacologique. Ces mesures sont effectuées sur le ventricule gauche (VG), ventricule droit (VD), septum ventriculaire (Sp), oreillette droite (OD) ou oreillette gauche (OG) et exprimées en pmol d'O<sub>2</sub> par seconde par unité de citrate synthase ou par quantité de protéines tissulaires. Les activités des complexes I, II, III et VI correspondent à la différence des respirations sans (Antim : antimycine A) et avec ADP (G+M<sup>ADP</sup> ; succ<sup>ADP</sup>), après addition de roténone pour le complexe II. L'activité de complexe IV est mesurée suite à l'inhibition des complexes I, II et III (Antim A) et à l'addition d'un donneur d'électrons (TPD+Asc). Les fuites de protons (Fuites) sont mesurées après inhibition des complexes I, II et III, et après addition d'atractyloside (ATR). Les RCR (Rapport du Contrôle Respiratoire) sont calculés pour les complexes I et II par le rapport de la vitesse maximale de respiration en présence d'ADP par celle en absence d'ADP avec le substrat correspondant. Les valeurs correspondent à la moyenne ± SEM. Les tests statistiques proviennent de t-test utilisant les données collectées dans le VG pour effectuer les comparaisons statistiques avec les autres compartiments dans chaque conditions : \*p<0,05 versus VG.

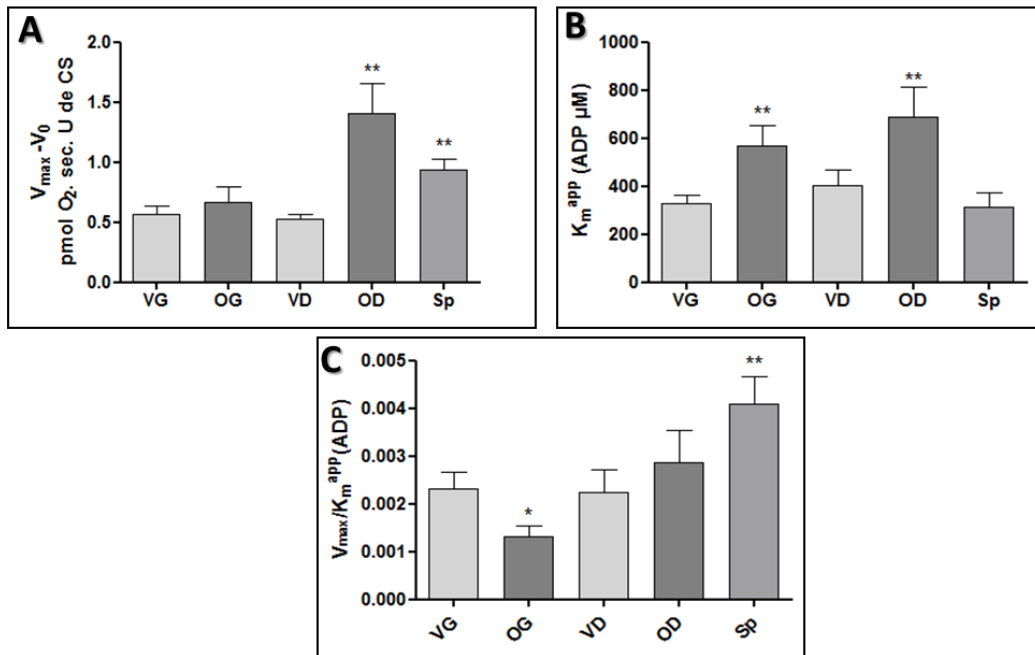
### 5.2.1.3 Stimulation de la respiration mitochondriale par l'ADP

Après avoir établi les différences régionales cardiaques au niveau des activités des complexes de la chaîne respiratoire, les vitesses maximales et les affinités apparentes de la respiration mitochondriale pour l'ADP ( $K_m^{app}(ADP)$ ) ont été étudiées. Pour cela, les tissus ont été stimulés par des doses croissantes d'ADP afin d'atteindre la vitesse respiratoire maximale (Figure 42).

Les deux ventricules et l'OG atteignent des vitesses maximales identiques. Le septum et l'oreillette droite présentent des vitesses maximales de respiration significativement plus élevées que le VG ( $p<0,01$  ; Figure 42A). Ces vitesses maximales de respiration sont atteintes pour des concentrations en ADP variables. Les  $K_m^{app}(ADP)$  ont été obtenues en modélisant les cinétiques de réponse de la respiration des fibres perméabilisées à des concentrations croissantes d'ADP, en utilisant l'équation de Michaelis-Menten (Figure 42B). Dans les cœurs contrôles testés, deux groupes se distinguent en fonction de leur affinité apparente pour l'ADP : le groupe des muscles ventriculaires (VG, VD et Sp) et le groupe des muscles auriculaires dont les affinités sont significativement plus basses lorsqu'elles sont comparées aux ventricules ( $p<0,01$ ).

L'affinité apparente pour l'ADP et les vitesses de respiration mitochondriale sont deux paramètres étroitement liés dans la réponse globale de la respiration mitochondriale pour des concentrations

croissantes d'ADP. L'efficacité catalytique (Figure 42C) est calculée par le rapport de la vitesse maximale sur l'affinité apparente pour l'ADP. Ce paramètre est utilisé pour deux raisons, la première raison étant qu'il permet une représentation de l'efficacité des oxydations phosphorylantes pour une faible quantité d'ADP et la deuxième raison étant qu'il permet de s'affranchir des différences de respiration maximales entre les tissus cardiaques. Il permet donc la comparaison directe entre les différents tissus cardiaques.



**Figure 42 : Affinités apparentes de la respiration mitochondriale pour l'ADP exogène dans les différents tissus cardiaques.**

Les réponses de la respiration mitochondriale à des additions croissantes d'ADP sont suivies par oxygraphie, sur des fibres isolées perméabilisées de ventricule gauche (VG), ventricule droit (VD), septum ventriculaire (Sp), oreillette droite (OD) ou oreillette gauche (OG). Les cinétiques obtenues ont été analysées selon un modèle de type Michaelis-Menten. La vitesse maximale de respiration est alors calculée par extrapolation (A), ainsi que l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ADP (B) pour chaque tissu. L'efficacité catalytique est calculée (C) pour chaque tissu par le rapport des vitesses maximales sur les affinités apparentes. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM. Les tests statistiques proviennent de t-test utilisant les données collectées dans le VG pour effectuer les comparaisons statistiques avec les autres compartiments dans chaque condition : \* $p < 0,05$  et \*\* $p < 0,01$  versus VG.

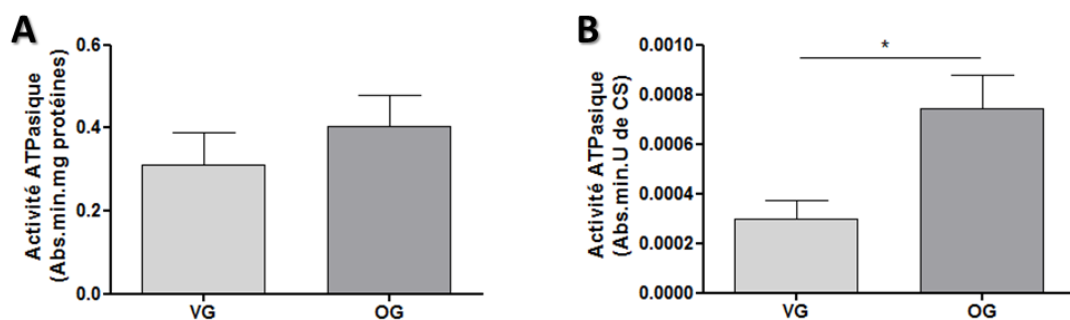
Dans le myocarde, les efficacités catalytiques des deux ventricules sont identiques. L'OD présente une efficacité catalytique identique au VG, bien que ce tissu combine une vitesse de respiration, ainsi qu'une valeur de  $K_m^{app}$  plus fortes que le VG. Deux tissus cardiaques présentent une efficacité catalytique significativement différente de celle du VG : l'OG et le Sp. L'OG, malgré une vitesse maximale de respiration identique au VG, est moins affine pour l'ADP et possède donc une efficacité catalytique moins forte que le VG ( $p < 0,05$  ; Figure 42C). Un résultat différent est observé pour le Sp, avec une respiration maximale plus forte mais une affinité de la mitochondrie pour l'ADP identique au VG ( $p < 0,01$ ).

## 5.2.2 Compartimentation bioénergétique et flux des nucléotides

Dans le but de comprendre les interactions entre les consommateurs et les producteurs d'énergie au sein du myocarde, le modèle des fibres perméabilisées est choisie afin d'avoir une approche *in vitro* intégrée. En effet dans ce modèle, la structure cellulaire est conservée et permet donc de considérer le recyclage et l'utilisation des nucléotides adényliques dans les phénomènes globaux de flux bioénergétiques, ce qui n'est pas possible avec un modèle de mitochondries isolées. La suite du projet a consisté en l'exploration des influences de la blebbistatine et de l'ap5a sur la régulation de la fonction mitochondriale, dans les tissus cardiaques. Cependant comme présenté précédemment, les différents tissus ont des caractéristiques mitochondriales hétérogènes. Le travail a donc été focalisé dans un premier temps sur la comparaison du ventricule et de l'oreillette gauche, afin de faciliter la lecture et d'émettre des hypothèses mécanistiques transférables au modèle de cœurs isolés et perfusés présenté dans la première partie de ce travail.

### 5.2.2.1 Implications de l'activité ATPasique

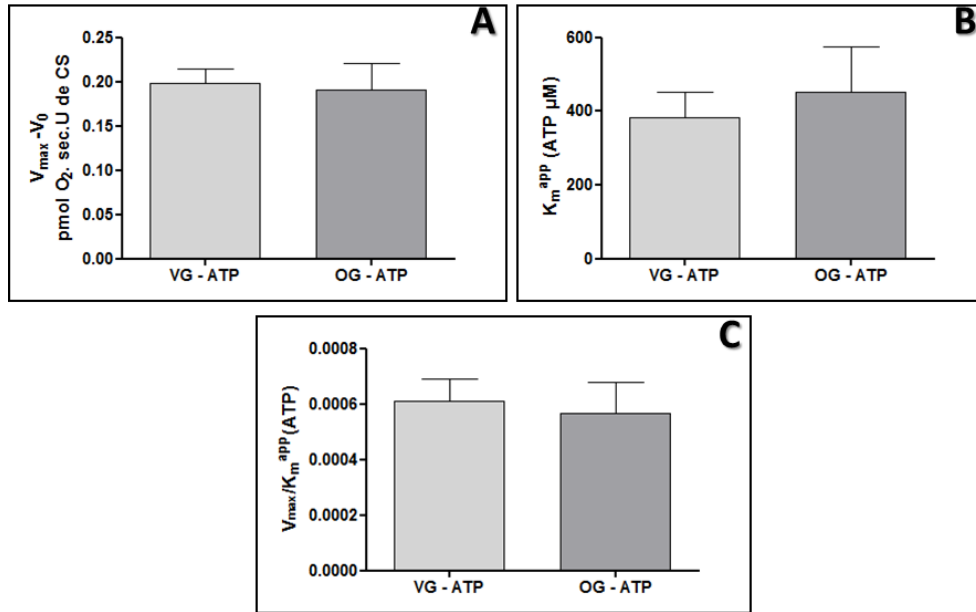
L'activité ATPasique des fibres perméabilisées est mesurée par l'intermédiaire d'un système rapporteur (Figure 43 et Section 4.2.3 de la partie Matériels et Méthodes). Le VG et l'OG possèdent la même activité ATPasique rapportée à la quantité de protéines tissulaires (Figure 43A). Cependant, la masse mitochondriale étant 1,5 fois inférieure dans l'OG, la demande énergétique peut donc être supérieure dans cette chambre (Figure 43B). Ainsi, rapportée à la quantité de citrate synthase, l'OG présente une activité ATPasique significativement plus forte ( $p < 0,05$ ) que le VG.



**Figure 43 : Activité ATPasique non mitochondriale des compartiments cardiaques gauches.**

L'activité ATPasique est mesurée sur fibres perméabilisées de ventricule gauche (VG) ou d'oreillette gauche (OG) dont les mitochondries sont inhibées préalablement (voir Matériels et Méthodes Section 4.2.3). En présence d'une concentration saturante d'ATP (2 mmol/L), un système rapporteur permet de suivre la formation d'ADP par la consommation de NADH. Le suivi spectrophotométrique informe sur la vitesse de disparition du NADH et donc indirectement la formation d'ADP. Les activités ATPasiques sont exprimées en fonction de la quantité de mg de protéine (A) ou de citrate synthase (B) dans chaque tissu. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM. Les tests statistiques proviennent de t-test comparant le VG à l'OG avec  $*p < 0,05$  versus VG.

L'impact de cette différence sur la stimulation de la respiration mitochondriale par l'ATP exogène est présentée Figure 44. Les vitesses maximales atteintes en présence d'ATP sont identiques dans les deux tissus, ramenées à la masse mitochondriale (Figure 44A). Lorsque l'ADP apportée à la mitochondrie provient d'une source endogène, ici les ATPases, les mitochondries des VG et OG réagissent de façon similaire avec une efficacité catalytique similaire (Figure 44C). Contrairement à l'ADP exogène, l'ADP endogène stimule les oxydations phosphorylantes des mitochondries du VG et de l'OG de façon similaire.



**Figure 44 : Paramètres respiratoires mitochondriaux lors d'une stimulation à l'ATP exogène des fibres perméabilisées des compartiments cardiaques gauches.**

Les réponses mitochondriales à une addition croissante d'ATP sont suivies par oxygraphie, sur des fibres isolées perméabilisées de ventricule gauche (VG) ou oreillette gauche (OG). Les cinétiques obtenues ont été analysées par une régression non linéaire de type hyperbolique (Michaelis-Menten). La vitesse maximale de respiration est alors calculée par extrapolation (A), ainsi que l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ATP (B) pour chaque tissu. L'efficacité catalytique est calculée (C) pour chaque tissu par le rapport des vitesses maximales sur les affinités apparentes. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM.

### 5.2.2.2 Effet des inhibiteurs de la signalisation énergétique

Afin de continuer l'investigation de la régulation de la fonction mitochondriale dans le ventricule et l'oreillette gauche, une approche pharmacologique a été adoptée. Les myosines ATPases, consommatrices principales d'ATP dans les cardiomyocytes ont été inhibées avec de la blebbistatine. La créatine kinase mitochondriale a été stimulée par la créatine. L'adénylate kinase a été inhibée par l'ap5a. Les Tableau 6 et Tableau 7 présentent les données obtenues lors des mesures d'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ADP exogène et endogène respectivement, dans les différentes conditions expérimentales.

ADP	Ventricule gauche		Oreillette gauche	
	$V_{\max}$ (pmol O <sub>2</sub> .sec.U de CS)	$K_m^{app}(ADP)$ ( $\mu$ M)	$V_{\max}$ (pmol O <sub>2</sub> .sec.U de CS)	$K_m^{app}(ADP)$ ( $\mu$ M)
Condition Contrôle	0,57 ± 0,07	326 ± 37	0,67 ± 0,12	570 ± 82 ††
Créatine (20 mmol.L)	0,34 ± 0,07 *	119 ± 18 ***	0,30 ± 0,05 *	269 ± 42 *, ††
Ap5a (50 $\mu$ mol.L)	0,49 ± 0,04	968 ± 238 ***	0,37 ± 0,08	1223 ± 412 *
Blebbistatine (25 $\mu$ mol.L)	0,47 ± 0,09	465 ± 102	0,57 ± 0,10	1380 ± 228 ***, ††
Ap5a (50 $\mu$ mol.L) et Blebbistatine (25 $\mu$ mol.L)	0,37 ± 0,04	765 ± 49 ***	0,37 ± 0,04	2301 ± 492 ***, †

**Tableau 6 : Impacts de la modulation bioénergétique sur les paramètres respiratoires mitochondriaux de fibres perméabilisées des compartiments cardiaques gauches, stimulée à l'ADP exogène.**

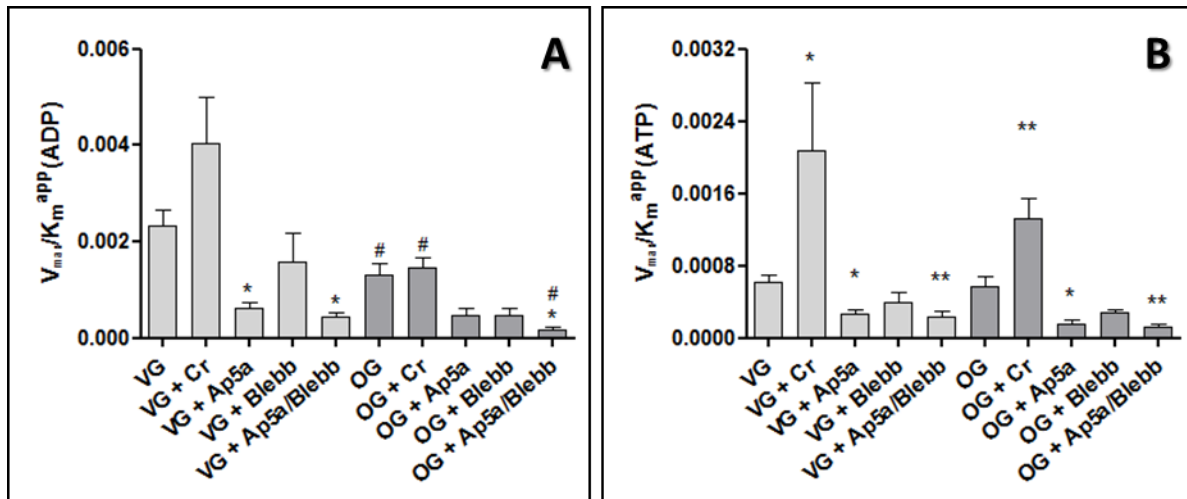
Les réponses mitochondriales à une addition croissante d'ADP sont suivies par oxygraphie, sur des fibres isolées perméabilisées de ventricule gauche (VG) ou oreillette gauche (OG). Les cinétiques obtenues ont été analysées par une régression non linéaire de type hyperbolique (Michaelis-Menten, Logiciel Prism GraphPad). La vitesse maximale de respiration est alors calculée par extrapolation ( $V_{\max}$ ), ainsi que l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ADP ( $K_m^{app}(ADP)$ ) pour chaque tissu. Les expériences sont effectuées en condition Contrôle, suite à l'activation du phosphotransfert créatine kinase-dépendant (Créatine), suite à l'inhibition de l'adénylate kinase (Ap5a), des myosines ATPases (Blebbistatine) ou suite à l'inhibition des deux (Ap5a et Blebbistatine). Les valeurs correspondent à la moyenne ± SEM. Les tests statistiques proviennent de t-test comparant chaque condition à sa condition Contrôle avec \* $p$ <0,05 et \*\*\* $p$ <0,001; et comparant les valeurs de l'OG à celle du VG dans les mêmes conditions avec † $p$ <0,05 et †† $p$ <0,01.

ATP	Ventricule gauche		Oreillette gauche	
	$V_{\max}$ (pmol O <sub>2</sub> .sec.U de CS)	$K_m^{app}(ATP)$ ( $\mu$ M)	$V_{\max}$ (pmol O <sub>2</sub> .sec.U de CS)	$K_m^{app}(ATP)$ ( $\mu$ M)
Condition Contrôle	0,20 ± 0,02	383 ± 70	0,19 ± 0,03	453 ± 122
Créatine (20 mmol.L)	0,34 ± 0,05 **	204 ± 42	0,34 ± 0,06 *	278 ± 45
Ap5a (50 $\mu$ mol.L)	0,18 ± 0,02	1058 ± 373 *	0,37 ± 0,13	3875 ± 2800 *
Blebbistatine (25 $\mu$ mol.L)	0,32 ± 0,08	1521 ± 886	0,42 ± 0,09 **	1626 ± 448 **
Ap5a (50 $\mu$ mol.L) et Blebbistatine (25 $\mu$ mol.L)	0,27 ± 0,04	2589 ± 1250	0,42 ± 0,08 **	5137 ± 1088 ***

**Tableau 7 : Impacts de la modulation bioénergétique sur les paramètres respiratoires mitochondriaux de fibres perméabilisées des compartiments cardiaques gauches, stimulée à l'ADP endogène.**

Les réponses mitochondriales à une addition croissante d'ATP sont suivies par oxygraphie, sur des fibres isolées perméabilisées de ventricule gauche (VG) ou oreillette gauche (OG). Les cinétiques obtenues ont été analysées par une régression non linéaire de type hyperbolique (Michaelis-Menten, Logiciel Prism GraphPad). La vitesse maximale de respiration est alors calculée par extrapolation ( $V_{\max}$ ), ainsi que l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ATP ( $K_m^{app}(ATP)$ ) pour chaque tissu. Les expériences sont effectuées en condition Contrôle, suite à l'activation du phosphotransfert créatine kinase-dépendant (Créatine), suite à l'inhibition de l'adénylate kinase (Ap5a), des myosines ATPases (Blebbistatine) ou suite à l'inhibition des deux (Ap5a et Blebbistatine). Les valeurs correspondent à la moyenne ± SEM. Les tests statistiques proviennent de t-test comparant chaque condition à sa condition Contrôle avec \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01 et \*\*\* $p$ <0,001.





**Figure 45 : Impacts de la modulation bioénergétique sur les efficacités catalytiques mitochondriales lors d'une stimulation à l'ADP exogène et endogène de fibres perméabilisées des compartiments cardiaques gauches.**

Les réponses mitochondriales à une addition croissante d'ADP et d'ATP sont suivies par oxygraphie, sur des fibres isolées perméabilisées de ventricule gauche (VG) ou oreillette gauche (OG). Les efficacités catalytiques sont calculées par le rapport de la vitesse maximale atteintes sur l'affinité apparente mitochondriale permettant de l'atteindre par une stimulation à l'ADP (A) et à l'ATP (B). Les expériences sont effectuées en condition Contrôle, suite à l'activation du phosphotransfert créatine kinase-dépendant (Créatine), suite à l'inhibition de l'adénylate kinase (Ap5a), des myosines ATPases (Blebbistatine) ou suite à l'inhibition des deux (Ap5a et Blebbistatine). Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM. Les tests statistiques proviennent de t-test comparant l'effet des additions de drogues sur un tissu par rapport à la condition contrôle de ce même tissu avec \* $p < 0,05$  et \*\* $p < 0,01$ ; et comparant le VG avec l'OG dans chaque condition avec # $p < 0,05$ .

#### 5.2.2.2.1 Inhibition des myosines ATPases

L'inhibition de l'appareil contractile par la blebbistatine abaisse de 51% l'activité ATPasique dans le VG, contre 37 % dans l'OG (Tableau 9), bien que l'addition de blebbistatine ne perturbe pas les vitesses maximales de respiration en présence d'ADP exogène (Tableau 6). Cette inhibition modifie pourtant les échanges nucléotidiques entre producteur et consommateur d'énergie. En effet, en présence de blebbistatine, l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ADP exogène diminue dans l'OG ( $p < 0,001$  versus OG contrôle ; Tableau 6).

Lorsque l'ADP provient d'une source endogène au système (Tableau 7) et que les myosines ATPases sont inhibées par la blebbistatine, les vitesses maximales de respiration augmentent de 60 % dans le VG et de 120 % dans l'OG ( $p < 0,01$  versus OG contrôle). Dans ces conditions, les additions d'ATP permettant d'atteindre une stimulation maximale doivent être triplées, avec des affinités apparentes à l'ATP faibles (OG :  $p < 0,01$  versus OG contrôle). Les efficacités catalytiques s'en trouvent alors fortement diminuées (Figure 45).

Dans le VG, une inhibition de l'appareil contractile provoque une diminution de l'efficacité catalytique de 33 %, quelle que soit la source d'ADP (Figure 45A et Figure 45B). Dans l'OG, malgré une inhibition plus faible de l'activité ATPasique par la blebbistatine, les efficacités catalytiques

mitochondriales subissent une diminution plus importante de 63 % lors d'ajout d'ADP exogène (Figure 45A) et de 51 % lors d'ajout d'ATP (Figure 45B).

#### 5.2.2.2 Modulation des phosphotransferts énergétiques : Créatine Kinase et Adénylate Kinase

Les systèmes de phosphotransferts énergétiques permettent d'améliorer les efficacités catalytiques mitochondriales favorisant les échanges énergétiques entre les sites producteur et consommateur d'énergie. Deux systèmes de phosphotransferts sont entre autre répertoriés au sein du myocarde : la Créatine Kinase (système Cr/PCr) et l'Adénylate Kinase (système ATP/AMP). L'impact de la modulation de l'activité de ces deux navettes nucléotidiques sur les liens producteurs-consommateurs d'énergie a été étudié soit par ajout de créatine, soit par inhibition directe de l'adénylate kinase (ap5a).

Lors des cinétiques avec l'ADP exogène et addition de créatine (20 mmol/L), une diminution significative des vitesses maximales de respiration est observée au sein des deux tissus cardiaques (Tableau 6) : VG (-41 %) et OG (-55 %). L'activation de la navette Cr/PCr par addition de créatine induit également une augmentation significative de l'affinité de la respiration mitochondriale pour l'ADP exogène de 63 % dans le VG ( $p < 0,001$ ) et de 53 % dans l'OG ( $p < 0,01$ ). De manière intéressante, une stimulation par l'ADP endogène (ajout d'ATP) augmente significativement les vitesses maximales de respiration (Tableau 7) de 71 % pour le VG ( $p < 0,01$ ) et de 80 % dans l'OG ( $p < 0,05$ ), associé à une baisse non significative du  $K_m^{app}(ATP)$  de 47 % dans le VG et de 39 % dans l'OG. Les efficacités catalytiques (Figure 45) sont donc clairement augmentées en présence de créatine dans le VG, de 74 % en présence d'ADP exogène et de 241 % en présence d'ADP endogène ( $p < 0,05$ ). Dans l'OG, l'efficacité catalytique mitochondriale pour l'ADP ne change pas mais est fortement augmentée pour l'ATP avec 133 % d'amélioration ( $p < 0,01$ ).

Comme lors de la condition Contrôle, lorsque les ATPases sont mises en jeu, avec ou sans système de phosphotransfert, les efficacités catalytiques des deux tissus sont identiques. Ainsi, les différences observées dans les expérimentations utilisant de l'ADP exogène, supportent l'hypothèse selon laquelle plusieurs niveaux de régulation de la fonction mitochondriale existent. De plus, ces expérimentations démontrent que la réponse des oxydations phosphorylantes observée pour une condition expérimentale donnée est en fonction du type de tissu étudié. Le rôle de l'architecture cellulaire ou d'un deuxième système de phosphotransfert doit être pris en compte. Ces systèmes permettent de « canaliser » l'apport des nucléotides endogènes jusqu'au compartiment mitochondrial et assure ainsi l'obtention d'une réponse homogène des oxydations phosphorylantes dans des tissus cardiaques différents. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi lorsque l'ADP est produit de façon endogène,

les différences entre le VG et l'OG disparaissent. En effet, lorsque l'ADP est apporté de façon exogène, tous les niveaux de régulation ne seraient peut-être pas activés, limitant ainsi les capacités d'adaptation du système en présence des différents inhibiteurs utilisés.

L'adénylate kinase est décrite pour avoir un rôle de phosphotransfert dans le myocarde, également appelé ATP/AMP phosphotransfert. Il a été démontré que l'AK pouvait stimuler la fonction mitochondriale via la formation d'AMP. De plus, l'AK a une fonction de recyclage de l'ADP en ATP à proximité des myofilaments, indépendamment du compartiment mitochondrial (Dzeja and Terzic, 2009). L'ap5a, inhibiteur spécifique de l'AK, est une molécule appartenant à la famille des dinucléotides polyphosphates, synthétisée naturellement et reconnue comme « alarmones » (Flores et al., 1999). Dans nos expérimentations, l'AK a été inhibé par addition d'ap5a (50  $\mu\text{mol/L}$ ) et les effets de cette inhibition sur la fonction mitochondriale ont été évalués. En présence d'ADP exogène et d'ap5a, les vitesses maximales de respiration ne sont pas significativement modifiées (Tableau 6). L'inhibition de l'AK diminue fortement les affinités apparentes pour l'ADP avec une valeur de  $K_m^{\text{app}}(\text{ADP})$  triplée pour le VG et doublée pour l'OG (VG  $p < 0,001$  et OG  $p < 0,05$ ) (Tableau 6). L'ap5a n'a pas d'effet sur l'activité ATPasique non mitochondriale (Tableau 9). Néanmoins cet inhibiteur induit de très fortes modifications de l'affinité apparente mitochondriale pour l'ATP (Tableau 7). Les augmentations des  $K_m^{\text{app}}(\text{ATP})$  sont de l'ordre de 176 % et 755 % pour le VG et l'OG respectivement ( $p < 0,05$ ).

Ainsi, en absence de créatine, l'AK semble être un élément majeur de la régulation bioénergétique cardiaque, en intervenant d'une part sur l'affinité de la respiration mitochondriale pour l'ADP mais également au niveau des flux nucléotidiques entre l'appareil contractile et le compartiment mitochondrial. Dans le but de vérifier l'effet de l'inhibition de l'AK sur la consommation d'ATP par l'appareil contractile et également sur le flux nucléotidique de l'appareil contractile vers la mitochondrie, une addition simultanée des deux inhibiteurs a été réalisée (ap5a 50  $\mu\text{mol/L}$  et blebbistatine 25  $\mu\text{mol/L}$ ). Après addition d'ADP exogène et en présence des deux inhibiteurs (Tableau 6), les respirations maximales varient très peu. L'addition des deux drogues induit une diminution forte de l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ADP exogène dans le VG (+134 %,  $p < 0,001$ ), augmentation comparable à celle induite par addition d'ap5a seul. L'OG semble également présenter une perte de sensibilité exacerbée en présence des deux inhibiteurs : le  $K_m^{\text{app}}(\text{ADP})$  est augmenté de 304 % ( $p < 0,001$ ), correspondant à un effet cumulatif des deux drogues.

L'activité ATPasique non mitochondriale (Tableau 9) diminue de façon non significative dans le VG et de manière significative dans l'OG avec une baisse de 61 % ( $p < 0,05$ ). Cette diminution d'activité ATPasique se répercute sur les respirations mitochondriales stimulées par l'ATP, diminuées de 118 % dans l'OG ( $p < 0,01$  ; Tableau 6). La combinaison des deux inhibiteurs induit une forte perte de l'affinité

des mitochondries pour l'ATP ( $K_m^{app}(ATP)$  augmenté de 576 % dans le VG et de 1034 % dans l'OG avec  $p < 0,001$ ). Ce dernier résultat confirme que la fourniture en ADP endogène est très fortement diminuée en présence des deux inhibiteurs, démontrant leurs spécificités et leurs efficacités.

Pour résumer, les efficacités catalytiques en présence d'ap5a et de blebbistatine sont fortement diminuées (Figure 45A et B) dans le VG (-81 % pour l'ADP exogène avec  $p < 0,05$  et -62 % pour l'ADP endogène avec  $p < 0,01$ ). Ces variations sont comparables à celles observées en présence d'ap5a seul. L'addition de blebbistatine seule n'induit pas de variations significatives de l'efficacité catalytique mesurée en présence d'ADP endogène et exogène. L'OG présente également des diminutions de l'efficacité catalytique (de 86 % avec  $p < 0,05$  pour l'ADP exogène et de 78 % pour l'ADP endogène avec  $p < 0,01$ ). Lors de l'application des deux drogues simultanément, la perte d'efficacité catalytique semble être cumulative dans l'OG et devient comparable au profil Ap5a seul dans le VG.

### **5.2.2.3 Système de compartimentation via le cytosquelette cellulaire**

Le système cardiaque repose donc à la fois sur de fortes différences au niveau de la fonction mitochondriale inter-tissulaire mais également sur un certain équilibre dans le fonctionnement global des tissus, présumant de la possible présence d'un autre système de régulation. Dans le modèle des fibres perméabilisées, la complexité repose sur une compartimentation physique de la bioénergétique ; de plus il y a une différence évidente dans le comportement des mitochondries de VG et d'OG face à l'accumulation d'ATP. Plusieurs stratégies sont donc adoptées afin de comprendre ces différences (Tableau 8).

Dans un premier temps, un système de recyclage d'ATP (addition d'hexokinase + glucose) est mis en place afin d'évaluer le véritable impact de l'accumulation d'ATP sur le fonctionnement mitochondrial. La modulation de la concentration d'ATP résultante de ce système de recyclage, renforce les données déjà commentées en Figure 45A : les propriétés intrinsèques mitochondriales du VG ne sont pas modifiées et ceux de l'OG sont différentes. En effet, dans ce tissu, des diminutions de 56 % de la respiration maximale (Tableau 8) et de 42 % du  $K_m^{app}(ADP)$  sont enregistrées. L'accumulation d'ATP joue donc un fort rôle dans les faibles affinités mitochondriales atriales. Ce même système de recyclage d'ATP par ajout d'hexokinase et de glucose a été testé en présence de blebbistatine afin de vérifier si les effets de l'inhibition des myosines ATPases sont uniquement dus à cette accumulation d'ATP endogène, qui se retrouverait alors délétère pour l'efficacité catalytique de l'OG. La vitesse maximale de respiration et l'affinité apparente de la respiration mitochondriale ne changent également pas dans le VG (Tableau 8), comme observé précédemment en présence de blebbistatine seule. Dans l'OG, la vitesse maximale de respiration n'est pas modulée mais l'affinité

apparente mitochondriale présente une tendance à diminuer, restant cependant deux fois moins importante que lors de l'addition de la blebbistatine seule.

Système de compartimentation	Ventricule gauche		Oreillette gauche	
	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{sec.U de CS}$ )	$K_m^{APP(ADP)}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{sec.U de CS}$ )	$K_m^{APP(ADP)}$ ( $\mu\text{M}$ )
Condition Contrôle	0,57 ± 0,07	326 ± 37	0,67 ± 0,12	570 ± 82 ††
Recyclage de l'ATP : HK/Glc	0,46 ± 0,04	318 ± 33	0,29 ± 0,07	333 ± 91
Recyclage de l'ATP : HK/Glc + Blebb	0,46 ± 0,04	355 ± 48	0,56 ± 0,08	726 ± 112 †
Déstructuration du système : trypsine	0,94 ± 0,13 *	194 ± 24 *	0,37 ± 0,04 ††	262 ± 56 *

**Tableau 8 : Impacts des différents systèmes de compartimentation bioénergétique sur les paramètres respiratoires mitochondriaux lors d'une stimulation à l'ADP exogène.**

Les réponses mitochondriales à une addition croissante d'ADP sont suivies par oxygraphie, sur des fibres isolées perméabilisées de ventricule gauche (VG) ou d'oreillette gauche (OG). Les cinétiques obtenues sont analysées selon un modèle de type Michaelis-Menten par un logiciel de statistique (Prism, GraphPad). La vitesse maximale de respiration est alors calculée par extrapolation ( $V_{max}$ ), ainsi que l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ATP ( $K_m^{APP(ADP)}$ ) pour chaque tissu. Les expériences sont effectuées en **condition Contrôle**, suite à l'addition d'un système exogène (hexokinase et glucose) de consommation d'ATP (**Recyclage de l'ATP : HK/Glc**), suite à l'addition de ce même système en présence d'un inhibiteur des myosines ATPases, la blebbistatine (**Recyclage de l'ATP : HK/Glc + blebb**), et enfin suite à la déstructuration du cytosquelette par pré-traitement des fibres perméabilisées à la trypsine (**Déstructuration du système : trypsine**). Les valeurs correspondent à la moyenne ± SEM. Les tests statistiques proviennent de t-test comparant chaque condition à sa condition Contrôle avec \* $p < 0,05$ ; et comparant les valeurs de l'OG à celle du VG dans les mêmes conditions avec † $p < 0,05$  et †† $p < 0,01$ .

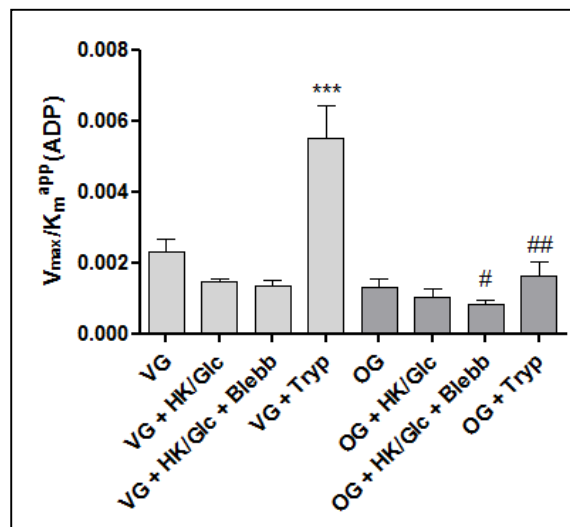
Activité ATPasique ( $10^{-3} \cdot \text{Abs.min.U de CS}$ )	Ventricule gauche		Oreillette gauche	
	Fibres perméabilisées	Fibres perméabilisées trypsinisées	Fibres perméabilisées	Fibres perméabilisées trypsinisées
Contrôle	0,300 ± 0,074	0,333 ± 0,062	0,743 ± 0,137 †	0,707 ± 0,069 ††
Ap5a	0,220 ± 0,007	0,206 ± 0,011	0,721 ± -	0,353 ± 0,010 *
Blebb	0,146 ± 0,018	0,227 ± 0,025	0,467 ± 0,012 †††	0,615 ± 0,102 †
Ap5a/Blebb	0,180 ± 0,027	0,169 ± 0,018 *	0,293 ± 0,033 *, †	0,366 ± 0,093 *

**Tableau 9 : Impacts de la modulation bioénergétique sur l'activité ATPasique non mitochondriale des fibres perméabilisées des compartiments cardiaques gauches.**

L'activité ATPasique non mitochondriale est mesurée sur des fibres isolées perméabilisées ou fibres perméabilisées trypsinisées de ventricule gauche (VG) ou oreillette gauche (OG). Les mesures sont effectuées après inhibition de la mitochondrie par addition de roténone, d'atractyloside et d'antimycine A, et via un système rapporteur basé sur la consommation de NADH. Les mesures spectrophotométriques sont effectuées en **condition Contrôle**, suite à l'inhibition de l'adénylate kinase (**Ap5a**), des myosines ATPases (**Blebbistatine**) ou suite à l'inhibition des deux (**Ap5a et Blebbistatine**). Les valeurs correspondent à la moyenne ± SEM. Les tests statistiques proviennent de t-test comparant chaque condition à sa condition Contrôle avec \* $p < 0,05$ ; et comparant les valeurs de l'OG à celle du VG dans les mêmes conditions avec † $p < 0,05$ , †† $p < 0,01$  et ††† $p < 0,001$ .

Ces résultats nous permettent de mettre en évidence un troisième partenaire dans le système producteur-consommateur d'énergie initialement décrit, notamment au niveau des fibres de l'OG. Ce nouveau partenaire permettrait d'expliquer les variations d'affinité apparente de l'OG parallèlement à l'accumulation d'ATP. Le cytosquelette pouvant être un de ces candidats potentiels, les fibres

perméabilisées ont alors été « déstructurées » par un traitement doux à la trypsine. Ce protocole a pour intérêt de conserver l'intégrité des organites tout en déstructurant le cytosquelette tissulaire (Seppet et al., 2006). Suite au traitement à la trypsine, les vitesses maximales de respiration évoluent de façon opposée dans les deux tissus cardiaques avec une augmentation de 64 % dans le VG (Tableau 8;  $p < 0,05$ ) et une diminution de 44 % dans l'OG. Les affinités sont augmentées dans les deux tissus (+40 % dans le VG et +54 % dans l'OG). La déstructuration par la trypsine induit donc des modifications de la fonction mitochondriale, révélant donc un rôle régulateur fort du cytosquelette dans les fibres perméabilisées.

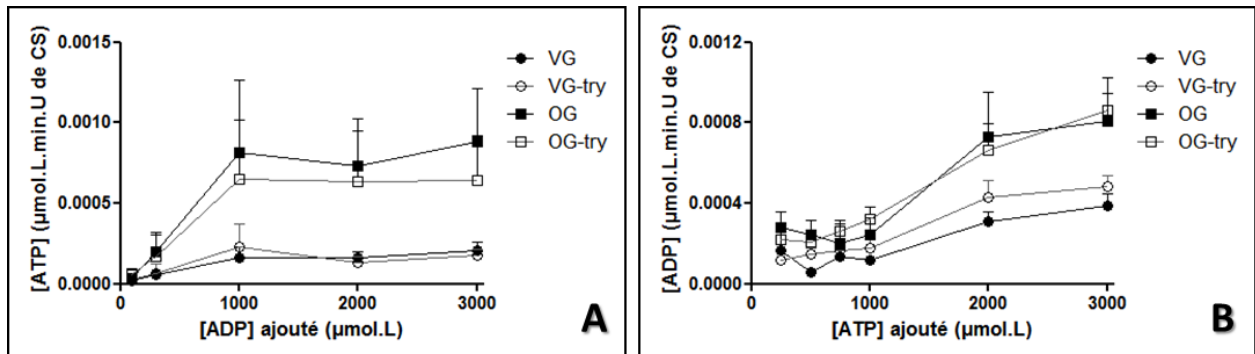


**Figure 46 : Impacts des différents systèmes de compartimentation bioénergétique sur l'efficacité catalytique mitochondriale lors d'une stimulation à l'ADP exogène.**

Les réponses mitochondriales à une addition croissante d'ADP sont suivies par oxygraphie, sur des fibres isolées perméabilisées de ventricule gauche (VG) ou d'oreillette gauche (OG). Les efficacités catalytiques sont calculées par le rapport de la vitesse maximale atteintes sur l'affinité apparente mitochondriale. Les expériences sont effectuées en **condition Contrôle**, suite à l'addition d'un système exogène (hexokinase et glucose) de consommation d'ATP (HK/Glc), suite à l'addition de ce même système en présence d'un inhibiteur des myosines ATPases, la blebbistatine (HK/Glc + Blebb), et enfin suite à la déstructuration du cytosquelette par pré-traitement des fibres perméabilisées à la trypsine (Tryp). Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM. Les tests statistiques proviennent de t-test comparant l'effet des additions de drogues sur un tissu par rapport à la condition contrôle de ce même tissu avec \*\*\* $p < 0,001$ ; et comparant le VG avec l'OG dans chaque condition avec # $p < 0,05$  et ## $p < 0,01$ .

La comparaison des efficacités catalytiques sur fibres perméabilisées par rapport aux fibres perméabilisées trypsinisées, indique des réponses variables dans chacune des chambres cardiaques (Figure 46). Dans le VG, l'efficacité catalytique augmente de 137 %, alors que l'efficacité catalytique de l'OG n'augmente que de 24 %, du fait des diminutions concomitantes des valeurs d'affinité mitochondriale et de vitesse maximale de respiration. Les fibres d'OG présentent ainsi une vitesse de production d'ATP (en présence d'ADP exogène) moins importante lorsque le système est déstructuré (Figure 47A). Malgré le fait que les activités ATPasiques ne changent pas (Figure 47B et Tableau 9) lorsque le système est déstructuré par traitement à la trypsine. L'activité des ATPases non

mitochondriales ne serait donc pas changée par des modifications du cytosquelette cellulaire dans les fibres perméabilisées cardiaques (Tableau 9).



Les paramètres de la respiration mitochondriale sont très variables en fonction des tissus cardiaques et de la pharmacologie étudiés (Annexe 1). Dans les différentes expériences, nous avons pu constater des efficacités catalytiques très similaires des deux ventricules en présence d'ADP exogène ou endogène. Les deux oreillettes présentent également des efficacités catalytiques très similaires, mis à part concernant les phospho-transferts. En effet, l'oreillette droite présente une diminution significative de son efficacité catalytique pour l'ADP en présence d'Ap5a mais n'en présente pas en présence de créatine et sous ATP,. Ces données sont inversées pour l'oreillette gauche. Pour terminer, le septum est un tissu très intéressant car il semble le plus sensible en terme de pharmacologie mais également le tissu ayant une forte efficacité catalytique, notamment en présence de créatine. Certaines de ces données *in vitro* sont à confirmer.

Cette étude sur fibres pelées perméabilisées nous a permis de mettre en évidence un certain nombre de résultats quant aux différences de fonctionnement énergétiques entre grands compartiments cardiaques. Même si en terme « d'équipement en chaîne respiratoire » peu de différences soient mises en évidence entre compartiments cardiaques, la régulation de la fonction mitochondriale est significativement différente entre ventricule et oreillette. Les valeurs de  $K_m^{app}$  pour l'ADP exogène sont en effet sensiblement plus élevées dans l'oreillette, signifiant une plus faible sensibilité mitochondriale pour l'ADP pour cette chambre cardiaque. Lorsque de la blebbistatine est ajoutée, entraînant ainsi une inhibition des myosines ATPases, nous notons que cette valeur de  $K_m^{app}$  est sensiblement augmentée. Ainsi, dans l'oreillette, une augmentation de la quantité d'ATP présente dans le milieu de respiration expliquée par une inhibition de la demande serait liée à une diminution de l'affinité apparente pour l'ADP. Ce résultat n'étant pas observé dans le ventricule, nous pouvons penser que la régulation énergétique de la fonction mitochondriale dans ce compartiment cardiaque n'est pas fondamentalement perturbée par des modifications des concentrations en ATP.

Une des hypothèses intéressantes de nos travaux repose sur la compréhension du rôle de l'architecture cellulaire dans l'origine des différences de régulation de la fonction mitochondriale entre oreillette et ventricule gauches. Comme le montre le Tableau 8, le traitement à la trypsine appliqué sur les fibres aboutit à des  $K_m^{app}$  pour l'ADP identiques des deux chambres cardiaques. Par contre, les effets de cette déstructuration sur les  $V_{max}$  sont opposés entre oreillette et ventricule. Ce point sera abordé dans la discussion générale, mais tend à montrer une compartimentation des nucléotides plus développée dans les fibres de ventricule gauche.



### 5.3 Analyse protéomique des différents tissus cardiaques

Afin d'expliquer les différences observées *in vitro* entre les compartiments cardiaques, une analyse protéomique est entreprise. Toutes les protéines du ventricule droit (VD), du septum interventriculaire (Sp), des oreillettes droite (OD) et gauche (OG), dont l'expression apparait différente du ventricule gauche (VG), sont répertoriées. L'expression de ces protéines est rapportée en fonction du rapport de leur expression comparé au VG, permettant une analyse « pseudo-quantitative ».

Le tissu présentant le moins de différences par rapport au VG dans sa composition protéique est le VD. En effet, 287 protéines sont recensées comme ayant une différence d'expression entre les deux tissus. Parmi ces protéines, 106 sont décrites comme étant plus de deux fois plus présentes dans le VD par rapport au VG. De la même façon, 20 protéines présentent des expressions au moins doublées dans le VD, avec un maximum de disparité de 0,20.

Le deuxième tissu le plus semblable au VG est le Sp. Le nombre de protéines recensées présentant des différences d'expression en comparaison au VG, est de 423. Sur ces 423 protéines identifiées, 70 ont une expression qui est au minimum doublée dans le Sp, allant jusqu'à une différence d'un facteur 1100. A l'inverse, 157 protéines sont deux fois moins exprimées dans le Sp par rapport au VG.

Les oreillettes sont les deux tissus dont les compositions protéiques sont les plus différentes en comparaison au VG. Le nombre de protéines dont le rapport calculé est différent de 1 s'élève à 1026 pour l'oreillette droite et 1025 pour l'oreillette gauche. Cependant, le nombre de protéines dont l'expression est au moins doublée par rapport au VG, est de 498 dans l'OD et de 443 dans l'OG. Concernant les protéines dont l'expression est au moins deux fois moins importante dans les oreillettes, elles sont 409 pour l'OD et 438 pour l'OG.

La répartition de ces protéines et leur fonction biologique est très hétérogène. En effet, par un classement arbitraire et manuel, les protéines sont répertoriées dans plusieurs grandes classes : architecture cellulaire, transcription/traduction, voies de signalisation, signalisation hormonale, métabolisme et bioénergétique, transport vésiculaire, électrophysiologie, protéasome et sans documentation. Une de ces classes, dont l'hétérogénéité est la plus présente est celle recouvrant le métabolisme et la bioénergétique. Nous avons donc analysé plus en détails ces deux grandes fonctions cellulaires afin de cerner les caractéristiques ou certaines différences protéomiques de chaque tissu cardiaque.

### **5.3.1 Différences protéomiques régionales du métabolisme des substrats**

#### **5.3.1.1 Métabolisme des sucres**

##### **5.3.1.1.1 La glycolyse**

La glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, est la voie métabolique cytosolique principale de la dégradation du glucose. Il a été montré que le myocarde en condition physiologique utilise principalement (environ 60 à 90 %) les acides gras comme source carbonée (Stanley et al., 2005). Néanmoins, la littérature propose que l'orientation métabolique du myocarde est dépendante de la région considérée, décrivant les oreillettes comme présentant une activité glycolytique supérieure aux ventricules (Shimura et al., 2013). Les protéines glycolytiques des chambres cardiaques par rapport au VG sont répertoriées (Tableau 10).

Le glucose est importé dans la cellule par un transporteur passif de glucose, appelé GLUT dont l'isoforme principale est le GLUT4. Ce transporteur est exprimé de façon équivalente dans le VD et le Sp par rapport au VG. En revanche, son expression est 6 et 9 fois supérieure dans l'OD et l'OG respectivement par rapport au VG.

Les enzymes de la glycolyse sont exprimées de façon équivalente dans les VD et VG. Cependant, la G-6-P isomérase est légèrement plus exprimée dans le VD. Certaines enzymes sont également sous-exprimées dans le VD par rapport au VG.

A l'image du VD, les enzymes de la glycolyse dans le Sp semblent aussi très comparables à celles du VG. Il est intéressant de noter que les isoformes 1 et 2 de l'hexokinase (HK) sont sous-exprimées dans le Sp. La 6-phosphofructose kinase type C est également bien moins exprimée que dans le VG, ainsi que la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase et la pyruvate kinase.

Dans les oreillettes, les enzymes glycolytiques sont sous-exprimées par rapport au VG, avec un rapport allant de 0,16 à 0,50. Certaines de ces différences sont importantes à mettre en avant quant à notre problématique. Par exemple, l'isoforme 2 de l'HK a été décrite pour avoir un rôle cardioprotecteur dans le myocarde au travers de son interaction avec le pore de transition de perméabilité (mPTP) (Pasdois et al., 2013). L'association de l'HK 2 avec le compartiment mitochondrial désensibilise le mPTP à son agoniste principal, le calcium. Il est intéressant de noter que de récents travaux scientifiques ont proposé que la dérégulation du mPTP ait un impact dans le développement d'arythmies ventriculaires et auriculaires (Xie et al., 2014). L'analyse protéomique montre que le niveau d'expression de l'HK 2 est inférieur dans l'OG en comparaison au VG. Ainsi, il est raisonnable de se demander si le mPTP présente des sensibilités différentes aux ions calcium dans les différents compartiments cardiaques.

Protéine	Isoformes	$\frac{VD}{VG}$	$\frac{Sp}{VG}$	$\frac{OD}{VG}$	$\frac{OG}{VG}$	Code UniProt
<b>Transporteur de Glucose</b>	GLUT 4	-	-	5,86	9,27	P19357
<b>Hexokinase</b>	1	-	0,25	0,16	0,27	P05708
	2	-	0,46	0,40	0,35	P27881
<b>G-6-P isomerase</b>		1,36	0,68	0,34	0,50	Q6P6V0
<b>6-phosphofructose kinase</b>		-	0,51	0,33	0,33	Q52KS1
	Type C	0,55	0,31	2,68	-	P47860
	Liver Type	-	-	-	0,44	P30835
<b>Fructose-biphosphate aldolase</b>	Type A	0,59	-	0,32	0,32	P05065
<b>Phospho-triose isomérase</b>		0,53	-	0,26	0,28	P48500
<b>Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase</b>		-	0,50	0,29	0,43	P04797
<b>Phosphoglycérate kinase</b>	Type 1	-	0,52	0,29	0,27	P16617
<b>Phosphoglycérate phospho-mutase</b>	Type 1	-	-	-	3,49	Q499Q4
	Type 2	0,75	0,52	0,45	0,37	P16290
<b>Enolase</b>	$\alpha$	-	-	0,29	0,32	P04764
	$\beta$	-	0,68	0,33	0,28	P15429
<b>Pyruvate kinase</b>	1/2	0,67	0,46	0,37	0,33	P11980

**Tableau 10 : Protéines caractéristiques de la glycolyse.**

Les protéines sont issues d'une analyse protéomique et exprimées en fonction du rapport significatif obtenu à partir du VG. Les protéines et leurs isoformes sont identifiées par un code correspondant à la base de données Uniprot. Les couleurs représentent les protéines deux fois moins exprimées au minimum (en bleu) et deux fois plus exprimées au minimum (en rouge). Glucose transportor, GLUT; G-6-P isomérase, Glucose-6-phosphate isomérase.

La 6-phosphofructose kinase type C est exprimée de manière similaire dans l'OG et dans le VG, mais est surexprimée dans l'OD en comparaison au VG. Dans ce même tissu d'ailleurs, l'isoforme « liver type » de cette enzyme n'est pas sous-exprimée (alors que c'est le cas dans l'OG) par rapport au VG. Enfin, une surexpression du type 1 de la phosphoglyceraldéhyde phospho-mutase est observée dans l'OG par rapport au VG.

Il est important de noter que le niveau d'expression des protéines de cette voie métabolique ne présume en rien du flux de glucose qui la traverse. Ainsi, il n'est pas possible en utilisant uniquement les données de la protéomique de stipuler que le flux glycolytique est plus important dans le VG *versus* l'OG, par exemple. L'utilisation de la résonance magnétique nucléaire du carbone 13 est une approche expérimentale qui permet d'évaluer le flux d'une voie métabolique donnée, ainsi que la métabolomique qui quantifie les intermédiaires énergétiques (Shimura et al., 2013).

### 5.3.1.1.2 Le devenir du pyruvate

La glycolyse aboutit à la création de pyruvate, dont le devenir est orienté par des facteurs environnementaux de la cellule. Le Tableau 11 rapporte les différences d'expression des protéines impliquées dans cette prise en charge du pyruvate dans les compartiments cardiaques.

En condition d'anaérobiose par exemple, le pyruvate peut être transformé en lactate par la lactate déshydrogénase. Cette enzyme possède deux chaînes (A et B) dont les expressions semblent homogènes dans les tissus ventriculaires. Un rapport moyen d'expression de 0,30 est observé dans les tissus auriculaires par rapport au VG, ce rapport se révélant être le même que celui observé pour les enzymes glycolytiques.

En conditions physiologiques, le pyruvate est majoritairement transporté dans la matrice mitochondriale. Il est alors pris en charge par un transporteur de pyruvate mitochondrial. L'expression de l'isoforme 2 de ce transporteur est divisée par deux dans le Sp et par trois dans les oreillettes en moyenne par rapport au VG. L'expression de ce transporteur est en moyenne identique à celle de la citrate synthase (témoin de la masse mitochondriale) dans chaque tissu.

Une fois dans la mitochondrie, le pyruvate peut être transformé en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase ou acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase. Dans le premier cas, la pyruvate carboxylase est fortement exprimée dans les tissus auriculaires avec une expression multipliée par plus de 5 dans l'OD et plus de 3 dans l'OG par rapport au VG. L'expression de la pyruvate déshydrogénase est peu modulée mais son régulateur, la pyruvate déshydrogénase kinase isoforme 1 a une expression diminuée dans les tissus auriculaires par rapport au VG.

Devenir du Pyruvate	Protéines	Isoformes	$\frac{VD}{VG}$	$\frac{Sp}{VG}$	$\frac{OD}{VG}$	$\frac{OG}{VG}$	Code UniProt
En lactate (cytoplasmique)	Lactate Déshydrogénase	Chaîne A	-	-	0,36	0,35	P04642
		Chaîne B	-	-	0,32	0,28	P42123
Mitochondrial	Pyruvate Carrier	2	-	0,54	0,28	0,36	P38718
En Oxaloacétate (mitochondrial)	Pyruvate Carboxylase		-	-	5,51	3,39	P52873
En Acétyl-CoA	Pyruvate Déshydrogénase E1	$\alpha$	-	0,56	-	0,52	P26284
		$\beta$	-	0,61	-	-	P49432
	Pyruvate Déshydrogénase Kinase	1	-	0,62	0,39	0,26	Q63065
		2	1,50	-	1,85	-	Q64536

**Tableau 11 : Protéines impliquées dans le devenir du pyruvate.**

Les protéines sont issues d'une analyse protéomique et exprimées en fonction du rapport significatif obtenu à partir du VG. Les protéines et leurs isoformes sont identifiées par un code correspondant à la base de données Uniprot. Les couleurs représentent les protéines deux fois moins exprimées au minimum (en bleu) et deux fois plus exprimées au minimum (en rouge).

### 5.3.1.2 Métabolisme des acides gras

L'apport d'acétyl-CoA au cycle de Krebs est assuré par la glycolyse, mais également par la  $\beta$ -oxydation dans le tissu cardiaque. En effet, la  $\beta$ -oxydation ou hélice de Lynen permet d'apporter de l'acétyl-CoA au cycle de Krebs, mais également la réduction des co-enzymes (comme le FAD et le NAD<sup>+</sup>) à destination de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le transport des acides gras (Tableau 12) à travers la membrane interne mitochondriale se fait quant à lui par l'intermédiaire d'une molécule, la carnitine, prise en charge par les Carnitine O-palmitoyl transférase.

Protéines	Isoformes	$\frac{VD}{VG}$	$\frac{Sp}{VG}$	$\frac{OD}{VG}$	$\frac{OG}{VG}$	Code UniProt
<b><math>\beta</math> - Oxydation</b>						
Lipases	Monoglycéride lipase	0,67	-	-	-	Q8R431
	Lipoprotéine lipase	-	0,63	-	-	Q06000
Acyl CoA déshydrogénase	à chaîne courte	-	0,67	0,23	0,21	P15651
	à chaîne moyenne	-	0,57	0,21	0,19	P08503
	à chaîne longue	-	0,50	0,30	0,31	P15650
	à chaîne très longue	-	0,48	0,36	0,35	Q5M9H2
Enoyl CoA hydratase	mitochondriale	-	0,54	0,33	0,49	P14604
	Enzyme trifonctionnel sous unité $\alpha$	-	0,34	0,39	0,42	Q64428
L-3 hydroxyacyl CoA déshydrogénase	mitochondriale	0,67	0,49	0,52	0,33	Q9WVK7
	type 2	-	0,69	0,40	0,38	070351
Acetyl CoA C-acyltransférase	Enzyme trifonctionnel sous unité $\beta$	-	0,50	0,42	0,50	Q60587
	3 ketoacyl CoA mitochondriale	0,58	0,47	-	-	P13437
	3 ketoacyl CoA peroximale	-	-	1,95	-	P21775
<b>Transport des acides gras</b>						
Carnitine O-acyltransférase		-	-	0,23	0,23	Q704S8
Carnitine O-palmitoyl transférase	CPT 1 muscle isoform	-	0,48	2,85	-	Q63704
	CPT 1 liver isoform	-	0,19	-	-	P32198
	CPT 2	-	0,60	0,26	0,27	P18886

**Tableau 12 : Protéines impliquées dans le transport des acides gras et la bêta-oxydation.**

Les protéines sont issues d'une analyse protéomique et exprimées en fonction du rapport significatif obtenu à partir du VG. Les protéines et leurs isoformes sont identifiées par un code correspondant à la base de données Uniprot. Les couleurs représentent les protéines deux fois moins exprimées au minimum (en bleu) et deux fois plus exprimées au minimum (en rouge).

#### 5.3.1.2.1 Le transport mitochondrial des acides gras (Tableau 12)

Les Carnitine O-palmitoyl transférases possèdent deux protéines différentes renseignant sur leur localisation membranaire. La CPT1, sur le versant cytosolique de la membrane mitochondriale externe, possède une isoforme musculaire moins exprimée dans le Sp et triplé dans l'OD par rapport au VG. Son isoforme hépatique est également moins exprimée dans le Sp par rapport au VG. Les rapports obtenus pour la distribution de la CPT2, insérée dans la membrane interne mitochondriale, respectent ceux obtenus pour la masse mitochondriale.

#### 5.3.1.2.2 La $\beta$ -oxydation (Tableau 12)

D'une manière générale, les enzymes impliquées dans la  $\beta$ -oxydation sont exprimés avec des rapports en accord avec la masse mitochondriale pour tous les tissus. D'ordre général, le VD ne présente pas de différence avec le VG et le Sp présente deux fois moins d'enzymes de la  $\beta$ -oxydation des acides gras par rapport au VG. Les tissus auriculaires présentent un rapport de 0,30 en moyenne pour ces mêmes enzymes par rapport au VG.

### **5.3.2 Différences protéomiques régionales des oxydations phosphorylantes**

#### **5.3.2.1 Cycle de Krebs**

Le cycle de Krebs comporte une série d'enzymes, souvent indicatrice de la masse mitochondriale (Tableau 13).

Le VD possède un profil enzymatique similaire au VG, avec une enzyme du cycle de Krebs plus fortement exprimée, la citrate synthase et trois isoformes d'enzymes mitochondriales dont l'expression est plus faible que celle retrouvée dans le VG.

Le Sp possède une masse mitochondriale divisée par deux par rapport au VG, indiquée par la quantité de citrate synthase. Une majorité des enzymes du cycle de Krebs présentent donc une expression plus faible que dans le VG, notamment les protéines du complexe de l'oxoglutarate déshydrogénase ou encore une des sous unités de la succinate déshydrogénase.

Les enzymes mitochondriales atriales suivent le même schéma que les enzymes glycolytiques atriales, à savoir un rapport d'expression de 0,30 en moyenne par rapport au VG. Une faible expression de presque toutes les enzymes du cycle de Krebs est à noter dans les oreillettes au regard du VG. Cependant certaines exceptions existent. En effet, les enzymes suivantes sont exprimées en même quantité dans un des tissus atriales par rapport au VG : pour l'OD, les sous unité  $\alpha$  et  $\delta 3$  de

l'isocitrate déshydrogénase, ainsi que les deux sous unités de la succinate déshydrogénase ; pour l'OG : la sous unité  $\gamma$ 1 de l'isocitrate déshydrogénase.

Protéine	Isoformes	$\frac{VD}{VG}$	$\frac{Sp}{VG}$	$\frac{OD}{VG}$	$\frac{OG}{VG}$	Code UniProt
<u>Citrate synthase</u>		1,52	0,49	0,32	0,34	G3V936
<u>Aconitase</u>	mitochondriale		0,68	0,38	0,43	Q9ER34
<u>Isocitrate déshydrogénase</u>	mitochondriale	0,71	0,57	0,40	0,31	P56574
	mitochondriale (sous unité $\alpha$ )	-	0,68	-	0,42	Q99NA5
	mitochondriale (sous unité $\beta$ )	-	-	0,56	0,34	Q68FX0
	mitochondriale (sous unité $\gamma$ 1)	-	0,53	0,42	-	P41565
	mitochondriale (sous unité $\gamma$ 3)	-	-	-	0,37	Q5XIJ3
<u>Complexe oxoglutarate déshydrogénase</u>	E1	0,70	0,45	0,34	0,35	Q5X178
	E2	-	0,45	0,52	0,54	Q01205
	E3	-	-	0,61	0,51	Q6P6R2
<u>Succinyl-CoA synthétase</u>	succinyl CoA ligase (sous unité $\alpha$ )	-	-	0,34	0,22	P13086
<u>Succinate déshydrogénase</u>	sous unité iron-sulfur	-	0,46	-	0,69	P21913
	sous unité flavoprotéine	-	-	-	0,44	Q920L2
<u>Fumarase</u>		0,79	0,77	0,48	0,45	P14408
<u>Malate déshydrogénase</u>	mitochondriale	-	0,61	0,46	0,43	P04636

**Tableau 13 : Protéines impliquées dans le cycle de Krebs.**

Les protéines sont issues d'une analyse protéomique et exprimées en fonction du rapport significatif obtenu à partir du VG. Les protéines et leurs isoformes sont identifiées par un code correspondant à la base de données Uniprot. Les couleurs représentent les protéines deux fois moins exprimées au minimum (en bleu) et deux fois plus exprimées au minimum (en rouge).

Lorsque les profils d'expression de chaque tissu par rapport au VG sont analysés, une suspicion peut être faite sur le rendement total du cycle de Krebs. Les isoformes répertoriées comme ayant un profil d'expression similaire au VG, font parties de complexes enzymatiques impliqués dans la réduction des co-enzymes à destination de la chaîne respiratoire mitochondriale.

### 5.3.2.2 La chaîne respiratoire

Les distributions des sous-unités des 4 complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthétase respectent les rapports obtenus pour la citrate synthase, indicateur de la masse mitochondriale. Néanmoins chaque tissu présente certains rapports intéressants que nous allons maintenant décrire.

Le VD présente le même profil d'expression pour tous les complexes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase. Une exception apparaît pour la sous-unité 10 du sous-complexe  $\alpha 1$  du complexe I (Tableau 14). Un bémol est posé sur ce résultat, suggérant l'absence de cette sous-unité dans le VG. Cependant, il apparaît une différence dans l'expression de cette sous-unité entre le VG et les oreillettes. L'identification de cette sous-unité se base sur un peptide unique dans le rapport VD/VG ; et sur plusieurs peptides dans les rapports impliquant les oreillettes. Ce résultat surprenant pourrait donc être une « fausse infinité » dans le VD.

Dans le Sp, peu de différences d'expression ressortent en comparaison au VG, malgré la différence de masse mitochondriale. Toutefois, une protéine est présente cinq fois plus dans le Sp par rapport au VG : le cytochrome c. Cette protéine, présente dans l'espace intermembranaire mitochondriale, assure un bon transfert des électrons à travers les complexes III et IV de la chaîne respiratoire et est également responsable de l'activation des voies de signalisation cytosoliques aboutissant à l'apoptose. Il serait donc intéressant d'évaluer la sensibilité à l'apoptose des cardiomyocytes provenant du septum.

L'expression des autres complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase des tissus atriaux par rapport au VG est très hétérogène avec plusieurs points intéressants. Les expressions du complexe I sont en accord avec les rapports significativement plus faibles de la citrate synthase des oreillettes comparé au VG, indiquant donc une masse mitochondriale plus faible au niveau auriculaire (Tableau 15).

Le complexe II possède un profil d'expression similaire dans l'OD par rapport au VG et moins élevé dans l'OG par rapport au VG.

Le complexe III présente plusieurs différences frappantes. Premièrement, dans la répartition de ses sous-unités respiratoires, il est à noter l'absence de la sous-unité de Rieske dans l'OG par rapport au VG. Cette sous-unité est essentielle puisqu'elle possède l'un des centres d'oxydoréduction de ce complexe. Cependant l'OG, l'expression du cytochrome b5 est plus de deux fois plus importante par rapport au VG et cette sous-unité possède deux centres d'oxydoréduction pour le complexe III. Cette même sous-unité, localisée dans la membrane externe mitochondriale est également plus fortement exprimée dans l'OD par rapport au VG. Concernant l'OD, la sous-unité 2 principale possède également une expression très largement supérieure à celle du VG.

Au niveau la COX ou complexe IV, les profils atriaux d'expression comparés au VG semblent être en accord avec la masse mitochondriale, avec cependant un rapport d'expression de la COX2 un peu plus élevé que le rapport de la masse mitochondriale. Il y a également une certaine disparité dans les rapports des sous-unités accessoires de ce complexe.



Protéine	Isoformes	$\frac{VD}{VG}$	$\frac{Sp}{VG}$	$\frac{OD}{VG}$	$\frac{OG}{VG}$	Code UniProt
<b>COMPLEXE I : NADH déshydrogénase</b>						
<b><u>Sous unité principales</u></b>	Oxydoréductase 75kDa	1,38	-	0,61	0,45	Q66HF1
	Oxydoréductase chaîne 2	-	-	-	0,28	P11662
	Oxydoréductase chaîne 4	-	-	0,44	0,34	P05508
	Oxydoréductase chaîne 5	-	-	0,48	0,34	Q8SEZ0
	Déshydrogénase flavoprotéine 2	-	-	0,46	-	P19234
	Déshydrogénase iron-sulfur protéine 2	-	-	0,21	0,40	Q641Y2
<b><u>Sous-unité accessoires</u></b>	Oxydoréductase chaîne 1 (fragment)	-	0,64	0,27	0,25	Q8SEZ8
	Déshydrogénase flavoprotéine 1	-	-	-	0,31	Q5XIH3
	Déshydrogénase iron-sulfur protéine 4	1,35	-	-	-	Q5XIF3
	Déshydrogénase Fe-S protéine 3	-	-	0,72	0,47	D3ZG43
	Déshydrogénase Fe-S protéine 5	-	-	0,34	0,49	B5DEL8
	Déshydrogénase Fe-S protéine 7	-	-	-	0,42	Q5RJNO
	Déshydrogénase Fe-S protéine 8	-	0,74	0,72	0,46	BOBNE6
	Déshydrogénase subcomplexe $\alpha$ 1, sous unité 5	-	-	-	0,46	Q63362
	Déshydrogénase subcomplexe $\alpha$ 1, sous unité 9	-	-	0,54	0,57	Q5BK63
	Déshydrogénase subcomplexe $\alpha$ 1, sous unité 10	infinité	-	0,52	0,32	Q561S0
	Déshydrogénase subcomplexe $\alpha$ 1, sous unité 11	-	-	0,47	0,15	Q80W89
	Déshydrogénase subcomplexe $\alpha$ 1, sous unité 12	-	-	-	0,27	F1LXAO
	Déshydrogénase subcomplexe $\beta$ 1, sous unité 5	-	0,59	0,40	0,43	D4A565
	Déshydrogénase subcomplexe $\beta$ 1, sous unité 6	-	-	0,35	0,33	D3ZZ21
	Déshydrogénase subcomplexe $\beta$ 1, sous unité 7	-	-	0,17	0,21	D3ZLT1
	Déshydrogénase subcomplexe $\beta$ 1, sous unité 8	-	-	0,53	0,52	B2RYS8
	Déshydrogénase subcomplexe $\beta$ 1, sous unité 9	-	-	-	0,47	B2RYW3
	Déshydrogénase subcomplexe $\beta$ 1, sous unité 11	-	0,59	0,59	0,29	D4A7L4
	Déshydrogénase subcomplexe 1, sous unité C2	-	-	0,18	0,24	Q5PQZ9

**Tableau 14 : Protéines impliquées dans le complexe I de la chaîne respiratoire.**

Les protéines sont issues d'une analyse protéomique et exprimées en fonction du rapport significatif obtenu à partir du VG. Les protéines et leurs isoformes sont identifiées par un code correspondant à la base de données Uniprot. Les couleurs représentent les protéines deux fois moins exprimées au minimum (en bleu) et deux fois plus exprimées au minimum (en rouge).

Enfin, de grandes différences apparaissent dans la composition de la sous-unité F<sub>0</sub> ou « rotor » de l'ATP synthétase. La sous-unité a est présente en plus forte quantité dans les tissus atriaux. L'expression de la sous unité b est presque multipliée par 28 dans l'OD par rapport au VG et la sous unité AL6 multipliée par 15 dans l'OG par rapport au VG. En terme d'analyse protéique, il y a donc une différence significative de composition du « rotor » de l'ATP synthase dans les tissus atriales. Les sous-unités dites « stator » ou catalytiques de l'ATP synthétase possèdent des rapports supérieurs à 0,30 dans les tissus atriaux par rapport au VG.

Protéine	Isoformes	$\frac{VD}{VG}$	$\frac{Sp}{VG}$	$\frac{OD}{VG}$	$\frac{OG}{VG}$	Code UniProt
<b>COMPLEXE II : Succinate déshydrogénase</b>						
<b>Succinate Déshydrogénase</b>	sous-unité iron-sulfur	-	0,46	-	0,22	P13086
	sous-unité flavoprotéine	-	-	-	0,44	Q920L2
<b>COMPLEXE III: Complexe cytochrome bc1</b>						
<b>Sous unités respiratoires</b>	sous unité de Rieske	-	0,32	0,53	0,00	P20788
	sous unité b	-	-	0,47	0,32	P00159
	sous unité b5	-	-	-	2,67	P00173
	sous unité b5 type B	-	-	2,81	-	P04166
<b>Sous unités principales</b>	sous unité 1	-	-	0,33	0,44	Q68FY0
	sous unité 2	-	0,61	138,21	-	P32551
<b>Sous unités légères</b>	sous unité 7	-	-	0,25	0,43	B2RYS2
	sous unité 8	-	-	-	0,65	Q7TQ16
<b>Cytochrome c</b>		-	4,98	0,38	0,32	P62898
<b>COMPLEXE IV: Cytochrome c oxidase</b>						
<b>Sous unités principales</b>	COX 1	-	0,52	0,37	0,33	P05503
	COX 2	-	-	0,48	0,42	P00406
<b>Sous unités accessoires</b>	COX 4 isoforme 1	-	0,48	0,39	0,60	P10888
	COX 5A	-	-	0,30	0,44	P11240
	COX 5B	-	-	0,50	-	P12075
	COX 6A-2	-	-	0,29	0,22	P10817
	COX 6C-2	-	-	0,22	0,29	P11951
<b>ATP synthase</b>						
<b>F<sub>0</sub></b>	sous unité a	-	1,58	6,52	9,00	P05504
	sous unité b	-	0,46	27,43	-	P19511
	sous unité d	-	0,42	0,71	0,51	P31399
	sous unité e	0,59	-	0,36	0,31	P29419
	sous unité f	-	-	-	0,43	D3ZAF6
	sous unité g	-	-	0,31	0,49	Q6PDU7
	sous unité AL6	-	-	-	14,57	P11608
<b>F<sub>1</sub></b>	sous unité α	0,86	0,60	0,50	0,28	P29419
	sous unité β	-	0,54	-	0,47	P10719
	sous unité O	-	0,67	1,81	-	Q06647
	sous unité γ	-	-	-	0,32	P35435

**Tableau 15 : Protéines impliquées dans la chaîne respiratoire.**

Les protéines sont issues d'une analyse protéomique et exprimées en fonction du rapport significatif obtenu à partir du VG. Les protéines et leurs isoformes sont identifiées par un code correspondant à la base de données Uniprot. Les couleurs représentent les protéines deux fois moins exprimées au minimum (en bleu) et deux fois plus exprimées au minimum (en rouge).

### 5.3.2.3 Le stress oxydant

Beaucoup d'enzymes citées précédemment, comme la glutaminase par exemple, sont sensibles au stress oxydant. La chaîne respiratoire est la source principale de ROS dans les cellules, mais d'autres sources et/ou systèmes de défenses anti-oxydantes ont été répertoriées (Tableau 16). Les tissus atriaux possèdent certaines enzymes anti-oxydantes en plus fortes quantités par rapport au VG. La catalase est ainsi deux fois plus importante dans les tissus atriaux par rapport au VG. Il en est de même pour l'isoforme 3 de la glutathion peroxidase, dont l'expression est triplée ou plus dans ces tissus par rapport au VG. Il pourrait donc y avoir une protection contre le stress oxydant plus importante dans les oreillettes par rapport au VG.

Protéines	Isoformes	$\frac{VD}{VG}$	$\frac{Sp}{VG}$	$\frac{OD}{VG}$	$\frac{OG}{VG}$	Code UniProt
<b>Sources de ROS</b>						
Xanthine oxydase		-	0,76	0,30	0,55	P22985
<b>Systèmes anti-oxydants</b>						
Superoxide dismutase	[Cu-Zn]	0,61	-	-	-	P07632
	mitochondriale	-	1,67	0,41	0,36	P07895
Catalase		-	-	2,55	2,64	P04762
Glutathion peroxidase	1	-	-	0,35	0,28	P04041
	3	-	0,46	3,74	2,84	P23764
	peroxiderine-6	-	-	0,50	-	O35244

**Tableau 16 : Protéines impliquées dans le stress oxydant.**

Les protéines sont issues d'une analyse protéomique et exprimées en fonction du rapport significatif obtenu à partir du VG. Les protéines et leurs isoformes sont identifiées par un code correspondant à la base de données Uniprot. Les couleurs représentent les protéines deux fois moins exprimées au minimum (en bleu) et deux fois plus exprimées au minimum (en rouge).

### 5.3.3 Différences protéomiques régionales des canaux et échangeurs mitochondriaux

Les protéines incluses dans les processus issus des apports de substrats à la cellule cardiaque, comme dans les réactions énergétiques du métabolisme sont donc pour certaines très spécifiques de la chambre cardiaque étudiée. Afin de compléter la description des différences protéomiques entre ces compartiments, les principaux canaux et échangeurs mitochondriaux ont également été comparés (Tableau 17).

Protéines	Isoformes	$\frac{VD}{VG}$	$\frac{Sp}{VG}$	$\frac{OD}{VG}$	$\frac{OG}{VG}$	Code UniProt
<b>Canaux mitochondriaux</b>						
VDAC	1	1,57	-	2,04	1,80	Q972L0
	2	1,69	-	2,62	2,90	P81155
UCP	1	-	-	-	1981,13	P04633
<b>Phospho-transfert</b>						
ANT	1	3,72	-	1,83	0,47	Q05962
	2	-	-	2,33	1,77	Q09073
Créatine Kinase	type B	-	0,45	0,46	0,33	P07335
	type M	0,72	0,53	0,36	0,23	P00564
	type S	-	0,51	0,17	0,38	P09605
Adénylate kinase	1	-	-	0,20	0,33	P39069
	2	1,65	1,37	-	-	P29410
	3	-	-	-	1,44	Q6P2A5
	4	-	-	-	0,40	Q9WUS0

**Tableau 17 : Protéines membranaires mitochondriales et/ou impliquées dans le phospho-transfert.**

Les protéines sont issues d'une analyse protéomique et exprimées en fonction du rapport significatif obtenu à partir du VG. Les protéines et leurs isoformes sont identifiées par un code correspondant à la base de données Uniprot. Les couleurs représentent les protéines deux fois moins exprimées au minimum (en bleu) et deux fois plus exprimées au minimum (en rouge).

Le canal VDAC (Voltage Dependent Anion Channel), canal situé au niveau de la membrane externe mitochondriale et constituant une voie critique pour les flux de métabolites entre l'espace intermembranaire et le cytosol, se trouve en quantité deux fois supérieure dans le VD et les oreillettes comparés au VG.

Concernant les systèmes de phosphotransfert, essentiels dans les phénomènes bioénergétiques cardiaques, plusieurs protéines ont été comparées. Parmi les translocateurs mitochondriaux de nucléotides adényliques, ANT1 est plus exprimé dans le VD et l'OD mais sous exprimé dans l'OG par rapport au VG. L'ANT2, isoforme trouvée dans les fibroblastes de façon préférentielle, est plus exprimée dans les oreillettes par rapport au VG.

La créatine kinase, isoformes cytoplasmique ou mitochondriale, est moins présente dans le Sp et les oreillettes. Concernant l'adénylate kinase, l'isoforme cytoplasmique, AK1 est moins exprimée dans le tissu atrial par rapport au VG. Cependant, l'AK2, l'isoforme trouvée dans l'espace intermembranaire mitochondrial est plus présente dans le VD et le Sp et en quantité similaire dans les oreillettes par rapport au VG. La troisième isoforme, contenue dans la matrice mitochondriale, AK3, est présente de façon identique dans le Sp et l'OD et en quantité supérieure dans l'OG par rapport au VG. La distribution des différentes isoformes de cette enzyme ne correspond pas au rapport de la masse

mitochondriale. Cela confirme l'étude *in vitro*, observant un rôle notoire de ce phosphotransfert au sein des différents tissus cardiaques.

### **5.3.4 Différences protéomiques régionales de l'architecture cellulaire**

Les résultats observés sur fibres perméabilisées ont montré que l'architecture cellulaire a un rôle majeur de la bioénergétique dans les tissus cardiaques. L'expression des protéines impliquées dans cette architecture cellulaire est donc explorée (Tableau 18, Tableau 19, Tableau 20). D'une part, l'organisation spatiale permet des rapprochements entre les sites producteurs et consommateurs d'énergie ou au contraire peut être des entraves physique à la communication énergétique. D'autre part, les sites consommateurs d'énergie majoritaires dans le myocarde sont les ATPases des têtes de myosines. Dans un dernier point, il est important de souligner que la transmission électrique au sein du myocarde s'effectue le long des fibres musculaires et que le cytosquelette des myocytes définit leur orientation tridimensionnelle.

Le cytosquelette des cellules cardiaques est défini par trois complexes protéiques : les filaments d'actine dont les sarcomères font partie, les filaments intermédiaires et les microtubules.

#### **5.3.4.1 Filaments d'actine ou microfilaments**

Les microfilaments sont la structure du cytosquelette la plus abondante dans les cellules musculaires. Cette structure dynamique est composée d'actine polymérisée, déclinée en plusieurs classes. Chaque compartiment cardiaque semble être caractérisé par une isoforme d'actine particulière. Le VD présente davantage d' $\alpha$ -actine spécifique au muscle squelettique que le VG. Le Sp se caractérise par trois fois plus d'actine cytoplasmique 1 que dans le VG, isoforme qui est également doublée dans les tissus atriaux par rapport au VG. L'OD présente plus de quatre fois plus d' $\alpha$ -actine spécifique au muscle cardiaque par rapport au VG et l'OG présente 25 fois plus d'actine spécifique du muscle lisse aortique comparé au VG.

Les filaments d'actine sont des structures dynamiques possédant plusieurs protéines actrices dans la stabilisation, l'initialisation de la polymérisation ou la dégradation des filaments. La CapZ ou F-actin capping se fixe sur le pôle positif du filament et induit un ralentissement de sa polymérisation. Cette protéine est répartie de façon homogène au sein des tissus, cependant une expression plus faible que dans le VG de l'isoforme  $\alpha 1$  dans le Sp et une expression multipliée par 5 dans les tissus atriaux de l'isoforme  $\beta$  sont notées. Le complexe initiateur (ARP 2/3) de la polymérisation est trouvé en plus faible quantité dans les tissus atriaux. Enfin, la gelsoline, protéine impliquée dans la dégradation des filaments d'actine, est 3 et 6 fois plus présente dans l'OD et l'OG respectivement par rapport au VG. Les filaments d'actine sont donc composés de classes d'actine différentes au sein des chambres

cardiaques et présentent des dynamiques différentes avec des protéines de stabilisation et de dégradation plus présentes au sein des tissus atriaux.

D'autres protéines des microfilaments sont des indicateurs de l'organisation spatiale des filaments entre eux, telle que la filamine et l' $\alpha$ -actinine. Ces deux protéines ont une expression augmentée dans l'ensemble des tissus cardiaques en comparaison au VG. La filamine  $\alpha$  est présente entre deux et trois fois plus dans le VD, le Sp, l'OD et l'OG par rapport au VG. L' $\alpha$ -actinine 1 est présente quatre fois plus dans le VD et plus de six fois plus dans les tissus atriaux par rapport au VG. Son isoforme 4 est plus présente dans tous les tissus par rapport au VG.

Protéines	Isoformes	$\frac{VD}{VG}$	$\frac{Sp}{VG}$	$\frac{OD}{VG}$	$\frac{OG}{VG}$	Code UniProt
<b>Filaments d'actine</b>						
<u>Actine</u>	$\alpha$ (muscle squelettique)	1,88	-	-	-	P68136
	$\alpha$ (muscle cardiaque 1)	-	-	4,41	-	P68035
	1 (cytoplasmique)	-	3,06	1,64	1,95	P60711
	(muscle lisse aortique)	-	-	-	24,99	P62738
<u>CapZ</u> ou <u>F actin-capping</u>	$\alpha$ 1	-	0,43	-	-	B2GUZ5
	$\alpha$ 2	0,63	-	-	-	Q3T1K5
	$\beta$	-	-	5,06	5,20	Q5X132
<u>Complexe ARP2/3</u>	ARP 2	-	-	0,32	0,35	Q5M7U6
	ARP 3	0,81	-	0,25	0,51	Q4V7C7
	Sous unité 3	-	0,53	0,44	-	B2GV73
<u>Gelsoline</u>		-	-	2,74	5,92	Q68FP1
<u>Filamine</u>	$\alpha$	2,11	2,00	1,92	3,57	COJPT7
<u><math>\alpha</math> actinine</u>	1	4,19	-	6,70	6,10	Q9Z1P2
	4	3,21	2,05	4,47	3,80	Q9QXQ0

**Tableau 18 : Protéines impliquées dans les filaments d'actine.**

Les protéines sont issues d'une analyse protéomique et exprimées en fonction du rapport significatif obtenu à partir du VG. Les protéines et leurs isoformes sont identifiées par un code correspondant à la base de données Uniprot. Les couleurs représentent les protéines deux fois moins exprimées au minimum (en bleu) et deux fois plus exprimées au minimum (en rouge).

### 5.3.4.2 Sarcomères

Les microfilaments cardiaques présentent des faisceaux contractiles en quantités moins importantes dans le VG en comparaison aux autres régions cardiaques étudiées. A l'image de l' $\alpha$ -

actinine, les protéines jouant un rôle dans l'organisation des sarcomères sont moins présentes dans le VG par rapport aux autres tissus cardiaques.

La tropomoduline coiffe l'extrémité négative des filaments d'actine et est plus présente dans les tissus atriaux par rapport au VG. La myosine impliquée dans la contraction cardiaque appartient à la classe Myosine II ou myosine conventionnelle. Elle est composée de 2 chaînes lourdes à activité ATPasique (MHC) et 4 chaînes légères (MLC). Parmi les isoformes de myosine appartenant à cette classe, la majorité de chaînes lourdes sont moins exprimées dans le VG. La MHC 6 ou  $\alpha$  spécifique au tissu cardiaque, est présente en quantité similaire dans le Sp, doublée dans le VD et multipliée par 4 dans les tissus atriaux par rapport au VG. La seconde isoforme cardiaque-spécifique, MHC 7 ou  $\beta$ , est doublée dans les tissus ventriculaires et presque multiplié par 5 dans les oreillettes par rapport au VG. Deux autres isoformes présentent un schéma d'expression intéressant. La MHC 10, non musculaire est plus que doublée dans les tissus ventriculaires, et les tissus atriaux présentent une très forte expression de cette isoforme, avec des rapports de 16 et 31 pour l'OD et l'OG respectivement. La MHC 11, ou spécifique du muscle lisse, présente une expression identique au VG dans l'OD, mais est plus présente dans les autres tissus par rapport au VG.

Concernant les chaînes légères, certaines isoformes sont connues comme spécifique au ventricule ou à l'oreillette. Ainsi, la MLC 2, spécifique des ventricules est exprimée de manière similaire dans le VD, le Sp et le VG, mais est beaucoup moins exprimée dans les oreillettes. De la même manière, la MLC 3 décrite comme une isoforme cardiaque, est bien plus exprimée dans le Sp, et son expression est doublée dans le VD par rapport au VG, mais bien moins exprimée dans les oreillettes. Il existe des isoformes de chaînes légères de myosines spécifiques du tissu atrial, comme la MLC 4, isoforme également connue comme étant embryonnaire, et la MLC7 qui sont toutes les deux très fortement exprimée dans les oreillettes. De façon intéressante, ces deux isoformes sont surexprimées dans le VD. L'isoforme de chaîne légère spécifique du muscle lisse, MLC12B, apparaît plus présente uniquement dans les tissus atriaux, avec une expression multipliée par 800 dans l'OD. Ce dernier résultat est surprenant puisque la MHC spécifique au muscle lisse ne révèle pas de différences dans le profil d'expression de l'OD par rapport au VG.

Plusieurs protéines impliquées dans le phénomène de contraction, notamment la troponine et la tropomyosine, présentent des différences d'expression entre les tissus cardiaques. La troponine possède 3 isoformes (I, T et C) dont les fonctions sont différentes. Les isoformes inhibitrice (troponine I) et liant la tropomyosine (troponine T) sont plus exprimées dans chaque tissu par rapport au VG. Cependant une différence apparaît pour l'isoforme liant le calcium (troponine C) dont l'expression est similaire pour les tissus ventriculaires mais est plus élevée dans les tissus atriaux. La tropomyosine est composée de deux chaînes,  $\alpha$  et  $\beta$ . Le Sp ne présente pas de différences dans l'expression de ces isoformes. La chaîne  $\alpha$ 1 est deux fois plus exprimée dans le VD, six fois plus dans l'OD et quatre fois

plus dans l'OG par rapport au VG. Deux autres isoformes de la chaîne  $\alpha$ , les chaînes  $\alpha_3$  et  $\alpha_4$  sont plus présentes uniquement dans l'OG par rapport au VG. De façon intéressante, la chaîne  $\beta$  quant à elle, est moins présente dans chaque compartiment par rapport au VG, excepté le Sp.

Protéines	Isoformes	$\frac{VD}{VG}$	$\frac{Sp}{VG}$	$\frac{OD}{VG}$	$\frac{OG}{VG}$	Code UniProt
<b>Sarcomères</b>						
<u>Tropomoduline</u>	1	-	-	7,10	5,32	P70567
<u>Myosine II</u> <u>Chaines lourdes</u>	6	2,23	-	4,74	4,53	G3V885
	7	2,14	2,57	4,52	5,08	G3V8B0
	9	-	0,47	2,53	3,27	G3V6P7
	10	3,72	2,58	16,08	31,15	Q9JLT0
	11	2,85	2,57	-	5,06	E9PTU4
<u>Myosine II</u> <u>Chaines légères</u>	2	1,89	-	0,08	0,08	P08733
	3	2,47	1096,7	0,15	0,13	P16409
	4	7,85	-	301,82	133,31	P17209
	6	-	1,81	2,78	3,80	Q64119
	7	1,66	2,52	91,66	111,44	F1M7K3
	12B	-	-	890,03	4,77	P18666
	MYLK3	-	-	3,33	3,10	E9PT87
<u>Troponine</u>	isoforme I	2,89	8,12	4,40	6,70	P23693
	isoforme T	2,10	3,45	3,30	3,94	P50753
	isoforme C	-	-	4,69	3,99	Q4PP99
<u>Tropomyosine</u>	chaîne $\alpha_1$	2,32	-	6,05	4,41	P04692
	chaîne $\alpha_3$	-	-	-	2,72	Q63610
	chaîne $\alpha_4$	-	-	-	2,66	P09495
	chaîne $\beta$	0,68	-	0,27	0,47	P58775

**Tableau 19 : Protéines impliquées dans les sarcomères.**

Les protéines sont issues d'une analyse protéomique et exprimées en fonction du rapport significatif obtenu à partir du VG. Les protéines et leurs isoformes sont identifiées par un code correspondant à la base de données Uniprot. Les couleurs représentent les protéines deux fois moins exprimées au minimum (en bleu) et deux fois plus exprimées au minimum (en rouge).

### 5.3.4.3 Filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont un élément central du cytosquelette, impliqués dans les jonctions cellule à cellule ou encore l'ancrage des cellules à une lame basale. Certaines protéines composant les



filaments intermédiaires sont également des marqueurs de type tissulaire, permettant de mieux caractériser l'hétérogénéité des tissus cardiaques (Tableau 20).

La jonction cellule-cellule est assurée par, entre autre, la plakoglobine ou la cadhérine. Les plakoglobines font partie de la structure des desmosomes et sont quatre fois plus présentes dans les tissus atriaux par rapport au VG. Les cadhérines 2 sont plus présentes dans les compartiments cardiaques droits, et l'OG par rapport au VG. L'isoforme 23 est moins présente uniquement dans l'OD par rapport au VG.

La jonction cellulaire à la lame basale est pris en charge par la plectine ou encore la famille des intégrines. Concernant la plectine, ces protéines sont plus exprimées dans les tissus atriaux par rapport au VG, d'autant plus dans l'OD. La chaîne  $\beta 1$  des intégrines est retrouvée en plus faible quantité dans le Sp par rapport au VG. Il y a donc une différence dans la composition des desmosomes et hémidesmosomes entre les tissus cardiaques, impliquant des jonctions cellules-cellules ou cellules-lame basale hétérogènes au sein du tissu cardiaque.

Certaines protéines des filaments intermédiaires sont des marqueurs tissulaires, comme la kératine pour l'épithélium, la desmine pour les cellules musculaires, la vimentine trouvée dans les fibroblastes ou encore la lamine soutenant l'enveloppe nucléaire. La kératine est moins présente dans les tissus atriaux par rapport au VG. La desmine au contraire, est bien moins présente dans le VG par rapport aux autres tissus cardiaques, avec une forte différence dans les oreillettes, notamment l'OD. Les fibroblastes, *via* la vimentine, constituent une partie moins importante du tissu ventriculaire gauche par rapport aux autres tissus, où l'expression est trois fois plus forte dans le VD et le Sp et dix fois plus importante dans les oreillettes. Enfin, le soutien de l'enveloppe nucléaire par la lamine de type A est moins présent dans le VG, de manière croissante, par rapport au VD, au Sp, à l'OG et à l'OD. Ces deux derniers tissus présentent également une expression plus élevée de lamine de type B1, isoforme ubiquitaire des lamines, que dans le VG.

#### **5.3.4.4 Microtubules**

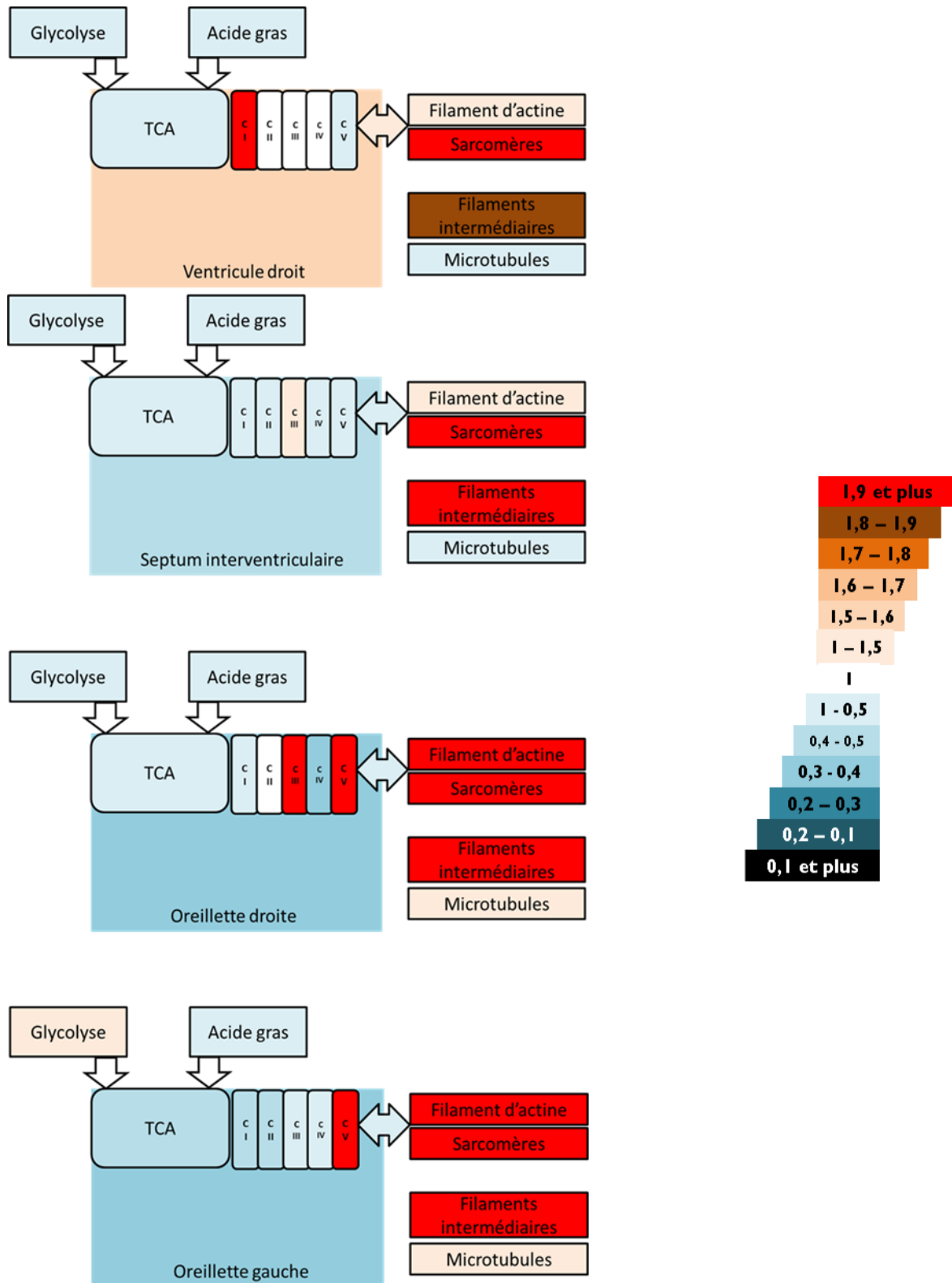
Les filaments de tubuline forment des structures très dynamiques, impliquées dans beaucoup de phénomènes cellulaires. Les microtubules représentent 10 à 20% des protéines des cellules nerveuses. Ils s'assemblent en deux chaînes distinctes appelées  $\alpha$  et  $\beta$ . La représentation des différentes isoformes des deux types de chaînes est inhomogène dans les tissus cardiaques. L'isoforme  $\alpha 1B$  est plus exprimée dans l'OD uniquement par rapport au VG. L'isoforme  $\alpha 8$  est plus exprimée dans le Sp et le VG. Les isoformes  $\beta 2A$  et  $\beta 3$  sont surexprimées dans les tissus atriaux par rapport au VG.

Protéines	Isoformes	$\frac{VD}{VG}$	$\frac{Sp}{VG}$	$\frac{OD}{VG}$	$\frac{OG}{VG}$	Code UniProt
<b>Filaments intermédiaires</b>						
<u>Plakoglobine</u>		-	-	4,15	4,62	Q6POK8
<u>Cadhérine</u>	2	2,00	-	3,67	1,96	Q9Z1Y3
	23	-	-	0,46	-	P58365
<u>Plectine</u>		-	1,88	9,37	5,95	P30427
<u>Intégrine</u>	chaîne $\beta$ 1	-	0,50	-	-	P49134
<u>Kératine</u>	type I cytosquelettal 18	-	-	0,30	0,19	Q5BJY9
<u>Desmine</u>		2,29	0,52	7,97	4,12	Q6P725
<u>Vimentine</u>		3,03	2,38	11,47	10,36	P31000
<u>Lamine</u>	type A	6,04	12,81	24,08	17,64	G3V8L3
	type B1	-	-	8,67	20,95	P70615
<b>Microtubules</b>						
<u>Tubuline</u>	$\alpha$ 1A	-	0,43	-	-	P69897
	$\alpha$ 1B	-	-	2,39	-	Q6P919
	$\alpha$ 8	0,47	-	0,01	0,02	Q6AY26
	$\beta$ 2A	-	-	1,94	2,45	P85108
	$\beta$ 3	-	-	1,91	1,48	Q4QRB4
	$\beta$ 5	-	0,57	0,61	-	P69897

**Tableau 20 : Protéines impliquées dans les filaments intermédiaires et les microtubules.**

Les protéines sont issues d'une analyse protéomique et exprimées en fonction du rapport significatif obtenu à partir du VG. Les protéines et leurs isoformes sont identifiées par un code correspondant à la base de données Uniprot. Les couleurs représentent les protéines deux fois moins exprimées au minimum (en bleu) et deux fois plus exprimées au minimum (en rouge).

En résumé, les résultats issus de l'analyse protéomique permettent de mettre en évidence des contenus protéiques spécifiques des oreillettes et du septum en comparaison des ventricules. Ces différences issues de résultats semi-quantitatifs reposent sur des paramètres énergétiques, métaboliques mais également au niveau du cytosquelette. Ces trois paramètres ont été proposés comme partenaires de la régulation de la fonction mitochondriale *in vitro* et *ex vivo*. La Figure 48 reprend d'ailleurs les résultats principaux énoncés dans cette partie.



**Figure 48 : Profil général des quantités de protéines dans chaque tissu cardiaque par rapport au VG.**

Les différences moyennes des protéines de la glycolyse, l'oxydation des acides gras (Acide gras), le cycle de Krebs (TCA), les complexes de la chaîne respiratoire (C I, C II, C III, C IV et C V) et le cytosquelette (Filaments d'actine, sarcomères, filaments intermédiaires et microtubules) sont indiquées par des rapports représentés par un système de pseudo-couleur (couleur froide : plus de protéine dans le VG ; couleur chaude : plus de protéines dans le compartiment étudié par rapport au VG).



# **DISCUSSION, CONCLUSION & PERSPECTIVES**

## 6 DISCUSSION, CONCLUSIONS, PERSPECTIVES

Dans ces travaux de thèse, les résultats obtenus suggèrent fortement l'existence d'un lien étroit entre la régulation de la fonction mitochondriale et le développement de troubles du rythme cardiaque. Cette régulation énergétique est différente en fonction du type de tissus cardiaques, auriculaire ou ventriculaire, et pourrait également différer dans chacun de ces tissus en fonction de la demande énergétique.

Le chapitre précédent relate et commente un grand nombre de caractéristiques énergétiques influençant cette régulation de l'activité mitochondriale et donc potentiellement la balance du système entre producteur et consommateur d'énergie. Nous avons choisi d'orienter cette partie « Discussion » vers une analyse des résultats potentiellement impliqués dans les mécanismes « candidats » pour les pathologies du trouble du rythme. En effet, malgré le nombre important de cas de morts subites dans le monde, les mécanismes qui expliquent les arythmies ventriculaires sont encore mal compris. Depuis plus de 20 ans, un certain nombre d'études mettent en évidence le rôle potentiel de la mitochondrie dans la genèse de ces arythmies. Dans de nombreux cas de pathologies, le statut énergétique cardiaque est affecté (Lygate et al., 2013b), ce qui influence indirectement le potentiel d'action sarcolemmal par l'intermédiaire des canaux potassiques ATP dépendants ( $\text{sarck}_{\text{ATP}}$ ) (Aon et al., 2003). Un courant d'études, menées en partie à Baltimore par l'équipe de B. O'Rourke, s'est attaché à décrire les mécanismes passant par la régulation de ces canaux potassiques ATP dépendants, afin d'en comprendre leurs effets sur l'hétérogénéité du potentiel membranaire menant aux arythmies (O'Rourke, 2000). Les variations au niveau des courants associés aux  $\text{sarck}_{\text{ATP}}$  et par conséquent de la durée du potentiel d'action ont été montrées comme intimement liés à l'activité des mitochondries. Ainsi, à ce niveau, les auteurs ont étudiés, majoritairement dans des expérimentations d'ischémie-reperfusion, des paramètres tels que le pore de transition mitochondrial (Halestrap and Pasdois, 2009) ou des canaux mitochondriaux ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ , MCU). Bien que ces travaux soient particulièrement intéressants pour comprendre les mécanismes mitochondriaux en relation avec les arythmies, il nous a semblé important de placer notre discussion à un niveau d'intégration supérieur, dans l'objectif d'un transfert de nos résultats à la clinique. Le système énergétique cardiaque est ainsi étudié dans sa globalité, décrit à partir de deux modules énergétiques, producteur (compartiment mitochondrial) et consommateur (compartiment myofibrillaire et pompes ATP dépendantes), reliés par un flux énergétique commun transmis par des systèmes spécifiques dénommés « phosphotransferts », dépendants de la créatine (Hoerter et al., 1994; Ventura-Clapier et al., 1998) ou de l'adénylate kinase (Dzeja and Terzic, 2009).

**Dans un premier temps**, un protocole de stimulation électrique sur cœurs perfusés en mode Langendorff a permis d'étudier l'impact de deux perturbateurs de l'homéostasie énergétique sur la susceptibilité du myocarde à développer des arythmies. Afin de perturber le statut énergétique, l'appareil contractile d'une part et le phosphotransfert médié par l'adénylate kinase (AK) d'autre part ont été inhibés respectivement par la blebbistatine et l'ap5a. Lors de cette étude deux classes de cœurs ont été répertoriés : les cœurs développant des arythmies (A) ou non (NA) suite à une stimulation électrique. Les valeurs ainsi que l'évolution de la consommation d'oxygène dans ces deux classes de cœurs avant et pendant chaque stimulation étaient différentes. Nous montrons que la capacité d'adaptation du myocarde suite à l'application d'un stress électrique pourrait être en relation avec la susceptibilité de ces myocards à développer des arythmies ventriculaires.

**La deuxième partie du projet** a eu pour but de mettre en évidence les différences bioénergétiques au sein de chacun des tissus cardiaques, auriculaire et ventriculaire. Les réponses de chaque compartiment cardiaque à un même type de dysfonction électrophysiologique sont en effet reconnues pour être très spécifiques de la région cardiaque. L'étude oxygraphique que nous avons réalisé sur fibres isolées et perméabilisées, nous a permis de définir plus précisément les conséquences de l'inhibition des myosines ATPases et/ou de l'AK sur la fonction mitochondriale dans chacun des compartiments cardiaques. De manière intéressante, nous avons pu observer une hétérogénéité importante de la réponse mitochondriale suite aux modifications des concentrations de nucléotides adényliques au sein des différentes régions du myocarde. Nous montrons, comme d'autres auteurs précédemment (Anflous et al., 1997; Ventura-Clapier et al., 1998) que l'oreillette est caractérisée par une faible sensibilité mitochondriale à l'ADP, et que celle-ci est améliorée en présence de créatine démontrant un faible couplage par la CK entre les sites de production et de consommation dans cette chambre cardiaque (Anflous, 1997). A l'inverse, un couplage optimal entre la mitochondrie et les sites consommateurs d'énergie est montré dans les fibres ventriculaires. De manière intéressante, la flexibilité des oreillettes quant à l'utilisation des mécanismes de phosphotransferts énergétiques serait meilleure comparée à celle du ventricule. Cette caractéristique est essentielle pour une réponse adaptée en cas de dysfonctionnement subit ou chronique du rythme cardiaque.

**Finalement**, les hypothèses mécanistiques proposées sur la base des résultats obtenus *in vitro* et *ex vivo* ont pu être étayées par les données issues de l'étude protéomique effectuée sur les échantillons préparés à partir des différentes régions cardiaques.

## 6.1 Réponses énergétiques mitochondriales et susceptibilité aux arythmies ventriculaires

L'étude de l'évolution de la consommation d'oxygène du myocarde, et donc de la fonction mitochondriale *in situ*, en réponse à une stimulation électrique suffisamment intense pour déclencher des arythmies ventriculaires est très peu décrite dans la littérature. Grâce aux mesures en temps réel de la consommation en oxygène des cœurs perfusés, nous avons pu, au sein du groupe contrôle, montrer l'existence de deux classes de myocarde, la classe arythmique (A) et la classe non-arythmique (N.A) (Figure 39 et Figure 40). Dans le groupe de cœurs Contrôle, la stimulation électrique induit une augmentation de la consommation d'oxygène myocardique de plus de 50 % (Figure 39) probablement liée à une augmentation consécutive de la concentration calcique intracellulaire provenant d'un dysfonctionnement consécutif des canaux ioniques dont les canaux calciques (Eisner, 2014). Dans ce cas, le stimulus électrique va se traduire fonctionnellement par une activation de la chaîne respiratoire mitochondriale et concrètement par une augmentation de la consommation d'oxygène du myocarde. Basées sur la théorie d'une activation parallèle du cœur par le calcium (Balaban, 2002), ces dépolarisations successives du myocarde induites par l'application de ce stimulus électrique activeraient donc également fortement le module consommateur par les myosines ATPases. Des études avaient d'ailleurs montré précédemment l'évolution de la consommation d'oxygène en fonction de différents niveaux de stimulations électriques. Marshall RC et al. par exemple, mettaient en évidence une absence de perturbation de la balance énergétique dans le cas d'une stimulation électrique visant à augmenter le travail cardiaque en imposant une fréquence cardiaque supérieure à la normale dans des cœurs perfusés de lapin (Marshall et al., 1986). Cette étude démontre donc la capacité du compartiment mitochondrial à maintenir l'homéostasie énergétique suite à une augmentation de l'activité myocardique (Balaban, 2006; Deschodt-Arsac et al., 2013; Saks et al., 2006). Cependant dans l'étude de Marshall, la stimulation électrique avait pour but d'augmenter l'activité myocardique et non de déclencher des arythmies ventriculaires. Il serait donc intéressant d'étudier l'évolution du statut énergétique ( $\Delta G_p$ ) en réponse à une stimulation électrique induisant des arythmies ventriculaires. Une hypothèse de travail pourrait être que la susceptibilité du myocarde à développer des arythmies ventriculaires, secondairement à une stimulation électrique, serait influencée par la capacité de synthèse d'ATP mitochondriale. Ainsi, si l'augmentation de la « dépense » énergétique, induite par la stimulation électrique, ne peut être compensée par une synthèse d'ATP suffisante, le myocarde développerait des arythmies. Les résultats présentés dans le Tableau 3 montrent que le pourcentage de myocarde du groupe contrôle développant des arythmies ventriculaires augmente en parallèle à la durée de stimulation. L'amplitude de la surcharge calcique induite par la stimulation électrique serait alors en partie dépendante de la vitesse de recapture ATP-



dépendante du calcium par la SERCA. Néanmoins, 30 secondes de stimulation électrique ne sont pas suffisantes pour induire l'arythmie ventriculaire dans la totalité des myocardes. L'étude de l'évolution de la consommation d'oxygène du myocarde suite à 30 secondes de stimulation électrique est présentée Figure 39. Cette figure montre que la vitesse à laquelle la consommation d'oxygène du myocarde augmente est supérieure dans la classe de myocarde non-arythmique (NA) en comparaison à la classe arythmique (A). Afin de poursuivre le raisonnement, il est important de partir du postulat que la « dépense » énergétique induite par la stimulation électrique ait été équivalente dans les classes NA et A (ce qui devrait à priori être le cas dans notre étude). Dans ces conditions, les résultats de la Figure 39 peuvent être interprétés de la façon suivante : plus la réactivité du compartiment mitochondrial à l'augmentation de la demande énergétique est rapide, moins les myocardes développent des arythmies ventriculaires. Il est donc possible que dans le modèle utilisé, la susceptibilité du myocarde à développer des arythmies ventriculaires induites par une stimulation électrique dépende au moins de deux facteurs. Le premier facteur serait représenté par le « coût » global de la dépense énergétique induite dans le myocarde. Le deuxième serait représenté par la capacité du myocarde à rapidement compenser cette « dépense » énergétique pour éviter le développement d'une instabilité électrique durable. Il est possible expérimentalement de faire varier le premier facteur en modulant la durée du stimulus. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que les travaux préliminaires de notre groupe montrent que lorsque la performance cardiaque est fortement inhibée (plus de 50 % de diminution du PPF), il devient pratiquement impossible d'induire des arythmies ventriculaires avec une stimulation électrique de 30 secondes. La diminution de la performance contractile influence directement l'amplitude de la réponse du compartiment mitochondrial. En effet, moins la demande énergétique est importante avant la stimulation électrique et plus la capacité du système à rapidement répondre à une augmentation de cette demande est importante. Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi l'inhibition complète de l'activité mécanique du myocarde à l'aide d'un découplant mécanique a un effet anti-arythmique (Lou et al., 2012). Nos expériences montrent que le produit pression-fréquence (PPF) moyen, mesuré juste avant la stimulation électrique, tend à être plus faible dans la classe NA en comparaison à la classe A. Néanmoins, la variabilité des mesures ainsi que la taille de l'échantillon ne permettent malheureusement pas de le démontrer significativement. Afin d'étayer d'avantage cette hypothèse de travail, il pourrait être intéressant de mesurer l'impact de stimulations électriques de durées croissantes sur l'évolution du rapport PCr sur ATP. Les durées de stimulation (de 5 à 30 secondes) étant très courte, une approche par RMN du  $^{31}\text{P}$  est cependant difficilement réalisable. En revanche, il serait possible de « freeze-clamper » les myocardes et d'étudier par des méthodes biochimiques leurs contenus en intermédiaires énergétiques. Ces expériences pourraient être réalisées dans des

myocardes pour lesquels la performance mécanique serait imposée, avant la stimulation électrique, par la quantité de calcium présente dans la solution de perfusion par exemple.

Les épisodes de stimulation électrique de nos protocoles imposaient au myocarde de se contracter à une fréquence 6 fois plus élevée que sa fréquence sinusale (30 hertz versus 5 hertz respectivement) impliquant une demande très importante de l'appareil contractile. En accord avec les travaux précédents sur la régulation énergétique cardiaque (Deschodt-Arsac et al., 2013; Diolez et al., 2007), ainsi qu'avec les travaux relatifs au couplage entre mitochondrie et appareil contractile effectués notamment par l'équipe de V. Saks (Guzun et al., 2011; Saks et al., 2010), nous avons inhibé certains compartiments cellulaires du système énergétique afin de caractériser la réponse mitochondriale dans ces situations modulées. L'inhibiteur des myosines choisi dans notre étude est la blebbistatine. Cette molécule est décrite comme un inhibiteur spécifique des myosines II et empêche l'hydrolyse d'ATP par les têtes de myosines. La blebbistatine induit, suite de 10 minutes de perfusion à une concentration de 0,1  $\mu\text{mol/L}$ , une diminution parallèle du RPP et de la  $\text{MVO}_2$  sans modifications du rendement cardiaque.

Sur la base du raisonnement développé dans le paragraphe précédent, nous avons évalué si cette inhibition partielle de la demande énergétique, pendant la stimulation électrique, avait un impact sur la proportion des myocardes développant des troubles du rythme. La Figure 35 et le Tableau 3 montrent que la blebbistatine augmente la susceptibilité aux arythmies ventriculaires induites par une courte stimulation électrique. L'obtention de ce résultat peut paraître surprenant par rapport au caractère anti-arythmique de la blebbistatine évoqué antérieurement dans la littérature (Lou et al., 2012), notamment pour les études en « optical mapping » pour lesquelles des « découplants » excitation-contraction sont couramment utilisés. Ces études comparent certains découplants afin d'optimiser leur utilisation pour cette technique expérimentale, en diminuant voire éliminant totalement les effets secondaires de la drogue sur l'électrophysiologie cardiaque. Par comparaison au 2,3-butanedione monoxime (BDM), autre découplant, Lou Q. et al. mettent ainsi en évidence l'absence d'effet de la blebbistatine comparé au BDM sur la vulnérabilité aux arythmies dans les cœurs de lapin (Lou et al., 2012). Dans notre étude, bien qu'un nombre d'arythmies plus important soit observé suite à 5 secondes de stimulation, les cœurs sont plus résistants à l'induction électrique pour des durées de stimulation supérieures, montrant également un nombre d'ectopies inférieurs lors des phases de récupération. La concentration de blebbistatine que nous avons utilisée pourrait donc permettre de diminuer la sensibilité des myofilaments (troponine C) au calcium, ce qui de fait pourrait expliquer la réduction de la fréquence des battements ectopiques (Venkataraman et al., 2013) et donc réduire le nombre de cœurs partant en arythmies dans notre protocole. Cette hypothèse est intéressante à exploiter dans le cas où cette sensibilité de la troponine C au calcium soit effectivement augmentée

lors d'épisodes de stimulations électriques (Huke and Knollmann, 2010). La blebbistatine aurait ainsi pour effet de contrecarrer l'effet délétère issu de l'augmentation trop importante de la sensibilité des myosines au calcium.

Le fait que nous montrions des différences entre nos résultats suite à 5 secondes de stimulation et ceux de la littérature montrant le caractère anti-arythmique de cette drogue peut reposer sur la concentration de blebbistatine utilisée. L'activité mécanique doit être suffisamment inhibée pour exercer un effet totalement anti-arythmique. Notre objectif n'était pas de bloquer totalement l'activité du consommateur d'énergie, mais uniquement d'inhiber légèrement la demande afin de quantifier la réponse énergétique mitochondriale. Il serait néanmoins nécessaire dans le futur de réaliser une courbe dose-réponse afin de caractériser plus finement ce « seuil anti-arythmique » sur cœur battant.

Une seconde modulation du système a été réalisée par addition d'ap5a dans le perfusât. Dans ce cas où le phosphotransfert AK-dépendant est inhibé, les cœurs ont une très forte tendance à partir en arythmies suite aux épisodes de stimulation électrique. L'inhibition de ce phosphotransfert « empêche » ainsi le système cardiaque d'utiliser un de ces « couplages » entre appareil contractile et compartiment mitochondrial (Nadtochiy et al., 2006) induisant des épisodes soutenus d'arythmies pour une grande majorité des cœurs testés. Ces résultats illustrent le rôle important de l'AK dans la régulation énergétique cardiaque, spécifiquement lors d'épisodes d'induction d'arythmies. Le rôle de ce phosphotransfert AK-dépendant avait été peu évoqué dans les travaux antérieurs portant sur la régulation énergétique cardiaque sur cœur entier battant, ces travaux portant pour la plupart sur les régulations des modules producteur et consommateur énergétiques (Calmettes et al., 2010; Deschodt-Arsac et al., 2010, 2013). Pourtant dès 1997, dans une comparaison entre l'activité mitochondriale auriculaires et ventriculaires, des auteurs avaient émis l'hypothèse d'un possible rôle de l'AK dans la régulation énergétique spécifique des oreillettes (Anflous et al., 1997). Nous pouvons penser que dans les conditions de cœurs sains dont les modulations sont proches de l'état stable de l'homéostasie énergétique, le rôle de l'AK pourrait être moins prépondérant. L'appareil contractile contrôle majoritairement le système, son activation entraîne une répercussion forte sur le flux énergétique avec de faibles variations du niveau énergétique cellulaire (Deschodt-Arsac et al., 2013). Cependant dans des conditions plus extrêmes telles que celles que nous avons testées dans ces travaux de thèse, assimilables à des troubles du rythme, le système peut être fortement perturbé entraînant une très grande modification de la demande. De ce fait, le statut énergétique serait potentiellement modifié et/ou le rôle de ce phosphotransfert deviendrait plus prépondérant.

En résumé, des épisodes d'inductions d'arythmies combinés à une inhibition de la voie de phosphotransfert AK, entraînerait des perturbations significatives de la régulation énergétique de la

fonction mitochondriale. Puisque la répartition des mécanismes de phosphotransfert CK et AK peuvent être potentiellement différentes en fonction du compartiment cardiaque, nous nous sommes attachés à évaluer la régulation énergétique mitochondriale dans chacun des tissus atriaux et ventriculaires.

## **6.2 Régulation énergétique cardiaque par les différents acteurs du système.**

La seconde partie de ces travaux de thèse a eu pour objectif d'étudier les différences bioénergétiques au sein de chacun des tissus cardiaques. Pour cela, nous avons travaillé sur un modèle de fibres isolées perméabilisées de chaque tissu cardiaque, oreillettes, ventricules et septum. Les résultats reflètent, de manière très caractéristique, une différence dans la régulation énergétique de l'activité mitochondriale entre oreillettes et ventricules. Cette différence est basée sur des mécanismes spécifiques développés ci-dessous.

### **6.2.1 La biogenèse mitochondriale est probablement différente dans ventricules et oreillettes.**

La spécificité du travail cardiaque exige que les contraintes mécaniques imposées au ventricule gauche soient plus importantes que celles imposées à l'oreillette gauche. Il est intéressant de constater que de ce fait, la masse mitochondriale, représentée dans nos travaux par l'activité spécifique de la citrate synthase, enzyme localisée dans la matrice mitochondriale, est deux fois plus élevée dans le ventricule gauche en comparaison à l'oreillette gauche (Figure 41). Ce résultat permettrait un flux énergétique plus élevé dans les ventricules, et suggérerait une meilleure balance énergétique entre le système producteur (*i.e.* compartiment mitochondrial) et le système consommateur d'énergie (*i.e.* l'ensemble des processus ATP-dépendant). Dans un tel contexte fonctionnel, la biogenèse mitochondriale pourrait être plus importante dans les ventricules comparée aux oreillettes. En effet, une modulation de la masse mitochondriale associée à des améliorations de la fonction cardiaque issues de modification de la biogenèse mitochondriale est décrite dans plusieurs situations telles que l'entraînement physique, l'adaptation à l'hypoxie ou même l'établissement de certaines pathologies cardiaques. Dans ce dernier cas notamment, une première phase « d'hypertrophie compensatrice » peut être décrite, caractérisée par une augmentation de la biogenèse mitochondriale permettant une augmentation de la masse mitochondriale (Rimbaud et al., 2009).

### **6.2.2 L'équipement en chaîne respiratoire mitochondriale n'est pas significativement différent entre ventricule et oreillette gauches**

Comme le montre le Tableau 5, l'activité de chacun des différents complexes de la chaîne respiratoire lorsqu'elle est normalisée par la masse mitochondriale n'est pas différente entre le ventricule gauche et l'oreillette gauche. Ceci suggère que la demande énergétique, pourtant différente dans ces deux compartiments n'a pas d'impact sur l'équipement enzymatique mitochondrial.

### **6.2.3 La régulation de la fonction mitochondriale est différente entre les ventricules et les oreillettes**

Bien que l'équipement enzymatique mitochondrial ne soit pas différent entre le ventricule et l'oreillette, les propriétés intrinsèques du module producteur d'énergie (*i.e.* le compartiment mitochondrial) sont sensiblement différentes entre ces deux compartiments. La Figure 42 montre en effet clairement, que l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ADP exogène dans les oreillettes est plus faible que celle des ventricules. Concrètement, pour une quantité équivalente d'ADP exogène ajoutée, la stimulation de la respiration mitochondriale est plus faible dans l'oreillette gauche en comparaison au ventricule gauche. La sensibilité mitochondriale à l'ADP exogène dans l'oreillette est donc plus faible que celle mesurée dans le ventricule gauche. Cependant l'activité ATPasique, ramenée à la masse mitochondriale, est plus importante dans les oreillettes en comparaison aux ventricules (Figure 43). Il est possible que l'ATP produit ne soit que partiellement hydrolysé dans les fibres d'oreillette. Ceci est en faveur d'une faible « canalisation » de l'ATP, des mitochondries vers les myosines ATPases. De plus, il est également possible que les mitochondries des fibres d'OG présentent une sensibilité plus importante à l'ATP. Ces résultats reflètent potentiellement une régulation de la fonction mitochondriale différente dans ces deux compartiments.

Les résultats présentés dans le Tableau 8 renforcent cette hypothèse. Afin d'évaluer l'impact réel de l'accumulation d'ATP dans le milieu de respiration, un système enzymatique de recyclage de l'ATP en ADP a été utilisé. Ce système a été établi par addition d'hexokinase et de glucose dans le milieu. En effet, l'hexokinase en présence d'ATP et de glucose va produire de l'ADP diminuant ainsi la quantité d'ATP dans le milieu. Dans ce système, les propriétés intrinsèques de la respiration mitochondriale dans les oreillettes sont fortement modifiées ( $K_m^{app}(ADP)$  diminué) en comparaison à celle des ventricules qui ne sont pas changées (Tableau 8).

L'addition de blebbistatine dans le milieu de respiration nous a permis de diminuer l'activité ATPasique des myosines ATPases, dans l'objectif d'augmenter artificiellement la quantité d'ATP présentes dans le milieu lors de la détermination du  $K_m^{app}$  des fibres préparées à partir de l'oreillette et du ventricule gauches. L'effet de la blebbistatine est plus fortement marqué dans l'oreillette gauche en

comparaison au ventricule gauche (Tableau 7). En effet, en présence de blebbistatine, le  $K_m^{app}$  pour l'ADP augmente de 0,5 mmol/L à 1,4 mmol/L dans l'oreillette gauche, rendant ainsi ce compartiment moins sensible aux concentrations d'ADP dans le milieu. Cet effet de la blebbistatine sur le  $K_m^{app}$  pour l'ADP dans l'oreillette gauche, est partiellement inhibé en présence du système de recyclage hexokinase/glucose (Tableau 8). Ces résultats laissent penser que, dans l'oreillette gauche, la respiration mitochondriale est davantage contrôlée par la quantité d'ATP environnante que dans le ventricule gauche, même s'il n'est techniquement pas possible à partir de l'exploitation de nos résultats de différencier la part d'augmentation du  $K_m^{app}$  pour ADP secondaire à l'accumulation d'ATP de celle secondaire à la diminution des échanges nucléotidiques entre les deux compartiments. Plus globalement, ces résultats renforcent l'hypothèse d'une régulation énergétique très spécifique de l'oreillette gauche par rapport au ventricule gauche.

#### ***6.2.4 Il existe un impact de l'architecture cellulaire sur l'origine des différences de régulation de la fonction mitochondriale entre les oreillettes et les ventricules.***

Il a été montré par l'équipe du Pr. Valdur Saks, que le cytosquelette, plus spécifiquement l'isoforme de la tubuline ( $\beta$ -tubulin-II), régule l'état d'ouverture de VDAC (Gonzalez-Granillo et al., 2012; Kuznetsov et al., 2013) et ainsi régulerait la fonction mitochondriale. Ainsi, la tubuline diminue la diffusion de l'ADP du cytosol vers l'espace intermembranaire. Dans ce contexte, il est intéressant de remarquer que notre étude protéomique met en évidence un niveau d'expression des différents isoformes de tubulines plus élevé dans l'oreillette en comparaison au ventricule. Ainsi, la faible affinité de la respiration mitochondriale pour l'ADP exogène dans l'oreillette en comparaison au ventricule pourrait-être secondaire à la régulation de VDAC par les tubulines. Afin de tester cette hypothèse, les fibres perméabilisées ont été partiellement digérées par un traitement à la trypsine. Ce protocole permet de diminuer les interactions entre les mitochondries et les tubulines. Comme le montre le Tableau 8, le traitement à la trypsine a un impact similaire sur le  $K_m^{app}$  ADP des fibres de ventricule et d'oreillette gauches. En revanche, la protéolyse a un effet antagoniste sur les  $V_{max}$  des fibres de ventricules et d'oreillettes. La Figure 46 met en perspective ces différences qui se traduisent par un rapport entre  $V_{max}$  et  $K_m^{app}$  beaucoup plus élevé dans les fibres de ventricules suite à la protéolyse. Il est difficile d'émettre une conclusion définitive sur les différences de compartimentation entre les fibres des différents compartiments cardiaques. Néanmoins, la diminution de l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ADP secondaire à l'accumulation d'ATP est beaucoup plus marquée dans les fibres d'oreillette en comparaison aux fibres de ventricule gauche. L'ensemble de ces résultats

suggère donc que la compartimentation des nucléotides adényliques est plus développée dans le ventricule gauche en comparaison à l'oreillette gauche.

En présence d'ADP exogène, le faible « channeling » entre les mitochondries et les sites consommateurs dans l'oreillette aboutirait à une diffusion d'ATP dans le milieu. Par conséquent, une quantité moindre d'ADP serait produite par les sites consommateurs d'ATP. Ce résultat expliquerait pourquoi il est nécessaire d'ajouter deux fois plus d'ADP dans les fibres d'oreillettes pour atteindre  $V_{\max}$  en comparaison aux fibres de ventricule gauche. Notre conclusion quant à ce résultat serait ainsi que les échanges de nucléotides adényliques entre le compartiment mitochondrial et les sites consommateurs pourraient être plus facilement modifiables dans l'oreillette. De ce fait, la diminution du  $K_m^{\text{app}}(\text{ADP})$  dans l'oreillette montrée précédemment par utilisation du système de recyclage d'ADP serait expliquée par le fait que l'hexokinase a plus facilement accès à l'ATP produit par les mitochondries dans les fibres d'oreillettes en comparaison aux fibres de ventricules. Néanmoins, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer pourquoi les mitochondries dans les fibres d'oreillettes sont plus sensibles à l'ATP que les fibres de ventricules. Nous avons proposé que le niveau d'expression des tubulines puisse expliquer les différences de  $K_m^{\text{app}}$  pour l'ADP exogène entre deux types de fibres. Cependant, une restriction de la diffusion de l'ADP imposée par VDAC et les tubulines devrait a priori également être applicable à l'ATP. Les résultats de la Figure 44 montrent que lorsque l'ADP est produit par les sites consommateurs d'ATP, les différences de restrictions de diffusion pour l'ADP disparaissent entre les fibres de ventricules et d'oreillette. Par conséquent, il semble que ces restrictions de diffusion dans l'oreillette soient dépendantes du type de sources, endogène ou exogène, de l'ADP. Il pourrait donc coexister dans les mitochondries de fibres d'oreillettes deux circuits pour les nucléotides adényliques. Un circuit dépendant du « channeling » avec les sites consommateurs et un circuit indépendant. Ce circuit indépendant du « channeling » serait fortement sensible aux quantités d'ATP du milieu contrairement au circuit dépendant du « channeling ». Bien évidemment, cela n'exclut pas que ces deux circuits de recyclage de l'ATP puissent être présents dans les fibres du ventricule gauche.

En tout état de cause, nos résultats permettent de clairement identifier à la fois une régulation énergétique spécifique des compartiments cardiaques, oreillettes *versus* ventricules, en relation avec des différences significatives de la compartimentation de chacune de ces parties du cœur. Notre hypothèse mécanistique reposerait sur le fait que dans le système de recyclage de l'ATP en ADP indépendant du « channeling » avec les sites consommateurs, le phosphotransfert AK aurait un rôle clef. Les différences énergétiques entre les fibres de ventricules et d'oreillettes pourraient être expliquées par la « répartition » des flux de nucléotides adényliques entre ce système AK et les systèmes consommateurs d'ATP. Dans le ventricule gauche, la majorité de l'ATP produit par les

mitochondries serait recyclée par les têtes de myosines alors que dans l'oreillette gauche la majorité de l'ATP serait recyclée par l'AK. Bien qu'encore émis sous forme d'hypothèses, ce dernier point est tout de même fondé sur nos résultats expérimentaux, notamment ceux issus du Tableau 9 du document. Celui-ci met en évidence que dans le ventricule, les activités ATPasiques sont inhibées par la blebbistatine et non significativement modifiées par l'Ap5a ; alors que dans l'oreillette gauche, un effet cumulatif des deux drogues est identifiable laissant penser qu'un système de communication existe bien entre sites consommateurs et l'AK dans ce compartiment. En allant plus loin dans les perspectives, nous pourrions supposer que les deux circuits, « channeling » et « phosphotransfert AK » pourraient exister dans chacun des compartiments cardiaques, mais que l'importance de la demande énergétique, ou même le type de situations, saine ou pathologique, pourrait induire un « shift » du système de l'un vers l'autre de ces circuits. Dans ces hypothèses, le tissu auriculaire serait plus « adaptable » que le tissu ventriculaire dans sa réponse énergétique quant à sa capacité à utiliser le phosphotransfert AK. Une des perspectives intéressantes pour la suite de ce travail serait alors d'appliquer ces conclusions au cœur battant notamment en situation d'inductions d'arythmies en présence de blebbistatine et d'ap5a. En effet, le moindre contrôle de l'énergétique par la demande dans l'oreillette accompagné de l'utilisation plus spécifique du phosphotransfert AK pourrait laisser supposer que la réponse de la fonction contractile de l'oreillette est sensiblement différente de celle du ventricule dans ces conditions.

### **6.3 Application à des modèles de rats pathologiques, perspectives.**

Les résultats de ces travaux de thèse sont actuellement appliqués à des modèles d'animaux pathologiques. Nous avons commencé à développer un projet sur un modèle de rats développant spontanément une insuffisance cardiaque (SHR, ou Spontaneous Hypertensive Rat). Ce modèle est testé avec le protocole de stimulation électrique décrit précédemment afin de déterminer les différents acteurs de la compartimentation et leur rôle dans les troubles du rythme. De manière intéressante, ces cœurs présentent une tendance anti-arythmique bien plus forte que les cœurs sains en présence de blebbistatine. L'enjeu est donc de regarder l'action d'une inhibition de l'appareil contractile, du phosphotransfert AK-dépendant mais également de quantifier dans les différents compartiments cardiaques, les protéines du cytosquelette pour en déterminer les éventuelles adaptations lors du vieillissement de ces animaux. Parallèlement à cette étude sur cœurs perfusés, l'équipe travaille également en amont sur ces animaux *in vivo* afin de quantifier les concentrations en intermédiaires énergétiques cardiaques par des expérimentations en RMN <sup>31</sup>P. Les derniers résultats tendent à montrer que, bien que la fraction d'éjection systolique et le rapport PCr/ATP restent stables lors de l'établissement de la maladie, la réponse à une stimulation pharmacologique des β-récepteurs



cardiaques (entraînant une période prolongée de tachycardie) soit significativement modifiée chez les rats SHR. Ce résultat pourrait être expliqué par une adaptation de la réponse énergétique des cœurs perfusés et potentiellement par une utilisation accrue du phosphotransfert AK (adaptation en réponse à la pathologie) associée à une modification de la sensibilité mitochondriale aux variations de l'énergétique du même type que celles montrées dans des travaux antérieurs en hypoxie (Calmettes et al., 2010) ou au cours du processus de vieillissement (Gouspillou et al., 2010).

Une analyse protéomique sera de plus pratiquée sur ces cœurs pathologiques. Nous avons pu observer des différences dans les grandes fonctions métaboliques, mitochondriales et la composition du cytosquelette chez nos rats sains entre oreillettes et ventricules. Dans le cas où il y aurait une adaptation des régulations énergétiques chez les rats SHR (probable à la vue de nos résultats *in vivo*, qui semblent montrer une diminution de la sensibilité de la réponse mitochondriale lors de la stimulation du système), l'analyse protéomique pourrait révéler des différences importantes au niveau de certains paramètres clefs du système énergétique, par exemple, au niveau de la quantité de protéines du cytosquelette, différences mettant en exergue des mécanismes impliqués dans l'établissement de pathologies plus graves. Enfin, notre étude protéomique nous a permis de mettre en évidence des différences quantitatives entre chambres cardiaques concernant des canaux membranaires, dont certains sont impliqués dans le potentiel d'action membranaire (Brown and O'Rourke, 2010). Puisqu'il semble exister des différences entre rats sains et rats SHR dans la qualité mais également la quantité de la réponse à d'épisodes arythmiques, il serait intéressant de vérifier les données protéomiques au niveau de ces canaux membranaires chez les rats pathologiques. Ceci nous aiderait à cibler des acteurs moléculaires précis afin d'en faire des cibles thérapeutiques, permettant de moduler l'adaptation du statut énergétique de la cellule cardiaque avant même les effets électrophysiologiques.

## 6.4 Conclusion générale

La bioénergétique cardiaque et plus précisément la capacité à maintenir une homéostasie énergétique est un élément indispensable à la performance du myocarde mais se révèle être aussi un thème essentiel pour la compréhension des pathologies issues des troubles du rythme.

**Ces travaux montrent qu'une dysfonction issue d'un trouble du rythme entraîne des modifications importantes de la régulation de la fonction mitochondriale**, module caractérisé par sa capacité à produire l'énergie nécessaire au système cardiaque dans son ensemble. Plus précisément, nous mettons en évidence les **rôles différents tenus par chacun des mécanismes de phosphotransferts AK au sein des ventricules et des oreillettes** quant à leur fonction de navette énergétique entre sites producteur et consommateurs d'énergie.

Les résultats de ces travaux réaffirment la relation forte entre la fonction mitochondriale et les troubles du rythme, montrée précédemment notamment par des travaux sur les différents canaux ioniques mitochondriaux et membranaires, mais surtout mettent en exergue le rôle que pourrait avoir le phosphotransfert AK, spécifiquement en cas de troubles du rythme. Ce résultat doit être mis en parallèle, voire renforcé par le fait que le ventricule gauche, qui supporte la plus grande demande énergétique semble être fondamentalement différent des oreillettes dans sa capacité à utiliser ce mécanisme de phosphotransfert, ce qui de ce fait rend ce résultat original par rapport au champ d'étude que représente l'électrophysiologie cardiaque. Cela permet d'ouvrir des pistes intéressantes orientées vers la compréhension de cette moindre utilisation des phosphotransferts AK par les ventricules notamment lors des pathologies liées aux troubles du rythme cardiaque.

**Pour aller plus loin**, les pathologies cardiaques sont très souvent décrites en se basant sur des observations spécifiquement orientées sur le ventricule gauche. Cependant, il est très clair dans nos résultats qu'il existe une vraie régionalisation cardiaque et que chaque chambre cardiaque présente des profils protéomiques mais également fonctionnels différents. Il est donc proposé ici d'établir, dans une perspective future de recherche, des études plus détaillées du comportement énergétique de chaque région cardiaque dans des cas de pathologies mais également dans le cadre de traitements thérapeutiques. **L'objectif à terme** serait de spécifier des cibles thérapeutiques au sein du système énergétique afin de lutter efficacement contre les dysfonctions auriculaires ou ventriculaires en prenant en compte la particularité des tissus. Cette perspective permettrait d'affiner le traitement de maladies cardiaques en agissant spécifiquement sur ces tissus tout en préservant les autres tissus.

Au-delà d'applications thérapeutiques futures, précises et efficaces, ce travail de thèse a permis en premier lieu de mettre en relief un champ d'étude encore trop timidement étudié reposant sur les relations entre la régulation énergétique mitochondriale *ex vivo* et *in vitro*, la compartimentation cellulaire et la gestion des troubles de l'électrophysiologie cardiaque.



# **BIBLIOGRAPHIE**

## 7 BIBLIOGRAPHIE

- Aggarwal, N.T., and Makielski, J.C. (2013). Redox control of cardiac excitability. *Antioxid. Redox Signal.* *18*, 432–468.
- Akar, F.G., and O'Rourke, B. (2011). Mitochondria are sources of metabolic sink and arrhythmias. *Pharmacol. Ther.* *131*, 287–294.
- Akar, F.G., Aon, M.A., Tomaselli, G.F., and O'Rourke, B. (2005). The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *J. Clin. Invest.* *115*, 3527–3535.
- Anflous, K., Veksler, V., Mateo, P., Samson, F., Saks, V., and Ventura-Clapier, R. (1997). Mitochondrial creatine kinase isoform expression does not correlate with its mode of action. *Biochem. J.* *322 ( Pt 1)*, 73–78.
- Anmann, T., Eimre, M., Kuznetsov, A.V., Andrienko, T., Kaambre, T., Sikk, P., Seppet, E., Tiivel, T., Vendelin, M., Seppet, E., et al. (2005). Calcium-induced contraction of sarcomeres changes the regulation of mitochondrial respiration in permeabilized cardiac cells. *FEBS J.* *272*, 3145–3161.
- Aon, M.A., Cortassa, S., Marbán, E., and O'Rourke, B. (2003). Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* *278*, 44735–44744.
- Appaix, F., Kuznetsov, A.V., Usson, Y., Kay, L., Andrienko, T., Olivares, J., Kaambre, T., Sikk, P., Margreiter, R., and Saks, V. (2003). Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria. *Exp. Physiol.* *88*, 175–190.
- Aronson, D., Mittleman, M.A., and Burger, A.J. (2003). Effects of sulfonylurea hypoglycemic agents and adenosine triphosphate dependent potassium channel antagonists on ventricular arrhythmias in patients with decompensated heart failure. *Pacing Clin. Electrophysiol.* *PACE* *26*, 1254–1261.
- Assimacopoulos-Jeannet, F., Cusin, I., Greco-Perotto, R.M., Terrettaz, J., Rohner-Jeanrenaud, F., Zarjevski, N., and Jeanrenaud, B. (1991). Glucose transporters: structure, function, and regulation. *Biochimie* *73*, 67–70.
- Baird, M.F., Graham, S.M., Baker, J.S., and Bickerstaff, G.F. (2012). Creatine-kinase- and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. *J. Nutr. Metab.* *2012*, 960363.
- Balaban, R.S. (2002). Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *34*, 1259–1271.
- Balaban, R.S. (2006). Maintenance of the metabolic homeostasis of the heart: developing a systems analysis approach. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1080*, 140–153.
- Balaban, R.S. (2009). The role of Ca<sup>2+</sup> signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochim. Biophys. Acta* *1787*, 1334–1341.
- Bandlow, W., Strobel, G., and Schrick, R. (1998). Influence of N-terminal sequence variation on the sorting of major adenylate kinase to the mitochondrial intermembrane space in yeast. *Biochem. J.* *329 ( Pt 2)*, 359–367.

- Baskin, R.J., and Deamer, D.W. (1970). A membrane-bound creatine phosphokinase in fragmented sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *245*, 1345–1347.
- Bell, C.J., Bright, N.A., Rutter, G.A., and Griffiths, E.J. (2006). ATP regulation in adult rat cardiomyocytes: time-resolved decoding of rapid mitochondrial calcium spiking imaged with targeted photoproteins. *J. Biol. Chem.* *281*, 28058–28067.
- Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* *415*, 198–205.
- Bessman, S.P., and Fonyo, A. (1966). The possible role of the mitochondrial bound creatine kinase in regulation of mitochondrial respiration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *22*, 597–602.
- Bittl, J.A., and Ingwall, J.S. (1985). Reaction rates of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart. A <sup>31</sup>P NMR magnetization transfer study. *J. Biol. Chem.* *260*, 3512–3517.
- Boehm, E., Ventura-Clapier, R., Mateo, P., Lechène, P., and Veksler, V. (2000). Glycolysis supports calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in skinned ventricular fibres of mice deficient in mitochondrial and cytosolic creatine kinase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *32*, 891–902.
- Bottomley, P.A., Panjra, G.S., Lai, S., Hirsch, G.A., Wu, K., Najjar, S.S., Steinberg, A., Gerstenblith, G., and Weiss, R.G. (2013). Metabolic rates of ATP transfer through creatine kinase (CK Flux) predict clinical heart failure events and death. *Sci. Transl. Med.* *5*, 215re3.
- Brack, K.E., Narang, R., Winter, J., and Ng, G.A. (2013). The mechanical uncoupler blebbistatin is associated with significant electrophysiological effects in the isolated rabbit heart. *Exp. Physiol.* *98*, 1009–1027.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.
- Brand, M.D. (1990). The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochim. Biophys. Acta* *1018*, 128–133.
- Brand, M.D., Chien, L.F., Ainscow, E.K., Rolfe, D.F., and Porter, R.K. (1994). The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim. Biophys. Acta* *1187*, 132–139.
- Brandts, B., Borchard, R., Dirkmann, D., Wickenbrock, I., Sievers, B., van Bracht, M., Prull, M.W., and Trappe, H.-J. (2003). Diadenosine-5-phosphate exerts A1-receptor-mediated proarrhythmic effects in rabbit atrial myocardium. *Br. J. Pharmacol.* *139*, 1265–1272.
- Brown, G.C. (1992). Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem. J.* *284* ( Pt 1), 1–13.
- Brown, D.A., and O'Rourke, B. (2010). Cardiac mitochondria and arrhythmias. *Cardiovasc. Res.* *88*, 241–249.
- Brown, D.A., Aon, M.A., Frasier, C.R., Sloan, R.C., Maloney, A.H., Anderson, E.J., and O'Rourke, B. (2010). Cardiac arrhythmias induced by glutathione oxidation can be inhibited by preventing mitochondrial depolarization. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *48*, 673–679.
- Cain, D.F., and Davies, R.E. (1962). Breakdown of adenosine triphosphate during a single contraction of working muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *8*, 361–366.

Calmettes, G., Deschodt-Arsac, V., Gouspillou, G., Miraux, S., Muller, B., Franconi, J.-M., Thiaudiere, E., and Diolez, P. (2010). Improved energy supply regulation in chronic hypoxic mouse counteracts hypoxia-induced altered cardiac energetics. *PLoS One* 5, e9306.

Carnes, C.A., Geisbuhler, T.P., and Reiser, P.J. (2004). Age-dependent changes in contraction and regional myocardial myosin heavy chain isoform expression in rats. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 97, 446–453.

Carrasco, A.J., Dzeja, P.P., Alekseev, A.E., Pucar, D., Zingman, L.V., Abraham, M.R., Hodgson, D., Bienengraeber, M., Puceat, M., Janssen, E., et al. (2001). Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7623–7628.

Cha, Y.-M., Dzeja, P.P., Shen, W.K., Jahangir, A., Hart, C.Y.T., Terzic, A., and Redfield, M.M. (2003). Failing atrial myocardium: energetic deficits accompany structural remodeling and electrical instability. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284, H1313–H1320.

Chance, B., Schoener, B., Oshino, R., Itshak, F., and Nakase, Y. (1979). Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J. Biol. Chem.* 254, 4764–4771.

Dedkova, E.N., and Blatter, L.A. (2008). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and the heart. *Cell Calcium* 44, 77–91.

Denton, R.M., and McCormack, J.G. (1990). Ca<sup>2+</sup> as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Annu. Rev. Physiol.* 52, 451–466.

Depre, C., Ponchaut, S., Deprez, J., Maisin, L., and Hue, L. (1998). Cyclic AMP suppresses the inhibition of glycolysis by alternative oxidizable substrates in the heart. *J. Clin. Invest.* 101, 390–397.

Deschodt-Arsac, V., Calmettes, G., Raffard, G., Massot, P., Franconi, J.-M., Pollesello, P., and Diolez, P. (2010). Absence of mitochondrial activation during levosimendan inotropic action in perfused paced guinea pig hearts as demonstrated by modular control analysis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, R786–R792.

Deschodt-Arsac, V., Calmettes, G., Gouspillou, G., Chapolard, M., Raffard, G., Rouland, R., Jais, P., Haissaguerre, M., Dos Santos, P., and Diolez, P. (2013). Non-invasive integrative analysis of contraction energetics in intact beating heart. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 4–10.

Diolez, P., Deschodt-Arsac, V., Raffard, G., Simon, C., Dos Santos, P., Thiaudière, E., Arsac, L., and Franconi, J.-M. (2007). Modular regulation analysis of heart contraction: application to in situ demonstration of a direct mitochondrial activation by calcium in beating heart. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R13–R19.

Dou, Y., Arlock, P., and Arner, A. (2007). Blebbistatin specifically inhibits actin-myosin interaction in mouse cardiac muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293, C1148–C1153.

Dzeja, P.P., and Terzic, A. (1998). Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12, 523–529.

Dzeja, P., and Terzic, A. (2009). Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 1729–1772.



- Dzeja, P., Kalvenas, A., Toleikis, A., and Praskevicius, A. (1985). The effect of adenylate kinase activity on the rate and efficiency of energy transport from mitochondria to hexokinase. *Biochem. Int.* *10*, 259–265.
- Dzeja, P.P., Vitkevicius, K.T., Redfield, M.M., Burnett, J.C., and Terzic, A. (1999). Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium : increased contribution in heart failure. *Circ. Res.* *84*, 1137–1143.
- Eisner, D. (2014). Calcium in the heart: from physiology to disease. *Exp. Physiol.* *99*, 1273–1282.
- Elvir-Mairena, J.R., Jovanovic, A., Gomez, L.A., Alekseev, A.E., and Terzic, A. (1996). Reversal of the ATP-liganded state of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by adenylate kinase activity. *J. Biol. Chem.* *271*, 31903–31908.
- Fedorov, V.V., Lozinsky, I.T., Sosunov, E.A., Anyukhovskiy, E.P., Rosen, M.R., Balke, C.W., and Efimov, I.R. (2007). Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* *4*, 619–626.
- Fernández-Sada, E., Silva-Platas, C., Villegas, C.A., Rivero, S.L., Willis, B.C., García, N., Garza, J.R., Oropeza-Almazán, Y., Valverde, C.A., Mazzocchi, G., et al. (2014). Cardiac responses to  $\beta$ -adrenoceptor stimulation is partly dependent on mitochondrial calcium uniporter activity. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 4207–4221.
- Flores, N.A., Stavrou, B.M., and Sheridan, D.J. (1999). The effects of diadenosine polyphosphates on the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* *42*, 15–26.
- Frank, O. (1895). Zur Dynamik des Herzmuskels. *Z Biol* *32*, 370.
- García-Rivas, G. de J., Carvajal, K., Correa, F., and Zazueta, C. (2006). Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo. *Br. J. Pharmacol.* *149*, 829–837.
- Gellerich, F., and Saks, V.A. (1982). Control of heart mitochondrial oxygen consumption by creatine kinase: the importance of enzyme localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *105*, 1473–1481.
- Gibala, M.J., Young, M.E., and Taegtmeyer, H. (2000). Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* *168*, 657–665.
- Gonca, E., and Bozdogan, O. (2010). Both mitochondrial KATP channel opening and sarcolemmal KATP channel blockage confer protection against ischemia/reperfusion-induced arrhythmia in anesthetized male rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* *15*, 403–411.
- Gonzalez-Granillo, M., Grichine, A., Guzun, R., Usson, Y., Tepp, K., Chekulayev, V., Shevchuk, I., Karu-Varikmaa, M., Kuznetsov, A.V., Grimm, M., et al. (2012). Studies of the role of tubulin beta II isotype in regulation of mitochondrial respiration in intracellular energetic units in cardiac cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *52*, 437–447.
- Gospillou, G., Bourdel-Marchasson, I., Rouland, R., Calmettes, G., Franconi, J.-M., Deschodt-Arsac, V., and Diollez, P. (2010). Alteration of mitochondrial oxidative phosphorylation in aged skeletal muscle involves modification of adenine nucleotide translocator. *Biochim. Biophys. Acta* *1797*, 143–151.
- Gudbjarnason, S., Mathes, P., and Ravens, K.G. (1970). Functional compartmentation of ATP and creatine phosphate in heart muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *1*, 325–339.

- Guzun, R., Timohhina, N., Tepp, K., Monge, C., Kaambre, T., Sikk, P., Kuznetsov, A.V., Pison, C., and Saks, V. (2009). Regulation of respiration controlled by mitochondrial creatine kinase in permeabilized cardiac cells in situ. Importance of system level properties. *Biochim. Biophys. Acta* *1787*, 1089–1105.
- Guzun, R., Karu-Varikmaa, M., Gonzalez-Granillo, M., Kuznetsov, A.V., Michel, L., Cottet-Rousselle, C., Saaremäe, M., Kaambre, T., Metsis, M., Grimm, M., et al. (2011). Mitochondria-cytoskeleton interaction: distribution of  $\beta$ -tubulins in cardiomyocytes and HL-1 cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 458–469.
- Guzun, R., Gonzalez-Granillo, M., Karu-Varikmaa, M., Grichine, A., Usson, Y., Kaambre, T., Guerrero-Roesch, K., Kuznetsov, A., Schlattner, U., and Saks, V. (2012). Regulation of respiration in muscle cells in vivo by VDAC through interaction with the cytoskeleton and MtCK within Mitochondrial Interactosome. *Biochim. Biophys. Acta* *1818*, 1545–1554.
- Guzun, R., Kaambre, T., Bagur, R., Grichine, A., Usson, Y., Varikmaa, M., Anmann, T., Tepp, K., Timohhina, N., Shevchuk, I., et al. (2014). Modular organization of cardiac energy metabolism: energy conversion, transfer and feedback regulation. *Acta Physiol. Oxf. Engl.*
- Halestrap, A.P., and Pasdois, P. (2009). The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1787*, 1402–1415.
- Hancock, C.R., Janssen, E., and Terjung, R.L. (2006). Contraction-mediated phosphorylation of AMPK is lower in skeletal muscle of adenylate kinase-deficient mice. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *100*, 406–413.
- Hill, A.V. (1950). A challenge to biochemists. *Biochim. Biophys. Acta* *4*, 4–11.
- Hoerter, J.A., Ventura-Clapier, R., and Kuznetsov, A. (1994). Compartmentation of creatine kinases during perinatal development of mammalian heart. *Mol. Cell. Biochem.* *133-134*, 277–286.
- Holloway, C.J., Suttie, J., Dass, S., and Neubauer, S. (2011). Clinical cardiac magnetic resonance spectroscopy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* *54*, 320–327.
- Huke, S., and Knollmann, B.C. (2010). Increased myofilament Ca<sup>2+</sup>-sensitivity and arrhythmia susceptibility. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *48*, 824–833.
- Huke, S., Venkataraman, R., Faggioni, M., Bennuri, S., Hwang, H.S., Baudenbacher, F., and Knollmann, B.C. (2013). Focal energy deprivation underlies arrhythmia susceptibility in mice with calcium-sensitized myofilaments. *Circ. Res.* *112*, 1334–1344.
- Ingwall, J.S. (2009). Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc. Res.* *81*, 412–419.
- Ingwall, J.S., and Weiss, R.G. (2004). Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ. Res.* *95*, 135–145.
- Jacobs, H., Heldt, H.W., and Klingenberg, M. (1964). High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *16*, 516–521.
- Jacobus, W.E., and Diffley, D.M. (1986). Creatine kinase of heart mitochondria. Control of oxidative phosphorylation by the extramitochondrial concentrations of creatine and phosphocreatine. *J. Biol. Chem.* *261*, 16579–16583.

- Jacobus, W.E., and Lehninger, A.L. (1973). Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport. *J. Biol. Chem.* *248*, 4803–4810.
- Janssen, E., Dzeja, P.P., Oerlemans, F., Simonetti, A.W., Heerschap, A., Haan, A. de, Rush, P.S., Terjung, R.R., Wieringa, B., and Terzic, A. (2000). Adenylate kinase 1 gene deletion disrupts muscle energetic economy despite metabolic rearrangement. *EMBO J.* *19*, 6371–6381.
- Jeong, E.-M., Liu, M., Sturdy, M., Gao, G., Varghese, S.T., Sovari, A.A., and Dudley, S.C. (2012). Metabolic stress, reactive oxygen species, and arrhythmia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *52*, 454–463.
- Kaasik, A., Joubert, F., Ventura-Clapier, R., and Veksler, V. (2004). A novel mechanism of regulation of cardiac contractility by mitochondrial functional state. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 1219–1227.
- Kanlop, N., and Sakai, T. (2010). Optical mapping study of blebbistatin-induced chaotic electrical activities in isolated rat atrium preparations. *J. Physiol. Sci. JPS* *60*, 109–117.
- Kauppinen, R.A., Hiltunen, J.K., and Hassinen, I.E. (1983). Mitochondrial membrane potential, transmembrane difference in the NAD<sup>+</sup> redox potential and the equilibrium of the glutamate-aspartate translocase in the isolated perfused rat heart. *Biochim. Biophys. Acta* *725*, 425–433.
- Kay, L., Nicolay, K., Wieringa, B., Saks, V., and Wallimann, T. (2000). Direct evidence for the control of mitochondrial respiration by mitochondrial creatine kinase in oxidative muscle cells in situ. *J. Biol. Chem.* *275*, 6937–6944.
- Kobayashi, K., and Neely, J.R. (1979). Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle. *Circ. Res.* *44*, 166–175.
- Kohlhaas, M., and Maack, C. (2013). Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovasc. Res.* *98*, 259–268.
- Kojima, S., Wu, S.T., Wikman-Coffelt, J., and Parmley, W.W. (1994). Intracellular calcium transients in potentiated contractions induced by multiple extrasystolic beats in isolated perfused rat hearts. *Cell Calcium* *16*, 219–226.
- Kong, F., Binas, B., Moon, J.H., Kang, S.S., and Kim, H.J. (2013). Differential expression of adenylate kinase 4 in the context of disparate stress response strategies of HEK293 and HepG2 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* *533*, 11–17.
- Korzeniewski, B., Deschodt-Arsac, V., Calmettes, G., Franconi, J.-M., and Diolez, P. (2008). Physiological heart activation by adrenaline involves parallel activation of ATP usage and supply. *Biochem. J.* *413*, 343–347.
- Krause, S.M., and Jacobus, W.E. (1992). Specific enhancement of the cardiac myofibrillar ATPase by bound creatine kinase. *J. Biol. Chem.* *267*, 2480–2486.
- Kuum, M., Kaasik, A., Joubert, F., Ventura-Clapier, R., and Veksler, V. (2009). Energetic state is a strong regulator of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> loss in cardiac muscle: different efficiencies of different energy sources. *Cardiovasc. Res.* *83*, 89–96.
- Kuznetsov, A.V., Tiivel, T., Sikk, P., Kaambre, T., Kay, L., Daneshrad, Z., Rossi, A., Kadaja, L., Peet, N., Seppet, E., et al. (1996). Striking differences between the kinetics of regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles in vivo. *Eur. J. Biochem. FEBS* *241*, 909–915.

- Kuznetsov, A.V., Guzun, R., Boucher, F., Bagur, R., Kaambre, T., and Saks, V. (2012). Mysterious Ca<sup>2+</sup>-independent muscular contraction: déjà vu. *Biochem. J.* *445*, 333–336.
- Kuznetsov, A.V., Javadov, S., Guzun, R., Grimm, M., and Saks, V. (2013). Cytoskeleton and regulation of mitochondrial function: the role of beta-tubulin II. *Front. Physiol.* *4*, 82.
- Laser, A., Ingwall, J.S., Tian, R., Reis, I., Hu, K., Gaudron, P., Ertl, G., and Neubauer, S. (1996). Regional biochemical remodeling in non-infarcted tissue of rat heart post-myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *28*, 1531–1538.
- Laurita, K.R., and Rosenbaum, D.S. (2008). Cellular mechanisms of arrhythmogenic cardiac alternans. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *97*, 332–347.
- Lee, H.-J., Pyo, J.-O., Oh, Y., Kim, H.-J., Hong, S., Jeon, Y.-J., Kim, H., Cho, D.-H., Woo, H.-N., Song, S., et al. (2007). AK2 activates a novel apoptotic pathway through formation of a complex with FADD and caspase-10. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1303–1310.
- Legato, M.J. (1973). Ultrastructure of the atrial, ventricular, and Purkinje cell, with special reference to the genesis of arrhythmias. *Circulation* *47*, 178–189.
- Lemieux, H., Semsroth, S., Antretter, H., Höfer, D., and Gnaiger, E. (2011). Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 1729–1738.
- Limouze, J., Straight, A.F., Mitchison, T., and Sellers, J.R. (2004). Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *25*, 337–341.
- Liu, R., Ström, A.-L., Zhai, J., Gal, J., Bao, S., Gong, W., and Zhu, H. (2009). Enzymatically inactive adenylate kinase 4 interacts with mitochondrial ADP/ATP translocase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1371–1380.
- Lou, Q., Li, W., and Efimov, I.R. (2012). The role of dynamic instability and wavelength in arrhythmia maintenance as revealed by panoramic imaging with blebbistatin vs. 2,3-butanedione monoxime. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *302*, H262–H269.
- Lygate, C.A., and Neubauer, S. (2014). Metabolic flux as a predictor of heart failure prognosis. *Circ. Res.* *114*, 1228–1230.
- Lygate, C.A., Aksentijevic, D., Dawson, D., ten Hove, M., Phillips, D., de Bono, J.P., Medway, D.J., Sebag-Montefiore, L., Hunyor, I., Channon, K.M., et al. (2013a). Living without creatine: unchanged exercise capacity and response to chronic myocardial infarction in creatine-deficient mice. *Circ. Res.* *112*, 945–955.
- Lygate, C.A., Schneider, J.E., and Neubauer, S. (2013b). Investigating cardiac energetics in heart failure. *Exp. Physiol.* *98*, 601–605.
- Maack, C., and O'Rourke, B. (2007). Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res. Cardiol.* *102*, 369–392.
- Mani, R.S., and Kay, C.M. (1976). Physicochemical studies on the creatine kinase M-line protein and its interaction with myosin and myosin fragments. *Biochim. Biophys. Acta* *453*, 391–399.

- Marshall, I., Al-Kazwini, S.J., Roberts, P.M., Shepperson, N.B., Adams, M., and Craig, R.K. (1986). Cardiovascular effects of human and rat CGRP compared in the rat and other species. *Eur. J. Pharmacol.* *123*, 207–216.
- Mayer, S.E., Mayfield, A.C., and Haas, J.A. (1966). Heart muscle hexokinase: subcellular distribution and inhibition by glucose 6-phosphate. *Mol. Pharmacol.* *2*, 393–405.
- McCormack, J.G., and Denton, R.M. (1990). Intracellular calcium ions and intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of energy metabolism in mammalian tissues. *Proc. Nutr. Soc.* *49*, 57–75.
- Meyers, D.E., Basha, H.I., and Koenig, M.K. (2013). Mitochondrial cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and management. *Tex. Heart Inst. J. Tex. Heart Inst. St Lukes Episcop. Hosp. Tex. Child. Hosp.* *40*, 385–394.
- Mitchell, P., and Moyle, J. (1967). Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* *213*, 137–139.
- Montaigne, D., Marechal, X., Lefebvre, P., Modine, T., Fayad, G., Dehondt, H., Hurt, C., Coisne, A., Koussa, M., Remy-Jouet, I., et al. (2013). Mitochondrial dysfunction as an arrhythmogenic substrate: a translational proof-of-concept study in patients with metabolic syndrome in whom post-operative atrial fibrillation develops. *J. Am. Coll. Cardiol.* *62*, 1466–1473.
- Montaigne, D., Marechal, X., Coisne, A., Debry, N., Modine, T., Fayad, G., Potelle, C., El Arid, J.-M., Mouton, S., Sebti, Y., et al. (2014). Myocardial contractile dysfunction is associated with impaired mitochondrial function and dynamics in type 2 diabetic but not in obese patients. *Circulation* *130*, 554–564.
- Moreadith, R.W., and Jacobus, W.E. (1982). Creatine kinase of heart mitochondria. Functional coupling of ADP transfer to the adenine nucleotide translocase. *J. Biol. Chem.* *257*, 899–905.
- Morimoto, K., and Harrington, W.F. (1972). Isolation and physical chemical properties of an M-line protein from skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* *247*, 3052–3061.
- Nadtochiy, S.M., Tompkins, A.J., and Brookes, P.S. (2006). Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and preconditioning: implications for pathology and cardioprotection. *Biochem. J.* *395*, 611–618.
- Nakaya, H. (2014). Role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cardiac arrhythmias. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* *19*, 237–243.
- Neely, J.R., Liebermeister, H., Battersby, E.J., and Morgan, H.E. (1967). Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am. J. Physiol.* *212*, 804–814.
- Neubauer, S., Hamman, B.L., Perry, S.B., Bittl, J.A., and Ingwall, J.S. (1988). Velocity of the creatine kinase reaction decreases in postischemic myocardium: a <sup>31</sup>P-NMR magnetization transfer study of the isolated ferret heart. *Circ. Res.* *63*, 1–15.
- Nicholls, D.G. (1974). The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur. J. Biochem. FEBS* *50*, 305–315.

- Nouette-Gaulain, K., Malgat, M., Rocher, C., Savineau, J.-P., Marthan, R., Mazat, J.-P., and Sztark, F. (2005). Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovasc. Res.* *66*, 132–140.
- Olson, R.E., and Piatnek, D.A. (1959). Conservation of energy in cardiac muscle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *72*, 466–479.
- Olson, R.E., and Schwartz, W.B. (1951). Myocardial metabolism in congestive heart failure. *Medicine (Baltimore)* *30*, 21–41.
- Olson, L.K., Schroeder, W., Robertson, R.P., Goldberg, N.D., and Walseth, T.F. (1996). Suppression of adenylate kinase catalyzed phosphotransfer precedes and is associated with glucose-induced insulin secretion in intact HIT-T15 cells. *J. Biol. Chem.* *271*, 16544–16552.
- O'Rourke, B. (2000). Myocardial K(ATP) channels in preconditioning. *Circ. Res.* *87*, 845–855.
- Panayiotou, C., Solaroli, N., and Karlsson, A. (2014). The many isoforms of human adenylate kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *49*, 75–83.
- Pasdois, P., Parker, J.E., and Halestrap, A.P. (2013). Extent of mitochondrial hexokinase II dissociation during ischemia correlates with mitochondrial cytochrome c release, reactive oxygen species production, and infarct size on reperfusion. *J. Am. Heart Assoc.* *2*, e005645.
- Patterson, S.W., and Starling, E.H. (1914). On the mechanical factors which determine the output of the ventricles. *J. Physiol.* *48*, 357–379.
- Patterson, S.W., Piper, H., and Starling, E.H. (1914). The regulation of the heart beat. *J. Physiol.* *48*, 465–513.
- Peltier, S., Burelle, Y., Novel-Chate, V., Demaison, L., Verdys, M., Saks, V., Keriel, C., and Leverve, X.M. (2005). Effect of exogenous adenosine and monensin on glycolytic flux in isolated perfused normoxic rat hearts: role of pyruvate kinase. *Mol. Cell. Biochem.* *277*, 55–61.
- Picard, M., Taivassalo, T., Gouspillou, G., and Hepple, R.T. (2011a). Mitochondria: isolation, structure and function. *J. Physiol.* *589*, 4413–4421.
- Picard, M., Taivassalo, T., Ritchie, D., Wright, K.J., Thomas, M.M., Romestaing, C., and Hepple, R.T. (2011b). Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PLoS One* *6*, e18317.
- Polimeni, P.I., and Buraczewski, S.I. (1988). Expansion of extracellular tracer spaces in the isolated heart perfused with crystalloid solutions: expansion of extracellular space, trans-sarcolemmal leakage, or both? *J. Mol. Cell. Cardiol.* *20*, 15–22.
- Ponsot, E., Zoll, J., N'guessan, B., Ribera, F., Lampert, E., Richard, R., Veksler, V., Ventura-Clapier, R., and Mettauer, B. (2005). Mitochondrial tissue specificity of substrates utilization in rat cardiac and skeletal muscles. *J. Cell. Physiol.* *203*, 479–486.
- Prebble, J.N. (2010). The discovery of oxidative phosphorylation: a conceptual off-shoot from the study of glycolysis. *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* *41*, 253–262.

- Pucar, D., Janssen, E., Dzeja, P.P., Juranic, N., Macura, S., Wieringa, B., and Terzic, A. (2000). Compromised energetics in the adenylate kinase AK1 gene knockout heart under metabolic stress. *J. Biol. Chem.* 275, 41424–41429.
- Pucar, D., Bast, P., Gumina, R.J., Lim, L., Drahl, C., Juranic, N., Macura, S., Janssen, E., Wieringa, B., Terzic, A., et al. (2002). Adenylate kinase AK1 knockout heart: energetics and functional performance under ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H776–H782.
- Rimbaud, S., Sanchez, H., Garnier, A., Fortin, D., Bigard, X., Veksler, V., and Ventura-Clapier, R. (2009). Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 952–959.
- Des Rosiers, C., Labarthe, F., Lloyd, S.G., and Chatham, J.C. (2011). Cardiac anaplerosis in health and disease: food for thought. *Cardiovasc. Res.* 90, 210–219.
- Saks, V., Favier, R., Guzun, R., Schlattner, U., and Wallimann, T. (2006). Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *J. Physiol.* 577, 769–777.
- Saks, V., Guzun, R., Timohhina, N., Tepp, K., Varikmaa, M., Monge, C., Beraud, N., Kaambre, T., Kuznetsov, A., Kadaja, L., et al. (2010). Structure-function relationships in feedback regulation of energy fluxes in vivo in health and disease: mitochondrial interactosome. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 678–697.
- Saks, V., Kuznetsov, A.V., Gonzalez-Granillo, M., Tepp, K., Timohhina, N., Karu-Varikmaa, M., Kaambre, T., Dos Santos, P., Boucher, F., and Guzun, R. (2012). Intracellular Energetic Units regulate metabolism in cardiac cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 419–436.
- Saks, V.A., Lipina, N.V., Sharov, V.G., Smirnov, V.N., Chazov, E., and Grosse, R. (1977). The localization of the MM isozyme of creatine phosphokinase on the surface membrane of myocardial cells and its functional coupling to ouabain-inhibited (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 465, 550–558.
- Saks, V.A., Rosenshtraukh, L.V., Smirnov, V.N., and Chazov, E.I. (1978). Role of creatine phosphokinase in cellular function and metabolism. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 56, 691–706.
- Saks, V.A., Ventura-Clapier, R., and Aliev, M.K. (1996). Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1274, 81–88.
- Saks, V.A., Veksler, V.I., Kuznetsov, A.V., Kay, L., Sikk, P., Tiivel, T., Tranqui, L., Olivares, J., Winkler, K., Wiedemann, F., et al. (1998). Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol. Cell. Biochem.* 184, 81–100.
- Dos Santos, P., Aliev, M.K., Diolez, P., Duclos, F., Besse, P., Bonoron-Adèle, S., Sikk, P., Canioni, P., and Saks, V.A. (2000). Metabolic control of contractile performance in isolated perfused rat heart. Analysis of experimental data by reaction:diffusion mathematical model. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 1703–1734.
- Seppet, E.K., Eimre, M., Anmann, T., Seppet, E., Peet, N., Käämbre, T., Paju, K., Piirsoo, A., Kuznetsov, A.V., Vendelin, M., et al. (2005). Intracellular energetic units in healthy and diseased hearts. *Exp. Clin. Cardiol.* 10, 173–183.
- Seppet, E.K., Eimre, M., Anmann, T., Seppet, E., Piirsoo, A., Peet, N., Paju, K., Guzun, R., Beraud, N., Pelloux, S., et al. (2006). Structure-function relationships in the regulation of energy transfer between mitochondria and ATPases in cardiac cells. *Exp. Clin. Cardiol.* 11, 189–194.

- Sharov, V.G., Saks, V.A., Smirnov, V.N., and Chazov, E.I. (1977). An electron microscopic histochemical investigation of the localization of creatine phosphokinase in heart cells. *Biochim. Biophys. Acta* *468*, 495–501.
- Shibayama, J., Taylor, T.G., Venable, P.W., Rhodes, N.L., Gil, R.B., Warren, M., Wende, A.R., Abel, E.D., Cox, J., Spitzer, K.W., et al. (2013). Metabolic determinants of electrical failure in ex-vivo canine model of cardiac arrest: evidence for the protective role of inorganic pyrophosphate. *PLoS One* *8*, e57821.
- Shimura, D., Nakai, G., Jiao, Q., Osanai, K., Kashikura, K., Endo, K., Soga, T., Goda, N., and Minamisawa, S. (2013). Metabolomic profiling analysis reveals chamber-dependent metabolite patterns in the mouse heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *305*, H494–H505.
- Stanley, W.C., Recchia, F.A., and Lopaschuk, G.D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev.* *85*, 1093–1129.
- Starling, E.H., and Visscher, M.B. (1927). The regulation of the energy output of the heart. *J. Physiol.* *62*, 243–261.
- Stavrou, B.M., Beck, C., and Flores, N.A. (2001). Changes in extracellular pH and myocardial ischaemia alter the cardiac effects of diadenosine tetraphosphate and pentaphosphate. *Br. J. Pharmacol.* *134*, 639–647.
- Stefenelli, T., Wikman-Coffelt, J., Wu, S.T., and Parmley, W.W. (1990). Calcium-dependent fluorescence transients during ventricular fibrillation. *Am. Heart J.* *120*, 590–597.
- Stefenelli, T., Wu, S.T., Parmley, W.W., and Wikman-Coffelt, J. (1992). Effects of propafenone on pacing-induced ventricular fibrillation and intracellular calcium in rat hearts. *Eur. Heart J.* *13*, 1556–1561.
- Tabibiazar, R., Wagner, R.A., Liao, A., and Quertermous, T. (2003). Transcriptional profiling of the heart reveals chamber-specific gene expression patterns. *Circ. Res.* *93*, 1193–1201.
- Taegtmeyer, H., and Ingwall, J.S. (2013). Creatine—a dispensable metabolite? *Circ. Res.* *112*, 878–880.
- Territo, P.R., French, S.A., Dunleavy, M.C., Evans, F.J., and Balaban, R.S. (2001). Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: rapid kinetics of mVO<sub>2</sub>, NADH, AND light scattering. *J. Biol. Chem.* *276*, 2586–2599.
- Tiivel, T., Kadaya, L., Kuznetsov, A., Käämbre, T., Peet, N., Sikk, P., Braun, U., Ventura-Clapier, R., Saks, V., and Seppet, E.K. (2000). Developmental changes in regulation of mitochondrial respiration by ADP and creatine in rat heart in vivo. *Mol. Cell. Biochem.* *208*, 119–128.
- Turner, D.C., Wallimann, T., and Eppenberger, H.M. (1973). A protein that binds specifically to the M-line of skeletal muscle is identified as the muscle form of creatine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *70*, 702–705.
- Vajda, S., Baczkó, I., and Leprán, I. (2007). Selective cardiac plasma-membrane K(ATP) channel inhibition is defibrillatory and improves survival during acute myocardial ischemia and reperfusion. *Eur. J. Pharmacol.* *577*, 115–123.
- Valentine, W.N., Paglia, D.E., Nakatani, M., and Brockway, R.A. (1989). Inhibition of adenylate kinase by P<sub>1</sub>,P<sub>5</sub>-di(adenosine 5') pentaphosphate in assays of erythrocyte enzyme activities requiring adenine nucleotides. *Am. J. Hematol.* *32*, 143–145.



- Venkataraman, R., Baldo, M.P., Hwang, H.S., Veltri, T., Pinto, J.R., Baudenbacher, F.J., and Knollmann, B.C. (2013). Myofilament calcium de-sensitization and contractile uncoupling prevent pause-triggered ventricular tachycardia in mouse hearts with chronic myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *60*, 8–15.
- Ventura-Clapier, R., Kuznetsov, A., Veksler, V., Boehm, E., and Anflous, K. (1998). Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol. Cell. Biochem.* *184*, 231–247.
- Vowles, D.T., and Easterby, J.S. (1979). Comparison of type I hexokinases from pig heart and kinetic evaluation of the effects of inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* *566*, 283–295.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., and Eppenberger, H.M. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* *281 ( Pt 1)*, 21–40.
- Wilding, J.R., Joubert, F., de Araujo, C., Fortin, D., Novotova, M., Veksler, V., and Ventura-Clapier, R. (2006). Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts. *J. Physiol.* *575*, 191–200.
- Wyss, M., Smeitink, J., Wevers, R.A., and Wallimann, T. (1992). Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* *1102*, 119–166.
- Xie, C., Kauffman, J., and Akar, F.G. (2014). Functional crosstalk between the mitochondrial PTP and KATP channels determine arrhythmic vulnerability to oxidative stress. *Front. Physiol.* *5*, 264.
- Zhang, L., Keung, W., Samokhvalov, V., Wang, W., and Lopaschuk, G.D. (2010). Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* *1801*, 1–22.
- Zordoky, B.N.M., Nagendran, J., Pulinilkunnil, T., Kienesberger, P.C., Masson, G., Waller, T.J., Kemp, B.E., Steinberg, G.R., and Dyck, J.R.B. (2014). AMPK-dependent inhibitory phosphorylation of ACC is not essential for maintaining myocardial fatty acid oxidation. *Circ. Res.* *115*, 518–524.
- Zorov, D.B., Juhaszova, M., Yaniv, Y., Nuss, H.B., Wang, S., and Sollott, S.J. (2009). Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc. Res.* *83*, 213–225.



# **ANNEXES**

## 8 ANNEXE

	VG		VD		Sp		OG		OD	
	ADP									
Contrôle	0,570 ± 0,07	326 ± 37	0,528 ± 0,04	403 ± 64	0,937 ± 0,09	313 ± 59	0,668 ± 0,12	570 ± 82	1,403 ± 0,26	689 ± 123
Cr	0,335 ± 0,07 *	119 ± 18 ***	0,548 ± 0,12	427 ± 188	0,829 ± 0,08	88 ± 11 ***	0,300 ± 0,05 *	269 ± 42 *	0,870 ± 0,21	311 ± 58 *
Ap5a	0,488 ± 0,04	968 ± 238 ***	1,467 ± 0,61	934 ± 274	0,885 ± 0,17	1326 ± 618	0,365 ± 0,08	1223 ± 412 *	0,929 ± 0,24	1233 ± 192 *
Blebb	0,466 ± 0,09	465 ± 102	0,454 ± 0,09	587 ± 135	0,984 ± 0,12	564 ± 65 *	0,574 ± 0,10	1380 ± 228 ***	1,601 ± 0,28	1428 ± 398 *
Ap5a/Blebb	0,366 ± 0,04	765 ± 49 ***	0,554 ± 0,14	630 ± 96	0,726 ± 0,05	478 ± 136	0,372 ± 0,04	2301 ± 492 ***	2,017 ± 0,31	3519 ± 1050 ***
	ATP									
Contrôle	0,198 ± 0,02	383 ± 70	0,415 ± 0,09	408 ± 118	0,730 ± 0,16	434 ± 96	0,191 ± 0,03	453 ± 122	1,022 ± 0,18	504 ± 65
Cr	0,339 ± 0,05 **	204 ± 42	0,536 ± 0,18	105 ± 11 **	0,857 ± 0,09	129 ± 28 ***	0,343 ± 0,06 *	278 ± 45	1,127 ± 0,32	500 ± 113
Ap5a	0,181 ± 0,02	1058 ± 373 *	0,277 ± 0,04	1201 ± 216 **	0,522 ± 0,10	745 ± 186	0,365 ± 0,13	3875 ± 2800 *	0,851 ± 0,16	1678 ± 532
Blebb	0,316 ± 0,08	1521 ± 886	0,411 ± 0,07	806 ± 280	0,501 ± 0,03	363 ± 62	0,420 ± 0,09 ***	1626 ± 448 **	1,602 ± 0,24	1165 ± 132 **
Ap5a/Blebb	0,265 ± 0,04	2589 ± 1250	0,299 ± 0,04	1300 ± 193 **	0,433 ± 0,03 *	1028 ± 465	0,416 ± 0,08 **	5137 ± 1088 ***	1,568 ± 0,20	5935 ± 719 ***

**Annexe 1: Paramètres respiratoires mitochondriaux de fibres perméabilisées des compartiments cardiaques.**

Les  $V_{max}$  (en pmol d'O<sub>2</sub>/sec/U de Cs) et  $K_m^{ADP}$  (en µmol/L) en présence d'ADP et d'ATP sont répertoriés pour le ventricule gauche (VG), ventricule droit (VD), septum (Sp), oreillette gauche (OG) et oreillette droite (OD). Les paramètres sont testés en condition Contrôle, en présence de créatine (20 mmol/L), d'ap5a (50 µmol/L), de blebbistatine (25 µmol/L) ou d'une combinaison de ces deux inhibiteurs.