



**HAL**  
open science

# Rôles des cardiofibroblastes dans la protection des cardiomyocytes au cours de l'ischémie-reperfusion

Maryline Abrial

► **To cite this version:**

Maryline Abrial. Rôles des cardiofibroblastes dans la protection des cardiomyocytes au cours de l'ischémie-reperfusion. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10209 . tel-01170995

**HAL Id: tel-01170995**

**<https://theses.hal.science/tel-01170995>**

Submitted on 2 Jul 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.

# **RÔLE DES CARDIOFIBROBLASTES DANS LA PROTECTION DES CARDIOMYOCYTES AU COURS DE L'ISCHEMIE - REPERFUSION**

## **THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Délivrée par  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1  
Et  
L'ECOLE DOCTORALE EDISS

Pour l'obtention du  
**DIPLOME DE DOCTORAT**

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le  
07 Novembre 2013

Par  
**Maryline ABRIAL**

Discipline : **Physiologie cardiovasculaire**

Membres du Jury :

Professeur Michel Ovize	Université de Lyon	Président
Professeur Fabrice Prunier	Université d'Angers	Rapporteur
Professeur Denis Angoulvant	Université de Tours	Rapporteur
Docteur Anne-Marie Rodriguez	Université de Créteil	Rapporteur
Docteur René Ferrera	Université de Lyon	Directeur de thèse
Docteur Claire Crola Da Silva	Université de Lyon	Co-Directrice de thèse

---

## Résumé

Les cardioblastes (CF) possèdent des rôles clés dans la régulation de la structure et du fonctionnement myocardique. Leurs implications physiopathologiques, notamment dans le remodelage et la fibrose, ont été largement décrites dans les maladies cardiovasculaires chroniques. Cependant, leurs rôles au cours de la phase aiguë d'ischémie-reperfusion (I/R) restent encore à élucider. Nous avons donc émis l'hypothèse que les CF pouvaient participer à la protection des cardiomyocytes (CM) face aux lésions d'I/R. Le but de ce travail a donc consisté en l'exploration et l'identification des mécanismes de cette protection. Un modèle cellulaire de CM et CF de rats nouveau-nés *in vitro* et un modèle d'I/R *in vivo* chez la souris ont été utilisés. Nos résultats montrent que la présence des CF, en co-culture avec les CM, augmente de façon paracrine leur viabilité, face aux lésions d'I/R. Cette action paracrine a été confirmée par l'utilisation du sécrétome de CF hypoxiques capable, à lui seul, d'augmenter la viabilité des CM. Ces résultats ont été corroborés par des expériences d'I/R *in vivo*, dans lesquelles les souris traitées avec le sécrétome de CF présentent une diminution de la taille d'infarctus. De plus, nous avons montré que TIMP-1, un facteur fortement détecté dans le sécrétome de CF, est capable de diminuer à la fois la mortalité cellulaire *in vitro* des CM et la taille de l'infarctus *in vivo*. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques nous a permis de mettre en évidence que cette protection paracrine était médiée en partie par l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt et ERK<sub>1/2</sub>. En conclusion cette étude démontre pour la première fois que les CF participent, de façon paracrine, à la protection des CM au cours la phase aiguë d'ischémie reperfusion. TIMP-1 semble être un des facteurs clé de cette cardioprotection par les CF.

En parallèle de ce travail, plusieurs études collaboratives ont été réalisées, sur une cible majeure d'investigation dans la cardioprotection : le pore de transition de perméabilité mitochondriale et notamment sa régulation par le complexe I de la chaîne respiratoire et les échanges calciques, ainsi que son implication dans la défaillance multi-organe face à l'arrêt cardiaque.

---

## Title

Role of cardiac fibroblasts in cardiomyocyte protection during ischemia-reperfusion

---

## Abstract

Roles of cardiac fibroblasts (CF) in the regulation of myocardial structure and function have been emphasized in the last decade. Their implications in pathophysiological aspects of chronic heart diseases such as myocardial remodelling and fibrosis is now well established. However their contribution to the acute phase of ischemia reperfusion injury still remains elusive. We hypothesized that CF may contribute to cardiomyocytes (CM) protection against ischemia reperfusion (I/R) injuries. This study was designed to investigate this protection and identify some of its mechanisms. Experiments were performed both on isolated neonatal rat CF and CM *in vitro* and *in vivo* mice model of myocardial infarction. We demonstrated that the presence of CF increases CM viability in co-cultures and that CF protect CM against I/R injuries in a paracrine manner. It was confirmed by a similar effect of hypoxic CF secretome alone on CM viability. These findings were corroborated by *in vivo* experiments in which an infarct size reduction was observed in CF secretome treated mice. Furthermore, experiments with Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1), abundantly detected in CF secretome, was able to both decrease CM cell death and infarct size. Experiments with pharmacological inhibitors provided more evidence that this paracrine protection is partly mediated by PI3K/Akt and ERK signalling pathways. Our data demonstrated for the first time that CF participate in cardioprotection during the acute phase of ischemia reperfusion, via a paracrine pathway, involving TIMP-1. Besides this first work, other collaborative studies have been performed, to investigate a major target in cardioprotection research : the mitochondrial permeability transition pore and its regulation by chain respiratory complex I and Ca<sup>2+</sup> transfers and finally its implication in multiple organ failure in cardiac arrest.

---

**Key words** : growth factors, cytokines, ischemia reperfusion injury, hypoxia, fibroblasts, cardiomyocytes

---

**Discipline** : Physiologie cardiovasculaire

---

## Intitulé et adresse du laboratoire

INSERM U1060 CarMeN, Equipe 5 Cardioprotection- Pr M. Ovize

Faculté de Médecine Lyon Est, 8 Avenue Rockefeller, 69373 LYON CEDEX 08

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

**M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

## COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme le Professeur C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Directeur : M. N. SIAUVE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : Mme S. FLECK

Directeur : Mme le Professeur I. DANIEL

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER



Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

**Thèse effectuée dans le laboratoire CarMeN-INSERM U1060 (Dr. Hubert Vidal)**

**Equipe 5 « Cardioprotection » (Pr. Michel Ovize)**

**Faculté de Médecine Lyon Est, 8 avenue Rockefeller 69373 Lyon CEDEX 08**

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord au Pr Michel Ovize, qui m'a accueillie au sein de son équipe. Merci de présider ce jury, votre expertise scientifique et vos précieux conseils ont permis de réaliser à bien ce travail.

Mes remerciements vont ensuite au Docteur Hubert Vidal : directeur du laboratoire CarMeN U1060 pour ses qualités humaines et scientifiques.

Je tiens également à remercier particulièrement les rapporteurs de ce travail : les Professeurs Fabrice Prunier et Denis Angoulvant ainsi que le Docteur Anne-Marie Rodriguez qui ont accepté d'apporter leurs expertises sur ce travail malgré leurs multiples occupations. Merci Denis, de m'avoir fait découvrir l'univers paracrine lors de mon stage de master en 2010. Merci Anne-Marie pour ces bons moments passés en Italie.

A mes directeurs de thèse, les Docteurs René Ferrera et Claire Crola Da Silva, pour m'avoir apporté leur conseils, leur soutien et leurs connaissances scientifiques. Malgré les moments difficiles au cours de ces années, ce travail n'aurait pu aboutir sans eux.

A Abdallah Gharib, pour son aide précieuse au quotidien dans le laboratoire, sa générosité, sa franchise et son soutien. Merci de m'avoir transmis votre rigueur et votre passion scientifique. A nos paris en tous genres et nos discussions animées, qui sont loin d'être terminées !

A Laurent Argaud et Martin Cour, pour m'avoir accordé leur confiance. Avoir pu finalement participer à vos travaux fut un réel plaisir.

A Murielle, pour ses compétences et son efficacité dans la vie quotidienne du laboratoire. Merci pour toute ton aide, ta sympathie et ton soutien au cours de toutes ces années.

A Fabrice, qui fut le premier à m'initier à la culture cellulaire. Merci pour ton aide, ainsi que ta rigueur et tes compétences scientifiques que tu m'as transmises dès mon arrivée au laboratoire.

A Marie-Christine, pour sa gentillesse, sa bonne humeur, ses histoires drôles, ses karaokés et surtout pour son aide si précieuse qu'elle apporte à tout le laboratoire.

A Lionel, pour sa bonne humeur et son calme légendaire. Merci d'avoir été une oreille toujours attentive au cours de ces années. J'attends cette guitare avec impatience.

A Bruno, pour ses conseils précieux aussi bien scientifiques que personnels. Merci pour toute ton aide dans la réalisation de ce travail. Et surtout à notre nouvelle amitié !

A Elisabeth et Noëlle, merci de m'avoir transmis votre rigueur et votre sérénité légendaire au cours de toutes ces après-midi passées à pulser !

A Pascal, merci pour ses conseils et sa gentillesse. Son optimisme légendaire me rappelle toujours le mien.

A Mélanie ou « Mme Bavarde », pour son dynamisme, ses conseils techniques et scientifiques précieux. A tous les « hop » et les « zou » que tu nous a fait partager. A bientôt aux USA j'espère.

A Ludovic pour sa bonne humeur et ses fondues savoyardes ou raclettes improvisées !

A Delphine, pour tous ses conseils scientifiques et personnels. Merci pour ton délicieux pain d'épices !

A Annie, pour son aide et ses conseils techniques. Merci de m'avoir si souvent remplacée en chambre de culture.

A Rizwan, pour son aide anglophone lors de la rédaction, ses conseils scientifiques et sa bonne humeur.

A Sandrine, malgré tes obligations professionnelles à l'hôpital, ta gaité, ta bonne humeur et ton dynamisme étaient toujours de rigueur au laboratoire. Merci pour toutes ces années.

A Marion, Daniel, Vincent et Laura, merci pour tous ces bons moments passés dans le bureau et surtout merci pour tous ces bonbons !

A Geoffrey dit « GeoGeo » et ses « bonjours » légendaires. Merci pour tous tes conseils et ton aide précieuse au cours de toutes ces années. Ma collection de Dinausorus prend fin ! A notre amitié !

A Elise, pour tous ses bons moments passés ensemble aussi bien au labo qu'autour d'un verre ou en virée shopping. Merci pour ta spontanéité, ta franchise et ton honnêteté. Mais surtout ton soutien et ton aide qui ont largement contribué à l'aboutissement de ce travail.

A Thomas, pour son dynamisme et son optimisme toujours de rigueur. Malgré tes retards légendaires, ton soutien, tes conseils et ton amitié on été précieux au cours de ces deux dernières années. A bientôt à Boston !

A Emily, co-équipière de toujours, sur le ring comme au labo. Merci pour ton calme, ta bonne humeur, ta gentillesse et surtout cette belle amitié !

A Johanna, dite « Zézé la Frisée ». Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta petite voix légendaire qui nous fait si souvent rire.

Je remercie également tous les membres du laboratoire que j'ai côtoyé durant ces 4 ans : Joseph, Charles, Damien, Souhila, Geneviève, Hélène, Nathan, Fabien, Pierre-Alain, Baptiste, Léa, Marine.

A Julie, à notre amitié depuis l'Ecosse et notre parcours similaire ! Merci pour tous ces bons moments passés ensemble qui furent accompagnés autant de pleurs, de disputes que de fous rires et qui font que notre amitié dure depuis toutes ces années malgré les kilomètres. Merci pour tous ces weekends passés à Lyon ou dans le Sud ! A bientôt pour ta thèse !

A mes parents, Philou, ma famille et mes amis.

*A ma grand mère,*

## PUBLICATIONS INTERNATIONALES

### TRAVAUX DE THESE :

*En révision :*

- **Cardiac fibroblasts protect cardiomyocytes from lethal ischemia reperfusion (Résultats et Discussion : Publication n°1)**

**Abrial M**, Crola Da Silva C, Augeul L, Pillot B, Ivanes F, Teixeira G, Cartier R, Ovize M, Ferrera R, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.

### TRAVAUX COLLABORATIFS :

*Publiés :*

- **Synergistic protective effect of cyclosporin A and rotenone against hypoxia-reoxygenation in cardiomyocytes (Résultats et Discussion : Publication n°2)**

Teixeira G, **Abrial M**, Portier K, Chiari P, Couture-Lepetit E, Tourneur Y, Ovize M, Gharib A, *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Mar;56:55-62. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.11.023

- ***Cyclosporine A at reperfusion fails to reduce infarct size in the in vivo rat heart***

De Paulis D, Chiari P, Teixeira G, Couture-Lepetit E, **Abrial M**, Argaud L, Gharib A, Ovize M, *Basic Res Cardiol*. 2013 Sep;108(5):379. doi: 10.1007/s00395-013-0379-4

- **Decreasing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from hypoxia-reoxygenation (Résultats et Discussion Publication : n°4)**

Paillard M, Tubbs E, Thiebaut PA, Gomez L, Fauconnier J, Crola Da Silva C, Teixeira G, Belaïdi E, Durand A, **Abrial M**, Lacampagne A, Rieusset J, Ovize M, *Circulation*, 2013

*En révision :*

- **Targeting the reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> handling to protect cardiomyocytes from lethal reperfusion injury (Résultats et Discussion : Publication n°3)**

Teixeira G, Fauconnier J, Chiari P, Couture-Lepetit E, Portier K, **Abrial M**, Ouillé A, Lacampagne A, Tourneur Y, Gharib A, Ovize M, *Basic Res Cardiol*

*En préparation :*

- **Ubiquitous protective effects of cyclosporine a to prevent cardiac arrest-induced multiple organ failure (Résultats et Discussion : Publication n°5)**

Cour M, **Abrial M**, Jahandiez V, Loufouat J, Belaïdi E, Gharib A, Varennes A, Monneret G, Nougier C, Ovize M, Argaud L



## COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

### COMMUNICATIONS ORALES :

- **ESC Working Group meeting 'The Heart and beyond: intercellular and interorgan communication', 02-05 May 2013, Varenna, Italy**  
*Paracrine factors from Cardiac Fibroblasts protects Cardiomyocytes against ischemia-reperfusion injury.*  
**M. Abrial**, C. Crola Da Silva, M. Ovize, R. Ferrera
- **Printemps de la Cardiologie, 18 et 19 avril 2013, Marseille, France**  
*Paracrine factors from Cardiac Fibroblasts protects Cardiomyocytes against ischemia-reperfusion injury.*  
**M. Abrial**, C. Crola Da Silva, M. Ovize, R. Ferrera
- **Printemps de la Cardiologie, 18 et 19 avril 2013, Marseille, France**  
*Cardiac Fibroblasts and Ischemia Reperfusion*  
**M. Abrial**, R. Ferrera

### POSTERS :

- **Printemps de la Cardiologie, 18 et 19 avril 2013, Marseille, France**  
*Paracrine factors from Cardiac Fibroblasts protects Cardiomyocytes against ischemia-reperfusion injury*  
**M. Abrial**, C. Crola Da Silva, M. Ovize, R. Ferrera
- **EMBO meeting, 22-25 september 2012, Nice, France**  
*TIMP-1 produced by Cardiac Fibroblast improves cardiomyocytes viability after ischemia reperfusion, M. Abrial*, C. Crola Da Silva, M. Ovize, R. Ferrera
- **Printemps de la Cardiologie, 12-13 avril 2012, Bordeaux, France**  
*TIMP-1 produced by Cardiac Fibroblast improves cardiomyocytes viability after ischemia reperfusion*  
**M. Abrial**, C. Crola Da Silva, M. Ovize, R. Ferrera
- **Printemps de la Cardiologie, 12-14 mai 2011, Lyon, France**  
*Cardiac Fibroblast Protect Cardiomyocytes From Simulated Ischemia Reperfusion Injury Through Paracrin Mechanisms,*  
**M. Abrial**, C. Crola Da Silva, F. Ivanès, D. Angoulvant, M. Ovize, R. Ferrera
- **Printemps de la Cardiologie, 15-17 avril 2010, Nantes, France**  
*Cardiac Fibroblast Protect Cardiomyocytes From Simulated Ischemia Reperfusion Injury Through Paracrin Mechanisms,*  
**M. Abrial**, C. Crola Da Silva, F. Ivanès, D. Angoulvant, M. Ovize, R. Ferrera

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>18</b>
<b><i>I. Ischémie-reperfusion et cardioprotection</i></b>	<b><i>19</i></b>
<b>A. Les déterminants de la taille d'infarctus</b>	<b>19</b>
1) Ischémie	19
2) Reperfusion	21
<b>B. Conséquences de l'ischémie-reperfusion</b>	<b>24</b>
1) Altérations cellulaires	25
2) Nécrose	29
3) Apoptose	29
4) Autophagie	30
<b>C. Stratégies de cardioprotection</b>	<b>32</b>
1) Pré- et post- conditionnement ischémiques	32
2) Pré et Postconditionnement pharmacologiques	41
3) Hypothermie	43
4) Thérapie cellulaire	44
<b><i>II. Les cardiofibroblastes</i></b>	<b><i>49</i></b>
<b>A. Caractéristiques des cardiofibroblastes</b>	<b>49</b>
1) Définition du cardiofibroblaste	49
2) Les myofibroblastes	50
3) Origine des cardiofibroblastes	51
4) Organisation des cardiofibroblastes dans le myocarde	53
<b>B. Fonctions des cardiofibroblastes</b>	<b>55</b>
1) Cardiofibroblastes et matrice extracellulaire	55
2) Cardiofibroblastes et interactions cellulaires	66
<b>C. Cardiofibroblastes et réparation post-infarctus</b>	<b>77</b>
1) Phase inflammatoire	78
2) Phase proliférative	80
3) Phase de maturation	82
<b>D. Cardiofibroblastes et ischémie-reperfusion</b>	<b>83</b>
<b>HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL</b>	<b>84</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>88</b>
<b><i>I. Etude in vitro</i></b>	<b><i>89</i></b>
<b>A. Culture cellulaire primaire</b>	<b>89</b>
1) Préparation des cardiomyocytes et cardiofibroblastes	89
2) Séparation des cardiomyocytes et cardiofibroblastes	90
3) Validation du modèle	90
<b>B. Hypoxie - Réoxygénation</b>	<b>92</b>
1) Préparation des cardiofibroblastes dans les inserts	93
2) Préparation du sécrétome de cardiofibroblastes	93

<b>C. Analyses Biochimiques</b>	<b>95</b>
1) Viabilité et mortalité cellulaire après hypoxie-réoxygénation	95
2) Expression des cytokines	96
3) Analyses des protéines	97
<b>II. Etude in vivo</b>	<b>101</b>
<b>A. Ischémie-reperfusion cardiaque chez la souris</b>	<b>101</b>
<b>B. Protocoles expérimentaux</b>	<b>102</b>
1) Injection de sécrétome de cardiofibroblastes	102
2) Injection de TIMP-1	103
<b>C. Quantification de l'infarctus</b>	<b>104</b>
<b>III. Statistiques</b>	<b>105</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>106</b>
<b><i>PARTIE I : Rôle des cardiofibroblastes dans la protection des cardiomyocytes au cours de l'ischémie-reperfusion</i></b>	<b>107</b>
<b>A. Introduction</b>	<b>108</b>
<b>B. Publication n°1</b>	<b>109</b>
<b>C. Résultats complémentaires liés à la publication n°1</b>	<b>143</b>
1) Effet des cardiofibroblastes en contact direct dans les puits de CM au cours de l'hypoxie-réoxygénation	143
2) Effet des cardiofibroblastes en contact indirect dans les inserts au cours de l'hypoxie-réoxygénation	145
3) Temps d'hypoxie nécessaire aux CF pour produire des facteurs protecteurs	147
4) Expression des protéines du récepteur putatif de TIMP-1 à la surface du CM de rat nouveau-né	149
5) Effet d'un inhibiteur pharmacologique des MMPs sur la viabilité des CM après hypoxie-réoxygénation	151
<b>D. Synthèse des résultats et discussion</b>	<b>153</b>
<b><i>PARTIE II : TRAVAUX EN COLLABORATION</i></b>	<b>156</b>
<b><i>I. Régulation du mPTP par le complexe I et la CypD</i></b>	<b>156</b>
<b>A. Introduction</b>	<b>156</b>
<b>B. Publication n°2</b>	<b>157</b>
<b>C. Synthèse des résultats et discussion</b>	<b>166</b>
<b><i>II. Echanges calciques CypD-dépendants et régulation du complexe I dans la cardioprotection</i></b>	<b>168</b>
<b>A. Introduction</b>	<b>168</b>
<b>B. Publication n°3</b>	<b>169</b>
<b>C. Synthèse des résultats et discussion</b>	<b>201</b>
<b><i>III. Rôle de la CypD à l'interface mitochondrie-réticulum au cours de l'ischémie-reperfusion</i></b>	<b>203</b>
<b>A. Introduction</b>	<b>203</b>
<b>B. Publication n°4</b>	<b>204</b>
<b>C. Synthèse des résultats et discussion</b>	<b>257</b>
<b><i>IV. Protection multi-organes par l'inhibition du mPTP face à l'arrêt cardio-circulatoire</i></b>	<b>258</b>
<b>A. Introduction</b>	<b>258</b>
<b>B. Publication n°5</b>	<b>259</b>
<b>C. Synthèse des résultats et discussion</b>	<b>292</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>294</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>297</b>

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<b>Figure 1</b> : « Wavefront Phenomenon »	20
<b>Figure 2</b> : Concept des lésions de reperfusion	23
<b>Figure 3</b> : Altérations cellulaires métaboliques et ioniques au cours de l'I/R	26
<b>Figure 4</b> : Conséquences de l'ouverture du mPTP	28
<b>Figure 5</b> : Le Pre- et le Postconditionnement ischémique	33
<b>Figure 6</b> : Résumé des principales voies impliquées par le Pre- et le Postconditionnement ischémique	35
<b>Figure 7</b> : Schéma récapitulatif des voies de signalisation activées par le Postconditionnement ischémique	40
<b>Figure 8</b> : Facteurs paracrines bénéfiques sécrétés par les différents types cellulaires progéniteurs utilisés pour la thérapie cellulaire post-infarctus	47
<b>Figure 9</b> : Schéma récapitulatif de l'origine des cardiofibroblastes	52
<b>Figure 10</b> : Images de microscopie confocale de coupes tissulaires de myocarde	54
<b>Figure 11</b> : Structure des MMPs	57
<b>Figure 12</b> : Structure tridimensionnelle de TIMP-1	59
<b>Figure 13</b> : Inhibition endogène des MMPs par les TIMPs	60
<b>Figure 14</b> : Couplage électrique entre cardiomyocytes et cardiofibroblastes	67
<b>Figure 15</b> : Nanotubes membranaires entre cardiomyocytes et cardiofibroblastes	70
<b>Figure 16</b> : Schéma récapitulatif des interactions paracrines entre cardiomyocytes et cardiofibroblastes	76
<b>Figure 17</b> : Cardiofibroblastes et réparation tissulaire post-infarctus	78
<b>Figure 18</b> : Processus de différenciation des cardiofibroblastes en myofibroblastes	81
<b>Figure 19</b> : Validation du modèle cellulaire primaire de cardiomyocytes et cardiofibroblastes	91
<b>Figure 20</b> : Schéma représentatif de la chambre à hypoxie	92
<b>Figure 21</b> : Protocoles expérimentaux d'hypoxie-réoxygénation <i>in vitro</i>	94
<b>Figure 22</b> : Protocoles expérimentaux d'ischémie-reperfusion <i>in vivo</i> chez la souris avec le secretome de cardiofibroblastes	102
<b>Figure 23</b> : Protocoles expérimentaux d'ischémie-reperfusion <i>in vivo</i> chez la souris avec TIMP-1	103
<b>Figure 24</b> : Schéma récapitulatif des différentes études de la thèse	296
<b>Figure supplémentaire 1</b> : Effet des cardiofibroblastes en contact direct avec les cardiomyocytes après hypoxie-réoxygénation	144
<b>Figure supplémentaire 2</b> : Effet paracrine des cardiofibroblastes sur la protection des cardiomyocytes à différents temps de la séquence d'hypoxie-réoxygénation	146
<b>Figure supplémentaire 3</b> : Temps d'hypoxie nécessaire aux cardiofibroblastes afin de produire un secretome protecteur	148
<b>Figure supplémentaire 4</b> : Vérification de l'expression des récepteurs putatifs de TIMP-1	150
<b>Figure supplémentaire 5</b> : Effet dose réponse du Batimastat sur la viabilité des cardiomyocytes après hypoxie-réoxygénation	152
<b>Tableau 1</b> : Tableau récapitulatif des effets et caractéristiques des différents TIMPs	65
<b>Tableau 2</b> : Anticorps utilisés	100
<b>Tableau 3</b> : Inhibiteurs pharmacologiques utilisés	100
<b>Tableau 4</b> : Protéines recombinantes utilisées	100

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADAM	A Dysintegrin And Metalloproteinase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ang II	Angiotensin II
AN	Zone Nécrosée
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
AR	Zone à Risque
ATP	Adénosine Triphosphate
BCA	Acide Bicinchoninique
BNP	Brain Natriuretic Peptide
BSA	Bovine Serum Albumin
CF	Cardiofibroblaste
CM	Cardiomyocyte
CsA	Ciclosporine A
CT-1	Cardiotrophin-1
CypD	Cyclophilin D
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
ET-1	Endothelin-1
FGF	Fibroblast growth factor
H/R	Hypoxie-Réoxygénation
IL	Interleukin
I/R	Ischémie-Reperfusion
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LV	Ventricule Gauche
MEC	Matrice Extracellulaire
mPTP	Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCU	Uniport Calcique Mitochondrial
MyoFB	Myofibroblaste
MMP	Métalloprotéinase
MT-MMP	Membrane Type-MMP

NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffer Saline
Pi	Phosphate Inorganique
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
PostC	Postconditionnement
PreC	Préconditionnement
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinase
ROS	Espèces Réactives de l'Oxygène
RS	Réticulum Sarcoplasmique
S	Sécrétome de Cardiofibroblastes
SAFE	Survivor Activating Factor Enhancement
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TBS-T	Tris Buffered Saline-Tween
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# INTRODUCTION

# I. Ischémie-reperfusion et cardioprotection

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de décès en France et dans les pays industrialisés. Les pathologies ischémiques représentent 27% des décès en France.

L'incidence de l'infarctus du myocarde reste en augmentation avec environ 120 000 cas par an en France. Elle est liée à de multiples facteurs de risque comme le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, la sédentarité, l'obésité et le diabète.

La mortalité liée à l'infarctus a diminué de 30% en 10 ans aux Etats Unis et en Europe de l'Ouest grâce à des progrès réalisés dans divers domaines tels que :

- la politique de santé publique de prévention des maladies cardio-vasculaires permettant un meilleur suivi des sujets à risque,
- une meilleure organisation des réseaux de soins,
- l'amélioration des connaissances et des pratiques médicales avec une prise en charge et une revascularisation myocardique (thrombolyse et angioplastie primaire) de plus en plus précoce.

Malgré ces progrès, le vieillissement de la population et la persistance des facteurs de risque font de l'infarctus du myocarde un problème majeur de santé publique<sup>1</sup>. De nombreuses équipes de recherche fondamentale et clinique s'intéressent aux mécanismes de mort cellulaire au cours de l'infarctus. Une meilleure compréhension de ces processus de mort cellulaire représente donc un challenge pour la mise en place d'une stratégie thérapeutique efficace.

## A. Les déterminants de la taille d'infarctus

### 1) Ischémie

L'ischémie myocardique est secondaire à la diminution de calibre d'une artère coronaire résultant d'une sténose ou d'une obstruction. Elle se traduit par une diminution du flux sanguin engendrant un déséquilibre entre les apports et les besoins du myocarde en



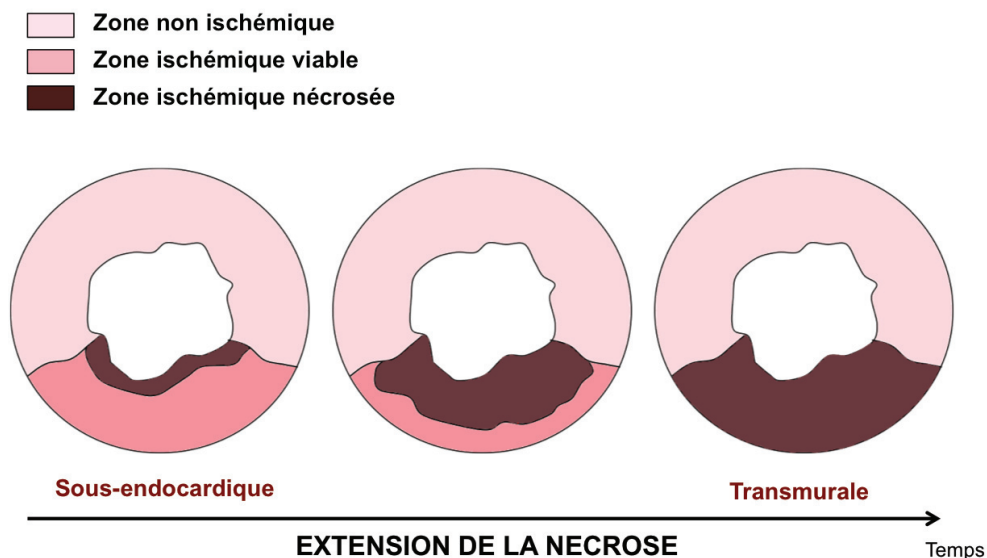
oxygène et en nutriments. Elle va entraîner une souffrance cellulaire pouvant aboutir à la mort cellulaire au niveau de la zone irriguée par l'artère concernée, appelée zone infarctée.

Plusieurs facteurs déterminent les conséquences de l'ischémie :

### *Durée de l'ischémie*

La gravité des lésions cellulaires engendrées dépend avant tout de la durée de l'ischémie. Pendant les premières minutes d'ischémie, les dommages cellulaires sont réversibles et, si la perfusion coronaire est rétablie, il n'y aura pas de mort cellulaire myocytaire<sup>2</sup>. Si l'ischémie est prolongée (supérieure à 20 minutes chez le rat ou le chien), les dommages cellulaires engendrés deviennent irréversibles et la nécrose s'étend ainsi progressivement de l'endocarde vers l'épicarde. Ce phénomène est appelé « wavefront phenomenon »<sup>3</sup>.

(Figure 1)



**Figure 1 : « Wavefront Phenomenon »** : l'extension de la nécrose au sein de la zone ischémisée suit une onde de progression depuis une lésion sous-endocardique jusqu'à une lésion transmurale. La durée de l'ischémie est un déterminant majeur de cette progression.

### ***Taille de la zone à risque***

La nécrose du myocarde chez l'animal, comme chez l'homme, dépend également de la taille de la zone ischémique, appelée zone à risque. Cette zone se définit comme le territoire vascularisé par l'artère coronaire occluse<sup>4</sup>. Ainsi, du fait de la distribution coronaire, plus l'occlusion artérielle est proximale, plus la taille de la zone à risque est importante et plus l'infarctus sera étendu.

### ***Débit collatéral***

Il se définit comme le débit sanguin myocardique, provenant des zones non ischémiques voisines, persistant dans la zone ischémique après occlusion de l'artère coronaire nourricière. Il s'agit d'une vascularisation artériolaire principalement épicaudique. Ce débit collatéral est donc un facteur capable d'influencer la taille de l'infarctus. Ainsi plus le débit collatéral est faible plus l'évolution vers la nécrose est rapide<sup>2</sup>. Ce débit est variable d'une espèce à l'autre mais présente également une importante variabilité interindividuelle.

### ***Température***

La température peut être également un facteur déterminant de la taille de l'infarctus. Il a été montré, dans un modèle d'infarctus chez le lapin, que la taille de l'infarctus, normalisée par rapport à la taille de la zone à risque, est corrélée de façon positive à la température centrale de l'animal<sup>5</sup>.

## **2) Reperfusion**

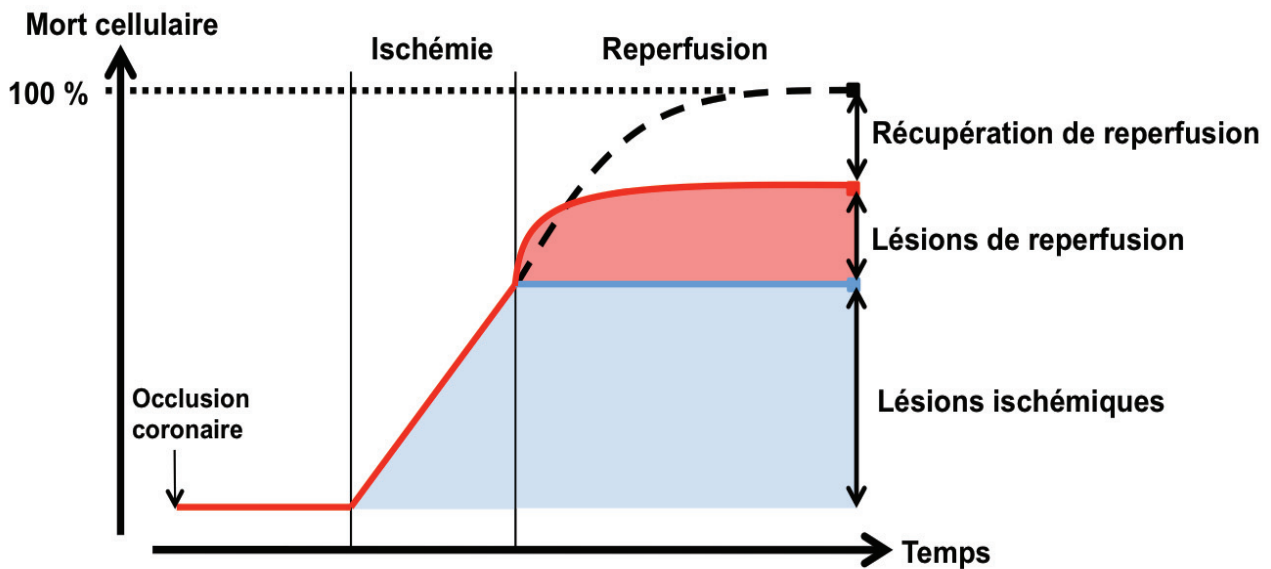
Le délai de levée de l'occlusion coronaire est le facteur pronostic clinique principal au cours du syndrome coronarien aigu. Il a été montré, aussi bien dans des modèles expérimentaux qu'en clinique, que la seule méthode permettant de réduire la taille de l'infarctus consiste en la reperfusion coronaire, à condition que celle-ci soit entreprise suffisamment tôt<sup>2</sup>. Bien que la fenêtre de temps ne soit pas totalement définie chez l'homme, des études cliniques suggèrent que la sauvegarde du myocarde ischémique est assurée lorsque la reperfusion est

commencée dans les 6 heures suivant le début de la douleur thoracique<sup>6</sup>. Ainsi, avec le développement de l'angioplastie primaire, une reperfusion précoce est devenue cliniquement possible en routine.

Bien qu'il ne fasse aucun doute que la reperfusion soit le seul traitement salvateur du myocarde ischémié, de nombreux travaux expérimentaux et cliniques ont mis en évidence un effet néfaste de cette reperfusion. La notion de lésions de reperfusion a été introduite par Jennings *et al.*, qui émirent l'hypothèse selon laquelle, chez le chien, la reperfusion s'accompagnait d'une accélération du processus nécrotique mis en place pendant l'épisode ischémié préalable<sup>2,7</sup> (Figure 2). Hearse *et al.* démontrèrent par la suite, dans un modèle de cœur isolé perfusé de rat, que la réoxygénation du myocarde ischémié s'accompagnait d'une libération massive d'enzymes cardiaques et de dommages ultra-structuraux plus importants que si l'ischémie avait été maintenue, introduisant ainsi la notion de « paradoxe de l'oxygène »<sup>8</sup>. La reperfusion est donc considérée comme une « épée à double tranchant » (Figure 2).

Il existe 4 formes de lésions de reperfusion :

- Les arythmies de reperfusion, qui sont constatées chez toutes les espèces.
- La sidération myocardique (*myocardial stunning*), qui est définie comme un phénomène de récupération retardée malgré la normalisation du flux coronaire<sup>9</sup>.
- Les dommages vasculaires avec le phénomène de *no-reflow* décrit par Kloner *et al.*, qui se définit comme l'absence de rétablissement immédiat de la perfusion coronaire après la reperfusion d'une zone ischémié<sup>10</sup>.
- La mort cellulaire liée à la reperfusion.



**Figure 2 : Concept des lésions de reperfusion.** Adapté de Yellon DM & Hausenloy DJ, JCI, 2013. Pendant l'ischémie, des dommages cellulaires irréversibles se produisent en fonction du temps et, en l'absence de reperfusion (courbe en pointillés), ils peuvent conduire à la mort cellulaire totale. Contrairement à ce que l'on pourrait penser en théorie (courbe bleue), la reperfusion n'abolit pas complètement ce processus de mort cellulaire et engendre elle aussi des lésions (courbe rouge). Par conséquent, diminuer les lésions survenant à la reperfusion en augmentant la survie cellulaire, représente un enjeu clinique majeur dans la cardioprotection.

## B. Conséquences de l'ischémie-reperfusion

Le myocarde requiert, pour son activité contractile, des apports énergétiques importants assurés par la synthèse d'ATP. Celle-ci est entretenue par un fort métabolisme oxydatif. En effet, le cœur consomme environ 10 % de l'apport total en oxygène de l'organisme<sup>11</sup>. Le myocarde fonctionne en permanence en flux tendu, ses réserves énergétiques ne lui permettent que quelques secondes d'autonomie. Par conséquent, il est dépendant d'un apport continu en oxygène, l'un des substrats de la phosphorylation oxydative, permettant la production d'ATP nécessaire à son fonctionnement.

Dans des conditions normales, où le flux coronaire assure un approvisionnement en substrats métaboliques et en oxygène optimal, l'oxydation des acides gras représentent environ 60 à 70 % de la consommation en oxygène du myocarde contre environ 30 % pour le lactate et le glucose et environ 3% pour les corps cétoniques et les acides aminés<sup>12</sup>. En effet, l'acide gras est un meilleur substrat que le glucose en terme de production énergétique : 129 ATP par molécule de palmitate contre 36 ATP par molécule de glucose.

Cependant, selon la nature du substrat métabolisé par le myocarde, la quantité d'oxygène utilisée est différente : l'oxydation d'une molécule d'acide gras nécessite plus d'oxygène que l'oxydation d'une molécule de glucose. Cette différence reste sans conséquence en conditions physiologiques, mais elle devient un facteur déterminant pour la fonction de la cellule cardiaque en situation de déficit d'oxygène telle que l'ischémie. La cellule va alors s'adapter aux conditions ischémiques entraînant de nombreuses altérations cellulaires.

## 1) Altérations cellulaires

### *Altérations métaboliques*

L'ischémie partielle diminue l'oxydation des acides gras et augmente la glycolyse anaérobie, notamment par l'augmentation du nombre de transporteurs de glucose : GLUT-1 et GLUT-4 favorisant l'entrée de glucose dans la cellule, aussi bien dans les zones ischémiques que non ischémiques<sup>13,14</sup>. Dans ces conditions d'ischémie modérée, le myocarde est qualifié d'hibernant, se traduisant par une autopréservation des cellules qui diminuent leur activité métabolique en réduisant leur activité mécanique.

Lorsque l'ischémie se prolonge, seule la glycolyse assure la synthèse d'ATP. Cependant, le débit coronaire étant réduit, il n'y a plus d'apport de glucose aux cellules qui mobilisent alors leur glycogène intracellulaire. Malgré un faible rendement (3 ATP par molécule de glucose), la synthèse d'ATP par la glycolyse permet ainsi le maintien de l'homéostasie ionique, en assurant le fonctionnement de certains canaux comme la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase du réticulum sarcoplasmique ou encore la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase du sarcolemme.

La stimulation importante de la glycolyse, accompagnée d'une inhibition de l'oxydation du pyruvate, aboutit à une accumulation de protons (découplage entre glycolyse anaérobie et oxydation du pyruvate) et une augmentation de la production de lactate<sup>15</sup>. Cette accumulation se traduit par une acidification du milieu intracellulaire. Une partie de l'ATP va alors être utilisée pour rétablir l'homéostasie, entre autres, des ions  $\text{H}^+$ <sup>16</sup>.

Lors de la reperfusion, pour que le myocarde reprenne une fonction contractile, il est nécessaire que la phosphorylation oxydative soit réactivée rapidement. Ainsi, l'oxydation des acides gras redevient la source prédominante de production d'ATP, fournissant 80 à 90 % des besoins énergétiques du cœur<sup>17</sup>. La  $\beta$ -oxydation étant plus coûteuse en oxygène que la glycolyse et la vitesse élevée à laquelle les acides gras sont oxydés va contribuer à la dysfonction contractile. Il a été montré que favoriser l'oxydation de glucose au cours de l'ischémie-reperfusion peut entraîner une amélioration de la fonction cardiaque<sup>17</sup>.

## Altérations ioniques

L'ischémie et la reperfusion entraînent des perturbations ioniques cellulaires marquées (Figure 3). L'ischémie induit une accumulation intracellulaire de  $H^+$ , conduisant à une acidose tissulaire. Pour réguler le pH intracellulaire, la cellule va activer l'antiport  $Na^+/H^+$  afin d'entraîner une sortie des protons<sup>18</sup>. Cet échangeur va être particulièrement actif au moment de la reperfusion mais cette activation va être associée à une entrée massive de  $Na^+$ <sup>19</sup>. Cette accumulation intracellulaire de  $Na^+$  va conduire en retour à une augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire via l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  dont l'activité diminue, jusqu'à fonctionner en mode inverse, induisant ainsi une entrée massive de  $Ca^{2+}$  dans la cellule<sup>20</sup>. Cette surcharge calcique est elle-même à l'origine d'une cascade d'événements délétères comme une hyper contractilité myofibrillaire, une déplétion d'ATP, des dommages ultra-structuraux de la mitochondrie et peut conduire à la sidération myocardique<sup>21</sup>. Jennings et al ont été les premiers à montrer l'implication de la mitochondrie dans les dommages cellulaires liés à l'I/R<sup>22-24,25</sup>. L'I/R altère l'intégrité de la chaîne respiratoire mitochondriale et induit une dysfonction de la phosphorylation oxydative<sup>26,27</sup>.

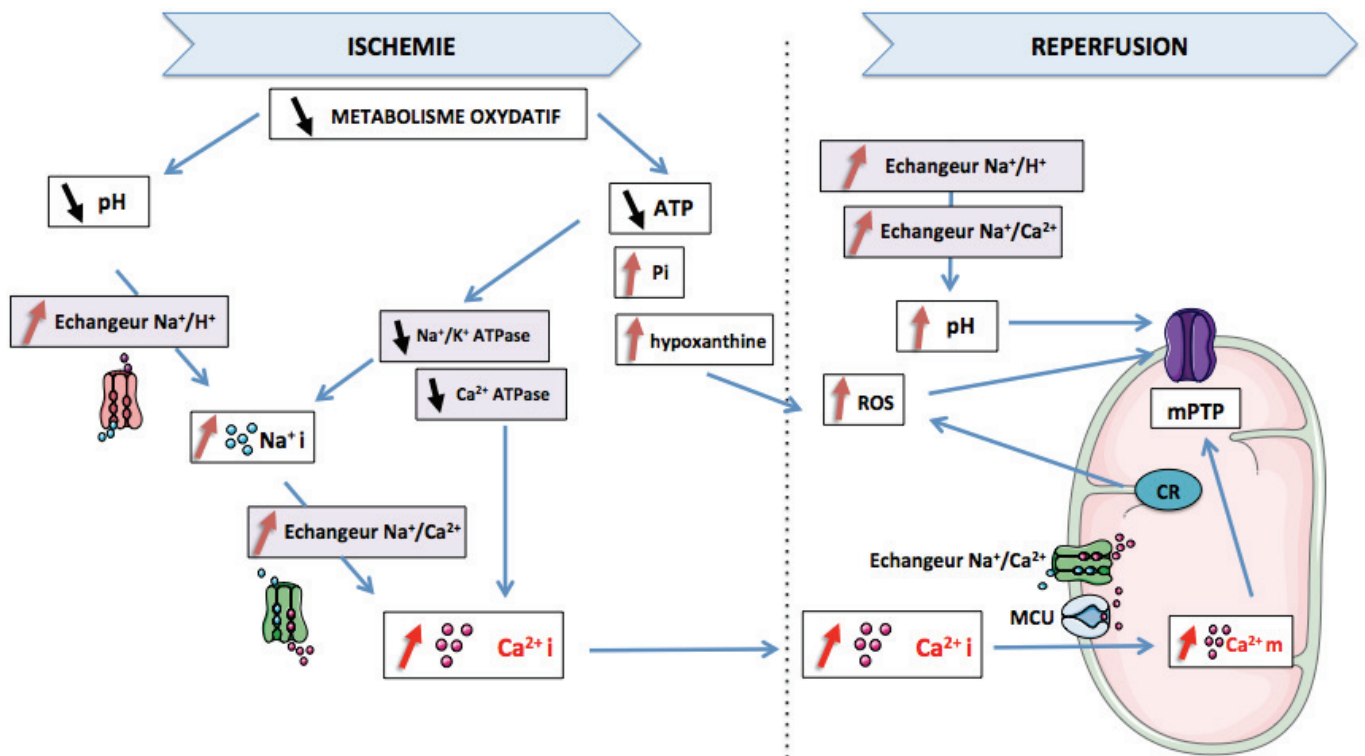


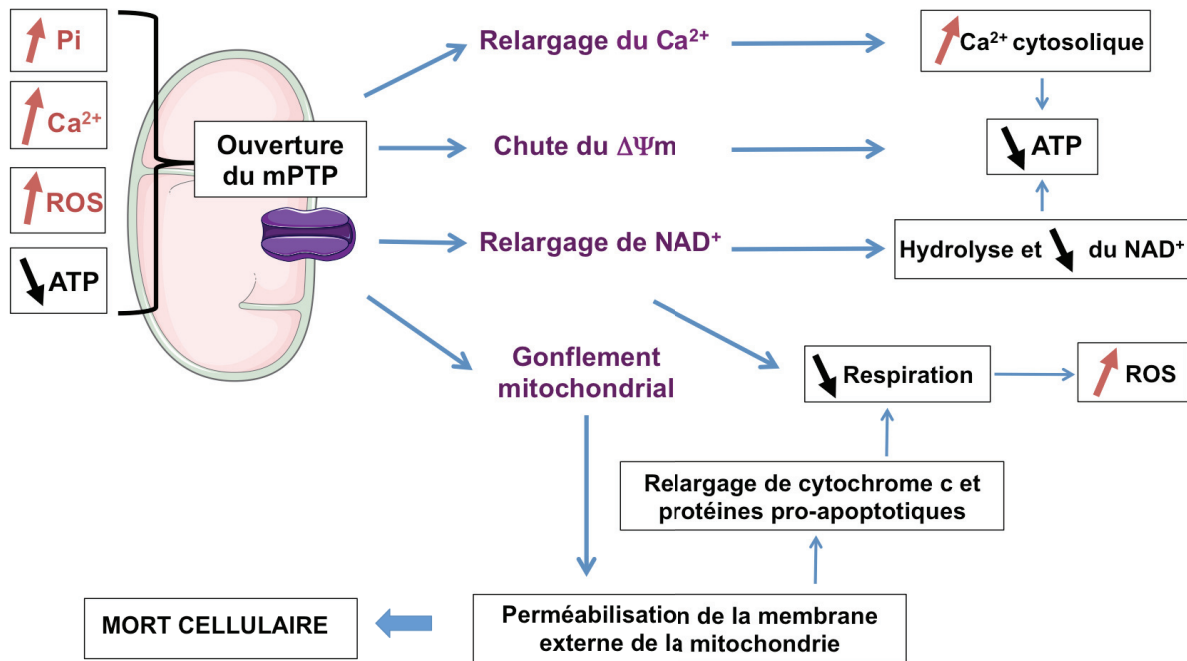
Figure 3 : Altérations cellulaires métaboliques et ioniques se produisant au cours de l'ischémie-reperfusion. Adaptée de Benhabbouche *et al.*, Annales Françaises d'Anesthésie

et de Réanimation, 2011. La diminution du métabolisme oxydatif au cours de l'ischémie va contribuer aux perturbations ioniques cellulaires aboutissant à une surcharge en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ( $\text{Ca}^{2+}$  i) et a pour conséquence une surcharge en  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitochondrie ( $\text{Ca}^{2+}$  m). Pi : phosphate inorganique, ROS : espèces réactives de l'oxygène, CR : chaîne respiratoire, MCU : uniport calcique mitochondrial, mPTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale.

### ***Ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale***

Il a été montré expérimentalement que de fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  entraînent un gonflement mitochondrial ou « swelling » et que ce gonflement pouvait être inhibé par la chélation du  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>28</sup>. Ce gonflement est provoqué par une perméabilisation de la membrane interne de la mitochondrie<sup>29</sup>. Cette perméabilisation contribue à l'ouverture d'un mégacanal non spécifique ne laissant passer que des molécules de poids moléculaire inférieur à 1,5kDa<sup>30-32</sup>. Ce canal est connu sous le nom de pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) et possède un large éventail d'activateurs et d'inhibiteurs. Les conditions favorables à son ouverture sont une baisse de l'ATP intracellulaire, une accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$ , une surproduction de radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une élévation du taux de phosphate inorganique (Pi). Toutes ces conditions sont réunies lors d'une ischémie-reperfusion prolongée<sup>33,34</sup>. Ainsi, de nombreux travaux ont montré, ces dernières années, que le mPTP joue un rôle central dans les lésions de reperfusion<sup>35-37</sup>. La figure 4 illustre ce phénomène.





**Figure 4 : Conséquences de l'ouverture du mPTP.** Adaptée de Di Lisa *et al.*, Antioxid Redox Signal, 2011. Lorsque l'ouverture du mPTP est prolongée, la membrane interne perd son imperméabilité constitutionnelle. Le potentiel de membrane mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) s'effondre et la synthèse d'ATP s'arrête. Le gonflement de la matrice entraîne la rupture de la membrane externe mitochondriale et le relargage de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c.

### ***Chute du potentiel membranaire mitochondrial***

La membrane interne de la mitochondrie, qui est normalement imperméable aux ions et aux protéines, est responsable du maintien du potentiel transmembranaire ( $\Delta\Psi_m$ ). Lorsque l'ouverture du mPTP est prolongée en conditions d'I/R, créant ainsi un canal non sélectif entre la membrane interne et le sarcoplasme, il en résulte un effondrement du  $\Delta\Psi_m$ . Afin de limiter la chute du  $\Delta\Psi_m$ , la pompe F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>-ATPsynthase va fonctionner en mode inverse, déplaçant ainsi rapidement les stocks d'ATP cellulaire.

## **Formation d'espèces réactives de l'oxygène**

Lors de la reperfusion, le retour massif de l'oxygène, couplé à la baisse d'ADP, favorisent la production des ROS par augmentation de la fuite d'électrons. Le retour de l'oxygène va également favoriser l'oxydation, par la xanthine oxydase, de ses 2 substrats accumulés pendant l'ischémie : la xanthine et l'hypoxanthine. La résultante de ces réactions est donc la production d' $O_2^-$  puis de  $H_2O_2$ <sup>38</sup>. Ces ROS vont d'une part endommager l'ultrastructure des cellules par leurs réactions avec les lipides, les protéines et les acides nucléiques et d'autre part déclencher l'ouverture du mPTP<sup>39</sup>. La production de ROS mitochondriale va alors augmenter par un mécanisme de rétro-contrôle positif<sup>40</sup>.

## **2) Nécrose**

La nécrose myocardique est directement liée à la privation en oxygène et en nutriments des cellules cardiaques, particulièrement les cardiomyocytes, et à ses conséquences directes : chute du taux d'ATP, surcharge calcique, etc. Les conséquences ultra-structurales de la nécrose cardiomyocytaire peuvent être caractérisées par l'accumulation d'inclusions intra-mitochondriales cristallines de calcium et la rupture des membranes cytoplasmiques associée avec celles des organites intracellulaires. Une conservation de la morphologie nucléaire est observée malgré des dégâts causés à l'ADN nucléaire de façon aléatoire par l'action de nucléases et de protéases dégradant les histones. Sont également associées à cela, une libération d'enzymes et de protéines cytosoliques : LDH (Lactate déshydrogénase), créatine kinase, troponine I et T ainsi qu'une forte réaction inflammatoire.

## **3) Apoptose**

Jusqu'au début des années 1970, la mort cellulaire était synonyme de nécrose. Les travaux de Kerr *et al.* ont révolutionné ce concept en mettant en évidence une autre forme de mort cellulaire : l'apoptose, définie comme une mort cellulaire programmée<sup>41</sup>. Elle se caractérise par des altérations morphologiques comprenant une condensation de la cellule et du noyau,

une fragmentation spécifique de l'ADN et un bourgeonnement de la membrane plasmique conduisant à la formation de corps apoptotiques.

Il a été montré que le processus d'apoptose est initié au cours de l'ischémie puis amplifié au moment de la reperfusion<sup>42,43</sup>. Ainsi, l'apoptose, en contribuant à la mort cellulaire observée à la reperfusion myocardique, fait suite à la surcharge calcique cellulaire et mitochondriale ainsi qu'au stress oxydatif<sup>44</sup>. Le signal de mort provient principalement de deux voies : la voie intrinsèque, ou voie mitochondriale et la voie extrinsèque ou voie des récepteurs membranaires.

- *La voie mitochondriale* se caractérise en situation de stress métabolique par une modification du potentiel membranaire et une transition de perméabilité mitochondriale permettant la libération de substances pro-apoptotiques telles que l'AIF (apoptosis inducing factor) et le cytochrome c, activateur de la caspase 9. L'activation de cette voie mitochondriale a été mise en évidence au cours de la réoxygénation<sup>45,46</sup>.
- *La voie des récepteurs de mort* est médiée par la fixation d'un ligand tel que TNF- $\alpha$  ou Fas-L sur son récepteur contenant un « domaine de mort » (TRADD ou FADD) induisant l'activation de caspases initiatrices (caspases 8 ou 10) puis des caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) conduisant à la mort cellulaire apoptotique.

#### **4) Autophagie**

A l'origine, l'autophagie a été décrite comme un mécanisme cellulaire physiologique conduisant à la formation de vésicules appelées autophagosomes permettant la dégradation et le recyclage de certains organelles ou protéines endommagées, non nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. On sait aujourd'hui qu'elle peut être bénéfique ou néfaste selon le contexte physiologique ou physiopathologique.

L'autophagie peut être induite lors d'un changement de l'environnement cellulaire, comme une ischémie. En effet, elle peut être déclenchée par une privation de nutriments, lorsque le recyclage en acides aminés et acides gras est nécessaire à la survie cellulaire. De nombreuses études ont montré que l'autophagie était activée à la fois par l'ischémie et par la reperfusion<sup>47-49</sup>. Le rôle de l'autophagie au cours de l'ischémie-reperfusion reste mal connu et encore très controversé. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'un niveau basal d'autophagie était nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire et pouvait également protéger les cellules contre des accumulations ou des dysfonctions d'organelles après un épisode bref d'hypoxie. Cependant, il est à noter aussi qu'un stress sévère d'hypoxie prolongée suivie d'une réoxygénation entraîne une activation excessive du phénomène d'autophagie, pouvant conduire à l'autodigestion d'organites essentiels et donc à la mort cellulaire<sup>50</sup>.

Au cours de l'ischémie, l'autophagie serait induite par l'activation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK), reflétant la diminution du taux d'ATP intracellulaire. Au cours de la reperfusion, l'AMPK n'est plus activée mais une forte expression de Beclin1, une protéine majeure du processus d'activation de l'autophagie, a été observée. Par conséquent les voies intracellulaires de l'autophagie mises en jeu au cours de l'ischémie ou de la reperfusion ne sont pas les mêmes et pourraient donc avoir des effets très différents. L'autophagie peut également être activée par différents facteurs, tels que les ROS, un stress du réticulum endoplasmique (accumulation de protéines mal conformées) ou encore une augmentation du calcium intracellulaire<sup>51</sup>. Les mécanismes potentiellement bénéfiques induits par l'autophagie sont donc multiples. En effet, la dégradation via l'autophagosome permet de recycler les protéines et membranes et donc de régénérer de l'ATP via l'oxydation des acides aminés et les acides gras ainsi obtenus<sup>48</sup>. La notion de mitophagie est également évoquée, puisque l'autophagie permettrait alors de dégrader les mitochondries endommagées par le processus d'ischémie-reperfusion et de prévenir ainsi le relargage de ROS ou de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c ou AIF lors de l'ouverture du mPTP<sup>52</sup>. Par ailleurs, l'autophagie activée par un stress du réticulum permet de diminuer le taux de protéines mal conformées qui n'auraient pas été dégradées par le protéasome, au sein de la cellule, au cours de l'ischémie-reperfusion.

## C. Stratégies de cardioprotection

### 1) Pré- et post- conditionnement ischémiques

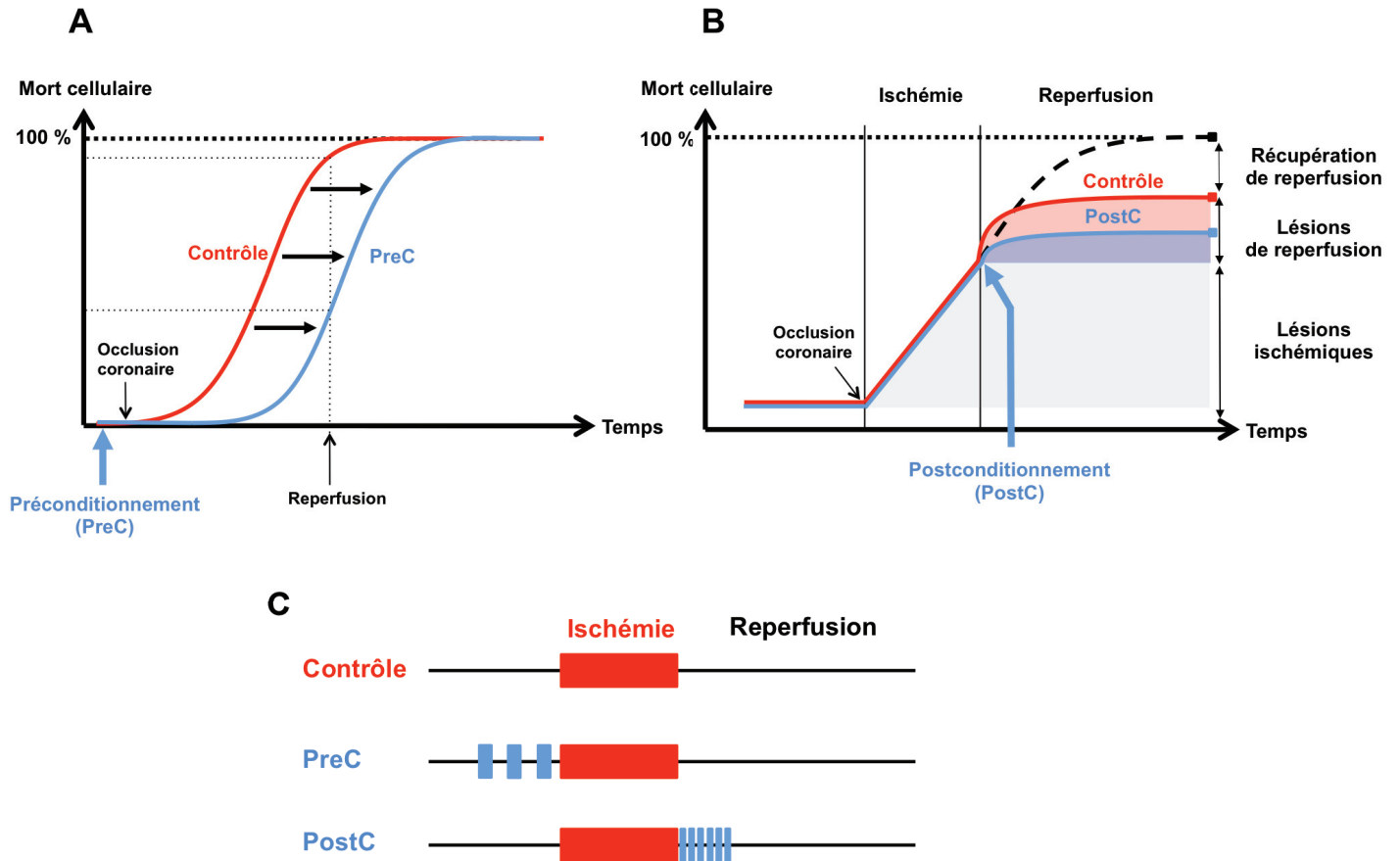
#### *Préconditionnement ischémique*

Le preconditionnement (PreC) ischémique a été décrit pour la première fois par l'équipe de Murry et Reimer en 1986 comme une protection endogène du myocarde<sup>53,54</sup>. En effet, ces auteurs ont montré que les lésions myocardiques induites par une ischémie prolongée étaient considérablement réduites lorsque le myocarde était préalablement exposé à de brèves séquences d'I/R, de l'ordre de la minute (Figure 5 A, C). Ce phénomène de mémorisation cellulaire est un mécanisme conservé au cours de l'évolution et entre les espèces, y compris chez l'homme<sup>55-59</sup>. De plus, le PreC ischémique est capable d'induire une protection similaire dans de nombreux organes, tels que le cerveau, le foie et le rein<sup>60-62</sup>. Cependant, malgré de nombreuses études, les mécanismes mis en jeu lors de ce phénomène restent encore mal connus<sup>63,64</sup>.

#### *Postconditionnement ischémique*

Comme il a été décrit précédemment, la reperfusion permet de sauver le myocarde ischémique mais provoque elle aussi des lésions, appelées lésions de reperfusion. En 2003, l'équipe de Zhao a montré, de façon parallèle au PreC, que de brèves séquences d'I/R appliquées à l'initiation de la reperfusion, diminuaient la taille de l'infarctus. Ce concept, baptisé postconditionnement (PostC), est basé sur le même principe que le PreC mais consiste en l'application de brèves périodes d'I/R plus courtes (de l'ordre de la seconde) et à la fois plus nombreuses que celles du PreC<sup>65</sup> (Figure 5 B, C). Ce PostC est efficace à la fois dans des modèles *in vitro* et *in vivo* et présente un fort intérêt clinique car il est applicable chez les patients présentant un infarctus du myocarde. En effet, une étude réalisée par notre équipe chez l'homme, a montré que le PostC ischémique diminuait de 36% la taille de l'infarctus<sup>66</sup>. A la différence du PreC, le PostC ne cible que les lésions de reperfusion et la fenêtre thérapeutique du PostC correspond aux premiers instants de la reperfusion<sup>67</sup>.

Par ailleurs, il a été montré que plus l'ischémie est longue et plus l'efficacité du PostC diminue<sup>68</sup>. Cependant si le PostC est appliqué à la suite d'une très courte ischémie (dite sub-léthale) n'entraînant pas d'infarctus, celui-ci peut causer un faible infarctus<sup>68</sup>.



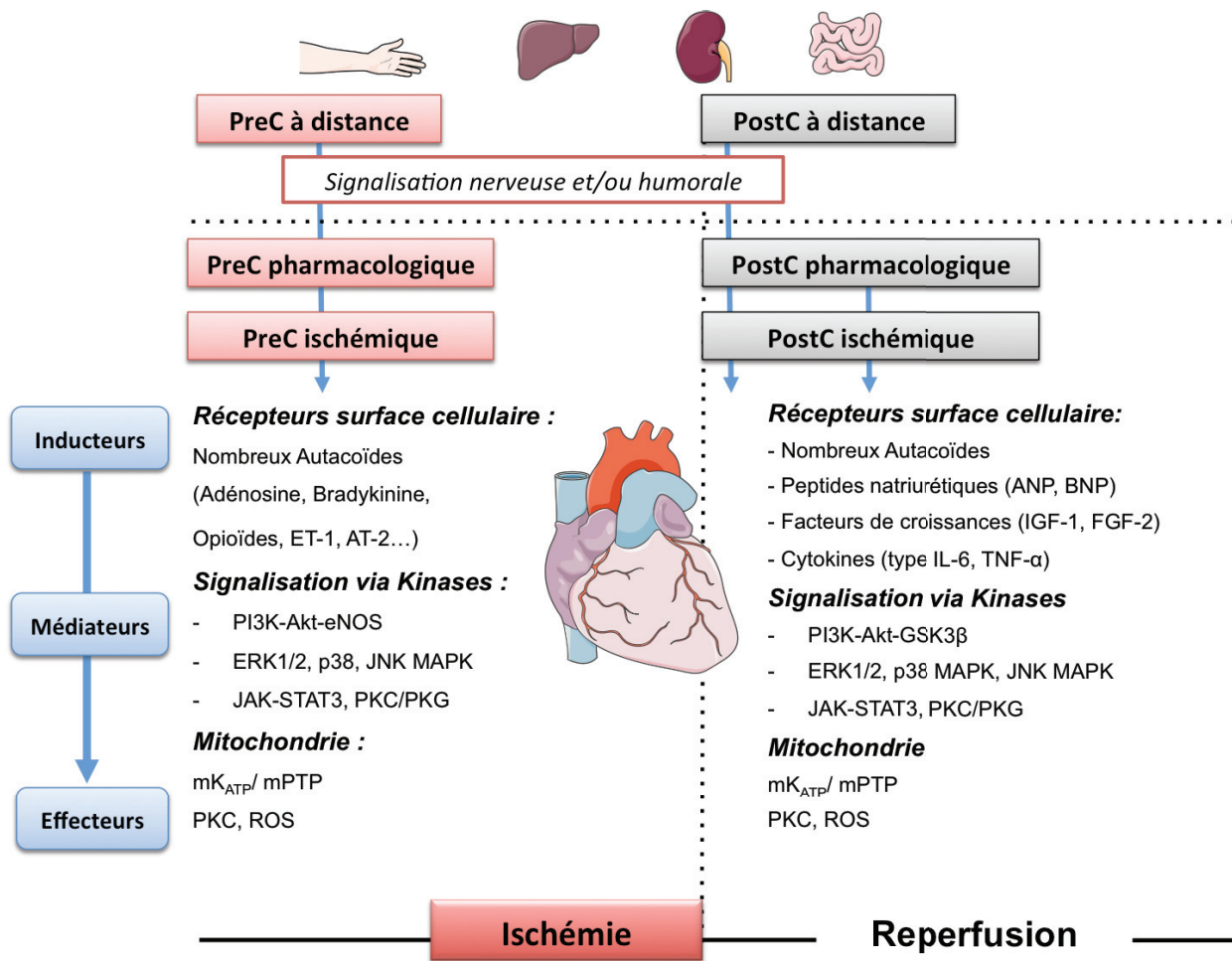
**Figure 5 : (A, C) Le preconditionnement ischémique (PreC).** Adaptée de Ferdinandy *et al.*, Pharmacol Rev 2007. Le PreC consiste en l'application de brèves séquences d'I/R avant une occlusion coronaire prolongée suivi d'une reperfusion. Ce traitement retarde la survenue des lésions en décalant vers la droite (courbe bleue) la courbe de la cinétique d'apparition de la mort cellulaire (courbe rouge). **(B, C) Le Postconditionnement ischémique (PostC).** Il consiste en l'application de brèves séquences d'I/R dès les premières minutes de la reperfusion. La reperfusion permet de prévenir la mort cellulaire totale (courbe noire pointillée) entraînée par une ischémie prolongée mais entraîne elle aussi des lésions (courbe rouge). Le PostC permet donc de limiter les dommages survenant à la reperfusion en prévenant davantage la mort cellulaire (courbe bleue). Adaptée de M.Ovize *et al.*, Cardiovasc Res 2010.

### ***Pré et postconditionnement ischémique à distance***

De manière intéressante, il a été montré que des niveaux de cardioprotection similaires à ceux du pré et postconditionnement ischémique pouvaient être atteints en appliquant de brèves séquences d'ischémie-reperfusion, non létales, dans un organe à distance du cœur. Ce phénomène a été nommé conditionnement ischémique à distance et a tout d'abord été mis en évidence pour la première fois, de façon régionale, au sein du myocarde par Przyklenk *et al.* en 1993. Ces auteurs ont démontré que l'application de brèves séquences d'I/R au niveau de l'artère coronaire antérieure gauche pouvait protéger le myocarde d'un infarctus généré au niveau de l'artère circonflexe<sup>69</sup>. Le concept a ensuite été étendu par des études montrant que les protocoles de PreC et PostC, appliqués sur d'autres organes, situés à distance du cœur, comme les reins ou l'intestin grêle, engendraient également une cardioprotection<sup>70-75</sup>. Ce phénomène endogène a pu être transposé à la clinique dans une étude « preuve de concept » de Bokter *et al.*, montrant que des I/R transitoires au niveau du bras des patients : 4 cycles de 5 minutes, réalisés à l'aide d'un brassard et pratiqués dès leur prise en charge dans l'ambulance au cours de l'ischémie myocardique, pouvaient reproduire ce phénomène et améliorer la fonction cardiaque<sup>76</sup>.

### ***Mécanismes cellulaires du PreC et du PostC ischémiques***

Le PreC et le PostC ischémiques partagent des voies cellulaires communes conduisant à la cardioprotection. Au cours de cette partie nous détaillerons plus précisément les voies de signalisations cellulaires impliquées par ces deux moyens de cardioprotection. Cependant, les voies de signalisation à l'origine de cette cardioprotection endogène sont complexes et ne sont pas encore complètement élucidées à ce jour. Par convention, il est admis que cette cascade de réactions comprend des inducteurs, des médiateurs et des effecteurs (Figure 6).



**Figure 6 : Résumé des principales voies impliquées par le PreC et le PostC.** Adapté de Hausenloy *et al.*, *Atherosclerosis*, 2009. Le PreC ischémique et le PreC à distance impliquent des voies de signalisation comprenant des récepteurs de nombreux autacoïdes (comme l'adénosine, la bradykinine, les opioïdes) à la surface cellulaire, des kinases de signalisation et des composants mitochondriaux avant l'ischémie cardiaque. Le PostC ischémique et le PostC à distance, empruntent des voies similaires à celles du PreC, au début de la reperfusion cardiaque. Les voies nerveuses et/ou humorales semblent être impliquées dans le PreC et le PostC à distance reliant ainsi le cœur aux autres organes afin d'induire une protection.



### ***Les inducteurs***

Les inducteurs principaux du PreC et du PostC sont constitués d'autacoïdes, comme l'adénosine, la bradykinine et les opioïdes, capables de se fixer à leurs récepteurs membranaires couplés aux protéines Gi et activer ainsi des voies de signalisation. L'implication de ces principaux inducteurs a été mise en évidence dans un premier temps par des approches pharmacologiques<sup>77,78</sup> puis par des approches génétiques. D'autres inducteurs endogènes, dont l'action est indépendante d'un récepteur, comme les ROS ou le NO, peuvent induire un signal protecteur, mais leur mode d'action n'est pas encore complètement élucidé et reste controversé<sup>79-81</sup>. Dans le cas du PostC, d'autres inducteurs peuvent être impliqués, comme les peptides natriurétiques (ANP et BNP) ou encore des facteurs de croissance (IGF-1, FGF-2), des cytokines de type IL-6 ou le TNF- $\alpha$ .

### ***Les médiateurs***

Les médiateurs sont principalement des protéines kinases activant en cascade une voie de signalisation spécifique. Nous décrivons dans ce paragraphe les deux voies les plus importantes.

#### *- La voie RISK (Reperfusion Injury salvage Kinase)*

Le concept de la voie RISK est défini principalement par l'action des kinases PI3K/Akt et p42/p44 ou ERK1/2 connues pour être activées par le PreC et a été introduit, pour la première fois, par Yellon *et al.* dans le PostC<sup>82</sup>. Ces auteurs ont démontré que l'activation pharmacologique de ces kinases de survie, au moment de la reperfusion pouvaient diminuer de 40 à 50% la taille de l'infarctus<sup>83</sup>. L'implication de ces kinases dans le PostC a par ailleurs été montrée à l'aide de divers agents pharmacologiques, dans de multiples modèles<sup>84-86</sup>.

Une autre kinase semble être impliquée dans la voie RISK : la glycogène synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), impliquée dans de nombreux processus cellulaires et notamment dans le métabolisme du glycogène. Il a été montré que la phosphorylation de cette kinase entraîne son inhibition et confère une cardioprotection via l'inhibition de l'ouverture du mPTP<sup>87</sup>, en agissant aussi sur le transporteur de l'adénine nucléotide (ANT)<sup>88</sup>. De plus, des souris

exprimant une forme mutée de la GSK-3 $\beta$ , non phosphorylable, ne sont pas protégeables par un PostC, suggérant que l'inhibition de la GSK-3 $\beta$  est nécessaire au fonctionnement du PostC<sup>89</sup>. Cependant, le rôle de la GSK-3 $\beta$  et son importance en tant que médiateur du PostC restent très controversés. En effet, une autre équipe a montré que des souris mutées pour les GSK-3 $\beta$  et  $\alpha$  (non phosphorylables) sont protégeables par un PreC et un PostC, suggérant cette fois que l'inactivation des GSK-3 $\beta$  et  $\alpha$  n'est pas nécessaire à la cardioprotection par le PostC<sup>90</sup>.

De nombreuses études se sont focalisées sur les kinases ERK<sub>1/2</sub> de la voie RISK. Les MAPK sont divisées en sous-familles : ERK, JNK et p38, qui semblent chacune jouer un rôle dans la cardioprotection induite par le PreC<sup>91,92</sup>. L'activation de ERK est controversée dans le PreC et il semble qu'elle soit espèce dépendante. En effet, le PreC augmente l'activité de ERK<sub>1</sub> chez le lapin<sup>93</sup> mais pas chez le porc<sup>94</sup>. L'activation de JNK et p38 réduit la taille de l'infarctus chez le lapin et le porc<sup>95,96</sup>. De la même façon, la cardioprotection chez le rat est abolie par l'inhibition de JNK46<sup>97</sup>. Cependant, JNK et p38, qui ont un rôle important dans la cardioprotection induite par le PreC, semblent avoir un effet délétère quand elles sont activées à la reperfusion (PostC)<sup>98</sup>.

La voie RISK apparaît donc comme une voie fondamentale dans la protection myocardique, mais des études récentes suggèrent que cette voie n'est pas la seule à être sollicitée. En effet, il a été montré, dans un modèle d'I/R chez le porc, que le PostC ischémique activait la voie RISK mais ne diminuait pas la taille de l'infarctus<sup>99</sup>. Un autre groupe a montré que le PostC chez le porc réduisait la taille de l'infarctus mais cette protection n'était pas médiée par une activation de Akt, ERK, p70S ou GSK-3 $\beta$ <sup>100,101</sup>. Ces données suggèrent donc, que selon les espèces, d'autres voies sont impliquées dans la protection induite par le PreC et le PostC.

#### *- La voie SAFE (Survivor Activating Factor Enhancement)*

L'activation de la voie JAK (Janus Kinase)/STAT a été proposée comme étant une voie alternative de cardioprotection, indépendante de la voie RISK<sup>102</sup>. Cette voie est médiée par la fixation de cytokines sur leurs récepteurs membranaires activant une cascade de

signalisation convergeant vers le noyau, entraînant la transcription de protéines impliquées dans divers processus cellulaires et notamment la cardioprotection. L'inhibition pharmacologique, ou la neutralisation génétique d'une composante de la voie SAFE, conduit à l'abolition des effets cardioprotecteurs du PostC<sup>103,104</sup>. Cependant, il a été montré que des souris knock-out pour STAT3, un acteur clé de la voie SAFE, étaient postconditionnables<sup>103</sup>, suggérant alors que cette voie n'est pas la seule impliquée dans la cardioprotection induite dans le PostC. Cependant, Lecour *et al.* ont démontré que la protection induite par le TNF- $\alpha$ , dépendante de STAT-3, était indépendante de l'activation de la voie RISK<sup>105</sup> suggérant alors que les mécanismes activés par le PostC sont multiples. En effet, d'autres kinases ont été décrites comme participant à ces cascades d'activation intracellulaire telles que la sphingosine kinase<sup>106,107</sup>, les protéines kinases C<sup>56, 108</sup> et plus particulièrement l'isoforme PKC- $\epsilon$ <sup>109</sup> ainsi que la protéine kinase G<sup>110,111</sup> dont le rôle reste encore à élucider.

### ***Les effecteurs***

La dernière étape de la transduction du signal n'est pas encore clairement identifiée mais les deux candidats principaux sont les canaux K<sub>ATP</sub> mitochondriaux et le mPTP.

#### *- Les canaux potassiques ATP dépendants (K<sub>ATP</sub>)*

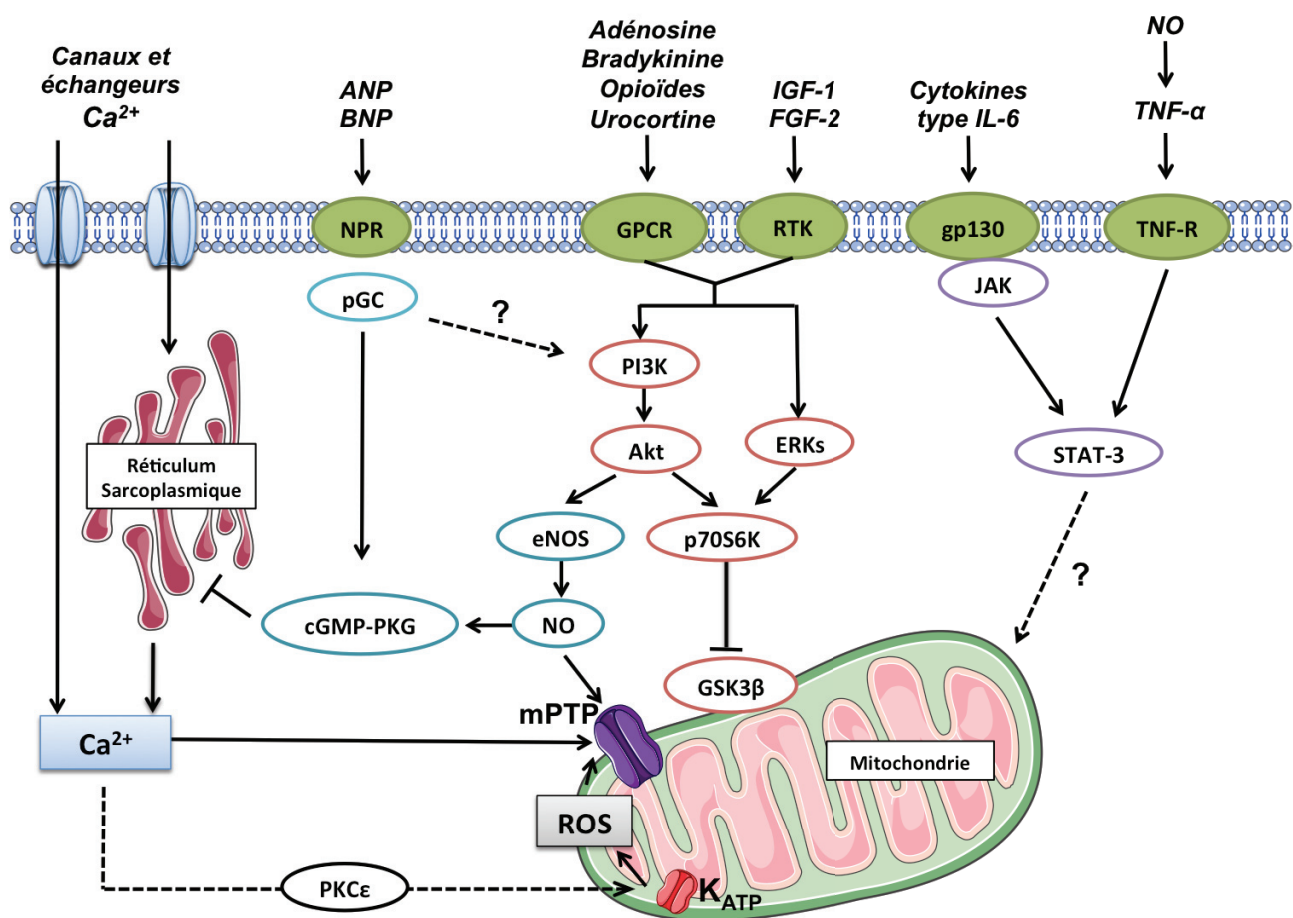
Les canaux K<sub>ATP</sub> sont des canaux sarcolemmaux et mitochondriaux au sein du cardiomyocyte. Ils ont été décrits comme étant des canaux inhibés par des concentrations physiologiques d'ATP. Leur ouverture provoque l'entrée de K<sup>+</sup>. Gross *et al.* ont été les premiers à proposer que l'ouverture des canaux K<sub>ATP</sub> mitochondriaux était impliquée dans le PreC<sup>112</sup>. En effet, il a été montré que des activateurs de l'ouverture des canaux potassiques, comme le pinacidil, le RP52891 ou le nicorandil, aboutissent à une cardioprotection tandis qu'un bloqueur, comme le glibenclamide, l'abolit<sup>113</sup>. Cependant, l'existence des canaux K<sub>ATP</sub> mitochondriaux n'a jamais été mise en évidence.

### - Le pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP)

La mitochondrie est le pivot central des processus déclenchés par l'ischémie reperfusion, déterminant ainsi la préservation ou la mort cellulaire. Le mPTP semble être au cœur de la problématique du PreC et du PostC ischémique et l'état de ce pore semble être un facteur fondamental orientant le destin cellulaire.

Hausenloy *et al.* ont été les premiers à proposer que le PreC ischémique puisse agir en inhibant l'ouverture du mPTP. Ils ont montré que les protections apportées par le PreC ischémique, par le diazoxide et par un agoniste de l'adénosine étaient toutes abolies par l'ajout d'atractyloside, un activateur de l'ouverture du mPTP<sup>114</sup>. Dans notre laboratoire, Argaud *et al.* ont été les premiers à démontrer que le PreC ischémique, de même que la ciclosporine A (CsA), inhibent l'ouverture du mPTP induite par la surcharge calcique et réduisent la taille de l'infarctus<sup>115</sup>. L'importance du mPTP dans le PreC est également confortée par le modèle génétique de souris Cyclophiline D (CypD) knock-out qui présentent une protection endogène face aux lésions d'I/R<sup>116</sup>. Bien qu'à ce jour l'identité moléculaire du mPTP ne soit toujours pas élucidée, tout laisse à penser qu'il joue un rôle majeur dans les lésions d'I/R.

Tout comme le PreC, il a été montré que le PostC par l'activation des voies de signalisation décrites précédemment, limite l'ouverture du mPTP induite par l'I/R<sup>117</sup>. L'inhibition de l'ouverture du mPTP par la CsA semble d'ailleurs mimer les effets du PostC. Cependant, les processus exacts survenant dans le cytosol au cours du PostC et permettant l'inhibition de l'ouverture du mPTP restent à élucider. La relation entre le mPTP et les ROS semble par ailleurs être impliquée dans ce processus. En effet, il a été montré qu'une légère augmentation de la production de ROS pourrait inhiber l'ouverture du mPTP via l'activation des canaux  $K_{ATP}$  et de la PKC<sup>118</sup>.



**Figure 7 : Schéma récapitulatif des voies de signalisation majeures activées par le PostC ischémique.** Adapté de M. Ovize *et al.*, Cardiovasc Res, 2010.

GPCR : Récepteur couplé aux protéines G, NPR : Récepteur des peptides natriurétiques, pGC : Guanylate cyclase particulaire, RTK : Récepteur tyrosine kinase, TNF-R : Récepteur du TNF- $\alpha$ .

## 2) Pré et Postconditionnement pharmacologiques

### *Pré et Postconditionnement par la ciclosporine A*

La CsA est un peptide cyclique lipophile composé de 11 acides aminés et d'un poids moléculaire de 1202 kDa possédant une forte affinité pour les cyclophilines. Crompton *et al.* ont été les premiers à montrer que la CsA inhibe l'ouverture du mPTP<sup>119</sup>. Cet effet est en relation avec l'inhibition de l'activité d'une protéine mitochondriale matricielle : la cyclophiline D (Cyp D). La CsA empêche la Cyp D de participer à la formation du mPTP<sup>120</sup>. Des travaux réalisés avec des souris Cyp D KO ont montré que la Cyp D est la cible de la CsA et qu'elle est un important régulateur de l'ouverture du mPTP<sup>116,121</sup>. *In vitro*, la CsA augmente la résistance des mitochondries à la surcharge calcique retardant l'ouverture du mPTP<sup>115</sup>. La première étude démontrant l'effet cardioprotecteur de la CsA face à l'I/R a été réalisée dans le laboratoire de Crompton en 1991<sup>122</sup>. Ils ont montré, dans un modèle de CM adultes de rats, que la CsA utilisée à des concentrations entre 200 nM et 400 nM protège des lésions d'hypoxie-réoxygénation. En 1992, Arteaga *et al.* ont montré que, chez le rat, la CsA injectée *in vivo* (20mg.kg<sup>-1</sup>) réduit les arythmies à la reperfusion ainsi que la nécrose myocardique<sup>123</sup>. Griffiths et Halestrap ont montré en 1993 qu'un PreC à la CsA de cœurs isolés de rat préserve la fonction cardiaque et le stock d'ATP après une I/R<sup>124</sup>. Depuis, de nombreuses études se sont intéressées au PreC et au PostC à la CsA et une étude pilote menée par notre laboratoire a montré que le PostC à la CsA était efficace en clinique humaine<sup>125</sup>.

Par ailleurs, plusieurs travaux ont proposé l'existence d'une régulation du mPTP par le complexe I de la chaîne respiratoire<sup>126,127</sup>. Le complexe I est composé de 42 sous-unités et sa régulation reste encore mal connue. Ces équipes ont montré que l'activation de la chaîne respiratoire par des substrats du complexe I augmentait la probabilité d'ouverture du mPTP et que celle-ci était inchangée en présence des substrats des complexes II, III ou IV<sup>126</sup>. Dans notre laboratoire nous avons démontré une interaction entre le complexe I, la CypD et le mPTP. En effet l'ajout de CsA et de Rotenone (un inhibiteur du complexe I) inhibe plus fortement l'ouverture du mPTP qu'en présence de CsA seule sur des mitochondries cardiaques de rat et de souris<sup>128</sup>. Dans notre étude (publication n°2 de la thèse), nous avons montré pour la première fois que l'inhibition du complexe I protège les cardiomyocytes

après hypoxie-réoxygénation de façon synergique à l'inhibition de la CypD, suggérant ainsi un rôle important du complexe I dans la régulation du mPTP<sup>129</sup>.

### ***Pré et Postconditionnement aux halogénés***

Les anesthésiques volatiles comme l'halothane, l'isoflurane, le sévoflurane et le desflurane sont des agents communément utilisés pour maintenir une anesthésie générale en clinique humaine. Ils sont aussi connus pour avoir des effets cardioprotecteurs. En effet, Cope *et al.* ont montré qu'une anesthésie entièrement conduite sous halogénés diminue la taille de l'infarctus par rapport à une anesthésie au pentobarbital, kétamine-xyzazine ou propofol<sup>130</sup>. De plus, Cason *et al.* ont montré qu'un PreC de 15 min à l'isoflurane avant une ischémie coronaire diminuait la taille de l'infarctus<sup>131</sup>. De nombreuses autres études ont montré un effet pré-conditionnant des agents anesthésiques halogénés<sup>132,133</sup>.

Les agents anesthésiques halogénés sont également capables de protéger le myocarde lorsqu'ils sont administrés à la reperfusion. En effet, l'équipe de Wolfgang *et al.* a montré que l'administration de sevoflurane ou de desflurane pendant les 15 premières minutes de reperfusion réduit la taille de la nécrose dans un modèle d'I/R *in vivo* chez le lapin<sup>134</sup>. De la même manière il a été montré que l'isoflurane administré à la reperfusion est efficace chez le lapin<sup>135</sup>.

La cardioprotection induite par les halogénés met en jeu des protéines membranaires de transduction du signal, situées notamment dans les cavéoles. En effet, il a été montré que des souris knock-out pour la cavéoline 3 ne sont pas préconditionnables par l'isoflurane<sup>136</sup>. Par ailleurs, l'utilisation d'un antagoniste de l'adénosine bloque le PreC induit par l'halothane ou l'isoflurane<sup>130,137</sup>, indiquant que les récepteurs A1 et A3 de l'adénosine sont également impliqués dans la cardioprotection par les halogénés. D'autres études ont encore montré que les protéines kinases C (PKC), protéines tyrosines kinases et MAPK ont un rôle dans le préconditionnement aux halogénés<sup>138-140</sup>. Les halogénés possèdent également des cibles mitochondriales et sont capables, notamment, d'inhiber le complexe I<sup>141</sup>. Cette inhibition suggère un rôle important des ROS dans l'action du PreC par les halogénés. En effet, l'administration par inhalation de piègeurs de ROS, 15 min avant de réaliser l'ischémie, abolit la protection induite par l'isoflurane chez le lapin<sup>142</sup>. Comme il a été décrit

précédemment, l'augmentation de la production de ROS et du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial est capable d'induire l'ouverture du mPTP à la reperfusion. Le PreC par les halogénés retarde l'ouverture du mPTP<sup>143</sup>, en mettant en jeu une dépolarisation mitochondriale<sup>144</sup>. De plus, les halogénés ont une action sur de nombreux canaux calciques, comme notamment l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et les pompes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, pouvant ainsi jouer un rôle dans l'altération de l'homéostasie calcique au cours de l'I/R<sup>145-147</sup>.

Comme le PreC, le PostC par les halogénés met en jeu de multiples mécanismes. En effet, plusieurs études suggèrent l'implication de mécanismes variés mis en jeu dans le PostC par les halogénés, soulignant notamment l'importance du NO<sup>148,149</sup> et de la voie PI3K/Akt<sup>135,150</sup>.

### 3) Hypothermie

La température centrale est un facteur déterminant de la taille de l'infarctus. Il a été montré dans de nombreux modèles animaux (tels que le chien, le porc ou le rat<sup>151-156</sup>) qu'une hypothermie légère (entre 32 et 35°C), modérée (entre 28°C et 32°C), sévère (entre 20 et 28°C) ou encore profonde (inférieure à 20°C) pouvait réduire la taille de l'infarctus<sup>157-161</sup>. Chez le lapin, à chaque diminution de température corporelle de 1°C, la taille d'infarctus est réduite en moyenne de 8%<sup>5</sup>. Néanmoins, l'efficacité de l'hypothermie diminue de façon drastique lorsque l'hypothermie n'est mise en place que tardivement au cours de l'ischémie<sup>158</sup>, soulevant des questions quant à une application en clinique humaine chez des patients présentant une ischémie en cours. Cependant il a été montré qu'une hypothermie mise en place à la reperfusion prévenait des dommages microvasculaires et notamment diminuait la survenue des phénomènes de no-reflow<sup>154,162</sup>.

Une hypothermie sévère (20-28°C) a principalement pour conséquences l'inhibition des échangeurs membranaires  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ <sup>163</sup>, la modération de la surcharge calcique mitochondriale pendant l'ischémie<sup>164,165</sup>, une diminution de la formation de ROS à la reperfusion<sup>166</sup> ou encore un ralentissement de la déplétion des stocks d'ATP<sup>167</sup>. Ces résultats sont en faveur d'un effet principalement mécanique du froid sur les phénomènes biologiques.

Cependant, plusieurs études portant sur l'hypothermie légère indiquent que d'autres mécanismes sont également en jeu<sup>157,161</sup>, comme l'activation de la voie PI3K/Akt, la



préservation de l'activité de ERK<sup>168</sup> ou encore la phosphorylation de HSP27<sup>169</sup>. Une étude *in vivo* confirme d'ailleurs ces résultats puisqu'elle montre que l'utilisation de L-NAME (L-N<sup>G</sup>-Nitroarginine methyl ester), inhibant la production de NO, ou de la wortmannine, inhibant la PI3K, abolissent la protection induite par l'hypothermie légère<sup>170</sup>. Une étude chez le lapin a montré que l'hypothermie légère pouvait retarder l'ouverture du mPTP induite par le Ca<sup>2+</sup><sup>171</sup>. Ces différents mécanismes d'action font encore l'objet de nombreuses investigations.

#### 4) Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste en l'injection, qu'elle soit systémique ou intra-cardiaque de cellules souches, après un infarctus du myocarde, afin de favoriser la réparation tissulaire.

Depuis une dizaine d'année, des études ont montré dans divers modèles animaux que la thérapie cellulaire pouvait être utilisée après une I/R afin de limiter les dommages cellulaires et prévenir l'insuffisance cardiaque en améliorant la fonction myocardique.

Cependant, les bénéfices concernant la thérapie cellulaire restent mitigés et dépendent principalement de deux facteurs :

- La capacité des cellules progénitrices utilisées à se différencier en cellules cardiaques ou en cellules endothéliales et à se greffer au myocarde endommagé
- La sécrétion, par ces cellules, de facteurs de survie pouvant stimuler la réparation du tissu et ainsi réduire la taille de l'infarctus.

Au cours des dernières années, aucun consensus n'a émergé sur le type cellulaire idéal à utiliser. Ainsi, différents types cellulaires progéniteurs ont été utilisés et la plupart d'entre eux ont été choisis pour divers critères, notamment celui d'avoir un potentiel cardiogénique naturel *in vitro* ou d'être capable de se différencier en cellules cardiaques dans des conditions spécifiques. Les cellules souches qui ont été le plus utilisées pour la thérapie cellulaires sont les suivantes :

- **Les cellules souches embryonnaires (ESCs)**, qui ont la capacité de se différencier avec l'aide de facteurs de croissances spécifiques en cellules souches à caractère phénotypique cardiaque. Ces cellules ont montré des capacités de greffe, de survie et

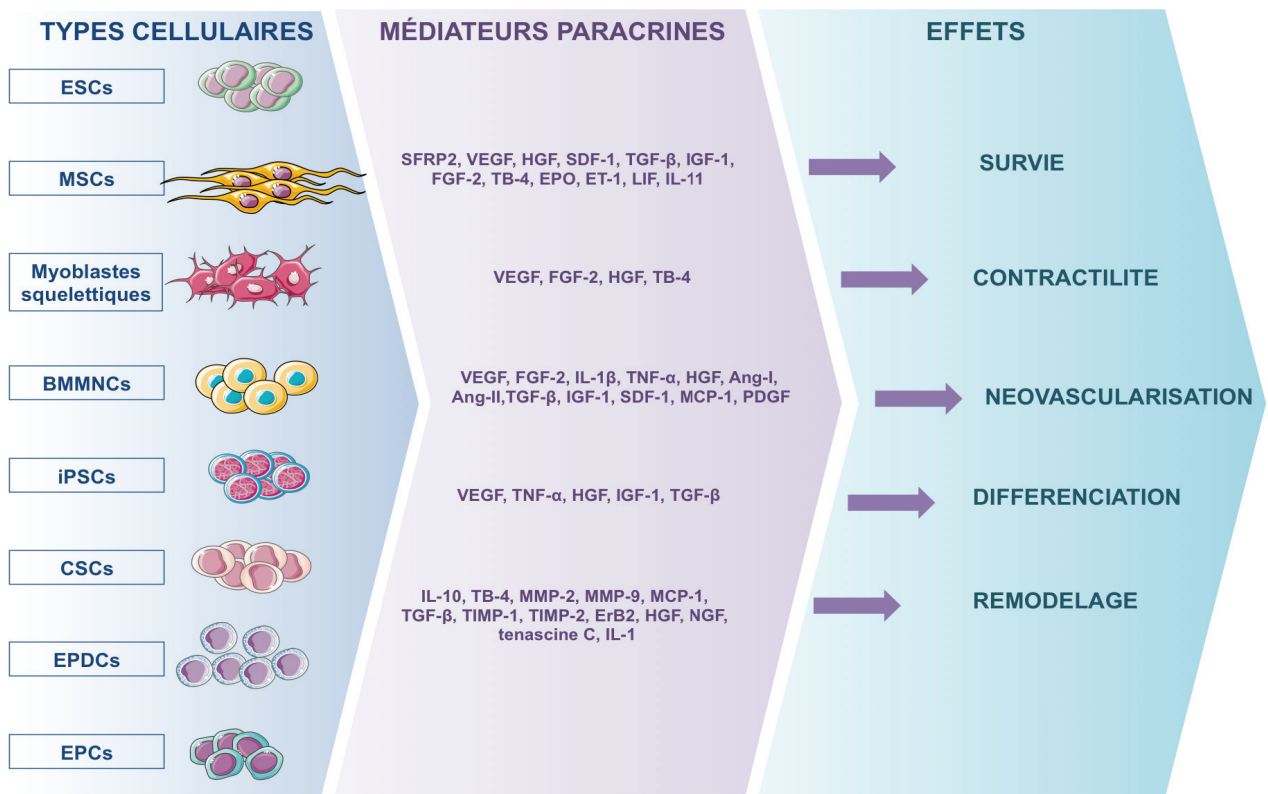
d'amélioration de la fonction cardiaque dans diverses études<sup>172-174</sup>. Cependant, leur potentiel de différenciation illimité représente un risque car ces cellules, dans leur état non différencié, peuvent former des tératomes et, de par leur origine allogénique, présentent un risque immunitaire de rejet<sup>175</sup>.

- **Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs)** sont généralement des cellules se différenciant en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes et ont la capacité, dans des conditions spécifiques, de se différencier en cardiomyocytes (CM). Leur implantation de façon autologue est un avantage mais leur capacité à se différencier en tissu non cardiaque limite leur utilisation<sup>176,177</sup>. Une étude clinique a néanmoins montré une amélioration de la fonction ventriculaire à 3 et 6 mois après injection post-infarctus<sup>178</sup>.
- **Les myoblastes squelettiques**, mis en culture à partir de biopsies musculaires, peuvent être amplifiés et implantés de façon autologue. Cependant, aucune différenciation en CM n'a été observée *in vivo*<sup>179</sup> et leur contraction dans le myocarde reste désynchronisée et source d'arythmie. Les études cliniques n'ont pas mis en évidence de réel effet bénéfique avec ce type cellulaire<sup>180</sup>.
- **Cellules souches mononuclées dérivées de la moelle osseuse (BMMNCs)**, comprenant les progéniteurs endothéliaux et hématopoïétiques, peuvent se différencier en CM, cellules endothéliales et cellules musculaires lisses. Après transplantation, ces cellules sont capables de sécréter une grande variété de facteurs de croissance à activité pro-angiogénique et anti-apoptotique. Les études cliniques réalisées avec ce type cellulaire ont démontré que l'injection de ces cellules induisait une diminution de la taille d'infarctus ainsi qu'une amélioration de la fonction ventriculaire gauche accompagnées d'une meilleure revascularisation après 12 mois post-infarctus<sup>181,182</sup>. Cependant le devenir et la différenciation de ces cellules en cellules cardiaques après transplantation restent encore très controversés<sup>183</sup>.
- **Les cellules souches pluripotentes inductibles ou iPSCs** sont de plus en plus utilisées ces dernières années et peuvent être générées à partir de cellules somatiques

(comme les fibroblastes) en sur-exprimant des facteurs de transcriptions clés impliqués dans la pluripotence des ESCs (Oct3/4, Sox2, Klf4, Nanog ou c-Myc)<sup>184-186</sup>, de façon contrôlée en évitant ainsi le risque de tumorigénèse. Après leur obtention, les iPSCs peuvent se différencier en cellules cardiaques. Une étude « preuve de concept » a montré qu'elles restaurent la structure et la fonction cardiaque après infarctus du myocarde chez la souris<sup>187</sup>.

- **Les cellules souches cardiaques (CSCs).** La découverte, en 2003, de cellules progénitrices endogènes au sein du myocarde chez l'homme a sollicité un nouvel intérêt pour la thérapie cellulaire de part leur potentiel cardiogénique<sup>188</sup>. Ces cellules expriment des marqueurs spécifiques comme c-Kit et Sca-1<sup>189,190</sup> et ont la capacité phénotypique de former des sphères dans des cultures en suspension. L'injection de ces cardiosphères humaines post-infarctus chez la souris augmente de façon paracrine l'angiogénèse et améliore la fonction cardiaque<sup>191</sup>. Depuis les 10 dernières années, de nombreuses études chez la souris, le rat ou le porc, ont montré un effet bénéfique de l'implantation post-infarctus de cellules dérivées des cardiosphères<sup>191-197</sup>.
- **Les cellules dérivées des progéniteurs de l'épicarde (EPDCs)** représentent une population de cellules souches mésenchymateuses provenant, au cours du développement, d'une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales de l'épicarde. Ces cellules peuvent ainsi s'implanter dans le tissu cardiaque et se différencier en cardiofibroblastes interstitiels et périvasculaires et en cellules musculaires lisses. Il a été montré que l'injection de ces cellules après infarctus améliore la fonction cardiaque mais ne se différencient pas en cellules cardiaques<sup>198</sup>.
- **Les cellules progénitrices endothéliales (EPCs)** sont dérivées de la moelle osseuse, et après une ischémie, peuvent migrer au niveau de la lésion et stimuler la réparation des vaisseaux lésés. Leur capacité régénératrice présente donc un grand potentiel thérapeutique. Il a été montré que ces cellules agissent principalement via une action paracrine en recrutant des cellules endothéliales et des progéniteurs cardiaques

résidents<sup>199</sup>. Ceci a été confirmé par Di Santo *et al.* dans une étude *in vivo*, où les auteurs ont montré que l'injection de milieu conditionné de ces cellules, contenant des facteurs tels que VEGF et SDF-1, augmente la formation de capillaires, dans un modèle d'ischémie chronique de la patte, chez le rat<sup>200</sup>.



**Figure 8 : Facteurs paracrines bénéfiques sécrétés par les différents types cellulaires progéniteurs utilisés pour la thérapie cellulaire post-infarctus.** Différents effets paracrines et médiateurs impliqués par la thérapie cellulaire. Adapté de M. Mirotsoy *et al.*, JMCC 2011. SFRP2 : Secreted frizzled-related protein 2, VEGF : vascular endothelial growth factor, HGF : hepatocyte growth factor, SDF-1 : stromal derived factor-1, TGF- $\beta$  : transforming growth factor-beta, IGF-1 : insulin growth factor-1, FGF-2 : Fibroblast growth factor-2, TB-4 : Thymosin beta-4, EPO : Erythropoïétine, ET-1 : Endothéline-1, LIF : Leukemia inhibitory factor, IL-1, -11 : Interleukine-1 et -11, TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor- $\alpha$ , Ang I et II : Angiotensine I et II, MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1, PDGF : Platelet-derived growth factor, MMP-2 et -9: Metalloproteinase-2 et -9, TIMP-1 et -2 : Tissue inhibitor of metalloproteinase -1 et -2, Erb2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, NGF : nerve growth factor.

Cependant, toutes les études réalisées ces dernières années ont montré qu'un très faible nombre de cellules souches transplantées subsistaient à long terme au sein du myocarde après injection post-infarctus. Ceci explique que les effets bénéfiques obtenus lors des études cliniques restent très modérés. Ces effets proviendraient en réalité en grande partie des facteurs paracrines sécrétés par les cellules souches injectées. Ceci a été en partie confirmé dans des modèles expérimentaux où l'injection de milieux conditionnés de cellules souches induit des effets similaires à ceux d'une injection des cellules elles-mêmes<sup>201-204</sup>. Identifier les facteurs responsables de ces effets bénéfiques et mieux comprendre leurs modes d'action représente donc un enjeu majeur. A ce jour, à l'aide de la protéomique, de nombreux facteurs impliqués ont été mis en évidence<sup>191,205-207</sup>. Plus récemment, grâce au développement des techniques de détection, un autre type de communication paracrine a été découvert, impliquant des microvésicules et des exosomes dont le contenu est enrichi en pré-miARNs<sup>208</sup>.

## II. Les cardiofibroblastes

Le myocarde est constitué de différents types cellulaires, dont les principaux sont les cardiomyocytes, les cardiofibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Bien que les cardiomyocytes représentent à eux seuls 2/3 du volume tissulaire du myocarde, les cardiofibroblastes (CF) constituent la plus importante population cellulaire au sein du tissu cardiaque (environ 2/3 de la population cellulaire totale)<sup>209</sup>. Néanmoins, ce ratio varie selon les espèces<sup>210</sup>.

Les fibroblastes sont des cellules d'origine mésenchymateuse et sont présents dans tous les tissus<sup>211</sup>. Bien qu'historiquement les fibroblastes étaient considérés, au sein des différents tissus, comme une population cellulaire homogène, divers travaux ont depuis montré qu'ils possèdent selon leur origine, des fonctions et des propriétés différentes<sup>212</sup>.

### A. Caractéristiques des cardiofibroblastes

#### 1) Définition du cardiofibroblaste

Les fibroblastes sont habituellement identifiés sur des critères morphologiques qui peuvent cependant varier selon leur activité métabolique et leur localisation dans l'organisme. Généralement, les caractéristiques morphologiques d'un fibroblaste sont basées sur une absence de membrane basale, une forme fusiforme ou étoilée avec de fins prolongements allant jusqu'aux autres cellules sans fusionner avec celles-ci. Ces cellules contiennent un noyau ovale (avec un ou deux nucléoles), un réticulum endoplasmique rugueux étendu, un appareil de Golgi important, ainsi qu'un cytoplasme abondant en vésicules et mitochondries.

Un nombre important de marqueurs a été identifié pour distinguer les fibroblastes, notamment les CF, des autres types cellulaires de l'organisme. Cependant, leur spécificité est contestée. La vimentine, le marqueur le plus utilisé, est une protéine présente dans les filaments intermédiaires des fibroblastes. Néanmoins, il a été montré que ce marqueur est

également exprimé dans d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales<sup>213</sup> et les cellules myoépithéliales<sup>214</sup>. Un autre marqueur, considéré comme étant plus spécifique du CF : la protéine DDR2 (Discoidin domain receptor 2)<sup>215</sup> est un récepteur pour le collagène, de la famille des tyrosines kinases, impliqué dans divers processus cellulaires comme la prolifération, la migration et la différenciation<sup>216,217</sup>. Des études chez le rat et la souris montrent que DDR2 n'est exprimé ni dans les cardiomyocytes, ni dans les cellules endothéliales cardiaques<sup>218,215</sup>. Malgré cela, l'utilisation de ce marqueur reste contesté car il est exprimé par les cellules dérivées de la moelle osseuse, les fibrocytes<sup>219</sup>, les leucocytes, et les cellules musculaires lisses<sup>220,221</sup>, pouvant être présentes également dans le coeur. Une autre protéine est utilisée pour distinguer les fibroblastes, FSP-1 (Fibroblast-specific protéine-1). Il s'agit d'une protéine se liant au calcium et associée aux filaments. Cependant, il a été montré, là aussi, que les leucocytes et diverses cellules cancéreuses pouvaient l'exprimer. L'utilisation de plusieurs marqueurs est donc nécessaire, à ce jour, pour discriminer les CF des autres cellules cardiaques.

## 2) Les myofibroblastes

Au cours des 20 dernières années, plusieurs travaux ont montré qu'il existait une très grande hétérogénéité de phénotype parmi les CF et que certains d'entre eux pouvaient exprimer des caractéristiques de cellules musculaires lisses, en réponse à divers stimuli environnementaux. Gabbiani *et al.* furent les premiers à leur attribuer le terme myofibroblastes (myoFB) et à montrer que ces cellules pouvaient prendre part à la croissance, au développement et la réparation de nombreux tissus<sup>222,223</sup>.

Ainsi, dans des conditions appropriées, des fibroblastes quiescents peuvent acquérir un phénotype contractile actif et exprimer ainsi des marqueurs de cellules musculaires lisses comme l' $\alpha$ -actine de muscle lisse, la vinculine, la paxilline et la tensine<sup>224,225</sup>. Les myoFB sont plus mobiles que des CF dit « normaux » et, via des microfilaments internes, peuvent se connecter à des domaines de la fibronectine de la matrice extracellulaire, formant ainsi des adhésions complexes appelées fibronexus. Les myoFB peuvent exercer une force contractile dans la matrice extra cellulaire les entourant<sup>226</sup>. Ainsi, il a été montré que les myoFB jouent

un rôle clé dans la réparation et la cicatrisation des tissus après un infarctus du myocarde<sup>227</sup>. Après une lésion du myocarde, les CF peuvent donc se différencier en myoFB et produire en grande quantité des protéines de la matrice extracellulaire afin d'amorcer la cicatrisation fibrotique. La différenciation en myoFB est principalement activée par le facteur TGF- $\beta$ , des cytokines, des protéines de la matrice et des facteurs de croissances<sup>228-231</sup>. Cependant, une lésion peut induire leur apparition à partir principalement de CF de l'adventice et de CF interstitiels mais également à partir de cellules progénitrices résidentes ou de cellules progénitrices hématopoïétiques circulantes. Quelque soit leur origine, les myoFB sont nécessaires à la cicatrisation et à la réparation tissulaire. Néanmoins, quand ils ne sont pas régulés de façon appropriée, ils peuvent conduire à un remodelage tissulaire excessif et délétère<sup>232,233</sup>. A l'exception des feuillets des valves cardiaques, les myoFB ne sont pas considérés comme présents dans un cœur sain, mais ceci reste très controversé dans la littérature. En effet, il est important de noter que la population CF est très hétérogène, constituée également de cellules mobiles qui contiennent de l' $\alpha$ -actine et de la myosine. Ainsi, leur identification comme cellules dépourvues de protéines contractiles peut poser des problèmes de faux négatifs<sup>209</sup>.

### 3) Origine des cardiofibroblastes

Les CF sont considérés comme dérivant des cellules mésenchymateuses. Cependant, la compréhension de l'origine des CF en conditions physiologiques reste compliquée du fait du manque de marqueurs spécifiques permettant de tracer leur provenance. Ainsi, les études ont montré un panel varié de cellules pouvant se différencier en CF.

Au cours du développement du myocarde, les CF peuvent émerger de différentes sources de populations cellulaires :

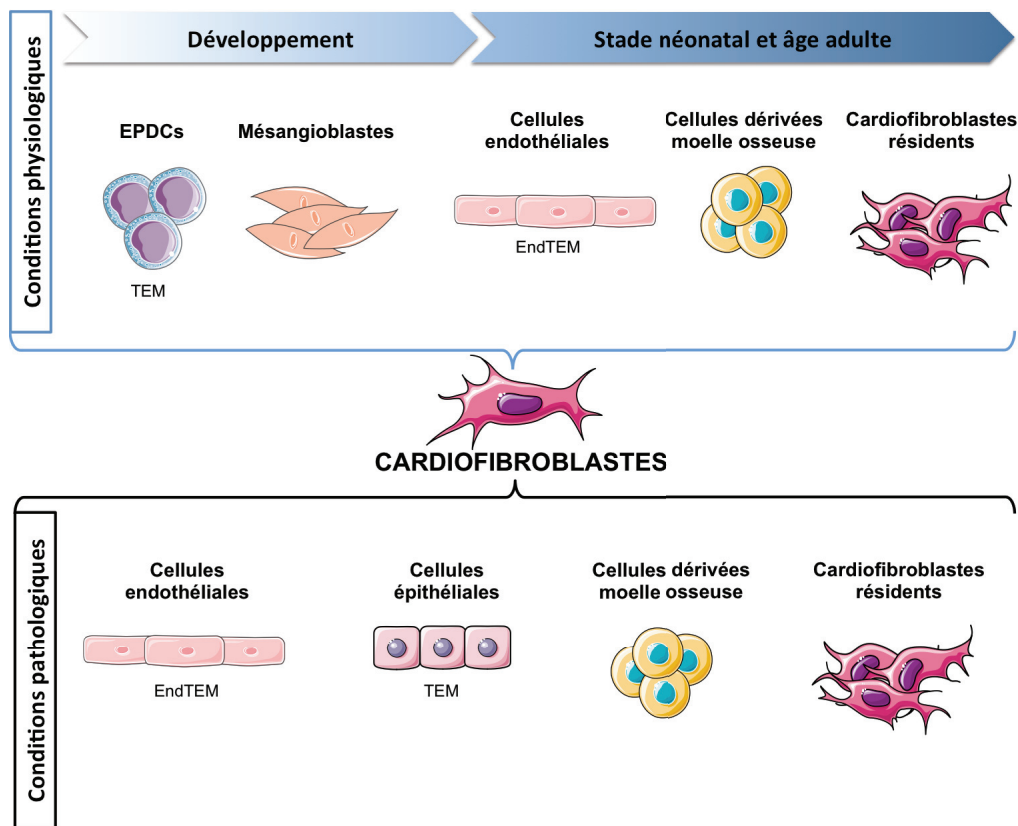
- La différenciation des **cellules dérivées des progéniteurs de l'épicarde (EPDCs)** est considérée comme la principale source de CF<sup>234</sup>. Après transition épithélio-mésenchymateuse, ces cellules vont se différencier en CF. Cette transition peut être induite par la périostine et le TGF- $\beta$ <sup>235-237</sup>.



- La différenciation de **mésangioblastes**, cellules progénitrices multipotentes, à l'origine de tissus mésodermiques ou vasculaires (cellules endothéliales et péricytes)<sup>238</sup>.

Au cours des stades néonataux et adultes, les fibroblastes proviennent principalement de populations cellulaires myocardiques endogènes:

- La transition épithélio-mésenchymateuse de **cellules endothéliales** en CF est nécessaire au bon développement et à l'expansion du myocarde ainsi qu'à la formation, notamment, des valves cardiaques<sup>239</sup>.
- la population interstitielle de CF au niveau des valves cardiaques peut être renouvelée par la différenciation de **cellules dérivées de la moelle osseuse**<sup>240</sup>.
- A l'âge adulte, le renouvellement des CF reste faible mais provient principalement de la population de CF déjà établie ainsi que de la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules endogènes.



**Figure 9 : Schéma récapitulatif de l'origine des CF** en conditions physiologiques, au cours du développement et à l'âge adulte et en conditions pathologiques. TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse, EPDCs : cellules dérivées des progéniteurs de l'épicarde.

De nombreuses études ont montré que, dans des conditions pathologiques telles qu'un infarctus du myocarde, les lésions cardiaques engendrées peuvent déclencher une amplification de la population de CF et conduire à la fibrose. L'origine de la prolifération des CF en situation pathologique reste encore à élucider mais il a été montré qu'elle pourrait être la conséquence de différents processus :

- une multiplication des CF endogènes
- une transformation des cellules épithéliales et endothéliales en CF
- un recrutement de cellules hématopoïétiques dérivées de la moelle osseuse au niveau de la lésion et se différenciant en CF et myoFB.

#### 4) Organisation des cardiofibroblastes dans le myocarde

Des études réalisées dans les années 1970 avaient montré que le cœur de rat adulte est constitué de 30% de cardiomyocytes et de 70% de cellules non-myocytaires<sup>241,242</sup>. Récemment, il a été montré que ces chiffres peuvent être très variables selon les espèces. Une autre étude a montré que, dans le cœur de souris adulte, les myocytes représentent 55% de la population cellulaire contre seulement 45% pour les cellules non-myocytaires<sup>243</sup>. Chez l'homme, ces chiffres restent indéterminés. Ces différences de populations cellulaires peuvent également conduire à des différences au niveau de la composition de la matrice extracellulaire.

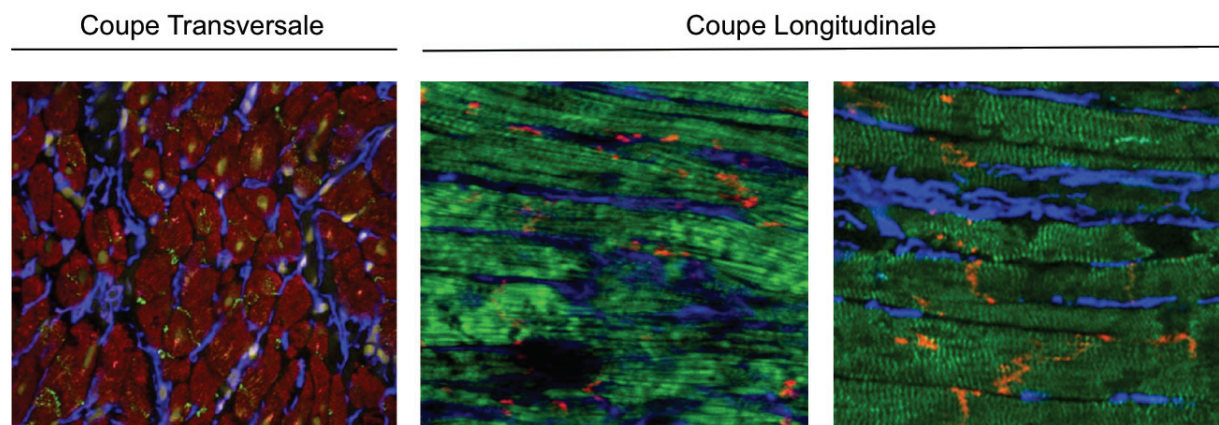
Le cœur consiste en l'assemblage complexe de composants cellulaires et acellulaires, et se compose de 3 couches principales de tissus :

- la couche externe : ***l'épicarde***
- la couche médiane : ***le myocarde***
- la couche interne: ***l'endocarde***

Selon leurs caractéristiques, ces différentes structures sont composées d'un réseau de collagène endomysial entouré de cardiomyocytes dont l'épaisseur varie entre 2 et 5 couches de cellules. Le réseau en 3 dimensions de collagène se formant pendant le développement embryonnaire et achevant sa formation au stade néonatal représente ainsi un support cellulaire. Les CF situés à l'intérieur de ce réseau sont interconnectés, entourant les

cardiomyocytes de façon lamellaire<sup>244</sup>. Cet arrangement cellulaire facilite la propagation des forces mécaniques et permet ainsi la contraction du réseau de collagène endomysial<sup>210</sup>.

Cette organisation permet aux CF de participer au maintien de l'intégrité structurale du myocarde via de fortes interactions cellulaires et de fortes interactions avec la matrice extracellulaire.



**Figure 10 : Images de microscopie confocale de coupes tissulaires de myocarde** avec immunomarquage fluorescent des CM et des CF. **Coupe transversale** : en rouge, les CM marqués avec un anticorps anti-myomesine ; en bleu, les CF avec un anticorps anti-vimentine ; en vert brillant, la Cx43 (protéine de jonction entre CM et CF, qui sera décrite dans le paragraphe II, 2) et en jaune-vert pâle, les noyaux marqués au DAPI. **Coupe longitudinale** : coupe ventriculaire de souris (à gauche) et de mouton (à droite) : en bleu, les CF marqués avec un anticorps anti-DDR2 (gauche) ou anti-vimentine (droite) ; en vert, les CM marqués avec la phalloïdine (gauche) ou un anticorps anti-myomésine (droite) et en rouge la Cx43. (P. Camelliti *et al.*, Cardiovascular Research, 2005)

## B. Fonctions des cardiofibroblastes

Les CF participent à de nombreux aspects de la fonction cardiaque, notamment le maintien de la structure cardiaque, ainsi qu'aux propriétés biochimiques, mécaniques et électriques du myocarde. Les paragraphes suivants seront consacrés aux différentes fonctions des CF au sein du myocarde et leurs impacts en conditions pathologiques.

### 1) Cardiofibroblastes et matrice extracellulaire

L'une des fonctions principales des CF est de maintenir l'intégrité de la matrice extracellulaire (MEC) cardiaque. La MEC est une structure formant un réseau de protéines et glycoprotéines fournissant ainsi un support structural et fonctionnel au myocarde. La MEC peut contenir de nombreuses cytokines et facteurs de croissance impactant sur la fonction et le devenir des cellules cardiaques. Elle représente donc un support indispensable pour les connexions intercellulaires mais également pour la conduction des forces mécaniques au sein du myocarde.

#### *Les composants de la MEC*

Les principaux composants de la MEC sont<sup>245</sup> :

- **des composants structuraux** : des fibres de collagène de type I et III et, de façon moins abondante, de collagène de type IV, V et VI<sup>246</sup> ainsi que de l'élastine.
- **des protéines adhésives** comme la fibronectine, la laminine et la fibrilline.
- **des protéines antiadhésives** comme la té nascine, la thrombospondine et l'ostéopontine
- **des polysaccharides de structure** comme les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes, pouvant également moduler la signalisation intercellulaire de par leur capacité à se lier à des facteurs de croissance ou cytokines.
- **des facteurs modulant la signalisation intracellulaire** : des cytokines, des facteurs de croissance et des matrikines

- **des enzymes contrôlant l'organisation et la composition de la MEC** : des métalloprotéinases (MMPs) et des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs).

### **Les métalloprotéinases (MMPs)**

#### **- Généralités :**

Les MMPs sont des enzymes dégradant les protéines de la MEC. Elles sont désignées par des numéros et leur classification est établie selon les critères suivants :

- le type de substrat de la MEC qu'elles vont dégrader
- leur structure primaire
- leur localisation subcellulaire

Ainsi, on distingue plusieurs groupes de MMPs comprenant : les collagénases (MMP-1, -2, -8, -13 et -18), les gélatinases (MMP-2 et -9), les stromélysines (MMP-3, -10 et -11), les matrilysines (MMP-7 et -26), les MMPs de type membranaire (MT1 à 8-MMPs) associant 4 MMPs de type transmembranaire (MMP-14, -15, -16 et -24) et les MMPs possédant un domaine d'ancrage glycosylphosphatidylinositol (MMP-17 et 25)<sup>247</sup>.

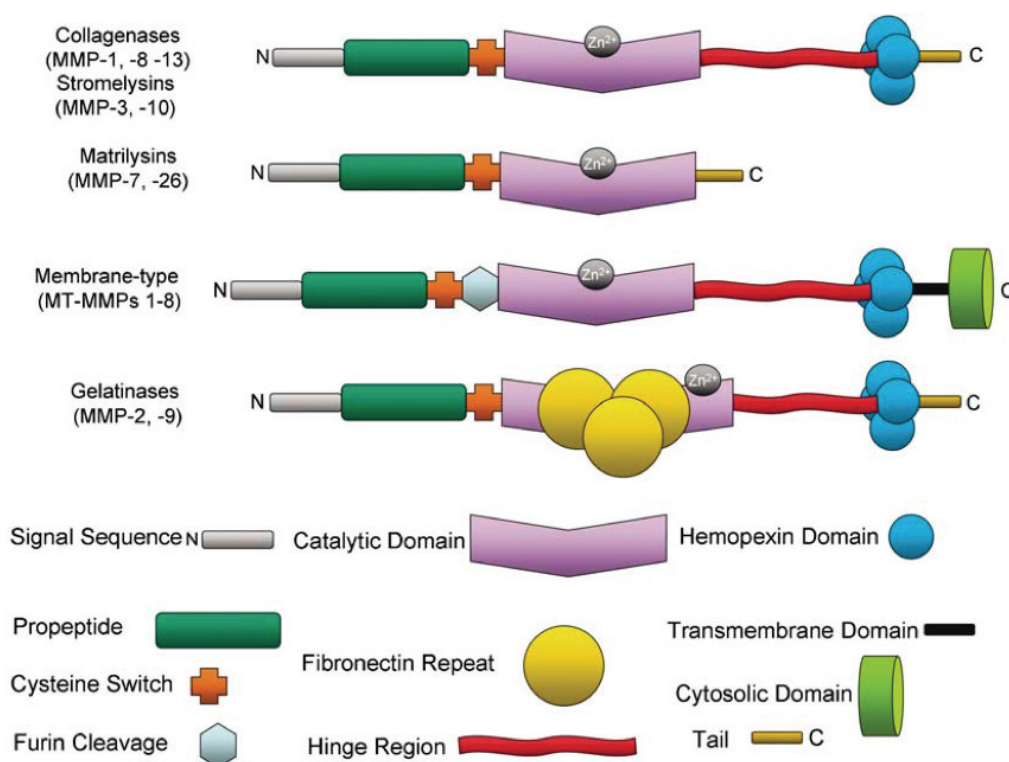
#### **- Structure :**

La structure des MMPs comporte un peptide signal en région N-terminal permettant la sécrétion et le transport de l'enzyme à l'extérieur de la cellule. Attenant au peptide signal, un domaine pro-peptidique hydrophobe protège le domaine catalytique renfermant un ion  $Zn^{2+}$ . L'activation des MMPs requiert la dissociation du pro-peptide au niveau d'un résidu cystéine situé entre le domaine catalytique et le pro-peptide. Ce résidu cystéine, et donc le site d'activation protéolytique, est conservé au sein des MMPs<sup>248</sup> (Figure 11).

#### **- Régulation :**

L'activité des MMPs peut être régulée au niveau de la transcription et de la traduction, par la régulation des gènes et ARNm, ainsi que par des modifications post-traductionnelles. Il a été montré que l'expression de l'ARNm et de la protéine MMP-2 peuvent être augmentés dans des cellules cardiaques en réponse à l'hypoxie ou à un stimulus inflammatoire, par Interleukine-1 $\beta$ <sup>249-251</sup>. Les MMPs peuvent également être activées par les espèces réactives de l'azote comme le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>). En effet, le peroxy-nitrite entraîne, selon la

concentration utilisée, différentes modifications post-traductionnelles telles qu'une S-glutathiolation, une hydroxylation ou encore une nitrosylation<sup>252,253</sup>. Une autre modification post-traductionnelle importante pour la régulation des MMPs est la phosphorylation. Il a été montré que la phosphorylation de MMP-2 par la protéine kinase C, connue pour son rôle dans le préconditionnement du myocarde, pouvait réduire l'activité de MMP-2<sup>254</sup>. Le rôle de MMP-2 phosphorylée dans le cœur reste encore à élucider. Mais de façon intéressante, les MMPs peuvent être régulées par deux types majeurs d'inhibiteurs endogènes : l' $\alpha$ 2-macroglobuline, au niveau plasmatique, et les TIMPs, au niveau tissulaire.



**Figure 11 : Structure des MMPs.** Les MMPs sont composées d'un pro-peptide d'environ 80 acides aminés, d'un domaine catalytique d'environ 170 acides aminés, d'un peptide linker ou région charnière de taille variable et d'un domaine hémopexine (d'environ 200 acides aminés). Le domaine catalytique contient un motif de liaison pour l'ion  $Zn^{2+}$ . Les matrilysines sont les seules MMPs qui ne possèdent ni de peptide linker ni de domaine hémopexine. Les MMPs associées aux membranes (MT-MMPs) possèdent une séquence de reconnaissance pour une proprotéine convertase : la furine, permettant l'activation protéolytique au niveau du domaine C-terminal. Benjamin, M. M. & Khalil, R. A., EXS 2012

## *Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs)*

### **- Généralités :**

Les TIMPs sont une famille d'enzyme comportant 4 isoformes structurellement proches : TIMP-1, -2, -3 et -4 (de 21 à 29 kDa). Les 4 TIMPs sont des inhibiteurs à spectre large des MMPs avec cependant des spécificités différentes. L'inhibition s'effectue selon une stœchiométrie 1:1.

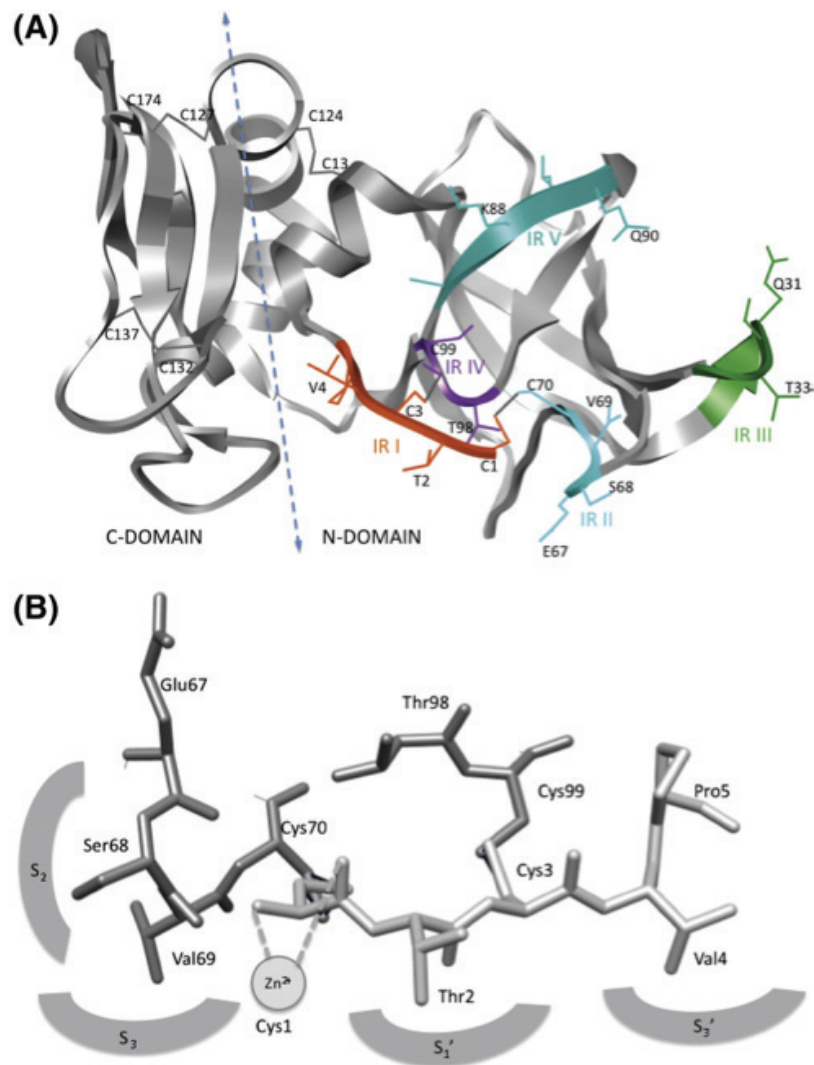
Le spectre d'inhibition de TIMP-1 est plus restreint que les 3 autres TIMPs. Celui-ci présente moins d'affinité pour les MMPs de types membranaires<sup>255</sup>. De la même façon, TIMP-2 et -3 sont de plus faibles inhibiteurs pour MMP-3 et -7 que TIMP-1. TIMP-3 est le seul TIMP capable d'inhiber à la fois un spectre large de MMPs et d'autres familles de protéases comme les ADAMs (A Disintegrine And Metalloproteinase)<sup>256</sup>.

Les TIMPs ont des caractéristiques moléculaires et physico-chimiques différentes, comme par exemple la solubilité, l'interaction avec les pro-enzymes et la régulation de leur expression. TIMP-3 interagit spécifiquement avec des glycosaminoglycanes, ce qui le lie à la MEC, alors que les autres TIMPs sont solubles<sup>257</sup>.

### **- Structure :**

Les TIMPs possèdent un domaine N-terminal d'environ 125 acides aminés contre environ 65 pour le domaine C-terminal contenant chacun 3 ponts disulfures. Le domaine N-terminal comportant les cystéines 1 à 3 impliquées dans la formation des ponts disulfures, représente un domaine hautement conservé et forme une structure indépendante entre les différents TIMPs, capable à elle seule d'inhiber les MMPs. A titre d'exemple, la structure de TIMP-1 est détaillée dans la figure 12.

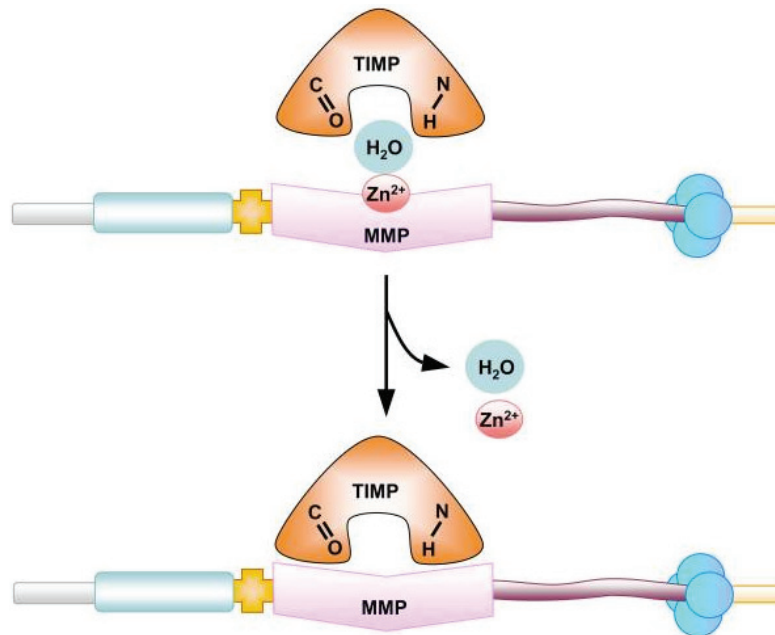




**Figure 12 : (A) Structure tridimensionnelle de TIMP-1** sous forme ruban décrivant la position des ponts disulfures (positions des cystéines : C), les domaines C-ter et N-ter ainsi que les domaines de liaisons et d'interface (IR I à V) avec les différentes familles de métalloprotéinases (MMPs, ADAMs, ADAMTs). **(B) Structure détaillée des sites d'interactions de TIMP-1** avec les parties actives des MMPs (S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>1</sub>', S<sub>3</sub>'). Brew *et al.* Biochimica et Biophysica Acta 2010.



Les TIMPs possèdent une structure globale cunéiforme capable d'interagir avec le site actif des MMPs de la même manière que leurs substrats. La cystéine 1 est un acide aminé clé permettant de chélater l'ion  $Zn^{2+}$  du site actif à l'aide de son groupe N-terminal  $\alpha$ -amine et carboxyle, libérant ainsi une molécule d' $H_2O$  initialement liée au site catalytique  $Zn^{2+258}$  (Figure 13).



**Figure 13 : Inhibition endogène des MMPs par les TIMPs.** Schéma représentatif du mécanisme d'inhibition d'une MMP par TIMP. Benjamin, M. M. & Khalil, R. A., EXS 2012.

#### **- Régulation :**

L'expression des TIMPs peut être régulée au niveau transcriptionnel par différentes cytokines et facteurs de croissance. Leur expression est donc spécifique du tissu, constitutive ou inductible<sup>259</sup>.

Ainsi, TIMP-1 est exprimé dans de nombreux tissus et principalement au niveau des organes reproducteur. TIMP-3 est également exprimé dans de nombreux tissus, notamment le cœur, le rein et le thymus. TIMP-3 constitue une protéine importante de la MEC des reins et des yeux. L'expression de TIMP-4 est plus sélective puisque TIMP-4 est principalement présent dans le cœur et le cerveau et dans une moindre mesure dans les ovaires, les reins et le

pancréas<sup>260,261</sup> suggérant un rôle tissu spécifique de TIMP-4, cependant, les fonctions de TIMP-4 restent relativement peu connues.

L'expression de TIMP-2 est constitutive dans tous les tissus et n'est pas inductible par des facteurs de croissance, contrairement à celles des TIMP-1, -3 et -4. En effet, l'expression de TIMP-1 peut être induite par différents stimuli extérieurs, comme les facteurs de croissance (PDGF, EGF) et les cytokines (IL-6, IL-1 et IL- $\beta$ ). De plus, l'érythropoïétine (Epo) a été décrite comme pouvant induire l'expression et la sécrétion de TIMP-1<sup>262</sup>.

#### **- Activités biologiques des TIMPs :**

L'ensemble des activités des TIMPs sont résumées et rassemblées dans le tableau 1.

#### *- Activité inhibitrice de MMPs et pro-MMPs :*

La fonction principale des TIMPs est d'inhiber la forme active des MMPs au niveau de leur site actif comme il a été décrit précédemment. Cependant, les TIMPs sont également capables de se lier aux pro-MMPs via leur domaine C-terminal et d'inhiber ainsi l'auto-activation des pro-enzymes<sup>263,264</sup>. De plus, les TIMP liés aux pro-MMPs sont toujours capables d'inhiber une MMP active via leur domaine N-terminal, suggérant la formation de complexes ternaires. Ainsi, il a été montré que TIMP-1 se fixe principalement à la pro-MMP-9<sup>265,266</sup> et TIMP-2 préférentiellement à la pro-MMP-2<sup>267,268</sup>.

#### *- Activité pro- et anti-mitotique :*

Lorsque l'ADNc de TIMP-1 a été cloné pour la première fois, il a été décrit comme identique à celui d'un facteur appelé EPA (Erythroid Potentiating Activity)<sup>269</sup>. Ce facteur, produit par une lignée de lymphocytes T humains, est capable de potentialiser les effets de l'Epo sur la croissance de progéniteurs erythroïdes *in vitro*<sup>270</sup>. Par la suite, plusieurs études ont montré que TIMP-1 pouvait promouvoir la croissance de nombreux types cellulaires comme les keratinocytes, les fibroblastes et différentes lignées de carcinomes<sup>271-273</sup>. Ainsi, TIMP-2 possède également une activité EPA ainsi qu'un effet positif sur la croissance cellulaire<sup>274-276</sup>. Des équipes ont montré que ces effets des TIMPs sont indépendants de leur activité inhibitrice de MMPs. Par des expériences de mutations ponctuelles au niveau N-terminal de

TIMP-1, son activité inhibitrice de MMPs a pu être abolie, mais pas son activité EPA<sup>277</sup>. De plus, des inhibiteurs de synthèse de MMPs ne reproduisent pas cette activité EPA<sup>277</sup>.

Les mécanismes cellulaires impliqués dans la stimulation de la croissance sont encore mal décrits mais des études ont montré que TIMP-1 et TIMP-2 augmentent le niveau de Ras-GTP de deux façons différentes : TIMP-1 active la voie des MAPK via les tyrosines kinases tandis que TIMP-2 active la protéine kinase A directement impliquée dans la formation du complexe Ras/ PI3K<sup>278</sup>. Ces données suggèrent donc que TIMP-1 et -2 ont des récepteurs différents. Des études récentes ont montré que TIMP-1 pouvait interagir au niveau de la membrane avec les protéines CD63 et l'intégrine  $\beta$ -1<sup>279,280</sup> et TIMP-2 avec l'intégrine  $\alpha$ 3 $\beta$ 1<sup>281</sup>. Cependant ces interactions semblent être impliquées dans d'autres phénomènes induits par les TIMPs, comme l'inhibition de l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire.

Néanmoins, dans certains types cellulaires, il a été montré que TIMP-1 et TIMP-2 pouvaient également stopper la croissance cellulaire. Dans des cellules MCF10A épithéliales humaines, TIMP-1 arrête le cycle cellulaire au niveau G1 via une diminution de l'expression de la cycline D1 résultant de l'augmentation de son inhibiteur p27<sup>KIP1</sup><sup>282</sup>. Une autre étude sur des cellules endothéliales a montré que TIMP-2 pouvait également induire l'arrêt du cycle cellulaire en G1 par une augmentation de l'expression de p27<sup>KIP1</sup><sup>283</sup>. TIMP-2 possède par ailleurs une activité suppressive de la prolifération induite par des facteurs de croissance. Il peut en effet bloquer l'action de VEGF ou FGF-2 via son interaction avec l'intégrine  $\alpha$ 3 $\beta$ 1, conduisant à un transfert de l'intégrine  $\beta$ 1 associée au récepteur VEGF ou FGF et à sa déphosphorylation<sup>281</sup>.

#### - *Activité pro- ou anti-apoptotique :*

TIMP-1 possède également des effets anti-apoptotiques dans de nombreux types cellulaires<sup>284-286</sup>. Bien que ces effets ont été montrés, dans des cellules hépatiques, comme étant dus à son activité inhibitrice de MMPs<sup>287</sup>, d'autres études semblent être en contradiction avec ces résultats. Jung *et al.* ont notamment montré dans les cellules MCF10A que l'effet anti-apoptotique de TIMP-1 est médié par sa liaison avec le complexe CD63-intégrine $\beta$ -1 au niveau membranaire activant ainsi des voies de survie cellulaire par l'activation de FAK, PI3-K et ERK<sup>279</sup>. L'effet anti-apoptotique de TIMP-1 dans certains types

cellulaires serait associé à un fort potentiel oncogénique. En effet, l'expression de TIMP-1 dans des tissus cancéreux est associée à un mauvais pronostic dans plusieurs types de cancers comme le cancer colorectal et le cancer du sein<sup>288-291</sup>. Une étude dans le foie a montré que TIMP-1 augmentait l'expression de HGF (Hepatocyte Growth Factor), conduisant à une plus grande probabilité de métastases<sup>292</sup>. L'effet oncogénique de TIMP-1 pourrait également être expliqué par ses effets à la fois sur l'arrêt du cycle cellulaire et anti-apoptotique, conduisant *in fine* à une transformation et une différenciation cellulaire<sup>293-295</sup>. Guedez *et al.* ont montré que des cellules de Lymphome de Burkitt qui sont TIMP-1 positives sont résistantes à l'apoptose Fas-dépendante et indépendante tandis que les cellules TIMP-1 négatives ne le sont pas<sup>284</sup>.

Bien que l'effet de TIMP-1 sur la différenciation cellulaire semble être du à ses effets sur l'arrêt du cycle et sur l'inhibition de l'apoptose, les choses sont moins claires concernant TIMP-2 et son activité anti-apoptotique. La surexpression de TIMP-2 dans des cellules murines B16F10 de mélanome rend ces cellules résistantes à l'apoptose<sup>296</sup>. Dans un autre modèle d'athérosclérose, la surexpression de TIMP-2 prévient l'instabilité de la plaque et inhibe l'apoptose des macrophages et des cellules spumeuses<sup>297</sup>. Cependant, une autre étude a montré que TIMP-2 pouvait promouvoir l'apoptose de lymphocytes T activés par l'inhibition du clivage de Fas<sup>298</sup>. Les effets anti-apoptotiques de TIMP-2 restent donc encore à démontrer.

A l'opposé, TIMP-3 est connu pour avoir des effets pro-apoptotiques dans de nombreuses lignées de cellules cancéreuses<sup>299-303</sup> et dans des cellules musculaires lisses de rat. Smith *et al.* ont montré que les effets pro-apoptotiques de TIMP-3 étaient liés à son inhibition de la metalloprotéinase ADAM17 permettant ainsi de stabiliser les récepteurs du TNF<sup>301</sup>. TIMP-3 est connu pour sa capacité à inhiber l'élimination de nombreuses molécules à la surface de la cellule. En effet, Ahonen *et al.* ont confirmé que TIMP-3 pouvait stabiliser plusieurs récepteurs capables d'induire l'apoptose tels que TNF receptor 1, FAS ou encore TRAIL-R1 (TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1)<sup>304</sup>. Ainsi, la séquestration de TIMP-3 dans la matrice extracellulaire préviendrait son effet pro-apoptotique tout en lui permettant de contrôler la protéolyse extracellulaire en inhibant les MMPs.

### - Activité anti-angiogénique :

Le cartilage est un tissu non vascularisé qui présente une forte activité anti-angiogénique. Il a été montré dans un premier temps que cette activité était médiée par un inhibiteur de collagénase<sup>305</sup>. Par la suite, Moses *et al.* ont identifié que la séquence N-terminale de TIMP-1 est responsable de cette activité anti-angiogénique<sup>306</sup>. Il est désormais bien établi que les 4 TIMPs possèdent cette activité anti-angiogénique<sup>307</sup>. Les MMPs étant impliquées dans de nombreux processus de migration cellulaire et de formation capillaire, l'inhibition des MMPs par les TIMPs prévient l'angiogénèse. Cependant, TIMP-2 et -3 possèdent une activité anti-angiogénique indépendante de l'inhibition des MMPs.

L'activité anti-angiogénique de TIMP-2 est en partie médiée par son interaction avec l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ . Feldman *et al.* ont montré que la surexpression de TIMP-2 par des cellules cancéreuses murines de colon pouvait inhiber l'angiogénèse et la croissance tumorale en induisant une augmentation de la MAP kinase phosphatase 1, déphosphorylant p38 MAPK impliquée dans la prolifération et la migration endothéliale<sup>308</sup>. De plus, l'activité anti-angiogénique de TIMP-2 est localisée dans la région C-terminale de la protéine, région par laquelle TIMP-2 se fixe à l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$ <sup>309</sup>.

TIMP-3, en se liant directement au récepteur 2 du VEGF des cellules endothéliales, entraîne son inhibition et prévient ainsi l'angiogénèse<sup>310</sup>. TIMP-3 est capable de se lier également au récepteur de l'angiotensine II. La surexpression de TIMP-3 et du récepteur à l'angiotensine II inhibe l'angiogénèse de façon synergique<sup>311</sup>.

TIMP-2 et -3 jouent également un rôle important dans la stabilisation des capillaires en prévenant leur régression. Saunders *et al.* ont montré que les interactions entre les cellules endothéliales et les péricytes favorisent l'expression de TIMP-3 par les péricytes et de TIMP-2 par les cellules endothéliales, participant ainsi à la stabilisation du vaisseau nouvellement formé en inhibant les MMPs et les ADAMS et par sa liaison au VEGFR-2<sup>312</sup>.

Caractéristiques	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Localisation chromosomique	Xp11, 23-11,4	17q23-17q25	22q12,1-22q13,2	3p25
mRNA (kb)	0,9	3,5-1,0	5,0 (2,6-2,4)	1,4
Masse moléculaire (kDa)	28,5	21	22/27	22
Acide aminés - Peptide signal - Forme mature	23	26	23	29
	184	194	188	196
Sites de N-glycosylation	2	0	1	0
Localisation de la protéine	Soluble	Soluble/surface cellulaire	MEC	Soluble/surface cellulaire
Expression	Inductible	Constitutive	Inductible	Inductible
Association avec des pro-MMPs	pro-MMP-9	pro-MMP-2	pro-MMP-2/9	pro-MMP-2
MMPs faiblement inhibées	MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP, MMP-19	Aucune	Aucune	Aucune
Prolifération cellulaire	↑ Kératinocytes, fibroblastes, lignées cancéreuses, précurseurs érythroïdes	↑ Fibroblastes, lignées cancéreuses, précurseurs urètre, cell. mésenchymateuses	↓ Cell. endothéliales	↓ Cell. tumorales de Wilm's
	↓ Lignée cancéreuse mammaire	↓ Cell. endothéliales, fibroblastes, neurones, cell. Tumorales		
Apoptose	↓ Cell. Lymphome de Burkitt, lignée cancéreuse mammaire, cell. β pancréatiques, cardiomyoblastes (H9c2)	↑ Cell. Cancer colorectal	↑ Cell. Muscu. Lisses, Cell. Cancéreuses, Cell. Épithéliales rétinienne	↑ Fibroblastes cardiaques
		↓ Cell. Mélanomes		↓ Cell. Canc. mammaires
Angiogénèse	↓	↓	↓	↓
Effets métastatiques	↑	-	-	↑

**Tableau 1** : Tableau récapitulatif des caractéristiques des différents TIMPs et leurs effets biologiques. Adapté de Stetler Stevenson WG, Sci. Signal 2008.

## 2) **Cardiofibroblastes et interactions cellulaires**

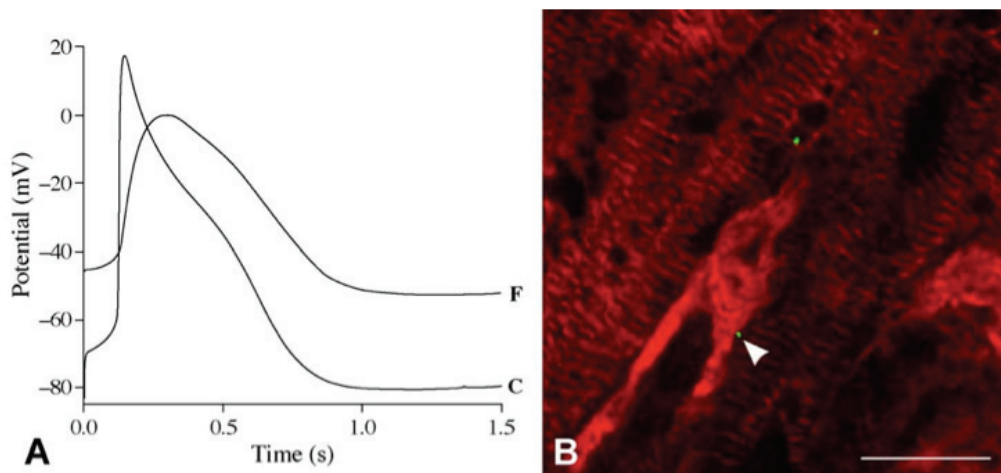
Plusieurs caractéristiques des CF, comme leur forte association avec la MEC et leur organisation formant un réseau en 3 dimensions, leur permettent une forte interaction avec les myocytes, que ce soit par une interaction directe, c'est à dire mécanique ou électrique, ou indirecte, par l'action de molécules bioactives comme des cytokines et des facteurs de croissance. Les CF interagissent avec d'autres types cellulaires, comme les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, mais nous avons choisi de détailler dans ce paragraphe uniquement les interactions cellulaires entre les CF et CM.

### *Interaction cellulaire par couplage électrique : jonctions gap*

Cette interaction se fait de façon similaire à celle des connections entre les CM, mettant en jeu les jonctions gap<sup>313</sup>. Les CM sont connectés par des jonctions reliant leurs cytoplasmes, permettant ainsi des échanges cellulaires de métabolites. Ces jonctions sont essentielles pour la propagation de l'impulsion électrique<sup>314</sup>. Elles sont formées de deux héli-canaux appelés connexons provenant chacun d'une cellule. Chaque héli-canal est composé de 6 molécules appelées connexines (Cx). Dans le cœur les formes prédominantes sont les Cx43, Cx45 et Cx40, bien qu'il existe une variabilité d'expression entre les différentes cavités cardiaques. Il a été montré que les CF expriment également les Cx43, Cx45 et Cx40<sup>315</sup>. De plus, des marquages par immunofluorescence ont permis de mettre en évidence, au sein du nœud sino-auriculaire, que les CF semblent exprimer majoritairement la Cx45, lorsqu'ils sont à proximité des CM, et majoritairement la Cx40, lorsqu'ils sont à proximité d'autres CF<sup>316</sup>.

Bien que les CF ne soient pas électriquement excitables, il a été montré, par des études de patch clamp, que leur membrane plasmique comportait de nombreux canaux ioniques et canaux voltage-dépendants, les rendant ainsi fortement conducteurs<sup>317-320</sup>. Des études ont montré que des CF néonataux peuvent constituer une source et/ou un collecteur de courants électro-toniques, modulant ainsi les caractéristiques des potentiels d'action et la vitesse de conduction lorsqu'ils sont couplés aux CM<sup>321,322</sup>. En effet, comme le potentiel de

membrane de CF est plus élevé que celui des CM à l'état de repos, le couplage entre les deux types cellulaires augmente le potentiel de membrane de CM et module ainsi leur seuil d'excitation<sup>323,324</sup> (Figure 14). Au cours de l'augmentation du potentiel d'action du CM, son potentiel de membrane devient plus élevé que celui du CF, transformant le CF en collecteur de courant électrique et pouvant alors diminuer la vitesse et l'amplitude du potentiel d'action des CM. Ces effets sont d'autant plus prononcés lorsque le nombre de CF couplés est augmenté<sup>323,325,326</sup>.



**Figure 14 : Couplage entre CM et CF (A)** Potentiels de membrane de CM et CF néonataux en culture. Le potentiel d'action du cardiomyocyte (C) affecte le potentiel de membrane du cardiofibroblaste couplé électriquement (F). Le potentiel de membrane plus élevé des CF peut se transmettre et moduler l'excitation des cardiomyocytes distants. **(B)** Image confocale du nœud sinoauriculaire de lapin par marquage immunohistochimique des CM (cellules striées rouges), des CF (cellules rouge brillant) et de la Cx45 (points verts). Echelle : 10 µm. Camelliti *et al.*, Cardiovascular Res 2005

L'idée d'un couplage électrique *in vivo* dans un cœur sain entre CM et CF reste débattue dans la littérature et difficile à démontrer par des techniques d'électrophysiologie standard. Le couplage *in vivo* entre les myocytes et les CF a été démontré uniquement au niveau du nœud sinoauriculaire<sup>327,328</sup>. Cependant, ceci a été démontré à plusieurs reprises dans des modèles *in vitro* d'interaction entre CM et CF par les jonctions gap<sup>329</sup>. En effet, l'équipe de



Rohr a montré dans un modèle de culture 2-D de CF et CM néonataux que des CM distants de plus de 300  $\mu\text{m}$  sont couplés électriquement grâce à leurs interactions avec des CF<sup>330</sup>. D'autres études suggèrent donc que le couplage entre CM et CF en culture permet la synchronisation de la contraction entre les myocytes<sup>331,332</sup>, accompagnée d'une synchronisation des potentiels de membrane des CF interconnectés<sup>332,333</sup>.

Vasquez *et al.* ont été les premiers à étudier l'expression des connexines et le couplage de CM et de CF isolés à partir de ventricules de rats ayant subi un infarctus. Ils ont mis en évidence une forte augmentation de l'expression de Cx43 dans les CF ainsi qu'une augmentation du couplage entre CF et CM issu des cœurs infarctés par technique de Gap-FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). De plus, ils ont montré que ce couplage est médié par les jonctions gap puisqu'il est prévenu par un découplant des jonctions : la carbenoxolone<sup>334</sup>.

Une étude récente a montré que des co-cultures de CM néonataux et de myofibroblastes en monocouche présentent des arythmies médiées par l'expression de la Cx43 dans les CF<sup>335</sup>. Ceci a été confirmé par une autre étude *in vivo* chez le lapin, où il a été montré que le couplage des myofibroblastes exacerbe la propagation d'arythmies après infarctus, et ceci de façon proportionnelle à la densité des myofibroblastes<sup>336</sup>. Toutes ces études soulignent la complexité des effets de couplage entre CM et CF, qui dépendent de nombreuses conditions, comme notamment le ratio et la densité des CF, la force de couplage, l'état d'activation des CM, la distribution spatiale des cellules et la structure des tissus. Une lésion cardiaque peut ainsi induire de nombreux changements au niveau des propriétés électrophysiologiques des CF, pouvant altérer les interactions CM-CF, voire même contribuer à la formation d'arythmies.

### ***Interaction cellulaire mécanique : jonctions adhérentes***

Les jonctions d'adhésions intercellulaires jouent un rôle majeur dans la fonction du tissu cardiaque<sup>337</sup>. Ces jonctions mécaniques sont composées de clusters de molécules d'adhésion, contenant en leur centre un complexe de cadhérines et caténines, permettant l'interaction avec les cellules adjacentes mais également avec la MEC. Les cadhérines sont

des récepteurs transmembranaires pouvant se lier aux protéines du cytosquelette telles que l'actine ou les filaments intermédiaires, via les caténines, facilitant ainsi la transmission d'un stimulus mécanique entre les cellules.

Le rôle de ces jonctions adhérentes entre les CM est largement connu dans le développement, notamment des myofibrilles, ainsi que dans le maintien du phénotype fonctionnel cardiaque.

Dans les CF, la formation de jonctions adhérentes est concomitante avec la transformation en myoFB et est essentielle à leur synchronisation<sup>338</sup>. L'expression de la cadhérine a été détectée également dans des co-cultures de CM et myoFB. Thompson *et al.* ont en effet montré que des myoFB activés par TGF- $\beta$  pouvaient augmenter la force tonique contractile des CM et ralentir la propagation du flux électrique résultant de l'activation de canaux mécanosensitifs<sup>338</sup>.

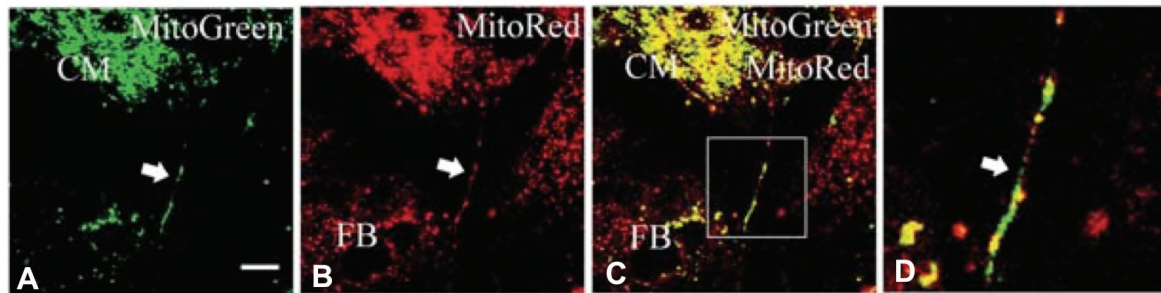
Les régulations des jonctions adhérentes et des jonctions gap sont étroitement liées. En effet, il a été rapporté une déstabilisation des jonctions gap lorsque les jonctions adhérentes étaient compromises par mutations des cadhérines ou caténines<sup>339,340</sup>. A l'inverse, il a été montré que l'organisation des jonctions adhérentes est indépendante des jonctions gap<sup>341</sup>.

### ***Interaction cellulaire mécanique : nanotubes membranaires***

Il a récemment été décrit l'existence d'un nouveau type de communication intercellulaire via la formation de nanotubes membranaires permettant l'échange d'organelles, de composés de la membrane plasmique ou encore de molécules cytoplasmiques à travers ou le long de ces nanotubes<sup>342,343</sup>.

Ces nanotubes membranaires ont été mis en évidence dans divers types cellulaires, notamment entre les CM et les progéniteurs endothéliaux ou encore entre les CM et les MSCs<sup>344,345</sup>. Une communication intercellulaire entre CM et CF, via des nanotubes, a également été rapportée récemment dans des cellules de rats nouveaux nés. Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence un transfert d'organelles (vésicules et mitochondries) et une propagation du signal calcique à travers ces nanotubes<sup>346</sup> (Figure 15). Ils ont

également montré que cette interaction n'était pas seulement hétérotopique mais que ce genre de connexions existait aussi de façon homotypique entre CM et entre CF<sup>346</sup>. L'existence de ces nanotubes *in vivo* reste à démontrer afin de caractériser leurs fonctions et leurs rôles en conditions physiologiques.



**Figure 15 : Nanotubes membranaires entre CM et CF néonataux et mise en évidence de transferts de mitochondries.** Après marquages des mitochondries à l'intérieur des cellules au mitotracker, les CM avec le MitoGreen (**A**) et les CF avec le MitoRed (**B**) les deux types cellulaires sont mis en co-culture durant 24h (**C**). Au niveau des nanotubes apparaissent à la fois les marquages rouge et vert (flèche). Un agrandissement du carré blanc est représenté dans la photo de droite (**D**). (CM : cardiomyocyte, FB : cardiofibroblaste) He *et al.*, Cardiovasc Res 2011

### ***Interaction cellulaire indirecte : communication paracrine***

Les échanges de facteurs paracrines entre CF et CM jouent un rôle clé dans la communication intercellulaire, pouvant *in fine* affecter leurs fonctions respectives. Les CM et les CF peuvent sécréter de nombreuses molécules bioactives comme des chimiokines, cytokines, facteurs de croissance et autres peptides bioactifs. Nous décrivons ici les principales molécules impliquées dans cette communication paracrine entre CF et CM, résumée dans la figure 16.

#### *- Angiotensine II (Ang II) :*

L'Ang II est une molécule effectrice du système rénine-angiotensine capable de réguler la pression et le volume sanguin. Il existe également un système rénine-angiotensine local au sein du myocarde, pouvant jouer un rôle clé dans la fonction cardiaque<sup>347</sup>. En effet, les CF et les CM produisent l'angiotensinogène, la rénine et l'enzyme de conversion de l'angiotensine, ce qui leur permet de produire de façon effective l'Ang II<sup>348,349</sup>. La stimulation des CF par l'Ang II augmente leur prolifération, leur différenciation en myoFB, leur production de collagène et l'expression d'autres protéines de la MEC comme la fibronectine ou la laminine<sup>350,351</sup>. L'Ang II régule donc la fonction des CF de façon directe via son récepteur de type 1 (AT<sub>1</sub>) ou de manière indirecte via l'induction de l'expression d'autres facteurs pouvant contribuer à l'hypertrophie ou à la fibrose comme Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), endothéline-1 (ET-1), Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukine-6 (IL-6), les peptides natriurétiques et Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)<sup>352-355</sup>.

#### *- Endothéline 1 (ET-1) :*

L'ET-1 est un peptide ayant des effets sur le tonus vasculaire. Des taux élevés d'ET-1 circulante sont mesurés chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque ainsi que dans divers modèles animaux d'insuffisance cardiaque<sup>356</sup>. L'ET-1 peut notamment être synthétisée par les CM, les cellules endothéliales et les CF. Les effets de l'ET-1 sont médiés par deux principaux récepteurs : ETA et ETB. Ces deux récepteurs sont exprimés par les CF et les myoFB, avec une prédominance pour ETB<sup>357</sup>, contrairement aux CM, qui expriment majoritairement le type ETA<sup>358,359</sup>. Une stimulation des CM par l'ET-1 induit un phénotype hypertrophique. L'ET-1 stimule la prolifération des CF via le récepteur ETA, augmente la différenciation en myoFB et augmente la synthèse de collagène<sup>360</sup>. Ses effets sont donc considérés comme pro-fibrotiques.

#### *- Les peptides natriurétiques (ANP-BNP) :*

Les peptides natriurétiques, synthétisés de façon prédominante dans le myocarde, ont pour rôle endocrine de réguler la pression sanguine et possèdent également des effets autocrine et paracrine. Leur production est augmentée après un infarctus du myocarde et au cours de l'insuffisance cardiaque. Bien qu'il soit admis que les CM sont la source majoritaire de peptides natriurétiques, ceux-ci peuvent également être produits par les CF. De plus, les

myoFB représentent aussi une source importante de BNP et ANP après infarctus, au cours de la cicatrisation<sup>227</sup>. Cette production par les CF ou les myoFB peut être induite par l'Ang II, l'IL-1 $\beta$ <sup>361</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>362</sup> ou en réponse à l'hypoxie-réoxygénation<sup>363</sup>.

#### - *Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) :*

Au sein du myocarde, TGF- $\beta$  est principalement synthétisé par les CF<sup>364</sup>. Ce facteur est un régulateur important de la réponse à la surcharge ventriculaire, de la fibrose ou encore de l'hypertrophie<sup>365</sup>. TGF- $\beta$  possède 3 isoformes, chacune encodée par un gène distinct. Sous forme inactive, TGF- $\beta$  est lié avec la protéine LTBP (latent TGF- $\beta$ -binding protein) et peut-être intracellulaire ou extracellulaire. Après activation, par clivage protéolytique, la forme active de TGF- $\beta$  peut se lier à des récepteurs transmembranaires et activer une cascade de signalisation entraînant la transcription de gènes via les facteurs Smad<sup>366</sup>.

TGF- $\beta$  a été largement décrit comme étant un facteur pouvant induire la prolifération et la transformation des CF en myoFB. La stimulation des CF par le TGF- $\beta$  augmente la production de collagène, de fibronectine, de protéoglycanes ainsi que de l' $\alpha$ -actine de muscle lisse ( $\alpha$ -SMA)<sup>367-369</sup>. Par ailleurs, il a été montré que la production de TGF- $\beta$ 1 par les CF peut être largement stimulée par l'angiotensine II (Ang II)<sup>352,370</sup>.

Les CM produisent également TGF- $\beta$  et expriment ses récepteurs à leurs surfaces. TGF- $\beta$  est produit par les CM en réponse à une contrainte mécanique<sup>371</sup> et son expression est augmentée lors d'une surcharge ventriculaire et d'un infarctus du myocarde<sup>364</sup>. TGF- $\beta$ 1 peut induire l'hypertrophie des CM *in vivo*<sup>372</sup> et être impliqué dans la pathogénèse de cardiomyopathies hypertrophiques chez l'homme<sup>373,374</sup>.

De manière intéressante, Gray *et al.* ont montré que l'Ang II induit une hypertrophie dans un modèle de CM en co-culture avec des CF et que cette hypertrophie est dépendante des CF montrant un effet similaire obtenu avec un milieu conditionné, par stimulation à l'Ang II, de CF. Les auteurs ont montré que l'Ang II stimule la production de TGF- $\beta$ 1 par les CF, induisant *in fine* l'hypertrophie des CM<sup>375</sup>. Cependant, cet effet paracrine ne semble pas homogène au sein du myocarde puisqu'une étude à partir de souris transgéniques exprimant de façon constitutive TGF- $\beta$ 1 dans les CM, a montré que ces souris présentent une fibrose spécifiquement auriculaire et une forte apoptose des CF principalement au niveau ventriculaire<sup>376</sup>.

#### - *Connective tissue growth factor (CTGF) :*

CTGF, connu aussi sous le nom de CCN2, est exprimé par les CF et les CM. Ce facteur est activé par TGF- $\beta$  et il régule la prolifération des CF ainsi que la synthèse de MEC durant le processus de fibrose<sup>377</sup>. Une étude récente a montré que la sécrétion de CTGF par les CM, résultant d'une communication intercellulaire avec les CF, a un rôle dans le développement de la fibrose cardiaque<sup>378</sup>. Les auteurs ont mis en évidence une forte augmentation de l'expression de CTGF dans un modèle de CM néonataux knockdown pour la protéine G Rad. De plus, la surexpression de Rad dans des CM néonataux abolit la sécrétion basale de CTGF et celle induite par le TGF- $\beta$ . Cette même étude a également montré qu'un milieu conditionné de CM knockdown pour Rad affecte la production de MEC par les CF et que ceci est aboli par l'utilisation d'un anticorps neutralisant CTGF. De plus, les auteurs ont montré que les souris knockout pour Rad présentent une fibrose plus importante. De la même manière, les souris transgéniques surexprimant le CTGF sous le promoteur de la chaîne lourde de l' $\alpha$ -myosine ( $\alpha$ -MHC) présentent une fibrose plus importante ainsi qu'une dysfonction contractile en réponse à une surcharge ventriculaire<sup>379</sup>. Par ailleurs, Duisters *et al.* ont montré que l'expression de CTGF est régulée de façon négative par les micro-ARNs miR-133 et miR-30<sup>380</sup>.

#### - *Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) :*

FGF-2 est une protéine intra- et extracellulaire qui peut-être synthétisée à la fois par les CM et par les CF. Dans l'espace interstitiel, FGF-2 est lié aux protéoglycanes (héparane-sulfate). Dans les CM, la production de FGF-2 est induite par une stimulation adrénergique entraînant un feedback positif sur sa propre synthèse<sup>381,382</sup>. L'expression de FGF-2 est également augmentée par une stimulation à l'Ang II ou encore par l'hypoxie<sup>383,384</sup>. Du fait de l'absence de peptide signal pour la sécrétion de FGF2, les mécanismes par lesquels les CM et les CF le sécrètent restent encore mal connus. Certaines études ont montré un relargage de FGF-2 lors d'une perte d'intégrité membranaire pouvant se produire pendant un épisode hypoxique, pendant l'apoptose, ou, de façon transitoire, pendant des réarrangements membranaires lors de la contraction<sup>385,386</sup>. Les souris KO pour FGF-2 présentent une diminution de l'hypertrophie induite par une surcharge ventriculaire<sup>387</sup>. Les CM de ces souris KO répondent à l'Ang II et au FGF-2. Cependant, leurs CF ont perdu leur capacité à produire d'autres facteurs hypertrophiques par rapport aux CF de souris wild type<sup>388</sup>. Ces études

suggèrent que FGF-2 serait sécrété majoritairement par les CF et pourrait agir à la fois de façon autocrine, en activant les CF eux-mêmes et de façon paracrine en activant une réponse hypertrophique des CM.

D'autres études ont montré que l'administration exogène de FGF-2, ou la surexpression de son récepteur, diminuent les lésions d'ischémie-reperfusion en activant les voies liées au postconditionnement, comme la voie RISK, via Akt et la kinase p70s6 et la protéine kinase C<sup>389-391</sup>.

#### - La Famille Interleukine-6 (IL-6) :

La famille IL-6 est composée de peptides comme l'IL-6, la cardiotrophine-1 (CT-1) ou le Leukemia Inhibitor Factor (LIF) pouvant réguler l'hypertrophie des CM. Ces peptides transmettent leur signal via la protéine transmembranaire gp130 pouvant activer diverses voies de signalisation. IL-6, CT-1 et LIF peuvent être produits par les CM et les CF et constituent des médiateurs de l'interaction paracrine entre les deux types cellulaires<sup>392,393</sup>.

Des études ont montré que IL-6, via la voie gp130-JAK-STAT, était importante dans la fonction cardiaque et la cardioprotection<sup>394-396</sup>. L'expression de l'IL-6 est fortement augmentée en cas d'hypertrophie<sup>397</sup> et des études ont montré que l'activation continue de gp130 pouvait également conduire à une hypertrophie myocardique<sup>398</sup>. De la même manière, il a été montré que LIF pouvait induire une hypertrophie des CM mais qu'il limitait la transformation des CF en myoFB ainsi que la synthèse de MEC<sup>399</sup>. CT-1 agit lui aussi sur l'hypertrophie des CM et stimule également la prolifération des CF<sup>362,400</sup>. Sano *et al.* ont mis en évidence la présence d'IL-6, de CT-1 et de LIF-1 dans du milieu conditionné de CF par stimulation à l'Ang II. Ce milieu conditionné de CF induit une augmentation de la taille des CM ainsi qu'une phosphorylation de gp130 et STAT3 pouvant être partiellement abolie par l'inhibition de LIF et CT-1<sup>354</sup>. Cette étude suggère donc que ces protéines sont impliquées en partie dans une cascade de molécules produites par les CF affectant l'hypertrophie des CM.

#### - L'interleukine 33 (IL-33) :

Parmi les membres de la famille IL-1, IL-33 est une interleukine récemment mise en évidence dans la communication paracrine entre CM et CF. Elle a été découverte en 2005 par Schmitz *et al.* et possède une structure commune aux facteurs IL-1 et FGF et se fixe au récepteur ST-2 de l'IL-1<sup>401</sup>. Sanada *et al.* ont été les premiers à montrer, dans le cœur, qu'IL-33 est

produite majoritairement par les CF et que son expression est induite par une contrainte biomécanique cyclique<sup>402</sup>. Cette même étude a montré, *in vivo*, qu'en réponse à une surcharge ventriculaire, IL-33 réduit l'hypertrophie myocytaire mais également la fibrose cardiaque<sup>402</sup>. De plus, des travaux menés chez le rat par Seki *et al.* ont montré qu'IL-33 diminue l'apoptose des CM induite *in vitro* par l'hypoxie, réduit *in vivo* la taille d'infarctus et la fibrose et améliore la fonction ventriculaire 15 jours après infarctus<sup>403</sup>.

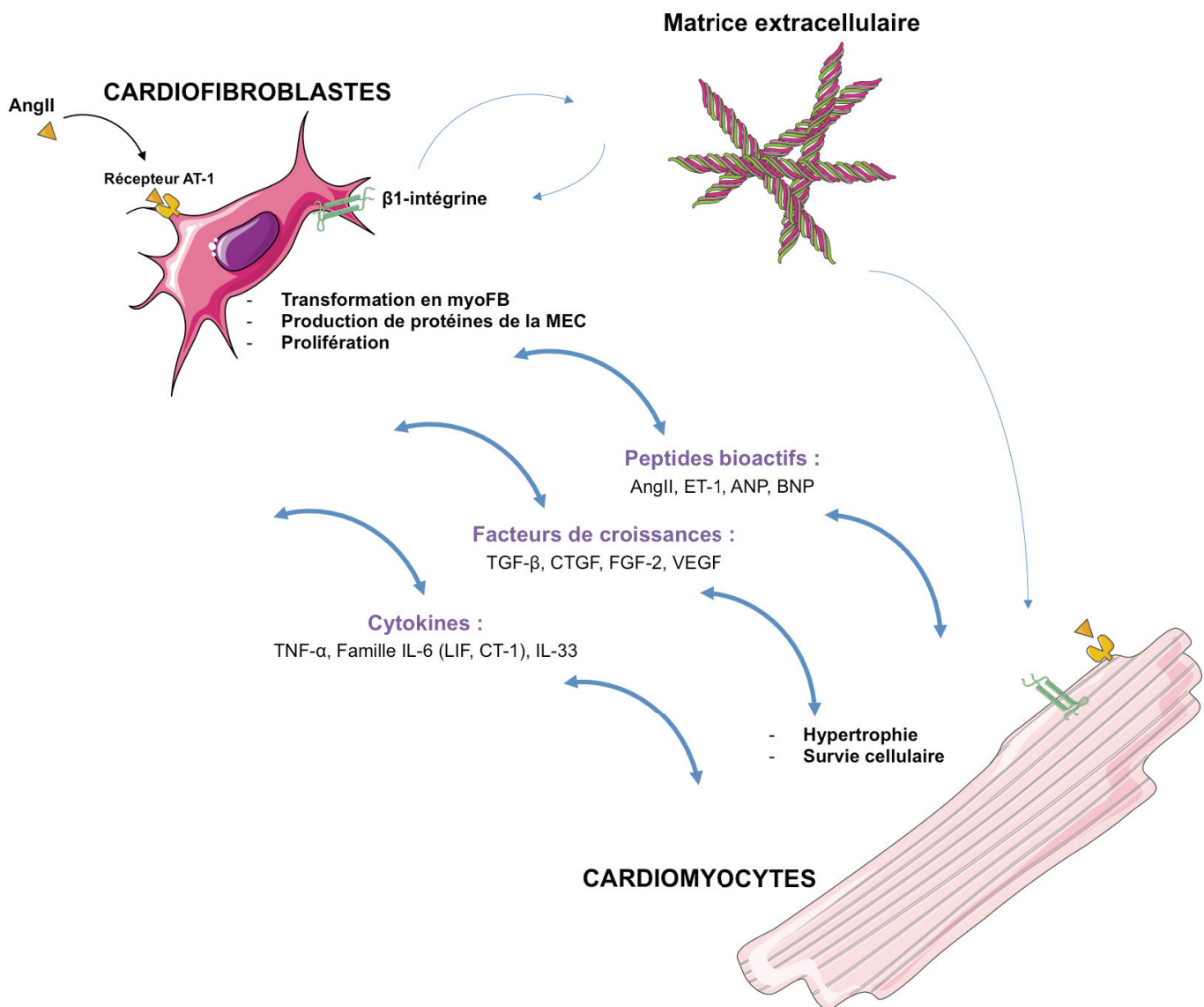
#### - Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) :

De nombreuses études ont montré que le niveau plasmatique de TNF- $\alpha$  était corrélé avec une progression vers le remodelage ventriculaire gauche et l'insuffisance cardiaque<sup>404,405</sup>. En effet, une étude a montré qu'une infusion péritonéale continue de TNF- $\alpha$ , durant 15 jours, chez le rat, peut conduire à une dysfonction ventriculaire et une insuffisance cardiaque<sup>406</sup>. Par ailleurs, TNF- $\alpha$  augmente l'expression de facteurs hypertrophiques comme IL-1 $\beta$  et IL-6 par les CF *in vitro*<sup>407</sup>. De plus, il a été montré que l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  est augmentée dans des cultures de CF isolés après infarctus<sup>408</sup>. Une autre étude a confirmé que l'hypoxie pouvait induire l'expression de TNF- $\alpha$  par les CF<sup>409</sup>.

#### - Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) :

Des études récentes ont montré qu'il existait une communication paracrine entre les CM et les CF via le récepteur VEGFR1 et la forme VEGFB de la famille VEGF<sup>410,411</sup>. L'activation de VEGFR1 à la surface du CM par VEGFB induit l'activation de signaux anti-apoptotiques *in vitro* dans des CM en culture mais également *in vivo* après infarctus du myocarde chez le rat. De plus, l'augmentation de l'expression de VEGFB, par l'injection d'un adénovirus chez le rat, préserve la fonction cardiaque 3 mois après infarctus sans action angiogénique suggérant un rôle majeur de VEGFR1 dans la fonction cardiaque<sup>412</sup>. Une autre étude a montré que la sécrétion de VEGF induite par des CM lésés pouvait induire la prolifération des myoFB, suggérant cette fois une contribution du VEGF dans le développement de la fibrose<sup>413</sup>. Un autre membre de la superfamille du VEGF, le PGF (Placental growth factor) a lui aussi été récemment mis en évidence dans l'interaction paracrine CM-CF. En effet, le PGF, sécrété par les CM, peut activer la prolifération des CF et induire indirectement une hypertrophie, par une action paracrine secondaire des CF<sup>414</sup>.





**Figure 16 : Schéma récapitulatif des interactions paracrines entre CF et CM** ainsi que leurs effets majeurs sur ces deux types cellulaires. Adapté de R. Kakkar and R.T. Lee, *Circulation Research*, 2010. (myoFB : myofibroblastes, MEC : matrice extracellulaire, TGF-β : transforming growth factor-β, IL-6 : interleukine 6, LIF : leukemia inhibitor factor, CT-1 : cardiotrophin-1, IL-33 : interleukine 33, CTGF : connective tissue growth factor, FGF-2 : fibroblast growth factor-2, VEGF : vascular endothelial growth factor, AngII : angiotensine II, Récepteur AT1 : récepteur de type 1 pour l'angiotensine II, ET-1 : endothelin-1, ANP-BNP: peptides natriurétiques).

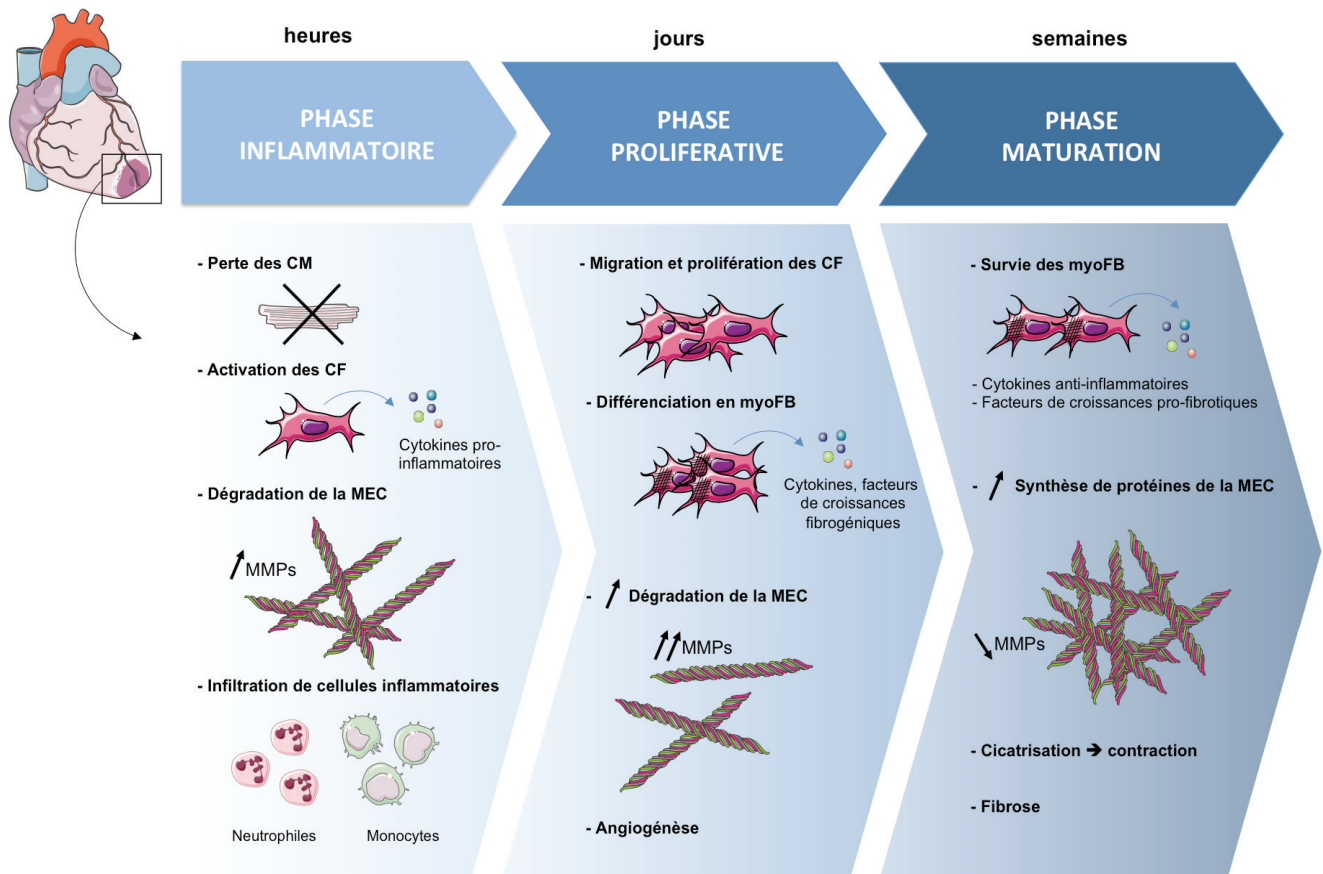
## C. Cardiofibroblastes et réparation post-infarctus

Comme il a été décrit précédemment, les CF ont un rôle majeur dans l'organisation de la fonction cardiaque. En contrôlant le microenvironnement, via la sécrétion de protéines matricielles et de facteurs solubles mais également via leur couplage direct avec les CM, ils fournissent une stabilité structurale nécessaire au bon fonctionnement du myocarde.

Au cours de l'infarctus du myocarde, une perte cellulaire importante du myocarde se produit dans un laps de temps réduit. Ainsi, la réparation de la zone infarctée représente un réel challenge pour le myocarde, sachant que le cœur adulte de mammifères ne possède qu'une très faible capacité de régénération. La zone lésée va donc déclencher une réponse inflammatoire de réparation remplaçant ainsi la perte cellulaire et les débris matriciels par une cicatrice formée majoritairement de collagène. Ce processus de remodelage s'accompagne de nombreux changements moléculaires et cellulaires au niveau de la zone infarctée ainsi que dans les zones bordantes, pouvant fortement altérer la géométrie ventriculaire<sup>415</sup>.

Ainsi, ce processus de réparation myocardique post-infarctus peut se décrire en trois principales phases distinctes pouvant cependant parfois coïncider : la phase inflammatoire, la phase proliférative et la phase de maturation<sup>416,417</sup> (Figure 17).

## Infarctus du myocarde



**Figure 17 : Cardiofibroblastes et réparation tissulaire post-infarctus.** Adaptée de F.A van Nieuwenhoven, N.A Turner, Vascular Pharmacology, 2012. (CM : cardiomyocytes, CF : cardiofibroblastes, MEC : matrice extracellulaire, MMPs : métalloprotéinases, myoFB : myofibroblastes)

### 1) Phase inflammatoire

Au cours de celle-ci, les composants intracellulaires de la zone lésée sont relargués et agissent comme signaux de danger pour le système immunitaire inné. Via la synthèse de chimiokines et cytokines, les cellules du myocarde vont induire le recrutement de neutrophiles et de monocytes<sup>418,419</sup>, puis activer les leucocytes afin de phagocyter les cellules mortes et les débris matriciels au sein de la lésion.

De par leur abondance et leur emplacement stratégique au sein du myocarde, les CF sont des cellules sentinelles de l'altération du microenvironnement pouvant initier, après

infarctus du myocarde, une réponse inflammatoire. Cependant, leur contribution à l'activation de cette réponse reste encore peu documentée et, à ce jour, les cellules endothéliales et les mastocytes résidents sont considérés comme les principales sources de la réponse inflammatoire<sup>420,421</sup>.

Une étude récente a cependant montré que les CF sont impliqués dans l'activation de l'inflammation post-infarctus. Les auteurs ont montré, dans un modèle *in vivo* chez la souris, que les CF activent l'inflammasome, plateforme moléculaire responsable de l'activation de la caspase-1 inflammatoire et de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ <sup>422</sup>. Ces auteurs ont montré *in vitro* que l'activation de l'inflammasome par les CF est due à la production de ROS et à l'efflux de potassium après hypoxie-réoxygénation.

En effet, les ROS peuvent moduler la fonction des CF, de façon directe et indirecte, en activant leur production de cytokines. Cependant, des études sont en contradiction quant à l'action des ROS sur les CF. En effet, une étude sur des CF adultes et néonataux a montré que les ROS diminuent la production de collagène et augmentent la synthèse de MMPs<sup>423</sup>, tandis que d'autres études, à partir de CF adultes, ont démontré que les ROS activent la synthèse de collagène et d'ostéopontine<sup>424,425</sup> et peuvent également activer la synthèse de TGF- $\beta$  ainsi que celle de CTGF<sup>426,427</sup>.

Les cytokines libérées dans le cœur infarci peuvent également avoir un rôle dans l'activation de l'inflammation par les CF post-infarctus. *In vitro*, l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'oncostatine-M stimulent le phénotype pro-inflammatoire des CF en induisant la synthèse de chimiokines et cytokines<sup>428,429</sup>. De plus, il a été montré que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6, fortement augmentés dans le myocarde infarci<sup>418</sup>, peuvent diminuer la synthèse de collagène, augmenter la production de MMPs et diminuer la production de TIMPs dans des CF en culture<sup>430</sup>. Par ailleurs, il a été suggéré que les effets inflammatoires d'IL-1 dans le myocarde infarci semblent être médiés en partie par une activation de la synthèse des MMPs produits par les CF<sup>431</sup>.

## 2) Phase proliférative

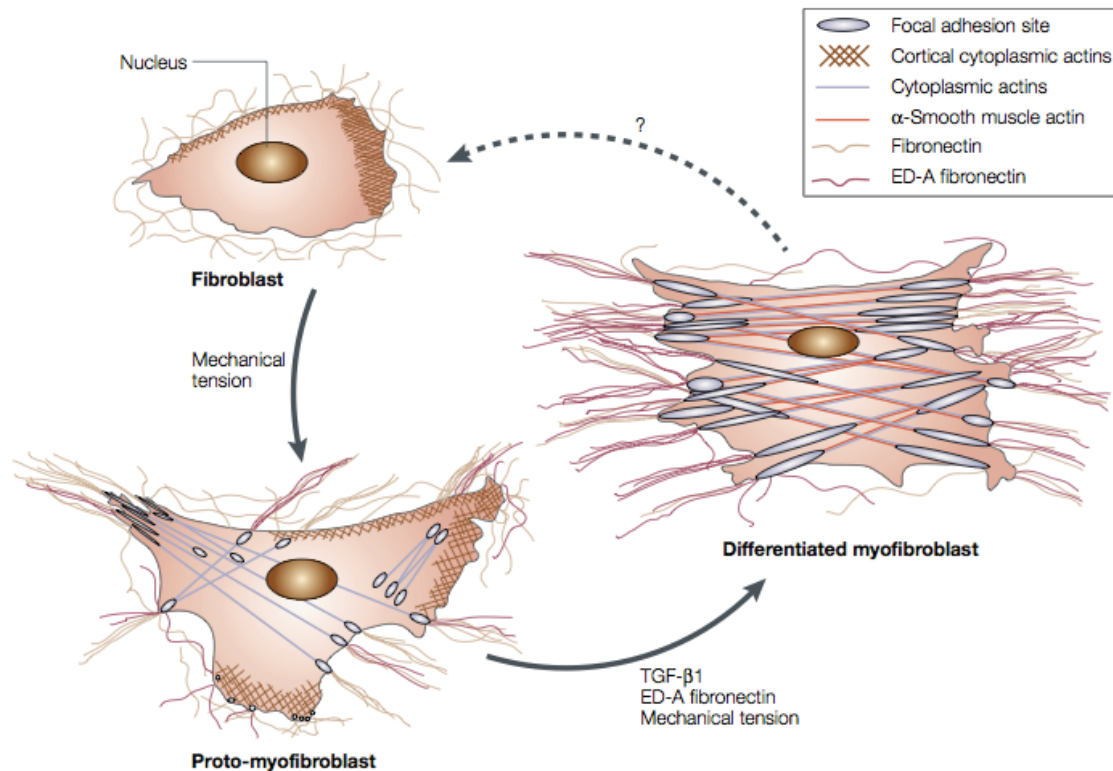
Dès lors que la zone infarctée ne contient plus de débris cellulaires et matriciels, la réponse inflammatoire est arrêtée. Les neutrophiles précédemment recrutés rentrent alors en apoptose et sont phagocytés par les macrophages, laissant place aux monocytes, macrophages et leucocytes<sup>419,432,433</sup>, qui produisent ensuite des médiateurs inhibiteurs de la réponse inflammatoire, comme IL-10 ou TGF- $\beta$ <sup>434-436</sup>. L'action des CF sur l'inhibition de la réponse inflammatoire reste mal connu, mais ils possèdent un rôle clé dans la phase proliférative. En effet, au cours de cette phase, les CF subissent des changements phénotypiques et fonctionnels majeurs : une forte capacité proliférative et migratoire, la faculté de produire des protéines de la MEC plus importante mais surtout par l'acquisition d'un phénotype de myoFB<sup>415</sup> (Figure 18).

Aux premiers stades du processus de réparation, les myoFB développent des fibres de stress composées d'actine cytoplasmique mais n'expriment pas encore l' $\alpha$ -SMA. Ces cellules sont appelées proto-myoFB<sup>437</sup>. La différenciation de ces cellules en myoFB, via l'expression de  $\alpha$ -actine de muscle lisse ( $\alpha$ -SMA), s'effectue grâce à la coopération de différents stimuli : l'activation de voies de signalisation par le TGF- $\beta$ , le stress mécanique et l'action de protéines spécialisées de la MEC, comme le variant d'épissage alternatif ED-A (Extra Domain-A) de la fibronectine<sup>437</sup>.

L'expression de TGF- $\beta$  est fortement augmentée dans le myocarde infarcté et stimule dans les CF la transcription du gène codant pour l' $\alpha$ -SMA, via la cascade de signalisation du facteur de transcription Smad3<sup>438</sup>.

Les altérations de la composition, ainsi que les propriétés mécaniques de la MEC, jouent un rôle important dans la différenciation des CF en myoFB (Figure 18). Le variant d'épissage ED-A de la fibronectine est fortement augmenté post-infarctus<sup>439</sup>. Ce variant possède un rôle clé dans la différenciation des myoFB<sup>231</sup> et l'absence de son expression préserve la survie et prévient le remodelage et la dysfonction ventriculaire post-infarctus<sup>440</sup>. Il a été montré également que la synthèse de collagènes non fibrillaires, notamment le collagène de type VI, est augmentée après infarctus et peut moduler la transformation des CF en myoFB *in vitro*<sup>441</sup>.

Le stress mécanique stimule directement la transcription de l' $\alpha$ -SMA via la voie de signalisation Rho/Rho Kinase<sup>442</sup>. Cependant, il a été montré que le stress mécanique, en l'absence de TGF- $\beta$ , n'est pas suffisant pour induire une différenciation en myoFB<sup>437</sup>.



**Figure 18 : Processus de différenciation des CF en myoFB au cours de la phase proliférative de réparation post-infarctus.** Tomasek *et al.* Nat Rev Mol Cell Biol 2002. (TGF- $\beta$ 1 : transforming growth factor- $\beta$ 1, ED-A : extra domain-A, variant d'épissage alternatif de la fibronectine)

Les mécanismes responsables de la migration des myoFB au niveau de la zone infarctée, afin d'amorcer la cicatrisation, restent encore mal connus. Des chimiokines, comme MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) ou les facteurs TGF- $\beta$  et FGFs peuvent stimuler le recrutement des fibroblastes dans la zone lésée<sup>415</sup>. Cette migration requiert un remodelage important de la MEC. Afin de faciliter la motilité des myoFB, il a été montré que ceux-ci produisent des protéases dégradant la MEC. Mais ils produisent également des protéines dites matricellulaires, comme les thrombospondines 1 et 2 (TSP-1 et -2), la tenascine-C ou SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), leur conférant des propriétés

d'adhésion cellulaire intermédiaire appelées état « dé-adhésif », afin de faciliter leur mobilité<sup>443,444</sup>. Leur migration au niveau de la zone lésée est également associée à l'expression du gène frizzled-2 (fz2) ayant un rôle clé dans la polarité tissulaire<sup>445</sup>.

Au cours de cette phase dite proliférative, l'environnement de la zone infarctée est riche en facteurs fibrogéniques tels que l'Ang II, TGF- $\beta$ , FGF-2 ou PDGF, capables de stimuler les myoFB, notamment par une augmentation de leur production de protéines matricielles ainsi que de leur prolifération<sup>446,447</sup>.

### 3) Phase de maturation

Au cours de la phase de maturation cicatricielle, le contenu en collagène augmente progressivement tandis que les leucocytes et les fibroblastes sont éliminés. En effet des études suggèrent que la densité des myoFB, après la phase proliférative, diminue au cours du temps<sup>448</sup> en rentrant dans un processus apoptotique<sup>449,450</sup>.

Les étapes précises de ce processus ne sont pas encore identifiées. Le phénomène de désactivation des myoFB reste encore à élucider, à savoir si l'apoptose précède cette désactivation ou si elle en est la conséquence.

Cette désactivation pourrait être due à la diminution du taux de cytokines et de facteurs de croissance au cours de la maturation de la cicatrice. De plus, les changements majeurs de la composition de la MEC se produisant lors de la cicatrisation peuvent également avoir des conséquences sur le phénotype et la désactivation des myoFB. En effet, la formation d'une cicatrice dite mature diminue l'activation des myoFB par stress mécanique<sup>224,451</sup>. Enfin, la formation d'une matrice plus structurée au cours de la cicatrisation diminue également la quantité de fibres de stress pouvant conduire à la quiescence cellulaire.

## D. Cardiofibroblastes et ischémie-reperfusion

Comme il a été décrit précédemment, les CF ont été largement étudiés pour leurs rôles dans la réparation tissulaire cardiaque suite à un infarctus du myocarde. Mais leurs rôles au cours de l'ischémie et de la reperfusion restent encore à élucider. Un faible nombre de travaux a été réalisé, à partir de CF isolés en culture, étudiant leur réponse face à un épisode hypoxique seul ou bien en conditions d'hypoxie-réoxygénation.

Il a été montré qu'un épisode hypoxique diminue la prolifération des CF<sup>452-454</sup>. Néanmoins, des études *in vitro* ont montré que l'hypoxie pouvait activer dans les CF un phénotype pro-inflammatoire et fibrogénique entraînant une augmentation de l'expression de cytokines comme TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  ou VEGF<sup>409</sup>, une différenciation en myoFB<sup>455</sup> et une augmentation de la synthèse de collagène<sup>456</sup>.

La réoxygénation, quant à elle, est perçue par les CF comme un état d'hyperoxie<sup>457</sup>, pouvant arrêter la progression du cycle cellulaire, par l'augmentation de la protéine p21<sup>Cip1</sup><sup>458</sup> et conduire à l'expression de  $\alpha$ -SMA et à la différenciation en myoFB<sup>459</sup>. La réoxygénation entraîne également la synthèse de collagène de type I et III, de MMPs et TIMPs<sup>363,460,461</sup>.

Les CM sont particulièrement sensibles à un épisode d'ischémie prolongée et une production importante de ROS. Cependant, les CF semblent beaucoup moins vulnérables. En effet, les CF sont moins sensibles à un stress oxydant à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que les CM<sup>462</sup>. Une autre étude a également montré que les CF sont plus résistants que les CM face à un stress à l'anion superoxyde, activant même leur prolifération et leur production de TGF- $\beta$ <sup>463</sup>..

Ainsi peu de travaux ont été réalisés sur le rôle des CF au cours de l'ischémie-reperfusion. Comme nous l'avons vu précédemment les CF sont capables d'interagir fortement avec les CM, que ce soit de façon directe par couplage électrique et mécanique soit de façon indirecte par des interactions paracrines. De quelles manières ces interactions sont-elles mises en jeu dans un épisode de stress aigu comme l'ischémie-reperfusion ?



# **HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL**

La prise en charge des patients et le traitement de l'infarctus du myocarde se sont nettement améliorés au cours des dernières décennies grâce aux progrès des pratiques médicales, permettant ainsi une réanimation rapide afin de limiter les lésions ischémiques. Cependant, comme nous l'avons vu, la reperfusion entraîne elle aussi des lésions. Des moyens de cardioprotection, qu'ils soient mécaniques ou pharmacologiques, ont donc été développés afin de limiter ces lésions de reperfusion. L'investigation et la compréhension des voies et mécanismes mis en jeu dans la cardioprotection sont essentielles afin de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les cardiofibroblastes possèdent des rôles clés dans le développement et le fonctionnement du myocarde aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques. Leurs implications dans la phase chronique post-infarctus, notamment dans la fibrose et le remodelage, ont été largement étudiées. Cependant, leurs rôles au cours de la phase aiguë d'ischémie-reperfusion restent encore largement méconnus. Des études réalisées ces dernières années suggèrent que les cardiofibroblastes possèdent des rôles bien plus diversifiés que ceux que l'on a pu leur attribuer dans un premier temps. En effet, des travaux ont montré récemment que l'activation post-infarctus de l'inflammation par les cardiofibroblastes était nécessaire à la réparation et à la cicatrisation du myocarde<sup>422</sup>.

Ces études sont venues conforter notre hypothèse de départ, à savoir que ces cellules pourraient avoir un rôle à jouer dans la réponse et la communication cellulaire au cours de la phase aiguë d'ischémie-reperfusion. En effet, nous savons aujourd'hui que les interactions cellulaires et la communication intercellulaire au sein d'un tissu participent fortement à la réponse de celui-ci face à toute agression ou changement physiologique.

Nous avons donc émis l'hypothèse que les cardiofibroblastes et les cardiomyocytes pourraient communiquer au cours de la phase aiguë de l'infarctus, que ce soit par interaction physique directe ou par interaction paracrine, et que cette communication cellulaire pourrait influencer la réponse des cardiomyocytes face aux lésions d'ischémie-reperfusion.

Nous nous sommes donc posés plusieurs questions :

- Existe-t-il une communication intercellulaire entre cardiomyocytes et cardiofibroblastes au cours de l'ischémie-reperfusion ?
- Cette communication a-t-elle lieu de manière directe via leurs interactions physiques ou indirecte via des interactions paracrines ?
- A-t-elle une influence sur la protection des cellules face aux lésions d'ischémie-reperfusion ?
- Si oui, quelles sont les voies impliquées par cette cardioprotection ?

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons envisagé 2 approches : *in vitro* et *in vivo*. Tout d'abord, nous avons travaillé sur un modèle *in vitro* de cardiomyocytes et de cardiofibroblastes isolés de rats nouveaux nés, dans le but d'étudier, dans un environnement contrôlé, leurs interactions au cours de l'hypoxie-réoxygénation. Cette première étude *in vitro* nous a permis de mettre en évidence une protection de type paracrine par les CF. TIMP-1 a été identifié comme un facteur clé de cette protection par les CF. Enfin, nous avons complété notre étude *in vitro* par une étude *in vivo*, dans un modèle plus intégré d'ischémie-reperfusion chez la souris.

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence une communication intercellulaire paracrine des cardiofibroblastes participant à la protection des cardiomyocytes au cours de l'ischémie-reperfusion. Notre étude suggère ainsi de nouvelles cibles de cardioprotection à explorer et soulève l'importance du rôle des cardiofibroblastes au cours de la phase aiguë d'ischémie-reperfusion, notamment via leur action paracrine et la mise en évidence de TIMP-1 comme un facteur clé participant à cette cardioprotection, dont l'exploration des mécanismes ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques.

En parallèle, j'ai pu participer à différents travaux du laboratoire visant à mettre en évidence la régulation du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP). La mitochondrie est une cible majeure de la cardioprotection. En effet, les dysfonctions mitochondriales, induites par l'I/R, se caractérisent par l'ouverture du mPTP entraînant la mort cellulaire. Les investigations sur la régulation de l'ouverture du mPTP représentent donc une cible majeure et sont essentielles à la meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la mort cellulaire au cours de l'I/R.

Ainsi j'ai pu participer, en collaboration, à différentes études visant à étudier la régulation du mPTP, notamment par l'inhibition de la CypD :

- Dans les publications n°2 et 3, nous avons étudié l'inhibition génétique ou pharmacologique de la CypD combinée à l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraînant un effet cardioprotecteur synergique.
- En parallèle, nous avons étudié le rôle de la CypD dans les échanges calciques à l'interface de la mitochondrie et du réticulum. Cette interface consiste en une nouvelle cible de la cardioprotection visant à diminuer la surcharge calcique mitochondriale (Publication n°4).
- Enfin, dans une dernière étude, nous avons étudié la régulation du mPTP par l'inhibition de la CypD, comme une cible, non seulement de la cardioprotection mais également de la protection multi-organes face à l'arrêt cardiaque (Publication n°5).

# **MATERIELS ET METHODES**

Tous les animaux ont été traités en accord avec la réglementation française sur les soins d'utilisation des animaux de laboratoire (décret n°2001-464 du 29 mai 2001 et décret n°2001-486 du 6 juin 2001) et les recommandations de l'INSERM de septembre 2002 relatif à l'expérimentation animale, ainsi qu'en conformité avec « the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals » publié par le « US National Institute of Health » (NIH publication n° 85-23, révisé en 1996). Par ailleurs, tous les protocoles expérimentaux utilisés ont été approuvés par le comité d'éthique de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

## **I. Etude *in vitro***

### **A. Culture cellulaire primaire**

#### **1) Préparation des cardiomyocytes et cardiofibroblastes**

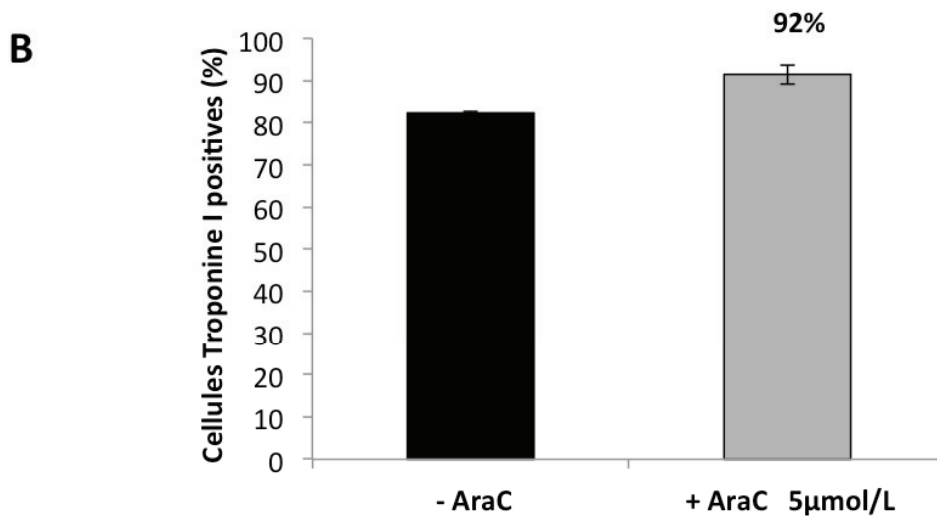
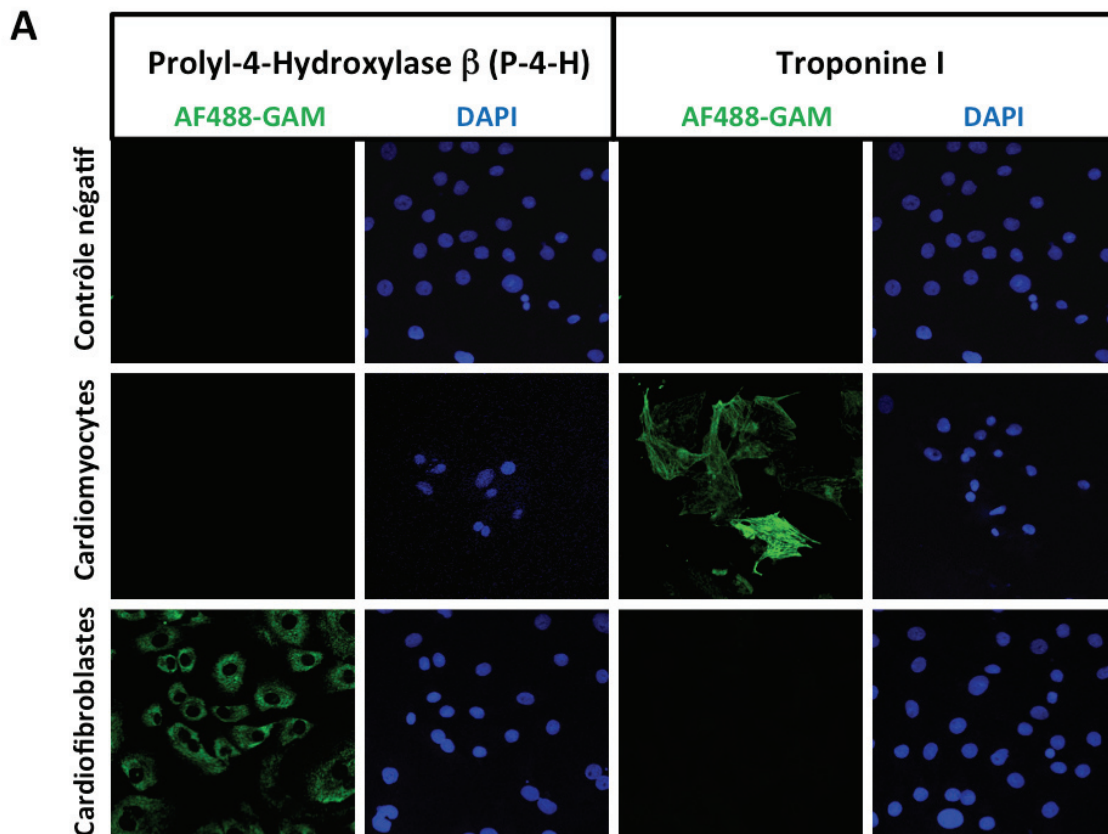
Les rats nouveau-nés (Wistar) de 2 jours sont euthanasiés par décapitation. Le cœur est retiré après section transversale du thorax. Les ventricules sont prélevés en évitant de récupérer les gros vaisseaux et les oreillettes. Après 3 lavages au PBS (Invitrogen®) à 4°C, les prélèvements sont finement réduits en fragments à l'aide de petits ciseaux durant 10 minutes, puis sont à nouveau rincés 3 fois dans du PBS à 4°C. Débute alors la digestion enzymatique, consistant en une séquence de 9 trypsinations de 10 minutes à 37°C, à l'aide d'une solution de trypsine (à 0,3% Invitrogen® diluée dans du PBS). Un broyage des tissus restants est réalisé à l'aide d'un potter en verre-téflon afin de récupérer un maximum de cellules. Après une centrifugation de 10 min à 1600 g, les cellules et le broyat sont resuspendus dans du milieu de culture (DMEM/F12 Invitrogen®, 20% SVF Gold PAA®, 1% Penicilline-Streptomycine Invitrogen®) à 37°C puis, à l'aide de filtres de 70µm (Cell-Strainer BD Bioscience®), les fragments non digérés sont éliminés. Un mélange de cardiomyocytes (CM) et de cardiofibroblastes (CF) est ainsi récupéré.

## 2) Séparation des cardiomyocytes et cardiofibroblastes

Les deux types cellulaires sont séparés en se basant sur le principe selon lequel les CF ont une capacité d'adhésion plus rapide que les CM. Un attachement différentiel est alors réalisé par répartition du filtrat dans deux boîtes de Pétri (diamètre 100 mm) incubées à 37°C pendant 30 min. Après un lavage doux avec du milieu de culture, le surnageant riche en CM est récupéré puis un second attachement de 2 heures est réalisé. Après récupération des surnageants, une centrifugation de 10 minutes à 1600 g est réalisée. Les CM sont alors comptés à l'aide d'une cellule de Malassez puis répartis dans des boîtes de culture à raison de  $2,5 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>. Les expériences sur les CM sont réalisées entre le 4<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour après la mise en culture, moment où les cellules sont parfaitement adhérentes et constituent des tapis cellulaires battants et confluent (environ 80 à 90 % de confluence). La préparation des cultures primaires de CM et CF est renouvelée chaque semaine.

## 3) Validation du modèle

Afin de limiter la contamination résiduelle des cultures de CM par les CF, le milieu des CM est complété avec un anti-mitotique, l'AraC (Cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside, Sigma®) à 5 $\mu$ M. Nous avons vérifié l'enrichissement de notre culture primaire en CM à l'aide d'un immunomarquage par la troponine I analysée par immunofluorescence (Figure 19A) et cytométrie en flux (Figure 19B). Nous avons pu ainsi enrichir nos cultures jusqu'à 92% de CM présents dans les puits (Figure 19B). De la même façon, nous avons vérifié le phénotype de notre culture primaire de CF à l'aide du marqueur prolyl-4-hydroxylase- $\beta$  (P-4-H) exprimé uniquement par les fibroblastes (Figure 19A).



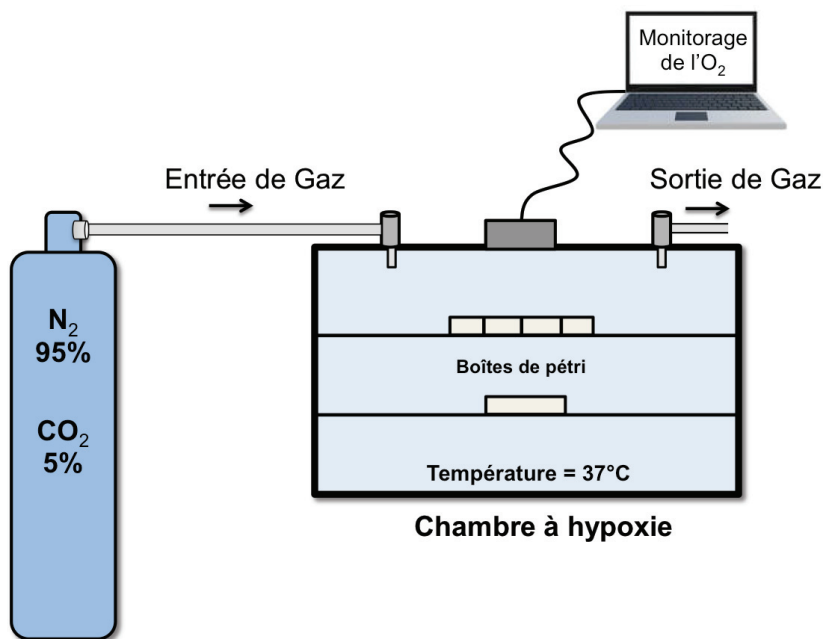
**Figure 19: Validation du modèle de cultures primaires de CM et CF de rat nouveau-né**

**(A)** Marquage par immunofluorescence des CM et des CF par la troponine I et la prolyl-4-hydroxylase- $\beta$  (P-4-H). Les cultures de CM sont marquées positivement à la troponine I et négativement à la P-4-H tandis que les cultures de CF à l'inverse n'expriment pas la troponine I mais expriment de façon positive la P-4-H. **(B)** Immunomarquage de la culture cellulaire par la troponine I et analyse par cytométrie en flux du nombre de cellules positives pour la troponine I. L'ajout de 5 $\mu$ M de Cytosine Arabino-side (AraC) limitant la prolifération des CF dans les puits des CM, permet un enrichissement de la population cellulaire en CM à 92%.



## B. Hypoxie - Réoxygénation

La chambre à hypoxie (Figure 20) est une enceinte hermétique en plexiglas (O<sub>2</sub>Sens®Box, Adelbio®) pouvant être ventilée par un mélange gazeux (95% N<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>, Air Liquid®). L'enceinte, placée dans un incubateur, est maintenue à 37°C. Une sonde à oxygène pouvant être reliée à un ordinateur permet de monitorer le pourcentage d'oxygène au cours de l'hypoxie, à l'aide du logiciel O<sub>2</sub>Sens®Monitor (Adelbio®).



**Figure 20 : Schéma représentatif de la chambre à hypoxie** où sont placées les cellules à 37°C dans un milieu non nutritif en présence de 95% N<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub> durant 3 heures.

Avant de réaliser l'hypoxie, deux lavages avec du Tyrode (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) à 37°C sont effectués pour enlever les nutriments du milieu de culture. Le milieu est donc remplacé par du Tyrode à 37°C au cours de l'hypoxie tandis que le groupe Sham reçoit du milieu complet puis est placé à 37°C dans un incubateur normoxique (Figure 21 a). Au cours de l'hypoxie différents paramètres du milieu de culture peuvent être mesurés, comme la concentration en oxygène grâce à une électrode à oxygène (Lazar Research Laboratories®, modèle DO-166-NP) et/ou le pH avec une micro-électrode à pH (diamètre 6 mm, Fisher Scientific Bioblock®).

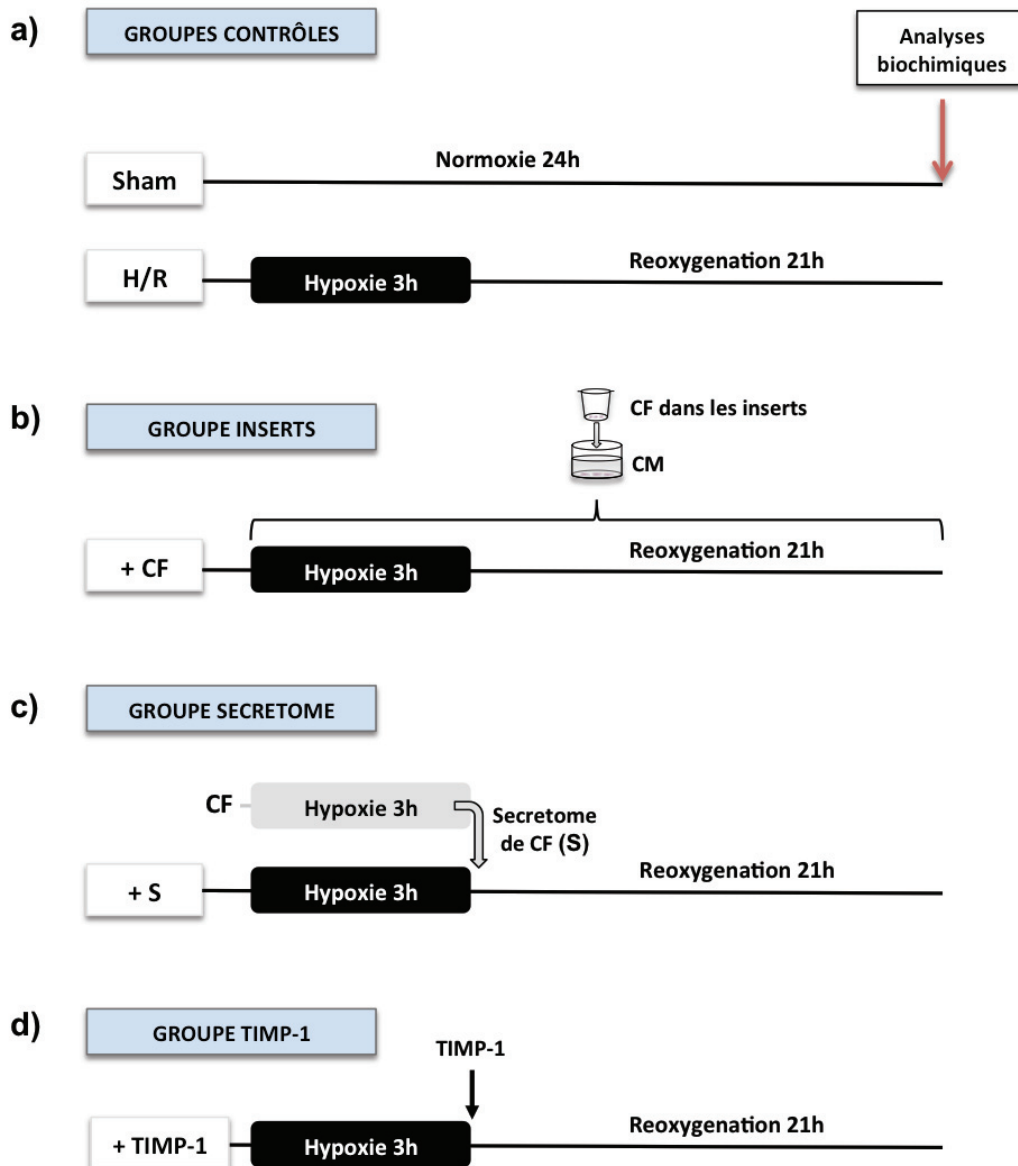
## **1) Préparation des cardiofibroblastes dans les inserts**

Deux jours avant de réaliser l'hypoxie, les CF sontensemencés à raison de  $1,5 \times 10^5$  cellules par  $\text{cm}^2$  dans les inserts (0.3 $\mu\text{m}$ , Falcon, Becton Dickinson), de façon à obtenir environ 80 % de confluence le jour de l'hypoxie. Les cellules sont alors lavées à deux reprises avec du Tyrode à 37°C, puis placées en présence des CM dans du Tyrode, en chambre à hypoxie pendant 3 heures, suivie d'une reoxygénation dans un milieu complet dépourvu de sérum pendant 21 heures. Des expériences ont été conduites avec les inserts placés au contact des CM à différents temps de la séquence d'hypoxie-réoxygénation. (Figure 21 b)

## **2) Préparation du sécrétome de cardiofibroblastes**

Trois jours avant de réaliser l'hypoxie, les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri (diamètre 100 mm) à raison de  $1 \times 10^4$  cellules/ $\text{cm}^2$ , pour la préparation du sécrétome (S) de CF, de façon à obtenir environ 80% de confluence le jour de l'hypoxie. Les cellules sont alors lavées deux fois avec du Tyrode à 37°C puis placées, en présence de Tyrode, en chambre à hypoxie pendant 3 heures à 37°C. A la fin de l'hypoxie, le S est prélevé et centrifugé 5 minutes à 1600 g puis filtré à 0,2 $\mu\text{m}$ , avant d'être ajouté dans le milieu des CM. (Figure 21 c)

## PROTOCOLE *IN VITRO* D'H/R



**Figure 21 : Protocoles expérimentaux d'hypoxie-réoxygénation (H/R) *in vitro*** utilisés à partir du modèle de CM et CF isolés de rats nouveaux nés. En parallèle d'un groupe Sham (CM placés en normoxie pendant 24h), les CM subissent une séquence d'hypoxie (3h) - réoxygénation (21h) dans différentes conditions : **a)** sans traitement (groupe H/R), **b)** en présence de CF dans des inserts tout au long de la séquence d'H/R (groupe + CF), **c)** avec ajout du sécrétome de CF à la réoxygénation, préalablement obtenu par 3h d'hypoxie sur CF seuls (groupe + S), **d)** avec ajout, à la réoxygénation, de 0,5nM de TIMP-1 (groupe TIMP-1). A l'issue de la séquence d'H/R des analyses biochimiques sont réalisées.

## C. Analyses Biochimiques

### 1) Viabilité et mortalité cellulaire après hypoxie-réoxygénation

#### *Evaluation de la viabilité des cardiomyocytes*

La viabilité cellulaire est évaluée à l'aide du test MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide, Sigma®) en se basant sur l'activité d'une enzyme mitochondriale : la succinate déshydrogénase (E.C. 1.3.99.1). En effet l'intégrité de l'activité de cette enzyme représente un marqueur de viabilité cellulaire. A l'issue de l'hypoxie réoxygénation, le milieu est retiré et une solution de 1,2 mM de MTT, dilué dans du PBS 1X, est ajoutée dans les puits de cardiomyocytes, pendant 1H30 à 37°C, dans l'obscurité. Les sels de tétrazolium de couleur jaune du substrat sont transformés par la succinate déshydrogénase en cristaux de formazan bleu violacés à l'intérieur des cellules. Ces cristaux sont solubilisés, après avoir ôté la solution de MTT, avec le DMSO (Diméthylsulfoxyde Sigma®) pendant 30 minutes sous agitation, dans l'obscurité. L'intensité de la coloration, détectable par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 550 nm, est ainsi mesurée. Cette intensité de coloration est proportionnelle à la viabilité cellulaire.

#### *Evaluation de la mortalité des cardiomyocytes*

##### *- Dosage de la troponine I*

Le relargage de Troponine I dans le milieu extracellulaire représente un marqueur spécifique de la mort cellulaire des cardiomyocytes. L'évaluation du taux de troponine I dans le milieu extracellulaire est réalisée par dosage immunologique. Le surnageant est prélevé après la séquence d'H/R puis congelé à - 80°C. Le dosage est réalisé ultérieurement au Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Cardiologique de Lyon, selon le protocole ARCHITECT STAT Troponin-I Abbott®. La quantification de la Troponine I est réalisée selon le principe

suivant : l'échantillon est placé au contact de microparticules paramagnétiques combinées à des anticorps spécifiques anti-troponine I. Puis, après plusieurs lavages, un second anticorps couplé à l'acridinium est ajouté. Ainsi la chimioluminescence de la réaction est mesurée en unités relatives de luminescence, celle-ci étant directement proportionnelle à la quantité de Troponine I présente dans l'échantillon.

### *- Cytométrie en flux*

La mort cellulaire a été également évaluée par cytométrie en flux par marquage des cellules à l'annexine V et à l'iodure de propidium (IP) à l'aide du kit Alexa Fluor®488annexinV/Dead cell Apoptosis Kit and PI for Flow Cytometry (Invitrogen). A l'issue de l'hypoxie, les cellules ont été détachées à l'aide de 400µL d'accutase (PAA) par puits pendant 10 min à 37°C, puis centrifugées 5 min à 800g dans des tubes dédiés à la cytométrie. Le culot cellulaire est resuspendu dans 95µL de Tampon Annexin V 1X puis 5µL AlexaFluor®488 annexin V sont ajoutés. Les cellules sont incubées avec ce mélange durant 30 min à 37°C.

Après un lavage au PBS, les cellules sont centrifugées 5 min à 800g puis resuspendues dans un 1 mL de PBS. L'IP (1 µg/mL) est ajouté directement dans les tubes, 5 minutes avant le passage au cytomètre. La lecture de l'intensité de fluorescence de l'annexine V et de l'IP s'effectue dans les canaux de fluorescence FL1-H et FL3-H respectivement. Un nombre de 10 000 cellules par condition a été analysé pour chaque expérience. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules marquées, reflétant la mort cellulaire dans chaque groupe. A chaque expérimentation, les mesures sont réalisées en triplicat.

## **2) Expression des cytokines**

Les cytokines présentes dans le sécrétome de CF ont été détectées grâce à une puce à cytokines (Rat Cytokine Array Panel A, ARY008, R&D Systems®). Il s'agit d'une membrane de nitrocellulose sur laquelle des anticorps spécifiques, dirigés contre différentes cytokines de rats, ont été immobilisés. Avant de former un complexe avec leurs anticorps spécifiques, les cytokines présentes dans le milieu à tester vont être préalablement couplées à la biotine, celle-ci ayant une très forte affinité pour la streptavidine. La streptavidine couplée à la HRP

(Horse Raddish Peroxidase) va donner lieu à une réaction enzymatique en présence de luminol dont le produit final est détectable par chimioluminescence. La quantification est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ en déterminant le nombre de pixel, celui-ci étant proportionnel à la quantité de cytokines présentes dans le surnageant.

### **3) Analyses des protéines**

#### ***Extraction des protéines***

Après stimulation, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS froid. Après ajout du tampon de lyse RIPA complet (composé de 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% Sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 50mM Tris pH 8,0, DTT 1mM, EDTA 5mM, Cocktail inhibiteur protéases sigma 1000X, cocktail inhibiteur phosphatases Phosphostop Roche 20X), les cellules sont grattées sur glace, récupérées dans un tube eppendorff et laissées dans la glace pendant 10 minutes en vortexant régulièrement. La méthode de dosage est basée sur le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique (BCA) peut ensuite former des complexes avec les ions  $\text{Cu}^{2+}$  ainsi réduits (Interchim®, BC Assay Protein Quantitation Kit), permettant un dosage protéique sur une gamme allant de 0 à 2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . La densité optique a été lue à 562 nm.

#### ***Western Blot***

Les extraits protéiques totaux sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Pour chaque échantillon, 25  $\mu\text{g}$  de protéines sont chargés dans les puits. Les échantillons sont déposés dans un gel d'acrylamide 12% et la migration des protéines est induite avec le tampon de migration : 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3, à température ambiante par une tension de 110 V pendant 2h. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidène difluoride) à l'aide d'un transfert semi-sec par une tension de 25V pendant 10 minutes (Trans-Blot®, Turbo™, Biorad). La membrane est ensuite saturée pendant une heure à température ambiante dans le tampon TBS-T (Tris Buffered Saline-Tween, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150

mM NaCl, 0,05% Tween 20) contenant 5% de BSA (Euromedex®), puis incubée pendant une nuit à 4°C sous agitation dans une solution de TBS-T contenant 1% de BSA et l'anticorps primaire à la concentration optimale d'utilisation (Tableau 2). Le lendemain trois lavages de 10 minutes au TBS-T sont réalisés, puis la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire spécifique couplé à la HRP (Horseradish Peroxidase) à la concentration optimale d'utilisation (Tableau 2). Après trois lavages de 10 minutes au TBS-T, les protéines d'intérêt sont finalement révélées par chimioluminescence à l'aide du kit ECL plus (GE Healthcare®) et d'une caméra à détection chimioluminescente (ChemiDoc™XRS-System, Biorad®). Après révélation, les anticorps peuvent être découplés de la membrane par incubation pendant 20 minutes dans une solution de Re-Blot Strong plus (Millipore®) suivi de 5 lavages de 5 minutes dans le TBS-T. Ainsi, la membrane peut être de nouveau saturée puis réhybridée avec un autre anticorps selon le protocole décrit. La quantité de chaque protéine est enfin déterminée à l'aide du logiciel ImageLab® (Biorad) en évaluant le nombre de pixel.

### *Immunoprécipitation*

Dans un premier temps, les billes magnétiques sont lavées 3 fois au tampon de lyse complet et les anticorps sont couplés aux billes à l'aide d'un cross-linker, le BS<sup>3</sup> (Bis[sulfosuccinimidyl] suberate) à 5mM pendant 2H à 4°C sous agitation, dans un tampon de conjugaison (100mM sodium phosphate, 0,15M NaCl, 20mM HEPES, 100mM Bicarbonate, pH 8). A l'issu de ce traitement, un quenching de 15 min à température ambiante est réalisé en ajoutant 50mM de quenching buffer (1M Tris-HCl, pH 7,5). Au préalable, une étape de « pre-clear » des extraits protéiques est réalisée avec des IgG fixées aux billes, provenant du même hôte que les anticorps utilisés par la suite, durant une nuit à 4°C sous agitation. Cette étape permet de limiter l'immunoprécipitation de protéines non-spécifiques dans les étapes suivantes. A l'issu du « pre-clear », les extraits protéiques (1mg) sont incubés ou non avec la protéine recombinante TIMP-1 (500ng/mL) pendant 4h à 4°C. Puis les échantillons (500µg) sont incubés avec les anticorps primaires spécifiques préalablement liés aux billes ou leurs IgG contrôles correspondantes pendant une nuit à 4°C. Après l'immunoprécipitation, les billes magnétiques sont lavées 4 fois avec du tampon de lyse complet. Enfin, les protéines

immunoprécipitées sont éluées des billes et dénaturées avec 30µL de laemmli 2X et chauffées à 95°C pendant 5min puis analysées par SDS-PAGE comme décrit précédemment.

## ***Immunocytochimie***

### *- Microscopie électronique*

Les cellules sontensemencées 48h avant de réaliser l'immunofluorescence à raison de  $1,25 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> dans des labtecks (Millipore). Après trois lavages au PBS, les cellules sont fixées par incubation pendant 10 minutes avec du paraformaldéhyde (4 % dilué dans du PBS). Après trois nouveaux lavages de 5 minutes dans le PBS, les sites non spécifiques sont saturés par incubation pendant 45 minutes à 37°C avec une solution de saturation (20% Blocking solution, Roche, 20% SVF PAA, dilués dans du PBS). Les cellules sont ensuite incubées pendant 2h à 37°C avec l'anticorps primaire d'intérêt dilué dans la solution de saturation préalablement diluée au 1/10. Après trois lavages de 5 minutes dans le PBS, les cellules sont ensuite incubées pendant 2h à 37°C avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore. Après trois lavages au PBS, les cellules sont marquées au DAPI (2µg/mL) puis la lame est montée à l'aide du milieu de montage (Prolong Gold Antifade, Invitrogen). La fluorescence émise est ensuite analysée au microscope confocal TCS-SP2.

### *- Cytométrie en flux*

Les cellules sontensemencées 48h avant de réaliser l'immunomarquage à raison de  $2,5 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> dans des plaques 24 puits. Le jour de l'expérimentation, les cellules sont détachées à l'aide de 400µL d'acutase (PAA) par puits pendant 10 min à 37°C, puis centrifugées 5 min à 800g dans des tubes dédiés à la cytométrie. Après un lavage au PBS, les cellules sont fixées par incubation pendant 10 minutes dans du paraformaldéhyde (4 %). Après un nouveau lavage au PBS, les sites non spécifiques sont saturés par incubation pendant 45 minutes à 37°C avec une solution de saturation (20% Blocking solution, Roche, 20% SVF PAA, dilués dans du PBS). Les cellules sont ensuite incubées pendant 2h à 37°C avec l'anticorps primaire d'intérêt, dilué dans 500 µL de solution de saturation préalablement diluée au 1/10. Après un lavage de 5 minutes dans le PBS, les cellules sont incubées pendant 2h à 37°C avec l'anticorps secondaire couplé au fluorophore AlexaFluor-488. Un dernier



lavage est ensuite réalisé avant d'analyser la fluorescence. La lecture de l'intensité de fluorescence s'effectue dans le canal de fluorescence FL1-H. Un nombre de 10 000 cellules par condition est analysé en triplicat pour chaque expérience.

### *Réactifs utilisés*

<b>Anticorps</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Source</b>	<b>Dilution</b>
Anti-Akt	Cell Signaling Ref 4691S	Rabbit monoclonal IgG	1:1000
Anti-phospho Akt (Ser473)	Cell Signaling Ref 4691S	Rabbit monoclonal IgG	1:500
Anti ERK1/2	R&D Systems Ref MAB1576	Mouse monoclonal IgG	1:2000
Anti phosphoERK1/2 (Thr202/Tyr204)	R&D Systems Ref MAB1018	Rabbit monoclonal IgG	1:1000
Anti- $\alpha$ -tubuline	Santa Cruz Ref sc-5286	Mouse monoclonal IgG	1:2000
Anti-CD63	Abcam Ref ab108950	Mouse monoclonal IgG	1:1000
Anti-CD29 (Intégrine $\beta$ 1)	BD Biosciences Ref 6104668	Mouse monoclonal IgG	1:200
Anti-TIMP-1 (R-18)	Santa Cruz Ref sc-6824	Goat polyclonal IgG	1:200
Anti-prolyl-4-hydroxylase	Acris Antibodies Ref AF5110-1	Mouse monoclonal IgG	1:200
Anti-cardiaque troponine I	Abcam Ref ab19615	Mouse monoclonal IgG	1:200

**Tableau 2 : Anticorps utilisés**

<b>Inhibiteurs</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Concentration utilisée</b>
LY2940002	Sigma Aldrich Ref L9908-1MG	400nM
PD98059	Sigma Aldrich Ref P215-5MG	1 $\mu$ M
Cytosine 1- $\beta$ -D arabinofuranoside (AraC)	Fluka Analytical Ref 30399	5 $\mu$ M
Batimastat	Calbiochem Ref 196440	50 à 500nM

**Tableau 3 : Inhibiteurs pharmacologiques utilisés**

<b>Protéines Recombinantes</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Concentration utilisée</b>
Rat TIMP-1	R&D Systems Ref 580-RT	0,05nM à 2nM
Mouse TIMP-1	R&D Systems Ref 980-MT	1 $\mu$ g.kg <sup>-1</sup>
Rat CXCL-7	R&D Systems Ref 1116-CK	0,1 à 2 $\mu$ M

**Tableau 4 : Protéines recombinantes utilisées**

## II. Etude *in vivo*

### A. Ischémie-reperfusion cardiaque chez la souris

Les souris C57BL/6J (8-12sem) adultes sont anesthésiées par une double injection intrapéritonéale de buprénorphine ( $0,075\text{mg.kg}^{-1}$ ) et de pentobarbital sodique ( $75\text{mg.kg}^{-1}$ ) puis intubées et ventilées mécaniquement à l'aide d'un respirateur adapté (minivent Typ845, Harvard Apparatus®, Holliston MA). Une pression positive est mise en place (PEEP) après l'ouverture de la cage thoracique. Une thoracotomie gauche est ensuite réalisée au niveau du 4<sup>ème</sup> espace intercostal. Après ouverture du sac péricardique, un fil de suture (8/0 polypropylène, Ethicon®), avec une aiguille courbe, est placé autour de l'artère interventriculaire antérieure gauche afin de permettre la réalisation d'une séquence d'I/R coronaire. La température corporelle des animaux est monitorée via un thermomètre rectal et maintenue à 37-38°C à l'aide d'une couverture chauffante. L'électrocardiogramme (ECG) est enregistré tout au long de l'expérimentation. Une phase de stabilisation de 15 minutes est respectée avant l'enregistrement des paramètres de référence.

Toutes les souris sont soumises à une occlusion coronaire de 60 minutes, suivie d'une reperfusion de 24 heures pour la détermination de la zone infarctée. L'ischémie est confirmée visuellement par une cyanose régionale de la surface du myocarde et par une élévation du segment ST de l'électrocardiogramme. Les animaux ont été répartis aléatoirement dans les différents groupes expérimentaux.

Une fois la séquence d'I/R réalisée, le fil de suture 8/0 est laissé en place. Puis le thorax est hermétiquement refermé avec du fil de suture 5/0 cardioxyl (Peter's surgical®). Les souris sont extubées après vérification d'une activité respiratoire autonome et placées dans une couveuse chauffée jusqu'à leur réveil complet. Le comportement des souris est surveillé pour contrôler leur niveau de douleur et administrer ainsi, au besoin, une dose supplémentaire de buprénorphine.

## B. Protocoles expérimentaux

### 1) Injection de sécrétome de cardiofibroblastes

Après avoir été fraîchement préparé le jour de l'ischémie-reperfusion, le sécrétome (S) de CF est concentré 10 fois à l'aide d'unités de filtration (Millipore Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices with a 3kDa cut off, Millipore®) dont la membrane permet de conserver les molécules d'un poids moléculaire supérieur à 3kDa. Ainsi, le S concentré obtenu est injecté, 5 min avant la reperfusion chez la souris, à raison de  $5\text{mL.kg}^{-1}$  en i.v. Le groupe contrôle a reçu  $5\text{mL.kg}^{-1}$  de Tyrode en i.v. (Figure 21).

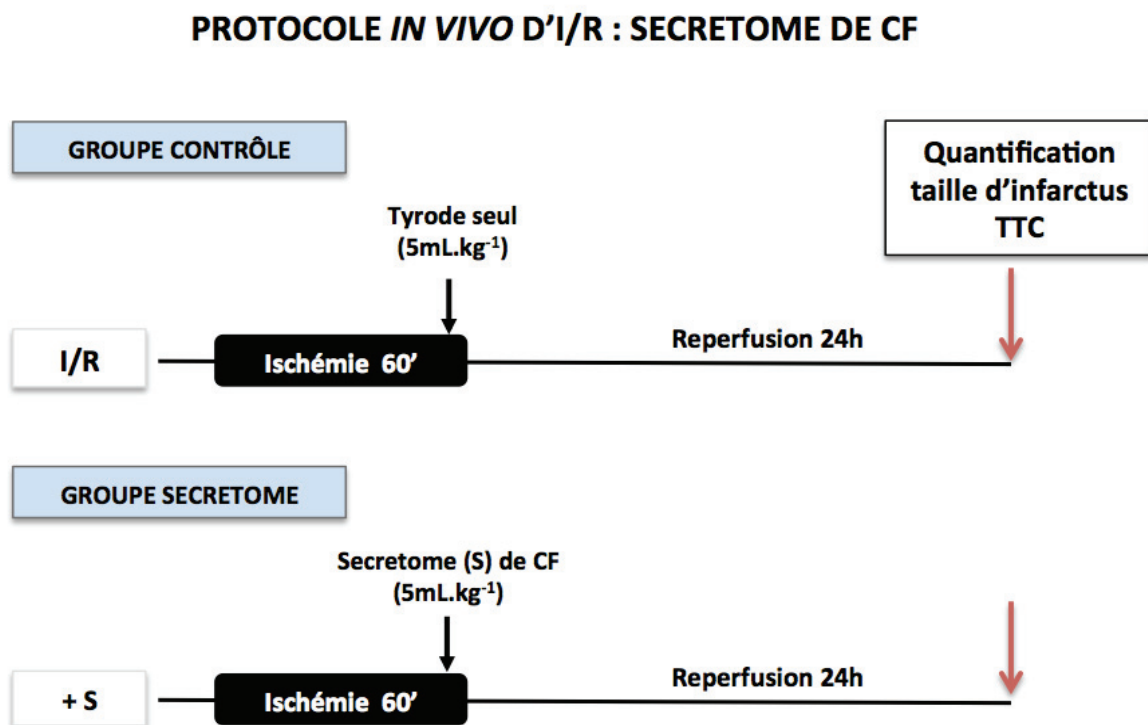
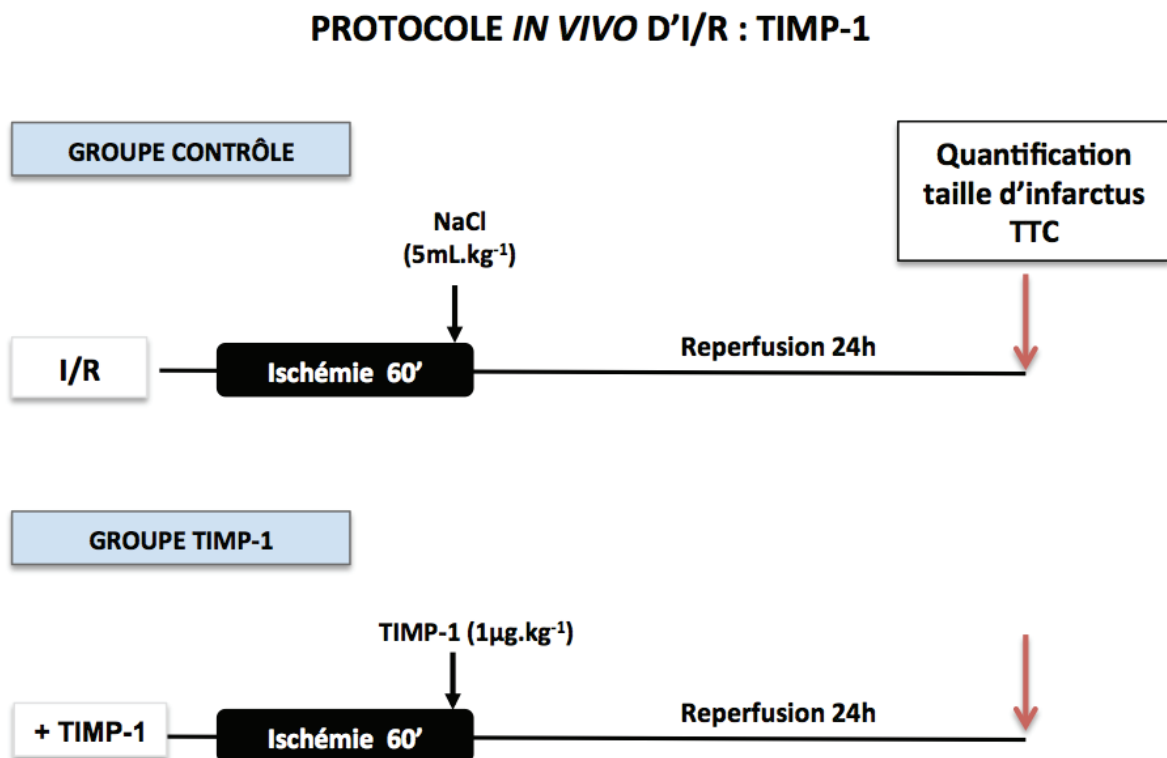


Figure 22 : Protocoles expérimentaux d'ischémie-reperfusion (I/R) *in vivo* chez la souris.

5 minutes avant la reperfusion, les groupes contrôle (I/R) et traité au sécrétome (+S) reçoivent respectivement en i.v. du tyrode seul et du sécrétome de CF. A l'issue de l'I/R, la taille de l'infarctus a été évaluée par TTC.

## 2) Injection de TIMP-1

La protéine recombinante TIMP-1 de souris (R&D Systems, 980-MT-010) a été reprise dans une solution de conservation (50 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, and 0.05% Brij-35, pH 7.5) puis diluée à la dose de 1µg.kg<sup>-1</sup> dans du NaCl et injectée 5 min avant la reperfusion (i.v.). Le groupe contrôle a reçu 5mL.kg<sup>-1</sup> (i.v.) de NaCl 9 ‰ (Figure 22).



**Figure 23 : Protocoles expérimentaux d'ischémie-reperfusion (I/R) *in vivo* chez la souris.**

5 minutes avant la reperfusion, les groupes contrôle (I/R) et traité avec TIMP-1 (+TIMP-1) reçoivent respectivement, une injection en i.v. de NaCl et TIMP-1 (1µg.kg<sup>-1</sup>). A l'issue l'I/R la taille de l'infarctus a été évaluée par TTC.

## C. Quantification de l'infarctus

A l'issu des 24 heures de reperfusion, les souris sont de nouveau anesthésiées et opérées. L'artère coronaire est brièvement ré-occluse grâce au fil laissé en place. 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> d'une solution de colorant bleu Unipperse (Ciba-Geigy®, Hawthorne, NY) à 10 % sont injectés au niveau de la veine cave afin de délimiter l'aire à risque (AR). La zone du myocarde non ischémique apparaît alors en bleu tandis que la partie du myocarde précédemment ischémisée reste rouge. Le cœur est ensuite excisé. Le ventricule droit, les oreillettes et l'aorte sont retirés. Le ventricule gauche (LV) est coupé, parallèlement au sillon auriculo-ventriculaire, en 5 tranches transverses qui sont pesées et photographiées pour la mesure de l'AR. Chaque tranche est ensuite incubée pendant 20 minutes à 37°C dans une solution de chlorure de triphényltétrazolium (TTC) à 1 %. Le myocarde « viable » apparaît alors coloré en rouge brique tandis que la zone nécrosée (AN) apparaît jaune pâle. Les tranches de myocarde sont une nouvelle fois photographiées, pour la quantification de la taille de l'infarctus. L'AR et l'AN sont quantifiées par planimétrie à l'aide des logiciels Adobe Photoshop® et ImageJ (v1.44, NIH, Bethesda, MD). Les zones totales de l'AR et de l'AN sont rapportées au poids du LV et exprimées en grammes. Les rapports AN/AR, AN/LV et AR/LV sont calculés. Le critère d'inclusion est défini par une AR supérieure à 10 % du volume ventriculaire gauche.

### III. Statistiques

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes  $\pm$  SEM (écart à la moyenne). Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism®. Une ANOVA à une voie suivie d'un test post hoc de Bonferroni a été utilisée pour analyser les différences entre les groupes. Un test t de Student a été réalisé pour la comparaison de deux groupes.

Les différences entre les groupes expérimentaux concernant la relation entre la taille de l'infarctus et l'AR ont été évaluées par une analyse de covariance (ANCOVA), avec la taille de l'infarctus comme variable dépendante et l'AR comme covariant.  $p < 0.05$  a été considérée comme statistiquement significative.

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **PARTIE I : Rôle des cardiofibroblastes dans la protection des cardiomyocytes au cours de l'ischémie-reperfusion**

Dans cette première partie nous traiterons le principal sujet de ma thèse : le rôle des CF au cours de l'I/R et notamment dans la protection des cardiomyocytes. Cette première partie sera divisée en deux parties, dans un premier chapitre seront présentés les travaux faisant l'objet d'un article en révision à *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Et dans un deuxième chapitre seront présentés les travaux complémentaires qui furent liés à cet article et qui n'ont pu être inclus, par volonté de clarté et de simplification du message de l'article.



## A. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, la participation et le rôle des CF dans le développement et la fonction cardiaque ont été mis en avant au cours des dernières années. Dans la pathologie de l'infarctus du myocarde, ils sont nécessaires à la réparation et la cicatrisation du myocarde infarci, mais sont également impliqués dans les phénomènes de remodelage et fibrose excessifs.

Cependant, peu de travaux ont cherché à élucider quels étaient leurs rôles au cours de la phase aigüe d'ischémie-reperfusion. Une communication intercellulaire entre cardiomyocytes et cardiofibroblastes est-elle mise en place afin de préserver les cellules face à un stress hypoxique ?

Au cours de ce travail nous avons donc cherché à répondre à différentes questions :

- les CF ont-ils une action sur la réponse des CM face à l'H/R ?
- si oui, de quelle façon a lieu la communication cellulaire, par contact direct ou via des facteurs paracrines ?
- si oui, les CF peuvent-ils limiter les lésions d'I/R *in vivo* ?

Pour ce faire, nous avons tout d'abord utilisé un modèle simplifié d'interaction cellulaire à l'aide de CM et CF isolés à partir de cœur de rats nouveau-nés soumis à des séquences d'hypoxie-réoxygénation. Par la suite nous avons utilisé un modèle plus intégré d'ischémie-reperfusion myocardique chez la souris.

Dans ce travail nous avons montré que les CF protègent les CM des lésions d'H/R par la sécrétion de facteurs paracrines. Ces facteurs diminuent les lésions d'I/R *in vivo* dans un modèle d'I/R chez la souris. Parmi ces facteurs nous avons pu mettre en évidence TIMP-1 et montré que ce facteur, à lui seul, peut également diminuer les lésions des CM face à une séquence d'H/R en activant en partie la voie RISK de cardioprotection. De la même façon nous avons montré que TIMP-1 diminue la taille d'infarctus *in vivo* chez la souris.

## **B. Publication n°1**

### **CARDIAC FIBROBLASTS PROTECT CARDIOMYOCYTES FROM LETHAL ISCHEMIA REPERFUSION INJURY**

**M. Abrial**, C. Crola Da Silva, L. Augeul, B. Pillot, F. Ivanes, G. Teixeira, R. Cartier, D.

Angoulvant, M. Ovize<sup>\*</sup>, R. Ferrera<sup>\*</sup>

**En revision à Journal of Molecular and Cellular Cardiology**

# CARDIAC FIBROBLASTS PROTECT CARDIOMYOCYTES AGAINST LETHAL ISCHEMIA REPERFUSION INJURY

M. Abrial<sup>1</sup>, C. Crola Da Silva<sup>1</sup>, L. Augeul<sup>1</sup>, B. Pillot<sup>1</sup>, F. Ivanes<sup>1,2</sup>, G. Teixeira<sup>1</sup>, R. Cartier<sup>2</sup>, D. Angoulvant<sup>3</sup>, M. Ovize<sup>1,2,\*</sup>, R. Ferrera<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Inserm U1060, CarMeN Laboratory, Université Lyon 1, F-69373, Lyon, France;

<sup>2</sup>Hospices Civils de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Service d'Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires & CIC de Lyon, F-69394, Lyon, France

<sup>3</sup>Université François Rabelais EA 4245, CHRU Tours, Hôpital Trousseau, Service de Cardiologie, F-37044, Tours, France

\* Co-last author

## Corresponding author:

Maryline Abrial

INSERM U1060 CarMeN

Laboratoire de Physiologie

Faculté de médecine Lyon-Nord

8, avenue Rockefeller

69373 LYON Cedex 08

FRANCE

Phone: (+33) 4 78 77 72 04

Fax: (+33) 4 78 77 71 75

E-mail: maryline.abrial@univ-lyon1.fr

**Count word: 6380**

**ABSTRACT:**

Roles of cardiac fibroblasts (CF) in the regulation of myocardial structure and function have been emphasized in the last decade. Their implications in pathophysiological aspects of chronic heart diseases such as myocardial remodelling and fibrosis is now well established; however their contribution to the acute phase of ischemia reperfusion injury still remains elusive. We hypothesized that CF may contribute to cardiomyocytes (CM) protection against ischemia reperfusion injuries. The present study was designed to investigate this protection and identify some of its mechanisms.

Experiments performed both on isolated neonatal rat CF and CM and *in vivo* mice model of myocardial infarction demonstrated that the presence of CF increases CM viability in co-cultures ( $58\pm 2\%$  versus  $30\pm 2\%$  in control) and that CF protect CM against hypoxia reoxygenation injury in a paracrine manner. It was confirmed by a similar effect of hypoxic CF secretome alone on CM viability ( $51\pm 9\%$  versus  $31\pm 4\%$  in untreated cells). These findings were corroborated by *in vivo* experiments in which a 25% infarct size reduction was observed in CF secretome treated compared to control mice. Furthermore, injection of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) alone, abundantly detected in CF secretome, was able to both decrease CM cell death (35%) and infarct size (37%). Experiments with pharmacological inhibitors of PI3K/Akt and ERK1/2 pathways provided more evidence that this paracrine protection is partly mediated by PI3K/Akt and ERK signalling pathways.

Our data demonstrated for the first time that CF participate in cardioprotection during the acute phase of ischemia reperfusion via a paracrine pathway involving TIMP-1.

**Key words:** growth factors, cytokines, ischemia reperfusion injury, hypoxia, fibroblasts, cardiomyocytes

## ABBREVIATIONS

AN: Area of Necrosis

AR: Area at Risk

CF: Cardiac fibroblasts

CM: Cardiomyocytes

H: Hypoxia

H/R: Hypoxia Reoxygenation

I/R: Ischemia Reperfusion

MMPs: Metalloproteinases

R: Reoxygenation

S: CF secretome

TIMPs: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases

## 1. Introduction

Cardiac fibroblasts (CF) are well-recognized as active participants both in cardiac development and function [1,2]. Their primary role is to produce extracellular matrix proteins including interstitial collagens, proteoglycans, glycoproteins, matrikines and metalloproteinases (MMPs) [3]. By secreting soluble factors, they are implicated in intercellular cross-talks that contribute to regulate cardiomyocytes phenotype in response to various environmental changes [4]. For example, TGF $\beta$  [5], IL-6 [6] or angiotensin II produced by CF can induce cardiomyocytes hypertrophy. Several studies have shown their involvement in various cardiac pathological processes including adaptive response to ventricular pressure overload, inflammation or hypertrophy where they are involved in tissue remodelling and fibrosis [7].

It has been suggested that CF may also play a role in myocardial ischemia-reperfusion injury. Paracrine factors like FGF-1 or FGF-2 and more recently IL-33 produced by CF have been reported to be cardioprotective after myocardial ischemia reperfusion [8,9]. Among the factors secreted by cardiac fibroblasts, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) are endogenous proteases inhibitors. TIMP-1 is the most characterized TIMP isoform and recently a novel function of TIMP-1 distinct from MMPs-dependent mechanisms was described. A direct biological activity able to exhibit anti-apoptotic characteristics in non-cardiac cell types such as breast epithelial cell line has been reported [10-12]. Reports suggest that the imbalance between MMPs and TIMPs play a role in myocardial infarction and adverse remodelling [13-16].

However, the actual function of CF during acute myocardial ischemia-reperfusion remains unclear. Using both *in vitro* and *in vivo* experimental preparations, we present evidence that TIMP-1 secreted by cardiac fibroblasts can protect cardiomyocytes from lethal reperfusion injury, likely through the activation of the ERK<sub>1/2</sub> and the PI3 kinase-Akt signalling pathways.

## 2. Methods

All the experiments were performed in accordance with the recommendations of the European Ethical Committee (EEC) (2010/63/EU), the French National Ethical Committee (87/848), and the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) for the care and use of laboratory animals. Protocols were approved by the Lyon University animal care committee under the reference BH2012-64 and BH2012-65.

### ***2.1 Isolation and enrichment of neonatal rat cardiomyocytes and cardiac fibroblasts***

Primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes (CM) were prepared from 2 days-old rat hearts (Wistar, Charles River, France) as described previously [17]. Briefly, ventricles were washed and minced in cold PBS (Phosphate Buffer Saline) solution. A series of digestion by 0.3% trypsin (Trypsin 2.5% 10X, Life Technologies) was performed at 37°C in a spinner bottle under a stirring platform. Supernatant from all cycles of trypsinization was centrifuged and cell pellets were resuspended in complete medium composed by DMEM F-12 (Life Technologies), 20 % Gold Fetal Bovine Serum (PAA) and 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technologies). Cells were then plated at 37°C in humidified air with 5% CO<sub>2</sub>.

Cardiac fibroblasts (CF) were separated from CM by differential plating. CM were seeded at a concentration of  $2.5 \times 10^3$  cells/mm<sup>2</sup> in presence of a non-proliferative drug AraC (Cytosine-1-β-D-arabinofuranoside, Sigma-Aldrich) 5μM to enrich CM population. Culture media of CM and CF were changed every 2 days. CF primary cultures were prepared each week to avoid *in vitro* differentiation into myofibroblasts.



## ***2.2 Hypoxia Reoxygenation (H/R)***

H/R experiments were completed 4 days after cells isolation. The hypoxia insult combined a substrate and oxygen deprivation in Tyrode buffer (in mM: NaCl 130, KCl 5, HEPES 10, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1, pH 7.4) by 3 hours exposure to N<sub>2</sub> 95% and CO<sub>2</sub> 5% at 37°C into a specifically manufactured bio-incubator (Verretech Laboratories, France) as previously validated [17]. Oxygen concentration, pH, and temperature were continuously recorded. “Reoxygenation” included exposure to nutrient-rich and serum-deprived fresh DMEM F-12 together with placement into a normoxic humidified incubator with CO<sub>2</sub> 5% for 21 hours.

## ***2.3 Transwells experiments***

We set up an original model to investigate paracrine interaction between CM and CF. The first objective was to determine whether a crosstalk between the two cell types would play a role in the tolerance of CM to H/R. To do so, we first performed H/R on a co-culture of CM and CF separated by cell culture transwells (Transwell, 0.3µm pore size, Falcon, Becton Dickinson). The transwell is a semi permeable membrane separating both cell types to only allow paracrine interaction. CF were seeded at  $1.5 \times 10^3$  cells/mm<sup>2</sup> in cell culture transwells 24 hours before applying the H/R protocol. CF were positioned above CM culture dishes thereby allowing a paracrine interaction with CM during all the sequence of H/R (Fig 1A).

## ***2.4 Cardiac fibroblasts secretome experiments***

A second objective was to assess whether this crosstalk might be mediated by factors secreted by CF during H/R. We then separated the two cell types and collected the fluids secreted by CF alone when exposed to 3 hours of hypoxia (named CF secretome: S).

For each experiment, CF secretome (S) was freshly prepared from 80% confluence CF submitted to 3 hours of hypoxia by deprivation from serum, nutrients and oxygen in Tyrode buffer. After filtration (0,2µm), the collected CF secretome was diluted into fresh deprived-serum DMEM F-12 (1:1 volume) and added at the beginning of reoxygenation into CM dishes. In control H/R experiments, Tyrode buffer was diluted into fresh DMEM F-12 (1:1 volume) (Fig1A). For *in vivo* experiments, CF secretome was prepared as previously described before being concentrated 10 times with Millipore Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices with a 3kDa cut off. It was then injected in the *in vivo* in mice model of myocardial ischemia reperfusion (Fig1B).

### **2.5 Evaluation of cell death**

At the end of the reoxygenation period, the medium was removed and cells were incubated with a solution of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich) 1.2mM. After 90 min at 37°C, formazan crystals were dissolved in DMSO (Dimethylsulfoxide, Sigma-Aldrich). The activity of mitochondrial dehydrogenases was quantified spectrophotometrically at 550 nm (Multiskan Ex, Thermo Electron Corporation, Shanghai, China). Measurement of troponin I in the supernatant was used for specific evaluation of CM death according to the manufacturer instructions Architect *Stat* Troponin-I Abbott, using anti-troponin I primary antibody and acridinium coupled secondary antibody [17]. A cell death assay by flow cytometry was performed using Annexin V and Propidium Iodide (PI) staining according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). The analysis was performed according to FL1-H (relative fluorescence intensity of annexin V) and FL3-H (relative fluorescence intensity of PI) fluorescence channels. Results were expressed as percentage of PI or Annexin V positive cells reflecting cell death proportion of in each group.

## **2.6 Western blots**

Lysates were obtained by lysing cell monolayer with 1% Triton X-100 lysis buffer (1% Triton X-100, 50mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM DTT, 5mM EDTA) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Sigma Aldrich) and phosphatase inhibitors (PhosphoStop, Roche Diagnostics). Protein concentration was normalized by determination of total protein concentration using BCA (Bicinchoninic acid) method (Interchim). In each sample, 25 µg of total proteins migrated in sodium dodecyl sulfate 12% polyacrylamide gel (SDS-PAGE). After migration, proteins were blotted to PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane by electro transfer (Trans-Blot Turbo Transfer, Biorad). Proteins were detected after labelling by specific primary antibodies (rabbit anti Phospho-Akt (Ser473) and rabbit anti-Akt from Cell signalling technology, rabbit anti Phospho-ERK1/2, mouse anti ERK1/2 from R&D Systems) revealed by secondary HRP (Horseradish peroxidase) coupled antibodies. Revelation was obtained by addition of the reaction substrate (ECL plus kit and western blotting detection system from GE Healthcare). The protein amount was determined using ImageLab software (Biorad).

## **2.7 Cytokine array**

Cytokine detection was performed according to manufacturer's instructions (ARY008, R&D systems). Briefly, CF secretome was pre-mixed with a detection antibody cocktail (Biotin-coupled antibodies) and then, incubated with the membrane where cytokine specific antibodies were spotted. Any cytokine/detection antibody complex present is bound by its cognate immobilized capture antibody on the membrane. Following the removal of unbound

materiel, streptavidin-HRP and chemiluminescent detection reagents were added sequentially. The intensity of chemiluminescent signal is proportional to the amount of cytokine bound and was determined using the freeware Image J v.1.44 (NIH, Bethesda, MD).

### ***2.8 Immunoprecipitation***

Lysates were obtained using the lysis buffer previously described for western blot experiments. Insoluble materials were pelleted at 12,000 rpm for 20 min and lysates were pre-cleared by incubation with magnetic beads (Millipore) conjugated with goat control IgG (Santa Cruz) antibody overnight at 4°C. 500µg of pre-cleared lysates were incubated with or without 500 ng/ml TIMP-1 at 4°C for 4 hours. Immune complexes were precipitated with the magnetic beads that were pre-bound with appropriate antibodies (TIMP-1 goat antibody (R-18) from Santa Cruz or goat control IgG antibody) at 4°C overnight, followed by four washes with the immunoprecipitation buffer. Immune complexes were then eluted from the beads with 2x SDS sample buffer and subjected to SDS-PAGE.

### ***2.9 Pharmaceuticals and drug preparation***

Rat TIMP-1 recombinant protein from R&D Systems was added at the time of reoxygenation at a final concentration of 0.5nM (optimal) obtained from test dose assay (data not shown). PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathway inhibitors LY294002 (Sigma-Aldrich) and PD98059 (Sigma-Aldrich) were used at a final concentration of 0.5µM and 1µM respectively at reoxygenation.

### **2.10 *In vivo* mouse model of myocardial ischemia reperfusion**

Male mice (C57BL/6J, 8-weeks old) were anesthetized by intraperitoneal injection of 75 mg/kg of pentobarbital sodium and analgesia was performed by 150 µg/kg of Fentanyl. They were subsequently intubated and ventilated. Following a left thoracotomy, all animals underwent 60 min of the left coronary artery ligation followed by 24 hours of reperfusion [18] (Fig 1B).

For CF secretome experiments, animals received an i.v. bolus (5mL/kg) of Tyrode buffer (I/R group, n=12) or CF secretome (+ S group, n=10), 5 min before reperfusion.

For TIMP-1 experiments animals received either an i.v. bolus of the drug vehicle (I/R group, n=11) or TIMP-1 mouse recombinant protein (R&D Systems) at the concentration of 1µg/kg, final plasmatic concentration = 0.5 nM (+TIMP-1 group, n=11), 5 min before reperfusion. At the end of reperfusion, area at risk (AR) was evaluated using Uniparse blue staining (Ciba-Geigy, Hawthorne NY), as previously described [18]. Hearts were excised and cut into five slices before measuring area of necrosis (AN) by tissue incubation in a 1% triphenyltetrazolium chloride solution.

### **2.11 Statistical analysis**

All values are expressed as mean ± SEM. Comparisons among groups was done with 1-way ANOVA; when a significant F value was obtained, a posthoc Tukey's test was applied.

Relationship between infarct size and AR was evaluated by analysis of covariance with the AN (expressed in mg) as the dependent variable and AR (expressed in mg) as the covariate.

Statistical significance was defined as a value of  $p < 0.05$ .

### **3. Results**

#### **3.1 CF protect CM from H/R in a paracrine manner**

As expected, H/R resulted in a significant reduction of CM viability compared to Sham. When CM underwent H/R in the presence of CF seeded in transwells, the average viability significantly improved to  $58 \pm 2 \%$  vs  $30 \pm 2 \%$  in the absence of CF ( $p < 0.05$  vs H/R) (Fig 2A). This was confirmed by the measurement of troponin I release (Fig 2B);  $0.90 \pm 0.03$  in the presence of CF vs  $2.20 \pm 0.14$  ng/mL in the absence of CF ( $p < 0.05$  vs H/R).

#### **3.2 Impact of CF secretome on PI3K/Akt and ERK1/2 activation**

We determined the optimal dose of CF secretome (1:1 volume with reoxygenation medium), after assessing CM viability with a dose response assay (data not shown). When CF secretome only (without CF) was added to CM at the onset of reoxygenation, we observed a significant increase ( $p < 0,05$  vs H/R) in viability that averaged  $51 \pm 9 \%$  versus  $31 \pm 4 \%$  (Fig 3A).

Addition of LY294002 (a specific inhibitor of PI3K/Akt pathway) did not significantly modify the protection induced by CF secretome (Fig 3A). In contrast, the addition of PD98059 (a specific inhibitor of ERK pathway) partially prevent the beneficial effect of CF secretome on viability (Fig 3A). Western blot analysis showed that CF secretome induced no significant change of Akt phosphorylation (Fig 3B), but increased ERK phosphorylation (Fig 3C). This effect was unaltered by LY294002 (Fig 3B) but significantly inhibited by PD98059 (Fig 3C).

#### **3.3 Secretome from CF reduces infarct size in vivo**

Area at risk (AR) was comparable between the two groups of mice. Administration of CF secretome, as an i.v. bolus, 5 min before reperfusion resulted in a significant reduction in

infarct size: AN/AR averaged  $35.4 \pm 2.6\%$  in treated group versus  $46.9 \pm 3\%$  in control group ( $p < 0.05$ ), (Fig 4). When infarct was considered as a dependent variable and area at risk as the covariate, the analysis of covariance confirmed that for any value of area at risk, administration of CF secretome significantly reduced infarct size (Data not shown).

### **3.4 Soluble factors present in the secretome of hypoxic CF**

The cytokine array detected several soluble factors in the secretome of CF subjected to 3 hours of hypoxia. Among them, five were systematically upregulated compared to negative control (by decreasing order of importance): TIMP-1, CXCL-7, IFN- $\gamma$ , CINC-1, RANTES and IL-1 $\alpha$  (Fig 5). In comparison to negative control, hypoxia increased TIMP-1 by 2.3 fold ( $p < 0.001$ ), while CXCL-7, IFN- $\gamma$ , CINC-1 and RANTES increased by 1.51, 1.33, 1.26, 1.25, 1.19 fold respectively (n=4 cytokine arrays).

### **3.5 TIMP-1 protection is mediated by the activation of the RISK pathway**

Cell viability analysis revealed that TIMP-1 (0.5nM), added at the onset of reoxygenation, significantly decreased the amount of annexin V-positive cells from  $20.8 \pm 5.0$  to  $12 \pm 3\%$  ( $p < 0.05$ ) in control with a parallel reduction in the number of PI-positive cells ( $26.3 \pm 6.0$  vs  $14.7 \pm 4.0\%$ ,  $p < 0.05$ ), (Fig6A). By MTT assay, TIMP-1 significantly improved CM viability,  $68.0 \pm 1.7\%$  versus  $44.0 \pm 0.1\%$  ( $p < 0.05$ ) in the absence of TIMP-1 (Fig 6B). The addition of both LY294002 and PD98059 to cell preparations treated by TIMP-1 prevented the beneficial effect of TIMP-1 on CM viability (Fig 6B). Western blot analysis showed that Akt phosphorylation was significantly increased while there was a non-significant increasing trend in ERK phosphorylation in CM treated with TIMP-1 (Fig 6C-D). Moreover, these effects were attenuated by treatment with LY2894002 and PD98059, respectively.

Previous studies in other cell models have demonstrated a contribution of TIMP-1 in the activation of different cellular signalling pathways promoting cell survival by its interaction with cell surface proteins including  $\beta$ 1-integrin. We therefore investigated whether TIMP-1 interacted with  $\beta$ 1-integrin in CM. As demonstrated by the immunoprecipitation assay, TIMP-1 interacted with  $\beta$ 1-integrin in our cell culture model. In cell lysates treated with recombinant protein TIMP-1, we revealed  $\beta$ 1-integrin by western blot analysis after TIMP-1 immunoprecipitation compared to control IgG immunoprecipitation (Fig 6E). Investigations with CXCL-7, the second cytokine upregulated in CF secretome, have been performed on CM viability after H/R, but no increase of viability was observed with this cytokine (data not shown).

### ***3.6 TIMP-1 reduces infarct size in the in vivo mouse heart***

Area at risk (AR) were comparable between the two groups of mice. Administration of an i.v. bolus of TIMP-1, 5 min before reperfusion, significantly reduced infarct size that averaged  $25.4 \pm 3.4\%$  vs  $40.5 \pm 4.1\%$  ( $p < 0.05$ ) of area at risk in controls (Figure 7). When infarct was considered as a dependent variable and area at risk as the covariate, the analysis of covariance confirmed that for any value of area at risk, administration of TIMP-1 significantly reduced infarct size (Data not shown).



#### 4. Discussion

In the present study, we demonstrated that during hypoxia-reoxygenation (H/R), CF contributed to attenuate ischemia-reperfusion injury of CM in a paracrine manner. TIMP-1, an inhibitor of MMPs secreted by CF following an hypoxic challenge, may play an important role in this protective effect likely through the activation of the PI3K-Akt and/or ERK1/2 pathways in reperfused CM.

Cardiac fibroblasts have long been recognized as prominent contributors of cardiac fibrosis in response to various cardiovascular diseases. Recent works have emphasized their role as key regulators of the inflammatory and reparative response following injury [19]. These processes being critical for myocardial dysfunction and patients prognosis after myocardial infarction, there is a need to investigate the role of CF in myocardial ischemia reperfusion injuries. Various studies have shown that different stem cell types can be cardioprotective by releasing soluble factors [17,20,21]. Several other studies (including from our group) have demonstrated that conditioned medium from Mesenchymal Stem Cells (MSC) can reduce myocardial ischemia reperfusion injury [17,20,21]. Hypoxia was shown to induce upregulation of various factors related to angiogenesis or survival and to enhance conditioned medium protective properties [20,22].

In the present study, we set up an original preparation where CM and CF were separated during the hypoxia-reoxygenation insult and where CM could be exposed to the soluble factors secreted by CF at the time of reoxygenation. We then demonstrated that the secretome produced by CF under hypoxic conditions was able to protect CM against lethal reperfusion injury. Analysis of this secretome revealed that 5 cytokines were highly expressed when compared to negative control: TIMP-1, CXCL-7, IFN- $\gamma$ , CINC-1, RANTES and IL1- $\alpha$ . This result is consistent with previous studies reporting that various inflammatory

cytokines can be produced during ischemia-reperfusion injury [23,24]. Among them we identified TIMP-1 as a major contributor of this protection. Indeed, TIMP-1 alone was able to significantly improve CM survival in vitro and further to reduce infarct size in the in vivo mouse model of myocardial ischemia reperfusion.

TIMP-1 is an endogenous inhibitor of MMPs that has been shown to increase its concentration within the myocardium several days after myocardial infarction in the chronic remodelling phase [25]. Roten et al. demonstrated that TIMP-1 expression participates in the maintenance of normal LV myocardial structure [15] and TIMP-1 deficiency has been associated with exacerbated left ventricular remodelling after myocardial infarction [14]. Jayasankar et al. showed that TIMP-1 gene transfer by inhibiting MMP activity preserves cardiac function and reduces fibrosis in ischemic cardiomyopathy [26]. To our knowledge this is however the first work reporting that TIMP-1 is rapidly secreted by acutely hypoxic CF and increases CM survival after an acute H/R stress. Detection of soluble factors present in the secretome of CF was not exhaustive as only 30 cytokines were detectable and other important cytokines like FGFs, HGF, IGF-1 or metabolites were not present on the array. Further studies are needed to assess whether soluble factors other than TIMP-1 may also trigger protection of CM against lethal reperfusion injury. We have also investigated whether CXCL-7 was able to protect CM from H/R but no significant effect was observed (Data not shown).

How TIMP-1 might protect CM against lethal reperfusion injury is unknown. Recently TIMP-1 has recently been shown to exhibit MMP-independent properties in various cell types which might play an important role in the regulation of apoptosis, cell survival, cell growth, cell differentiation and angiogenesis [10,11,27-30]. Yet, both the putative "TIMP-1-binding receptor" and downstream signalling pathways remain to be identified. Studies have shown that TIMP-1 can interact with  $\beta$ 1-integrin and CD63 on cell surface to mediate

activation of intracellular survival pathways implicating PI3K/Akt activation in breast tumor and melanoma cell lines [31,32]. In our study, we have measured both  $\beta$ 1-integrin and CD63 expression on CM cell surface and showed that only  $\beta$ 1-integrin interacted with TIMP-1 in our model. Another group has shown that TIMP-1 was also able to bind to another cell surface protein, CD44 promoting erythroid cell survival [33]. The mechanism that confers “cytokine-like” properties to TIMP-1 remains unclear. Potential TIMP-1-binding receptor involved in signalling cascades triggering favourable cellular responses is not yet well identified and may be different among various cell types.

We have shown here that TIMP-1 might indeed bind  $\beta$ 1-integrin and further demonstrated that TIMP-1 was able to induce cardioprotection through the activation of PI3K/Akt and/or ERK1/2 pathways. This is consistent with previous findings by Singla et al. who reported that TIMP-1 was an important factor present in embryonic stem cell conditioned medium that can inhibit cell death from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts [34]. The protection afforded by CF secretome was partly abolished by inhibition of the ERK1/2 pathway but not by inhibition of the PI3K/Akt pathway. This may result from the fact that the large number of factors contained in this secretome simultaneously activates different signalling pathways that cannot be targeted by a single specific inhibitor. Protection afforded by TIMP-1 alone seems to be mainly related to the activation of the PI3K/Akt pathway and to a lesser extent to ERK1/2 pathway. This is consistent with previous findings of cardioprotection showing that post-conditioning induced the activation of the RISK (reperfusion injury salvage kinases) pathway including PI3K/Akt and ERK phosphorylation [35,36]. Others demonstrated that TIMP-1 may inhibit cell death by activation of survival pathways mediated by PI3K/Akt in several cancer cell lines [11,37-39]. Our group previously demonstrated that protection of CM by MSC conditioned medium resulted from the

activation of the PI3K pathway [17]. Overall, it seems that the paracrine protection of CM triggered by CF is likely due to the activation of PI3K/Akt and/or ERK1/2 pathways.

This work raised several questions and warranted future investigations. First, if an hypoxic stress can activate release of pro-survival factors like TIMP-1 from CF *in vitro*, is this protective process happening *in vivo*? We have seen that CF are more resistant than CM against an hypoxic insult and that 3 h of hypoxia are needed for CF to produce a protective secretome (data not shown). Therefore, 60 min of ischemia may be not sufficient for them to produce protective factors like TIMP-1 *in vivo*. Another raised question is if TIMP-1 is indeed produce *in vivo* by CF during ischemia, what is its effect on infarct size? TIMP-1 may be mobilized to its primary activity during ischemia, which is inhibiting MMPs and cannot exert its MMP-independent activity. Indeed, MMPs production is largely increased after ischemia [40,41]. Moreover it has been shown that MMP inhibition by TIMP-1 gene transfer preserves cardiac function after an ischemic insult [26] and cardioprotective strategies such as pre- and post-conditioning are known to attenuate MMP activity [42-44]. Therefore increasing the endogen level of TIMP-1 produced by CF to improve cell survival and MMP inhibition might be both potential therapeutic targets against ischemia reperfusion injury.

In summary, our study suggests that cardiac fibroblasts are important players in acute ischemia-reperfusion injury and that they mainly act through the production of soluble factors, including TIMP-1. We claim that CF may protect jeopardized cardiomyocytes in a paracrine way, likely resulting in the activation of the PI3kinase and/or ERK1/2 pathways. Our work provides new data suggesting that fibroblast-released protective cytokine may be of interest for cardioprotection against ischemia reperfusion injuries. They may be beneficial both at the time of reperfusion and later during the remodelling process.

***Funding Sources:***

This study was supported by a research grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and by a grant from the Agence de Biomédecine. M Abrial was a recipient of a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France.

***Disclosures:***

None declared

***Acknowledgements:***

We thank Marie-Christine Chablin for her excellent technical assistance and Muhammad Rizwan Alam for reading the manuscript and giving valuable suggestions.

## References

- [1] Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, Ross RS, Hong T-T, Shaw RM, et al. Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev Cell* 2009;16:233–44.
- [2] Dell'Era P, Ronca R, Coco L, Nicoli S, Metra M, Presta M. Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development. *Circulation Research* 2003;93:414–20.
- [3] Bowers SLK, Banerjee I, Baudino TA. The extracellular matrix: At the center of it all. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009;48:474–82.
- [4] Kakkar R, Lee RT. Intramyocardial Fibroblast Myocyte Communication. *Circulation Research* 2010;106:47–57.
- [5] Leask A. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovascular Research* 2007;74:207–12.
- [6] Fredj S, Bescond J, Louault C, Delwail A, Lecron J-C, Potreau D. Role of interleukin-6 in cardiomyocyte/cardiac fibroblast interactions during myocyte hypertrophy and fibroblast proliferation. *J Cell Physiol* 2005;204:428–36.
- [7] Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, Nishimura S, et al. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J Clin Invest* 2010;120:254–65.
- [8] Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhauser ML, Handa V, Gannon J, et al. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ Heart Fail* 2009;2:684–91.
- [9] Jiang Z-S, Wen G-B, Tang Z-H, Srisakuldee W, Fandrich RR, Kardami E. High molecular weight FGF-2 promotes postconditioning-like cardioprotection linked to activation of the protein kinase C isoforms Akt and p70 S6 kinase. *Can J Physiol Pharmacol* 2009;87:798–804.
- [10] Liu X-W, Margarida Bernado M, Fridman R, Kim H-RC. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Protects Human Breast Epithelial Cells Against Intrinsic Apoptotic Cell Death via the Focal Adhesion Kinase/Phosphatidylinositol 3-Kinase and MAPK Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:40364–72.
- [11] Liu X-W, Taube ME, Jung K-K. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Protects Human Breast Epithelial Cells From Extrinsic Cell Death: a Potential Oncogenic Activity of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1. *Cancer Research* 2005;65:898–906.
- [12] Li G, Fridman R, Kim HR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Research* 1999;59:6267–75.
- [13] Ikonomidis JS, Hendrick JW, Parkhurst AM, Herron AR, Escobar PG, Dowdy KB, et al. Accelerated LV remodeling after myocardial infarction in TIMP-1-deficient mice: effects of exogenous MMP inhibition. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 2004;288:H149–58.
- [14] Creemers EEJM, Davis JN, Parkhurst AM, Leenders P, Dowdy KB, Hapke E, et al. Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H364–71.
- [15] Roten L, Nemoto S, Simsic J, Coker ML, Rao V, Baicu S, et al. Effects of gene deletion of the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-type 1 (TIMP-1) on left

- ventricular geometry and function in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2000;32:109–20.
- [16] Angoulvant D, Fazel S, Weisel RD, Lai TYY, Fedak PW, Chen L, et al. Cell-based gene therapy modifies matrix remodeling after a myocardial infarction in tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3-deficient mice. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137:471–80.
- [17] Angoulvant D, Ivanes F, Ferrera R, Matthews PG, Nataf S, Ovize M. Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 2011;30:95–102.
- [18] Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* 2008;117:2761–8.
- [19] Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2011;123:594–604.
- [20] Fidelis-de-Oliveira P, Werneck-de-Castro JPS, Pinho-Ribeiro V, Shalom BCM, Nascimento-Silva JH, Costa e Souza RH, et al. Soluble Factors From Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Have Antinecrotic Effect on Cardiomyocytes In Vitro and Improve Cardiac Function in Infarcted Rat Hearts. *Cell Transplant* 2012;21:1011–21.
- [21] Timmers L, Lim SK, Arslan F, Armstrong JS, Hofer IE, Doevendans PA, et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Research* 2008;1:129–37.
- [22] Chanyshv B, Shainberg A, Isak A, Chepurko Y, Porat E, Hochhauser E. Conditioned medium from hypoxic cells protects cardiomyocytes against ischemia. *Mol Cell Biochem* 2012;363:167–78.
- [23] Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 2002;53:31–47.
- [24] Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacological Research* 2008;58:88–111.
- [25] Lindsey ML. MMP induction and inhibition in myocardial infarction. *Heart Failure Reviews* 2004;9:7–19.
- [26] Jayasankar V. Inhibition of Matrix Metalloproteinase Activity by TIMP-1 Gene Transfer Effectively Treats Ischemic Cardiomyopathy. *Circulation* 2004;110:II–180–II–186.
- [27] Chirco R, Liu X-W, Jung K-K, Kim H-RC. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:99–113.
- [28] Akahane T, Akahane M, Shah A, Thorgeirsson UP. TIMP-1 stimulates proliferation of human aortic smooth muscle cells and Ras effector pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;324:440–5.
- [29] Guedez L, Stetler-Stevenson WG. In Vitro Suppression of Programmed Cell Death of B Cells by Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 1998;102:1–9.
- [30] Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992;298:29–32.
- [31] Jung K-K, Liu X-W, Chirco R, Fridman R, Kim H-RC. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *Embo J* 2006;25:3934–42.
- [32] Toricelli M, Melo FH, Peres GB, Silva DC, Jasiulionis MG. Timp1 interacts with beta-1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3-K signaling pathway independently of Akt phosphorylation. *Mol*

- Cancer 2013;12:22.
- [33] Lambert E, Bridoux L, Devy J, Dassé E, Sowa M-L, Duca L, et al. TIMP-1 binding to proMMP-9/CD44 complex localized at the cell surface promotes erythroid cell survival. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009;41:1102–15.
- [34] Singla DK, McDonald DE. Factors released from embryonic stem cells inhibit apoptosis of H9c2 cells. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 2007;293:H1590–5.
- [35] Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circulation Research* 2004;95:230–2.
- [36] Sivaraman V, Mudalagiri NR, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, et al. Postconditioning protects human atrial muscle through the activation of the RISK pathway. *Basic Res Cardiol* 2007;102:453–9.
- [37] Kadri Z, Petitfrère E, Boudot C, Freyssinier JM, Fichelson S, Mayeux P, et al. Erythropoietin induction of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 expression and secretion is mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Cell Growth Differ* 2000;11:573–80.
- [38] Lambert E, Boudot C, Kadri Z, Soula-Rothhut M, Sowa M-L, Mayeux P, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem J* 2003;372:767–74.
- [39] Haviernik P, Lahoda C, Bradley HL, Hawley TS, Ramezani A, Hawley RG, et al. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 overexpression in M1 myeloblasts impairs IL-6-induced differentiation. *Oncogene* 2004;23:9212–9.
- [40] Lalu MM, Pasini E, Schulze CJ, Ferrari-Vivaldi M, Ferrari-Vivaldi G, Bachetti T, et al. Ischaemia-reperfusion injury activates matrix metalloproteinases in the human heart. *European Heart Journal* 2005;26:27–35.
- [41] Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovascular Research* 2006;69:604–13.
- [42] Bencsik P, Kupai K, Gircz Z, Görbe A, Pipis J, Murlasits Z, et al. Role of iNOS and peroxynitrite-matrix metalloproteinase-2 signaling in myocardial late preconditioning in rats. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 2010;299:H512–8.
- [43] Wang Z-F, Wang N-P, Harmouche S, Philip T, Pang X-F, Bai F, et al. Postconditioning promotes the cardiac repair through balancing collagen degradation and synthesis after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol* 2013;108:318.
- [44] Lalu MM, Csonka C, Gircz Z, Csont T, Schulz R, Ferdinandy P. Preconditioning decreases ischemia/reperfusion-induced release and activation of matrix metalloproteinase-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002;296:937–41.



## Figure legends

### **Figure 1: *In vitro* and *in vivo* experimental protocols**

**A:** *In vitro* model of neonatal rat CM subjected to 3h of hypoxia (H) and 21h of reoxygenation (R). CM group not subjected to H/R was named Sham. For transwells experiments (+CF), CF seeded in transwells, were added in CM culture dishes during all H/R sequence. For CF secretome experiments (+S), CF were subjected to hypoxia alone and their supernatant named S was collected and added in CM dishes at reoxygenation. For TIMP-1 experiments, recombinant protein TIMP-1 (0.5nM) was added in CM reoxygenation medium.

**B:** *In vivo* model of mice myocardial infarction (MI). All animals underwent 60 minutes of ischemia (I) performed by left coronary artery ligation and followed by 24h of reperfusion (R). For CF secretome experiments (+S), animals received an i.v bolus of concentrated S (5mL/kg), 5 minutes before reperfusion. Control animals received Tyrode buffer. For TIMP-1 experiments (+TIMP-1), animals received an i.v. bolus of TIMP-1 (1 $\mu$ g/kg), 5 min before reperfusion. Control animals received TIMP-1 vehicle alone.

### **Figure 2: CF protect CM against H/R in a paracrine manner**

**A:** MTT assay, measuring CM viability, was performed after 3 h of hypoxia and 21 h of reoxygenation. CF, seeded in transwells, were positioned above CM dishes during the whole sequence of H/R.

**B:** Troponin I measurement assessed CM mortality after H/R.

All groups (n=6/group) were done with the same number of CM seeded in culture dishes and CF in transwells. Sham CM (white bar) were not subjected to H/R. \* $p$ <0.001 vs H/R.

**Figure 3: CF secretome confers protection to CM via activation of ERK1/2 signalling pathway but not Akt**

**A:** MTT assay measuring CM viability after H/R. CF secretome (S) was added at reperfusion. PI3K/Akt and ERK inhibitors were used in secretome treated groups (+S). Results are expressed as % of sham. \* $p < 0.05$  vs H/R.  $\yen$   $p < 0.065$  vs + S. (n = 3/group)

**B:** Evaluation of S effect on Akt phosphorylated forms in CM cell lysates after H/R by western blot and upon treatment with PI3/Akt inhibitor: LY294002. We show a representative western blot from 3 different experiments. Quantitative histograms of phosphorylated Akt forms vs total forms. Results are expressed as fold vs H/R.

**C:** Evaluation of CF secretome effect on ERK1/2 phosphorylated forms in CM cell lysates after H/R by western blot and treatment with ERK1/2 inhibitor: PD98059. We show representative western blot from 3 different experiments. Quantitative histograms of ERK phosphorylated forms vs total forms. Results are expressed as fold vs H/R. \* $p < 0.05$  vs H/R,  $\yen$   $p < 0.05$  vs + S.

**Figure 4: CF secretome reduces infarct size in vivo in a mice model of myocardial ischemia reperfusion**

Infarct size was measured in control group (I/R) and CF secretome treated group (+S). AR (area at risk) and AN (area of necrosis) are presented for each group (n = 12 and 10/group). AR/LV (left ventricle) were similar between groups but AN/AR is significantly reduced in S of CF group. \* $p < 0.05$  vs I/R.

**Figure 5: TIMP-1 is the major factor present in CF secretome after hypoxia**

Comparative histogram expression of all soluble factors present in CF secretome after 3 hours of hypoxia, detected by cytokine array. Results are expressed as fold of negative control. Data are the mean  $\pm$  sem of 4 cytokines arrays. (\* $p$ <0.01 vs negative control)

**Figure 6: TIMP-1 alone protects CM from H/R injury via activation of Akt and ERK1/2 signalling pathway and  $\beta$ 1-integrin binding.**

**A:** Quantitative histograms of cell death assay by PI and Annexin V staining using flow cytometry. Results were expressed as % of labelled cells. (n=4) \* $p$ <0.05 vs H/R

**B:** MTT assay measuring CM viability after H/R treated or not with TIMP-1. LY294002 and PD98059, respectively PI3K/Akt and ERK inhibitors, were used in groups treated with TIMP-1. Results were expressed as % of sham. \* $p$ <0.05 vs H/R.  $\yen$   $p$ <0.05 vs + TIMP-1.

**C:** Evaluation of TIMP-1 effect on Akt phosphorylated form in CM after H/R by western blot and after treatment with the inhibitor LY294002. We show a representative western blot of 3 different experiments. Quantitative histograms of Akt phosphorylated form vs total form. \* $p$ <0.05 vs H/R,  $\yen$   $p$ <0.05 vs + TIMP-1. Results are expressed in fold of H/R.

**D:** Evaluation of TIMP-1 effect on ERK1/2 phosphorylation in CM after H/R by western blot and after treatment with ERK1/2 inhibitor: PD98059. We show a representative western blot from 3 different experiments. Quantitative histograms of ERK1/2 phosphorylated forms vs total forms. Results are expressed in fold of H/R.

**E:** Immunoprecipitation of TIMP-1 or control IgG after treatment with recombinant TIMP-1 and detection by western blot of  $\beta$ 1-Integrin (130kDa). Input reflects protein loading in each

condition.

**Figure 7: TIMP-1 reduces infarct size in vivo in a mice model of myocardial infarction**

Infarct size was measured in control group (I/R) and TIMP-1 treated group (+TIMP-1). AR (area at risk) and AN (area of necrosis) are presented for each group (n=11/group). AR/LV were similar between groups but AN/AR was reduced in TIMP-1 group. \* $p < 0.02$  vs I/R.

Figure 1

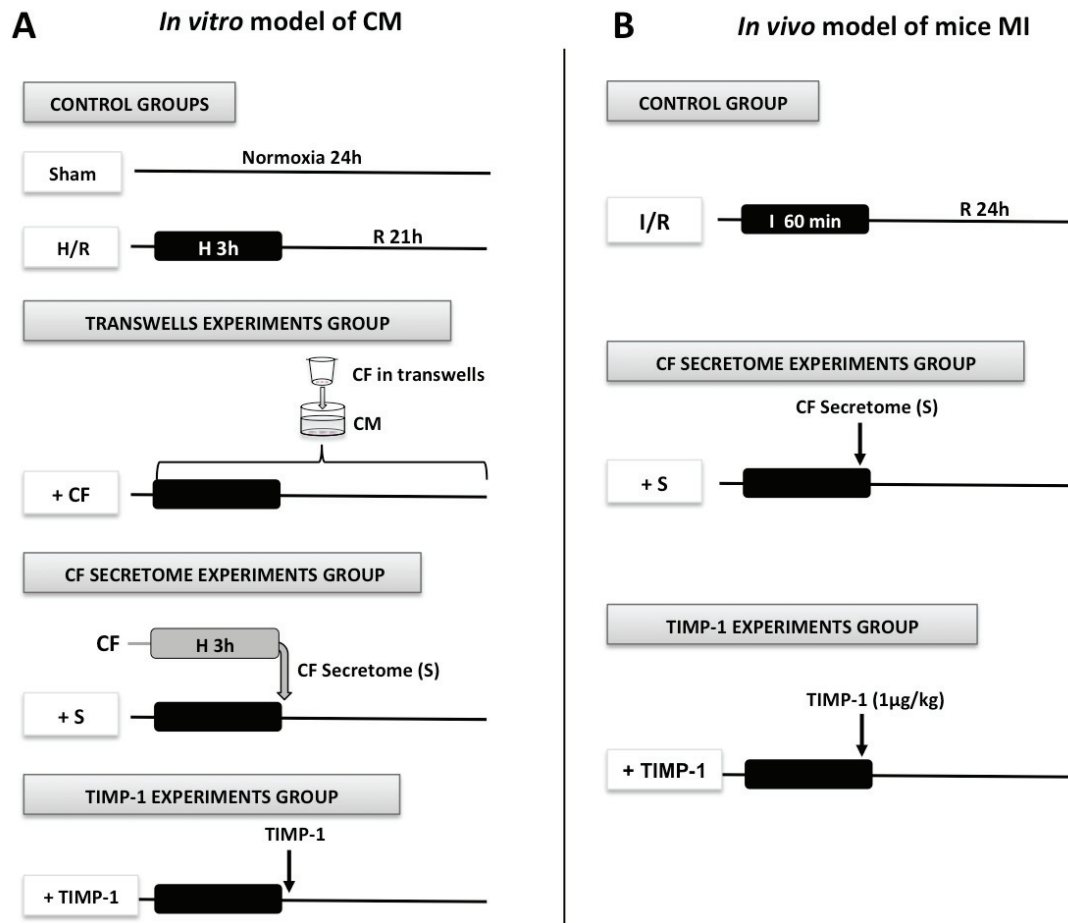
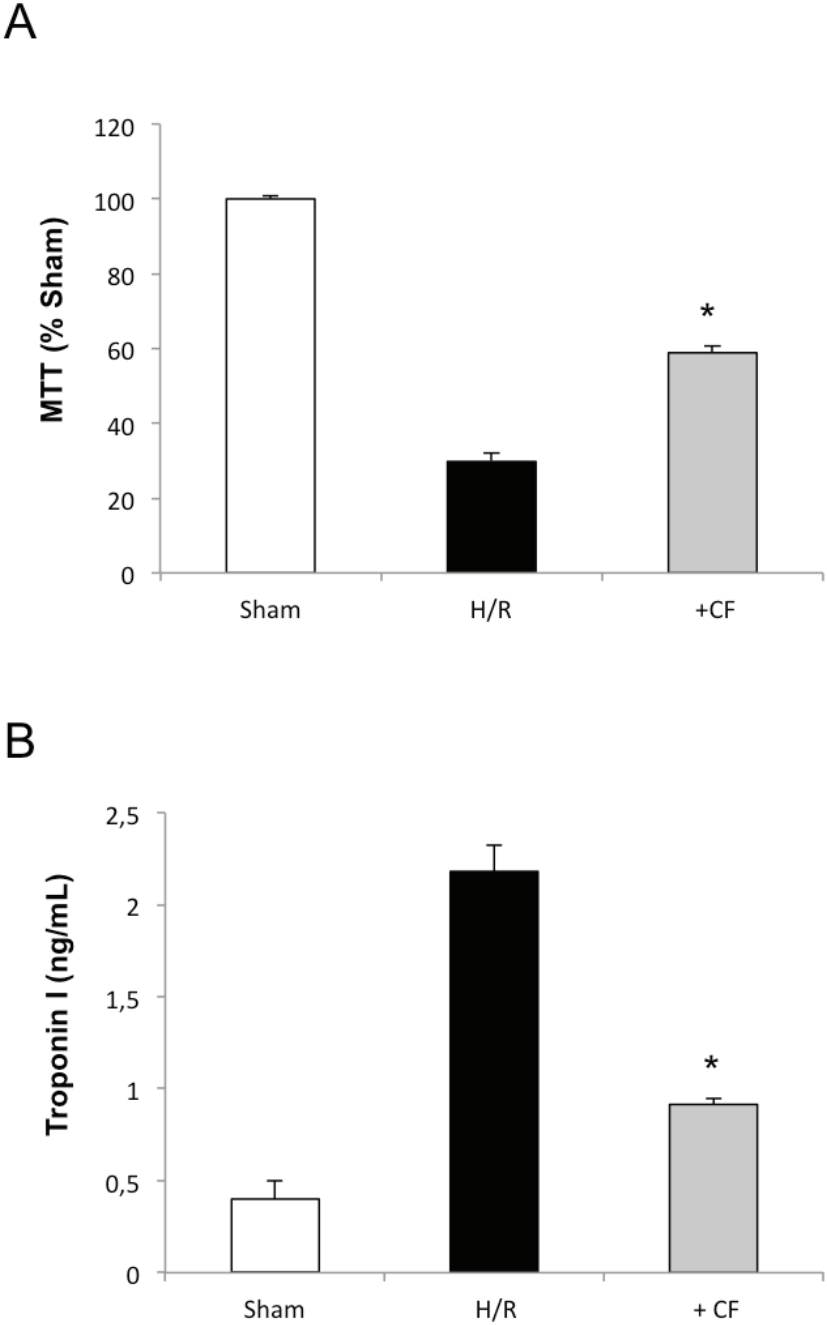
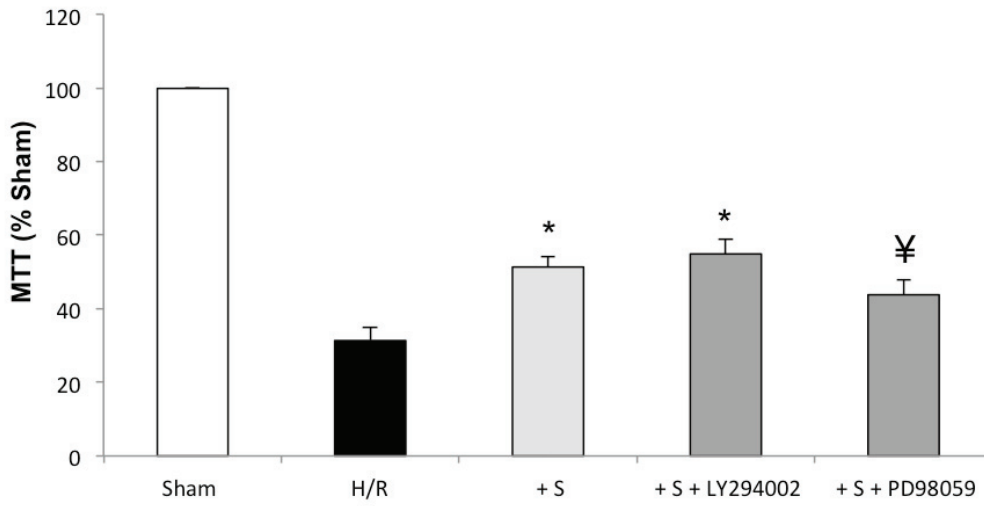


Figure 2

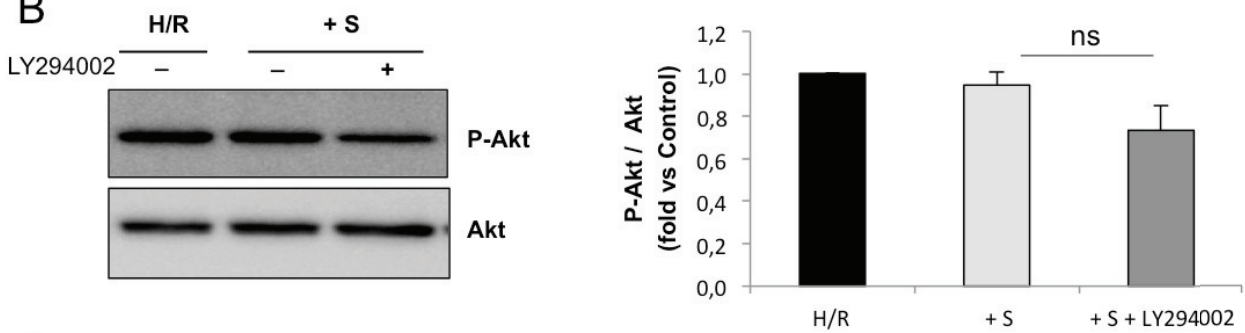


**Figure 3**

**A**



**B**



**C**

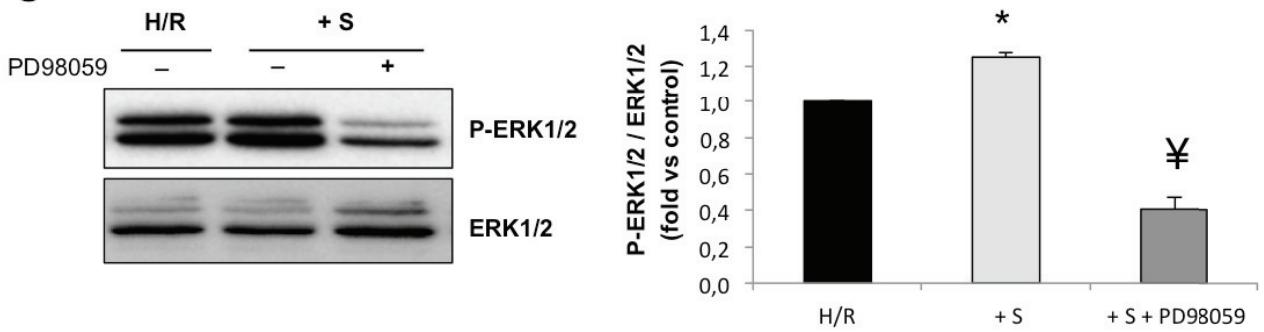


Figure 4

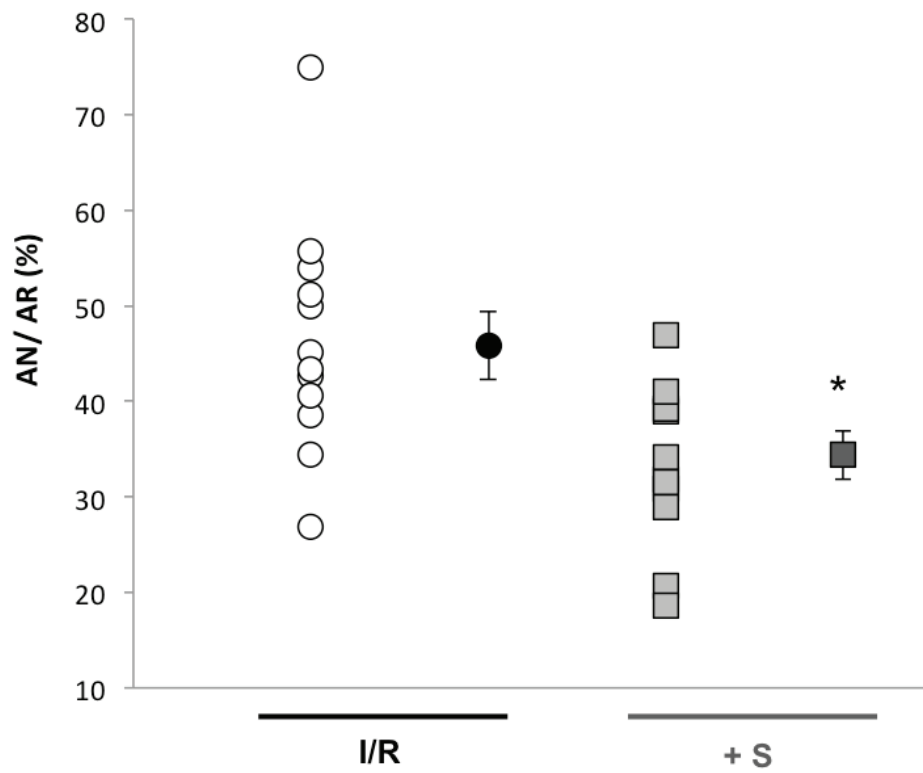
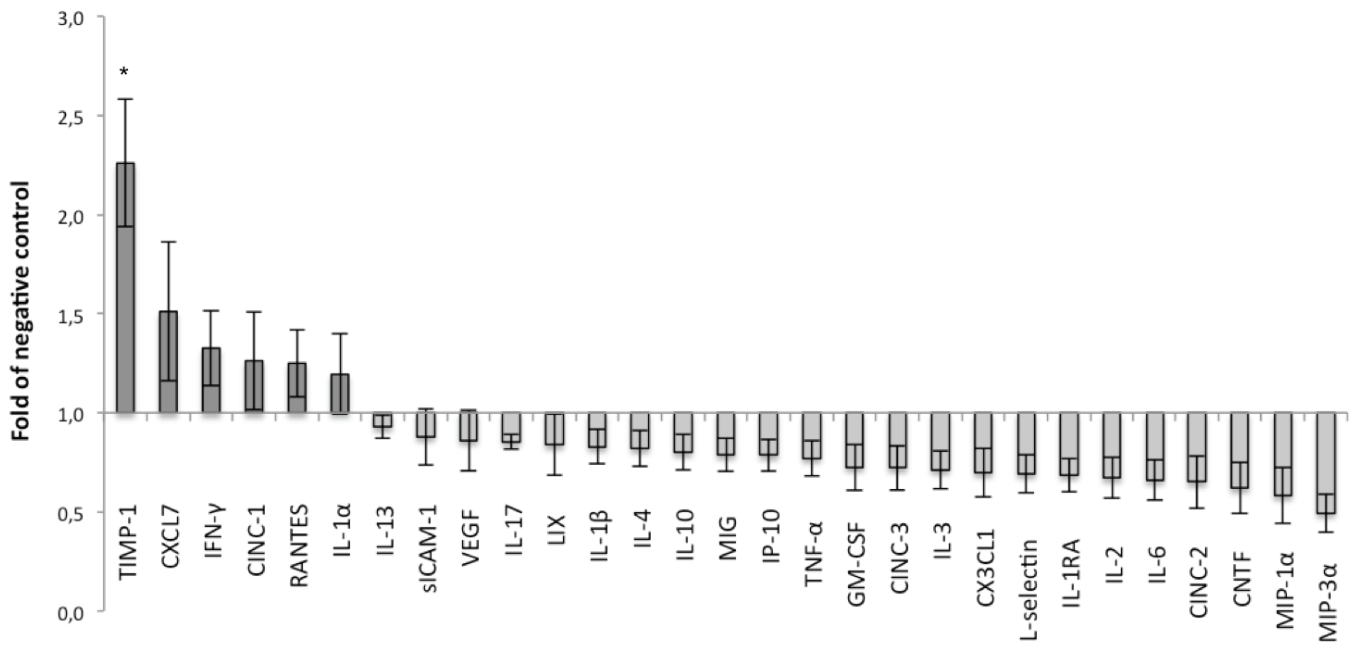




Figure 5



**Figure 6**

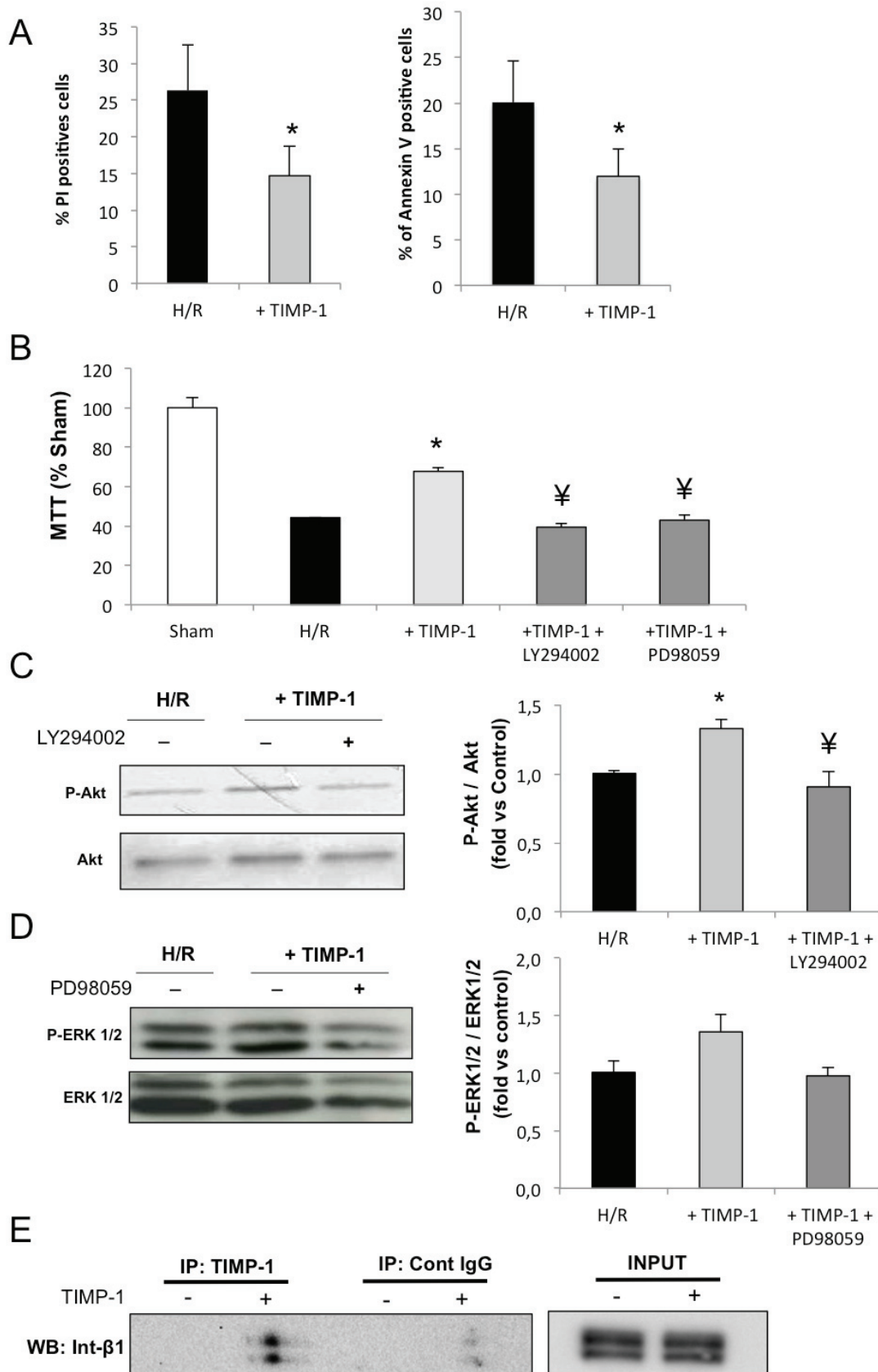
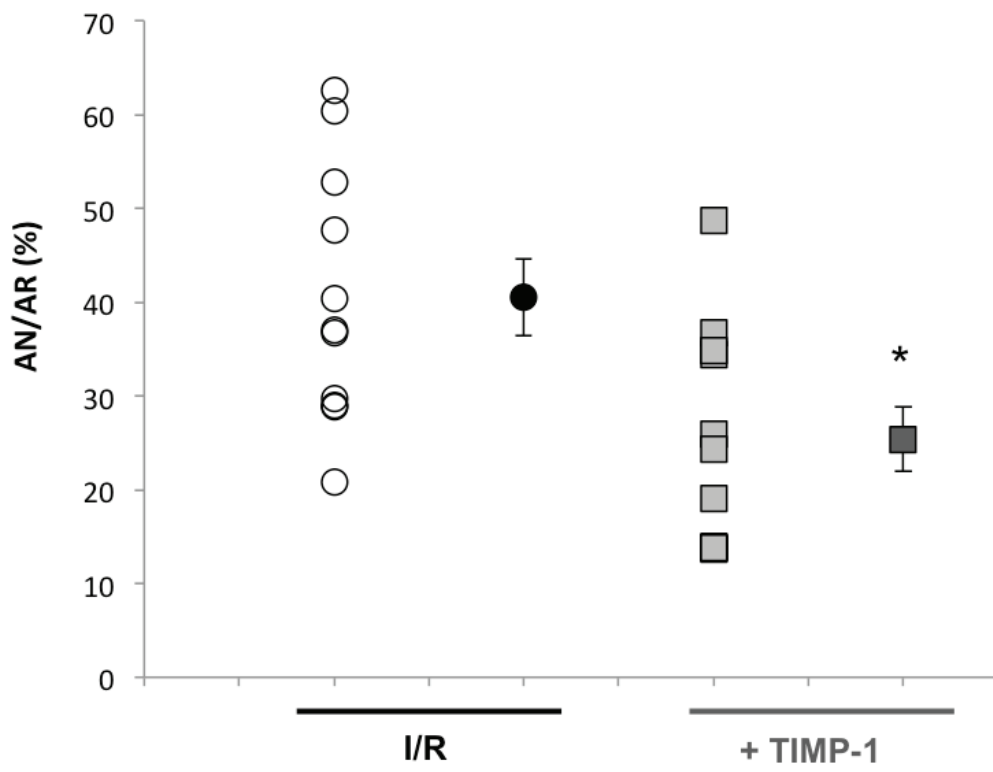


Figure 7



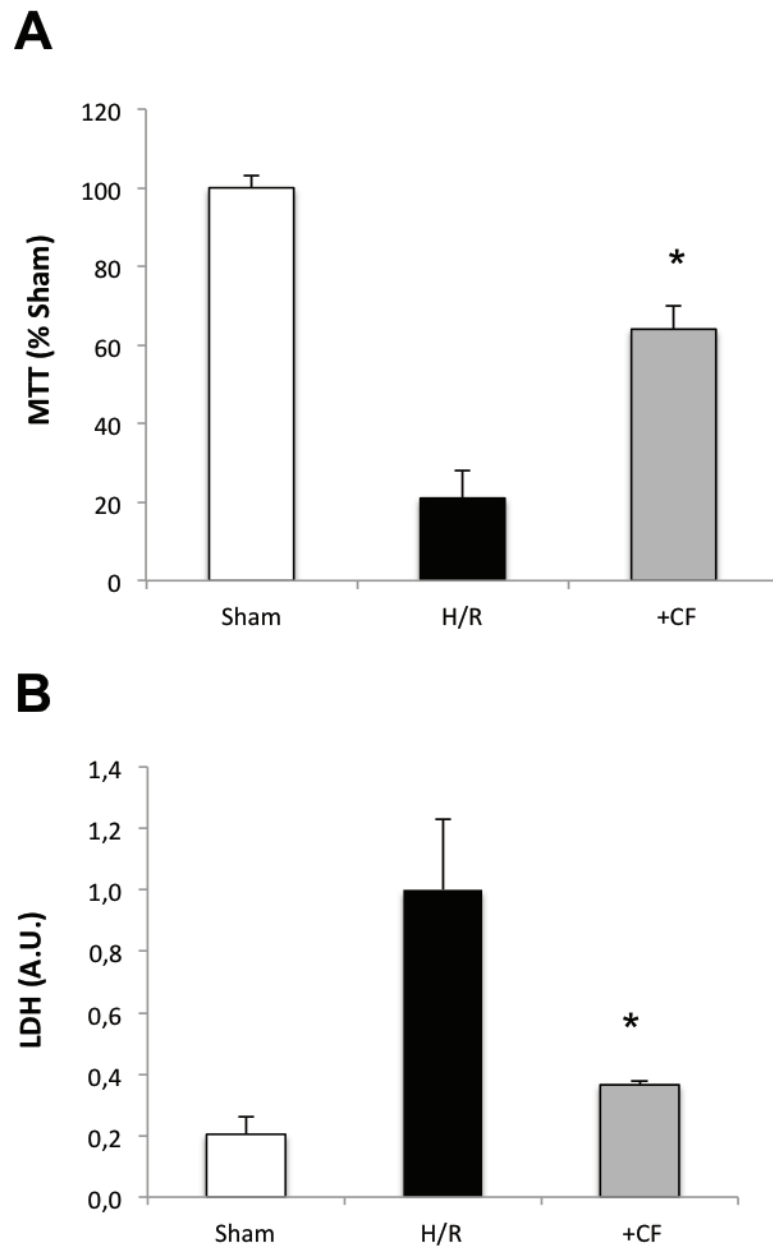
## **C. Résultats complémentaires liés à la publication n°1**

### **1) Effet des cardiofibroblastes en contact direct dans les puits de CM au cours de l'hypoxie-réoxygénation**

Pour répondre à notre première question, les CF ont-ils un impact sur la réponse des CM face à l'H/R, nous avons tout d'abord utilisé une approche d'interaction cellulaire par contact direct. Les CF ont été ensemencés de façon contrôlée avec les CM, (en conservant le même nombre de cellules final) 12h avant l'H/R afin d'éviter toute division cellulaire.

Cette approche nous a permis de mettre en évidence une augmentation de la viabilité cellulaire face à une séquence d'H/R, lorsque les deux types cellulaires sont présents (Figure S1A) et de la même façon, une diminution de la mortalité cellulaire (Figure S1B).

Ces résultats suggèrent que les CF semblent augmenter la résistance des cellules face à l'H/R mais ne nous permettent pas de distinguer si ce sont les CM qui sont moins sensibles à l'H/R en présence de CF ou si ce sont les CF qui sont plus résistants que les CM face à l'H/R, pouvant fausser alors les résultats obtenus.



**Figure supplémentaire 1 : Effet des CF en contact direct dans les puits de CM après H/R.**

**(A)** Evaluation de viabilité et **(B)** mortalité cellulaire après hypoxie-réoxygénation (H/R) en contact direct avec les CF. Sham : CM en normoxie, H/R : CM seul en H/R, +CF : CM en contact direct avec les CF au cours de l'H/R. Tous les puits contiennent le même nombre de cellules, pour le groupe + CF, un ratio de 1 : 1 entre CM et CF a été utilisé. \*  $p < 0,05$  vs H/R,  $n=6$

## **2) Effet des cardiofibroblastes en contact indirect dans les inserts au cours de l'hypoxie-réoxygénation**

Une seconde approche a été utilisée, les CM ont été ensemencés seuls dans les puits tandis que les CF ont été mis en culture dans des inserts, nacelle amovible pouvant être placée dans les puits des CM, évitant ainsi tout contact direct entre les cellules et permettant d'étudier uniquement les interactions paracrines.

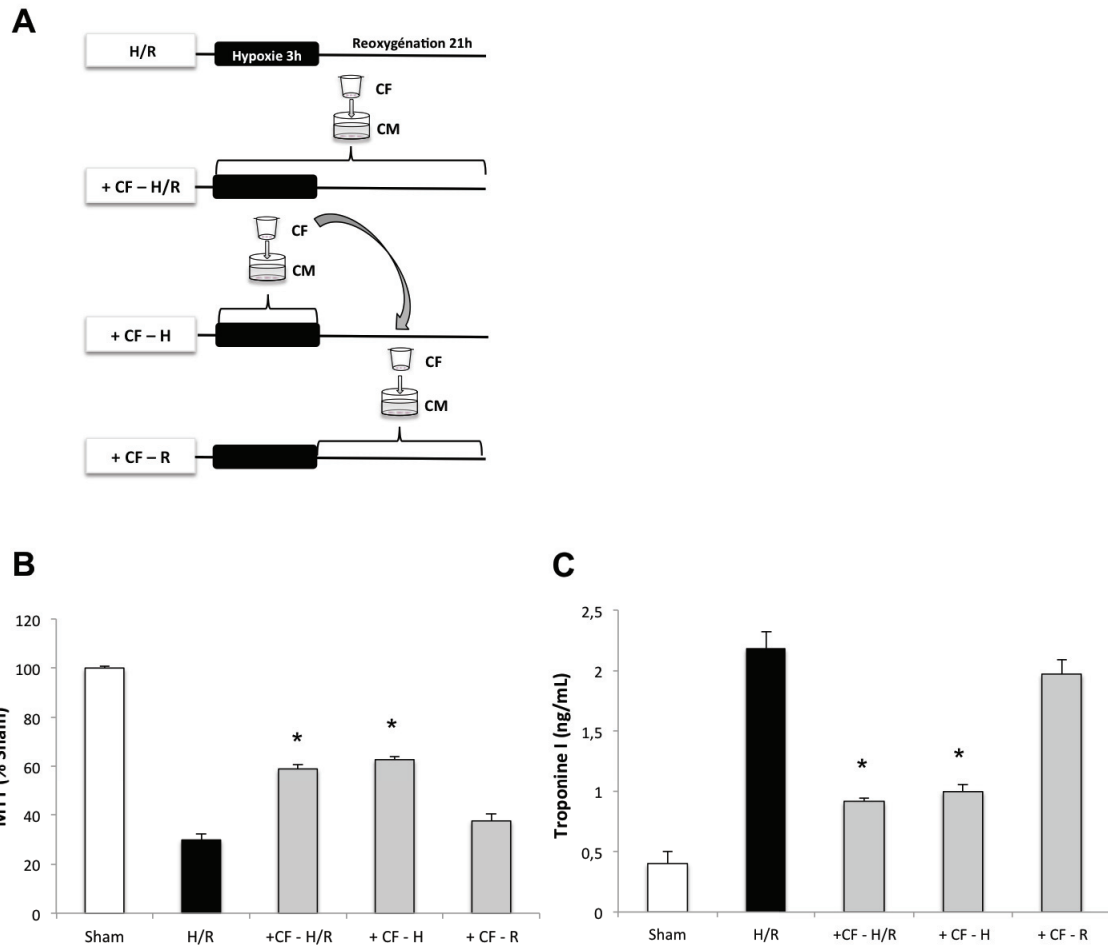
Différentes expériences ont alors pu être réalisées à l'aide des inserts, notamment en les positionnant à différents temps de la séquence d'H/R (Figure S2A).

Lorsque les CF sont placés avec les CM pendant toute la séquence d'H/R, une augmentation significative de la viabilité des CM est observée (Figure S2B), corrélée par une diminution du relargage de troponine I (Figure S2C).

De manière similaire, lorsque les CF sont placés avec les CM au cours de l'hypoxie uniquement, une augmentation de la viabilité des CM est observée (Figure S2B) également corrélée par une diminution du relargage de troponine I (Figure S2C).

Cette protection n'est pas retrouvée lorsque les CF dans les inserts (préalablement hypoxiés) sont placés avec les CM au moment de la reperfusion uniquement que ce soit par mesure de viabilité cellulaire (Figure S2B) ou de mortalité (Figure S2C).

Ces résultats suggèrent que les CF produisent des facteurs paracrines protecteurs au cours de l'hypoxie, capables d'agir sur la viabilité des CM.



**Figure supplémentaire 2 : Effet paracrine des CF sur la protection des CM à différents temps de la séquence d'H/R.**

**(A) Protocole expérimental.**

**Sham** : CM en normoxie.

**H/R** : CM seul en H/R.

**+CF H/R** : les CF dans les inserts sont mis en présence des CM pendant toute la séquence.

**+CF - H** : les CF dans les inserts sont mis en présence des CM pendant l'hypoxie uniquement.

**+CF - R** : les CF du groupe précédent, préalablement hypoxiés, sont mis en présence des CM à la reperfusion uniquement.

**(B) Evaluation de viabilité (C) mortalité cellulaire des CM après H/R en présence de CF.**

\*  $p < 0,05$  vs H/R,  $n=6$

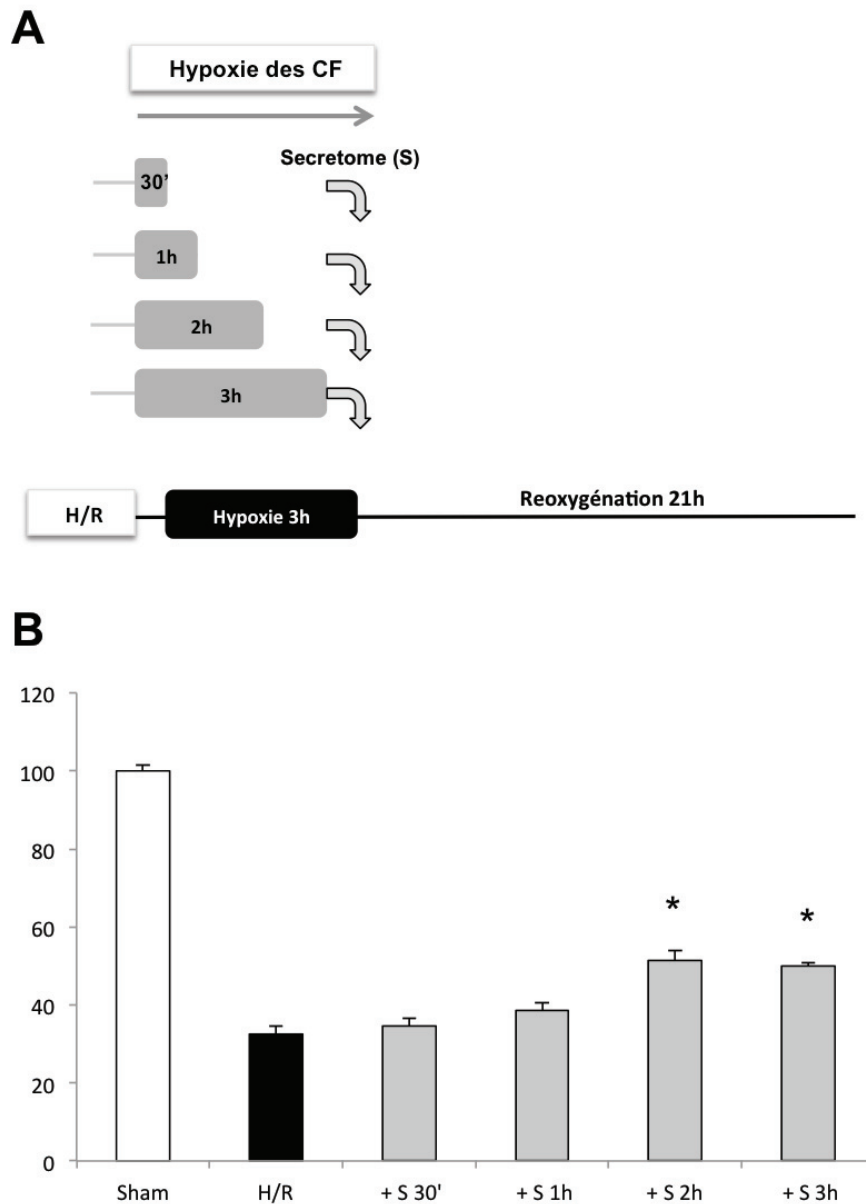
### **3) Temps d'hypoxie nécessaire aux CF pour produire des facteurs protecteurs**

Les résultats précédents ont donc soulevé de nouvelles questions : si les CF sont capables de sécréter des facteurs agissant sur la viabilité des CM sous l'effet d'un stress hypoxique, quelle est la durée d'hypoxie nécessaire pour que les CF produisent ces facteurs protecteurs ?

Pour répondre à cette question nous avons soumis les CF à des séquences d'hypoxie de durée croissante (Figure S3A). A l'issue de la séquence, le surnageant des CF est récupéré (appelé Sécrétome : S) et ajouté dans les puits des CM au moment de la réoxygénation. La viabilité des CM a été évaluée comme précédemment à l'issue des 24h de réoxygénation.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence qu'au minimum 2h d'hypoxie des CF sont nécessaires pour induire la sécrétion de facteurs protecteurs et ainsi diminuer les lésions d'hypoxie-réoxygénation des CM (Figure S3B).





**Figure supplémentaire 3 : Temps d'hypoxie des CF nécessaire pour induire une cardioprotection par leur secretome.**

**(A) Protocole expérimental.**

Les CF ont été soumis à différents temps croissants d'hypoxie et à l'issue de chacun des temps, leur sécrétome a été collecté et ajouté dans les puits de CM au moment de la réoxygénation.

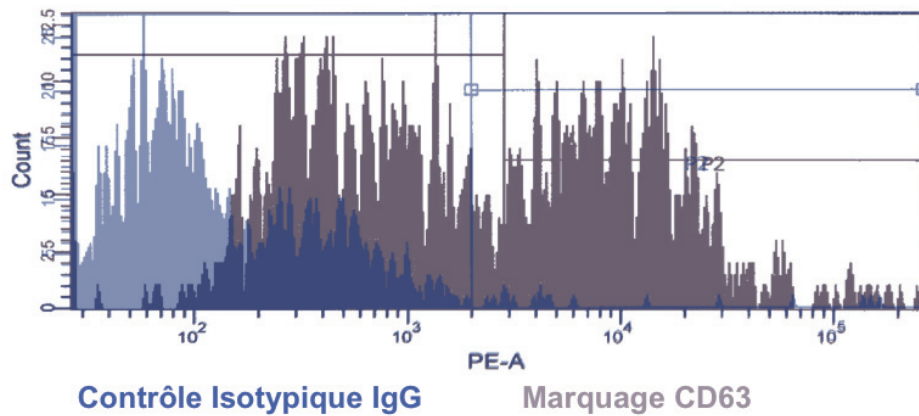
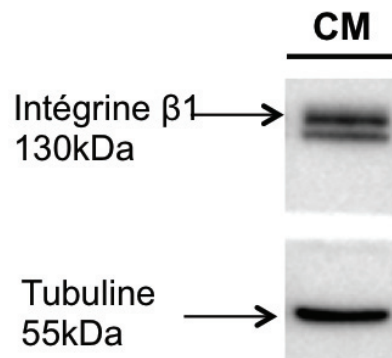
**(B) Evaluation de viabilité des CM après H/R** en présence ou non de sécrétome obtenu à partir de temps croissants d'hypoxie des CF. \*  $p < 0,05$  vs H/R,  $n=3$

#### **4) Expression des protéines du récepteur putatif de TIMP-1 à la surface du CM de rat nouveau-né**

Dans la littérature il a été montré que TIMP-1 inhibe l'apoptose et active des voies de survie cellulaire via la liaison à des protéines membranaires : l'intégrine- $\beta$ 1 et la tétraspanine CD63, pouvant former un complexe et activant des voies de signalisation intracellulaire.

Nous avons donc cherché à savoir si ces deux protéines étaient exprimées à la surface du CM de rat nouveau-nés et nous avons pu montrer par immunomarquage et détection par cytométrie en flux que CD63 était bien exprimé à la surface des CM (Figure S4A).

Par ailleurs, nous avons pu vérifier par western blot, l'expression de l'intégrine- $\beta$ 1 dans nos cellules (Figure S4B). Des expériences par immunoprécipitation nous ont permis de mettre en évidence une interaction de TIMP-1 avec l'intégrine- $\beta$ 1 dans notre modèle (Figure 6E, Article 1).

**A****B**

**Figure supplémentaire 4 : Vérification de l'expression des récepteurs putatifs de TIMP-1 par le CM de rats nouveaux nés.**

**(A) Immunomarquage de la tétraspanine CD63 à la surface du CM et détection de la fluorescence par cytométrie en flux.** Le contrôle isotypique, histogramme bleu représente l'immunomarquage avec un anticorps non spécifique correspondant à la fluorescence basale. L'histogramme gris décalé vers la droite correspond au marquage avec l'anticorps anti-CD63, reflétant une forte expression de cette protéine à la surface du CM. n=3

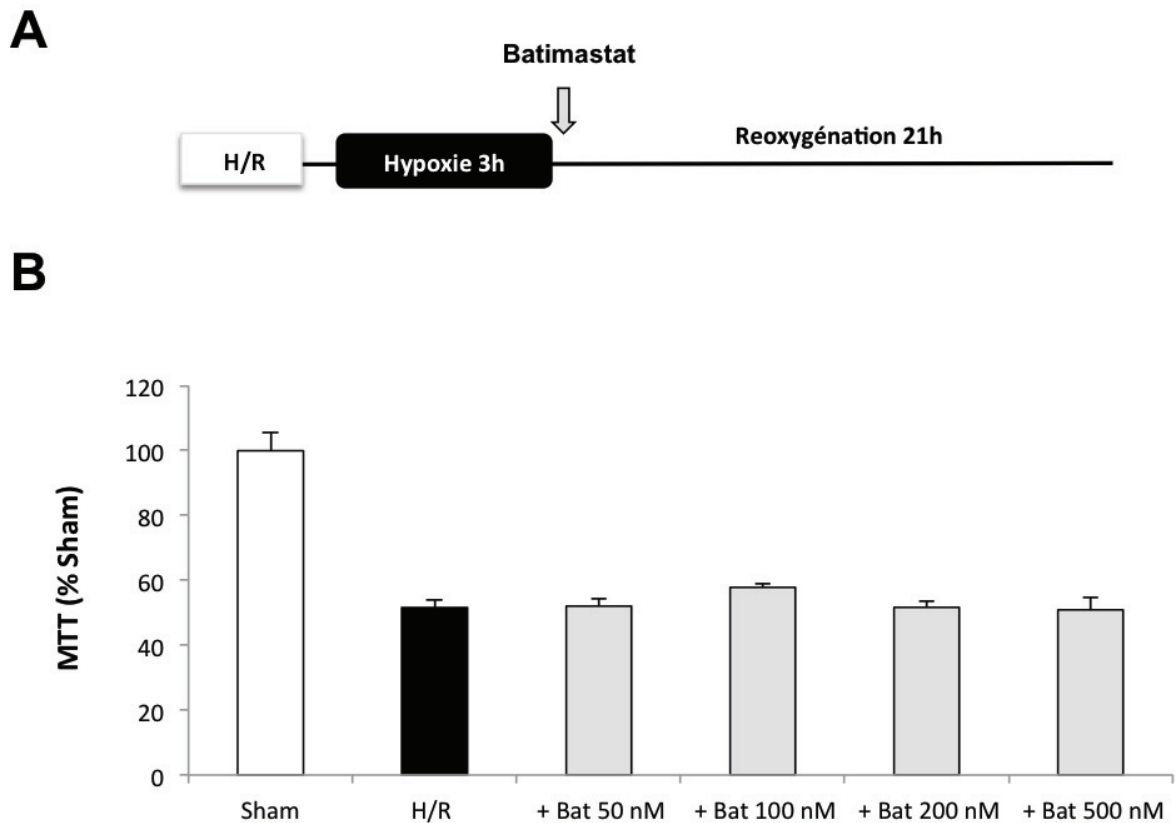
**(B) Détection par western blot de l'expression de l'intégrine  $\beta 1$  par les CM.** n=3

## 5) Effet d'un inhibiteur pharmacologique des MMPs sur la viabilité des CM après hypoxie-réoxygénation

TIMP-1 est un inhibiteur endogène des MMPs, qui comme nous l'avons vu, possède également des activités biologiques directes. Nos résultats montrent que TIMP-1 augmente la viabilité des CM en activant des voies de signalisation connues de la cardioprotection (Figure 6, Article 1), suggérant ainsi que son activité inhibitrice des MMPs ne semble pas mise en jeu dans la cardioprotection observée.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique des MMPs, le Batimastat. Celui-ci a été ajouté, de la même façon que TIMP-1, à la réoxygénation des CM, à différentes doses (Figure S5A). A l'issue de la réoxygénation la viabilité des CM a été évaluée. Nous avons montré que le batimastat n'a aucun effet sur la viabilité des CM après H/R (Figure S5B).

Ce résultat suggère que l'inhibition des MMPs n'a pas d'effet sur la viabilité des CM après hypoxie-réoxygénation dans notre modèle, soulevant alors l'importance de l'activité de TIMP-1 (indépendante de l'inhibition des MMPs) responsable de l'effet protecteur obtenu.



**Figure supplémentaire 5 : Effet dose-réponse du Batimastat (un inhibiteur pharmacologique des MMPs) sur la viabilité des CM après H/R.**

**(A) Protocole expérimental :** l'inhibiteur a été ajouté selon des doses croissantes au moment de la réoxygénation dans le milieu des CM.

**(B) Evaluation de la viabilité des CM** en présence ou non de quantité croissante d'inhibiteur ajouté à la réoxygénation. n=6

## D. Synthèse des résultats et discussion

Cette étude démontre pour la première fois que les CF participent à la communication intercellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion et contribuent à diminuer les lésions d'ischémie-reperfusion de façon paracrine. Nous avons montré que TIMP-1 semble être un des facteurs majeurs de cette cardioprotection par les CF.

Dans cette étude, deux approches, à l'aide de modèles cellulaires de CM et CF de rats nouveau-nés, ont été utilisées pour étudier le rôle des CF au cours de l'ischémie-reperfusion. Une première approche en co-culture, par contact direct entre les deux types cellulaires, nous a permis de mettre en évidence une diminution de la mort cellulaire en présence de CF après H/R (Figure S1).

Une seconde approche, en co-culture indirecte, à l'aide d'inserts nous a permis de mettre en évidence une protection paracrine des CM, par les CF, après H/R (Figure 1, Publication n°1). Nous avons pu également montrer que les facteurs protecteurs (sécrétome), produits par les CF, étaient sécrétés durant l'hypoxie (Figure S2). En effet, des expériences de cinétique ont montré que 2h minimum d'hypoxie étaient nécessaires pour induire une protection des CM par le sécrétome de CF (Figure S3). Une étude a montré que le milieu conditionné de cellules souches hypoxiques est capable d'exercer une protection plus importante que le milieu cellulaire standard, suggérant ainsi qu'un stress hypoxique puisse activer la production de facteurs protecteurs quelque soit le type de cellule utilisée<sup>464</sup>.

Nous avons montré que l'inhibition pharmacologique de la voie PI3K/Akt n'abolit pas la protection induite par le sécrétome de CF tandis que l'inhibition de la voie ERK<sub>1/2</sub> l'abolit partiellement. Ceci suggère que les facteurs protecteurs contenus dans le sécrétome de CF sont capables d'activer de multiples voies de signalisation.

L'étude réalisée *in vivo*, dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez la souris a conforté nos résultats obtenus *in vitro*, en montrant que le sécrétome de CF injecté chez la souris, en post-conditionnement, diminue la taille de l'infarctus après 24 h de reperfusion.

L'analyse des facteurs contenus dans le sécrétome de CF nous a permis de mettre en évidence TIMP-1, un inhibiteur endogène des MMPs, comme étant un facteur produit de façon significative par les CF après hypoxie. Ce facteur possède, en parallèle de son activité inhibitrice des MMPs, une activité biologique directe pouvant avoir des effets mitogénique, anti-apoptotique ou encore anti-angiogénique.

L'étude de l'effet de TIMP-1 seul *in vitro* a montré que ce facteur pouvait induire une protection des CM face à un stress d'H/R. Cette protection est abolie par l'inhibition des voies de signalisation PI3K/Akt et ERK<sub>1/2</sub> suggérant une activation de la voie RISK de cardioprotection par TIMP-1. Ces résultats corrént avec des études précédentes réalisées dans des modèles cellulaires non cardiaques où TIMP-1 exerce un effet anti-apoptotique par l'activation de la voie PI3K/Akt<sup>262,285,465,466</sup>. De plus, il a été montré que les souris KO pour TIMP-1 présentent, après ischémie-reperfusion myocardique, une accélération du remodelage ventriculaire gauche accompagnée d'une diminution de la fonction cardiaque suggérant un rôle crucial de TIMP-1 dans la régulation de la fonction et la structure du myocarde après ischémie-reperfusion<sup>467,468</sup>. Ces auteurs ont également montré que ce phénotype pouvait être amélioré par l'injection, chez ces souris, d'un inhibiteur exogène des MMPs<sup>469</sup>. Ces résultats suggèrent que l'activité de TIMP-1 inhibitrice des MMPs est également à prendre en compte dans notre étude et nécessite de nouvelles investigations. Cependant, nous avons montré que l'ajout d'un inhibiteur de MMPs *in vitro* n'induit pas de protection dans notre modèle (Figure S5). Le modèle cellulaire utilisé ainsi que l'intervalle de temps dans lequel nous nous plaçons pour observer le phénomène aigu d'H/R peuvent expliquer ces différences. En effet, les inhibiteurs de MMPs sont connus pour leur rôle dans la préservation de la fonction cardiaque au long terme après ischémie-reperfusion<sup>470</sup>. Par ailleurs, l'étude de l'effet de TIMP-1 *in vivo* confirme nos résultats obtenus *in vitro*. En effet, l'injection de TIMP-1, en post-conditionnement, réduit la taille de l'infarctus après 24 h de reperfusion. Ces résultats n'excluent donc pas que TIMP-1, en parallèle de son action positive sur la géométrie du myocarde post-infarctus, possède un rôle protecteur dans la phase aiguë d'ischémie-reperfusion.

En perspective, une étude plus fine du sécrétome de CF, afin de détecter les autres facteurs produits par les CF qui n'ont pas pu être identifiés par notre puce à cytokines, reste à

réaliser. En effet, une meilleure compréhension de la communication intercellulaire paracrine au cours de l'ischémie-reperfusion est nécessaire à la mise en place de nouvelles cibles de cardioprotection. En parallèle l'étude mécanistique de l'action cardioprotectrice de TIMP-1 reste à explorer. En effet, le mode d'action de ce facteur, possédant de multiples activités, n'est pas complètement élucidé.

En conclusion, notre étude démontre que les CF exercent une communication intercellulaire avec les CM au cours de l'I/R et contribuent à diminuer les lésions d'I/R via la production de facteurs paracrines. TIMP-1 est un facteur contribuant à cette cardioprotection.

L'étude de la communication intercellulaire entre les différents types cellulaires du myocarde au cours de l'infarctus du myocarde représente donc un nouveau challenge afin de pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques au niveau cellulaire et limiter ainsi les lésions induites par l'ischémie-reperfusion.



## **PARTIE II : TRAVAUX EN COLLABORATION**

Dans cette deuxième partie seront présentés les travaux que j'ai réalisés en parallèle de mes travaux de thèse, en collaboration avec différents groupes au sein du laboratoire. Ces travaux traitent en particulier de la cible effectrice qu'est la mitochondrie aussi bien dans la cardioprotection que dans la protection multi-organes. Ces études portent notamment sur la régulation de l'ouverture du mPTP mais également des échanges calciques entre la mitochondrie et le réticulum et leurs implications dans les lésions d'ischémie-reperfusion.

### **I. Régulation du mPTP par le complexe I et la CypD**

#### **A. Introduction**

L'inhibition de l'ouverture du mPTP est l'une des stratégies les plus efficaces pour réduire la mort cellulaire induite par l'I/R. L'approche cardioprotectrice la plus développée consiste en l'inhibition pharmacologique d'un des régulateurs majeurs du mPTP : la CypD, que ce soit par une inhibition pharmacologique (avec la CsA) ou génétique.

Récemment, des travaux réalisés au laboratoire ont montré que l'inhibition du complexe I par la roténone prévenait l'ouverture du mPTP dans plusieurs types cellulaires<sup>128</sup>. Ces travaux ont pu montrer que la roténone prévient l'ouverture du mPTP dans des tissus pauvres en CypD. De plus, de manière intéressante, la combinaison de l'inhibition du complexe I par la roténone et de l'inhibition de la CypD par la CsA retarde plus fortement l'ouverture du mPTP que la CsA seule dans des tissus riches en CypD comme le tissu cardiaque. Cette étude précédente suggère donc un effet synergique entre les inhibitions du complexe I et de la CypD dans la régulation de l'ouverture du mPTP.

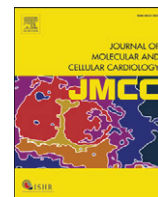
Le but de cette nouvelle étude a donc été de déterminer si cette double inhibition pouvait protéger les cellules cardiaques face aux lésions de reperfusion. Pour cela, nous avons effectué des traitements pharmacologiques avec la CsA et/ou avec la roténone en PreC et PostC, sur un modèle de cardiomyocytes isolés de souris adultes.

## **B. Publication n°2**

### **SYNERGISTIC PROTECTIVE EFFECT OF CYCLOSPORIN A AND ROTENONE AGAINST HYPOXIA-REOXYGENATION IN CARDIOMYOCYTES**

Geoffrey Teixeira, **Maryline Abrial**, Karine Portier, Pascal Chiari, Elisabeth Couture-Lepetit,  
Yves Tourneur, Michel Ovize, Abdallah Gharib

**Publiée dans Journal of Molecular and Cellular Cardiology**



## Original article

## Synergistic protective effect of cyclosporin A and rotenone against hypoxia–reoxygenation in cardiomyocytes

Geoffrey Teixeira<sup>a,b</sup>, Maryline Abrial<sup>a,b</sup>, Karine Portier<sup>a,b,c</sup>, Pascal Chiari<sup>a,b,d</sup>, Elisabeth Couture-Lepetit<sup>a,b</sup>, Yves Tourneur<sup>a,b</sup>, Michel Ovize<sup>a,b,e</sup>, Abdallah Gharib<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> INSERM UMR 1060, CarMeN, F-69373, Lyon, France<sup>b</sup> Université Lyon 1, Faculté de médecine Lyon Est, F-69373, Lyon, France<sup>c</sup> Service d'Anesthésie, VetAgro Sup (Campus vétérinaire de Lyon), Université de Lyon, F-69280, Marcy L'Etoile, France<sup>d</sup> Service d'Anesthésie Réanimation, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, F-69677, Lyon, France<sup>e</sup> Service d'Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires et CIC de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, F-69677, Lyon, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 September 2012

Received in revised form 13 November 2012

Accepted 26 November 2012

Available online 10 December 2012

## Keywords:

Cytoprotection

Mitochondrial permeability transition pore

Cyclophilin D

Complex I

Adult mice cardiomyocytes

Hypoxia/reoxygenation

## ABSTRACT

Reperfusion of the heart after an ischemic event leads to the opening of a nonspecific pore in the inner mitochondrial membrane, the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). Inhibition of mPTP opening is an effective strategy to prevent cardiomyocyte death. The matrix protein cyclophilin-D (CypD) is the best-known regulator of mPTP opening. In this study we confirmed that preconditioning and postconditioning with CypD inhibitor cyclosporin-A (CsA) reduced cell death after hypoxia–reoxygenation (H/R) in wild-type (WT) cardiomyocytes and HL-1 mouse cardiac cell line as measured by nuclear staining with propidium iodide. The complex I inhibitor rotenone (Rot), alone, had no effect on HL-1 and WT cardiomyocyte death after H/R, but enhanced the native protection of CypD-knocked-out (CypD KO) cardiomyocytes. Reduction of cell death was associated with a delay of mPTP opening challenged by H/R and observed by the calcein loading  $\text{CoCl}_2$ -quenching technique. Simultaneous inhibition of complex I and CypD increased in a synergistic manner the calcium retention capacity in permeabilized cardiomyocytes and cardiac mitochondria. These results demonstrated that protection by complex I inhibition was CypD dependent.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Mitochondria are recognized as critical mediators of cardiomyocyte death when the myocardium is subjected to ischemia–reperfusion injury. During reperfusion, mitochondrial dysfunction leads to the formation of a non-selective mega-channel, the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). The mPTP opening is triggered by calcium overload and overproduction of reactive oxygen species (ROS) [1]. This leads to the collapse of mitochondrial membrane potential, ATP deprivation and release of pro-apoptotic molecules into the cytosol which to a certain point lead to cell death [2].

Preventing mPTP opening is an efficient strategy to protect the heart against lethal ischemia–reperfusion injury [3,4]. For example, inhibition of mPTP opening via ischaemic preconditioning (PreC) and post-conditioning (PostC) decreased the myocardial infarct size

after ischemia–reperfusion [3,5]. Although the molecular composition of the mPTP remains unclear, the matrix protein cyclophilin-D (CypD) is the best defined regulatory component of mPTP [6–8]. CypD genetic ablation or pharmacological inhibition with cyclosporin A (CsA) reduces the infarct size in laboratory animals submitted to myocardial ischemia–reperfusion [8,9]. Other mPTP modulators such as benzodiazepine receptor [10], hexokinase I and II [11], phosphate carrier [12], and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitors [13] can regulate the mPTP opening.

Recently, we demonstrated that rotenone (Rot), a mitochondrial respiratory chain complex I inhibitor, is a more potent mPTP inhibitor than CsA in various cell types [14]. Interestingly, we also showed that tissues in which Rot alone does not appear to affect mPTP opening, such as cardiac mice mitochondria, are characterized by high expression levels of CypD, suggesting that CypD and complex I might interact to modulated mPTP opening in some conditions.

Immortalized HL-1 mouse cardiomyocyte cell line exhibits characteristics of differentiated cardiac cells but shows metabolic differences from adult cardiomyocytes [15]. In these cells, glycolytic enzyme activity is increased whereas oxidative phosphorylation is very low, especially at the level of complex I [16]. Glycolysis must serve as the main energy-providing system in HL-1. Unfortunately, the level of CypD is unknown in these cells. Our studies were also

*Abbreviations:* mPTP, mitochondrial permeability transition pore; PreC, preconditioning; PostC, postconditioning; CypD, cyclophilin-D; CsA, cyclosporin-A; Rot, rotenone; WT, wild-type; KO, knocked-out; H/R, hypoxia/reoxygenation;  $t_{\text{mPTP50}}$ , time to 50% mitochondrial permeability transition pore opening; CRC, calcium retention capacity.

\* Corresponding author at: INSERM UMR 1060, CarMeN, Laboratoire de Physiologie, Lyon Est, 8 av Rockefeller, 69373, Lyon, France. Tel.: +33 478785610.

E-mail address: [abdallah.gharib@univ-lyon1.fr](mailto:abdallah.gharib@univ-lyon1.fr) (A. Gharib).

performed on adult wild-type (WT) and CypD-knocked-out (CypD KO) mice cardiomyocytes. Thereby, we were able to compare three cardiac models with different levels of CypD and complex I.

In the present study, we investigated whether CypD inhibition (CypD genetic ablation and CsA treatment) and/or complex I inhibition (by Rot) reduced cell death by modulating mPTP opening. These experiments were performed using an *in vitro* hypoxia–reoxygenation (H/R) adult mice cardiomyocyte model or HL-1 cell-line model with PreC and pharmacological treatment of reperfusion injury (PostC) protocols, as well as mitochondria isolated from these cells.

In this study, we present evidence that inhibition of complex I prevents cardiomyocyte death after H/R in a CypD dependent manner. Combined inhibition of complex I and CypD might represent a new therapeutic cardioprotective strategy.

## 2. Materials and methods

The present study was performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996). All the experimental procedures were approved by the ethic committee of Lyon I Claude Bernard University (BH-2007-07).

### 2.1. Animals

WT and CypD KO male mice (8–12 weeks, 20–30 g) were used throughout the study. B6129BF1/J WT mice were used as controls (Charles River, L'Arbresle, France). CypD KO mice were a generous gift from the laboratory of Stanely Korsmeyer [17].

### 2.2. Isolating adult murine ventricular cardiomyocytes

Adult WT and CypD KO mice were pre-medicated with heparin (100 USP units/mouse) (Sanofi Winthrop, Gentilly, France) administered intraperitoneally. Anesthesia was induced with sodium pentobarbital (70 mg/kg) (Sanofi Santé Animale, Libourne, France). A thoracotomy was performed and the heart collected. Ventricular cardiomyocytes were isolated using enzymatic digestion according to previously described procedures [13].

### 2.3. HL-1 cell line

Immortalized HL-1 cardiomyocyte cell line derived from mouse atrial tumors was a gift from Dr. W.C. Claycomb (Louisiana State University Medical Center). Cells were cultured in Claycomb medium (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) supplemented with 10% fetal calf serum, 4 mM L-glutamine, penicillin and streptomycin (100 U–0.1 mg/ml), 0.3 mM ascorbic acid and 10  $\mu$ M norepinephrine, at 37 °C in a humid atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air as previously described [18]. Cells were split at a mean density of 15,000/cm<sup>2</sup> in 35 mm Petri dishes coated with a mixture of 0.02% gelatin and fibronectin (12.5  $\mu$ g/ml) and were allowed to reach 75% confluence before the experiments involving H/R.

### 2.4. Western Blot analysis

Cells were lysed with a lysis buffer containing in mM: Nonidet P-40 (1%), 20 Tris HCl, 138 NaCl, 2.7 MgCl<sub>2</sub>, glycerol (5%), 5 EDTA, 1 Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>V, 20 NaF, 1 DTT, protease inhibitor (Sigma Aldrich) and phosphatase inhibitors (Roche diagnostic, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Protein concentration was normalized by determination of the total protein concentration by BCA assay (Bicinchoninic acid, Thermo scientific, Rockford, IL) method. Per lane, 15  $\mu$ g of total protein migrate in sodium dodecyl sulfate, 12% polyacrylamide gel (SDS-PAGE). After migration, proteins were blotted to PVDF membrane by electrotransfer. Proteins were detected after labeling by specific primary antibodies revealed by secondary HRP coupled

antibodies (HRP-anti-rabbit and HRP-anti-mouse from GE Healthcare, Orsay, France). The primary antibodies used were: mouse anti-VDAC (1:1000) and mouse anti-CypD (1:2000) AP1035 from Calbiochem (San Diego, CA). The revelation was obtained by addition of reaction substrate (ECL plus Kit western blotting detection systems from GE Healthcare, Pittsburgh, PA). Evaluation of protein amount was determined by using ImageLab software from BioRad (Hercules, CA). Integrated density of each band was converted to arbitrary unit to evaluate the amount of revealed protein.

### 2.4.1. Oxidative phosphorylation

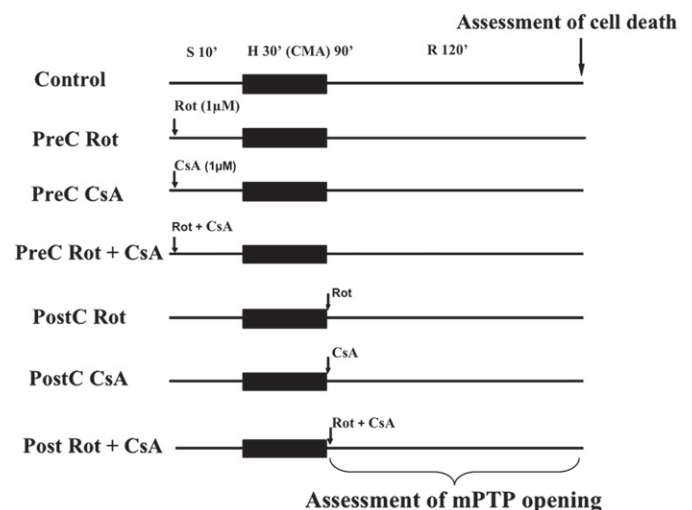
Mitochondrial oxygen consumption was measured at 25 °C using a Clark-type oxygen electrode. Permeabilized cardiomyocytes or HL-1 (150  $\mu$ g protein) with digitonin (40  $\mu$ M) were incubated in 2 ml of respiration buffer containing, in mM: 100 KCl, 50 MOPS, 1 EGTA, 5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 1 mg/ml defatted BSA. Glutamate/malate/pyruvate (5 mM each) were used as electron donors to complex I in the electron transport chain. Respiration state 3 is initiated with addition of 1 mM ADP and expressed as nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>.

### 2.5. Time-lapse microscopy

For hypoxia–reoxygenation and cell death quantification, cells were placed in a thermostated chamber (37 °C) mounted on the stage of a IX50 Olympus microscope (Olympus, Tokyo, Japan), as previously described [13]. The chamber was connected to a constant stream of O<sub>2</sub> (21%), N<sub>2</sub> (74%) and CO<sub>2</sub> (5%). Oxygen in the solution was measured using a fiber optic sensor system (Ocean Optics, Inc., Dunedin, FL). A 12-bit cooled CCD camera (Orca-R<sup>2</sup>, Hamamatsu, Japan) allowed image acquisition. Image acquisition and analysis was performed with ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

### 2.6. Hypoxia–reoxygenation protocol

The cells were perfused with a Tyrode's solution containing in mM: 130 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub> and 10 glucose, pH 7.4, at 37 °C for a 10 min-stabilization period. In order to induce hypoxia, the bubbling gas was replaced by O<sub>2</sub> free bubbled Tyrode and under a constant stream of the same gas, composed of 95% N<sub>2</sub>



**Fig. 1.** Experimental protocol (hypoxia–reoxygenation). After a 10-min stabilization (S) period all groups underwent 30 (cardiomyocytes) or 90 min (HL-1) of hypoxia followed by 120 min of reoxygenation. H: hypoxia; R: reoxygenation; Rot: rotenone; CsA: cyclosporin A; PreC: preconditioning by injection of Rot (1  $\mu$ M) or CsA (1  $\mu$ M) or Rot + CsA 10 min before hypoxia; PostC: postconditioning or pharmacological treatment of reperfusion injury by injection of Rot (1  $\mu$ M) or CsA (1  $\mu$ M) or Rot + CsA at the beginning of reoxygenation. Cell death was quantified at the end of hypoxia–reoxygenation and mPTP opening was followed during reoxygenation period.

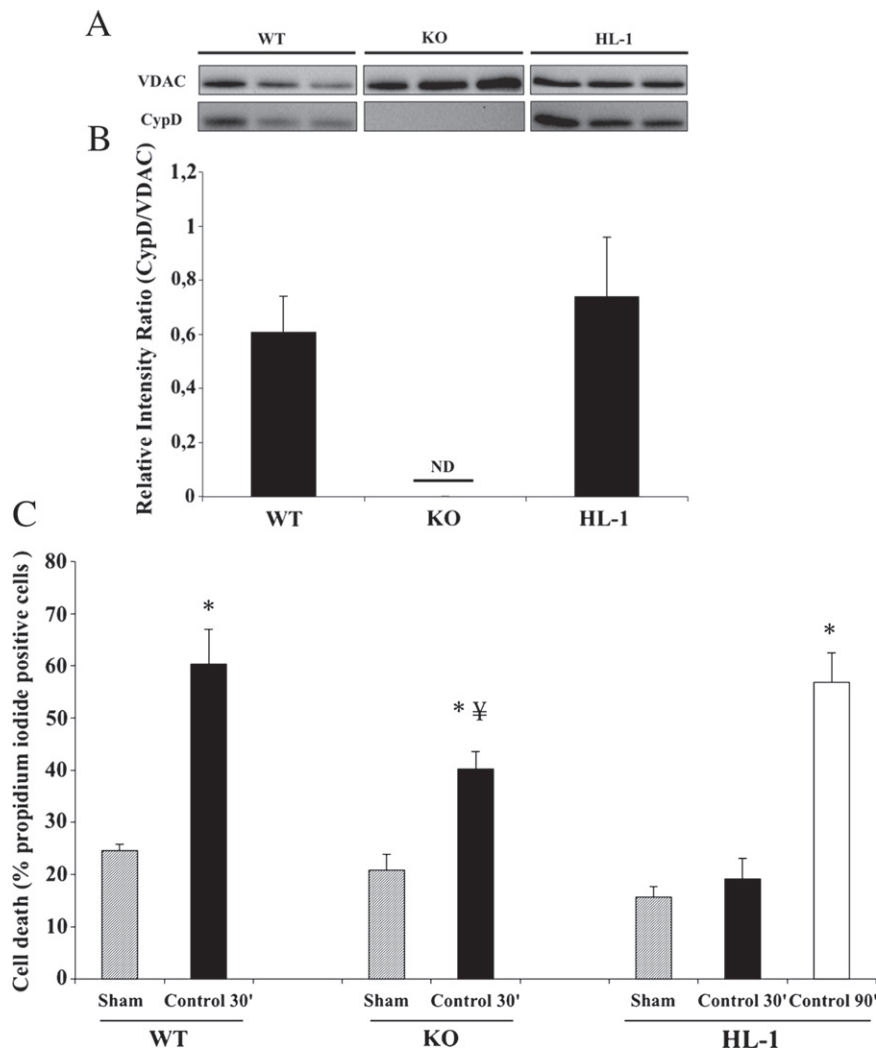
and 5% CO<sub>2</sub> in the chamber for 90 min (for HL-1) and 30 min (for WT or CypD KO cardiomyocytes) respectively. At the end of the hypoxia period, a 120-min reoxygenation time was allowed by restoring rapidly the Tyrode's flow and oxygen fraction to 21%. Pharmacological PreC and pharmacological treatment of reperfusion injury (PostC) were performed with Rot (1 μM) and/or CsA (1 μM) (Novartis, Basel, Switzerland) given either 10 min before hypoxia (PreC) or at the beginning of the reoxygenation phase (PostC) respectively (Fig. 1).

### 2.7. Assessment of cell death

The cell death was quantified, at the end of the hypoxia-reoxygenation period, by the number of cells staining positive for propidium iodide (5 μM), which permeates only the damaged cells. Propidium iodide fluorescence was excited at 520 to 550 nm and recorded at 580 nm. Images were acquired every 5 min after an illumination time of 1 s per image. For each treatment group, approximately 800 cells were counted. This measure was repeated on 4 to 5 separate experiments per treatment group.

### 2.8. Assessment of mPTP opening

Assessment of mPTP opening in cardiac myocytes was made by means of the established loading procedure of the cells with calcein acetoxymethyl ester (calcein-AM) and CoCl<sub>2</sub> resulting in mitochondrial localization of calcein fluorescence [19,20]. Cells were loaded for 30 min at 37 °C with 1 μM calcein-AM and 1 mM CoCl<sub>2</sub> in order to selectively load the mitochondria with calcein and quenching the cytosolic calcein with CoCl<sub>2</sub>. The detection of calcein fluorescence was achieved by the use of a 460–490 nm excitation and a 510 nm emission filter. Images were acquired every 2 min after an illumination time of 100 ms per image. Fluorescence was integrated over a region of interest (approximately 80 μm<sup>2</sup>) for each cardiomyocyte and the fluorescence background corresponding to an area without cells was subtracted. For comparison among groups, the fluorescence intensity minus background was normalized according to the initial fluorescence value. For each treatment we calculated the global response by averaging the fluorescence changes obtained from all the cardiac myocytes contained in a field (at least 10 cells). This measure was repeated on 4 to 5 separate experiments per treatment group.



**Fig. 2.** Level of CypD expression and effect of hypoxia-reoxygenation on cell death in cardiomyocytes and HL-1. (A) Western Blot analysis expression of CypD in WT and KO cardiomyocytes and HL-1. VDAC was used as a loading control. (B) CypD expression level of WT and KO adult cardiomyocytes and HL-1 cell line. The data are presented as mean ± SEM of 3 independent experiments. The relative density of the 17-kDa CypD protein was divided by the density of 36-kDa VDAC protein, ND: not detected. (C) Cardiomyocytes and HL-1 were loaded with propidium iodide. After a 10-min normoxic period and a 30 or 90-min hypoxia, a 120-min reoxygenation was induced. The cell death was quantified, at the end of the hypoxia-reoxygenation period. Each value is the mean ± SEM of four to five experiments. \**p* < 0.05 versus corresponding Sham and ‡*p* < 0.05 versus Control WT.



The time to 50% mPTP opening ( $t_{mPTP50}$ ) was measured as the average reoxygenation time necessary to induce a 50% decrease in calcein fluorescence in the same field. Image analysis was performed using the freeware Image J v.1.44 (NIH, Bethesda, MD).

### 2.9. Isolation of mitochondria

Preparation of mitochondria was adapted from a previously described procedure [21]. Briefly, the heart was collected and placed in a cold buffer containing in mM: 70 sucrose, 210 mannitol, and 10 EGTA in 50 Tris/HCl, pH 7.4. The atria and the aorta were removed and the tissue was finely minced and then homogenized in the same buffer using a Potter Elvehjem. The homogenate was centrifuged at 1300 g for 3 min and the supernatant at 10,000 g for 10 min. The mitochondrial pellet was suspended in a cold buffer containing in mM: 70 sucrose and 210 mannitol in 50 Tris/HCl, pH 7.4 and centrifuged at 6500 g for 10 min. Mitochondrial protein concentration was measured by the Bradford method using bovine serum albumin as a standard [22].

### 2.10. Calcium retention capacity measurement (CRC)

Extra-mitochondrial  $Ca^{2+}$  measurement was performed with a spectrofluorometer (excitation: 506 nm; emission: 530 nm) [23]. The incubation medium of permeabilized cardiomyocytes or heart mitochondria contained, in mM: 150 sucrose, 50 KCl, 2  $KH_2PO_4$ , 20 Tris/HCl, 5 succinate-Tris and 0.25  $\mu M$  Calcium Green-5N. Cells (150  $\mu g$  protein) in solution with digitonin (40  $\mu M$ ), or isolated mitochondria (250  $\mu g$  protein) were added in 2 ml of this incubation medium. Rot (1  $\mu M$ ) and/or CsA (1  $\mu M$ ) were added to the whole preparation. After 2 min of incubation, the CRC was measured by adding  $Ca^{2+}$  pulses every minute until mPTP opening. The CRC was expressed as  $nmol Ca^{2+} mg protein^{-1}$ .

### 2.11. Statistical analysis

All values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed using one-way analysis variance (ANOVA), followed by Bonferroni post hoc test to analyze differences between groups.  $p < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

The expression level of CypD was measured in the three cellular cardiac models. As expected, CypD was absent in CypD KO cardiomyocytes while it was equally expressed in WT cardiomyocytes and HL-1 (Fig. 2A and B).

### 3.1. Cell death after hypoxia–reoxygenation

We investigated the effect of H/R on cell death in the three cell types. As seen in Fig. 2C, 30 min of hypoxia induced a significant mortality in WT when compared to Sham ( $60 \pm 6$  versus  $24 \pm 1\%$ ,  $p < 0.05$ ). Cell death was significantly reduced in CypD KO versus WT, as expected ( $60 \pm 6$  versus  $40 \pm 3\%$ ,  $p < 0.05$ ). HL-1 cells appeared more resistant to H/R with a 30 min-hypoxia insult being insufficient to cause significant cell death. A sustained 90 min-hypoxia was necessary to significantly increase cell death in this cell line ( $56 \pm 5$  versus  $19 \pm 3\%$ , compared to Sham,  $p < 0.05$ ).

### 3.2. Respiration at the level of complex I in cardiomyocytes and HL-1

HL-1 cells exhibited a low capacity of oxidative phosphorylation initiated by complex I substrates (glutamate/malate/pyruvate) in comparison with WT ( $24 \pm 2$  vs.  $128 \pm 6$   $nmol O_2/min/mg prot$ ,  $p < 0.05$ ;

Fig. 3). There was no difference between WT and CypD KO state 3 respirations.

### 3.3. Effect of pharmacological preconditioning and pharmacological treatment of reperfusion injury induced by cyclosporin A and/or rotenone on cell death in cardiomyocytes and HL-1

Pharmacological PreC (Fig. 4A) with CsA reduced cell death on WT cardiomyocytes ( $37 \pm 2$  versus  $60 \pm 6\%$ ,  $p < 0.05$ ) and in HL-1 compared to Control ( $29 \pm 2$  versus  $56 \pm 5\%$ ,  $p < 0.05$ ). The complex I inhibitor Rot alone had no effect on WT and HL-1 cells, but interestingly, decreased cardiomyocyte death after PreC in CypD KO group ( $23 \pm 1$  versus  $40 \pm 3\%$  in Control,  $p < 0.05$ ).

Pharmacological treatment of reperfusion injury (Fig. 4B) with CsA reduced cell death on WT cardiomyocytes ( $37 \pm 4\%$  versus  $60 \pm 6\%$ ,  $p < 0.05$ ) and in HL-1 compared to Control ( $42 \pm 2$  versus  $56 \pm 5\%$ ,  $p < 0.05$ ). Pharmacological treatment of reperfusion injury with Rot had no effect on cell death in the three cell types.

### 3.4. mPTP opening after hypoxia–reoxygenation in cardiomyocytes

Since we obtained the similar results in terms of cell death and protection by either CsA and Rot, as PreC or pharmacological treatment of reperfusion injury for WT cardiomyocytes and HL-1, we then decided to restrict the mPTP opening studies to WT and CypD KO cardiomyocytes. Figs. 5 and 6 illustrate changes in mitochondria fluorescence of cardiomyocytes loaded with calcein-cobalt and subjected to H/R after PreC and pharmacological treatment of reperfusion injury. Reoxygenation induced a decrease in calcein fluorescence corresponding to mPTP opening. In WT cardiomyocytes, mPTP opening was significantly delayed by PreC with CsA or Rot + CsA in comparison to Control ( $44 \pm 3$  and  $40 \pm 1$  min versus  $27.3 \pm 1$  min, respectively,  $p < 0.05$ ). mPTP opening was significantly delayed in Control CypD KO cardiomyocytes, compared to Control WT ( $42 \pm 2$  versus  $27 \pm 1$  min,  $p < 0.05$ ; Fig. 5A and B). In CypD KO cells, this delay was further increased by Rot used in PreC ( $53 \pm 0.6$  versus  $42 \pm 2$  min,  $p < 0.05$ ). The same results were observed with pharmacological treatment of reperfusion injury protocol (Fig. 6A and B).

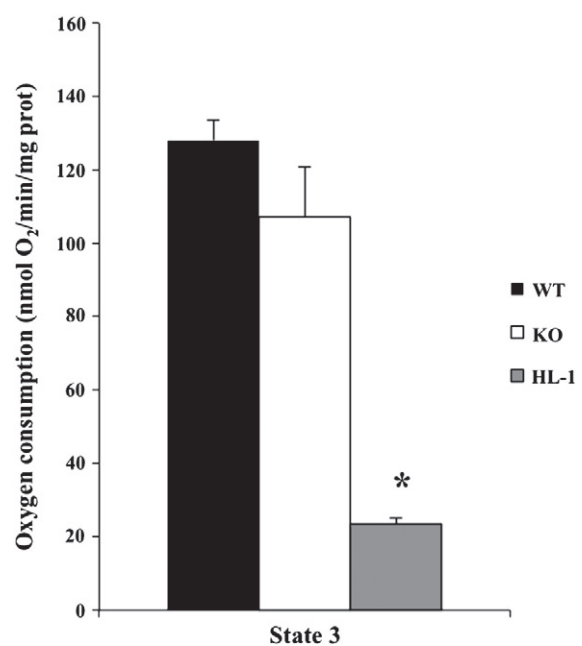
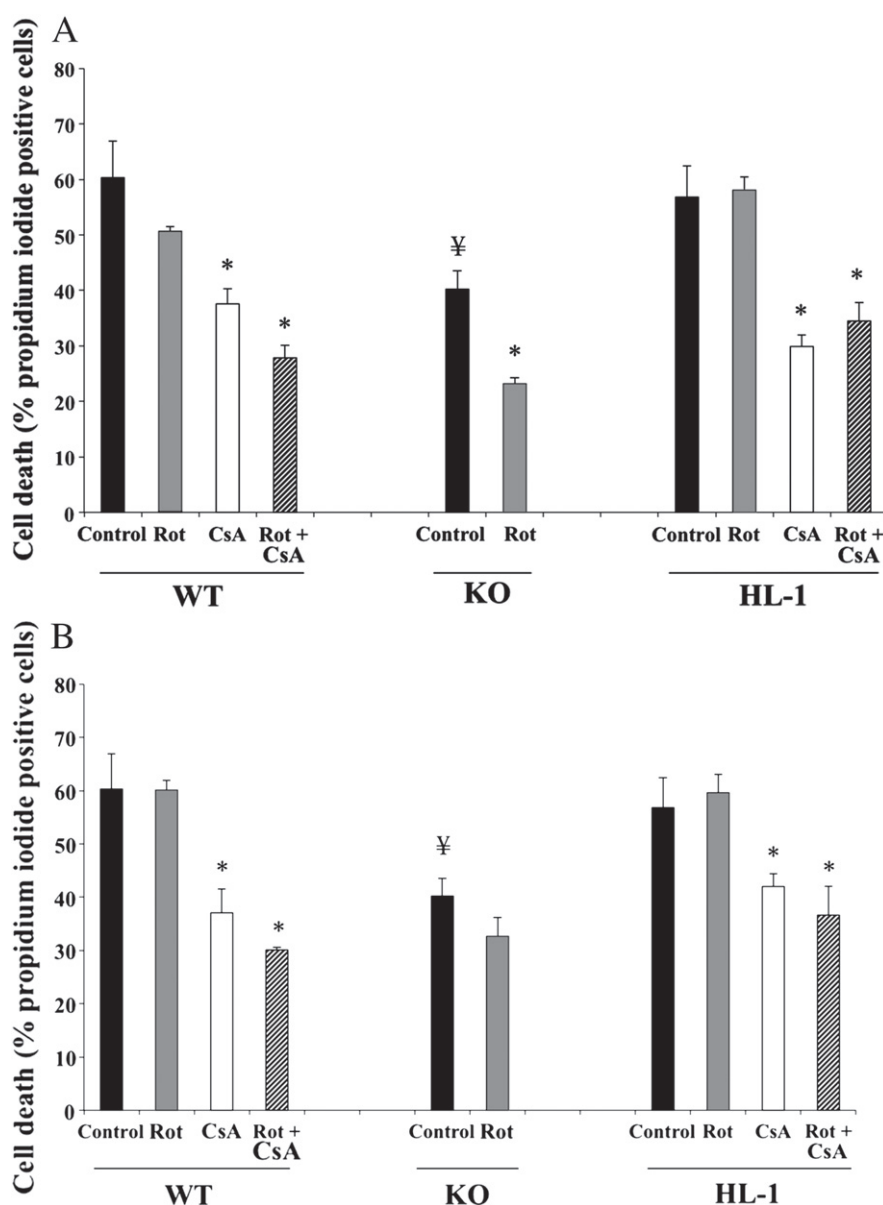


Fig. 3. Oxidative phosphorylation capacity in cardiomyocytes and HL-1. Mitochondrial respiration using complex I substrates glutamate/malate/pyruvate. Respiration state 3 is initiated with addition of 1 mM ADP and expressed as  $nmol O_2 min^{-1} mg protein^{-1}$ . Each value is the mean  $\pm$  SEM of four to five experiments. \* $p < 0.05$  versus WT.



**Fig. 4.** Effect of pharmacological preconditioning and pharmacological treatment of reperfusion injury in different cells with cyclosporin A and/or rotenone on cell death. Cardiomyocytes and HL-1 were loaded with propidium iodide. After a 10-min normoxic period and a 30 (cardiomyocytes) or 90-min (HL-1) hypoxia, a 120-min reoxygenation was induced. (A) Pharmacological PreC was performed with Rot (1  $\mu$ M) and/or CsA (1  $\mu$ M) 10 min before hypoxia. (B) Pharmacological treatment of reperfusion injury was performed with Rot (1  $\mu$ M) and/or CsA (1  $\mu$ M) the ten first minutes of reoxygenation. Each value is the mean  $\pm$  SEM of four to five experiments. \* $p$ <0.05 versus corresponding Control and  $\neq p$ <0.05 versus Control WT.

except that Rot had no effect on CypD KO cardiomyocytes. mPTP opening kinetics were positively correlated with cell death.

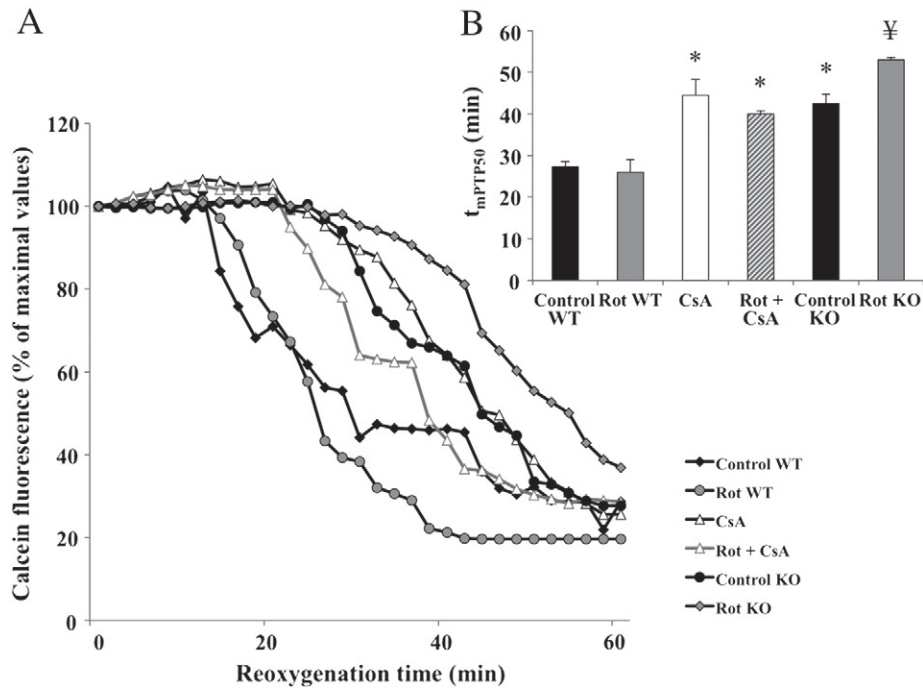
### 3.5. mPTP opening in isolated heart mitochondria and permeabilized cardiomyocytes

The amount of  $\text{Ca}^{2+}$  required to open the mPTP in isolated mitochondria averaged  $782 \pm 69$  nmol/mg prot in Basal WT group. This  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was significantly increased in both CsA and Basal CypD KO groups, averaging  $1471 \pm 80$  and  $1651 \pm 84$  nmol/mg proteins respectively in comparison to Basal WT ( $p$ <0.05; Fig. 7A). The amount of  $\text{Ca}^{2+}$  required to open the mPTP was significantly higher in the presence of both CsA and Rot than with CsA alone ( $2184 \pm 38$  versus  $1471 \pm 80$  nmol/mg proteins,  $p$ <0.05). Rot alone had no effect on calcium retention capacity in WT but significantly

increased CRC in CypD KO ( $2494 \pm 184$  versus  $1651 \pm 84$  nmol/mg proteins,  $p$ <0.05).

The same results were observed in permeabilized cardiomyocytes but a higher amount of  $\text{Ca}^{2+}$  was required to open mPTP (Fig. 7B). It was significantly increased in both CsA and CypD KO groups, averaging  $2467 \pm 110$  and  $2319 \pm 119$  nmol/mg proteins respectively versus Basal WT  $1799 \pm 68$  nmol/mg proteins ( $p$ <0.05). The amount of  $\text{Ca}^{2+}$  required to open the mPTP was higher in the presence of both CsA and Rot than with CsA alone ( $3717 \pm 229$  versus  $2466 \pm 366$  nmol/mg proteins,  $p$ <0.05). Rot alone had no effect on calcium retention capacity in WT but significantly increased CRC in CypD KO ( $3981 \pm 156$  versus  $2319 \pm 119$  nmol/mg proteins,  $p$ <0.05).

Experiments performed with a scavenger of ROS, the MnTBAP, proved that scavenging of ROS has no effect on CRC and no additional effect on CsA (data not shown).

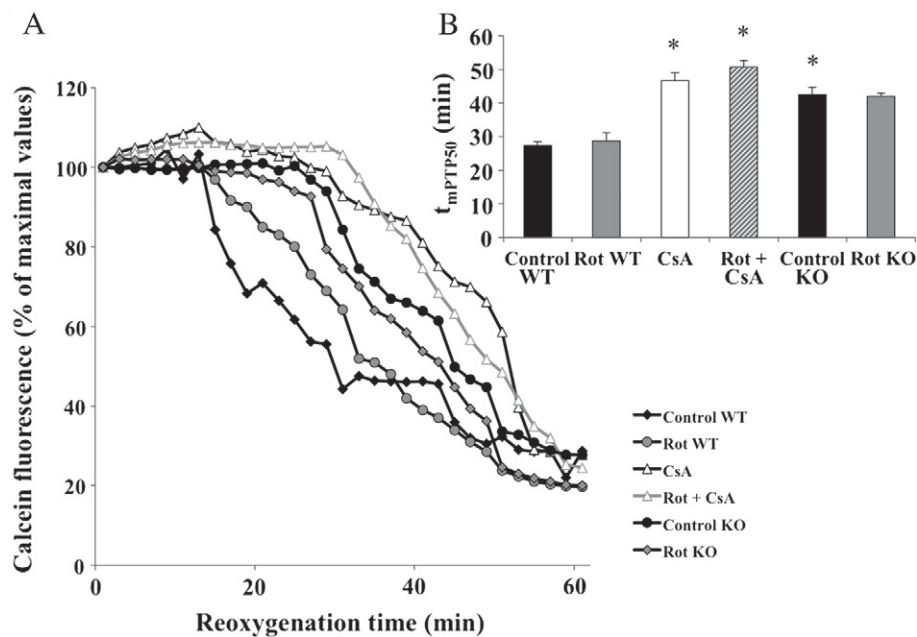


**Fig. 5.** Effect of pharmacological preconditioning with cyclosporin A and/or rotenone on mPTP opening in WT and KO cardiomyocytes. Cardiomyocytes were loaded with calcein-AM and  $\text{CoCl}_2$ . After a 10-min normoxic period and 30 min hypoxia (omitted for clarity, no calcein change being observed), a 120-min reoxygenation was induced. Pharmacological preconditioning was performed with Rot (1  $\mu\text{M}$ ) and/or CsA (1  $\mu\text{M}$ ) 10 min before hypoxia. For each treatment we calculated (A) the kinetic of mPTP opening by averaging the fluorescence changes obtained from all of the cardiomyocytes contained in a field and (B) the  $t_{mPTP50}$  as the average reoxygenation time necessary to induce a 50% decrease in calcein fluorescence in the same field. Each value is the mean  $\pm$  SEM of four to five experiments. \* $p < 0.05$  versus Control WT and ¥ $p < 0.05$  versus Control KO.

#### 4. Discussion

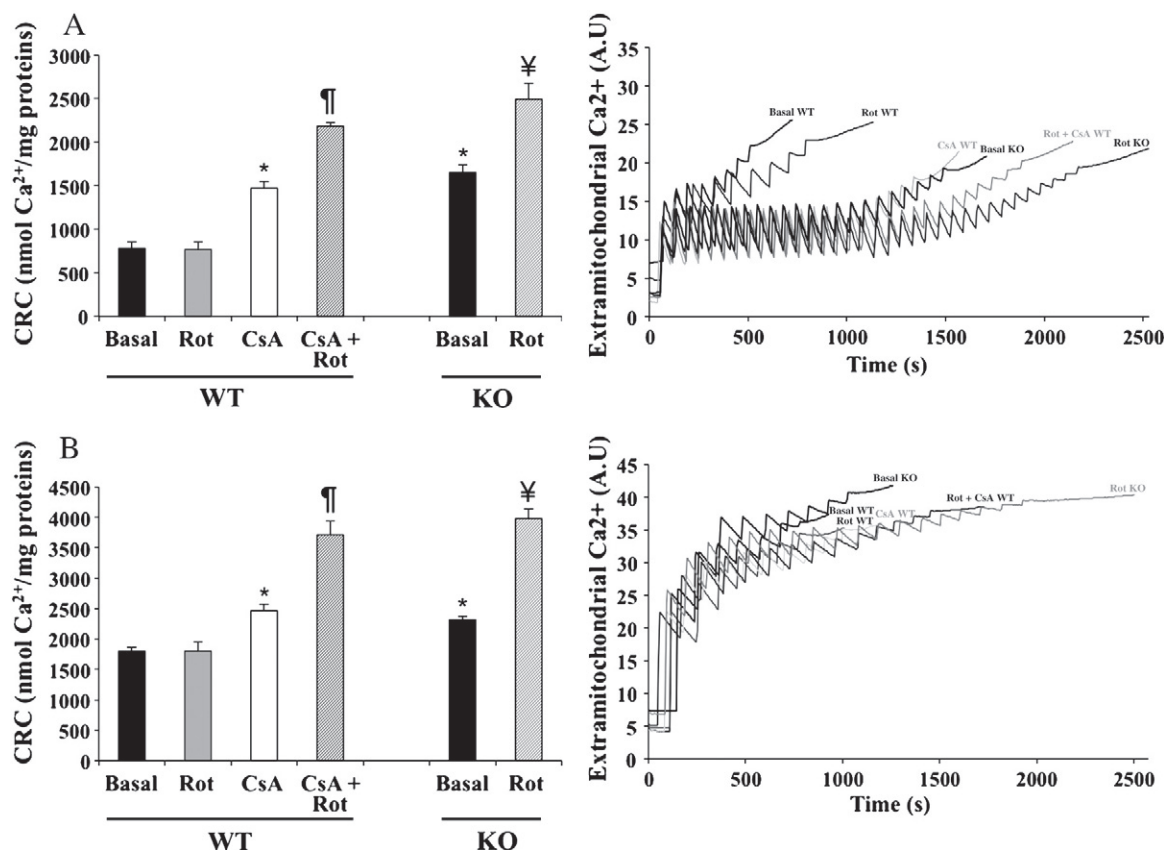
Ischemia and reperfusion injury induce cardiomyocyte death. Mitochondria are increasingly recognized as central regulators of cell death in cardiomyocytes via opening of mPTP. Many studies

have suggested that inhibition of mPTP is an effective strategy to provide cardioprotection [24–26]. Although the exact composition of mPTP is not completely known, CypD appears as a major regulatory component of mPTP [3]. Furthermore, studies have suggested that complex I regulates the mPTP in various cell lines. Fontaine et al.,



**Fig. 6.** Effect of pharmacological treatment of reperfusion injury with cyclosporin A and/or rotenone on mPTP opening in WT and KO cardiomyocytes. Cardiomyocytes were loaded with calcein-AM and  $\text{CoCl}_2$ . After a 10-min normoxic period and 30-min hypoxia a 120-min reoxygenation was induced. Pharmacological treatment of reperfusion injury was performed the ten first minutes of reoxygenation with Rot (1  $\mu\text{M}$ ) and/or CsA (1  $\mu\text{M}$ ). For each treatment we calculated (A) the kinetic of mPTP opening by averaging the fluorescence changes obtained from all of the cardiomyocytes contained in a field and (B) the  $t_{mPTP50}$  as the average reoxygenation time necessary to induce a 50% decrease in calcein fluorescence in the same field. Each value is the mean  $\pm$  SEM of four to five experiments. \* $p < 0.05$  versus Control WT.





**Fig. 7.** Effect of cyclophilin-D and complex I inhibition on Ca<sup>2+</sup>-induced mPTP opening in isolated heart mitochondria and permeabilized cardiomyocytes. Mitochondria (250  $\mu$ g) or permeabilized cardiomyocytes (150  $\mu$ g) with digitonin (40  $\mu$ M) were added in incubation medium with in 0.25  $\mu$ M Calcium Green-5N. After 2 min of incubation, the CRC was measured by adding 10 nmol (mitochondria, A) or 20 nmol (cardiomyocytes, B) Ca<sup>2+</sup> pulses every minute until mPTP opening. *Inset*, typical example of Ca<sup>2+</sup>-induced mPTP opening recording in mitochondria or permeabilized cardiomyocytes. Each value is the mean  $\pm$  SEM of five to six experiments. \* $p < 0.05$  versus Basal WT, † $p < 0.05$  versus Basal KO and ‡ $p < 0.05$  versus CsA.

have proposed that complex I might be a structural component of mPTP [27]. In this study, we demonstrated that the combined pharmacological inhibition of CypD and complex I decreased cell death in adult mice cardiomyocytes and HL-1 cardiac cell-line after H/R. This protective effect was associated with a delay in mPTP opening and an enhancement of mitochondrial resistance to Ca<sup>2+</sup> overload.

We demonstrated that CypD expression is high and equal in adult WT mice cardiomyocytes and cardiac cell-line HL-1. 30 min of hypoxia followed by 120 min of reoxygenation did not induce cell death in HL-1 whereas mortality was important in WT cardiomyocytes. Monge et al., demonstrated that HL-1 exhibits a lower capacity of oxidative phosphorylation and a higher capacity glycolytic system than adult cardiomyocytes [16]. HL-1 protection against a short period of hypoxia may result from this glycolytic phenotype. In addition, our data confirmed a previous study showing that respiration stimulated with complex I substrates was 4 times lower in HL-1 than in cardiomyocytes [16]. Eimre et al., suggested a weak deficiency in complex I in HL-1 [28]. With regard to these results, complex I may have a leading role in cellular protection relative to its oxidative phosphorylation capacity. In addition, we demonstrated the native protection of CypD KO cardiomyocytes against H/R and therefore confirmed the role of CypD in cell death. CypD genetic inhibition results in a decrease in cell death during ischemia-reperfusion in adult cardiomyocytes [29], smaller myocardial infarct size and resistance to calcium-induced mPTP opening [8]. This statement is further supported by the CsA cardioprotective effect during PreC and pharmacological treatment of reperfusion injury. Pharmacological PreC and pharmacological treatment of reperfusion injury with Rot alone did not protect WT cardiomyocytes and HL-1 against H/R. Recently, several studies showed that Rot did not affect

mPTP and cell death in tissues like heart that contain high levels of CypD [30,31]. Our data confirmed that Rot had a protective effect only when CypD is absent or inhibited. In regard with these results we propose that protection induced by inhibition of complex I is CypD dependent. In fact, the pharmacological action of Rot on mPTP is dependent of CypD inhibition or ablation but her action target is influencing by a part outside the CypD, the complex I. This study reports for the first time that resistance to H/R of CypD KO cardiomyocytes may be further increased by complex I inhibition during PreC. Pharmacological treatment of reperfusion injury with Rot enhanced, but to a lesser extent than PreC, the native cardioprotection of CypD KO. Complex I is well known to be the initial site of ischemic damage to the electron transfer chain. Its activity is reduced by ischemia [32–35]. This could explain the lower protection conferred by pharmacological treatment of reperfusion injury on CypD KO because in this case, Rot acts on an already altered complex I. These results suggest the importance of structural and catalytic integrity of complex I for cell protection and are in agreement with a CypD–complex I cooperative protection. In addition, the protective association of CypD and complex I inhibition was correlated with a delay in mPTP opening. Moreover, CypD and complex I inhibition protective effects were synergistic.

mPTP opening induced by calcium loading was also studied as a mitochondrial functional test (CRC). We confirmed that mPTP opening was inhibited by CsA in heart mice mitochondria and permeabilized cardiomyocytes, and this effect was amplified by complex I inhibition with Rot. We also proved that this effect of Rot is ROS independent. These results were confirmed in mitochondria devoid of CypD and were consistent with a suspected mPTP-regulatory interaction between CypD and complex I. Waldmeier et al., showed this interaction

in isolated rat liver mitochondria [36]. They demonstrated that association of Rot and CsA prevents mitochondrial swelling via promoting a subsequent partial mitochondrial repolarization. This mPTP regulation was also observed in other cells and with other complex I inhibitors. An mPTP regulation by piericidine, another complex I inhibitor, was also observed in the human histiocytic leukemia cell line U937 and the KB human tumor cell line [31]. Inhibition of mPTP opening by Rot is associated with inhibition of cell death in U937. Rot inhibits cytotoxicity of tumor necrosis factor- $\alpha$  in L929 cells [37]. An antidiabetic drug, metformin, which indirectly restricted complex I activity, has been shown to inhibit mPTP opening and finally to prevent cell death in pancreatic cells [38]. Furthermore, reversible inhibition of complex I with a short-active barbiturate, named amobarbital, decreased cardiac injury measured during reperfusion [39].

Our study demonstrates that the protective effect of complex I and CypD inhibition in cardiomyocytes and HL-1 is additive and associated with mPTP inhibition. These results are important in our understanding of the mPTP regulation mechanism. The development and screening of novel pore modulators based on complex I inhibition could open new fields for therapeutic drugs.

## Disclosure statement

None.

## References

- [1] Loor G, Kondapalli J, Iwase H, Chandel NS, Waypa GB, Guzy RD, et al. Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia–reperfusion. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:1382–94.
- [2] Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem* 2001;276:12030–4.
- [3] Hausenloy DJ, Ong SB, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. *Basic Res Cardiol* 2009;104:189–202.
- [4] Hausenloy D, Boston-Griffiths E, Yellon D. Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent. *Br J Pharmacol* 2012;165:1235–45.
- [5] Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 2005;111:194–7.
- [6] Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005;434:652–8.
- [7] Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D. *J Biol Chem* 2005;280:18558–61.
- [8] Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005;434:658–62.
- [9] Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs. *Cardiovasc Drugs Ther* 2010;24:85–7.
- [10] Schaller S, Paradis S, Ngoh GA, Assaly R, Buisson B, Drouot C, et al. TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;333:696–706.
- [11] Pastorino JG, Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 2008;40:171–82.
- [12] Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem* 2008;283:26312–23.
- [13] Obame FN, Plin-Mercier C, Assaly R, Zini R, Dubois-Randé JL, Berdeaux A, et al. Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 beta, SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;326:252–8.
- [14] Li B, Chauvin C, De Paulis D, De Oliveira F, Gharib A, Vial G, et al. Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D. *Biochim Biophys Acta* 2012;1817:1628–34.
- [15] Anmann T, Guzun R, Beraud N, Pelloux S, Kuznetsov AV, Kogerman L, et al. Different kinetics of the regulation of respiration in permeabilized cardiomyocytes and in HL-1 cardiac cells. Importance of cell structure/organization for respiration regulation. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:1597–606.
- [16] Monge C, Beraud N, Tepp K, Pelloux S, Chahboun S, Kaambre T, et al. Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes. *Can J Physiol Pharmacol* 2009;87:318–26.
- [17] Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, et al. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12005–10.
- [18] Pelloux S, Robillard J, Ferrera R, Bilbaut A, Ojeda C, Saks V, et al. Non-beating HL-1 cells for confocal microscopy: application to mitochondrial functions during cardiac preconditioning. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;90:270–98.
- [19] Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, et al. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J* 1999;76:725–34.
- [20] Hausenloy DJ, Lim SY, Ong SG, Davidson SM, Yellon DM. Mitochondrial cyclophilin-D as a critical mediator of ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2010;88:67–74.
- [21] Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Bejui F, et al. Preconditioning delays Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 2004;61:115–22.
- [22] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [23] Fontaine E, Ichas F, Bernardi P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 1998;273:25734–40.
- [24] Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, et al. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 2010;87:406–23.
- [25] Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans* 2010;38:841–60.
- [26] Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004;61:372–85.
- [27] Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 1998;273:12662–8.
- [28] Eimre M, Paju K, Pelloux S, Beraud N, Roosimaa M, Kadaja L, et al. Distinct organization of energy metabolism in HL-1 cardiac cell line and cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta* 2008;1777:514–24.
- [29] Ruiz-Meana M, Inseñe J, Fernandez-Sanz C, Hernando V, Miro-Casas E, Barba I, et al. The role of mitochondrial permeability transition in reperfusion-induced cardiomyocyte death depends on the duration of ischemia. *Basic Res Cardiol* 2011;106:1259–68.
- [30] Eliseev RA, Filippov G, Velos J, VanWinkle B, Goldman A, Rosier RN, et al. Role of cyclophilin D in the resistance of brain mitochondria to the permeability transition. *Neurobiol Aging* 2007;28:1532–42.
- [31] Bo L, Chauvin C, De Paulis D, De Oliveira F, Gharib A, Vial G, et al. Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D: 2012.
- [32] Rouslin W. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *Am J Physiol* 1983;244:H743–8.
- [33] Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia–reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1065–89.
- [34] Paradis G, Petrosillo G, Pistolesse M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ Res* 2004;94:53–9.
- [35] Gadicherla AK, Stowe DF, Antholine WE, Yang M, Camara AK. Damage to mitochondrial complex I during cardiac ischemia reperfusion injury is reduced indirectly by anti-anginal drug ranolazine. *Biochim Biophys Acta* 2012;1817:419–29.
- [36] Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, Lemasters JJ. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. *Mol Pharmacol* 2002;62:22–9.
- [37] Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J* 1993;12:3095–104.
- [38] Lablanche S, Cottet-Rousselle C, Lamarche F, Benhamou PY, Halimi S, Leverve X, et al. Protection of pancreatic INS-1 beta-cells from glucose- and fructose-induced cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition with cyclosporin A or metformin. *Cell Death Differ* 2011;2:e134.
- [39] Stewart S, Lesnefsky EJ, Chen Q. Reversible blockade of electron transport with amobarbital at the onset of reperfusion attenuates cardiac injury. *Transl Res* 2009;153:224–31.

## C. Synthèse des résultats et discussion

Fontaine *et al.* ont été les premiers à montrer que le flux d'électrons à travers le complexe I régule le mPTP<sup>126</sup>. En collaboration avec notre laboratoire, cette même équipe a montré que l'inhibition du complexe I par la rotenone augmente la capacité de rétention calcique de nombreux types cellulaires<sup>128</sup>. De plus, cette étude a souligné l'importance de la CypD dans cette régulation du mPTP par le complexe I. En effet, l'inhibition du complexe I potentialise les effets de la CsA sur l'ouverture du mPTP.

Ce travail a été ainsi élargi dans cette étude sur les cardiomyocytes de souris adultes (WT et CypD KO) et sur la lignée cellulaire cardiaque HL-1, soumis à une séquence d'H/R. La mortalité cellulaire et l'ouverture du mPTP ont été évaluées par microscopie de fluorescence en temps réel. Les traitements pharmacologiques ont été réalisés en PreC ou PostC par inhibition de la CypD et du complexe I. La charge de rétention calcique (CRC) après les différents traitements a été mesurée dans les cardiomyocytes et les mitochondries cardiaques.

Dans cette étude, sachant que le taux de CypD affecte la régulation du mPTP par le complexe I, nous avons tout d'abord vérifié que les taux de CypD dans les cardiomyocytes WT et les HL-1 étaient similaires. Les résultats de mortalité cellulaire montrent que les cardiomyocytes sont plus sensibles face à l'H/R que les HL-1. Par ailleurs, la respiration mitochondriale des HL-1 au niveau du complexe I est inférieure à celle des cardiomyocytes suggérant ainsi que la cardioprotection par le complexe I peut-être associée à son impact sur la phosphorylation oxydative.

Nos résultats montrent que l'inhibition de la CypD, qu'elle soit génétique ou pharmacologique, diminue la mortalité cellulaire après H/R. L'inhibition seule du complexe I ne protège pas les cardiomyocytes, ce qui est en accord avec les résultats de l'étude précédente montrant que la rotenone n'a pas d'effet sur la mortalité et le mPTP dans des tissus riches en CypD<sup>128</sup>. Ceci confirme donc que la protection induite par le complexe I est CypD dépendante et nous montrons pour la première fois que le PreC à la rotenone amplifie

la protection induite par l'inhibition génétique de la CypD. Le PostC quant à lui, reste moins efficace sur les cardiomyocytes CypD-KO. Ceci peut-être expliqué par le fait que le complexe I est le premier site de la chaîne respiratoire touché par l'ischémie<sup>26</sup>. Par ailleurs, nous avons pu corrélérer la protection en terme de mortalité cellulaire et d'ouverture du mPTP.

En conclusion, ce travail démontre le rôle régulateur du complexe I sur le mPTP et sur la mortalité cellulaire et apporte ainsi une meilleure connaissance de la régulation du mPTP en condition d'I/R et ouvre de nouvelles perspectives quant au développement de modulateurs du mPTP basés sur l'inhibition du complexe I.

## II. Echanges calciques CypD-dépendants et régulation du complexe I dans la cardioprotection

### A. Introduction

L'ischémie-reperfusion provoque une surcharge calcique cellulaire ainsi que des dysfonctions mitochondriales majeures entraînant l'ouverture irréversible du mPTP<sup>471</sup>. L'ouverture de ce méga-canal provoque la mort des cardiomyocytes par la libération de facteurs pro-apoptotiques. La CypD est l'un des régulateurs majeurs du mPTP et son inhibition apparaît comme l'une des stratégies cardioprotectrices les plus efficaces.

La CypD est de plus en plus étudiée pour son rôle dans la régulation calcique pouvant influencer le calcium mitochondrial<sup>472</sup> et notamment son rôle à l'interface mitochondrie-réticulum (Publication n°4). La publication n°2 a montré que la CypD régule le mPTP en association avec le complexe I.

Dans ce travail, nous suggérons que la modification de l'homéostasie calcique induite par le CypD et le complexe I régule l'ouverture du mPTP. Pour cette étude nous avons donc utilisé l'isoflurane, un anesthésique volatil connu pour inhiber le complexe I mais également pour modifier l'homéostasie calcique et induire une cardioprotection<sup>135,141,473,474</sup>.

## **B. Publication n°3**

### **TARGETING THE RETICULUM AND MITOCHONDRIAL Ca<sup>2+</sup> HANDLING TO PROTECT CARDIOMYOCYTES FROM LETHAL REPERFUSION INJURY**

Geoffrey Teixeira, Jeremy Fauconnier, Pascal Chiari, Elisabeth Couture-Lepetit, Karine Portier, **Maryline Abrial**, Aude Ouillé, Alain Lacampagne, Yves Tourneur, Abdallah Gharib, Michel Ovize

**En révision à Basic Research in Cardiology**

# Targeting the reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> handling to protect cardiomyocytes from lethal reperfusion injury

*Geoffrey Teixeira<sup>1</sup>, Jeremy Fauconnier<sup>2</sup>, Pascal Chiari<sup>1,3</sup>, Elisabeth Couture-Lepetit<sup>1</sup>, Karine Portier<sup>1,4</sup>, Maryline Abrial<sup>1</sup>, Aude Ouillé<sup>2</sup>, Alain Lacampagne<sup>2</sup>, Yves Tourneur<sup>1</sup>, Abdallah Gharib<sup>1</sup>, Michel Ovize<sup>1,5</sup>*

1.INSERM UMR-1060, CarMeN laboratory, Univ Lyon-1, Faculté de Médecine Rockefeller, F-69373 Lyon, France

2. INSERM UMR-1046, Université Montpellier 1, Université Montpellier 2, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, F-34295, Montpellier, France.

3. Service d'Anesthésie Réanimation, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, F-69677, Lyon, France.

4. Service d'Anesthésie, VetAgro Sup (Campus vétérinaire de Lyon), Université de Lyon, F-69280, Marcy l'Etoile, France.

5. Service d'Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires & CIC de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, F-69677, Lyon, France.

Corresponding author: Abdallah Gharib

Inserm U1060-CarMeN-Cardioprotection

8 avenue Rockefeller

69373 Lyon cedex 08, FRANCE

Phone: +33 4 78 77 70 47

Fax: +33 4 78 77 71 75

Email: [abdallah.gharib@univ-lyon1.fr](mailto:abdallah.gharib@univ-lyon1.fr)

Word count: 5716

Running title: Ca<sup>2+</sup> handling in cardioprotection



## ABSTRACT

**Background** – We questioned whether and how combining the inhibition of CypD and the limitation of  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation into mitochondria via Isoflurane (Iso) might reinforce myocardial protection against lethal reperfusion injury.

**Methods and Results** – Isolated adult mouse cardiomyocytes underwent 30 minutes of hypoxia and 120 minutes of reoxygenation (HR). Cell death was assessed by propidium iodide staining. Mitochondrial membrane potential and permeability transition pore (PTP) opening were assessed using TMRM and calcein-cobalt fluorescence, respectively. Fluo-4 AM and rhod-2 AM confocal microscopy allowed measurement of  $\text{Ca}^{2+}$  transient and  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from SR to mitochondria following caffeine stimulation. CypD knock-out (CypD-KO) cardiomyocytes displayed endogenous protection against HR. Iso further reduced cell death resulting from HR when added to either cyclosporin A (CsA) in WT or applied to CypD-KO cardiomyocytes. Both CsA and Iso delayed PTP opening, but without any additive effect. Iso induced a depolarization of the mitochondrial membrane, decreased oxidative phosphorylation, and blunted the caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from SR to mitochondria in WT cardiomyocytes. Surprisingly, the transfer of  $\text{Ca}^{2+}$  from SR to mitochondrial was spontaneously attenuated in CypD-KO cardiomyocytes.

**Conclusion** – Iso did not act directly on CypD, but prevented mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation, inhibited respiration and depolarized the mitochondrial membrane. Inhibition of CypD not only directly prevented PTP opening, but also attenuated mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload by limiting SR to mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  transfer. The combination of these mechanisms resulted in a deeper reduction of mitochondrial

Ca<sup>2+</sup> and subsequent inhibition of PTP opening, leading to a stronger protection against lethal reperfusion injury.

**Key words –**

Cyclophilin D, Calcium, Isoflurane, Reticulum, Mitochondria

## INTRODUCTION

Ischemic heart disease is the leading cause of death in Western countries. Early reperfusion of the heart is essential in preventing irreversible tissue damage caused by ischemia. However, reperfusion can exacerbate lethal tissue injury [37]. Mitochondrial permeability transition pore (PTP) opening has been shown to play a major role in lethal reperfusion injury [4, 6, 13]. Although the molecular structure of the PTP remains unclear, the mitochondrial matrix protein cyclophilin D (CypD) is a critical regulatory component of the PTP [6, 40]. CypD is a mitochondrial chaperone that, upon accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  into the matrix, binds to the inner mitochondrial membrane and triggers the opening of the PTP [11]. Genetic ablation or pharmacological inhibition of this  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive chaperone by cyclosporin A (CsA) or its analogs, reduce the infarct size in animal models, as well as in patients undergoing acute myocardial infarction [2, 10, 25, 32].

The major source of  $\text{Ca}^{2+}$  in cardiomyocytes is the sarcoplasmic reticulum (SR). SR and mitochondria are spatially and functionally organized as a network and this physical association plays a crucial role in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling [1, 28, 39].  $\text{Ca}^{2+}$  crosstalk between SR and mitochondria has been involved in myocardial reperfusion injury [28]. A volatile anesthetic, isoflurane (Iso), is well known to induce cardioprotection with both pre- (PreC) and postconditioning protocols [3, 18, 31]. Iso can modulate SR, mitochondrial and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  contents [15, 16, 34]. Studies demonstrated that Iso also regulates mitochondrial respiration [14, 17].

Based on this, we questioned whether combining the inhibition of CypD and the administration of Iso might target both SR and mitochondria calcium handling, thereby reinforcing (indirect and direct) inhibition of PTP opening and resulting in a stronger protection against lethal myocardial reperfusion injury.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

CypD-KO mice under C57Bl/6/SV129 background were obtained from the laboratory of the late Stanley Korsmeyer (Dana Farber Cancer Institute, Boston, US) [30]. Both wild-type (WT) and CypD-KO male mice (8-12 weeks, 20-30g) were obtained by homozygous intercross in our laboratory. The present study was performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and all the experimental procedures were approved by a local Ethics Committee (UCBL1 n° BH2007-07).

### **Isolation of adult murine ventricular cardiomyocytes and mitochondria**

WT and CypD-KO mice were anesthetized with sodium pentobarbital (70 mg/kg) and buprenorphine 50µg/kg (Sanofi Santé Animale, Libourne, France) administered intraperitoneally. Once pedal pinch reflexes were completely inhibited, a thoracotomy was performed and the heart collected. Ventricular cardiomyocytes were isolated using enzymatic digestion and mitochondria were prepared according to previously described procedure [21, 23]. In each group, ten mice were used for the isolation of cardiomyocytes and the preparation of mitochondria (for calcium retention capacity and oxygraphy measurements).

### **Hypoxia-reoxygenation (HR)**

Cardiomyocytes from WT or CypD-KO hearts were placed in a thermostated chamber at 37°C, which was mounted on the stage of an IX50 Olympus microscope

(Olympus, Tokyo, Japan) as previously described [23]. The cells were perfused with a Tyrode's solution containing in mM: 130 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub> and 10 glucose, pH 7.4, at 37°C for a 10 min-stabilization period. The chamber was connected to a constant stream of O<sub>2</sub> (21%), N<sub>2</sub> (74%) and CO<sub>2</sub> (5%). Oxygen in the solution was measured using a fiber optic sensor system (Ocean Optics, Inc., Dunedin, FL). For the hypoxia challenge, WT or CypD-KO cardiomyocytes were bathed for 30 minutes in a glucose-free Tyrode bubbled with 100% N<sub>2</sub> and under a constant stream of N<sub>2</sub> (100%) in the chamber. At the end of the hypoxia period, a 120-minute reoxygenation phase was completed by rapidly restoring the Tyrode's flow and oxygen fraction to 21%. Pharmacological PreC was performed with CsA (1 μM, Novartis, Basel, Switzerland) and/or Iso (0.5 mM, Abbott, Chicago, US) 10 min before hypoxia. Iso, dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, US) was added to experimental buffers to achieve a desired concentration of 0.5 mM, confirmed by high-performance liquid chromatography (HPLC).

### **Measurement of cell death**

The cell death was quantified, at the end of the H/R period, as the number of cells staining positive for propidium iodide (5 μM), which permeates only the damaged cells. Propidium iodide fluorescence was excited at 520 to 550 nm and recorded at 580 nm. A 12-bit cooled CCD camera (Orca-R<sup>2</sup>, Hamamatsu, Japan) allowed the images acquisition every 5 min after an illumination time of 1s per image. For each treatment group, approximately 800 cells were counted. This measure was repeated in 4 to 5 separate experiments per treatment group.

### **Measurement of PTP opening in isolated cardiomyocytes**

Cells were loaded for 30 min at 37°C with 1  $\mu$ M calcein-AM and 1 mM CoCl<sub>2</sub> in order to selectively load the mitochondria with calcein by quenching the cytosolic calcein with CoCl<sub>2</sub>. The detection of calcein fluorescence was achieved by the use of a 460-490 nm excitation and a 510 nm emission filter. Images were acquired every 2 min after an illumination time of 100 ms per image. Fluorescence was integrated over a region of interest (approximately 80  $\mu$ m<sup>2</sup>) for each cardiomyocytes and a fluorescence background corresponding to an area without cells was removed. For comparison purpose, the fluorescence intensity minus background was normalized according to the initial fluorescence value. For each treatment we calculated the global response by averaging the fluorescence changes obtained from all of the cardiac myocytes contained in a field (at least 10 cells). This measure was repeated in 4 to 5 separate experiments per treatment group. The time delay to 50% PTP opening ( $t_{PTP50}$ ) was measured as the average reoxygenation time necessary to induce a 50 % decrease in calcein fluorescence in the same field. Image analysis was performed using Image J v.1.44 (NIH, Bethesda, MD).

### **Measurement of the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )**

Cardiomyocytes were loaded with TMRM (10 nM) for 40 min at 37°C, followed by a washout. TMRM fluorescence intensity was recorded with a 560nm long pass filter after excitation at 543 nm. Images were taken every minute, and fluorescence signals were normalized to the fluorescence measured at the start of the experiment. To minimize the impact of  $\Delta\Psi_m$  variability, TMRM fluorescence was measured in five different areas in each cell [8]. At the end of each experiment, cells were exposed to the mitochondrial uncoupler FCCP (1  $\mu$ M) to determine the dynamic range of the dye.

## **Oxidative phosphorylation**

Mitochondrial oxygen consumption was measured at 25°C using a Clark-type oxygen electrode. Permeabilized cardiomyocytes (150 µg protein) with digitonin (40µM) or cardiac mitochondria (250 µg protein) were incubated in 2 ml of respiration buffer containing, in mM: 100 KCl, 50 MOPS, 1 EGTA, 5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 1 mg/ml defatted BSA. Glutamate/malate/pyruvate (5 mM each) were used as electron donors to complex I in the electron transport chain in the absence (basal) or presence of Iso (0.5 mM). Respiration state 3 is initiated with addition of 1 mM (cardiomyocytes) or 200 µM (mitochondria) ADP and expressed as nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup>.

## **Measurements of the Ca<sup>2+</sup> transient**

Isolated cardiomyocytes were loaded for 20 min at 37°C with fluo-4 AM (5 µM) assessing the cytosolic Ca<sup>2+</sup>. To measure Ca<sup>2+</sup> transients, cardiomyocytes were field-stimulated at 1Hz with a current pulse delivered via two platinum electrodes. Analysis included amplitude of Ca<sup>2+</sup> transients (change in fluorescence  $\Delta F$  was divided by the fluorescence  $F_0$  detected before the electrical stimulation pulses), rising phase of Ca<sup>2+</sup> transients (normalizing the peak amplitude over the time to peak) and the decay of electrically stimulated Ca<sup>2+</sup> transients. Spontaneous Ca<sup>2+</sup> sparks frequency was measured in quiescent cardiomyocytes and analyzed using Spark Master plugin with Image J [24].

## **Measurement of SR to mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transfer following caffeine stimulation**

Cardiomyocytes were loaded for 40 min at 37°C with rhod-2 AM (5 µM, Teflabs, Austin, USA). Cells were stimulated under current-clamp conditions using a whole-

cell patch-clamp technique at room temperature with an Axopatch 200B (Axon Instruments), as described previously [9]. Pipettes (2-3M $\Omega$ ) were filled with recording solutions, in mM: KCl 130, HEPES 25, ATP (Mg) 3, GTP (Na) 0.4, EGTA 0.5, pH adjusted to 7.2 with KOH. The cardiomyocytes were perfused with Tyrode's solution. Action potentials (APs) were elicited by 0.2ms current injections of supra-threshold intensity. Cells were stimulated routinely at 0.1Hz until action potentials stabilized. Data acquisition and analyses were performed using PClamp version 10.1 (Axon Instruments).

### **Confocal imaging acquisition**

Fluo-4 AM was excited at 488 nm and emission was collected through a 505 nm long pass filter. Rhod-2 fluorescence was acquired at 590 nm upon excitation with green argon laser. Changes in dye fluorescence were recorded using an LSM510 Meta Zeiss confocal microscope equipped with a 63X water-immersion objective (numerical aperture: 1.2). All measurements were performed in line-scan mode (1.54 ms/line) and scanning was carried out along the long axis (Ca<sup>2+</sup> transients and Ca<sup>2+</sup> sparks) or along the short axis of the cell, closed to the patch pipette (Ca<sup>2+</sup> mitochondrial).

### **Statistical analysis**

All values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed using one-way analysis variance (ANOVA), followed by Bonferroni post hoc test to analyze differences between groups.  $p < 0.05$  was considered significant.



## RESULTS

### **Additive protection by inhibition of CypD and administration of isoflurane**

In WT cardiomyocytes, CsA or Iso significantly reduced HR-induced cell death that averaged  $38 \pm 3$  and  $31 \pm 1$  %, respectively, versus  $60 \pm 7$  % in controls ( $p < 0.05$ , Fig. 1). As expected, CsA had no effect on CypD-KO (data not shown) and CypD-KO cardiomyocytes displayed a significantly decreased cell death when compared to WT ( $40 \pm 3$  versus  $60 \pm 7$  %,  $p < 0.05$ ). Simultaneous application of CsA and Iso to WT cardiomyocytes induced additional protection, with cell death averaging  $23 \pm 1$  % versus  $31 \pm 1$  % in the Iso alone group ( $p < 0.05$ ). Interestingly, Iso further reduced cell death in CypD-KO cells, with a mean value of  $28 \pm 1$  % versus  $40 \pm 3$  % in untreated CypD-KO cardiomyocytes ( $p < 0.05$ ).

### **PTP opening after CypD inhibition and isoflurane**

We then examined whether this additional protection might be related to a direct effect on PTP opening. In WT cardiomyocytes, CsA or Iso significantly delayed PTP opening with  $t_{PTP50}$  averaging  $44 \pm 3$  and  $44 \pm 4$  min respectively, versus  $27 \pm 1$  min in untreated WT ( $p < 0.05$ , Fig. 2A and 2C). However, simultaneous application of Iso and CsA did not increase  $t_{PTP50}$  when compared to each treatment alone in WT cardiomyocytes. In CypD-KO cardiomyocytes,  $t_{PTP50}$  was significantly prolonged to  $42 \pm 2$  versus  $27 \pm 1$  min in WT ( $p < 0.05$ , Fig. 2B and 2C). Importantly, Iso did not further increase  $t_{PTP50}$  in CypD-KO cardiomyocytes.

Because of this apparent discrepancy regarding the additive effect of Iso and CypD inhibition between the results on cell mortality after HR and PTP opening data, we questioned whether Iso might also act through different mechanism(s) that may indirectly protect against HR injury. Specifically, we examined mitochondrial

respiration and  $\text{Ca}^{2+}$  transfer between SR and mitochondria, which both have been proposed as potential contributors to ischemia-reperfusion injury.

### **Mitochondrial membrane polarization and respiration**

WT and CypD-KO cardiomyocytes exhibited similar TMRM fluorescence intensity at baseline, indicative of similar membrane potential. Iso caused comparable moderate mitochondrial depolarization in WT and CypD-KO cardiomyocytes ( $72 \pm 8\%$  and  $78 \pm 5\%$ , respectively,  $p < 0.05$ , Fig. 3).

WT and CypD-KO cardiomyocytes exhibited comparable oxygen consumption at baseline (Fig. 4A). Iso significantly decreased state 3 respiration to a similar extent in WT and CypD-KO cardiomyocytes ( $53 \pm 6$  and  $52 \pm 6$  nmol versus  $128 \pm 6$  and  $107 \pm 14$  nmol  $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  prot, respectively,  $p < 0.05$ ). Very similar results were obtained using isolated cardiac mitochondria instead of cardiomyocytes (Fig. 4B).

### **SR-mitochondrial $\text{Ca}^{2+}$ crosstalk**

We measured  $\text{Ca}^{2+}$  transient (amplitude, speed of rise and decay) in WT and CypD-KO cardiomyocytes, without and with Iso, as well as mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  concentration after application of caffeine (to stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  release from SR) indicative of  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from SR to mitochondria.

The amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  transient, evoked by electrical stimulation (1 Hz), was spontaneously significantly attenuated in CypD-KO cardiomyocytes as compared to WT ( $2.1 \pm 0.1$  versus  $2.6 \pm 0.1$ , respectively,  $p < 0.05$ ; Fig. 5A). The speed of the rise of  $\text{Ca}^{2+}$  transient was also significantly decreased in CypD-KO when compared to WT ( $0.13 \pm 0.01$  versus  $0.16 \pm 0.01$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 5B). The decay of  $\text{Ca}^{2+}$  transient, mostly dependent on the activity of  $\text{Ca}^{2+}$  re-uptake by the SR, was significantly increased in

CypD-KO as compared to WT cardiomyocytes ( $280 \pm 8$  versus  $213 \pm 10$  msec,  $p < 0.05$ , Fig. 5C).

In WT cardiomyocytes, Iso significantly decreased the amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  transients in WT ( $1.6 \pm 0.1$  versus  $2.6 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 5A) and attenuated the speed of the SR- $\text{Ca}^{2+}$  release ( $0.12 \pm 0.01$  versus  $0.16 \pm 0.01$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 5B) to a similar extent than observed in CypD-KO cardiomyocytes. Iso tended (although not significantly) to increase the speed of decay of  $\text{Ca}^{2+}$  transients in WT cardiomyocytes (Fig 5C). In CypD-KO cardiomyocytes, Iso further decreased amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  transients ( $1.6 \pm 0.2$  versus  $2.1 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 5A), the speed of the SR- $\text{Ca}^{2+}$  release ( $0.10 \pm 0.01$  versus  $0.13 \pm 0.01$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 5B), and the speed of  $\text{Ca}^{2+}$  re-uptake by the SR ( $164 \pm 14$  versus  $280 \pm 8$  msec,  $p < 0.05$ , Fig. 5C).

In WT cardiomyocytes, a 10 mM challenge with caffeine, that stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  flux out of the SR, caused a significant increase in mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation, as measured by rhod-2 fluorescence (Fig. 6A). When exposed to the same dose of caffeine, the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was lowered by  $25 \pm 4$  % in CypD-KO when compared to WT ( $p < 0.05$ , Fig. 6B). Similar reduction in the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake ( $33 \pm 8$  %;  $p < 0.05$  versus WT) was observed after transient exposure of WT cardiomyocytes to Iso. But, Iso did not further decrease the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake following application of caffeine when applied to CypD-KO cells.

$\text{Ca}^{2+}$  sparks frequency was significantly higher in CypD-KO than in WT ( $2.3 \pm 0.1$  versus  $1.3 \pm 0.1$  events/ $\mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 7). Iso significantly increased  $\text{Ca}^{2+}$  sparks frequency (near to the level observed in CypD-KO cardiomyocytes) when compared to WT ( $2.7 \pm 0.2$  versus  $1.3 \pm 0.1$  events/ $\mu\text{m}/\text{sec}$ ,  $p < 0.05$ ). Iso did not further increase the frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks in CypD-KO cardiomyocytes.

## DISCUSSION

PTP opening plays a key role in lethal reperfusion injury after acute myocardial ischemia [12, 13, 29]. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload is the primary trigger of PTP opening since it activates the translocation of the matrix chaperone CypD to the inner mitochondrial membrane [20, 27]. Indeed, the pharmacological inhibition of CypD by CsA has been shown as an effective strategy to prevent lethal reperfusion injury in several animal models and in acute myocardial infarction patients [25]. The present study demonstrates that additional limitation of reperfusion injury to that afforded by direct PTP inhibition can be provided by limiting mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  overload via reducing mitochondrial respiration and lowering of mitochondrial membrane potential by Iso. Our results also suggest for the first time that both Iso and inhibition of CypD attenuate  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from SR to mitochondria, which may further prevent mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation upon HR.

Previous studies have shown that CsA and CypD ablation reduce myocardial infarct size and cardiomyocytes death following ischemia-reperfusion [2, 10, 32]. Our study confirms, using an *in vitro model*, that pharmacological inhibition or genetic loss of function of CypD protects cardiomyocytes from lethal reperfusion reoxygenation injury after a prolonged hypoxia. Iso, a volatile anesthetic widely used in clinical practice, is also one of the few agents producing both preconditioning and postconditioning [3, 18]. We confirm here that Iso alone is as powerful as CsA to prevent cell death following HR injury. Interestingly, the protection afforded by Iso alone was additive to that afforded by CsA so that the maximal protection was observed when both drugs were applied together. We first questioned whether the dose of CsA we used in our study would not have fully inhibited PTP opening and whether the observed additive effect of Iso might be related to a more complete

inhibition of the CypD-triggered PTP opening by Iso. This is however very unlikely since even the endogenously protected CypD-KO cardiomyocytes were better protected when exposed to Iso. All together this led us to conclude that the greater diminution of cell death observed by addition of Iso was not CypD-dependent. Because several reports indicate that both mitochondrial respiration and SR calcium homeostasis may play a role in ischemia-reperfusion injury, we then went to assess these two functions in WT and CypD-KO cardiomyocytes, with and without Iso.

We first questioned whether the cardioprotective effect of Iso observed in our study might be explained by its known influence on mitochondrial respiration. As expected, Iso dramatically decreased mitochondrial respiration in WT cardiomyocytes [14, 17]. Interestingly, Iso also decreased state 3 respiration in CypD-KO cardiomyocytes, as well as in isolated mitochondria. Noteworthy, Iso significantly reduced mitochondrial membrane polarization in WT as well as CypD-KO cardiomyocytes. Importantly, in the absence of Iso, loss of CypD function neither influenced mitochondrial respiration activity nor altered mitochondrial membrane polarization. According to these observations, one may propose that the effect of Iso on the mitochondrial membrane polarization may reduce the driving force for  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation into the mitochondria during reperfusion. One cannot however exclude that the protection afforded by Iso to cardiomyocytes is independent of mitochondrial calcium overload and results from changes in cellular energy charge. One might further speculate that the observed impact on oxidative phosphorylation may be related to an effect of isoflurane on mitochondrial complex I. We recently demonstrated that the mitochondrial complex I modulates PTP opening through a site masked by CypD, and that protection afforded by the complex I inhibitor, rotenone was visible when CypD was inhibited or absent [21, 35]. The present demonstration that Iso protects CypD-KO cardiomyocytes is in

keeping with this Hanley et al. demonstrated that Iso inhibits complex I in a dose-dependent fashion [14]. This has been recently confirmed by Hirata et al. who found that Iso induces a 86% reduction on complex I activity, with no incidence on activities of complexes II, III, and IV [17]. Previous studies using inhibitors of complex I in different cellular models link PTP and cell death [19, 21]. Indeed, reversible inhibition of complex I with amobarbital decreased cardiac injury observed during reperfusion [33]. These data suggest that the additive effect of Iso to reduced cell death after HR may be due to the inhibition of the respiration chain, and subsequent reduction of the driving force for  $Ca^{2+}$  accumulation into the mitochondria and/or inhibition of the PTP independently of CypD.

SR is structurally and functionally interconnected with mitochondria and this interface is responsible for  $Ca^{2+}$  exchanges between the two organelles [26, 28]. Regulation of the crosstalk between SR and mitochondria is emerging as a new target to reduce cell death [7]. Murphy's group suggested that a reduced SR  $Ca^{2+}$  loading before ischemia could attenuate cytosolic  $Ca^{2+}$  overload during ischemia and early reperfusion and contribute to cardioprotection [38]. We then assessed the amplitude, the rise and decay of the  $Ca^{2+}$  transient, as well as  $Ca^{2+}$  sparks, in WT and CypD-KO cardiomyocytes, with and without Iso. CypD-KO and Iso-treated WT cardiomyocytes displayed several common features. Both interventions attenuated the amplitude and the  $Ca^{2+}$  transient rise, limited the accumulation of  $Ca^{2+}$  in the mitochondria following the stimulation by caffeine of SR  $Ca^{2+}$  release, and increased the frequency of  $Ca^{2+}$  sparks. This is to our knowledge the first demonstration that inhibition of CypD can alter SR  $Ca^{2+}$  homeostasis. These unexpected results would suggest that CypD is not only involved in PTP opening but might also play a role in the  $Ca^{2+}$  crosstalk between SR and mitochondria. Our observation suggests that inhibition of CypD,

through the reduction of the release of  $\text{Ca}^{2+}$  by SR, would limit its accumulation into mitochondria. One might hypothesize that this action would indirectly contribute to prevent PTP opening. Additional studies are required to address this issue in depth. When administered to WT cardiomyocytes, Iso alone had a comparable effect than inhibition of CypD on the amplitude and speed of rise of  $\text{Ca}^{2+}$  transient as well as on the accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  into the mitochondria resulting from the application of caffeine. Iso enhanced the reduction of both the amplitude and the speed of rise of the  $\text{Ca}^{2+}$  release in CypD-KO cardiomyocytes. Following caffeine-induced SR  $\text{Ca}^{2+}$  release, Iso did not further reduce  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation into mitochondria when applied to CypD-KO cardiomyocytes. This is in agreement with Ljubkovic et al. who have suggested that mitochondrial depolarization induced by Iso could attenuate the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload by diminishing the driving force for  $\text{Ca}^{2+}$  influx via the mitochondrial carrier uniport [22]. Iso is also known to inhibit L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel [5, 34]. One cannot rule out that the modification of the  $\text{Ca}^{2+}$  transient seen after administration of Iso might be at least in part a consequence of a reduced  $\text{Ca}^{2+}$ -induced- $\text{Ca}^{2+}$ -release. Our results showed that genetic ablation of CypD and administration of Iso increased SR luminal diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  leak as spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  sparks (Fig. 7). In accordance with Terentyev et al., one cannot exclude that this leak might play a role in protection of cardiomyocytes by reducing the SR  $\text{Ca}^{2+}$  content [36].

In summary, we propose that the additive protective effect of the inhibition of CypD and Iso is due to an action on different targets. Inhibition of CypD not only directly prevents PTP opening, but likely attenuates mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload by attenuating SR to mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  transfer. Iso did not neither act directly on CypD but rather likely prevents mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation, inhibits mitochondrial

respiration and depolarizes the mitochondrial membrane. Combination of these actions likely results in a stronger reduction of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  and subsequent inhibition of PTP opening.

## **DISCLOSURES**

None



## REFERENCES

1. Abdallah Y, Kasseckert SA, Iraqi W, Said M, Shahzad T, Erdogan A, Neuhofer C, Gunduz D, Schluter KD, Tillmanns H, Piper HM, Reusch HP, Ladilov Y (2011) Interplay between Ca<sup>2+</sup> cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes. *J Cell Mol Med* 15:2478-2485 doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01249.x
2. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434:658-662 doi:10.1038/nature03434
3. Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier DC (2005) Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology* 102:102-109
4. Crompton M, Andreeva L (1993) On the involvement of a mitochondrial pore in reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 88:513-523
5. Davies LA, Gibson CN, Boyett MR, Hopkins PM, Harrison SM (2000) Effects of isoflurane, sevoflurane, and halothane on myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in rat ventricular myocytes. *Anesthesiology* 93:1034-1044
6. Di Lisa F, Carpi A, Giorgio V, Bernardi P (2011) The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 1813:1316-1322 doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.031
7. Dong S, Teng Z, Lu FH, Zhao YJ, Li H, Ren H, Chen H, Pan ZW, Lv YJ, Yang BF, Tian Y, Xu CQ, Zhang WH (2010) Post-conditioning protects cardiomyocytes from apoptosis via PKC(epsilon)-interacting with calcium-sensing receptors to inhibit endo(sarco)plasmic reticulum-mitochondria crosstalk. *Mol Cell Biochem* 341:195-206 doi:10.1007/s11010-010-0450-5
8. Fauconnier J, Andersson DC, Zhang SJ, Lanner JT, Wibom R, Katz A, Bruton JD, Westerblad H (2007) Effects of palmitate on Ca<sup>2+</sup> handling in adult control and ob/ob cardiomyocytes: impact of mitochondrial reactive oxygen species. *Diabetes* 56:1136-1142 doi:10.2337/db06-0739
9. Fauconnier J, Lacampagne A, Rauzier JM, Vassort G, Richard S (2005) Ca<sup>2+</sup>-dependent reduction of IK1 in rat ventricular cells: a novel paradigm for arrhythmia in heart failure? *Cardiovasc Res* 68:204-212 doi:10.1016/j.cardiores.2005.05.024
10. Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M (2008) Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* 117:2761-2768 doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.755066
11. Halestrap AP (2006) Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans* 34:232-237 doi:10.1042/BST20060232
12. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61:372-385 doi:10.1016/S0008-6363(03)00533-9
13. Halestrap AP, Pasdois P (2009) The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 1787:1402-1415 doi:10.1016/j.bbabi.2008.12.017
14. Hanley PJ, Ray J, Brandt U, Daut J (2002) Halothane, isoflurane and sevoflurane inhibit NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of cardiac mitochondria. *J Physiol* 544:687-693
15. Hanley PJ, ter Keurs HE, Cannell MB (2004) Excitation-contraction coupling in the heart and the negative inotropic action of volatile anesthetics. *Anesthesiology* 101:999-1014

16. Hannon JD, Cody MJ (2002) Effects of volatile anesthetics on sarcolemmal calcium transport and sarcoplasmic reticulum calcium content in isolated myocytes. *Anesthesiology* 96:1457-1464
17. Hirata N, Shim YH, Pravdic D, Lohr NL, Pratt PF, Jr., Weihrauch D, Kersten JR, Warltier DC, Bosnjak ZJ, Bienengraeber M (2011) Isoflurane differentially modulates mitochondrial reactive oxygen species production via forward versus reverse electron transport flow: implications for preconditioning. *Anesthesiology* 115:531-540 doi:10.1097/ALN.0b013e31822a2316
18. Kersten JR, Schmelting TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC (1997) Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 87:361-370
19. Lablanche S, Cottet-Rousselle C, Lamarche F, Benhamou PY, Halimi S, Leverve X, Fontaine E (2011) Protection of pancreatic INS-1 beta-cells from glucose- and fructose-induced cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition with cyclosporin A or metformin. *Cell Death Dis* 2:e134 doi:10.1038/cddis.2011.15
20. Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhong Z, Nieminen AL (2009) Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim Biophys Acta* 1787:1395-1401 doi:10.1016/j.bbabi.2009.06.009
21. Li B, Chauvin C, De Paulis D, De Oliveira F, Gharib A, Vial G, Lablanche S, Leverve X, Bernardi P, Ovize M, Fontaine E (2012) Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D. *Biochim Biophys Acta* 1817:1628-1634 doi:10.1016/j.bbabi.2012.05.011
22. Ljubkovic M, Mio Y, Marinovic J, Stadnicka A, Warltier DC, Bosnjak ZJ, Bienengraeber M (2007) Isoflurane preconditioning uncouples mitochondria and protects against hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C1583-1590 doi:10.1152/ajpcell.00221.2006
23. Obame FN, Plin-Mercier C, Assaly R, Zini R, Dubois-Rande JL, Berdeaux A, Morin D (2008) Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 beta, SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Pharmacol Exp Ther* 326:252-258 doi:10.1124/jpet.108.138008
24. Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM (2007) SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C1073-1081 doi:10.1152/ajpcell.00586.2006
25. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, Andre-Fouet X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M (2008) Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 359:473-481 doi:10.1056/NEJMoa071142
26. Piper HM, Abdallah Y, Kasseckert S, Schluter KD (2008) Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial interaction in the mechanism of acute reperfusion injury. *Viewpoint. Cardiovasc Res* 77:234-236 doi:10.1093/cvr/cvm066
27. Ruiz-Meana M, Abellan A, Miro-Casas E, Garcia-Dorado D (2007) Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca<sup>2+</sup> overloaded cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* 102:542-552 doi:10.1007/s00395-007-0675-y
28. Ruiz-Meana M, Fernandez-Sanz C, Garcia-Dorado D (2010) The SR-mitochondria interaction: a new player in cardiac pathophysiology. *Cardiovasc Res* 88:30-39 doi:10.1093/cvr/cvq225
29. Ruiz-Meana M, Inserte J, Fernandez-Sanz C, Hernando V, Miro-Casas E, Barba I, Garcia-Dorado D (2011) The role of mitochondrial permeability transition in reperfusion-induced cardiomyocyte death depends on the duration of ischemia. *Basic Res Cardiol* 106:1259-1268 doi:10.1007/s00395-011-0225-5
30. Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, Hetz C, Danial NN, Moskowitz MA, Korsmeyer SJ (2005) Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability

- transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12005-12010 doi:10.1073/pnas.0505294102
31. Sedlic F, Sepac A, Pravdic D, Camara AK, Bienengraeber M, Brzezinska AK, Wakatsuki T, Bosnjak ZJ (2010) Mitochondrial depolarization underlies delay in permeability transition by preconditioning with isoflurane: roles of ROS and Ca<sup>2+</sup>. *Am J Physiol Cell Physiol* 299:C506-515 doi:10.1152/ajpcell.00006.2010
  32. Skyschally A, Schulz R, Heusch G (2010) Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs. *Cardiovasc Drugs Ther* 24:85-87 doi:10.1007/s10557-010-6219-y
  33. Stewart S, Lesnefsky EJ, Chen Q (2009) Reversible blockade of electron transport with amobarbital at the onset of reperfusion attenuates cardiac injury. *Transl Res* 153:224-231 doi:10.1016/j.trsl.2009.02.003
  34. Tampo A, Hogan CS, Sedlic F, Bosnjak ZJ, Kwok WM (2009) Accelerated inactivation of cardiac L-type calcium channels triggered by anaesthetic-induced preconditioning. *Br J Pharmacol* 156:432-443 doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00026.x
  35. Teixeira G, Abrial M, Portier K, Chiari P, Couture-Lepetit E, Tourneur Y, Ovize M, Gharib A (2013) Synergistic protective effect of cyclosporin A and rotenone against hypoxia-reoxygenation in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 56:55-62 doi:10.1016/j.yjmcc.2012.11.023
  36. Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Gyorke I, Terentyeva R, Gyorke S (2003) Protein phosphatases decrease sarcoplasmic reticulum calcium content by stimulating calcium release in cardiac myocytes. *J Physiol* 552:109-118 doi:10.1113/jphysiol.2003.046367
  37. Thuny F, Lairez O, Roubille F, Mewton N, Rioufol G, Sportouch C, Sanchez I, Bergerot C, Thibault H, Cung TT, Finet G, Argaud L, Revel D, Derumeaux G, Bonnefoy-Cudraz E, Elbaz M, Piot C, Ovize M, Croisille P (2012) Post-conditioning reduces infarct size and edema in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 59:2175-2181 doi:10.1016/j.jacc.2012.03.026
  38. Yamamura K, Steenbergen C, Murphy E (2005) Protein kinase C and preconditioning: role of the sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H2484-2490 doi:10.1152/ajpheart.00590.2005
  39. Yaniv Y, Spurgeon HA, Lyashkov AE, Yang D, Ziman BD, Maltsev VA, Lakatta EG (2012) Crosstalk between mitochondrial and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> cycling modulates cardiac pacemaker cell automaticity. *PLoS One* 7:e37582 doi:10.1371/journal.pone.0037582
  40. Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ (2009) Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 83:213-225 doi:10.1093/cvr/cvp151

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1. Protective effect of CypD inhibition and isoflurane on cell death

Cardiomyocytes were loaded with propidium iodide and submitted to 30-min hypoxia followed by 120-min reoxygenation. PreC was performed with CsA (1  $\mu$ M) and/or Iso (0.5 mM) 10 min before hypoxia. Each value was the mean  $\pm$  SEM of four to five separate experiments. \* $p$ <0.05 versus Control WT, <sup>†</sup> $p$ <0.05 versus CsA WT and  $\yen$  $p$ <0.05 versus Control CypD-KO.

### Figure 2. CypD inhibition and isoflurane preconditioning delay PTP opening.

WT (A) and CypD-KO (B) cardiomyocytes were loaded with calcein-AM and CoCl<sub>2</sub> and submitted to 30-min hypoxia followed by 120-min reoxygenation. PreC was performed with CsA (1  $\mu$ M) and/or Iso (0.5 mM) 10 min before hypoxia. (C)  $t_{PTP50}$  is the average reoxygenation time necessary to induce a 50 % decrease in calcein fluorescence in the same field. Each value was the mean  $\pm$  SEM of four to five separate experiments. \* $p$ <0.05 versus Control WT.

### Figure 3. Mitochondrial membrane polarization

Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was assessed by fluorescence of TMRM after stimulation with Iso (0.5 mM). Each value was the mean  $\pm$  SEM of four to five separate experiments. \* $p$ <0.05 versus Basal WT.

### Figure 4. Cardiomyocytes and mitochondria respiration

Respiration was measured using complex I substrates glutamate/malate/pyruvate in the absence (Basal) or presence of Iso (0.5 mM). Respiration state 3 was initiated with addition of ADP (1 mM for cardiomyocytes (A) or 200  $\mu$ M for mitochondria (B))

and expressed as nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup>. Each value was the mean ± SEM of four to five separate experiments. \*p<0.05 versus Basal WT.

**Figure 5. Genetic CypD ablation and isoflurane affect SR Ca<sup>2+</sup> regulation.**

Ca<sup>2+</sup> transients were recorded in fluo4-AM loaded intact cardiomyocytes electrically stimulated at 1 Hz in the absence (Basal) or 10 min after Iso (0.5 mM) incubation. A, Ca<sup>2+</sup> transients amplitude. B, Peak systolic Ca<sup>2+</sup> transients as an index of Ryr function (calculated from the relative amplitude and time to peak of the electrical induced Ca<sup>2+</sup> transient). C, Ca<sup>2+</sup> transients decays as an index of SERCA function. D, Representative Ca<sup>2+</sup> transients. Each value was the mean ± SEM of six to seven separate experiments. \*p<0.05 versus Basal WT and # p<0.05 versus Basal KO.

**Figure 6. Genetic CypD ablation and isoflurane reduce mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake.**

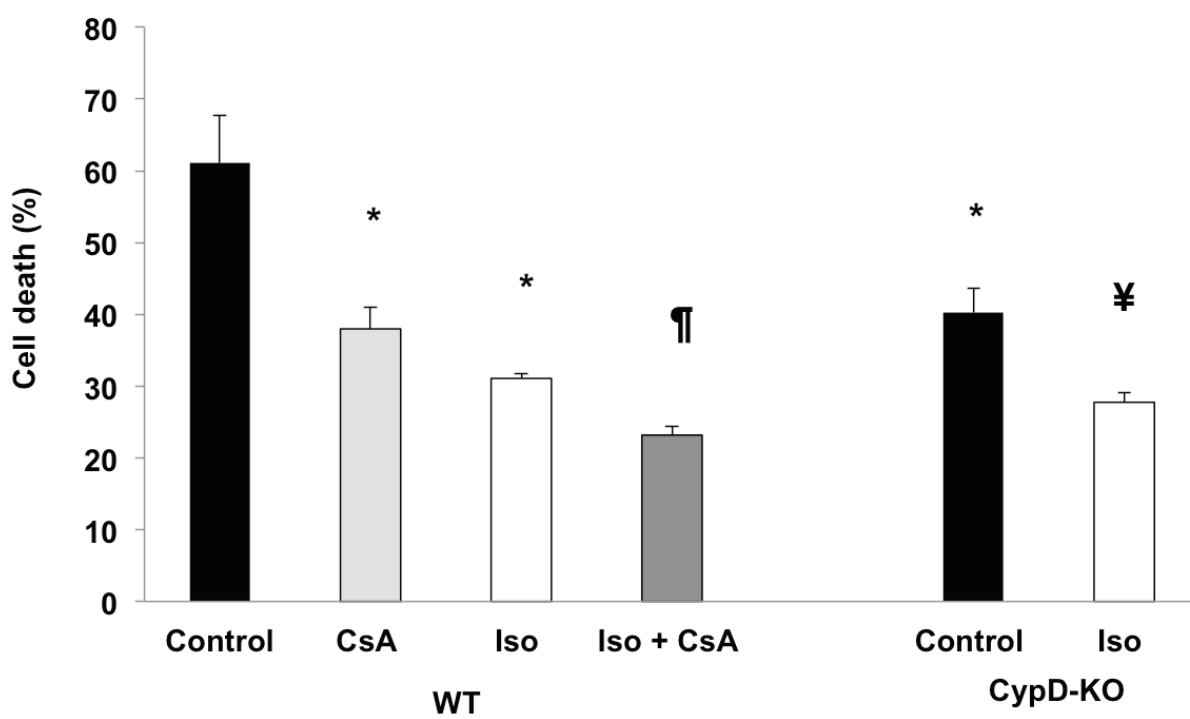
Cardiomyocytes were loaded with rhod-2 AM and patch clamped in whole cell configuration. Perfusion of an internal cytosolic solution removes cytosolic remains of the dye and allow us to detect mitochondrial specific fluorescence. rhod-2 AM fluorescence was recorded by laser scanning confocal microscopy after caffeine (10 mM) stimulation in the absence (Basal) or 10 min after Iso (0.5 mM) incubation. A, Representative rhod-2 AM fluorescence signals. B, Summarized data for mitochondrial Ca<sup>2+</sup> measurements. Each value was the mean ± SEM of four to five separate experiments. \*p<0.05 versus Basal WT.

**Figure 7. Genetic CypD ablation and isoflurane increase Ca<sup>2+</sup> sparks.**

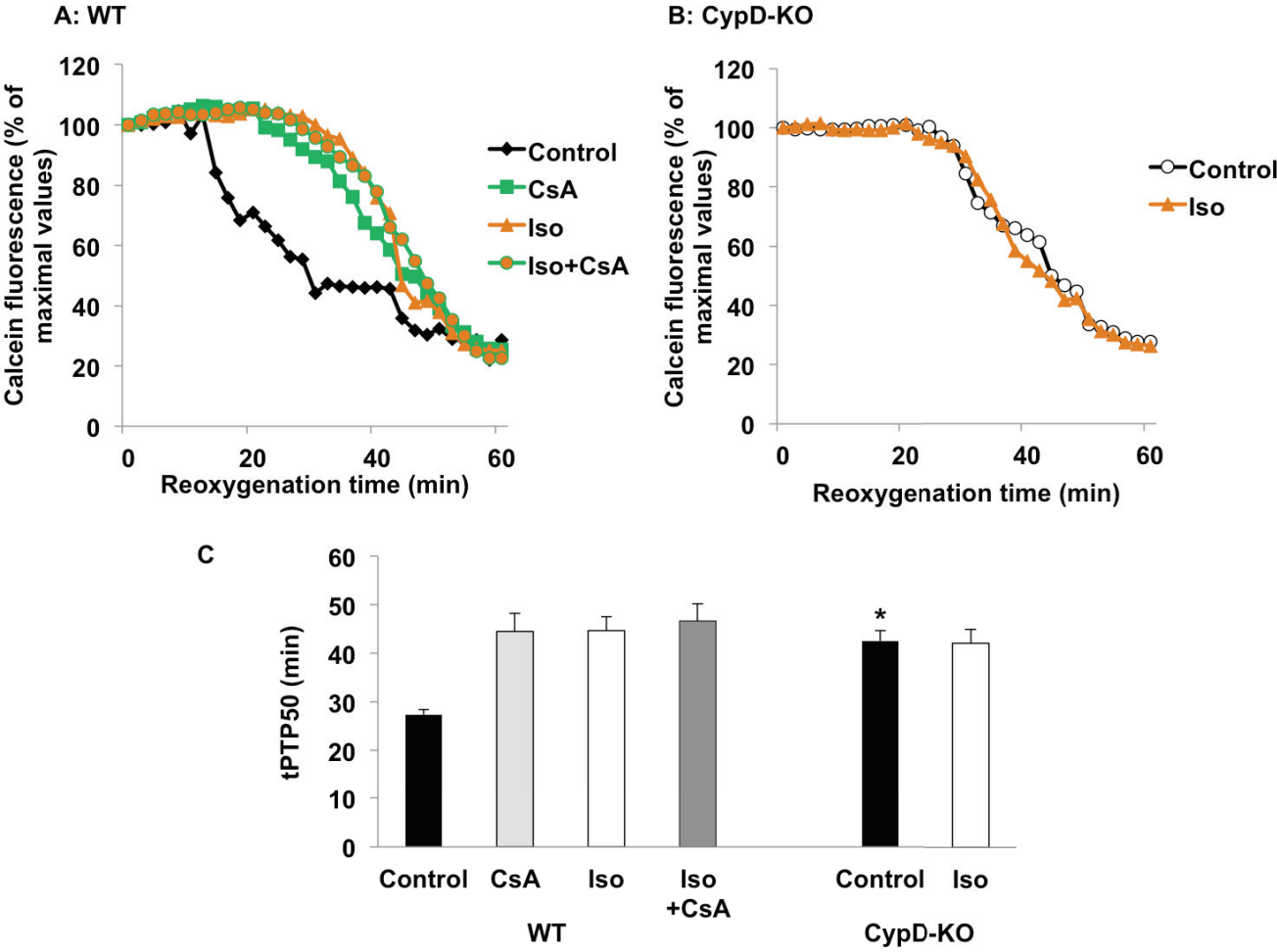
Spontaneous none propagating Ca<sup>2+</sup> releases mediated by ryanodine receptors

(RyRs) were recorded in fluo4-AM loaded intact cardiomyocytes by laser scanning confocal microscopy in the absence (Basal) or 10 min after Iso (0.5 mM) incubation. Ca<sup>2+</sup> sparks frequency was used as an index of diastolic SR Ca<sup>2+</sup> leak. Each value was the mean ± SEM of six to seven separate experiments. \*p<0.05 versus Basal WT.

Figure 1.

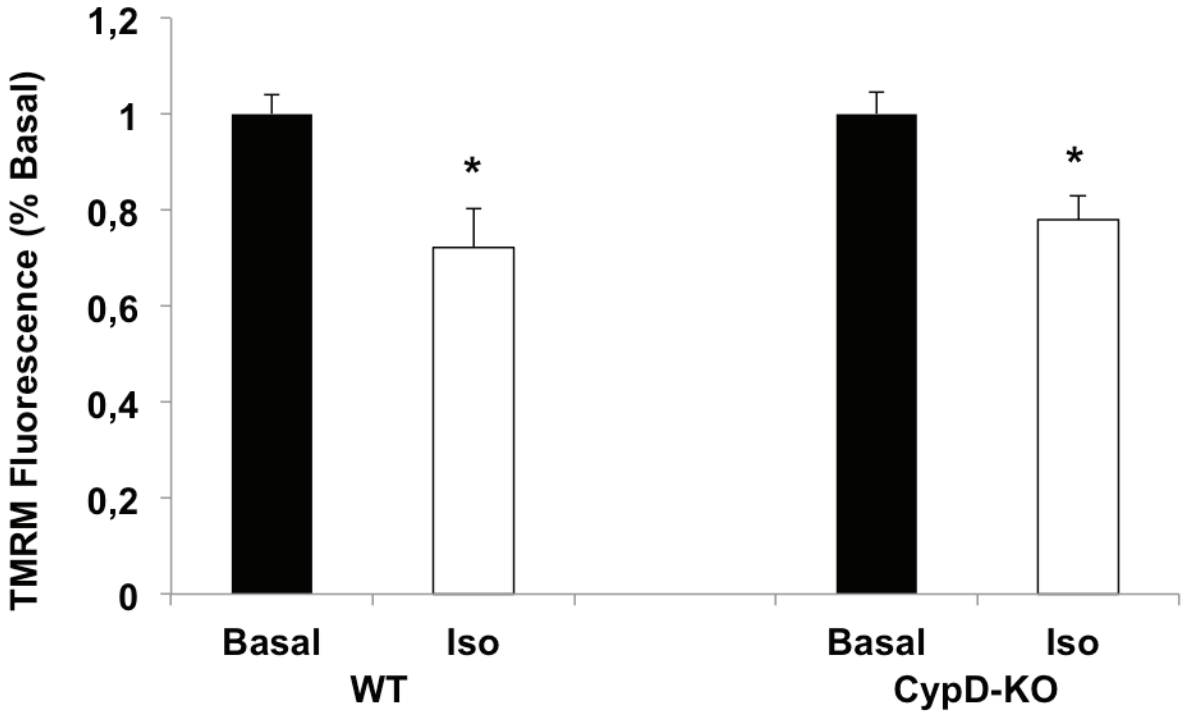


**Figure 2.**

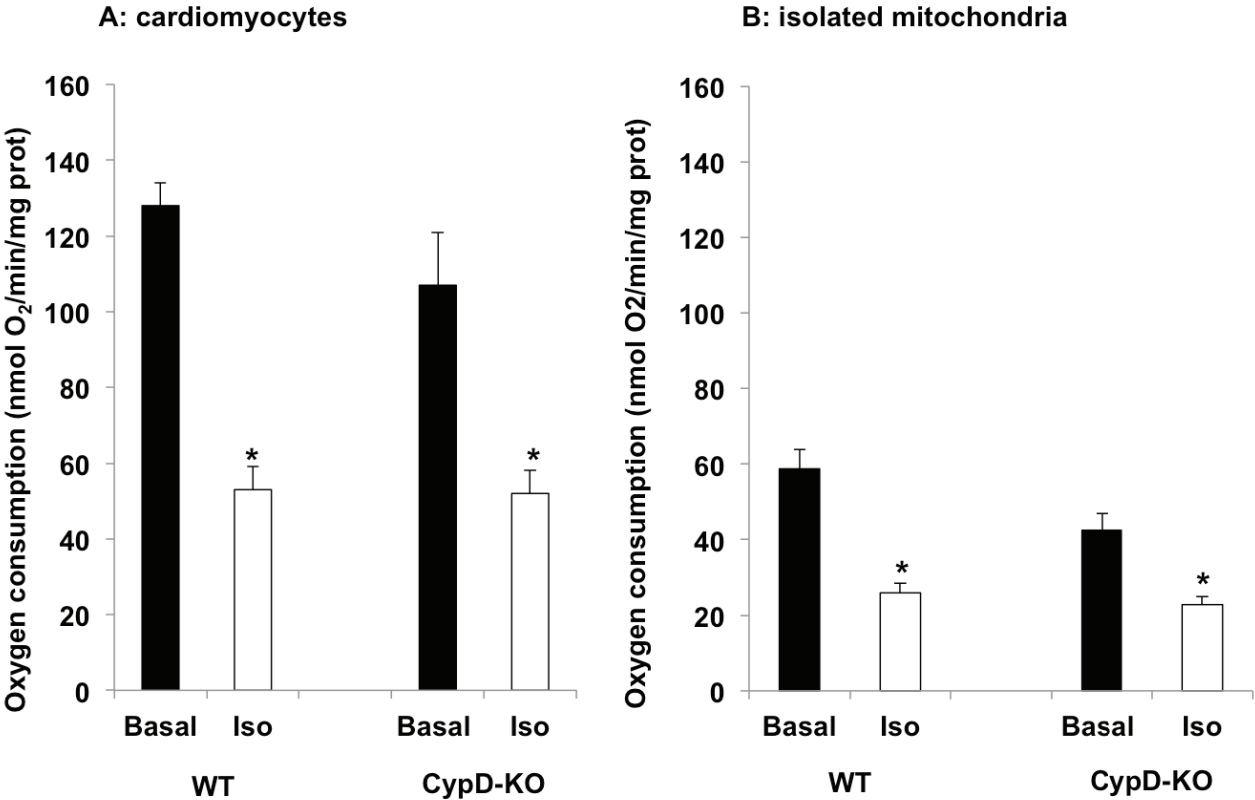




**Figure 3.**



**Figure 4.**



**Figure 5.**

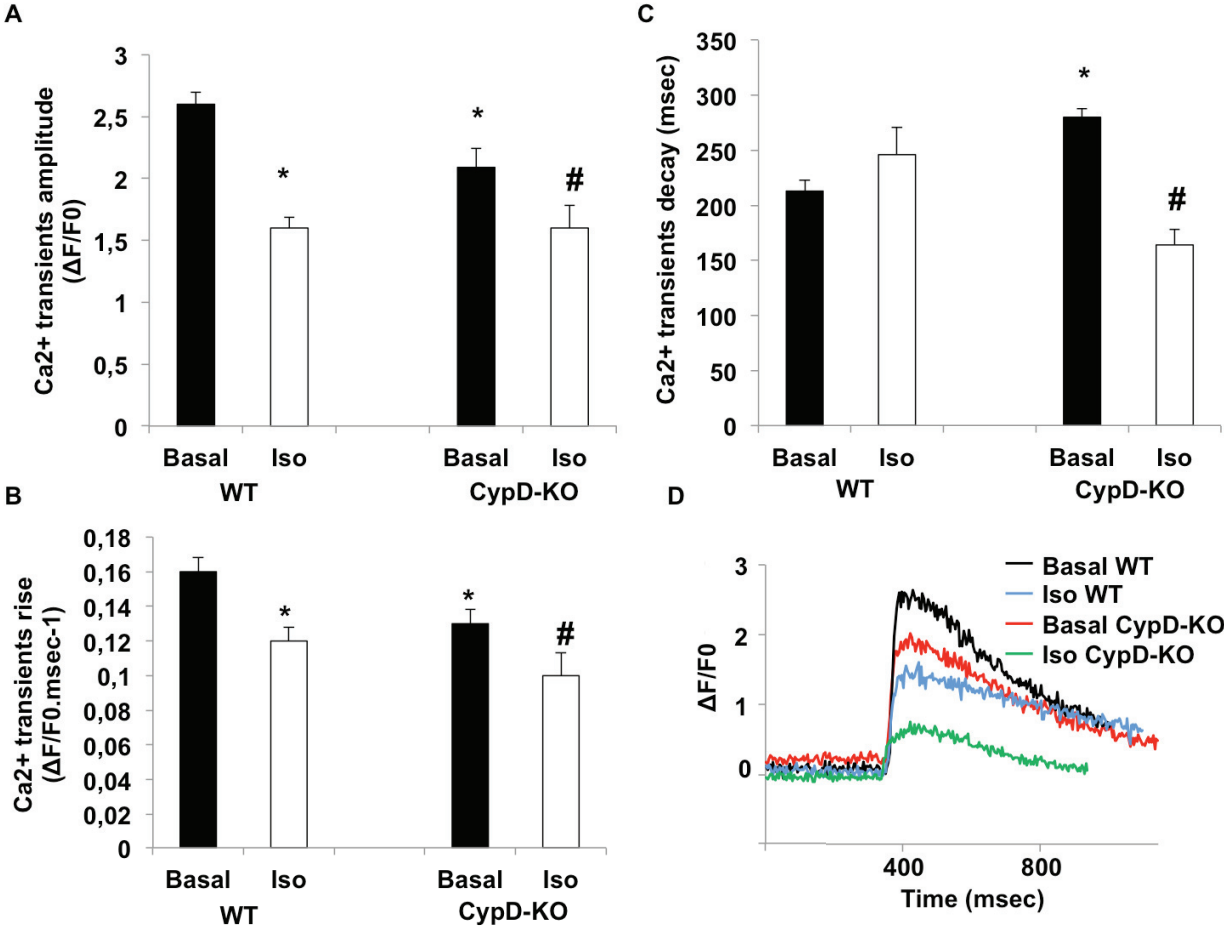


Figure 6.

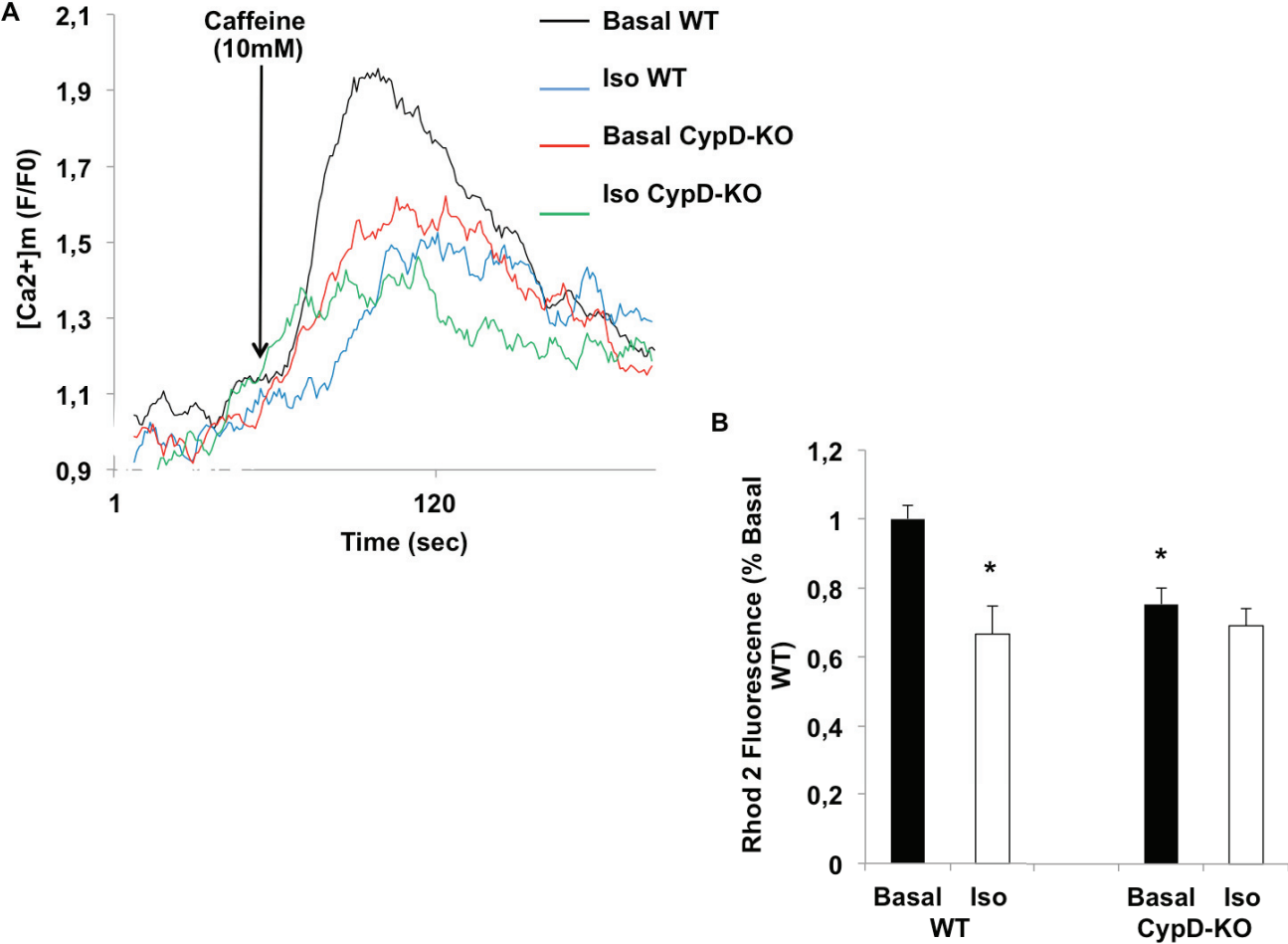
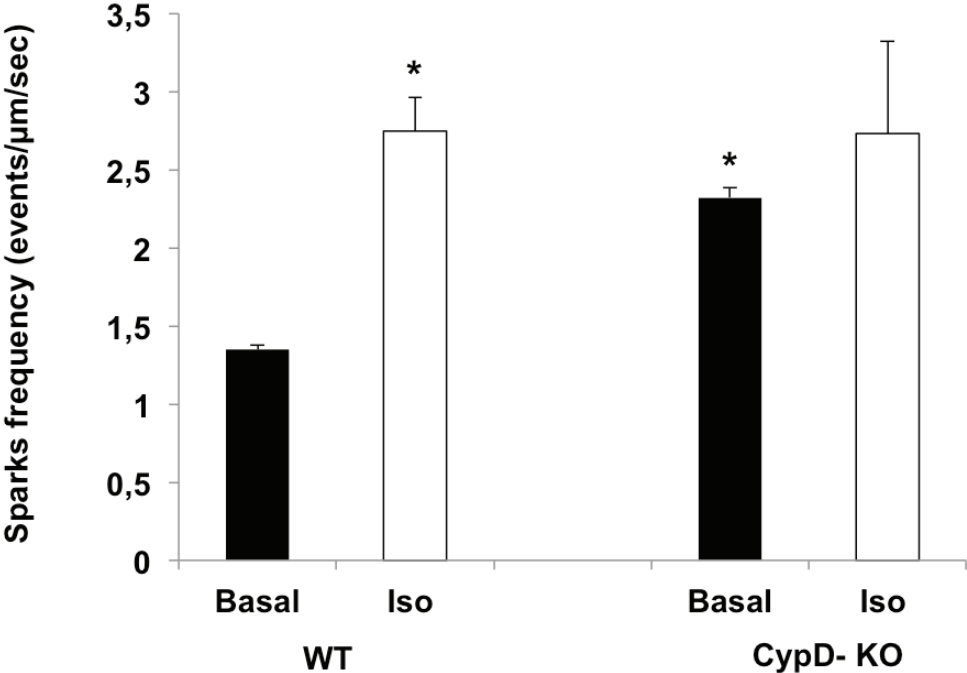


Figure 7.



## C. Synthèse des résultats et discussion

Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux de l'étude précédente ainsi que ceux de la littérature, montrant que l'inhibition pharmacologique ou génétique de la CypD diminue la mortalité cellulaire en retardant l'ouverture du mPTP et le signal calcique.

L'isoflurane confirme l'implication du  $\text{Ca}^{2+}$  et des fonctions mitochondriales dans les mécanismes cardioprotecteurs. Par ailleurs le renforcement de la protection native des cardiomyocytes CypD-KO démontre que l'isoflurane est capable d'induire une cardioprotection CypD-indépendante. L'absence d'effet de l'isoflurane sur la capacité de rétention calcique de mitochondries isolées confirme l'importance de l'environnement cellulaire entier et notamment des composants cytosoliques dans la régulation du mPTP par l'isoflurane, suggérant la présence de sites d'actions extra-mitochondriaux.

Une des sources principale de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule est le réticulum sarcoplasmique (RS). Celui-ci est structurellement et fonctionnellement interconnecté avec la mitochondrie par des points de contact faisant lieu d'importants échanges calciques. Ces points de contact font l'objet de nouvelles cibles afin de réduire la mortalité cellulaire provoquée par l'H/R. En effet, les surcharges calciques mitochondriales et cytosoliques lors de la reperfusion sont dépendantes de la charge calcique du RS avant l'ischémie. Yamamura *et al.* suggèrent donc que limiter la charge calcique du RS lors de l'ischémie préviendrait la surcharge cytosolique au début de la reperfusion pouvant ainsi avoir un effet cardioprotecteur<sup>475</sup>. Notre étude montre que l'inhibition de la CypD et le traitement à l'isoflurane augmentent la fuite calcique du RS sous forme de sparks calciques. Cette fuite pourrait alors expliquer la cardioprotection observée.

L'inhibition de la CypD ainsi que le traitement à l'isoflurane diminuent l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie après stimulation de la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS. Cependant, l'isoflurane n'a pas d'effet additif sur les CypD-KO, confirmant l'action CypD-indépendante de l'isoflurane qui n'aurait pas d'action significative sur le transfert calcique à l'interface mitochondrie-RS mais plutôt un impact direct sur la fonction mitochondriale. En effet, l'isoflurane entraîne dans

nos expériences une légère dépolarisation mitochondriale pouvant favoriser une diminution de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie<sup>476</sup>.

Enfin, les résultats de cette étude confirment ceux de l'article précédent en suggérant que la protection conférée par l'isoflurane passe par son action sur le complexe I comme le montre les résultats de la phosphorylation oxydative.

En conclusion, ce travail montre qu'une meilleure compréhension des échanges calciques à l'interface mitochondrie-RS permet la mise en place de nouvelles cibles thérapeutiques cardioprotectrices visant à limiter la surcharge calcique. Cependant nos résultats sur l'isoflurane montrent que l'étude de la régulation du mPTP doit prendre en compte les échanges  $\text{Ca}^{2+}$  mais également d'autres mécanismes indépendants du  $\text{Ca}^{2+}$ , mettant en jeu le complexe I.

### III. Rôle de la CypD à l'interface mitochondrie-réticulum au cours de l'ischémie-reperfusion

#### A. Introduction

La mitochondrie et le réticulum sont des organites structurellement connectés par des points de contact appelés MAM (pour Mitochondria Associated Membrane). Au niveau de ces points de contacts entre les deux organelles, s'effectuent principalement des échanges de lipides mais également des transferts calciques via un complexe macromoléculaire composé des protéines VDAC1, Grp75 et IP3R1.

La surcharge calcique mitochondriale entraîne la mort cellulaire via l'ouverture du mPTP. L'équipe de Molkenin a montré que la CypD pouvait moduler le niveau de  $Ca^{2+}$  mitochondrial aussi bien en condition physiologique que pathologique<sup>472</sup>. Par ailleurs, des microdomaines riches en  $Ca^{2+}$ , entre la mitochondrie et le réticulum sarcoplasmique, ont été mis en évidence dans le cœur. Nous avons donc étudié si la CypD appartenait au complexe VDAC1/Grp75/IP3R1 dans le cœur et quelle était l'implication de ce complexe protéique dans les lésions d'ischémie-reperfusion.

L'hypothèse émise dans ce travail est donc que l'inhibition ou l'absence de CypD au niveau des points de contact mitochondrie-réticulum sarcoplasmique pourrait être protectrice dans un contexte d'I/R en modifiant notamment les échanges calciques et la surcharge mitochondriale.



## **B. Publication n°4**

### **DEPRESSING MITOCHONDRIA-RETICULUM INTERACTIONS PROTECTS CARDIOMYOCYTES FROM LETHAL HYPOXIA-REOXYGENATION INJURY**

Melanie Paillard, Emily Tubbs, Pierre-Alain Thiebaut, Ludovic Gomez, Jeremy Fauconnier,  
Claire Crola Da Silva, Geoffrey Teixeira, Elise Belaidi, Annie Durand, **Maryline Abrial**, Alain  
Lacampagne, Jennifer Rieusset, Michel Ovize

**Publiée dans Circulation**

## Depressing Mitochondria-Reticulum Interactions Protects Cardiomyocytes from Lethal Hypoxia-Reoxygenation Injury

Melanie Paillard, Emily Tubbs, Pierre-Alain Thiebaut, Ludovic Gomez, Jeremy Fauconnier, Claire Crola Da Silva, Geoffrey Teixeira, Nathan Mewton, Elise Belaidi, Annie Durand, Maryline Abrial, Alain Lacampagne, Jennifer Rieusset and Michel Ovize

*Circulation*. published online August 27, 2013;  
*Circulation* is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231  
Copyright © 2013 American Heart Association, Inc. All rights reserved.  
Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/content/early/2013/08/27/CIRCULATIONAHA.113.001225>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circ.ahajournals.org/content/suppl/2013/08/27/CIRCULATIONAHA.113.001225.DC1.html>

**Permissions:** Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

**Reprints:** Information about reprints can be found online at:  
<http://www.lww.com/reprints>

**Subscriptions:** Information about subscribing to *Circulation* is online at:  
<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

## Depressing Mitochondria-Reticulum Interactions Protects Cardiomyocytes from Lethal Hypoxia-Reoxygenation Injury

**Running title:** *Paillard et al.; Calcium, MAM and ischemia-reperfusion*

Melanie Paillard, PhD<sup>1</sup>; Emily Tubbs, Bsc<sup>1\*</sup>; Pierre-Alain Thiebaut, Bsc<sup>1\*</sup>; Ludovic Gomez, PhD<sup>1\*</sup>; Jeremy Fauconnier, PhD<sup>2</sup>; Claire Crola Da Silva, PhD<sup>1</sup>; Geoffrey Teixeira, PhD<sup>1</sup>; Nathan Mewton, MD, PhD<sup>1,3</sup>; Elise Belaidi, PhD<sup>1</sup>; Annie Durand, Bsc<sup>1</sup>; Maryline Abrial, Bsc<sup>1</sup>; Alain Lacampagne, PhD<sup>2</sup>; Jennifer Rieusset, PhD<sup>1</sup>; Michel Ovize, MD, PhD<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR-1060, Laboratoire CarMeN, Université Lyon 1, Faculté de médecine Rockefeller et Charles Merieux Lyon-Sud, Lyon, France; <sup>2</sup>INSERM UMR-1046, Université Montpellier 1, Université Montpellier 2, CHU de Montpellier, Montpellier, France; <sup>3</sup>Hospices Civils de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Service d'Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires & CIC de Lyon, Lyon, France

\*contributed equally to this work

### Address for Correspondence:

Melanie Paillard, PhD  
Inserm U1060-CarMeN-Cardioprotection  
8 Avenue Rockefeller  
69373 Lyon Cedex 08  
France  
Tel: +33.4.78.77.70.47  
Fax: +33.4.78.77.71.75  
E-mail: melanie.paillard@univ-lyon1.fr

**Journal Subject Code:** Myocardial biology:[108] Other myocardial biology

## Abstract

**Background**—Under physiological conditions,  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from the endoplasmic reticulum (ER) to mitochondria might occur at least in part at contact points between the two organelles, and involves the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex. Accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  into the mitochondrial matrix may activate the mitochondrial chaperone cyclophilin D (CypD) and trigger permeability transition pore (PTP) opening, whose role in ischemia-reperfusion injury is well recognized. We questioned here whether the transfer of  $\text{Ca}^{2+}$  from ER to mitochondria might play a role in cardiomyocyte death after hypoxia-reoxygenation.

**Methods and Results**—We report that CypD interacts with the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex in cardiomyocytes. Genetic or pharmacologic inhibition of CypD in both H9c2 cardiomyoblasts and adult cardiomyocytes decreased the  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from ER to mitochondria through IP3R under normoxic conditions. During hypoxia-reoxygenation (HR), the interaction between CypD and the IP3R1  $\text{Ca}^{2+}$  channeling complex increased concomitantly with mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  content. Inhibition of either CypD, IP3R1 or Grp75 decreased protein interaction within the complex, attenuated mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload and protected cells from HR. Genetic or pharmacological inhibition of CypD provided similar effect in adult mice cardiomyocytes. Noteworthy, disruption of ER-mitochondria interaction via the down-regulation of Mfn2 similarly reduced the interaction between CypD and the IP3R1 complex and protected against HR injury.

**Conclusions**—Our data point first, to a new role of CypD at the ER-mitochondria interface, and second, suggest that decreasing ER-mitochondria interaction at reperfusion can protect cardiomyocytes against lethal reperfusion injury through the reduction of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload via the CypD/VDAC1/Grp75/IP3R1 complex.

**Key words:** mitochondria, calcium, ischemia reperfusion injury, sarcoplasmic reticulum, mitochondria-associated membranes

## Introduction

Mitochondria and the endoplasmic reticulum (ER) are separately considered as key players in cell death signaling<sup>1</sup>. Mitochondria and ER are interconnected organelles and form endomembrane network. The contact points through which ER communicates with mitochondria are referred to as mitochondria-associated membranes (MAM)<sup>2</sup>. MAM are enriched in phospholipids- and glycosphingolipid-synthesis enzymes, as well as chaperone proteins, which transport lipids and exchange calcium between these two organelles<sup>1</sup>. Several recent studies have identified new proteins enriched at the ER-mitochondria interface, highlighting the emerging understanding of the role of this region within the cell<sup>3,4</sup>. One of them has identified a macromolecular complex composed of VDAC1, Grp75 and IP3R1 which regulates direct Ca<sup>2+</sup> transfer from ER to mitochondria<sup>5</sup>. Indeed, ER-mitochondria junctions are aligned with mitochondrial contact points where VDAC1 is abundantly present, thus creating a hotspot for the Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER<sup>6</sup>. While the role of this organelle crosstalk begins to be understood in cell physiology, MAM involvement in cardiac pathologies remains unknown.

Calcium signaling is central for the heart function, through its physiological role in excitation-contraction coupling, and the detrimental impact of Ca<sup>2+</sup> overload during heart failure and myocardial ischemia-reperfusion. During this latter condition, it is well accepted that the cytosolic accumulation of Ca<sup>2+</sup> subsequently results in mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload, which activates the matrix chaperone cyclophilin D (CypD) and triggers the opening of the permeability transition pore (PTP) leading to cell death<sup>7</sup>. Recent reports have confirmed the existence of Ca<sup>2+</sup> microdomains between ER and mitochondria in the myocardium where the organization of the network between the two organelles is highly ordered<sup>8,9</sup>. It has also been suggested that mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload could be mediated through IP3R<sup>10</sup>.

We therefore questioned whether  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from ER to mitochondria via the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex might play a role in mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload and subsequent cardiomyocyte death observed during the reperfusion phase following a sustained ischemic insult. We further questioned the relationship between CypD and VDAC1/Grp75/IP3R1 complex in the regulation of the  $\text{Ca}^{2+}$  exchange during ischemia-reperfusion. We report a new physiological role of CypD in ER-mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  exchange via its interaction with the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex, with major impact on cardiomyocyte death upon hypoxia-reoxygenation.

## Methods

For further details, see supplemental methods.

## Animals

*Ppif*<sup>-/-</sup> mice under C57Bl6/SV129 background were a gift from SJ Korsmeyer's lab (Dana Farber Cancer Institute, Boston, US)<sup>11</sup>. Both WT and *Ppif*<sup>-/-</sup> male mice were obtained by homozygous intercross in our laboratory. All experiments were performed on mice at 8 weeks. All procedures conformed to European Parliament Directive 2010/63/EU and the 22 September 2010 Council on the protection of animals and were approved by the local institutional animal research committee (N°BH2012-64).

## Duolink® Proximity Ligation in situ Assay (PLA)

Cells were fixed with 4% Paraformaldehyde (10min at room temperature, RT) and permeabilized using 0.1% Triton X100 (15min at RT). Subsequent blocking, antibody hybridizations, proximity ligations and detections were performed according to recommendations from manufacturers (OLINK Bioscience). The cells were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C and

then washed three times with TBS-0.05% Tween 20 (TBS-T). Briefly, after incubation with primary antibodies, we applied combinations of corresponding PLA probes for 1h at 37°C. The cells were washed with TBS-T, incubated for 30min with ligase, and finally washed with TBS-T. Then, cells were incubated with polymerase for 100min. Finally, the cells were washed once with SSC 1X, and then with SSC 0,1X. All reactions were performed at 37°C in a humid chamber, with 30µl of reaction mixture/well. Preparations were mounted in DuoLink II mounting medium, containing DAPI (Eurogentec). Fluorescence was analyzed with a Zeiss inverted fluorescent microscope equipped with an ApoTome, using the AxioVision program.

Quantification of signals was done with the BlobFinder software (Centre for Image Analysis, Uppsala University) and expressed as interactions per cell relative to the non-treated. Experiments were performed at least three times, with a minimum of 5 fields taken per conditions.

### **Ca<sup>2+</sup> measurements in H9c2 cells**

Ca<sup>2+</sup> transfer from ER to mitochondria was assessed by recording mitochondrial Ca<sup>2+</sup> changes in a native cell environment in presence of extracellular calcium (phenol-free DMEM with 1.8mM CaCl<sub>2</sub> and 10%FBS). Cells were plated in a 8-well chamber glass slide (LabTek, Dutscher). To measure mitochondrial Ca<sup>2+</sup>, cells were incubated with Rhod2-AM (2µM, Invitrogen) in phenol-free DMEM with 0.03% pluronic acid (Sigma) for 1h at 37°C. Cells were then washed free of Rhod2 and de-esterified in phenol-free DMEM/10% FBS at 37°C. After being loaded, cells were placed on the stage of a Zeiss LSM 780 bi-photon confocal microscope (Zeiss, Le Pecq France) equipped with a 63X lens (oil immersion, Numerical Aperture, NA=1.4). Rhod2 fluorescence signals were recorded at 30°C by excitation at 561nm and measuring the emitted light at 588nm. Collected images were processed with Zen 2009 Light Edition software (Zeiss).

### **Isolation of adult murine cardiomyocytes and Ca<sup>2+</sup> measurements**

Ventricular cardiomyocytes were isolated using enzymatic digestion according to previously described procedure<sup>12</sup>.

Cardiomyocytes were loaded for 20min at 37°C with Fluo4-AM (5μM, Invitrogen). To measure Ca<sup>2+</sup> transients, cardiomyocytes were field-stimulated at 1Hz with a current pulse delivered via two platinum electrodes. Changes in Fluo4 fluorescence were recorded at 25°C using an LSM510 Meta confocal microscope equipped with a 63x water-immersion objective (numerical aperture: 1.2; Line-scan mode: 1.5 ms/line; Zeiss). Scanning was carried out along the long axis of the cell.

To measure mitochondrial Ca<sup>2+</sup>, cardiomyocytes were loaded for 40min at 37°C with Rhod2-AM (5μM, Teflabs, Austin, USA). Cardiomyocytes were stimulated under action potential induced-clamp conditions using a whole-cell patch-clamp technique at RT with an Axopatch 200B (Axon Instruments), as described previously<sup>13</sup>.

### **Cellular model of hypoxia-reoxygenation and analysis of cell death and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> concentration**

H9c2 cardiomyoblasts were subjected to 3h of hypoxia followed by 2h of reoxygenation at 37°C. Cells were randomized to receive either no additional intervention (HR), or 1μM NIM811 (HR+NIM811), or 50μM 2-APB (HR+2-APB), administered at the onset of reoxygenation. To simulate hypoxia, the cell culture medium was replaced with Tyrode containing (in mM): 130 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub> at pH 7.4/37°C and cardiomyoblasts were exposed to hypoxia in a controlled hypoxic chamber (Adelbio®, Clermont-Ferrand, France) by 95% nitrogen and 5% CO<sub>2</sub> gas mixture flushing up to partial O<sub>2</sub> pressure of 0.5 to 1%. Reoxygenation was conducted in a normoxic incubator at 37°C, by replacing the ischemia-medium for 2h with



DMEM supplemented with 10%FBS. Time Control (TC) group consists in cells without the hypoxic stimulus, kept in the reoxygenation buffer. Cell death was determined after loading with 1µg/mL propidium iodide (PI) that permeates only the damaged cells, and measured by flow cytometry (FACSCalibur, BD) at the end of the 2h reoxygenation. Similar protocol was used for isolated adult cardiomyocytes, except that the duration of hypoxia was reduced to 45min and cell death was measured by counting PI-positive cells using microscopy after the 120-minute reoxygenation period. For mitochondrial  $Ca^{2+}$  concentration measurements, H9c2 cells were loaded before hypoxia with Rhod2 as described above, and fluorescence measurement was determined by a fluorescence plate reader (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific) at an excitation wavelength of 542nm and an emission wavelength of 590nm. Intensity was normalized by cell density measured with Crystal Violet staining.

### Statistical analysis

Data are expressed as the mean±SEM. Experiments were performed at least three times, in duplicates or more. Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism software using non-parametric tests. Comparisons among more than 2 groups were analysed by the Kruskal-Wallis test. When the Kruskal-Wallis test was significant, the Dunn's appropriate multiple testing procedure was performed. For all other analysis, data were compared by the Mann-Whitney rank sum test. Statistical significance was defined as a value of  $p < 0.05$ .

### Results

#### **CypD interacts with the VDAC1/Grp75/IP3R1 $Ca^{2+}$ channelling complex in the heart**

We first questioned if CypD could be present at the heart MAM interface by adapting the protocol of MAM isolation from liver to the heart<sup>14</sup>. Absence of cross-contamination and purity

of each fraction was assessed by both electron microscopy (**Supplementary figure 1**) and Western Blot (**Figure 1A**). As expected, CypD was concentrated in pure mitochondria and absent of the ER. However, a small fraction of CypD was also detected in the MAM fraction, together with IP3R1, Grp75 and VDAC1. To determine if these proteins could form a macromolecular complex, we performed 2D blue native page separation of heart homogenates. CypD was present in varying amounts in complexes which have a wide range of sizes, but more particularly in a high molecular weight complex where VDAC1, Grp75 and IP3R1, but not ANT, were detected (**Figure 1B**). A specific interaction of CypD with the IP3R1 channelling complex was also demonstrated by IP3R1 immunoprecipitation in mice heart homogenates (**Figure 1C**). To further confirm the involvement of CypD in the IP3R1 channelling complex, we monitored *in situ* protein-protein interactions at MAM interface by proximity ligation assay in H9c2 cardiomyoblasts. We observed the interaction between IP3R1 and VDAC1, with Grp75 as an intermediate (**Figure 1D**, first row). To evaluate the potential involvement of CypD in this complex, we analyzed the interactions between IP3R1/CypD, as well as with Grp75. For each couple of proteins, red fluorescent dots were observed, illustrating interactions of IP3R1 and Grp75 with CypD (**Figure 1D**, middle row). Interestingly, no interaction was observed between CypD and other ER Ca<sup>2+</sup> channeling proteins, like Serca2 and RyR2, neither with IP3R2 (**Figure 1C**, last row). This suggests that the CypD interaction with the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex is specific and occurs at the ER-mitochondria interface (**Supplemental figure 2**).

**CypD removal from the ER-mitochondria interface decreases the interactions of partner proteins within the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex.**

CypD is known to be a mitochondrial matrix protein able to be recruited at the inner membrane. In order to understand the role of CypD in the MAM, we performed at different time points

(30min, 2h and 16h) a pharmacological inhibition of CypD in H9c2 cells. We used NIM811, a specific inhibitor of CypD (known to detach it from the inner mitochondrial membrane<sup>15</sup>), to determine if it might change this protein localization in the MAM of H9c2 cells. As shown in **Figure 2A-B**, NIM811 treatment significantly decreased the interactions between CypD and IP3R1 after 2h and 16h with a time-dependent effect. Interestingly, inhibition of CypD by NIM811 also modified the interaction between the other partner proteins of the complex; indeed, Grp75/IP3R1 interactions were reduced as soon as 30min after NIM811 treatment (**Figure 2C**) whereas interactions between Grp75 and VDAC1 diminished only after 2h of NIM811 treatment (**Figure 2D**).

In line with this, adult cardiomyocytes of *Ppif*<sup>-/-</sup> (CypD protein, mice null for the *Ppif* gene) mice displayed significantly decreased interactions of both VDAC1 and Grp75 with IP3R1 (**Figure 2E-F**). We further analyzed the composition of heart MAM following the *in vivo* administration of either NIM811 or CsA in mice. Interestingly, NIM811 significantly decreased the presence of the chaperones CypD and Grp75 at the MAM interface, with a similar trend for CsA (**Figure 2G-H**).

Alternatively, the inhibition of IP3R by either 2-APB or XestoC also decreased the interactions of IP3R1 with CypD and Grp75 (**Supplemental figure 3**).

### **CypD controls the Ca<sup>2+</sup> transfer from ER to mitochondria through IP3R1**

Given that the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex has been shown to directly control the Ca<sup>2+</sup> transfer from ER to mitochondria<sup>5</sup>, we hypothesized that CypD would play a role in this Ca<sup>2+</sup> exchange between the two organelles. Assessment of specific mitochondrial Ca<sup>2+</sup> loading with Rhod-2 was performed on H9c2 cells after histamine stimulation, known to induce Ca<sup>2+</sup> release from ER stores (**Figure 3A**). In untreated H9c2, histamine rapidly increased mitochondrial Ca<sup>2+</sup>

levels, reflecting IP3R-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from ER to mitochondria. Both the down-regulation of CypD expression by specific siRNA and the pharmacological inhibition of CypD by NIM811 led to a non-significant reduction of the amplitude of the histamine-stimulated increase of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  when compared to siCTL (**Figure 3B-D**). Inhibition of CypD also accelerated the decay time as depicted by the decreased tau but did not significantly modify the time of rise of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figure 3E-F**). So, to rule out an effect on the mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, we analyzed the effect of its inhibitor, CGP-37157, on the histamine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transfer after NIM811 treatment (**Supplemental figure 4A**). In H9c2 cells treated with NIM811, we observed a similar decrease of  $\text{Ca}^{2+}$  transfer to mitochondria with prevention of the increase in tau after histamine stimulation when the mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger is inhibited (**Supplementary figure 4B-C**). Importantly, neither the inhibition of CypD by NIM811 nor of IP3R1 by 2-APB caused any significant change in the mitochondrial membrane potential, as assessed by TMRM (**Supplementary figure 5**).

To confirm the involvement of CypD in this  $\text{Ca}^{2+}$  coupling in the heart, we examined  $\text{Ca}^{2+}$  transients in isolated adult cardiomyocytes from WT and *Ppif*<sup>-/-</sup> mice. In adult *Ppif*<sup>-/-</sup> cardiomyocytes, the electrically evoked  $\text{Ca}^{2+}$  transients displayed an unchanged rate of rise, a significantly reduced amplitude and an increased time constant of decay (**Figure 4A-D**). Caffeine stimulation revealed a reduction in the SR  $\text{Ca}^{2+}$  load without any change of the rate of  $\text{Ca}^{2+}$  release (**Figure 4E**). Importantly, these alterations of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis were mimicked by pharmacological inhibition of CypD activity with NIM811 in isolated WT cardiomyocytes (**Figure 4A-E**).

To confirm the involvement of CypD *in vivo* in the  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from SR to mitochondria, we measured mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  load by Rhod-2 in isolated cardiomyocytes from

WT and *Ppif*<sup>-/-</sup> mice under patch-clamp conditions (**Figure 4F**). *Ppif*<sup>-/-</sup> cardiomyocytes exhibited a significant reduction of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> loading after both action potential-induced Ca<sup>2+</sup> transients and caffeine-induced SR Ca<sup>2+</sup> release (**Figure 4G-H**). Altogether, these data strongly suggest that CypD is involved in the SR-mitochondria Ca<sup>2+</sup> coupling in the heart through the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex. This SR-mitochondria Ca<sup>2+</sup> coupling may also contribute to modulate the global Ca<sup>2+</sup> homeostasis and excitation-contraction coupling in cardiomyocytes.

### **Inhibiting the CypD/VDAC1/Grp75/IP3R1 complex protects from hypoxia-reoxygenation injury**

Based on these results, we hypothesized that the IP3R1-dependent Ca<sup>2+</sup> transfer could also play a role in the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload observed during ischemia-reperfusion, and thus may be a new pharmacological target to prevent ischemia-reperfusion injury. Hypoxia-reoxygenation (HR) of H9c2 led to a significant increase of the interactions between CypD, Grp75 and IP3R1 as revealed by *in situ* PLA (**Figure 5A and B, Supplemental Figure 6**). These increased protein-protein interactions were associated with a higher mitochondrial Ca<sup>2+</sup> load (**Figure 5C**) and a significant increase of cell death as compared to time control (TC) cells (**Figure 5D**).

Interestingly, treatment at reoxygenation with either 2μM NIM811 or 50μM 2-APB reduced CypD/IP3R1 interactions and inhibited HR-induced mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload and cell death (**Figure 5A-D**). Similar observations were made following genetic down-regulation of CypD (**Supplemental Figure 7**) or treatment with Xestospongine C, another inhibitor of IP3R (**Supplemental Figure 8**). To confirm the involvement of CypD and the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex during HR injury, we down-regulated another partner of this complex, Grp75. Under baseline conditions (TC), the down-regulation of Grp75 significantly reduced the Grp75/IP3R1 interactions and tended to reduce the CypD/IP3R1 interactions, and caused a decrease of the

mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  load (**Figure 6A-C**). After HR, Grp75-silenced H9c2 cells showed a decreased interaction of CypD and Grp75 with IP3R1 and a prevention of the increase in mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  content when compared to siCTL (**Figure 6A-C**). Cell death was significantly reduced after HR in the siGrp75 group. These results support the idea that modifying the CypD/VDAC1/Grp75/IP3R1 complex at reoxygenation prevents the  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from ER to mitochondria during HR and attenuate mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  loading and subsequent lethal cell injury.

### **Down-regulation of Mfn2 protects H9c2 cells from lethal hypoxia-reoxygenation injury**

Mfn2 has been recently shown to be involved in the tethering of ER to mitochondria and to regulate cardiac bioenergetics at the MAM interface<sup>3, 8</sup>. Down-regulation of Mfn2 reduced the interactions between both CypD and VDAC1 with IP3R1, at baseline but also after HR (**Figure 7A**). In addition, down-regulation of Mfn2 prevented the increase of the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  content observed after HR (**Figure 7B**). Eventually, cells depleted in Mfn2 were protected against lethal HR injury (**Figure 7C**). These data support the proposal that decreasing the ER-mitochondria tethering protects from HR injury by reducing the IP3R1-mediated ER-mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  transfer.

### **Protection of adult mice cardiomyocytes from lethal reoxygenation injury by targeting the CypD/VDAC1/Grp75/IP3R1 complex**

The organization of the ER/SR and mitochondria is more complex in cardiomyocytes than in H9c2 cells. We then checked whether we could make similar observations in adult WT and *Ppif*<sup>-/-</sup> primary cardiomyocytes. Cardiomyocytes were subjected to 45 minutes of hypoxia followed by 2 hours of reoxygenation. In WT cardiomyocytes, the analysis of the interaction of both CypD and VDAC1 with IP3R1 by *in situ* PLA showed that HR significantly increased the interaction

between the partners of the IP3R1 Ca<sup>2+</sup> channelling complex, concomitant with 45% of cell death as assessed by propidium iodide staining (**Figure 8A-C**), in agreement with our data in H9c2 cells. Treatment at reoxygenation with 1 μM NIM811 significantly reduced the interaction between VDAC1 and IP3R1 and tended non-significantly to reduce the CypD/IP3R1 interactions while significantly decreasing HR-induced cell death (**Figure 8A-C**). Importantly, *Ppif*<sup>-/-</sup> cardiomyocytes displayed a significant reduction of both VDAC1/IP3R1 and Grp75/IP3R1 interactions after HR, concomitant to a reduced cell death (**Figure 8D-E**).

## Discussion

We report that the mitochondrial chaperone CypD modulates ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> crosstalk via the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex. This modulation plays an important role in hypoxia-reoxygenation injury. Pharmacological or genetic inhibition of each partner of the complex modified the Ca<sup>2+</sup> fluxes and blunted lethal reoxygenation injury. Decreasing the tethering of ER to mitochondria by down-regulation of Mfn2 also prevented mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload and reduced cell death following hypoxia-reoxygenation injury. These findings give new insights into the mechanism of lethal myocardial ischemia-reperfusion injury and open new therapeutic perspectives.

Recently, several MAM-specific proteins were identified, including Mfn2, PACS2, sigma-1 receptor and promyelocytic leukemia<sup>3, 4, 16, 17</sup>. Most of these proteins are ER proteins, with only a few (e.g. Mfn2) belonging to mitochondria. The identification of CypD in close contact with the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex adds a new member to the list of mitochondrial partners in MAM. Several of these MAM-specific proteins are Ca<sup>2+</sup>-sensitive chaperones<sup>5</sup>. Interestingly, CypD is a Ca<sup>2+</sup>-sensitive mitochondrial chaperone and belongs to the peptidyl-



prolyl *cis-trans* isomerase family, confirming the important role of this class of proteins to regulate Ca<sup>2+</sup> signalling at ER-mitochondria contact sites. Whether the chaperone activity of CypD is important for its interaction with the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex was not specifically addressed in this study. Nevertheless, we found that pharmacological inhibition or siRNA removal of CypD altered the interaction among the other proteins of the VDAC1/Grp75/IP3R1, suggesting that the link between CypD and the complex might not only be functional but also structural. One cannot however rule out that the predominant matrix fraction of CypD might also play a role in Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER to mitochondria. The mechanism by which CypD physically and functionally interacts with the VDAC1/Grp75/IP3R1 Ca<sup>2+</sup> channelling complex needs further investigation. However its inhibition by NIM811, known to detach CypD from the mitochondrial membrane, suggests that its binding to the inner membrane is required to modulate the Ca<sup>2+</sup> flux from ER to mitochondria through the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex. The observation that, under normoxic conditions, CypD facilitates the transfer of Ca<sup>2+</sup> from ER to mitochondria is in line with the well-known role of Ca<sup>2+</sup> in cardiac excitation-contraction coupling and bioenergy coupling between ER and mitochondria. Smaili et al. have suggested in intact hepatocytes a role of cyclophilins in the Ca<sup>2+</sup> cycling between ER and mitochondria by showing that cyclosporine modifies the IP3-dependent Ca<sup>2+</sup> signals<sup>18</sup>. The present data expand this notion since both genetic and pharmacologic inhibition of CypD leads to a decreased Ca<sup>2+</sup> transfer from ER to mitochondria through IP3R1, even in the *in vivo* cardiomyocyte model.

IP3R exists as three isoforms. Different studies suggest that several isoforms of IP3R could be enriched in the MAM<sup>5, 19, 20</sup>. In the heart, the type-1 isoform of IP3R is highly expressed, but IP3R2 is recognized as the predominant isoform in the cardiac myocyte<sup>21</sup>.



However, most of the functions of IP3Rs are attributed to the type-1<sup>22</sup> and our results show that CypD preferentially interacts with IP3R isoform 1 since no interaction with IP3R2 was observed. One can wonder whether the impact of IP3Rs signaling plays an important role in the heart compared to the cardiac RyR2 which is the major Ca<sup>2+</sup> release channel on the sarcoplasmic reticulum in cardiomyocytes. In fact, accumulating evidence suggests that the IP3Rs, and more particularly the type 1 isoform, are involved in cardiac calcium signaling including the excitation-contraction and excitation-transcription coupling in the normal heart but also in some pathologies like hypertrophy<sup>21, 23-26</sup>.

One may question whether other factors, including mitochondrial membrane potential or SR Ca<sup>2+</sup> load, might contribute to attenuate Ca<sup>2+</sup> transfer from ER to mitochondria upon inhibition of CypD. In contrast to Smaili et al.<sup>18</sup>, we found that inhibition of CypD by NIM811 did not modify the mitochondrial membrane potential, indicating that the observed reduction of Ca<sup>2+</sup> transfer from ER to mitochondria was likely not the result of a diminution of the driving force between the two organelles. Following both the chronic (*Ppif*<sup>-/-</sup>) and acute (NIM811) inhibition of CypD, we showed that cardiomyocytes exhibited a slower cytosolic Ca<sup>2+</sup> transient decay (**Figure 4A**), indicative of a slower SR Ca<sup>2+</sup> uptake, which in turn may explain the observed reduction in SR Ca<sup>2+</sup> content (**Figure 4E**). The reduction in SR Ca<sup>2+</sup> content can by itself explain the reduction in SR Ca<sup>2+</sup> transient (**Figure 4A-B**) since the RyR2-dependent release process does not seem to be affected (**Figure 4D**). One may question whether the reduced SR Ca<sup>2+</sup> content may further contribute to the limitation in SR to mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer. Such mechanism remains to be investigated in depth in future studies. In summary, we propose that the inhibition of CypD by first limiting the Ca<sup>2+</sup> transfer from SR to mitochondria through the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex might create a metabolic uncoupling between SR and

mitochondria, which subsequently results in a deficient uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  by SR, possibly contributing to the disturbances in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. Elrod et al. recently reported that cyclosporine could increase  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by mitochondria<sup>27</sup>. This apparent discrepancy with our results may be due to different experimental preparations and techniques of  $\text{Ca}^{2+}$  measurements. Elrod used pericam to measure mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  in neonatal rat cardiomyocytes whereas we used Rhod2 either in H9c2 cardiomyoblasts or in adult mouse cardiomyocytes. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  was measured after single-pulse field stimulation by Elrod, whereas we also used histamine stimulation of IP3R, meaning that we, but not Elrod, specifically addressed the transfer of  $\text{Ca}^{2+}$  from ER to mitochondria through the VDAC/Grp75/IP3R1 complex. Estimation of the efficiency of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake would have required that we had simultaneously measured cytosolic and mitochondrial calcium; it would have still be difficult to separate the effect of CypD inhibitors on either its energetic or calcium channeling properties.

Upon ischemia and reperfusion, the accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  into mitochondria can trigger PTP opening and cell death<sup>28</sup>.  $\text{Ca}^{2+}$  crosstalk between ER and mitochondria has been involved in myocardial reperfusion injury<sup>29</sup>. We hypothesized that at least part of the death signal represented by mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload would come from the ER, and that what we had observed under normoxic conditions would be of significant relevance upon the challenge of hypoxia-reoxygenation injury. The interactions among all the partners of the CypD/VDAC1/Grp75/IP3R1 complex were significantly increased after HR and associated with mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload and cell death. Pharmacological inhibition of CypD by NIM811 administered at the time of reoxygenation prevented the increased interaction between the partners of the IP3R1  $\text{Ca}^{2+}$  channeling complex and attenuated the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload. This suggests that the enhanced contact between ER to mitochondria and the subsequent

increased transfer of  $\text{Ca}^{2+}$  through the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex during reoxygenation following a prolonged hypoxic insult may contribute to lethal cardiomyocyte injury. Obviously, one may object that the reduction of cell death following inhibition of CypD was due to the sole inhibition of PTP opening within mitochondria. Whereas this point is very difficult to clarify as CypD-independent inhibitors of PTP would also reduce mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload and cell death, different observations are against this proposal. First, the pharmacological inhibition or genetic ablation of CypD caused disturbances in ER  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis even under normoxic conditions, i.e. when the PTP is not formed. Second, the mitochondrial CypD is located into the matrix under normoxic conditions, and needs to be translocated to the inner membrane to trigger PTP opening upon hypoxia-reoxygenation. In contrast, it appears that the sub-fraction of CypD located at MAMs is already bound to the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex under normoxic conditions. The reason for that is unclear; however, one may hypothesize that the likely high local concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the vicinity of the mitochondrial side of the VDAC1/Grp75/IP3R1 channel, favours the binding of local CypD to the inner mitochondrial membrane. Third, we demonstrated that the inhibition of CypD reduced the number of CypD/VDAC1/Grp75/IP3R1 complexes formed during hypoxia-reoxygenation and significantly attenuated  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation into mitochondria. Most importantly, non CypD-related reduction of ER-mitochondria interactions by pharmacological inhibition of IP3R or genetic loss of function of either Grp75 or Mfn2 produced very comparable effects than inhibition of CypD in terms of reduction of  $\text{Ca}^{2+}$  flux from ER to mitochondria and cell death. There is also no evidence that either protein is linked to the PTP. This strongly suggests that the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex plays a major role in hypoxia-reoxygenation injury through the  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from ER to mitochondria. It indirectly indicates that CypD is one target within this complex, apart from the PTP, that might

be used to prevent mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload during hypoxia-reoxygenation. With this paradigm, inhibition of CypD would protect against ischemia-reperfusion injury via two synergistic actions (**Supplemental Figure 9**): 1) the *upstream* limitation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload by the reduction of  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from ER to mitochondria, and 2) the *downstream* prevention of PTP formation via the limitation of CypD binding to the inner mitochondrial membrane. This is consistent with a previous report suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  cycling from ER to mitochondria may directly favor the PTP<sup>30</sup>. This is also in agreement with reports showing that some modulators of apoptosis act by modifying  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from ER to mitochondria and subsequent PTP opening<sup>4, 31-33</sup>.

In summary, our work identifies a new role for CypD as a partner of the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex at the contact sites between ER and mitochondria, contributing to the  $\text{Ca}^{2+}$  crosstalk between the two organelles. It shows that this  $\text{Ca}^{2+}$  transfer complex plays a major role in lethal reoxygenation injury, and thereby identifies new molecular targets for cardioprotection.

**Acknowledgments:** We thank Elisabeth Errazuriz and Christophe Vanbelle for their technical help and advices at the CeCILE Imaging Center (Lyon, France), Claudine Kieda for the gift of the H9c2 cells and Fabien Van Coppenolle and Rizwan Alam for their helpful and critical discussions on the manuscript.

**Funding Sources:** This work was supported in part by the ANR (CYDIACOR) from MO, by a Grant from the Servier Laboratories and by the FRM (DPM20121125551).

**Conflict of Interest Disclosures:** None.

**References:**

1. Giorgi C, De Stefani D, Bononi A, Rizzuto R, Pinton P. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:1817-1827.
2. Vance JE, Stone SJ, Faust JR. Abnormalities in mitochondria-associated membranes and phospholipid biosynthetic enzymes in the mnd/mnd mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1344:286-299.
3. de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 2008;456:605-610.
4. Giorgi C, Ito K, Lin HK, Santangelo C, Wieckowski MR, Lebiedzinska M, Bononi A, Bonora M, Duszynski J, Bernardi R, Rizzuto R, Tacchetti C, Pinton P, Pandolfi PP. PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. *Science*. 2010;330:1247-1251.
5. Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels. *J Cell Biol*. 2006;175:901-911.
6. Garcia-Perez C, Schneider TG, Hajnoczky G, Csordas G. Alignment of sarcoplasmic reticulum-mitochondrial junctions with mitochondrial contact points. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H1907-1915.
7. Di Lisa F, Canton M, Menabo R, Kaludercic N, Bernardi P. Mitochondria and cardioprotection. *Heart Fail Rev*. 2007;12:249-260.
8. Chen Y, Csordas G, Jowdy C, Schneider TG, Csordas N, Wang W, Liu Y, Kohlhaas M, Meiser M, Bergem S, Nerbonne JM, Dorn GW, Maack C. Mitofusin 2-Containing Mitochondrial-Reticular Microdomains Direct Rapid Cardiomyocyte Bioenergetic Responses via Inter-Organellar Ca<sup>2+</sup> Crosstalk. *Circ Res*. 2012;111:863-875.
9. Garcia-Perez C, Hajnoczky G, Csordas G. Physical coupling supports the local Ca<sup>2+</sup> transfer between sarcoplasmic reticulum subdomains and the mitochondria in heart muscle. *J Biol Chem*. 2008;283:32771-32780.
10. Lu FH, Tian Z, Zhang WH, Zhao YJ, Li HL, Ren H, Zheng HS, Liu C, Hu GX, Tian Y, Yang BF, Wang R, Xu CQ. Calcium-sensing receptors regulate cardiomyocyte Ca<sup>2+</sup> signaling via the sarcoplasmic reticulum-mitochondrion interface during hypoxia/reoxygenation. *J Biomed Sci*. 2010;17:17-50.
11. Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, Hetz C, Danial NN, Moskowitz MA, Korsmeyer SJ. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*

A. 2005;102:12005-12010.

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

13. Fauconnier J, Lacampagne A, Rauzier JM, Vassort G, Richard S. Ca<sup>2+</sup>-dependent reduction of IK1 in rat ventricular cells: a novel paradigm for arrhythmia in heart failure? *Cardiovasc Res*. 2005;68:204-212.

14. Wieckowski MR, Giorgi C, Lebedzinska M, Duszynski J, Pinton P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc*. 2009;4:1582-1590.

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

16. Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca<sup>2+</sup> signaling and cell survival. *Cell*. 2007;131:596-610.

17. Simmen T, Aslan JE, Blagoveshchenskaya AD, Thomas L, Wan L, Xiang Y, Feliciangeli SF, Hung CH, Crump CM, Thomas G. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *Embo J*. 2005;24:717-729.

18. Smaili SS, Stellato KA, Burnett P, Thomas AP, Gaspers LD. Cyclosporin A inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca<sup>2+</sup> signals by enhancing Ca<sup>2+</sup> uptake into the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem*. 2001;276:23329-23340.

19. Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol*. 2009;19:81-88.

20. Mendes CC, Gomes DA, Thompson M, Souto NC, Goes TS, Goes AM, Rodrigues MA, Gomez MV, Nathanson MH, Leite MF. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca<sup>2+</sup> signals into mitochondria. *J Biol Chem*. 2005;280:40892-40900.

21. Vermassen E, Parys JB, Mauger JP. Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants. *Biol Cell*. 2004;96:3-17.

22. Anger M, Lompre AM, Vallot O, Marotte F, Rappaport L, Samuel JL. Cellular distribution of Ca<sup>2+</sup> pumps and Ca<sup>2+</sup> release channels in rat cardiac hypertrophy induced by aortic stenosis. *Circulation*. 1998;98:2477-2486.

23. Kijima Y, Saito A, Jetton TL, Magnuson MA, Fleischer S. Different intracellular localization of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 1993;268:3499-3506.
24. Lipp P, Laine M, Tovey SC, Burrell KM, Berridge MJ, Li W, Bootman MD. Functional InsP3 receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr Biol*. 2000;10:939-942.
25. Nakayama H, Bodi I, Maillet M, DeSantiago J, Domeier TL, Mikoshiba K, Lorenz JN, Blatter LA, Bers DM, Molkentin JD. The IP3 receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circ Res*. 2010;107:659-666.
26. Tuvia S, Buhusi M, Davis L, Reedy M, Bennett V. Ankyrin-B is required for intracellular sorting of structurally diverse Ca<sup>2+</sup> homeostasis proteins. *J Cell Biol*. 1999;147:995-1008.
27. Elrod JW, Wong R, Mishra S, Vagnozzi RJ, Sakthivel B, Goonasekera SA, Karch J, Gabel S, Farber J, Force T, Brown JH, Murphy E, Molkentin JD. Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca<sup>2+</sup> exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:3680-3687.
28. Crompton M, Virji S, Ward JM. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem*. 1998;258:729-735.
29. Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inserte J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2012;94:168-180.
30. Ruiz-Meana M, Abellan A, Miro-Casas E, Agullo E, Garcia-Dorado D. Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H1281-1289.
31. Pacher P, Hajnoczky G. Propagation of the apoptotic signal by mitochondrial waves. *Embo J*. 2001;20:4107-4121.
32. Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. The Ca<sup>2+</sup> concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *Embo J*. 2001;20:2690-2701.
33. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E, Pinton P. Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787:1342-1351.



**Figure Legends:**

**Figure 1.** CypD is involved in the VDAC/Grp75/IP3R1 complex at the ER-mitochondria interface. A) Detection of CypD by immunoblotting in subcellular fractionation of mice heart. H: total homogenate; ER: endoplasmic reticulum; pM: pure mitochondria; MAM: mitochondria-associated membranes. Serca2 and IP3R1 were used as ER markers, VDAC1, Grp75, ANT, COX IV and cytochrome c as mitochondrial markers. B) Two dimensional blue native separation of native heart extracts from WT mice. The blue native-page was calibrated based on the location of the mitochondrial respiratory chain complexes isolated from mouse heart mitochondria, separated by electrophoresis simultaneously with the total mouse heart lysate. CypD was present in varying amounts in complexes which have a wide range of sizes, but more particularly in a high molecular weight complex where VDAC1, Grp75 and IP3R1 but not ANT were detected (see arrow). C) Immunoprecipitation of IP3R1 from mice heart homogenates specifically pulled down CypD, as well as VDAC1 and Grp75. D) Visualization of in situ interactions between CypD, VDAC1, Grp75 and IP3R1 using proximity ligation assay in H9c2 cells. Nuclei appear in blue and interactions between the two proteins are depicted in red.

**Figure 2.** CypD removal from the ER-mitochondria interface decreases protein interactions within the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex. H9c2 cells were treated with NIM811 (2 $\mu$ M) during 30min, 2h or 16h and the interactions were analysed by proximity ligation assay, in order to quantify IP3R1/CypD (B), Grp75/IP3R1 (C) and Grp75/VDAC1 (D) interactions compared to the Vehicle (Veh). Panel A shows typical images after 2h of treatment. Quantification of the Duolink PLA red fluorescent dots was performed using BlobFinder V3.2. Nuclei were stained



with Dapi. \* $p < 0.05$  vs. respective Veh,  $n = 3$  experiments. E) Typical images of in situ interactions between CypD, VDAC1, Grp75 and IP3R1 using proximity ligation assay in isolated adult cardiomyocytes from WT and *Ppif*<sup>-/-</sup> mice. Quantification in F) demonstrates a significant decrease in both VDAC1 and Grp75 interactions with IP3R1 in *Ppif*<sup>-/-</sup> cardiomyocytes. † $p < 0.05$  vs. WT,  $n = 6$ . G) Analysis of MAM composition after overnight treatment of mice with CsA or NIM (10mg/kg, IP). The corresponding bar graph (H) shows a significant decrease of the amount of both CypD and Grp75 (expressed as a ratio of VDAC content) in the MAM after in vivo CsA or NIM811 treatment.  $n = 4$ .

**Figure 3.** Inhibition of CypD in H9c2 cells reduces the  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from ER to mitochondria through IP3R. A) Representative images of mitochondria staining by Rhod-2 and Mitotracker Green, showing 95% colocalization. B-C) Representative curves of the time course of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  after histamine stimulation, after CypD down-regulation by siRNA (B) or CypD inhibition by NIM811 (C). Quantification of the maximal mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  mean fluorescence ( $F/F_0$ ) in (D), of the time constant of decay  $\tau$  (E) and the time to peak (F) after histamine stimulation.  $n = 8-12$ .

**Figure 4.** *Ppif*<sup>-/-</sup> cardiomyocytes display an alteration of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. A-E)  $\text{Ca}^{2+}$  transients in isolated WT (treated or not with 2 $\mu\text{M}$  NIM811) and *Ppif*<sup>-/-</sup> cardiomyocytes field stimulated at 1.0 Hz and visualized with Fluo-4 AM. A) Representative recordings expressed as  $\Delta F/F_0$ ; B) quantification of averaged peak  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude; C) averaged decay time constant ( $\tau$ ) of  $\text{Ca}^{2+}$  transients; D) rate of rise of  $\text{Ca}^{2+}$  transients; E) averaged SR  $\text{Ca}^{2+}$  content estimated from the caffeine-induced peak in  $\text{Ca}^{2+}$  transients. F) Representative images of patch-clamp

experiment with Rhod-2 loading in adult cardiomyocytes. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  load was assessed by Rhod-2 after action potential induced-  $\text{Ca}^{2+}$  transients (G) or caffeine-induced SR  $\text{Ca}^{2+}$  release (H).

**Figure 5.** Prevention of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload through IP3R by NIM811 and 2-APB after hypoxia-reoxygenation. Hypoxia (3hrs) followed by re-oxygenation (2hrs) (HR) was performed on H9c2 cells. A-B) Interactions between CypD/IP3R1 and Grp75/IP3R1 were studied after HR by in situ PLA. Panel A shows typical images of interactions between IP3R1 and CypD. B) Quantification of the interactions per cell was performed. HR induced an increased number of interactions when compared to Time Control cells (TC). Both NIM811 and 2-APB prevented this increase. C) Measurement of mitochondrial calcium by Rhod2 loading after 2 hours of reoxygenation. NIM811 and 2-APB attenuated the increase induced by HR. D) Cell death was measured by FACS analysis of propidium iodide staining. The mortality is presented as a percentage of PI-positive cells. Cell death was slightly but significantly reduced by NIM811 (2 $\mu\text{M}$ ) and 2-APB (50 $\mu\text{M}$ ). n=6.

**Figure 6.** Downregulation of Grp75 protects from cell death after hypoxia-reoxygenation. A) Representative in situ PLA images of Grp75/IP3R1 interactions. B) Quantification of CypD/IP3R1 and Grp75/IP3R1 interactions after Grp75 downregulation and HR. At baseline (TC), down-regulation of Grp75 caused a nonsignificant reduction of the interaction of CypD with IP3R1, and expectedly a significant reduction of the interaction of Grp75 with IP3R1. After HR, siGrp75 prevented the increased interactions between CypD and IP3R1 (non-significant trend) and between Grp75 and IP3R1 when compared to siCTL. C) Measurement of

mitochondrial calcium by Rhod2 loading after 2 hours of reoxygenation. D) Assessment of cell death after 3 hours of hypoxia followed by 2 hours of reoxygenation. Downregulation of Grp75 decreased cell death after HR as compared to control (siCTL). n=6.

**Figure 7.** Decreasing ER-mitochondria interactions by down-regulation of Mfn2 protects from cell death after hypoxia-reoxygenation. A) Quantification of CypD/IP3R1 and VDAC1/IP3R1 interactions after Mfn2 down-regulation and HR. At baseline (TC), down-regulation of Mfn2 tended (non-significantly) to decrease the interactions of both CypD and VDAC1 with IP3R1. After HR, siMfn2 significantly prevented the increased interactions between CypD, VDAC1 and IP3R1 when compared to siCTL. Inset shows Mfn2 level after 24 hours of transfection. B) Measurement of mitochondrial calcium by Rhod2 loading after 2h reoxygenation. Down-regulation of Mfn2 significantly decreased mitochondrial  $Ca^{2+}$  accumulation after HR when compared to control (siCTL). C) Assessment of cell death after 3 hours of hypoxia followed by 2 hours of reoxygenation. Down-regulation of Mfn2 decreased cell death after HR when compared to control (siCTL). n=6.

**Figure 8.** NIM811 decreases the interaction between the partners of the CypD/VDAC1/Grp75/IP3R1 complex and protects adult mice cardiomyocytes from cell death. A-B) Interactions between CypD/IP3R1 and VDAC1/IP3R1 were studied after HR by in situ PLA. Panel A shows typical images of interactions between CypD (top row) and VDAC1 (bottom row) with IP3R1. B) Quantification of interactions per cell. HR increased the interactions between CypD and IP3R1 and between VDAC and IP3R1 when compared to Time Control cells (TC). NIM811 prevented this increase. C) Assessment of cell death after 45min of

hypoxia followed by 2hrs of reoxygenation. NIM811 significantly decreased cell death after HR. n=6. Quantification of VDAC1/IP3R1 and Grp75/IP3R1 interactions (D) and assessment of cell death (E) after HR in WT and *Ppif*<sup>-/-</sup> mice cardiomyocytes. *Ppif*<sup>-/-</sup> cardiomyocytes displayed decreased interactions between VDAC1/Grp75/IP3R1 together with a significantly reduced cell death. n=6.



Figure 1

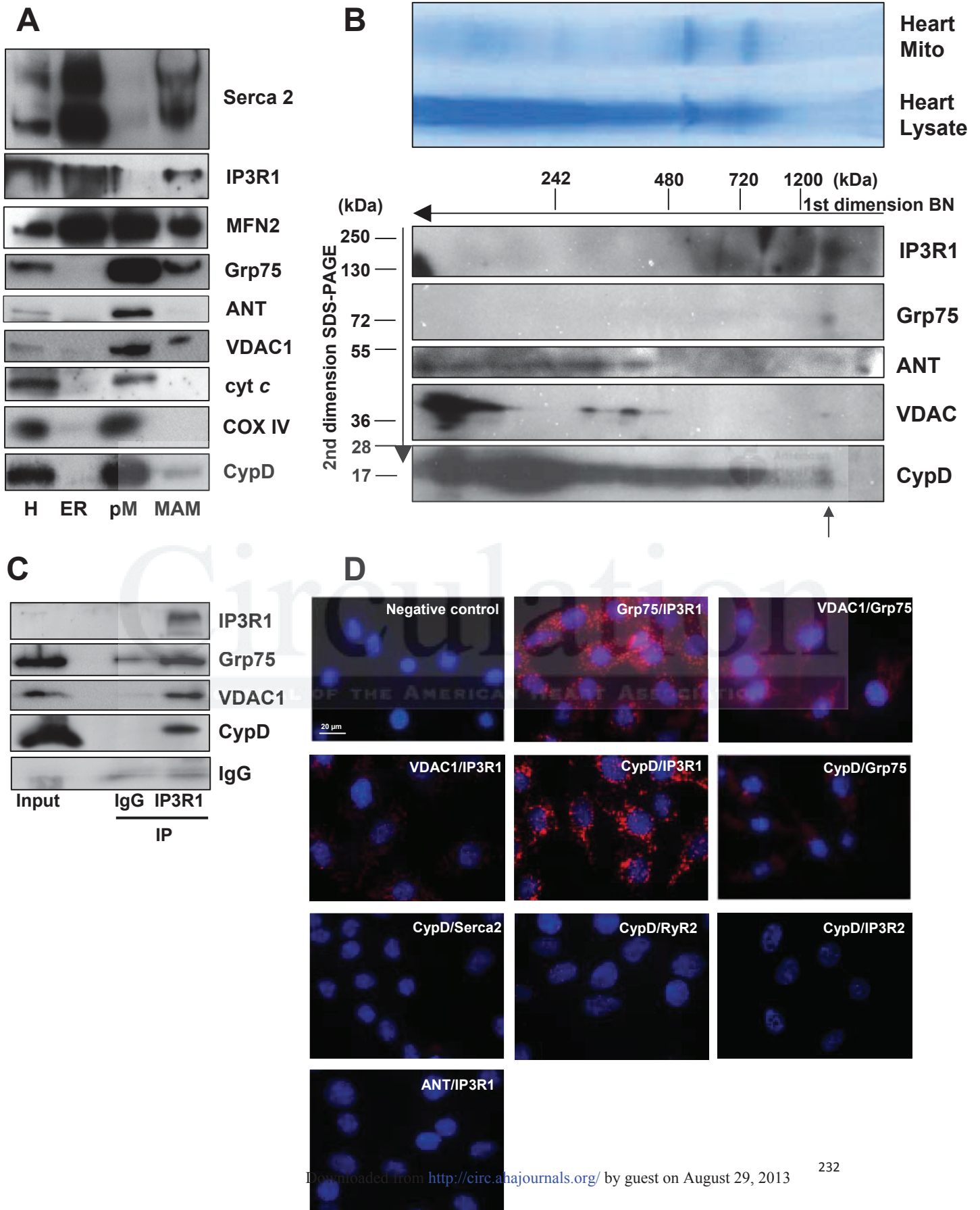


Figure 2

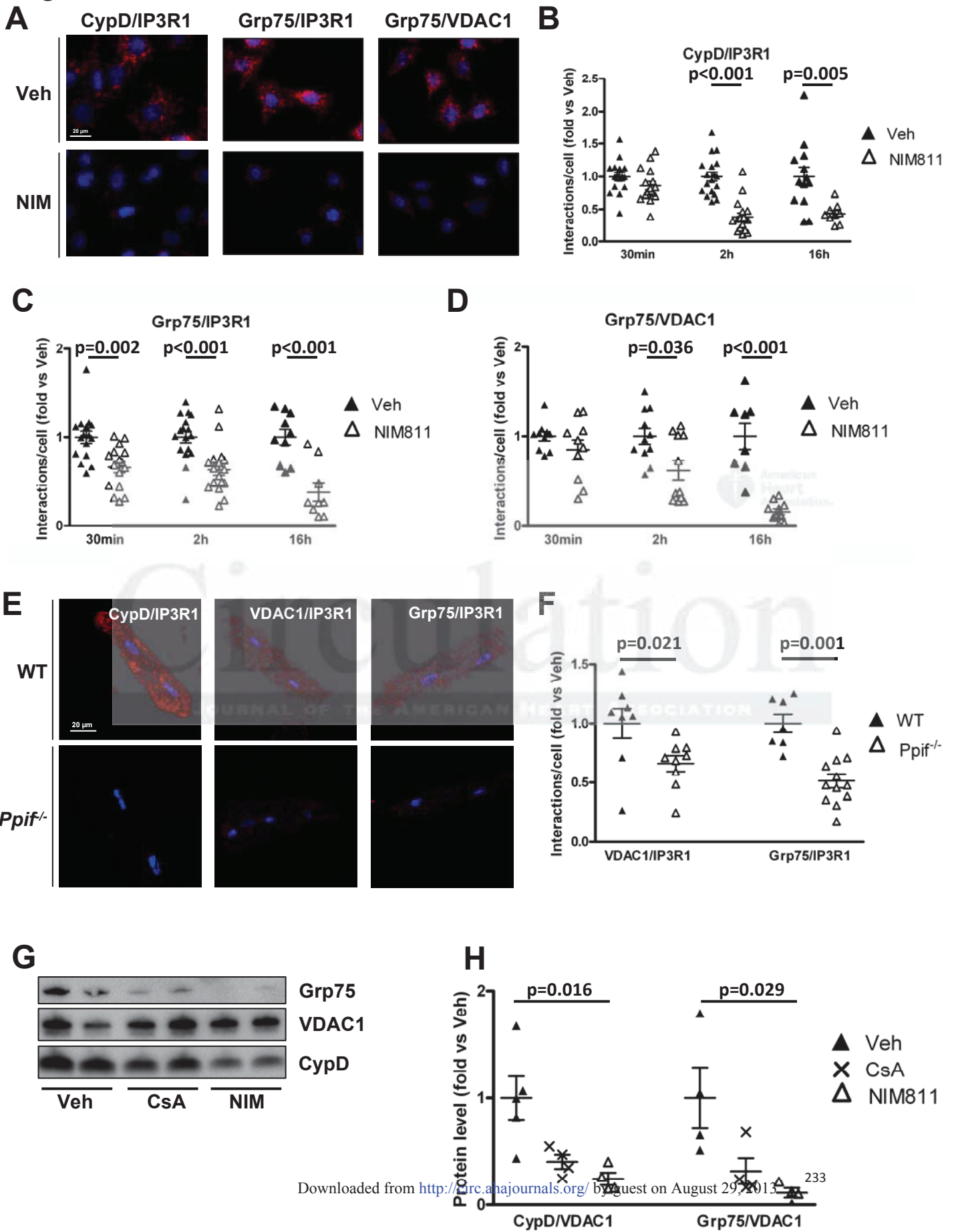




Figure 3

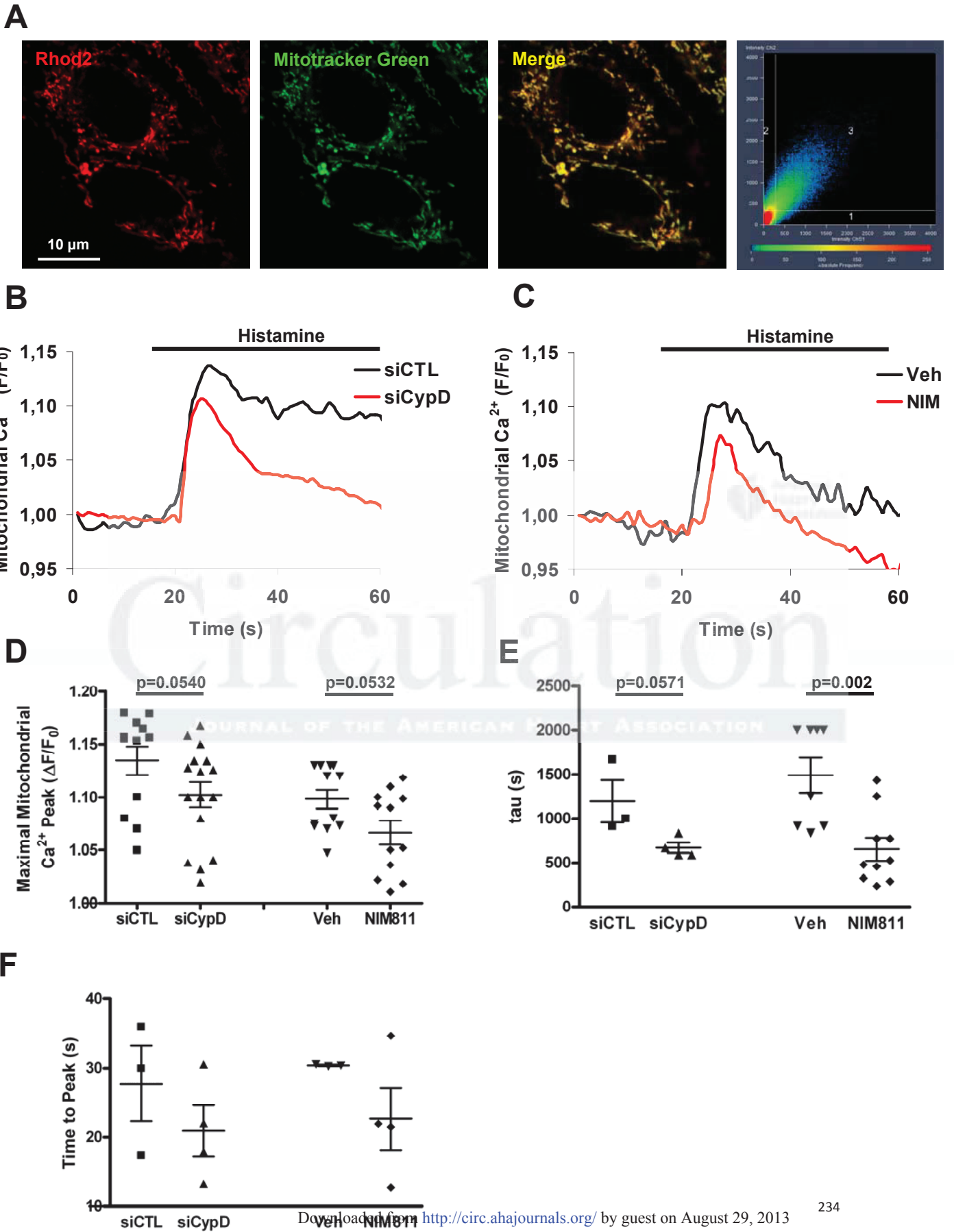
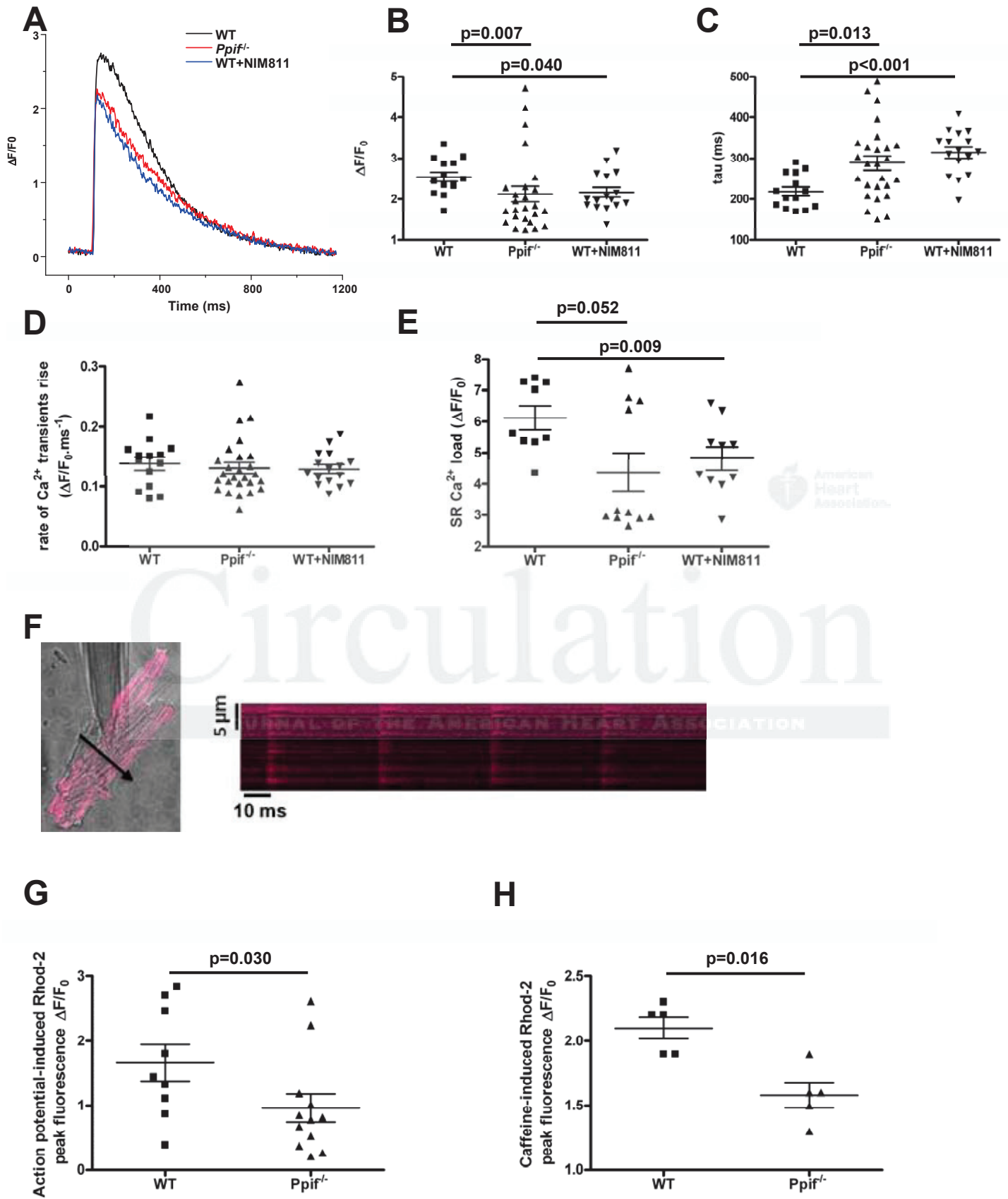


Figure 4



Circulation

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



Figure 5

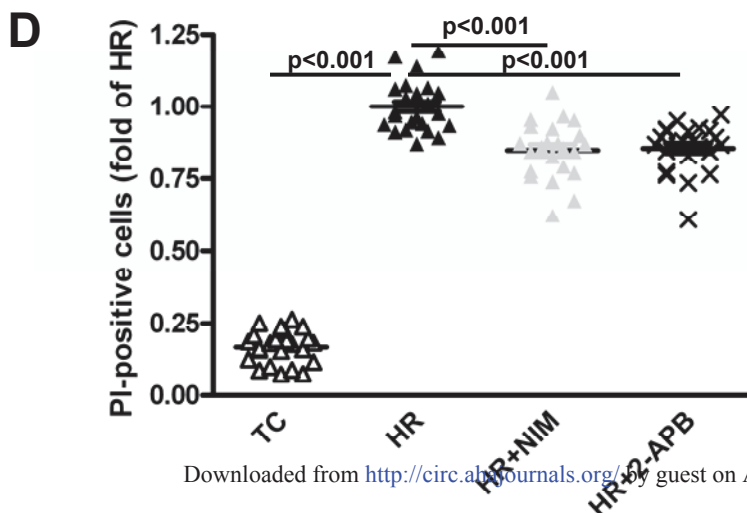
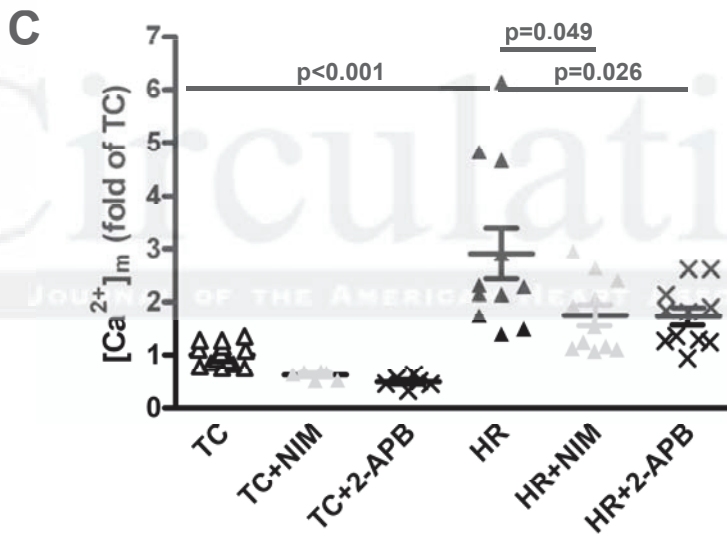
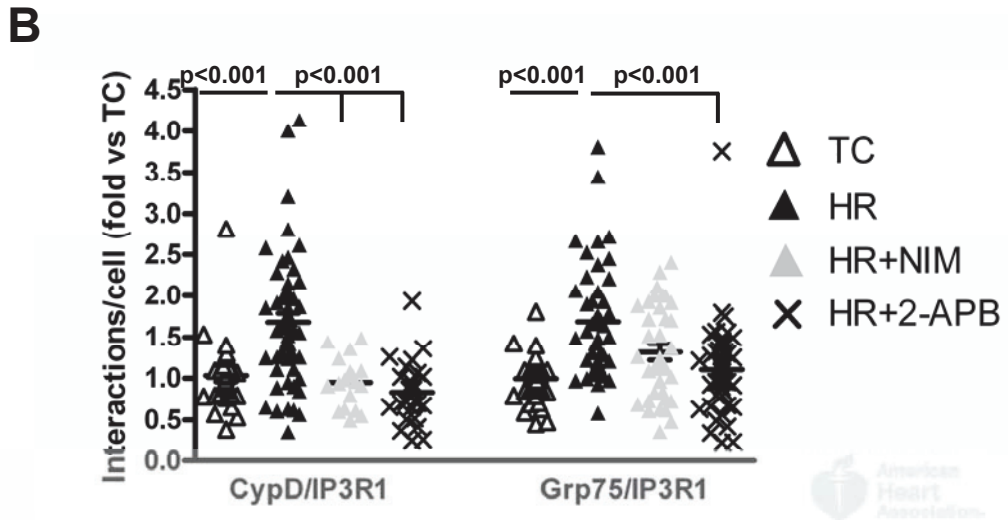
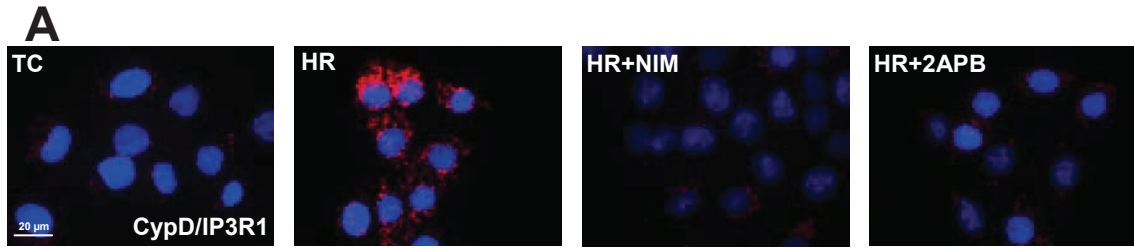


Figure 6

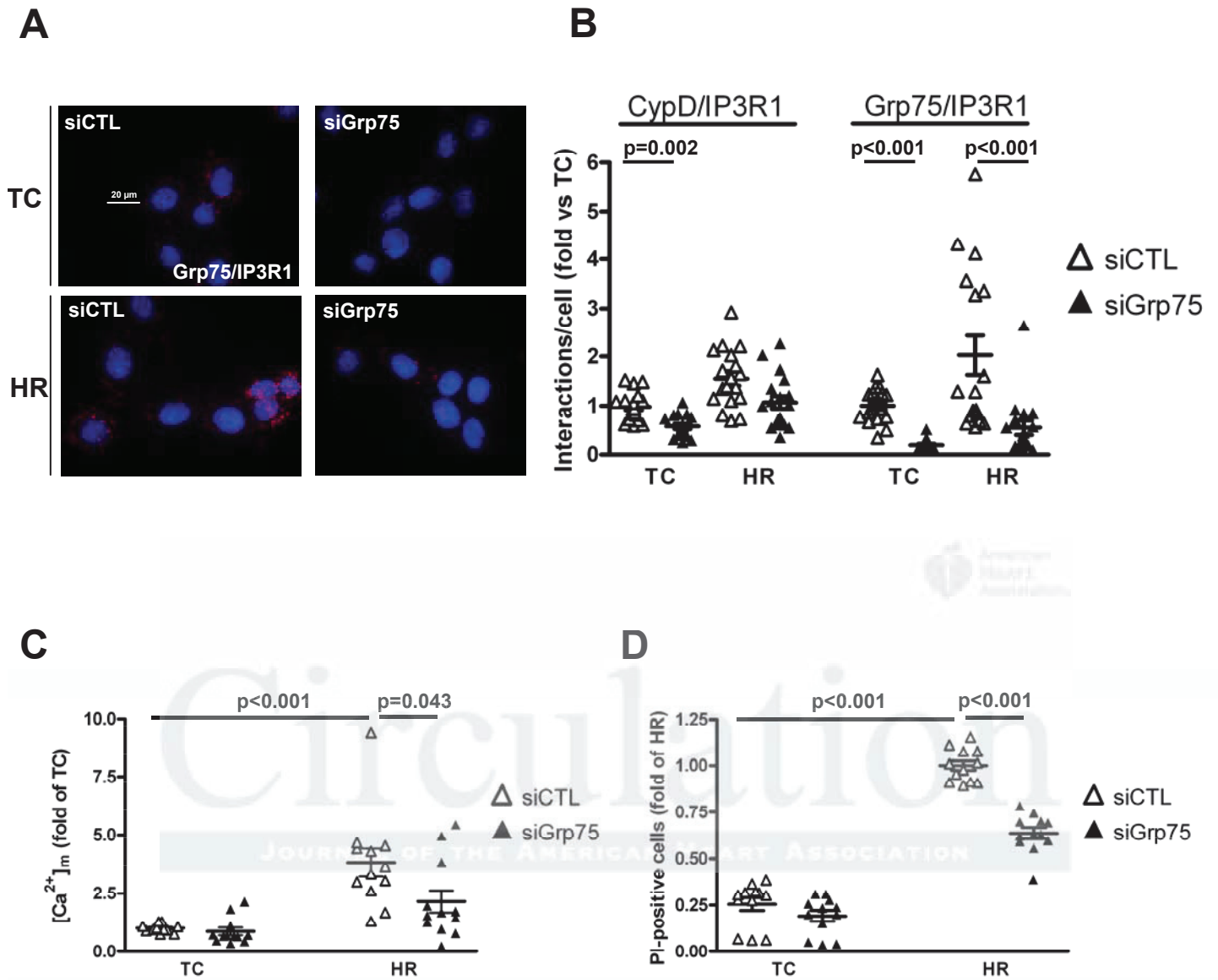


Figure 7

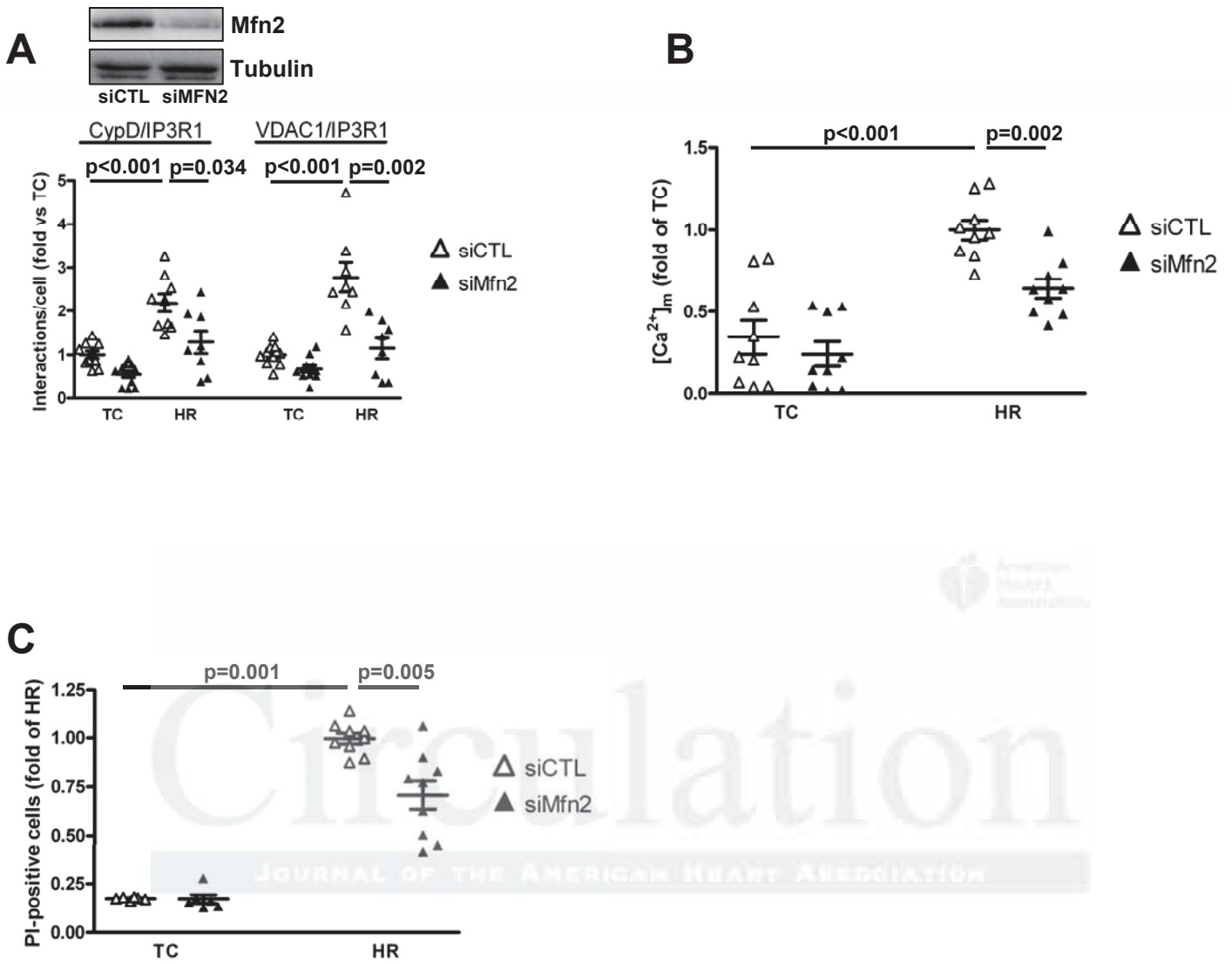
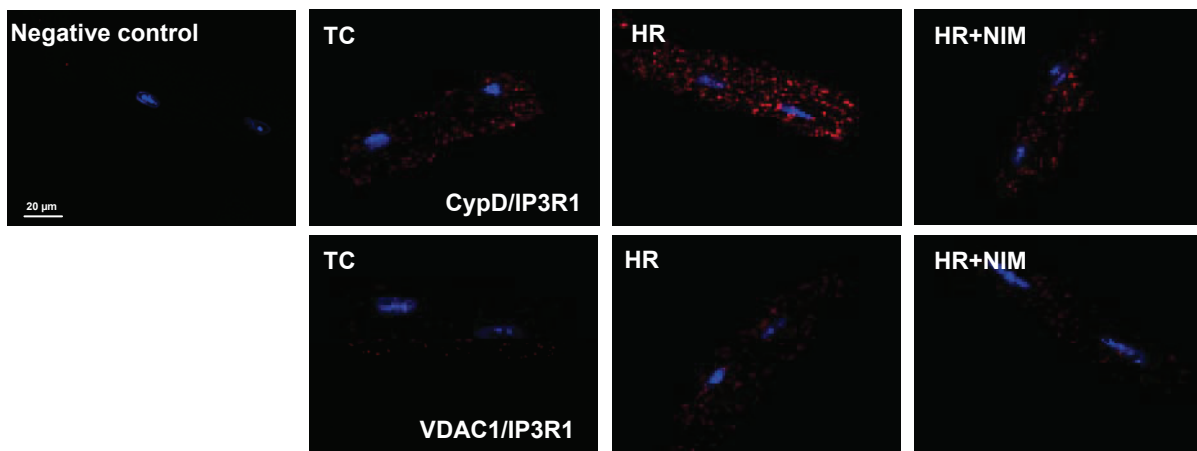
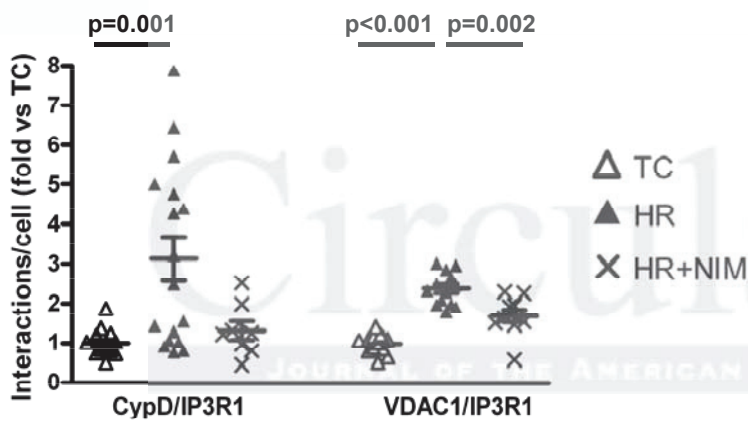


Figure 8

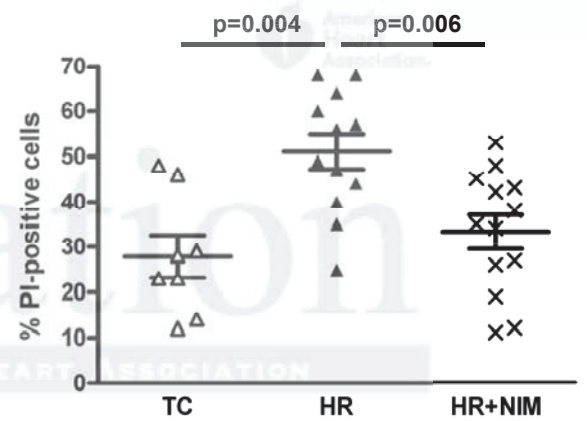
**A**



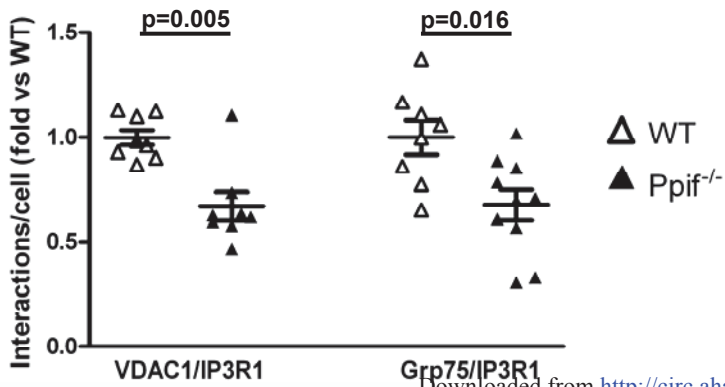
**B**



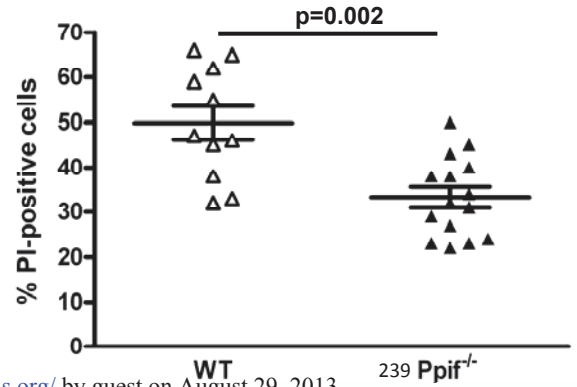
**C**



**D**



**E**



**DEPRESSING MITOCHONDRIA-RETICULUM INTERACTIONS PROTECTS  
CARDIOMYOCYTES FROM LETHAL HYPOXIA-REOXYGENATION INJURY**

Melanie Paillard, Emily Tubbs, Pierre-Alain Thiebaut, Ludovic Gomez, Jeremy Fauconnier, Claire Crola Da Silva, Geoffrey Teixeira, Nathan Mewton, Elise Belaidi, Annie Durand, Maryline Abrial, Alain Lacampagne, Jennifer Rieusset, Michel Ovize

**SUPPLEMENTAL  
MATERIAL**

## SUPPLEMENTAL METHODS

### **Isolation of mitochondria-associated membranes (MAM)**

Isolation of the MAM fraction was performed by differential ultracentrifugation as previously described <sup>1</sup>. The heart was homogenized with a glass potter in Isolation Buffer (225mM mannitol, 75mM sucrose, 0.5% BSA, 0.5mM EGTA and 30mM Tris-HCl, pH 7.4) and then centrifuged twice at 740g for 5min to remove nuclei and cellular debris. The supernatant was centrifuged at 9000g for 10min to pellet crude mitochondria which were re-suspended in Mitochondria Resuspending Buffer (MRB: 250mM mannitol, 5mM Hepes and 0.5mM EGTA, pH 7.4). Crude mitochondria were further purified through a percoll medium at 95000g for 30min in a SW40 rotor (Beckman). Purified mitochondria were localized at the bottom of the tube as a dense band whereas MAM was a diffused white band above the mitochondria. Pure mitochondria were washed twice by centrifugation at 6300g for 10min and resuspended in MRB. To further purify the MAM fraction, MAM were diluted in MRB and centrifuged at 6300g for 10min to remove any contaminating mitochondria. MAM supernatant was then centrifuged at 100000g for 1h in a 70 Ti rotor (Beckman) and the resulting pellet was resuspended in MRB. Resulting supernatant after crude mitochondria centrifugation was further centrifuged at 20000g for 30min followed by 100000g for 1h to pellet the endoplasmic reticulum (ER). Protein content was assayed by the Lowry method and 30µg of proteins from each fraction was loaded on a 4-15% SDS gel (Biorad).

### **Blue-Native and SDS-PAGE 2D separation**

Hearts from WT mice were gently homogenized three times at 6000 Hz for 10 seconds (Precellys 24, Ozyme), in CP1 buffer (100mM KCL, 50mM Mops, 5mM

MgSO<sub>4</sub>, 1mM EGTA, 1mM ATP). To prepare “native” protein lysate, native heart homogenate was solubilized with 1% Lauryl Maltoside (Mitosciences) for 30min at 4°C. To remove unsolubilized material, the lysates were centrifuged at 10000 for 10min. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad). Native page was performed according to manufacturers’ instructions (Invitrogen). Briefly, 80µg of proteins combined with 0.25% G-250 was loaded onto a 4-12% Criterion Bis-Tris gel (Biorad) for the first dimension. As an internal calibration, 20µg of mice heart mitochondria solubilized with 0.48% Lauryl Maltoside was analyzed. At the end of the first dimension, the gel strips were excised and reduced with 1X NuPage reducing agent in 1X NuPage LDS sample buffer (Invitrogen) for 15min at RT. Then, cysteines alkylation was done with N, N-Dimethylacrylamide for 15min at RT. Finally, the reaction was quenched for 15min at RT with 20% ethanol in 1X LDS and 0.1X Reducing agent. Then, the equilibrated gel strip was applied to the second dimension on a 4-16% Criterion Bis-Tris gel, separated and transferred to the PVDF membrane.

### **Cell culture and transfection**

SV40-transformed H9c2 rat cardiomyoblasts were obtained from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) (C.Kieda, patent 99-16169, France). All cell culture reagents were obtained from Invitrogen. Cells were cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) containing 4.5 mM glucose and supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin and streptomycin. Cells were plated at a density of 13000–16000 cells/cm<sup>2</sup>. Depending of the nature of experiments, H9c2 cells were plated either on 12 wells plates or in a 8-chamber glass slide (Millipore). N-methyl-4-isoleucine-cyclosporin (NIM811) (2µM, Novartis) was

dissolved in 100% Ethanol and used as a non-immunosuppressive and specific pharmaceutical inhibitor of CypD. Cells were also treated with IP3R inhibitors: 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB, 50 $\mu$ M) or XestospongineC (XestoC, 1nM) both dissolved in DMSO. Downregulation of CypD, Grp75 and Mfn2 (50nM, Qiagen) was performed using DharmaFECT transfection reagent (Thermo Scientific) according to the technical recommendations. Twenty-four hours post-transfection, the medium was removed and the cells were immediately lysed in appropriate lysis buffer and frozen at -20 °C until processing or used for further experiments.

### **Electron microscopy**

Pellets of pure mitochondria, ER and MAM from WT heart were fixed in 2% glutaraldehyde for 2h at 4 °C, postfixed in 1% osmium tetroxide for 1h at 4 °C, dehydrated and embedded in Epon. The fraction was then cut using a RMC/MTX ultramicrotome (Elexience) and ultrathin sections (60-80nm) were mounted on copper grids, contrasted with 8% uranyl acetate and lead citrate, and observed with a Jeol 1200 EX transmission electron microscope (Jeol LTD) equipped with MegaView II high resolution TEM camera. Analysis was performed with Soft Imaging System (Eloïse SARL).

### **Protein extracts and Western-blotting**

Total lysates of H9c2 were prepared in lysis buffer (containing 1% NP40, 20mM Tris-HCl, 138mM NaCl, 2,7mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5% Glycerol, 5mM EDTA, 1mM DTT) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Sigma, Aldrich) and phosphatases inhibitors (PhosStop, Roche Diagnostics). Equivalent amounts of total protein (50-100 $\mu$ g) were separated electrophoretically by SDS-PAGE (6%, 12% or 4-



15% ready gels, BioRad) and transferred to a PVDF membrane (Biorad). The later was blocked in 5% solution of dry milk in TBS-T for 1h at RT, and probed overnight at 4°C using the following antibodies: IP3R1H80 (1/1000), VDAC1 (1/2500), Grp75 (1/1000), CypD (1/2500), Mfn2 (1/1000, Abcam) and Tubulin (1/500, Santa Cruz). Immunoblots were developed using the ECL plus chemiluminescence assay system (Amersham) with the GelDoc molecular Imager (Biorad). Quantification was performed with the Image Lab software (Biorad).

### **Immunoprecipitation of IP3R1**

Heart homogenates (500 µg) were mixed overnight at 4°C with 2µg of anti-IP3R1 antibody or for control with rabbit IgG (Santa Cruz) in buffer containing 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, and 1 mM EDTA, supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Sigma and Roche, respectively). On the next day, the mixture was then incubated for 2 h at 4°C with Pure Proteome protein G magnetic beads (Millipore) and bound proteins were then eluted with Laemmli buffer.

### **Duolink® Proximity Ligation in situ Assay (PLA)**

Antibodies used for the detection of protein–protein interactions were anti-IP3R1H80 (rabbit, Santa Cruz), anti-VDAC1 (rabbit, Calbiochem and mouse, Abcam), anti-CypD (mouse, Abcam), anti-Grp75 (mouse, Santa Cruz), anti-ANT (mouse, Calbiochem), anti-RyR2 (rabbit, Abcam) and anti-Serca2 (rabbit, Cell Signaling) at a concentration of 1/200. All antibodies were first confirmed by immunofluorescence (data not shown).

### **Isolation of adult murine cardiomyocytes and Ca<sup>2+</sup> measurements**

Briefly, WT and *Ppif*<sup>-/-</sup> mice were anesthetized with sodium pentobarbital (70mg/kg) (Sanofi Santé Animale, France) and the heart was quickly harvested and retrogradely perfused at 37°C for 6-8min with a perfusion buffer (in mM: 113 NaCl, 4.7 KCL, 0.6 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 12 NaHCO<sub>3</sub>, 10 KHCO<sub>3</sub>, 10 Hepes, 30 Taurine, pH 7.4) containing 10mM 2,3-Butanedione, 5.5mM Glucose, 12.5μM CaCl<sub>2</sub>, 0.1mg/mL of liberase (Roche) and 0.14mg/ml trypsin (Sigma). Isolated myocytes were then transferred on laminin (10μg/ml) precoated dishes with M199 medium (Invitrogen) and allowed to attach for 2h in humidified 5%CO<sub>2</sub>–95% air at 37°C and then washed once to remove unattached cells before being used.

Analysis of Ca<sup>2+</sup> transients was performed on different parameters: amplitude of Ca<sup>2+</sup> transients (change in fluorescence ΔF was divided by the fluorescence F<sub>0</sub> detected before the electrical stimulation pulses), rising phase of Ca<sup>2+</sup> transients (normalizing the peak amplitude over the time to peak) as an index of ryanodine receptor (RyR) function and the decay of electrically stimulated Ca<sup>2+</sup> transients as an index of sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) activity.

For patch-clamp measurements, pipettes (2-3MΩ) were filled with recording solutions, in mM: KCl 130, HEPES 25, ATP(Mg) 3, GTP(Na) 0.4, EGTA 0.5, pH adjusted to 7.2 with KOH. The cardiomyocytes were perfused with Tyrode's solution. Action potentials (APs) were elicited by 0.2ms current injections of supra-threshold intensity. Cells were stimulated routinely at 0.1Hz until APs stabilized. Data acquisition and analyses were performed using PClamp version 10.1 (Axon Instruments).

## Measurement of membrane potential in H9c2

H9c2 cells were loaded with 10nM TMRM (Molecular Probes) for 40min at 37°C, and then followed by 20min washout before recordings with a Zeiss LSM 780 bi-photon confocal microscope (Zeiss, Le Pecq France) equipped with a 63X lens (oil immersion, Numerical Aperture, NA=1.4). Analysis was performed on at least 5 different cells per field.

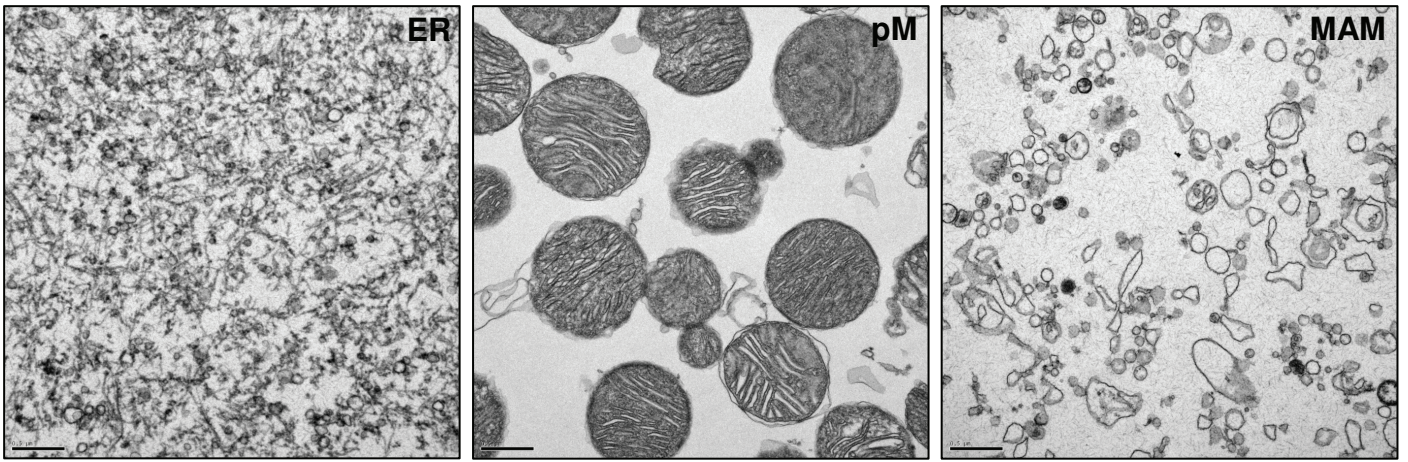
## SUPPLEMENTAL BIBLIOGRAPHY

1. MR Wieckowski, C Giorgi, M Lebiezinska, J Duszynski, P Pinton. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc.* 2009;4:1582-1590.
2. J Fauconnier, A Lacampagne, JM Rauzier, G Vassort, S Richard. Ca<sup>2+</sup>-dependent reduction of IK1 in rat ventricular cells: a novel paradigm for arrhythmia in heart failure? *Cardiovasc Res.* 2005;68:204-212.

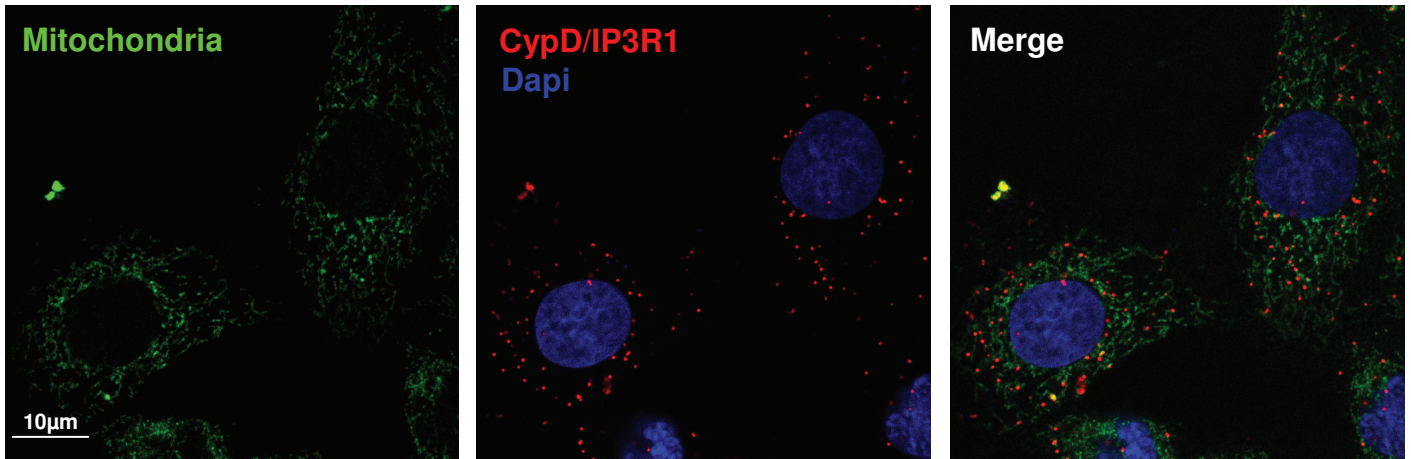
**Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury**

Melanie Paillard, Emily Tubbs, Pierre-Alain Thiebaut, Ludovic Gomez, Jeremy Fauconnier, Claire Crola Da Silva, Geoffrey Teixeira, Nathan Mewton, Elise Belaidi, Annie Durand, Maryline Abrial, Alain Lacampagne, Jennifer Rieusset, Michel Ovize

# Supplemental Figures

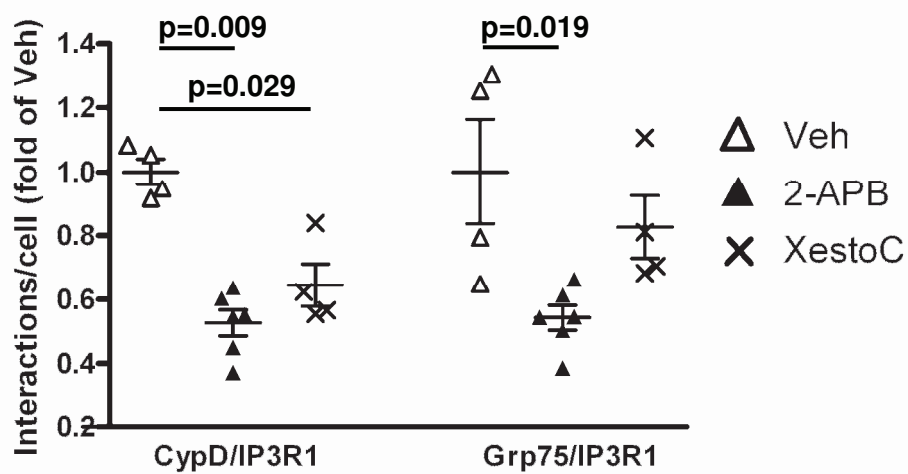


**Supplemental Figure 1: Electron microscopy of ER, pure mitochondria (pM) and MAM fraction.** Subcellular fractions were Percoll-purified from WT heart as described, fixed, processed and analyzed by TEM. Bars, 0.5  $\mu\text{m}$ .

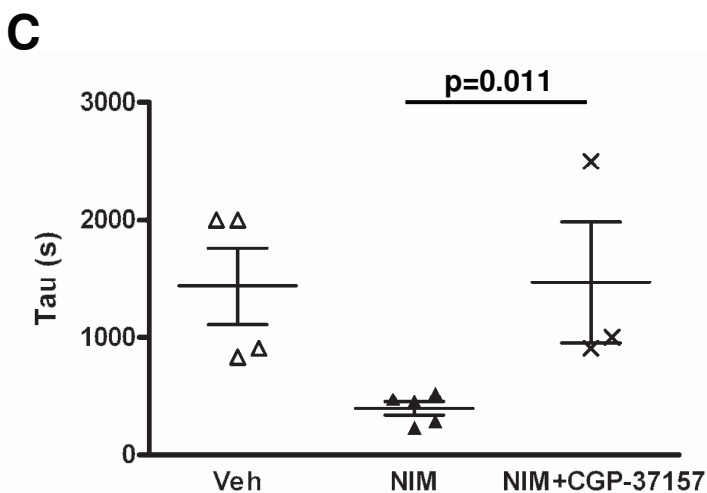
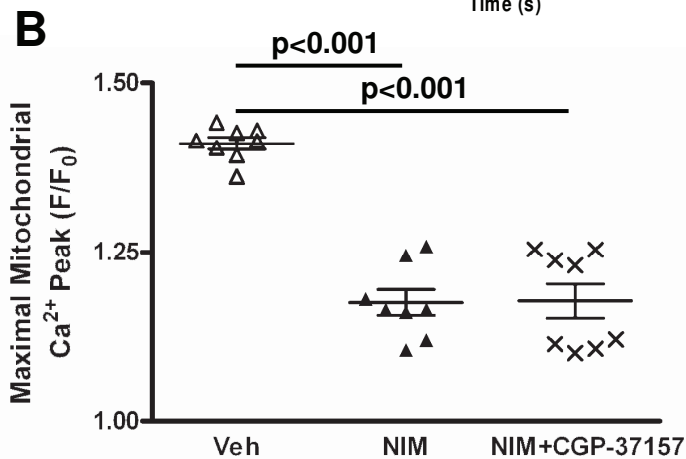
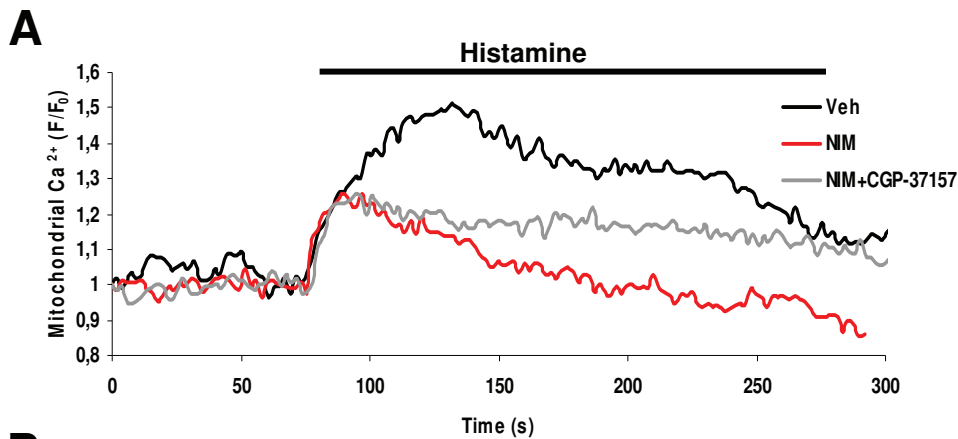


**Supplemental Figure 2: Simultaneous staining of mitochondrial network and CypD/IP3R1 interactions.**

CypD/IP3R1 interactions (red dots) are aligned along mitochondria (stained in green), as shown by the merge. This suggests that this interaction likely occurs at the ER-mitochondria interface in the heart.



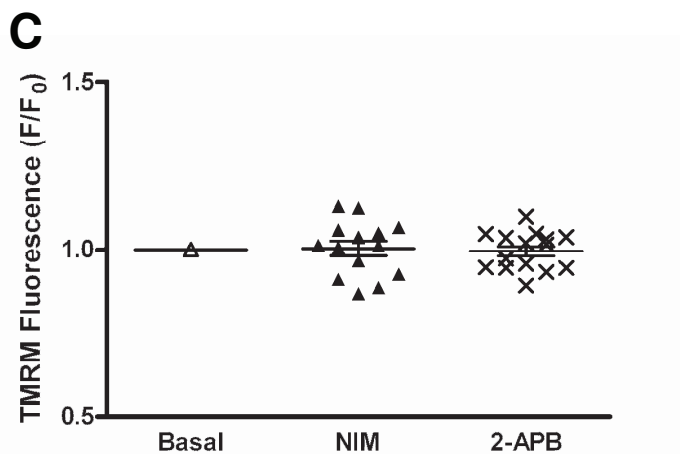
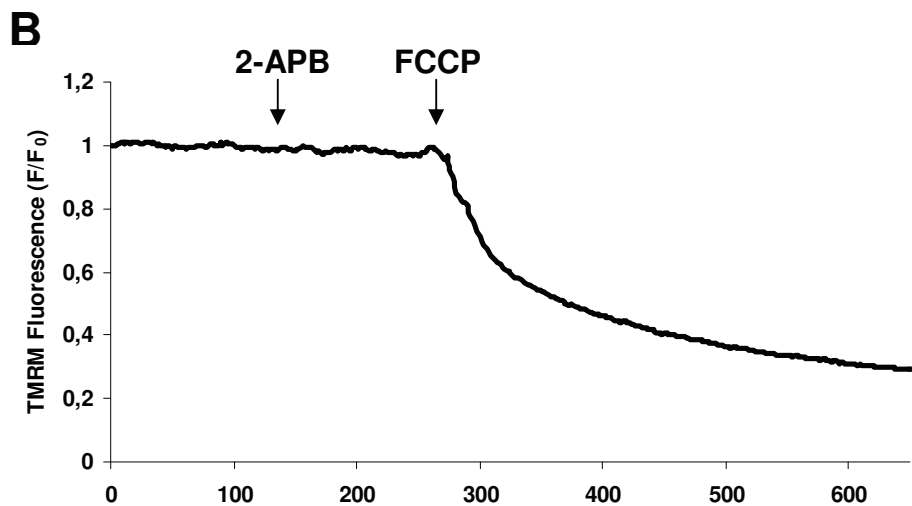
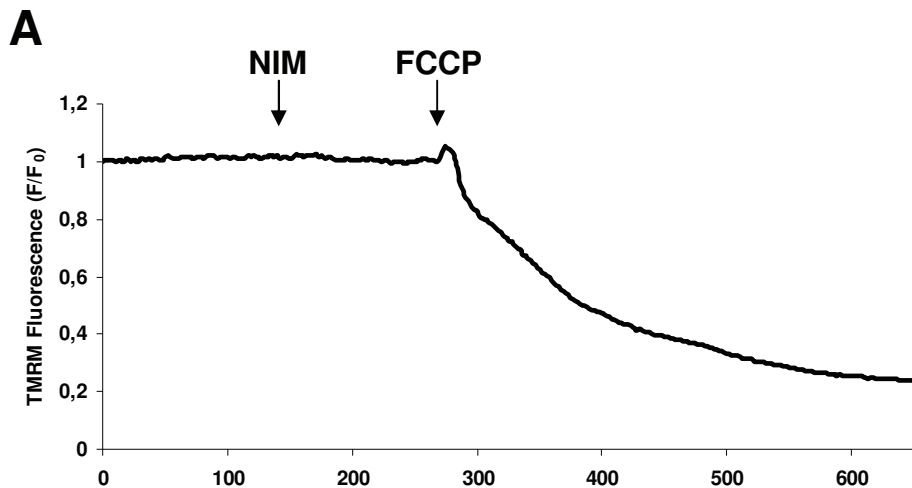
**Supplemental Figure 3: Inhibition of IP3R in H9c2 cells alters the interaction of CypD with the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex.** Effect of 2-APB treatment (50  $\mu$ M, 2h) and Xestospongine C (XestoC, 2 $\mu$ M, 2h) on interactions between CypD, Grp75 and IP3R1, using in situ PLA. n=4-5.



**Supplemental Figure 4: Inhibition of the mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger by CGP-37157 does not modify the decreased histamine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transfer to mitochondria in NIM-treated H9c2 cells.**

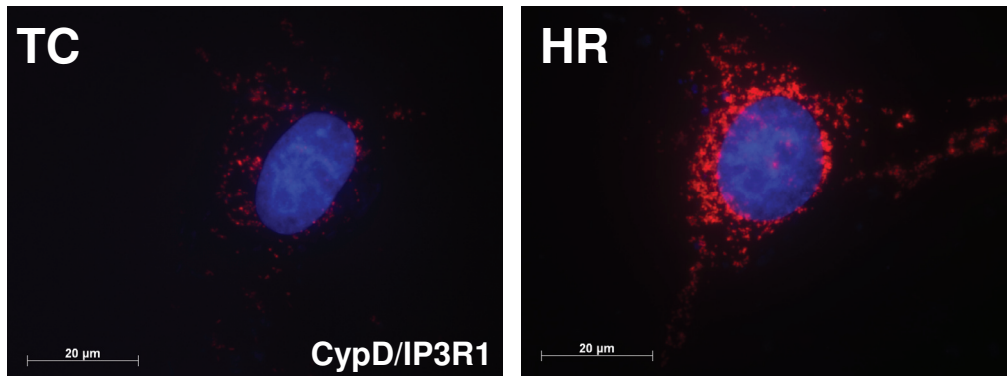
A) Representative curves of the time course of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  after histamine stimulation, in condition of inhibition by NIM811 ( $2\mu\text{M}$ ) with or without CGP-37157 ( $10\mu\text{M}$ ). Quantification of (B) the maximal mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  mean fluorescence ( $F/F_0$ ) and (C) the time constant of decay tau, after histamine stimulation.  $n=8$ .



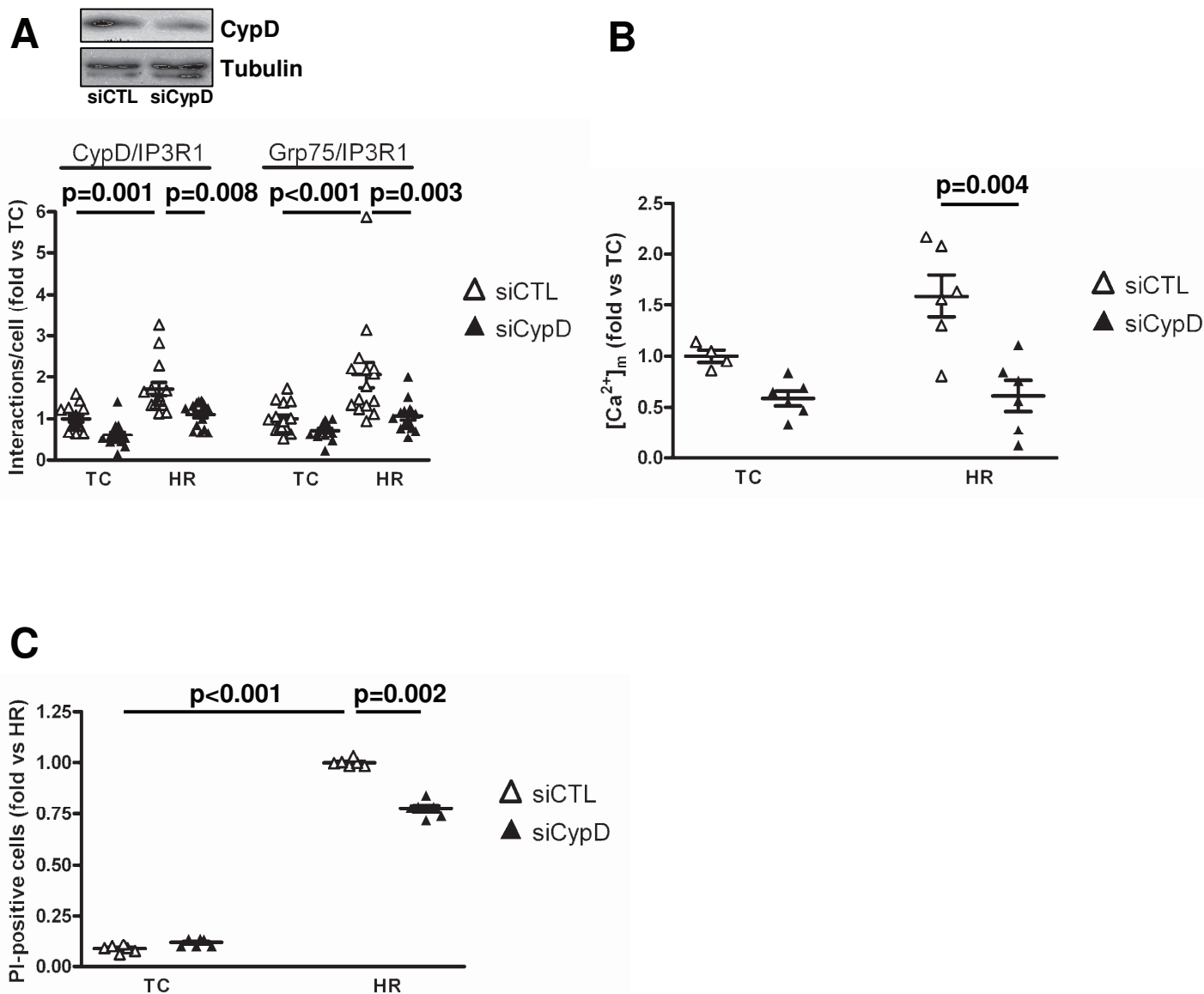


**Supplemental Figure 5: Inhibition of CypD by NIM811 or IP3R1 by 2-APB does not alter mitochondrial membrane potential.**

Representative curves of the time course of mitochondrial membrane potential assessed by TMRM fluorescence after inhibition by 2  $\mu$ M NIM811 (A) or 50  $\mu$ M 2-APB (B), followed by 1  $\mu$ M FCCP. C) Quantification of the TMRM mean fluorescence ( $F/F_0$ ) after NIM and 2-APB stimulation.  $n=3$  independent experiments with 4-5 cells/each.

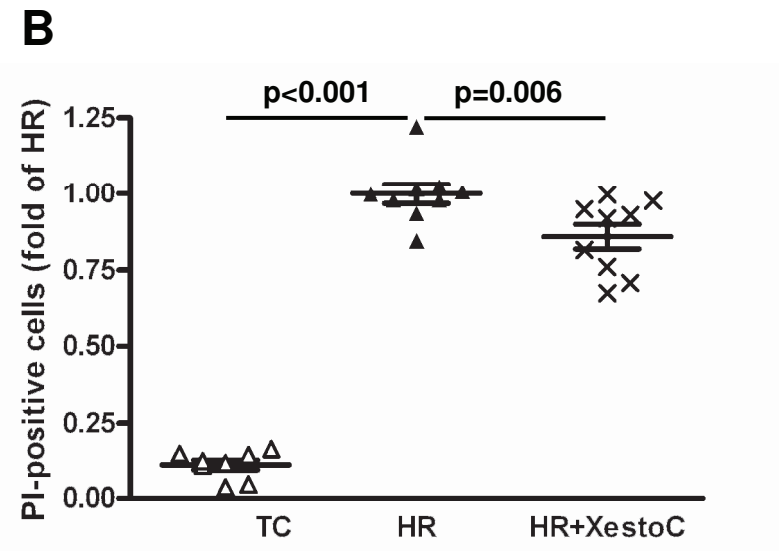
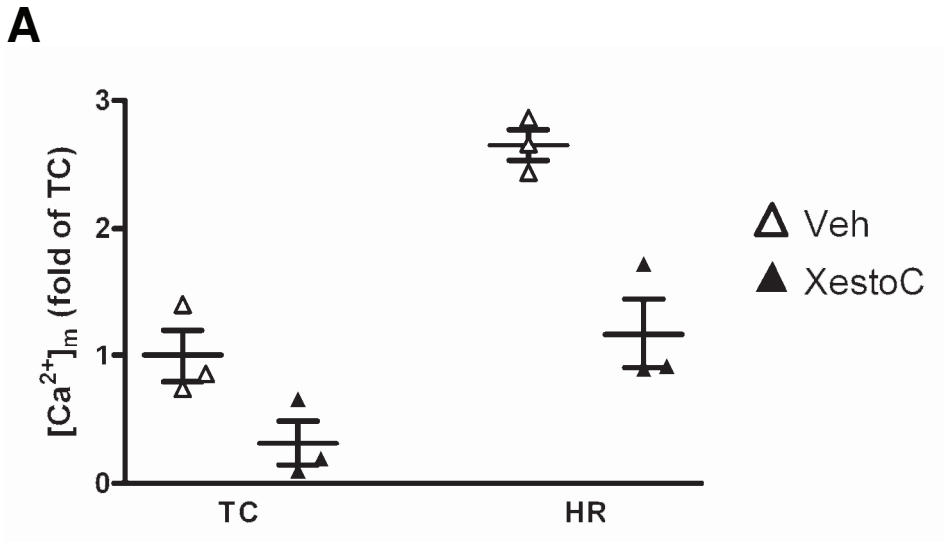


**Supplemental Figure 6: Increased ER-mitochondria interaction in the perinuclear region after HR.** Representative images of CypD/IP3R1 interactions after HR, by in situ PLA.

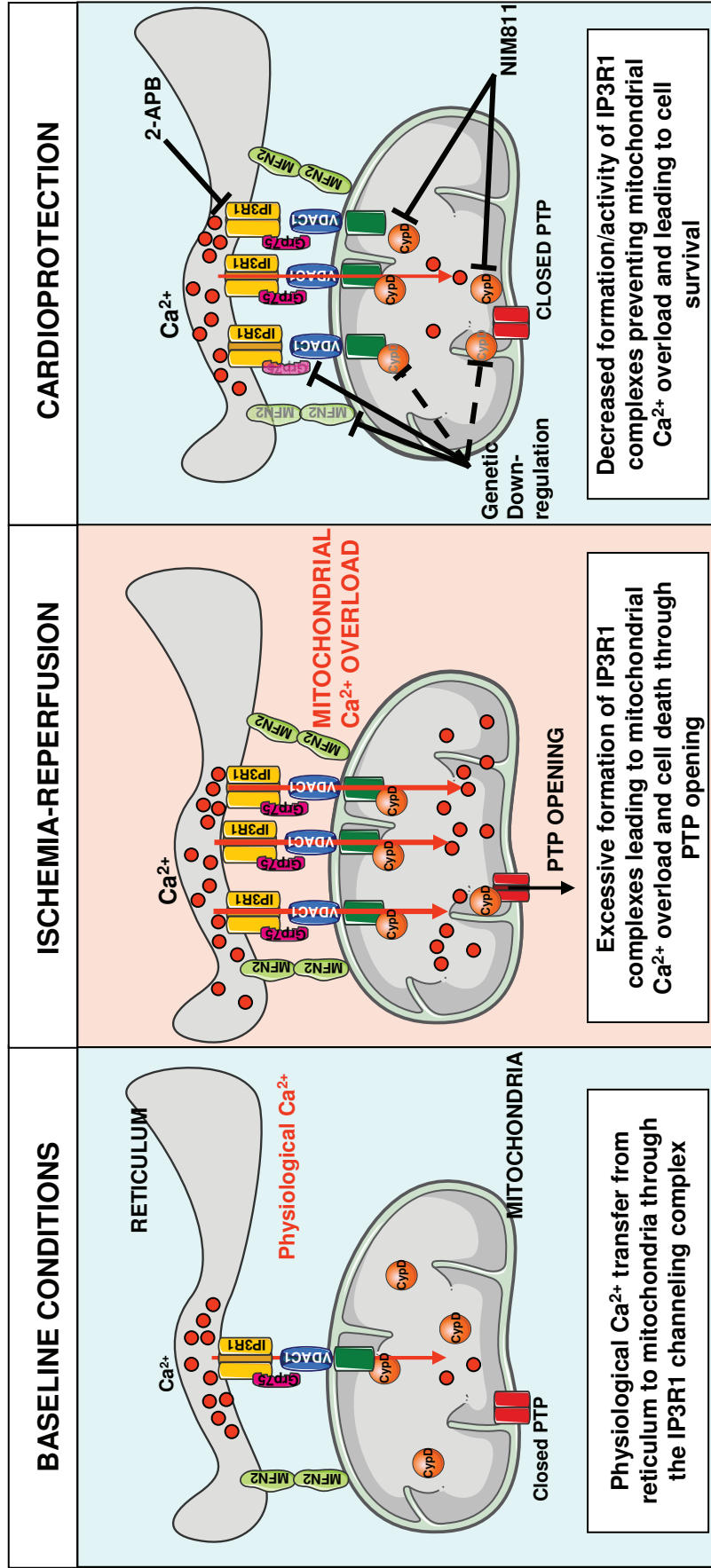


**Supplemental Figure 7: Downregulation of CypD prevents mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload and protects against hypoxia-reoxygenation injury**

Hypoxia (3h) followed by reoxygenation (2h) (HR) was performed on H9c2 cells. A) Interactions between CypD/IP3R1 and Grp75/IP3R1 were studied after HR by in situ PLA. At baseline (TC), depletion in CypD decreased interactions of IP3R1 with both CypD and Grp75. siCypD prevented the increased interactions after HR. Inset shows CypD protein level after 24h of transfection. B) Measurement of mitochondrial calcium by Rhod2 loading after 2h reoxygenation. siCypD prevented the increase after HR. C) Cell death was measured by FACS analysis of propidium iodide staining. The mortality is presented as a percentage of PI-positive cells. Cell death was reduced by downregulation of CypD (siCypD). n=6.



**Supplemental Figure 8: Effect of Xestospongins C on mitochondrial  $Ca^{2+}$  and cell death after HR.**  
 A) Measurement of mitochondrial calcium by Rhod2 loading after 2h reoxygenation. B) Assessment of cell death after 3h hypoxia followed by 2h reoxygenation. n=3.



**Supplementary Figure 9: Proposed theoretical model for the regulation by CypD of the IP3R1 Ca<sup>2+</sup> channeling complex during ischemia-reperfusion and cardioprotection.** Under baseline conditions, physiological Ca<sup>2+</sup> transfer from the reticulum to mitochondria occurs through the VDAC1/Grp75/IP3R1 complex which might be regulated by CypD. Ischemia-reperfusion stress leads to an increased formation of IP3R1 complexes, favoring mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload and possibly cell death through PTP opening. CypD is present at the IP3R1 complex and also recruited upon reperfusion at the PTP. Beyond the direct inhibition of PTP opening, cardioprotection could be induced by preventing mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload (and subsequent opening of the PTP) either through the inhibition of the partners of the IP3R1 Ca<sup>2+</sup> channeling complex (including CypD) or by decreasing reticulum-mitochondria tethering.

## C. Synthèse des résultats et discussion

Le rôle de la CypD a été largement décrit comme régulateur de l'ouverture du mPTP. Cette étude suggère ici un nouveau rôle pour la CypD dans la régulation des échanges calciques au niveau des points de contact entre la mitochondrie et le réticulum sarcoplasmique. En effet, ce travail montre que l'inhibition de la CypD diminue le transfert de  $\text{Ca}^{2+}$  entre le réticulum et la mitochondrie.

Dans cette étude nous avons montré que l'hypoxie-réoxygénation augmente l'interaction de la CypD avec IP3R1 ainsi qu'avec VDAC et GRP75 dans les cardiomyoblastes de rat H9c2 et dans les cardiomyocytes de souris adultes. Ces interactions conduisent à une surcharge calcique mitochondriale et *in fine* à la mort cellulaire via l'ouverture du mPTP.

Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de la CypD, d'IP3R1 ou de Grp75 protègent les cardiomyocytes face aux lésions d'H/R, en limitant la surcharge calcique mitochondriale.

Néanmoins cette étude montre que l'absence de CypD dans un modèle de souris KO, entraîne une dysfonction cardiaque et des arythmies dues à des échanges calciques anormaux. L'inhibition de la CypD a donc une incidence différente dans un contexte de stress aigu ou chronique.

La caractérisation des mécanismes mis en jeu dans ces échanges calciques entre mitochondrie et réticulum apparaissent donc comme de nouvelles cibles de cardioprotection.

## IV. Protection multi-organes par l'inhibition du mPTP face à l'arrêt cardio-circulatoire

### A. Introduction

L'arrêt cardio-circulatoire (ACC) demeure un problème majeur de santé publique tant par sa fréquence que par son pronostic péjoratif. La majorité des patients réanimés, initialement avec succès, décèdent des conséquences du syndrome post-ACC, caractérisé par l'association d'une dysfonction cardio-circulatoire et d'une défaillance multi-organes. Sur le plan physiopathologique, l'ACC réanimé représente donc un modèle d'ischémie-reperfusion globale des différents organes « nobles », responsable d'une souffrance tissulaire, consécutive à des mécanismes cellulaires d'hypoxie et de réoxygénation. En effet, de façon analogue à la physiopathologie de l'infarctus du myocarde, il est probable qu'une part des lésions cellulaires irréversibles de l'ACC soit consécutive, paradoxalement, à la restauration d'une activité circulatoire.

Dans une première étude sur l'ACC, réalisée au laboratoire, il a été montré que l'administration de CsA ou de son analogue non immunosuppresseur la NIM811, lors de la réanimation cardio-pulmonaire, prévient le syndrome post-ACC et la survie dans un modèle d'ACC chez le lapin<sup>477</sup>. En effet, cette étude a montré que la CsA et la NIM811 retardent l'ouverture du mPTP, tout en restaurant les capacités de phosphorylation oxydative. La transition de perméabilité mitochondriale semble donc avoir un rôle clé dans la défaillance cardiaque liée à l'ACC. Ces effets mitochondriaux observés étaient associés à une amélioration des paramètres hémodynamiques et à une diminution des lésions myocardiques, hépatiques, rénales et cérébrales.

Ainsi dans cette nouvelle étude, nous avons cherché à savoir si la transition de perméabilité mitochondriale était un phénomène ubiquitaire dans la défaillance multi-organes induite par le syndrome post-ACC et si cette défaillance pouvait être prévenue par un inhibiteur du mPTP la CsA et son analogue non immunosuppresseur la NIM811.

## **B. Publication n°5**

### **UBIQUITOUS PROTECTIVE EFFECTS OF CYCLOSPORINE A TO PREVENT CARDIAC ARREST-INDUCED MULTIPLE ORGAN FAILURE**

Martin Cour, **Maryline Abrial**, Vincent Jahandiez, Joseph Loufouat, Elise Belaïdi,

Abdallah Gharib, Annie Varennes, Guillaume Monneret, Christophe Nougier,

Michel Ovize, Laurent Argaud

**En préparation pour soumission dans Circulation**



# Ubiquitous protective effects of cyclosporine A to prevent cardiac arrest-induced multiple organ failure

Martin Cour<sup>1,2</sup>, MD; Maryline Abrial<sup>2</sup>, Bsc; Vincent Jahandiez<sup>1,2</sup>, MD;  
Joseph Loufouat<sup>2</sup>, PhD; Elise Belaïdi<sup>2</sup>, PhD; Abdallah Gharib<sup>2</sup>, PhD;  
Annie Varennes<sup>3</sup>, PhD; Guillaume Monneret<sup>4</sup> MD, PhD; Christophe Nougier<sup>5</sup> MD;  
Michel Ovize<sup>2</sup> MD, PhD; Laurent Argaud<sup>1,2</sup>, MD, PhD

- (1) Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Service de Réanimation Médicale, F-69437, Lyon, France; Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de médecine Lyon-Est, F-69373, Lyon, France
- (2) INSERM UMR 1060, CarMeN, F-69373, Lyon, France
- (3) Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Laboratoire de Biochimie, F-69003, Lyon, France
- (4) Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Laboratoire d'Immunologie Clinique, F-69003, Lyon, France
- (5) Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Laboratoire d'Hématologie et d'Hémostase, F-69003, Lyon, France

**First author's surname:** COUR

**Short title:** Post-cardiac arrest syndrome and mitochondria

**Total word count of the manuscript:** 5849

**Journal subject codes:** [25] CPR and emergency cardiac care

**Corresponding author:**

Prof. Laurent Argaud, MD, PhD

Service de Réanimation Médicale

Groupement Hospitalier Edouard Herriot

5, Place d'Arsonval

69437 Lyon Cedex 03, France

Phone: (+33)-4-72-11-00-15

Fax: (+33)-4-72-11-01-10

E-mail: laurent.argaud@chu-lyon.fr

## Abstract

**Background:** Resuscitated cardiac arrest (CA) leads to the post-CA syndrome that comprises brain injury, myocardial dysfunction as well as other organ failures (e.g. renal, hepatic or respiratory) and systemic response to ischemia-reperfusion. Opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP), a cyclosporine A (CsA)-sensitive inner membrane channel, plays a key role in post-CA myocardial dysfunction. We hypothesized that CsA may prevent CA-induced multiple organ failure through a ubiquitous mPTP inhibition at the level of each vital organ.

**Methods and results:** NZW rabbits were subjected to 15 min of CA and 120 min of reperfusion. At the onset of resuscitation, rabbits received CsA (5 mg/kg), its non-immunosuppressive derivative NIM811 (2.5 mg/kg) or vehicle (controls). Survival, hemodynamics, brain damage (pupillary reactivity, neuron specific enolase), organ injuries (troponin, creatinine, ALT, PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>) and systemic I/R response (TNF- $\alpha$ , nitrite/nitrate levels, LDH, lactate) were analyzed. After 2 hours of reperfusion, fresh mitochondria were isolated from brain, heart, kidney, liver and lung to assess both oxidative phosphorylation and permeability transition. CsA-analogs significantly improved short-term survival and prevented multiple organ failures including brain damages and myocardial dysfunction ( $p < 0.05$  vs controls). Susceptibility of mPTP opening was significantly increased in heart, brain, kidney and liver mitochondria isolated from controls while mitochondrial respiration was impaired ( $p < 0.05$  vs Sham). CsA-analogs prevented these mitochondrial dysfunctions ( $p < 0.05$  vs Controls).

**Conclusions:** These results provide evidences of a ubiquitous mitochondrial protective effect of CsA-derivatives to prevent the post-CA syndrome.

**Key words:** Cardiopulmonary resuscitation, ischemia, reperfusion, mitochondria, shock.

## Introduction

At least 500,000 Americans and almost as many Europeans suffer cardiac arrest (CA) each year while fewer than 10% of these patients survive.<sup>1</sup> Thus, CA remains a major medical challenge. Although current cardiopulmonary resuscitation performance can increase the rate of restoration of spontaneous circulation (ROSC), the prognosis is poor partly because a wide majority of immediate survivors die of post-CA syndrome.<sup>2</sup> Indeed, the whole-body ischemia-reperfusion (I/R) response that occurs during resuscitated CA induces complex pathophysiological processes leading to irreversible brain damage, myocardial dysfunction as well as other vital organ failures (e.g. kidney and liver) with decease in most cases.<sup>2,3</sup>

Even if there is no doubt that limiting duration of ischemia prevents irreversible cell injuries, it has also been proposed that reperfusion by itself may damage the previously ischemic tissues.<sup>4</sup> There is general agreement that mitochondria are important actors of these reperfusion injuries.<sup>5</sup> As a result, mitochondria are emerging as targets of choice for therapeutic interventions in CA.<sup>6-8</sup> Growing evidence suggests that mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening, a cyclosporine A (CsA)-sensitive channel located in the inner membrane, mediates cell death at the onset of reperfusion, including in CA.<sup>5,8-10</sup> Indeed, it seems that mPTP opening occurs in the first few minutes of reperfusion, when conditions that increase the probability of pore opening prevail: calcium overload, matrix corrected pH, ATP depletion and burst of reactive oxygen species.<sup>5,11</sup> Accumulating data from our group and others, support pharmacological mPTP inhibition by CsA (independently of immunosuppressive properties), as a potent strategy to prevent cellular injuries after I/R, particularly in heart and brain.<sup>4,8,12-15</sup>

Using a rabbit model of CA, we have previously identified the corner role of mPTP to prevent CA-induced myocardial dysfunction.<sup>8</sup> The beneficial effects of CsA on cardiovascular failure have also been recently reported in a rodent model.<sup>16</sup> However, it remained unclear whether permeability transition might be involved, in the same manner, in the pathogenesis of other organ failures (brain, kidney, liver and lung). We hypothesized that the post-CA syndrome was related to ubiquitous mitochondrial damages that might be all prevented by pharmacological mPTP inhibition at the level of each organ.

## **Materials and methods**

Adult male New Zealand White rabbits were used according to institutional guidelines that complied with national and international regulations. The Lyon I Claude Bernard University Committee for Animal Research approved all animal experiments.

### **Animal preparation**

We used our established rabbit model of CA and resuscitation.<sup>8</sup> Briefly, rabbits (2.5-3.5 kg) were anesthetized by xylazine and ketamine. A tracheotomy was performed and animals underwent mechanical ventilation with 30% oxygen. A micromanometer-tipped catheter (SPR 330, Millar Instruments, Houston, TX, USA) was inserted into the left ventricle (LV) through the right internal carotid. End-diastolic LV pressure (EDLVP) and its peak positive derivative ( $dp/dt$  max) were continuously monitored on a multi-channel recorder (Model 4000, Gould Inc). The Millar probe was removed from LV during CPR. A left thoracotomy was performed to expose the heart. Invasive arterial pressure, heart rate (HR), end-tidal carbon dioxide concentration ( $EtCO_2$ ), and esophageal temperature were also measured continuously. A 15-min stabilization period was then observed before experiments.

### **Cardiac arrest and resuscitation**

As previously described, rabbits were paralyzed with pancuronium bromide.<sup>8</sup> Primary asphyxial CA was therefore induced by the withdrawal of mechanical ventilation. After 15 min of untreated CA, resuscitation was started with resumption of mechanical ventilation with 100% oxygen, open chest cardiac massage ( $\approx$  200 bpm)

and intravenous (iv) administration of epinephrine (20 µg/kg) every 3-5 min in the absence of ROSC or when mean arterial pressure (MAP) was less than 15 mmHg. ROSC was defined as the return of an organized cardiac rhythm for at least 2 min, with MAP > 15 mmHg. In the absence of ROSC after 30 min, the resuscitative efforts were stopped.

### **Experimental protocol**

After the stabilization period, animals were randomly assigned to one of the four following groups: (1) control group (Ctrl): CA with 120 min of reperfusion following resuscitation; (2) CsA group: iv bolus of CsA (5 mg/kg) at the onset of the resuscitation; (3) NIM811 group: iv bolus of N-methyl-4-isoleucine-cyclosporine (NIM811, 2.5 mg/kg), a non-immunosuppressive CsA derivative that specifically inhibits mPTP opening<sup>12,17,18</sup>; (4) sham-operated group.

Each of the five organ systems (cardiovascular, neurological, renal, hepatic and respiratory) was extensively studied. To this end, heart, brain, kidney, liver and lung were harvested. For experimental reasons, a maximum of three organs was removed in a same animal.

### **Markers of multiple organ injuries and/or failures**

Blood levels of Neuron Specific Enolase (NSE), a marker of neuronal damage and blood brain barrier integrity was determined at the end of the protocol by using ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Glory Science Co, Del Rio, TX, USA).<sup>19</sup> Pupillary reactivity to light, a rough functional estimate of cerebral damage after CA, was defined as present when pupils constricted more than 1 mm.<sup>19,20</sup>

Troponin I<sub>c</sub>, creatinine, alanine aminotransferase (ALT) concentrations and arterial blood gases were measured at an off-site reference laboratory after 120 min of

reperfusion to assess heart, kidney, liver, and lung damages, respectively. Lung dysfunction was also assessed by measurement of edema. To this end, lungs were weighed and dried to constant temperature at 80°C over 48 hours in an oven and the wet/dry ratio was calculated.<sup>21</sup> The ratio of the partial pressure of oxygen in arterial blood (PaO<sub>2</sub>) to the inspired oxygen fraction (FiO<sub>2</sub>), a widely used index of oxygen exchange, was calculated and expressed in mmHg.

### **Systemic response to ischemia-reperfusion**

At 120 min of reperfusion, plasma levels of nitrite/nitrate, an indicator of nitric oxide synthesis, were determined by enzymatically reducing nitrate and by the colorimetric Griess reaction, as previously described.<sup>21</sup> Plasma levels of Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ), a pro-inflammatory cytokine, were determined by using ELISA kit according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Inc). Lactate dehydrogenase (LDH) and arterial lactate were also determined at an off-site laboratory.

### **Mitochondrial assays**

Mitochondria from the LV anterior wall of the heart, the left side of the cerebral cortex, the whole kidney, the liver and the lungs were isolated by differential centrifugation.<sup>8,12,14,22</sup> Cold isolation buffer contained either 70 mM sucrose, 210 mM mannitol, 1 mM EGTA in Tris/HCL, pH 7.4 for heart, brain and lung, or 250 mM sucrose, 10 mM Tris, 0.5 mM EGTA, pH 7.4 for kidney and liver. Isolated mitochondria were re-suspended in same buffers devoid of calcium chelating agents and kept over ice prior to experiments.

As previously described, calcium retention capacity (CRC) was determined using spectrofluorimetry.<sup>8,14</sup> Briefly, CaCl<sub>2</sub> pulses were added every minute to a medium

containing mitochondria until the opening of the mPTP. CRC was used as an indicator of the susceptibility of mPTP opening in presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and was expressed as nmol  $\text{CaCl}_2$  per milligram of proteins. Oxygen consumption was also determined as previously described.<sup>8,14,23</sup> State 3 (ADP-stimulated), State 4 (ADP-limited), and respiratory control index (RCI: State 3/State 4) were determined by oxygraphy (Oroboros Oxygraph, Paar, Austria). Electron donors to complex I (glutamate 5 mM and malate 5 mM) were used for both CRC and mitochondrial respiration assays.

### ***Statistical analysis***

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM or number and percentage, as appropriate. Results were analyzed with the Graphpad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Comparisons of variables were performed using two-sided Fisher's exact test or one-way ANOVA, as appropriate. Comparisons between time-based measurements within each group were performed with two-way ANOVA with repeated measures on one factor. Statistical significance was defined as a value of  $p < 0.05$ .



## Results

Seventy rabbits were used in this study. One animal was excluded before randomization because of a lung perforation. Results from the remaining 69 rabbits are presented (Sham: n=12; Ctrl: n=24; CsA: n=18; NIM811: n=15).

### Cardiac arrest, resuscitation and outcomes

As presented in Table 1, duration of asphyxia before CA, ranging from 5 to 7 min, did not differ among groups. With CsA and NIM811, there was a tendency toward shorter cardiac massage, smaller amounts of epinephrine to restore circulation and higher rates of ROSC ( $p=ns$ ) (Table 1). Survival was significantly better in animals treated with mPTP inhibitors when compared with controls: 30/33 (91%) versus 16/24 (67%) ( $p<0.05$ ).

### Myocardial dysfunction

As reported in Table 2, hemodynamics were not different among groups at baseline. MAP, EDLVP, as well as  $dP/dt_{max}$  were severely impaired at 5 and 30 min of reperfusion in all groups ( $p<0.05$  vs baseline). At the end of the protocol, hemodynamics including  $EtCO_2$  (used here as a surrogate marker of cardiac output) were significantly improved by CsA-analogs ( $p<0.05$  vs Ctrl).

### Neurological damage

Among the 24 control rabbits included in the study, only 7 (29%) were alive with a pupillary reflex at the end of the protocol (Figure 1A). This group also exhibited a significantly increase in NSE averaging  $5.6\pm 0.4$  ng/ml versus Sham animals

( $2.7\pm 0.3$  ng/ml) (Figure 1B). Both CsA and NIM811 significantly prevented pupillary areflexia after CA and reduced NSE release ( $p<0.05$  vs Ctrl).

### **Organ injuries and/or failures**

As shown in Figure 2, the Ctrl group displayed a significant increase in troponin, ALT and creatinine at the end of the protocol when compared with Sham ( $p<0.05$ ). As expected, CsA and NIM811 prevented the increase in these markers of cellular injuries ( $p<0.05$  vs Ctrl). In contrast,  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  was comparable among groups (Figure 2). In the same way, the wet/dry ratio of lung tissue did not significantly differ among groups (data not shown).

### **Systemic response to ischemia-reperfusion**

At baseline, arterial blood gases were comparable among groups (data not shown). Thirty minutes after ROSC, blood gases showed comparable severe acidosis in all groups (mean  $\text{pH}<7.10$  in all groups) ( $p=\text{ns}$ ). At the end of the protocol, arterial blood pH remained very low in controls ( $7.10\pm 0.03$ ) whereas it was significantly improved in CsA ( $7.25\pm 0.04$ ) and NIM811 ( $7.27\pm 0.03$ ) groups ( $p<0.05$  vs Ctrl). In the same way, CsA-analogs prevented LDH release, as well as the increase in both lactate and  $\text{TNF-}\alpha$  (Figure 3). By contrast, increase in plasma levels of nitrite/nitrate were not mitigated by CsA and NIM811 (Figure 3D).

### **Mitochondrial functions**

As shown in Table 3, ADP-stimulated respiration (State 3) was significantly impaired after CA in mitochondria isolated from all organs except lung ( $p<0.05$  vs Sham). Moreover, heart and brain mitochondria prepared from controls also showed a significant decrease in RCI ( $p<0.05$  vs Sham). In these organs, both CsA and

NIM811 restored oxidative phosphorylation ( $p=ns$  vs Sham) when compared with untreated animals (Table 3).

In mitochondria isolated from organs showing ischemia-reperfusion lesions, i.e. brain, heart, kidney and liver (Figure 1 and Figure 2), the amount of  $Ca^{2+}$  required to open the mPTP (i.e. the CRC) was significantly decreased after resuscitated CA (Figure 4). As expected, CRC was significantly enhanced by *in vitro* addition of CsA (1  $\mu$ M) in all groups and organs ( $p<0.01$ ; data not shown). *In vivo* treatment with CsA-analogs also restored the CRC in the injured tissues whereas it had no effect on the lung (Figure 4).

## Discussion

In the present study, we demonstrated for the first time that pharmacological mPTP inhibition with CsA-analogs, at the time of reperfusion, limited mitochondrial dysfunctions at the level of each vital organ and therefore prevented the post-CA syndrome. Thus, our results emphasize the ubiquitous role of mPTP opening in the pathogenesis of CA-induced multiple organ failure.

The post-CA syndrome is the main cause of death after resuscitated CA.<sup>2</sup> This post-resuscitation disease includes brain injury, myocardial dysfunction and systemic I/R response.<sup>2,3</sup> The pathophysiology is incompletely understood but involves multiorgan failure, pro-inflammatory response and oxidative stress, that is a pattern quite similar to that observed in septic shock.<sup>2,24</sup> Both experimental and clinical evidence lend support to the notion that changes in mitochondrial functions are central to the process leading to multiorgan failure.<sup>21,25,26</sup> It has been previously shown that resuscitated CA induces severe mitochondria damages including permeability transition, oxidative phosphorylation impairments and releasing of proapoptotic agents such as cytochrome *c*.<sup>6,8,16,27-29</sup> In our validated CA model, the whole-body I/R insult consistently lead to multiple organ failure with high short-term mortality. We previously showed that mPTP inhibition with CsA, used at the time of reflow, prevents myocardial mitochondrial dysfunction, as well as cardiovascular failure.<sup>8</sup> In the present work, by studying mitochondria isolated from brain, kidney, liver and lung, we extended this demonstration to all injured organs. As previously observed in experimental septic shock, our results suggest that the protective effect of CsA was not related to a decrease in nitric oxide synthesis.<sup>21</sup> By contrast, mPTP

inhibitors limited increase in the pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$ . However, the fact that NIM811 (i.e. a non-immunosuppressive CsA derivative) was able to offer similar protection than CsA strongly suggests that mPTP opening is a major event involved in the post-CA syndrome.<sup>12,18,23</sup>

We showed in the present work that pharmacological mPTP inhibition might limit hemodynamic failure and troponin release after resuscitated CA in rabbits, confirming the findings of our previous study.<sup>8</sup> These data are also in accordance with two recent works demonstrating that CsA improves hemodynamics after transient global ischemia in both newborn piglet and rat models.<sup>16,30</sup> Huang *et al.* have recently shown that delaying administration of CsA few minutes after cardiopulmonary resuscitation failed to improve both mitochondrial functions and hemodynamics, suggesting that there is a relatively narrow therapeutic window during which myocardial injuries may be preventable after CA.<sup>16</sup> In these CA models, without coronary occlusion, the severity of early cardiovascular failure contrasts with the relatively limited irreversible myocardial I/R injuries. One may speculate that preservation of bioenergetic homeostasis with CsA analogs could also play an important role in preventing cardiovascular failure. Interestingly, we observed that not only mitochondrial inner membrane integrity but also oxidative phosphorylation were significantly more preserved under treatment. These results correspond to the findings previously reported in the rat model.<sup>16</sup> Another explanation might be that CsA and its non-immunosuppressive derivative significantly decrease TNF- $\alpha$  release after CA in our model. Indeed, TNF- $\alpha$  is a known myocardial depressant, presumably by disrupting calcium homeostasis and the normal myocardial contraction-relaxation cycle.<sup>31</sup> In this way, Niemann *et al.* have recently reported that direct pharmacological TNF- $\alpha$  blockade improves hemodynamics and survival after CA.<sup>31</sup> One last

explanation could be that mPTP inhibition, by preventing other organ dysfunctions (e.g. kidney and liver), might also limit severe metabolic disorders and therefore improve hemodynamics.

Limiting brain damage remains nowadays a challenge to improve outcomes after CA.<sup>1-3,19,20</sup> Mitochondria play also a key role in neuronal death processes after I/R, notably through the opening of the mPTP.<sup>9,14,15</sup> Our data suggest that CsA-analogs, when administered at the time of resuscitation, protect against neurological dysfunction after CA. Indeed, mPTP inhibitors significantly prevent pupillary areflexia, a major clinical sign since it consistently predicts unfavorable neurological outcome.<sup>19,20</sup> Pharmacological mPTP inhibition was also associated with a lesser NSE elevation, a rough marker of neuronal lysis that is routinely used in clinical practice to predict neurological outcome after CA.<sup>19,20</sup> In the present study, brain oxidative phosphorylation was also significantly impaired after CA. Our results are in agreement with a recent report from Gong *et al.* showing quite similar abnormalities of oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from pig brain 24 hours after CA.<sup>32</sup> In our work, both CsA and NIM811 prevented decrease in ADP-stimulated respiration and RCI (i.e. a measure of mitochondrial coupling between oxygen consumption). As decrease in RCI generally indicates a misuse of oxygen, that is known to produce oxidative stress, it might have favored mPTP opening and subsequent cell damages.<sup>32,33</sup> In agreement with non-CA studies, we also found that mPTP opening susceptibility was increased in brain after whole-body I/R.<sup>10,14,15</sup> This pattern was herein prevented by CsA-analogs administered at reflow. Previously, it has been shown that pharmacological mPTP inhibition could decrease brain infarct size in ischemic stroke models, provided that the drugs penetrate into the brain.<sup>10,14,15</sup> Indeed, a major limiting factor in producing the therapeutic effect of

CsA is its ability to cross the brain blood barrier (BBB).<sup>15</sup> It is well established that CA can lead to the disruption of the BBB.<sup>34</sup> In our study, the fact that mPTP opening was inhibited in brain mitochondria after *in vivo* administration of CsA, strongly suggest that it was the case. Moreover, we used a single bolus of CsA leading to high blood concentration, within the first minutes of reflow, which may have overpassed drug efflux mechanisms at the level of BBB.

Poor prognosis of CA is also driven by the occurrence of other organ failures.<sup>2,3,20</sup> Functional impairments of peripheral vital organs such as kidney, liver or lung are awaited after CA, including in humans.<sup>2,3,8,20,24,35,36</sup> For examples, about 40% of patients resuscitated from out-of-hospital CA develop renal dysfunction while liver function test abnormalities have been observed in up to 25% of CA victims.<sup>35,36</sup> Although very frequent in clinical practice, only few experimental data indicate that CA causes acute lung injury.<sup>36,37</sup> In the present work, we demonstrated for the first time the potent nephro- and hepato-protective effect of pharmacological mPTP inhibition after CA. These findings are in accordance with studies reporting that low dose of CsA-analogs attenuated both renal and hepatic injuries after transient focal ischemia.<sup>38,39</sup> By contrast, there was no evidence for significant CA-induced respiratory failure in our model and CsA had any effect on both gas exchange or lung edema. Several hypothesizes can be put forward to explain this absence of acute lung injury. First, we used an open-chest CA model, which avoided physical lung injury during heart massage. Second, rabbits were ventilated with positive pressure ventilation, a condition known to limit hydrostatic pulmonary edema. Third, our animals were tracheotomised which prevented the risk of aspiration pneumonia (which is probably the main cause of ALI in Humans). Interestingly, contrary to mitochondria from damaged organs (i.e. heart, brain, kidney and liver), those from

lungs did not exhibit alteration in susceptibility to mPTP opening, including after *in vivo* CsA administration. This suggests that mitochondrial response to CA differs among organs and that beneficial effects of CsA are limited solely to the organs injured by CA. In any case, our study opens up the possibility to translate basic research findings into effective intervention able to prevent CA-induced multiorgan failure in Humans.



## **Conclusion**

In summary, this study strongly suggests that CsA may prevent the post-CA syndrome through a ubiquitous mPTP inhibition at the level of each vital organ. Regarding the role of mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of whole-body I/R, our results indicate pharmacological mPTP inhibition as a new therapeutic approach of CA-induced multiple organ failure. Clinical trials are now awaited to determine whether these experimental results could be translated into humans.

## **Acknowledgements**

None.

## **Funding sources**

This study was supported by a research grant “*Recherche Clinique Translationnelle 2011*” from the *Direction Générale de l’Offre de Soins (DGOS)* of the *Ministère du Travail, de l’Emploi et de la Santé* and the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)* and by a research grant from the *Fonds de Dotation - Association Lyonnaise de Logistique Post-Hospitalière (ALLP)*.

## **Disclosures**

None.

## References

1. Berdowski J, Berg RA, Tijssen JG, Koster RW. Global incidence of out-of-hospital cardiac arrest and survival rates: Systematic review of 67 prospective studies. *Resuscitation*. 2010;81:1479-1481.
2. Neumar RW, Nolan JP, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Böttiger BW, Callaway C, Clark RS, Geocadin RG, Jauch EC, Kern KB, Laurent I, Longstreth WT Jr, Merchant RM, Morley P, Morrison LJ, Nadkarni V, Peberdy MA, Rivers EP, Rodriguez-Nunez A, Selke FW, Spaulding C, Sunke K, Vanden Hoek T. Post-Cardiac arrest syndrome. Epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. *Circulation*. 2008;118:2452-2483.
3. Roberts BW, Kilgannon JH, Chansky ME, Mittal N, Wooden J, Parillo JE, Trzeciak S. Multiple organ dysfunction after return of spontaneous circulation in postcardiac arrest syndrome. *Crit Care Med*. 2013;41:1492-1501.
4. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357:1121-1135.
5. Honda HM, Korge P, Weiss JN. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1047:248-258.
6. Ayoub IM, Radhakrishnan J, Gazmuri RJ. Targeting mitochondria for resuscitation from cardiac arrest. *Crit Care Med*. 2008;36:S440-S446.
7. Dezfulian C, Shiva S, Alekseyenko A, Pendyal A, Beiser DG, Munasinghe JP, Anderson SA, Chesley CF, Vanden Hoek TL, Gladwin MT. Nitrite therapy after cardiac arrest reduces reactive oxygen species generation, improves cardiac and neurological function, and enhances survival via reversible inhibition of mitochondrial Complex I. *Circulation*. 2009;120:897-905.
8. Cour M, Loufouat J, Paillard M, Augeul L, Goudable J, Ovize M, Argaud L. Inhibition of mitochondrial permeability transition to prevent the post-cardiac arrest syndrome. *Eur Heart J*. 2011;32:226-235.

9. Cour M, Gomez L, Mewton N, Ovize M, Argaud L. Postconditioning: from the bench to the bedside. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011;16:117-130.
10. Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dison E, Di Lisa F, Forte MA. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J.* 2006;273:2077-2099.
11. Halestrap AP, Pasdois P. The role of mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1787:1402-1415.
12. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raïsky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation.* 2005;111:194-197.
13. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, André-Fouët X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2008;359:473-481.
14. Leger PL, De Paulis D, Li B, Augeul L, Couture-Lepetit E, Gomez L, Angoulvant D, Ovize M, Gharib A, Charriaut-Marlangue C. Evaluation of cyclosporine A in a stroke model in the immature brain. *Exp Neurol.* 2011;230:58-66.
15. Sun J, Luan Q, Dong H, Song W, Xie K, Hou L, Xiong L. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening contributes to the neuroprotective effects of ischemic postconditioning in rats. *Brain Res.* 2012;1436:101-110.
16. Huang CH, Tsai MS, Hsu CY, Su YJ, Wang TD, Chang WT, Chen WJ. Post-cardiac arrest myocardial dysfunction is improved with cyclosporine treatment at onset of resuscitation but not in the reperfusion phase. *Resuscitation.* 2011;82:S41-S47.
17. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:367-374.

18. Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, Lemasters JJ. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM 811. *Mol Pharmacol*. 2002;62:22-29.
19. Zandbergen EG, Hijdra A, Koelman JH, Hart AA, Vos PE, Verbeek MM, de Haan RJ. Prediction of poor outcome within the first 3 days of postanoxic coma. *Neurology*. 2006;66:62-68.
20. Morrison LJ, Deakin CD, Morley PT, Callaway CW, Kerber RE, Kronick SL, Lavonas EJ, Link MS, Neumar RW, Otto CW, Parr M, Shuster M, Sunde K, Peberdy MA, Tang W, Hoek TL, Böttiger BW, Drajer S, Lim SH, Nolan JP; Advanced Life Support Chapter Collaborators. Part 8: Advanced life support: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation*. 2010;122:S345-S421.
21. Larche J, Lancel S, Hassoun SM, Favory R, Decoster B, Marchetti P, Chopin C, Neviere R. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents sepsis-induced myocardial dysfunction and mortality. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:377-485.
22. Mirandola SR, Melo DR, Saito A, Castilho RF. 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *J Neurosci Res*. 2010;88:630-639.
23. Argaud L, Gateau-Roesch O, Augeul L, Couture-Lepetit E, Loufouat J, Gomez L, Robert D, Ovize M. Increased mitochondrial calcium coexists with decreased reperfusion injury in postconditioned (but not preconditioned) hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H386-H391.
24. Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I, Monchi M, Vinsonneau C, Fitting C, Fraise F, Dinh-Xuan AT, Carli P, Spaulding C, Dhainaut JF, Cavillon JM. Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis like" syndrome. *Circulation*. 2002;106:562-568.

25. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*. 2002;360:219-233.
26. Dare AJ, Phillips AR, Hickey AJ, Mittal A, Loveday B, Thompson N, Windsor JA. A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2009;47:1517-1525.
27. Edoute Y, van der Merwe E, Sanan D, Kotze JC, Steinmann C, Lochner A. Normothermic ischemic cardiac arrest of the isolated working rat heart. Effects of time and reperfusion on myocardial ultrastructure, mitochondrial oxidative function, and mechanical recovery. *Circ Res*. 1983;53:663-678.
28. Tsai MS, Huang CH, Tsai SH, Tsai CY, Chen HW, Cheng HJ, Hsu CY, Wang TD, Chang WT, Chen WJ. The difference in myocardial injuries and mitochondrial damages between asphyxial and ventricular fibrillation cardiac arrests. *Am J Emerg Med*. 2012;30:1540-1548.
29. Radhakrishnan J, Wang S, Ayoub IM, Kolarova JD, Levine RF, Gazmuri RJ. Circulating levels of cytochrome c after resuscitation from cardiac arrest: a marker of mitochondrial injury and predictor of survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:767-775.
30. Gill RS, Manouchehri N, Liu JQ, Lee TF, Cho WJ, Thiesen A, Chruchill T, Bigam D, Cheung PY. Cyclosporine treatment improves cardiac function and systemic hemodynamic during resuscitation in a newborn piglet model of asphyxia: a dose response study. *Crit Care Med*. 2012;40:1237-1244.
31. Niemann JT, Yougquist ST, Shah AP, Thomas JL, Rosborough JP. TNF- $\alpha$  blockade improves early post-resuscitation survival and hemodynamics in a swine model of ischemic ventricular fibrillation. *Resuscitation*. 2013;84:103-107.
32. Gong P, Hua R, Zhang Yu, Zhao H, Tang Z, Mei X, Zhang M, Cui J, Li C. Hypothermia-induced neuroprotection is associated with reduced mitochondrial membrane permeability in a swine model of cardiac arrest. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33:928-934.

33. Piantadosi CA, Zhang J. Mitochondrial generation of reactive species after brain ischemia in the rat. *Stroke*. 1996;27:327-331.
34. Miclescu A, Sharma HS, Martijn C, Vinklund L. Methylene blue protects the cortical blood-brain barrier against ischemia-reperfusion-induced disruptions. *Crit Care Med*. 2010;38:2199-2206.
35. Yanta J, Guyette FX, Doshi AA, Callaway CW, Rittenberger JC; The Post Cardiac Arrest Service. Renal dysfunction is common following resuscitation from out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation* 2013 (*in press*).
36. Bjork RJ, Snyder BD, Campion BC, Loewenson RB. Medical complications of cardiopulmonary arrest. *Arch Inter Med*. 1982;142:500-503.
37. Zhang MY, Ji XF, Wang S, Li CS. Shen-fu administration attenuates post-resuscitation lung injury in a porcine model of cardiac arrest. *Resuscitation*. 2012;83:1152-1158.
38. Yang CW, Ahn HJ, Han HJ, Kim WY, Li C, Shin MJ, Kim SK, Park JH, Kim YS, Moon IS, Bang BK. Pharmacological preconditioning with low dose cyclosporine or FK-506 reduces subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation*. 2001;72:1753-1759.
39. Lin HC, Lee TK, Tsai CC, Lai IR, Lu KS. Ischemic postconditioning protects liver from ischemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial permeability transition. *Transplantation*. 2012;93:265-271.

## Tables

**Table 1 - Cardiopulmonary resuscitation and outcomes**

	<b>Asphyxia (s)</b>	<b>Heart massage (s)</b>	<b>Epinephrine (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>ROSC n (%)</b>	<b>Survival n (%)</b>
<b>Ctrl</b>	391 $\pm$ 14	201 $\pm$ 34	33 $\pm$ 3	20/24 (83)	16/24 (67)
<b>CsA</b>	384 $\pm$ 9	141 $\pm$ 24	29 $\pm$ 3	17/18 (94)	16/18 (89)
<b>NIM811</b>	391 $\pm$ 10	135 $\pm$ 14	24 $\pm$ 2	14/15 (93)	14/15 (93)

ROSC: Restoration of spontaneous circulation.



**Table 2 - Hemodynamics**

		Baseline	5 min reperfusion	30 min reperfusion	60 min reperfusion	120 min reperfusion
<b>HR</b>	<b>Sham</b>	166 ± 7	168 ± 7	159 ± 9	160 ± 8	162 ± 7
	<b>Ctrl</b>	181 ± 8	174 ± 10	193 ± 5	189 ± 3	183 ± 6
	<b>CsA</b>	177 ± 5	172 ± 9	169 ± 7	166 ± 4	171 ± 4
	<b>NIM811</b>	182 ± 8	169 ± 12	188 ± 10	182 ± 4	187 ± 5
<b>MAP</b>	<b>Sham</b>	66 ± 10	60 ± 11	63 ± 10	66 ± 10	63 ± 10
	<b>Ctrl</b>	76 ± 3	31 ± 3*†	33 ± 3*†	39 ± 3*†	34 ± 2*†
	<b>CsA</b>	68 ± 2	35 ± 2*†	35 ± 2*†	48 ± 2*†	45 ± 2*†‡
	<b>NIM811</b>	69 ± 3	39 ± 4*†	41 ± 3*†	49 ± 3*†	49 ± 3*†‡
<b>EDLVP</b>	<b>Sham</b>	3.9 ± 0.2	-	3.9 ± 0.3	4.5 ± 0.4	3.8 ± 0.4
	<b>Ctrl</b>	4.0 ± 0.3	-	7.6 ± 0.8*	7.3 ± 0.8*	6.5 ± 0.5*
	<b>CsA</b>	4.7 ± 0.6	-	7.9 ± 0.9*	5.3 ± 0.5	4.6 ± 0.4‡
	<b>NIM811</b>	4.5 ± 0.5	-	7.8 ± 0.8*	4.9 ± 0.7‡	4.4 ± 0.6‡
<b>dP/dt<sub>max</sub></b>	<b>Sham</b>	2.4 ± 0.1	-	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1
	<b>Ctrl</b>	2.4 ± 0.1	-	0.7 ± 0.1*†	1.0 ± 0.1*†	1.0 ± 0.1*†
	<b>CsA</b>	2.5 ± 0.1	-	0.9 ± 0.1*†	1.3 ± 0.1*†	1.5 ± 0.1*†‡
	<b>NIM811</b>	2.3 ± 0.1	-	1.0 ± 0.1*†	1.2 ± 0.1*†	1.5 ± 0.1*†‡
<b>ETCO<sub>2</sub></b>	<b>Sham</b>	33 ± 1	33 ± 2	34 ± 2	36 ± 2	36 ± 2
	<b>Ctrl</b>	35 ± 1	39 ± 4	33 ± 3	33 ± 2	28 ± 2*
	<b>CsA</b>	34 ± 1	41 ± 2*	41 ± 2*	38 ± 1	36 ± 3‡
	<b>NIM811</b>	36 ± 1	48 ± 4*†‡	41 ± 3	38 ± 2	36 ± 2‡

HR: Heart rate (bpm); MAP: Mean arterial pressure (mmHg); EDLVP: End-diastolic left ventricular pressure (mmHg); dP/dt<sub>max</sub> (x10<sup>3</sup> mmHg/sec); ETCO<sub>2</sub>: End-tidal CO<sub>2</sub> (mmHg).  
*p*<0.05 vs Baseline; † *p*<0.05 vs Sham; ‡ *p*<0.05 vs Ctrl.

**Table 3 - Oxidative phosphorylation**

		<b>State 3</b>	<b>State 4</b>	<b>RCI</b>
<b>Heart</b>	<b>Sham</b>	85 ± 6	12 ± 1	7.1 ± 0.3
	<b>Ctrl</b>	42 ± 5*	9 ± 2	4.8 ± 0.6*
	<b>CsA</b>	70 ± 5 <sup>†</sup>	10 ± 1	7.6 ± 0.6 <sup>†</sup>
	<b>NIM811</b>	79 ± 7 <sup>†</sup>	10 ± 1	7.6 ± 0.6 <sup>†</sup>
<b>Brain</b>	<b>Sham</b>	44 ± 2	7 ± 1	6.4 ± 0.4
	<b>Ctrl</b>	22 ± 3*	6 ± 1	3.9 ± 0.4*
	<b>CsA</b>	35 ± 3 <sup>†</sup>	6 ± 1	6.1 ± 0.6 <sup>†</sup>
	<b>NIM811</b>	36 ± 3 <sup>†</sup>	5 ± 0	7.8 ± 0.6 <sup>†</sup>
<b>Liver</b>	<b>Sham</b>	62 ± 4	8 ± 1	7.8 ± 0.6
	<b>Ctrl</b>	42 ± 4*	7 ± 1	6.4 ± 0.5
	<b>CsA</b>	48 ± 5	7 ± 1	7.4 ± 0.5
	<b>NIM811</b>	39 ± 1*	7 ± 1	5.8 ± 0.6
<b>Kidney</b>	<b>Sham</b>	99 ± 14	15 ± 2	6.5 ± 0.3
	<b>Ctrl</b>	55 ± 6*	11 ± 2	5.6 ± 0.8
	<b>CsA</b>	60 ± 5*	10 ± 1	6.5 ± 0.7
	<b>NIM811</b>	56 ± 4*	10 ± 1	6.0 ± 0.7
<b>Lung</b>	<b>Sham</b>	22 ± 3	3 ± 1	6.8 ± 1.0
	<b>Ctrl</b>	21 ± 3	4 ± 1	5.1 ± 0.4
	<b>CsA</b>	29 ± 3	4 ± 1	6.8 ± 0.4
	<b>NIM811</b>	26 ± 2	5 ± 0	5.6 ± 0.7

State 3 and State 4 are expressed as nanograms-atoms of oxygen/min/mg proteins; RCI: Respiratory control index (State 3/ State 4).

\*  $p < 0.05$  vs Sham; <sup>†</sup>  $p < 0.05$  vs Ctrl.

## Figures Legends

### Figure 1 - Neurological damage

**Panel A:** The proportion of rabbits that presented a light pupillary reflex at the end of the protocol was significantly higher in the treated groups by cyclosporine A (CsA) or its non-immunosuppressive derivative NIM811 when compared to controls (Ctrl).

**Panel B:** Neuron specific enolase (NSE) was significantly reduced in both CsA and NIM811-treated groups versus Ctrl.

\*  $p < 0.05$  vs Sham; †  $p < 0.05$  vs Ctrl.

### Figure 2 - Organ injuries and/or failures

When present, Cyclosporine A (CsA) and its derivative NIM811 significantly limited irreversible myocardial (**Panel A**) and liver (**Panel B**) injuries, as well as kidney dysfunction (**Panel C**). CsA-analogs did not modify oxygen exchanges when compared to both controls (Ctrl) and Sham-operated animals (**Panel D**).

ALT: Alanine-aminotransferase;  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ : ratio of the partial pressure of oxygen in arterial blood to the inspired oxygen fraction.

\*  $p < 0.05$  vs Sham; †  $p < 0.05$  vs Ctrl.

### Figure 3 - Systemic response to ischemia-reperfusion

The increase in lactic dehydrogenase (LDH), lactate and tumor necrosis factor alpha  $\text{TNF-}\alpha$  was significantly limited by cyclosporine A (CsA) and its derivative NIM811 when compared to controls (Ctrl). CsA-analogs did not prevent increase in nitrite/nitrate levels.

\*  $p < 0.05$  vs Sham; †  $p < 0.05$  vs Ctrl.

#### **Figure 4 - Calcium retention capacity**

Typical examples of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening recording from isolated brain mitochondria (**Panel A**). The mPTP opening corresponded to the massive release of  $\text{Ca}^{2+}$  by mitochondria following progressive calcium overload. Amount of  $\text{Ca}^{2+}$  to trigger permeability transition was fewer in controls (Ctrl) than in cyclosporine A (CsA)-treated animal.

Calcium retention capacity, an indicator of permeability transition pore opening, was significantly decreased after resuscitated cardiac arrest in mitochondria isolated from all organs except lungs and restored by CsA and its non-immunosuppressive derivative NIM811. \* $p < 0.05$  vs Sham; †  $p < 0.05$  vs Ctrl.

**FIGURE 1**

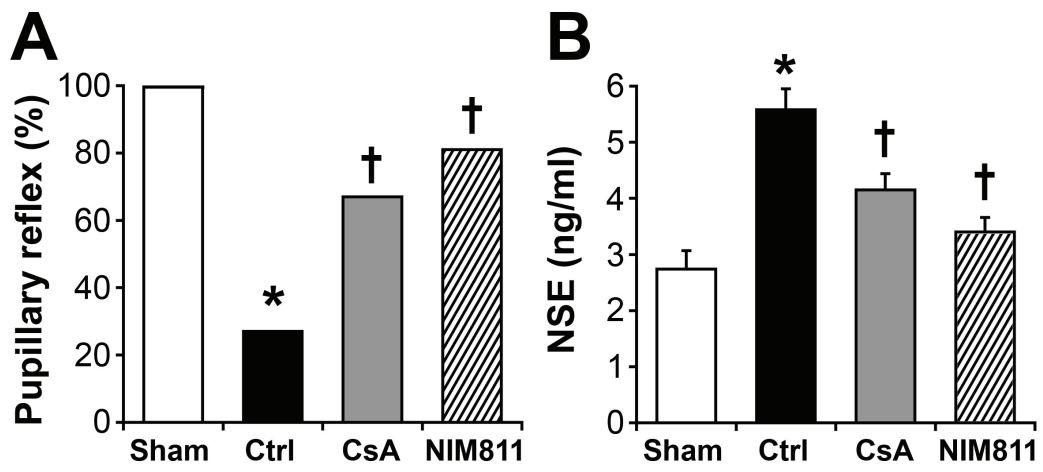


FIGURE 2

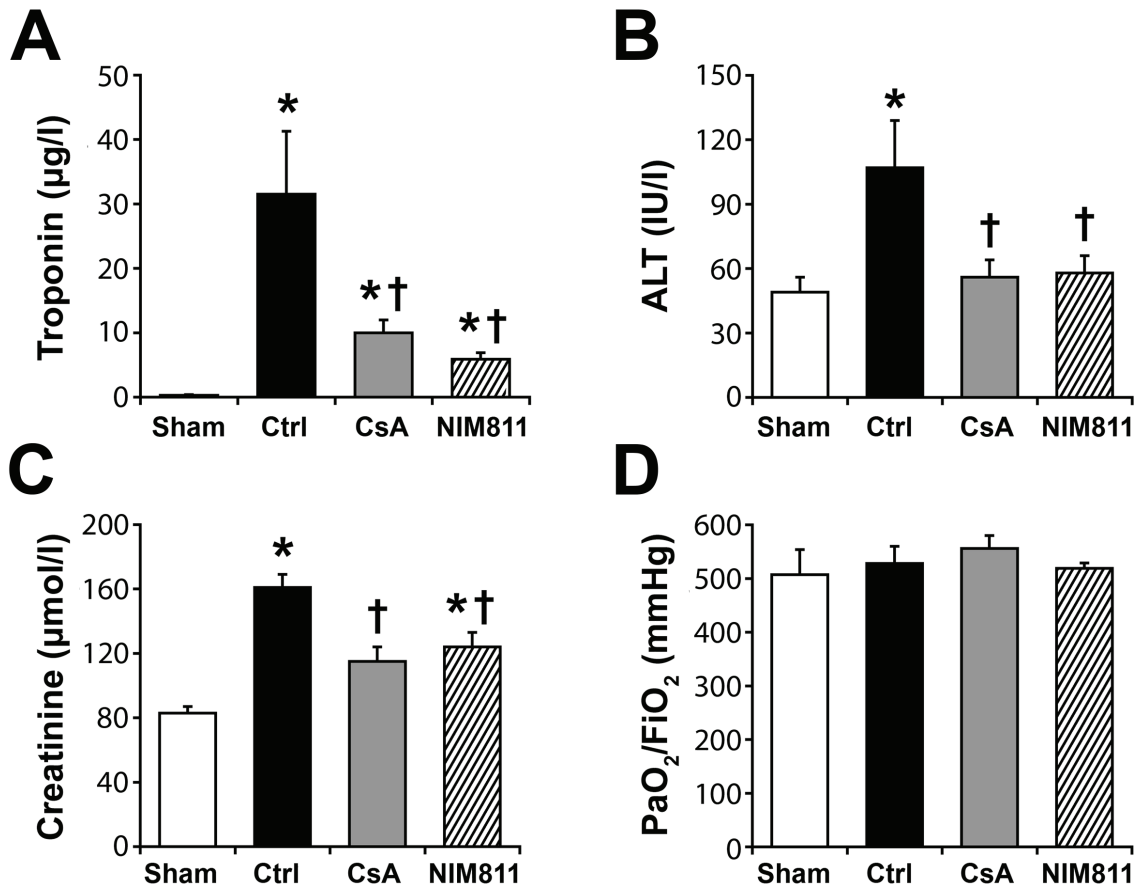
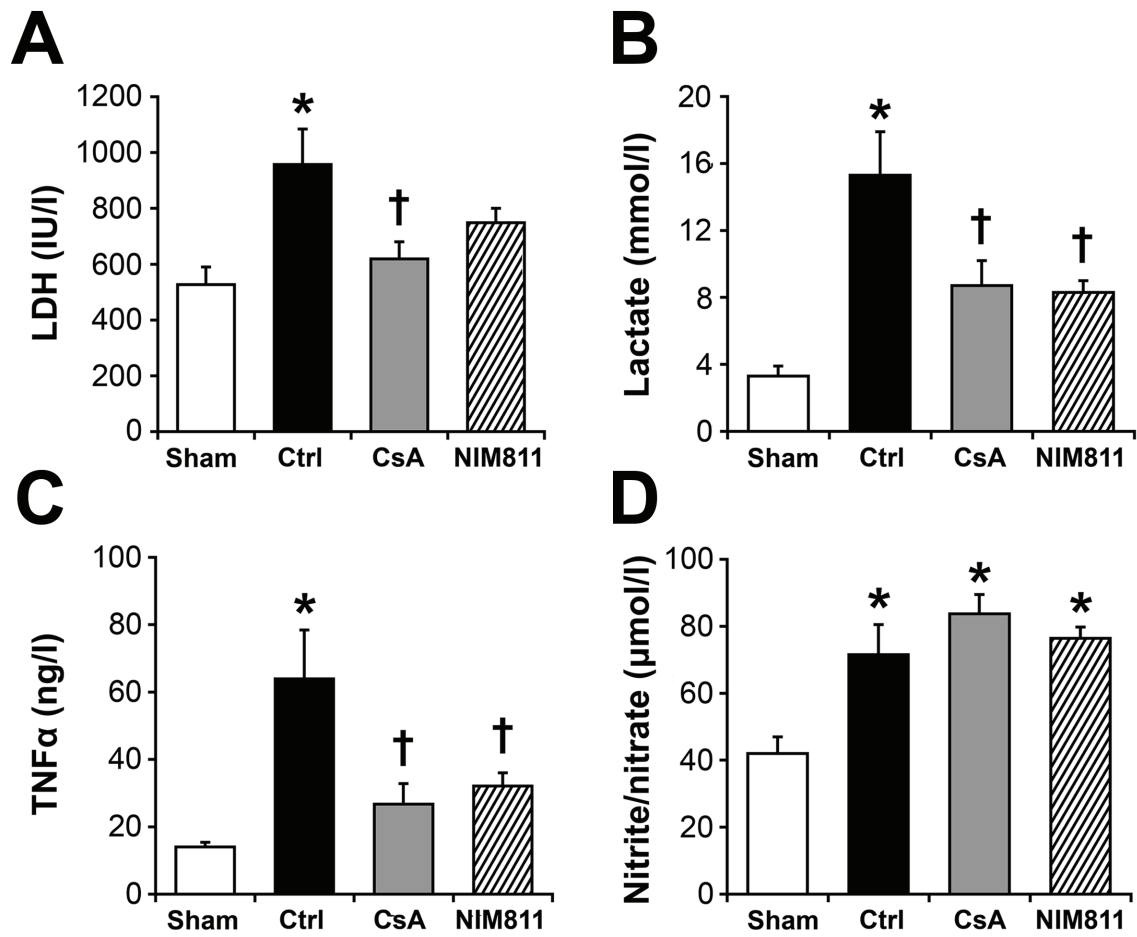
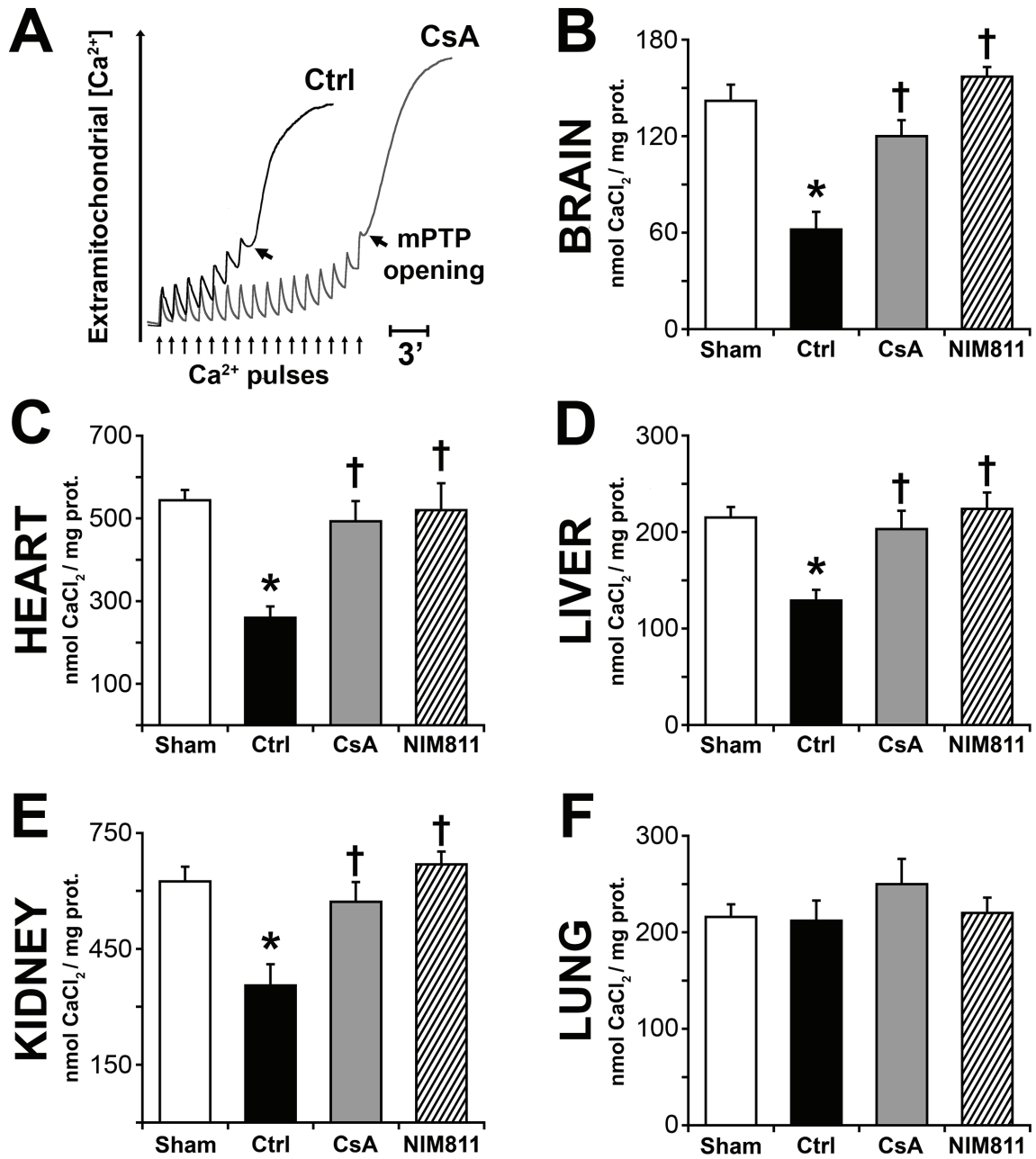


FIGURE 3



**FIGURE 4**





## C. Synthèse des résultats et discussion

Le syndrome post-ACC, caractérisé par une dysfonction cardio-circulatoire et une défaillance multi-organes, est responsable de la majorité des décès survenus après un ACC réanimé avec succès. Actuellement aucun traitement pharmacologique n'a démontré son efficacité pour limiter l'apparition de ce syndrome et améliorer la survie des patients.

Considéré comme une modalité globale d'I/R, l'ACC réanimé entraîne de nombreuses dysfonctions au niveau des mitochondries cardiaques comme la transition de perméabilité et le gonflement mitochondrial, la diminution des taux d'ATP, l'incapacité d'utiliser les substrats énergétiques et le relargage du cytochrome c<sup>478,479</sup>.

Une étude précédente réalisée au laboratoire sur un modèle d'ACC chez le lapin a démontré que l'inhibition du mPTP par la CsA, à la reperfusion, prévenait la dysfonction des mitochondries et la défaillance cardiovasculaire<sup>477</sup>. Ainsi ce précédent travail a été étendu dans cette nouvelle étude où des mitochondries d'autres organes (le cerveau, le foie, les reins et les poumons) ont été isolées.

Cette étude démontre pour la première fois que la CsA prévient le syndrome post-ACC par une inhibition ubiquitaire de l'ouverture du mPTP au sein des organes vitaux. En effet, l'ajout de la CsA ou de son analogue la NIM811, prévient la dysfonction mitochondriale et la défaillance des organes, préserve les fonctions hémodynamiques et améliorent la survie des animaux traités. Néanmoins dans notre modèle d'ACC, aucune défaillance respiratoire n'a été observée et le traitement à la CsA ou à la NIM811 n'améliore pas les paramètres fonctionnels des mitochondries isolées de poumons. Ceci peut être expliqué par le modèle d'ACC utilisé, qui peut prévenir des lésions pulmonaires. En effet, l'utilisation d'un modèle d'ACC à thorax ouvert prévient des dommages pulmonaires lors de la réanimation et du massage cardiaque, de même que l'utilisation d'une ventilation en pression positive et d'une trachéotomie.

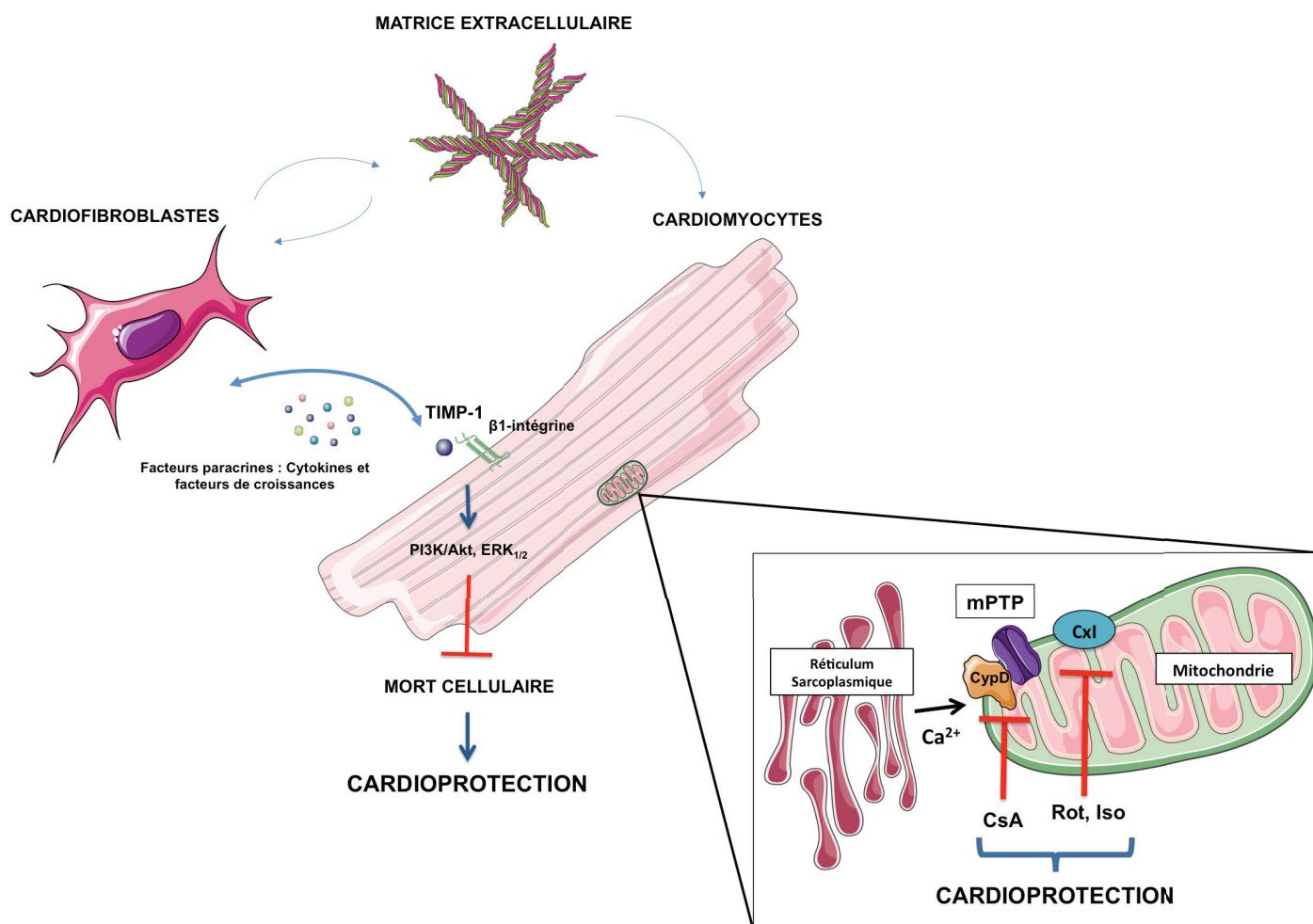
En conclusion, cette étude pré-clinique montre donc que l'inhibition pharmacologique du mPTP lors de la réanimation prévient le syndrome post-ACC et améliore la survie des animaux traités. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives quant à l'utilisation d'une approche thérapeutique par l'inhibition du mPTP dans la prise en charge de l'arrêt cardiaque chez l'homme. Des études cliniques sont déjà en cours afin de déterminer si ces résultats expérimentaux sont transposables chez l'homme.

# **CONCLUSION GENERALE**

L'infarctus du myocarde et ses conséquences restent chez l'homme l'un des problèmes majeur de santé publique. Ce travail de thèse nous a permis d'étudier le rôle des cardiofibroblastes au cours de l'ischémie-reperfusion. Ces cellules, longtemps peu considérées lors de l'épisode ischémique, sont connues pour leur rôle lors de la réparation tissulaire post-infarctus et notamment par leur production de matrice extracellulaire.

Notre travail a pu montrer que ces cellules peuvent conférer aux cardiomyocytes une protection face aux lésions d'ischémie-reperfusion. En effet par des études d'interaction cellulaires directes et indirectes nous avons montré qu'il existe une communication paracrine entre les cardiofibroblastes et les cardiomyocytes, au cours de l'hypoxie. En effet, parmi les facteurs protecteurs sécrétés par les cardiofibroblastes au cours d'un épisode hypoxique, nous avons mis en évidence TIMP-1 comme l'un des facteurs clés de cette cardioprotection médiée par les cardiofibroblastes. TIMP-1, un inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases, possède de multiples activités en parallèle de son action inhibitrice des métalloprotéinases. Dans notre travail, nous avons pu montrer que TIMP-1 est capable d'activer des voies de signalisations connues de la cardioprotection *in vitro* : les voies PI3K/Akt et ERK<sub>1/2</sub> et de diminuer la taille de l'infarctus *in vivo*.

En parallèle de ce travail sur l'interaction cellulaire entre cardiomyocytes et cardiofibroblastes, nous avons étudié une des cibles majeures de la cardioprotection : la mitochondrie. Les dysfonctions mitochondriales induites par l'ischémie-reperfusion peuvent entraîner la perméabilité de la membrane interne mitochondriale via l'ouverture du pore de transition. Nous avons montré que l'inhibition pharmacologique ou génétique de l'un des composants majeur de ce pore : la CypD, associée à l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire, diminuent de façon synergique la mort cellulaire des cardiomyocytes et ceci de façon CypD-dépendante. Par ailleurs, nous avons montré dans deux autres études que l'inhibition de la CypD cardioprotège en inhibant l'ouverture du mPTP mais également en modulant l'homéostasie calcique et ceci indépendamment de son action sur le mPTP. En effet, un nouveau rôle de la CypD modulant le transfert calcique au niveau de l'interface mitochondrie-réticulum a été montré. Enfin, une dernière étude nous a permis de mettre en évidence que l'inhibition de l'ouverture du mPTP par l'inhibition de la CypD entraîne non seulement une cardioprotection mais également une protection multi-organes face à un modèle global d'ischémie-reperfusion : l'arrêt cardiaque.



**Figure 24 : Schéma récapitulatif des différentes études de la thèse.** TIMP-1 : inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases, CypD : cyclophiline D, mPTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale, Cxl : complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, CsA : ciclosporine A, Rot : roténone, Iso : isoflurane.

En conclusion, notre travail met en évidence l'existence de nombreux mécanismes impliqués dans la cardioprotection. En effet, nous montrons que de nouvelles cibles de cardioprotection existent, plus particulièrement la communication intercellulaire entre cardiomyocytes et cardiofibroblastes. De plus, ce travail intègre une vision globale inter- et intracellulaire dans la cardioprotection, avec la mise en évidence de nouveaux mécanismes dans la régulation du mPTP. L'intérêt de ces nouvelles pistes est de développer de nouveaux traitements pharmacologiques cardioprotecteurs.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Ezzati, M. *et al.* Estimates of global and regional potential health gains from reducing multiple major risk factors. *Lancet* **362**, 271–280 (2003).
2. Jennings, R. B. & Reimer, K. A. Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation* **68**, 125–36 (1983).
3. Reimer, K. A. & Jennings, R. B. The ‘wavefront phenomenon’ of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* **40**, 633–644 (1979).
4. Reimer, K. A. *et al.* Animal models for protecting ischemic myocardium: results of the NHLBI Cooperative Study. Comparison of unconscious and conscious dog models. *Circulation Research* **56**, 651–665 (1985).
5. Chien, G. L., Wolff, R. A., Davis, R. F. & Van Winkle, D. M. ‘Normothermic range’ temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovascular Research* **28**, 1014–1017 (1994).
6. Braunwald, E. Myocardial reperfusion, limitation of infarct size, reduction of left ventricular dysfunction, and improved survival. Should the paradigm be expanded? *Circulation* **79**, 441–444 (1989).
7. Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A. & Linn, H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* **70**, 68–78 (1960).
8. Hearse, D. J. Reperfusion of the ischemic myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **9**, 605–616 (1977).
9. Braunwald, E. & Kloner, R. A. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* **66**, 1146–1149 (1982).
10. Kloner, R. A., Ganote, C. E. & Jennings, R. B. The ‘no-reflow’ phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J. Clin. Invest.* **54**, 1496–1508 (1974).
11. Rolfe, D. F. & Brown, G. C. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews* **77**, 731–758 (1997).
12. Neely, J. R. & Morgan, H. E. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **36**, 413–459 (1974).
13. Young, L. H. *et al.* Low-flow ischemia leads to translocation of canine heart GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporters to the sarcolemma in vivo. *Circulation* **95**, 415–422 (1997).
14. Egert, S., Nguyen, N. & Schwaiger, M. Myocardial glucose transporter GLUT1: translocation induced by insulin and ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **31**, 8–8 (1999).
15. Dennis, S. C., Gevers, W. & Opie, L. H. Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **23**, 1077–1086 (1991).
16. Liu, B., Clanachan, A. S., Schulz, R. & Lopaschuk, G. D. Cardiac efficiency is improved after ischemia by altering both the source and fate of protons. *Circulation Research* **79**, 940–948 (1996).
17. Stanley, W. C., Lopaschuk, G. D., Hall, J. L. & McCormack, J. G. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovascular Research* **33**, 243–257 (1997).
18. Karmazyn, M., Gan, X. T., Humphreys, R. A., Yoshida, H. & Kusumoto, K. The myocardial Na<sup>(+)</sup>-H<sup>(+)</sup> exchange: structure, regulation, and its role in heart disease.

- Circulation Research* **85**, 777–786 (1999).
19. Imahashi, K. *et al.* Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury. *Circulation Research* **84**, 1401–1406 (1999).
  20. Tani, M. & Neely, J. R. Role of intracellular Na<sup>+</sup> in Ca<sup>2+</sup> overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange. *Circulation Research* **65**, 1045–1056 (1989).
  21. Kusuoka, H., Porterfield, J. K., Weisman, H. F., Weisfeldt, M. L. & Marbán, E. Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca<sup>2+</sup> activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. *J. Clin. Invest.* **79**, 950–961 (1987).
  22. Jennings, R. B., Herdson, P. B. & Sommers, H. M. Structural and functional abnormalities in mitochondria isolated from ischemic dog myocardium. *Lab Invest* **20**, 548–557 (1969).
  23. Jennings, R. B., Herdson, P. B. & Hill, M. L. Pyruvate metabolism in mitochondria isolated from dog myocardium. *Lab Invest* **20**, 537–547 (1969).
  24. Jennings, R. B. & Ganote, C. E. Mitochondrial structure and function in acute myocardial ischemic injury. *Circulation Research* **38**, I80–I91 (1976).
  25. Shen, A. C. & Jennings, R. B. Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury. *The American Journal of Pathology* **67**, 441–452 (1972).
  26. Rouslin, W. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *Am J Physiol* **244**, H743–H748 (1983).
  27. Lesnefsky, E. J., Slabe, T. J., Stoll, M. S., Minkler, P. E. & Hoppel, C. L. Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H2770–H2778 (2001).
  28. Chappell, J. B. & Crofts, A. R. Calcium ion accumulation and volume changes of isolated liver mitochondria. calcium ion-induced swelling. *Biochem. J.* **95**, 378–386 (1965).
  29. Pfeiffer, D. R., Gunter, T. E., Eliseev, R., Broekemeier, K. M. & Gunter, K. K. Release of Ca<sup>2+</sup> from mitochondria via the saturable mechanisms and the permeability transition. *IUBMB Life* **52**, 205–212 (2001).
  30. Hunter, D. R. & Haworth, R. A. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* **195**, 453–459 (1979).
  31. Haworth, R. A. & Hunter, D. R. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Arch. Biochem. Biophys.* **195**, 460–467 (1979).
  32. Crompton, M., Costi, A. & Hayat, L. Evidence for the presence of a reversible Ca<sup>2+</sup>-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem. J.* **245**, 915–918 (1987).
  33. Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* **341**, 233–233 (1999).
  34. Halestrap, A. P., McStay, G. P. & Clarke, S. J. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* **84**, 153–166 (2002).
  35. Di Lisa, F. & Bernardi, P. Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition. *Cardiovascular Research* **66**, 11–11 (2005).
  36. Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* **357**,



- 1121–1135 (2007).
37. Halestrap, A. P., Clarke, S. J. & Khaliulin, I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1767**, 25–25 (2007).
  38. Xia, Y. & Zweier, J. L. Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. *J. Biol. Chem.* **270**, 18797–18803 (1995).
  39. Zorov, D. B. *et al.* Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research* **83**, 213–225 (2009).
  40. Zorov, D. B., Filburn, C. R., Klotz, L. O., Zweier, J. L. & Sollott, S. J. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med* **192**, 1001–1014 (2000).
  41. Kerr, J., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239 (1972).
  42. Fliss, H. & Gattinger, D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circulation Research* **79**, 949–956 (1996).
  43. Freude, B. *et al.* Apoptosis is Initiated by Myocardial Ischemia and Executed During Reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **32**, 12–12 (2000).
  44. Zhao, Z.-Q. *et al.* Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovascular Research* **59**, 132–142 (2003).
  45. Kang, P. M., Haunstetter, A., Aoki, H., Usheva, A. & Izumo, S. Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circulation Research* **87**, 118–125 (2000).
  46. Holly, T. A. *et al.* Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **31**, 1709–1715 (1999).
  47. Matsui, Y. *et al.* Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circulation Research* **100**, 914–922 (2007).
  48. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
  49. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. & Klionsky, D. J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**, 1069–1075 (2008).
  50. Gustafsson, Å. B. & Gottlieb, R. A. Autophagy in Ischemic Heart Disease. *Circulation Research* **104**, 150–158 (2009).
  51. Gottlieb, R. A. & Mentzer, R. M., Jr. Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 45–59 (2010).
  52. Kubli, D. A. & Gustafsson, Å. B. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circulation Research* **111**, 1208–1221 (2012).
  53. Reimer, K. A., Murry, C. E., Yamasawa, I., Hill, M. L. & Jennings, R. B. Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol* **251**, H1306–H1315 (1986).
  54. Murry, C. E., Jennings, R. B. & Reimer, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124–1136 (1986).
  55. Cohen, M. V., Liu, G. S. & Downey, J. M. Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. *Circulation* **84**, 341–349 (1991).

56. Liu, Y. & Downey, J. M. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol* **263**, H1107–H1112 (1992).
57. Ovize, M. *et al.* Preconditioning reduces infarct size but accelerates time to ventricular fibrillation in ischemic pig heart. *Am J Physiol* **269**, H72–H79 (1995).
58. Sumeray, M. S. & Yellon, D. M. Ischaemic preconditioning reduces infarct size following global ischaemia in the murine myocardium. *Basic Res. Cardiol.* **93**, 384–390 (1998).
59. Tomai, F., Crea, F., Chiariello, L. & Giuffr , P. A. Ischemic preconditioning in humans: models, mediators, and clinical relevance. *Circulation* **100**, 559–563 (1999).
60. Dirnagl, U., Becker, K. & Meisel, A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol* **8**, 398–412 (2009).
61. Macedo, F. I. & Miranda, L. E. Role of ischemic preconditioning in liver transplant: a review of literature. *Exp Clin Transplant* **8**, 1–3 (2010).
62. Bonventre, J. V. Kidney ischemic preconditioning. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **11**, 43–48 (2002).
63. Yellon, D. M. & Downey, J. M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiological Reviews* **83**, 1113–1151 (2003).
64. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Preconditioning and postconditioning: Underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis* **204**, 8–8 (2009).
65. Zhao, Z.-Q. *et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H579–H588 (2003).
66. Staat, P. *et al.* Postconditioning the Human Heart. *Circulation* **112**, 2143–2148 (2005).
67. Piper, H. M., Abdallah, Y. & Schäfer, C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular Research* **61**, 7–7 (2004).
68. Manintveld, O. C. *et al.* Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H1551–H1560 (2007).
69. Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R. A. & Whittaker, P. Regional ischemic ‘preconditioning’ protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* **87**, 893–899 (1993).
70. Gho, B. C., Schoemaker, R. G., van den Doel, M. A., Duncker, D. J. & Verdouw, P. D. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* **94**, 2193–2200 (1996).
71. Pell, T. J., Baxter, G. F., Yellon, D. M. & Drew, G. M. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* **275**, H1542–7 (1998).
72. Kerendi, F. *et al.* Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res. Cardiol.* **100**, 404–412 (2005).
73. Li, C.-M., Zhang, X.-H., Ma, X.-J. & Luo, M. Limb ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Scand. Cardiovasc. J.* **40**, 312–317 (2006).
74. Gritsopoulos, G. *et al.* Remote postconditioning is more potent than classic postconditioning in reducing the infarct size in anesthetized rabbits. *Cardiovasc*

- Drugs Ther* **23**, 193–198 (2009).
75. Andreka, G. *et al.* Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart* **93**, 749–752 (2007).
  76. Bøtker, H. E. *et al.* Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet* **375**, 727–734 (2010).
  77. Liu, G. S. *et al.* Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* **84**, 350–356 (1991).
  78. Grover, G. J., Sleph, P. G. & Dzwonczyk, S. Role of myocardial ATP-sensitive potassium channels in mediating preconditioning in the dog heart and their possible interaction with adenosine A1-receptors. *Circulation* **86**, 1310–1316 (1992).
  79. Lochner, A., Marais, E., Toit, Du, E. & Moolman, J. Nitric oxide triggers classic ischemic preconditioning. *Annals of the New York Academy of Sciences* **962**, 402–414 (2002).
  80. Baines, C. P., Goto, M. & Downey, J. M. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **29**, 207–216 (1997).
  81. Vanden Hoek, T., Becker, L. B., Shao, Z. H., Li, C. Q. & Schumacker, P. T. Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circulation Research* **86**, 541–548 (2000).
  82. Schulman, D., Latchman, D. S. & Yellon, D. M. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H1481–8 (2002).
  83. Hausenloy, D. J., Mocanu, M. M. & Yellon, D. M. Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovascular Research* **63**, 305–312 (2004).
  84. Yang, X.-M. *et al.* Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *Journal of the American College of Cardiology* **44**, 1103–1110 (2004).
  85. Tsang, A., Hausenloy, D. J., Mocanu, M. M. & Yellon, D. M. Postconditioning: a form of ‘modified reperfusion’ protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circulation Research* **95**, 230–232 (2004).
  86. Zhu, M. *et al.* Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway. *Cardiovascular Research* **72**, 152–162 (2006).
  87. Juhaszova, M. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest.* **113**, 1535–1549 (2004).
  88. Das, S., Wong, R., Rajapakse, N., Murphy, E. & Steenbergen, C. Glycogen synthase kinase 3 inhibition slows mitochondrial adenine nucleotide transport and regulates voltage-dependent anion channel phosphorylation. *Circulation Research* **103**, 983–991 (2008).
  89. Gomez, L., Paillard, M., Thibault, H., Derumeaux, G. & Ovize, M. Inhibition of GSK3 $\beta$  by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* **117**, 2761–2768 (2008).
  90. Nishino, Y. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the mouse. *Circulation Research* **103**, 307–314 (2008).

91. Ping, P. & Murphy, E. Role of p38 mitogen-activated protein kinases in preconditioning: a detrimental factor or a protective kinase? *Circulation Research* **86**, 921–922 (2000).
92. Michel, M. C., Li, Y. & Heusch, G. Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **363**, 245–266 (2001).
93. Kim, S. O. *et al.* Ischemia induced activation of heat shock protein 27 kinases and casein kinase 2 in the preconditioned rabbit heart. *Biochem. Cell Biol.* **77**, 559–567 (1999).
94. Behrends, M. *et al.* Inconsistent relation of MAPK activation to infarct size reduction by ischemic preconditioning in pigs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H1111–9 (2000).
95. Baines, C. P. *et al.* Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol* **276**, H1361–8 (1999).
96. Barancik, M., Htun, P. & Schaper, W. Okadaic acid and anisomycin are protective and stimulate the SAPK/JNK pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **34**, 182–190 (1999).
97. Sato, M., Cordis, G. A., Maulik, N. & Das, D. K. SAPKs regulation of ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H901–7 (2000).
98. Sun, H.-Y. *et al.* Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis* **11**, 1583–1593 (2006).
99. Schwartz, L. M. & Lagranha, C. J. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H1011–8 (2006).
100. Skyschally, A. *et al.* Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circulation Research* **104**, 15–18 (2009).
101. Musiolik, J. *et al.* Reduction of infarct size by gentle reperfusion without activation of reperfusion injury salvage kinases in pigs. *Cardiovascular Research* **85**, 110–117 (2010).
102. Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Drexler, H., Heusch, G. & Schulz, R. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacology and Therapeutics* **120**, 172–185 (2008).
103. Boengler, K. *et al.* Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice. *Circulation Research* **102**, 131–135 (2008).
104. Goodman, M. D., Koch, S. E., Fuller-Bicer, G. A. & Butler, K. L. Regulating RISK: a role for JAK-STAT signaling in postconditioning? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**, H1649–56 (2008).
105. Lecour, S. *et al.* Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation* **112**, 3911–3918 (2005).
106. Vessey, D. A. *et al.* Role of sphingosine kinase activity in protection of heart against ischemia reperfusion injury. *Med. Sci. Monit.* **12**, BR318–24 (2006).
107. Jin, Z.-Q., Karliner, J. S. & Vessey, D. A. Ischaemic postconditioning protects isolated mouse hearts against ischaemia/reperfusion injury via sphingosine kinase isoform-1 activation. *Cardiovascular Research* **79**, 134–140 (2008).
108. Penna, C. *et al.* Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling

- through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel and protein kinase C activation. *Basic Res. Cardiol.* **101**, 180–189 (2006).
109. Zatta, A. J. *et al.* Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovascular Research* **70**, 315–324 (2006).
  110. Yang, X.-M., Philipp, S., Downey, J. M. & Cohen, M. V. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res. Cardiol.* **100**, 57–63 (2005).
  111. Penna, C. *et al.* Post-conditioning reduces infarct size in the isolated rat heart: role of coronary flow and pressure and the nitric oxide/cGMP pathway. *Basic Res. Cardiol.* **101**, 168–179 (2006).
  112. Gross, G. J. & Auchampach, J. A. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circulation Research* **70**, 223–233 (1992).
  113. Van Winkle, D. M. *et al.* Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the K<sub>ATP</sub> channel. *Am J Physiol* **266**, H829–39 (1994).
  114. Hausenloy, D. J., Yellon, D. M., Mani-Babu, S. & Duchon, M. R. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H841–9 (2004).
  115. Argaud, L. *et al.* Preconditioning delays Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovascular Research* **61**, 115–122 (2004).
  116. Nakagawa, T. T. *et al.* Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434**, 652–658 (2005).
  117. Argaud, L. *et al.* Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* **111**, 194–197 (2005).
  118. Costa, A. D. T. *et al.* The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibit the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* **281**, 20801–20808 (2006).
  119. Crompton, M., Ellinger, H. & Costi, A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* **255**, 357–360 (1988).
  120. Davidson, A. M. & Halestrap, A. P. Partial inhibition by cyclosporin A of the swelling of liver mitochondria in vivo and in vitro induced by sub-micromolar [Ca<sup>2+</sup>], but not by butyrate. Evidence for two distinct swelling mechanisms. *Biochem. J.* **268**, 147–152 (1990).
  121. Baines, C. P. *et al.* Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**, 658–662 (2005).
  122. Nazareth, W., Yafei, N. & Crompton, M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **23**, 1351–1354 (1991).
  123. Arteaga, D. *et al.* Impairment by cyclosporin A of reperfusion-induced arrhythmias. *Life Sciences* **51**, 1127–1134 (1992).
  124. Griffiths, E. J. & Halestrap, A. P. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **25**, 1461–1469 (1993).
  125. Piot, C. *et al.* Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **359**, 473–481 (2008).
  126. Fontaine, E., Eriksson, O., Ichas, F. & Bernardi, P. Regulation of the permeability



- transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J. Biol. Chem.* **273**, 12662–12668 (1998).
127. Fontaine, E., Ichas, F. & Bernardi, P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* **273**, 25734–25740 (1998).
  128. Li, B. *et al.* Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D. *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 1628–1634 (2012).
  129. Teixeira, G. *et al.* Synergistic protective effect of cyclosporin A and rotenone against hypoxia-reoxygenation in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **56**, 55–62 (2013).
  130. Cope, D. K., Impastato, W. K., Cohen, M. V. & Downey, J. M. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* **86**, 699–709 (1997).
  131. Cason, B. A., Gamperl, A. K., Slocum, R. E. & Hickey, R. F. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* **87**, 1182–1190 (1997).
  132. Toller, W. G., Kersten, J. R., Gross, E. R., Pagel, P. S. & Warltier, D. C. Isoflurane preconditions myocardium against infarction via activation of inhibitory guanine nucleotide binding proteins. *Anesthesiology* **92**, 1400–1407 (2000).
  133. Toller, W. G., Kersten, J. R., Pagel, P. S., Hettrick, D. A. & Warltier, D. C. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology* **91**, 1437–1446 (1999).
  134. Preckel, B. *et al.* Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischaemia in the rabbit heart in vivo. *Br J Anaesth* **81**, 905–912 (1998).
  135. Chiari, P. C. *et al.* Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology* **102**, 102–109 (2005).
  136. Horikawa, Y. T. *et al.* Caveolin-3 expression and caveolae are required for isoflurane-induced cardiac protection from hypoxia and ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **44**, 123–130 (2008).
  137. Ismaeil, M. S., Tkachenko, I., Gamperl, A. K., Hickey, R. F. & Cason, B. A. Mechanisms of isoflurane-induced myocardial preconditioning in rabbits. *Anesthesiology* **90**, 812–821 (1999).
  138. Uecker, M. *et al.* Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* **99**, 138–147 (2003).
  139. Da Silva, R., Grampp, T., Pasch, T., Schaub, M. C. & Zaugg, M. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* **100**, 59–69 (2004).
  140. Ludwig, L. M., Weihrauch, D., Kersten, J. R., Pagel, P. S. & Warltier, D. C. Protein kinase C translocation and Src protein tyrosine kinase activation mediate isoflurane-induced preconditioning in vivo: potential downstream targets of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reactive oxygen species. *Anesthesiology* **100**, 532–539 (2004).
  141. Hanley, P. J., Ray, J., Brandt, U. & Daut, J. Halothane, isoflurane and sevoflurane inhibit NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of cardiac mitochondria. *J. Physiol. (Lond.)* **544**, 687–693 (2002).

142. Müllenheim, J. *et al.* Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals. *Anesthesiology* **96**, 934–940 (2002).
143. Piriou, V. *et al.* Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology* **100**, 581–588 (2004).
144. Sedlic, F. *et al.* Mitochondrial depolarization underlies delay in permeability transition by preconditioning with isoflurane: roles of ROS and Ca<sup>2+</sup>. *AJP: Cell Physiology* **299**, C506–15 (2010).
145. Haworth, R. A. & Goknur, A. B. Inhibition of sodium/calcium exchange and calcium channels of heart cells by volatile anesthetics. *Anesthesiology* **82**, 1255–1265 (1995).
146. Karon, B. S. *et al.* Different anesthetic sensitivities of skeletal and cardiac isoforms of the Ca-ATPase. *Biochemistry* **38**, 9301–9307 (1999).
147. Miao, N., Frazer, M. J. & Lynch, C. Anesthetic actions on calcium uptake and calcium-dependent adenosine triphosphatase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Adv. Pharmacol.* **31**, 145–165 (1994).
148. Krolikowski, J. G. *et al.* Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo. *Can J Anaesth* **53**, 174–182 (2006).
149. Ge, Z.-D. *et al.* Isoflurane postconditioning protects against reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition by an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Anesthesiology* **112**, 73–85 (2010).
150. Feng, J. *et al.* Infarct-remodeled myocardium is receptive to protection by isoflurane postconditioning: role of protein kinase B/Akt signaling. *Anesthesiology* **104**, 1004–1014 (2006).
151. Duncker, D. J. *et al.* Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *Am J Physiol* **270**, H1189–99 (1996).
152. Hale, S. L. & Kloner, R. A. Myocardial temperature reduction attenuates necrosis after prolonged ischemia in rabbits. *Cardiovascular Research* **40**, 502–507 (1998).
153. Hale, S. L. & Kloner, R. A. Myocardial hypothermia: a potential therapeutic technique for acute regional myocardial ischemia. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **10**, 405–413 (1999).
154. Hale, S. L., Dae, M. W. & Kloner, R. A. Hypothermia during reperfusion limits ‘no-reflow’ injury in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Cardiovascular Research* **59**, 715–722 (2003).
155. Dae, M. W., Gao, D. W., Sessler, D. I., Chair, K. & Stillson, C. A. Effect of endovascular cooling on myocardial temperature, infarct size, and cardiac output in human-sized pigs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **282**, H1584–91 (2002).
156. van den Doel, M. A. *et al.* Hypothermia extends the cardioprotection by ischaemic preconditioning to coronary artery occlusions of longer duration. *Cardiovascular Research* **37**, 76–81 (1998).
157. Tissier, R. *et al.* The small chill: mild hypothermia for cardioprotection? *Cardiovascular Research* **88**, 406–414 (2010).
158. Miki, T., Liu, G. S., Cohen, M. V. & Downey, J. M. Mild hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart: a practical intervention for acute myocardial infarction? *Basic Res. Cardiol.* **93**, 372–383 (1998).
159. Chen, Q. *et al.* Cardiac preconditioning with 4-h, 17 degrees C ischemia reduces [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> load and damage in part via K(ATP) channel opening. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **282**, H1961–9 (2002).
160. Chenoune, M. *et al.* Rapid cooling of the heart with total liquid ventilation prevents

- transmural myocardial infarction following prolonged ischemia in rabbits. *Resuscitation* **81**, 359–362 (2010).
161. Simkhovich, B. Z., Hale, S. L. & Kloner, R. A. Metabolic mechanism by which mild regional hypothermia preserves ischemic tissue. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **9**, 83–90 (2004).
  162. Götberg, M. *et al.* Rapid short-duration hypothermia with cold saline and endovascular cooling before reperfusion reduces microvascular obstruction and myocardial infarct size. *BMC Cardiovasc Disord* **8**, 7 (2008).
  163. Knerr, S. M. & Lieberman, M. Ion transport during hypothermia in cultured heart cells: implications for protection of the immature myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **25**, 277–288 (1993).
  164. Anderson, S. E., Liu, H., Beyschau, A. & Cala, P. M. Effects of cold cardioplegia on pH, Na, and Ca in newborn rabbit hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H1090–7 (2006).
  165. Riess, M. L., Camara, A. K. S., Kevin, L. G., An, J. & Stowe, D. F. Reduced reactive O<sub>2</sub> species formation and preserved mitochondrial NADH and [Ca<sup>2+</sup>] levels during short-term 17 degrees C ischemia in intact hearts. *Cardiovascular Research* **61**, 580–590 (2004).
  166. Gambert, S. *et al.* Deep hypothermia during ischemia improves functional recovery and reduces free-radical generation in isolated reperfused rat heart. *J. Heart Lung Transplant.* **23**, 487–491 (2004).
  167. Jones, R. N., Reimer, K. A., Hill, M. L. & Jennings, R. B. Effect of hypothermia on changes in high-energy phosphate production and utilization in total ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **14 Suppl 3**, 123–130 (1982).
  168. Yang, X. *et al.* Cardioprotection by mild hypothermia during ischemia involves preservation of ERK activity. *Basic Res. Cardiol.* **106**, 421–430 (2011).
  169. Shao, Z.-H. *et al.* Therapeutic hypothermia cardioprotection via Akt- and nitric oxide-mediated attenuation of mitochondrial oxidants. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* **298**, H2164–73 (2010).
  170. Mochizuki, T., Yu, S., Katoh, T., Aoki, K. & Sato, S. Cardioprotective effect of therapeutic hypothermia at 34°C against ischaemia/reperfusion injury mediated by PI3K and nitric oxide in a rat isolated heart model. *Resuscitation* **83**, 238–242 (2012).
  171. Tissier, R. *et al.* Rapid cooling preserves the ischaemic myocardium against mitochondrial damage and left ventricular dysfunction. *Cardiovascular Research* **83**, 345–353 (2009).
  172. Min, J.-Y. *et al.* Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J. Appl. Physiol.* **92**, 288–296 (2002).
  173. Laflamme, M. A. *et al.* Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1015–1024 (2007).
  174. Behfar, A. *et al.* Cardiopoietic programming of embryonic stem cells for tumor-free heart repair. *J Exp Med* **204**, 405–420 (2007).
  175. Nussbaum, J. *et al.* Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J.* **21**, 1345–1357 (2007).
  176. Yoon, Y.-S., Park, J.-S., Tkebuchava, T., Luedeman, C. & Losordo, D. W. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation* **109**, 3154–3157 (2004).



177. Breitbach, M. *et al.* Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* **110**, 1362–1369 (2007).
178. Chen, S.-L. *et al.* Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *AJC* **94**, 92–95 (2004).
179. Reinecke, H., Poppa, V. & Murry, C. E. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **34**, 241–249 (2002).
180. Menasché, P. *et al.* The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* **117**, 1189–1200 (2008).
181. Abdel-Latif, A. *et al.* Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* **167**, 989–997 (2007).
182. Schächinger, V. *et al.* Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *European Heart Journal* **27**, 2775–2783 (2006).
183. Murry, C. E. *et al.* Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* **428**, 664–668 (2004).
184. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
185. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
186. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–1920 (2007).
187. Nelson, T. J. *et al.* Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* **120**, 408–416 (2009).
188. Beltrami, A. P. *et al.* Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**, 763–776 (2003).
189. Oh, H. *et al.* Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 12313–12318 (2003).
190. Messina, E. *et al.* Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circulation Research* **95**, 911–921 (2004).
191. Chimenti, I. *et al.* Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circulation Research* **106**, 971–980 (2010).
192. Li, T.-S. *et al.* Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. *Stem Cells* **28**, 2088–2098 (2010).
193. Cheng, K. *et al.* Magnetic targeting enhances engraftment and functional benefit of iron-labeled cardiosphere-derived cells in myocardial infarction. *Circulation Research* **106**, 1570–1581 (2010).
194. Davis, D. R. *et al.* Isolation and expansion of functionally-competent cardiac progenitor cells directly from heart biopsies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **49**, 312–321 (2010).
195. Terrovitis, J. *et al.* Noninvasive quantification and optimization of acute cell retention by in vivo positron emission tomography after intramyocardial cardiac-derived stem cell delivery. *Journal of the American College of Cardiology* **54**, 1619–

- 1626 (2009).
196. Lee, S.-T. *et al.* Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **57**, 455–465 (2011).
  197. Johnston, P. V. *et al.* Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation* **120**, 1075–83– 7 p following 1083 (2009).
  198. Winter, E. M. *et al.* Preservation of left ventricular function and attenuation of remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouse heart. *Circulation* **116**, 917–927 (2007).
  199. Urbich, C. *et al.* Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **39**, 733–742 (2005).
  200. Di Santo, S. *et al.* Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS ONE* **4**, e5643 (2009).
  201. Gneocchi, M. *et al.* Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* **20**, 661–669 (2006).
  202. Gneocchi, M., Zhang, Z., Ni, A. & Dzau, V. J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation Research* **103**, 1204–1219 (2008).
  203. Perez-Illarbe, M. *et al.* Characterization of the paracrine effects of human skeletal myoblasts transplanted in infarcted myocardium. *Eur. J. Heart Fail.* **10**, 1065–1072 (2008).
  204. Korf-Klingebiel, M. *et al.* Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction. *European Heart Journal* **29**, 2851–2858 (2008).
  205. Stastna, M., Chimenti, I., Marbán, E. & Van Eyk, J. E. Identification and functionality of proteomes secreted by rat cardiac stem cells and neonatal cardiomyocytes. *Proteomics* **10**, 245–253 (2010).
  206. Estrada, R. *et al.* Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. *J. Cell. Physiol.* **219**, 563–571 (2009).
  207. Pula, G. *et al.* Proteomics identifies thymidine phosphorylase as a key regulator of the angiogenic potential of colony-forming units and endothelial progenitor cell cultures. *Circulation Research* **104**, 32–40 (2009).
  208. Chen, T. S. *et al.* Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res.* **38**, 215–224 (2010).
  209. Camelliti, P., Borg, T. K. & Kohl, P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovascular Research* **65**, 40–51 (2005).
  210. Souders, C. A., Bowers, S. L. K. & Baudino, T. A. Cardiac Fibroblast: The Renaissance Cell. *Circulation Research* **105**, 1164–1176 (2009).
  211. Krenning, G., Zeisberg, E. M. & Kalluri, R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J. Cell. Physiol.* **225**, 631–637 (2010).
  212. Fries, K. M. *et al.* Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **72**, 283–292 (1994).
  213. Franke, W. W., Schmid, E., Osborn, M. & Weber, K. Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* **81**, 570–580 (1979).

214. Mørk, C., van Deurs, B. & Petersen, O. W. Regulation of vimentin expression in cultured human mammary epithelial cells. *Differentiation* **43**, 146–156 (1990).
215. Goldsmith, E. C. *et al.* Organization of fibroblasts in the heart. *Dev. Dyn.* **230**, 787–794 (2004).
216. Vogel, W., Gish, G. D., Alves, F. & Pawson, T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol. Cell* **1**, 13–23 (1997).
217. Schlessinger, J. Direct binding and activation of receptor tyrosine kinases by collagen. *Cell* **91**, 869–872 (1997).
218. Lai, C. & Lemke, G. An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron* **6**, 691–704 (1991).
219. Ebihara, Y. *et al.* Hematopoietic origins of fibroblasts: II. In vitro studies of fibroblasts, CFU-F, and fibrocytes. *Exp. Hematol.* **34**, 219–229 (2006).
220. Shyu, K.-G., Chao, Y.-M., Wang, B.-W. & Kuan, P. Regulation of discoidin domain receptor 2 by cyclic mechanical stretch in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **46**, 614–621 (2005).
221. Ferri, N., Carragher, N. O. & Raines, E. W. Role of discoidin domain receptors 1 and 2 in human smooth muscle cell-mediated collagen remodeling: potential implications in atherosclerosis and lymphangioliomyomatosis. *The American Journal of Pathology* **164**, 1575–1585 (2004).
222. Gabbiani, G., Ryan, G. B. & Majne, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* **27**, 549–550 (1971).
223. Gabbiani, G. The cellular derivation and the life span of the myofibroblast. *Pathol. Res. Pract.* **192**, 708–711 (1996).
224. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 349–363 (2002).
225. Santiago, J.-J. *et al.* Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Dev. Dyn.* **239**, 1573–1584 (2010).
226. Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* **200**, 500–503 (2003).
227. Calderone, A. *et al.* Scar myofibroblasts of the infarcted rat heart express natriuretic peptides. *J. Cell. Physiol.* **207**, 165–173 (2006).
228. Tamaoki, M. *et al.* Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury. *The American Journal of Pathology* **167**, 71–80 (2005).
229. Walker, G. A., Masters, K. S., Shah, D. N., Anseth, K. S. & Leinwand, L. A. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circulation Research* **95**, 253–260 (2004).
230. Kaden, J. J. *et al.* Tumor necrosis factor alpha promotes an osteoblast-like phenotype in human aortic valve myofibroblasts: a potential regulatory mechanism of valvular calcification. *Int. J. Mol. Med.* **16**, 869–872 (2005).
231. Serini, G. *et al.* The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J. Cell Biol.* **142**, 873–881 (1998).
232. Powell, D. W. *et al.* Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* **277**, C1–9 (1999).
233. Adler, K. B., Low, R. B., Leslie, K. O., Mitchell, J. & Evans, J. N. Contractile cells in normal and fibrotic lung. *Lab Invest* **60**, 473–485 (1989).

234. Moorman, A. F. M. & Christoffels, V. M. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiological Reviews* **83**, 1223–1267 (2003).
235. Lie-Venema, H. *et al.* Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development. *ScientificWorldJournal* **7**, 1777–1798 (2007).
236. Norris, R. A. *et al.* Neonatal and adult cardiovascular pathophysiological remodeling and repair: developmental role of periostin. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1123**, 30–40 (2008).
237. Olivey, H. E., Mundell, N. A., Austin, A. F. & Barnett, J. V. Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Dev. Dyn.* **235**, 50–59 (2006).
238. Cossu, G. & Bianco, P. Mesoangioblasts--vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 537–542 (2003).
239. de Lange, F. J. *et al.* Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves. *Circulation Research* **95**, 645–654 (2004).
240. Visconti, R. P. *et al.* An in vivo analysis of hematopoietic stem cell potential: hematopoietic origin of cardiac valve interstitial cells. *Circulation Research* **98**, 690–696 (2006).
241. Nag, A. C. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* **28**, 41–61 (1980).
242. Zak, R. Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circulation Research* **35**, suppl II:17–26 (1974).
243. Banerjee, I., Fuseler, J. W., Price, R. L., Borg, T. & Baudino, T. A. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* **293**, H1883–H1891 (2007).
244. Young, A. A., Legrice, I. J., Young, M. A. & Smaill, B. H. Extended confocal microscopy of myocardial laminae and collagen network. *J Microsc* **192**, 139–150 (1998).
245. Corda, S., Samuel, J. L. & Rappaport, L. Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Failure Reviews* **5**, 119–130 (2000).
246. Fan, D., Takawale, A., Lee, J. & Kassiri, Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis & Tissue Repair* **5**, 1–1 (2012).
247. Benjamin, M. M. & Khalil, R. A. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease. *EXS* **103**, 209–279 (2012).
248. Chow, A. K., Cena, J. & Schulz, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 189–205 (2007).
249. Alfonso-Jaume, M. A. *et al.* Cardiac ischemia-reperfusion injury induces matrix metalloproteinase-2 expression through the AP-1 components FosB and JunB. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H1838–46 (2006).
250. Ben-Yosef, Y., Lahat, N., Shapiro, S., Bitterman, H. & Miller, A. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circulation Research* **90**, 784–791 (2002).
251. Mountain, D. J. H., Singh, M., Menon, B. & Singh, K. Interleukin-1beta increases expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in cardiac microvascular endothelial cells: role of PKCalpha/beta1 and MAPKs. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **292**, C867–75 (2007).

252. Okamoto, T. *et al.* Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J. Biol. Chem.* **276**, 29596–29602 (2001).
253. Viappiani, S. & Schulz, R. Detection of specific nitrotyrosine-modified proteins as a marker of oxidative stress in cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H2167–8 (2006).
254. Sariahmetoglu, M. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity by phosphorylation. *FASEB J.* **21**, 2486–2495 (2007).
255. NAGASE, H., VISSE, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* **69**, 562–573 (2006).
256. Brew, K. & Nagase, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *BBA - Molecular Cell Research* **1803**, 55–71 (2010).
257. Vanhoutte, D. & Heymans, S. TIMPs and cardiac remodeling: ‘Embracing the MMP-independent-side of the family’. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **48**, 445–453 (2010).
258. Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* **92**, 827–839 (2003).
259. Clark, I., Swingler, T., Sampieri, C. & Edwards, D. R. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 1362–1378 (2008).
260. Baker, A. H., Edwards, D. R. & Murphy, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science* **115**, 3719–3727 (2002).
261. Nuttall, R. K. *et al.* Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Lett.* **563**, 129–134 (2004).
262. Kadri, Z. *et al.* Erythropoietin induction of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 expression and secretion is mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Cell Growth Differ.* **11**, 573–580 (2000).
263. Howard, E. W., Bullen, E. C. & Banda, M. J. Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J. Biol. Chem.* **266**, 13064–13069 (1991).
264. Okada, Y. *et al.* Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J. Biol. Chem.* **267**, 21712–21719 (1992).
265. Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H. & Thorgeirsson, U. P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* **74**, 111–122 (1997).
266. Olson, M. W. *et al.* Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. Differential rates for activation by stromelysin 1. *J. Biol. Chem.* **275**, 2661–2668 (2000).
267. Ward, R. V., Hembry, R. M., Reynolds, J. J. & Murphy, G. The purification of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 from its 72 kDa progelatinase complex. Demonstration of the biochemical similarities of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Biochem. J.* **278** (Pt 1), 179–187 (1991).
268. Howard, E. W., Bullen, E. C. & Banda, M. J. Preferential inhibition of 72- and 92-kDa



- gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J. Biol. Chem.* **266**, 13070–13075 (1991).
269. Docherty, A. J. *et al.* Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* **318**, 66–69 (1985).
270. Gasson, J. C., Bersch, N. & Golde, D. W. Characterization of purified human erythroid-potentiating activity. *Prog. Clin. Biol. Res.* **184**, 95–104 (1985).
271. Bertaux, B., Hornebeck, W., Eisen, A. Z. & Dubertret, L. Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 679–685 (1991).
272. Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. & Iwata, K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett.* **298**, 29–32 (1992).
273. Yamashita, K. *et al.* Tyrosine phosphorylation is crucial for growth signaling by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2). *FEBS Lett.* **396**, 103–107 (1996).
274. Stetler-Stevenson, W. G., Bersch, N. & Golde, D. W. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. *FEBS Lett.* **296**, 231–234 (1992).
275. Hayakawa, T., Yamashita, K., Ohuchi, E. & Shinagawa, A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Journal of Cell Science* **107 ( Pt 9)**, 2373–2379 (1994).
276. Barasch, J. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates mesenchymal growth and regulates epithelial branching during morphogenesis of the rat metanephros. *J. Clin. Invest.* **103**, 1299–1307 (1999).
277. Chesler, L., Golde, D. W., Bersch, N. & Johnson, M. D. Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Blood* **86**, 4506–4515 (1995).
278. Wang, T., Yamashita, K., Iwata, K. & Hayakawa, T. Both tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and TIMP-2 activate Ras but through different pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **296**, 201–205 (2002).
279. Jung, K.-K., Liu, X.-W., Chirco, R., Fridman, R. & Kim, H.-R. C. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J.* **25**, 3934–3942 (2006).
280. Toricelli, M., Melo, F. H., Peres, G. B., Silva, D. C. & Jasiulionis, M. G. Timp1 interacts with beta-1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3-K signaling pathway independently of Akt phosphorylation. *Mol. Cancer* **12**, 22 (2013).
281. Seo, D.-W. *et al.* TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell* **114**, 171–180 (2003).
282. Taube, M. E., Liu, X. W., Fridman, R. & Kim, H.-R. C. TIMP-1 regulation of cell cycle in human breast epithelial cells via stabilization of p27(KIP1) protein. *Oncogene* **25**, 3041–3048 (2006).
283. Seo, D.-W. *et al.* Shp-1 mediates the antiproliferative activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 3711–3721 (2006).
284. Guedez, L. & Stetler-Stevenson, W. G. In Vitro Suppression of Programmed Cell Death of B Cells by Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1. *J. Clin. Invest.* **102**, 1–9

- (1998).
285. Lambert, E. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem. J.* **372**, 767–774 (2003).
  286. Liu, X.-W., Margarida Bernado, M., Fridman, R. & Kim, H.-R. C. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Protects Human Breast Epithelial Cells Against Intrinsic Apoptotic Cell Death via the Focal Adhesion Kinase/Phosphatidylinositol 3-Kinase and MAPK Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 40364–40372 (2003).
  287. Murphy, F. R. *et al.* Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 11069–11076 (2002).
  288. Kossakowska, A. E., Urbanski, S. J. & Edwards, D. R. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* **77**, 2475–2481 (1991).
  289. Zeng, Z. S., Cohen, A. M., Zhang, Z. F., Stetler-Stevenson, W. & Guillem, J. G. Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin. Cancer Res.* **1**, 899–906 (1995).
  290. Holten-Andersen, M. N. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the postoperative monitoring of colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* **42**, 1889–1896 (2006).
  291. Nakopoulou, L. *et al.* Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *J. Pathol.* **197**, 307–313 (2002).
  292. Kopitz, C. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Research* **67**, 8615–8623 (2007).
  293. Guedez, L. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 regulation of interleukin-10 in B-cell differentiation and lymphomagenesis. *Blood* **97**, 1796–1802 (2001).
  294. Guedez, L. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) promotes plasmablastic differentiation of a Burkitt lymphoma cell line: implications in the pathogenesis of plasmacytic/plasmablastic tumors. *Blood* **105**, 1660–1668 (2005).
  295. Dassé, E. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes hematopoietic differentiation via caspase-3 upstream the MEKK1/MEK6/p38alpha pathway. *Leukemia* **21**, 595–603 (2007).
  296. Valente, P. *et al.* TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int. J. Cancer* **75**, 246–253 (1998).
  297. Johnson, J. L. *et al.* Suppression of atherosclerotic plaque progression and instability by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: involvement of macrophage migration and apoptosis. *Circulation* **113**, 2435–2444 (2006).
  298. Lim, M. S., Guedez, L., Stetler-Stevenson, W. G. & Stetler-Stevenson, M. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 induces apoptosis in human T lymphocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **878**, 522–523 (1999).
  299. Ahonen, M., Baker, A. H. & Kähäri, V. M. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Research* **58**, 2310–2315 (1998).
  300. Bian, J. *et al.* Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3. *Carcinogenesis* **17**, 1805–1811 (1996).

301. Smith, M. R., Kung, H., Durum, S. K., Colburn, N. H. & Sun, Y. TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine* **9**, 770–780 (1997).
302. Baker, A. H., George, S. J., Zaltsman, A. B., Murphy, G. & Newby, A. C. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br. J. Cancer* **79**, 1347–1355 (1999).
303. Baker, A. H., Zaltsman, A. B., George, S. J. & Newby, A. C. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J. Clin. Invest.* **101**, 1478–1487 (1998).
304. Ahonen, M. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. *Oncogene* **22**, 2121–2134 (2003).
305. Kuettner, K. E. & Pauli, B. U. Inhibition of neovascularization by a cartilage factor. *Ciba Found. Symp.* **100**, 163–173 (1983).
306. Moses, M. A., Sudhalter, J. & Langer, R. Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* **248**, 1408–1410 (1990).
307. Handsley, M. M. & Edwards, D. R. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* **115**, 849–860 (2005).
308. Feldman, A. L. *et al.* Modulation of tumor-host interactions, angiogenesis, and tumor growth by tissue inhibitor of metalloproteinase 2 via a novel mechanism. *Cancer Research* **64**, 4481–4486 (2004).
309. Fernández, C. A., Butterfield, C., Jackson, G. & Moses, M. A. Structural and functional uncoupling of the enzymatic and angiogenic inhibitory activities of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2): loop 6 is a novel angiogenesis inhibitor. *J. Biol. Chem.* **278**, 40989–40995 (2003).
310. Qi, J. H. *et al.* A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat. Med.* **9**, 407–415 (2003).
311. Kang, K.-H., Park, S.-Y., Rho, S. B. & Lee, J.-H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 interacts with angiotensin II type 2 receptor and additively inhibits angiogenesis. *Cardiovascular Research* **79**, 150–160 (2008).
312. Saunders, W. B. *et al.* Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3. *J. Cell Biol.* **175**, 179–191 (2006).
313. Zhang, P., Su, J. & Mende, U. Cross talk between cardiac myocytes and fibroblasts: from multiscale investigative approaches to mechanisms and functional consequences. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* **303**, H1385–96 (2012).
314. Jansen, J. A., van Veen, T. A. B., de Bakker, J. M. T. & van Rijen, H. V. M. Cardiac connexins and impulse propagation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **48**, 76–82 (2010).
315. Zhang, Y. *et al.* Connexin43 expression levels influence intercellular coupling and cell proliferation of native murine cardiac fibroblasts. *Cell Commun. Adhes.* **15**, 289–303 (2008).
316. Camelliti, P., Green, C. R., LeGrice, I. & Kohl, P. Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circulation Research* **94**, 828–835 (2004).
317. Li, G.-R. *et al.* Characterization of multiple ion channels in cultured human cardiac fibroblasts. *PLoS ONE* **4**, e7307 (2009).
318. Chilton, L. *et al.* K<sup>+</sup> currents regulate the resting membrane potential, proliferation,



- and contractile responses in ventricular fibroblasts and myofibroblasts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H2931–9 (2005).
319. Kohl, P. Heterogeneous cell coupling in the heart: an electrophysiological role for fibroblasts. *Circulation Research* **93**, 381–383 (2003).
  320. Vasquez, C., Benamer, N. & Morley, G. E. The cardiac fibroblast: functional and electrophysiological considerations in healthy and diseased hearts. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **57**, 380–388 (2011).
  321. Fast, V. G., Darrow, B. J., Saffitz, J. E. & Kléber, A. G. Anisotropic activation spread in heart cell monolayers assessed by high-resolution optical mapping. Role of tissue discontinuities. *Circulation Research* **79**, 115–127 (1996).
  322. Xie, Y. *et al.* Effects of fibroblast-myocyte coupling on cardiac conduction and vulnerability to reentry: A computational study. *Heart Rhythm* **6**, 1641–1649 (2009).
  323. Jacquemet, V. & Henriquez, C. S. Modelling cardiac fibroblasts: interactions with myocytes and their impact on impulse propagation. *Europace* **9 Suppl 6**, vi29–37 (2007).
  324. Greisas, A. & Zlochiver, S. Modulation of spiral-wave dynamics and spontaneous activity in a fibroblast/myocyte heterocellular tissue—a computational study. *IEEE Trans Biomed Eng* **59**, 1398–1407 (2012).
  325. Jacquemet, V. & Henriquez, C. S. Loading effect of fibroblast-myocyte coupling on resting potential, impulse propagation, and repolarization: insights from a microstructure model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **294**, H2040–52 (2008).
  326. MacCannell, K. A. *et al.* A mathematical model of electrotonic interactions between ventricular myocytes and fibroblasts. *Biophys. J.* **92**, 4121–4132 (2007).
  327. De Mazière, A. M., van Ginneken, A. C., Wilders, R., Jongsma, H. J. & Bouman, L. N. Spatial and functional relationship between myocytes and fibroblasts in the rabbit sinoatrial node. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **24**, 567–578 (1992).
  328. Camelliti, P., Devlin, G. P., Matthews, K. G., Kohl, P. & Green, C. R. Spatially and temporally distinct expression of fibroblast connexins after sheep ventricular infarction. *Cardiovascular Research* **62**, 415–425 (2004).
  329. Rook, M. B., Jongsma, H. J. & de Jonge, B. Single channel currents of homo- and heterologous gap junctions between cardiac fibroblasts and myocytes. *Pflugers Arch.* **414**, 95–98 (1989).
  330. Gaudesius, G., Miragoli, M., Thomas, S. P. & Rohr, S. Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circulation Research* **93**, 421–428 (2003).
  331. Goshima, K. Synchronized beating of and electrotonic transmission between myocardial cells mediated by heterotypic strain cells in monolayer culture. *Exp. Cell Res.* **58**, 420–426 (1969).
  332. Hyde, A. *et al.* Homo- and heterocellular junctions in cell cultures: an electrophysiological and morphological study. *Prog. Brain Res.* **31**, 283–311 (1969).
  333. Goshima, K. Formation of nexuses and electrotonic transmission between myocardial and FL cells in monolayer culture. *Exp. Cell Res.* **63**, 124–130 (1970).
  334. Zhang, Y., Kanter, E. M. & Yamada, K. A. Remodeling of cardiac fibroblasts following myocardial infarction results in increased gap junction intercellular communication. *Cardiovasc. Pathol.* **19**, e233–40 (2010).
  335. Askar, S. F. *et al.* Connexin43 silencing in myofibroblasts prevents arrhythmias in myocardial cultures: role of maximal diastolic potential. *Cardiovascular Research* **93**, 434–444 (2012).

336. McDowell, K. S., Arevalo, H. J., Maleckar, M. M. & Trayanova, N. A. Susceptibility to arrhythmia in the infarcted heart depends on myofibroblast density. *Biophys. J.* **101**, 1307–1315 (2011).
337. Gumbiner, B. M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345–357 (1996).
338. Thompson, S. A., Copeland, C. R., Reich, D. H. & Tung, L. Mechanical coupling between myofibroblasts and cardiomyocytes slows electric conduction in fibrotic cell monolayers. *Circulation* **123**, 2083–2093 (2011).
339. Li, J. *et al.* Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. *Circulation Research* **97**, 474–481 (2005).
340. Saffitz, J. E. Dependence of electrical coupling on mechanical coupling in cardiac myocytes: insights gained from cardiomyopathies caused by defects in cell-cell connections. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1047**, 336–344 (2005).
341. Gutstein, D. E., Liu, F.-Y., Meyers, M. B., Choo, A. & Fishman, G. I. The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. *Journal of Cell Science* **116**, 875–885 (2003).
342. Davis, D. M. & Sowinski, S. Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nature Publishing Group* **9**, 431–436 (2008).
343. Gerdes, H.-H. & Carvalho, R. N. Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 470–475 (2008).
344. Koyanagi, M., Brandes, R. P., Haendeler, J., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circulation Research* **96**, 1039–1041 (2005).
345. Plotnikov, E. Y. *et al.* Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 1622–1631 (2008).
346. He, K. *et al.* Long-distance intercellular connectivity between cardiomyocytes and cardiofibroblasts mediated by membrane nanotubes. *Cardiovascular Research* **92**, 39–47 (2011).
347. Dostal, D. E. & Baker, K. M. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circulation Research* **85**, 643–650 (1999).
348. Sanghi, S., Kumar, R., Smith, M., Baker, K. M. & Dostal, D. E. Activation of protein kinase A by atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiac fibroblasts: role in regulation of the local renin-angiotensin system. *Regul. Pept.* **132**, 1–8 (2005).
349. Katwa, L. C. *et al.* Cultured myofibroblasts generate angiotensin peptides de novo. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **29**, 1375–1386 (1997).
350. Lijnen, P. J., Petrov, V. V. & Fagard, R. H. Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **2**, 117–122 (2001).
351. Bouzeghrane, F. & Thibault, G. Is angiotensin II a proliferative factor of cardiac fibroblasts? *Cardiovascular Research* **53**, 304–312 (2002).
352. Campbell, S. E. & Katwa, L. C. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **29**, 1947–1958 (1997).
353. Fujisaki, H. *et al.* Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J. Clin. Invest.* **96**, 1059–1065 (1995).
354. Sano, M. *et al.* Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 29717–29723

- (2000).
355. Chintalgattu, V., Nair, D. M. & Katwa, L. C. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **35**, 277–286 (2003).
  356. Motte, S., McEntee, K. & Naeije, R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacology and Therapeutics* **110**, 386–414 (2006).
  357. Katwa, L. C., Guarda, E. & Weber, K. T. Endothelin receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Cardiovascular Research* **27**, 2125–2129 (1993).
  358. Fareh, J., Touyz, R. M., Schiffrin, E. L. & Thibault, G. Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. Receptor regulation and intracellular Ca<sup>2+</sup> modulation. *Circulation Research* **78**, 302–311 (1996).
  359. Modesti, P. A. *et al.* Characterization of endothelin-1 receptor subtypes in isolated human cardiomyocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **34**, 333–339 (1999).
  360. Porter, K. E. & Turner, N. A. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology and Therapeutics* **123**, 255–278 (2009).
  361. Harada, E. *et al.* Effect of interleukin-1 beta on cardiac hypertrophy and production of natriuretic peptides in rat cardiocyte culture. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **31**, 1997–2006 (1999).
  362. Tsuruda, T. *et al.* Brain natriuretic Peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circulation Research* **91**, 1127–1134 (2002).
  363. Makino, N., Sugano, M., Satoh, S., Oyama, J. & Maeda, T. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands attenuate brain natriuretic peptide production and affect remodeling in cardiac fibroblasts in reoxygenation after hypoxia. *Cell Biochem. Biophys.* **44**, 65–71 (2006).
  364. Bujak, M. & Frangogiannis, N. G. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovascular Research* **74**, 184–195 (2007).
  365. Leask, A. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovascular Research* **74**, 207–212 (2007).
  366. Leask, A. & Abraham, D. J. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* **18**, 816–827 (2004).
  367. Sigel, A. V., Centrella, M. & Eghbali-Webb, M. Regulation of proliferative response of cardiac fibroblasts by transforming growth factor-beta 1. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **28**, 1921–1929 (1996).
  368. Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. & Gabbiani, G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* **122**, 103–111 (1993).
  369. Butt, R. P., Laurent, G. J. & Bishop, J. E. Collagen production and replication by cardiac fibroblasts is enhanced in response to diverse classes of growth factors. *Eur. J. Cell Biol.* **68**, 330–335 (1995).
  370. Lee, A. A., Dillmann, W. H., McCulloch, A. D. & Villarreal, F. J. Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor-beta 1 in adult rat cardiac fibroblasts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **27**, 2347–2357 (1995).
  371. van Wamel, A. J. E. T., Ruwhof, C., van der Valk-Kokshoorn, L. J. M., Schrier, P. I. & van der Laarse, A. Stretch-induced paracrine hypertrophic stimuli increase TGF-beta1 expression in cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **236**, 147–153 (2002).

372. Schultz, J. E. J. *et al.* TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J. Clin. Invest.* **109**, 787–796 (2002).
373. Li, R. K. *et al.* Overexpression of transforming growth factor-beta1 and insulin-like growth factor-I in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **96**, 874–881 (1997).
374. Patel, R. *et al.* Variants of trophic factors and expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **32**, 2369–2377 (2000).
375. Gray, M. O., Long, C. S., Kalinyak, J. E., Li, H. T. & Karliner, J. S. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovascular Research* **40**, 352–363 (1998).
376. Nakajima, H. *et al.* Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-beta(1) transgene in the heart. *Circulation Research* **86**, 571–579 (2000).
377. Chen, M. M., Lam, A., Abraham, J. A., Schreiner, G. F. & Joly, A. H. CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **32**, 1805–1819 (2000).
378. Zhang, J. *et al.* Rad GTPase inhibits cardiac fibrosis through connective tissue growth factor. *Cardiovascular Research* **91**, 90–98 (2011).
379. Yoon, P. O. *et al.* The opposing effects of CCN2 and CCN5 on the development of cardiac hypertrophy and fibrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **49**, 294–303 (2010).
380. Duisters, R. F. *et al.* miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circulation Research* **104**, 170–8– 6p following 178 (2009).
381. Jimenez, S. K. *et al.* Transcriptional regulation of FGF-2 gene expression in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research* **62**, 548–557 (2004).
382. Detillieux, K. A., Meij, J. T., Kardami, E. & Cattini, P. A. alpha1-Adrenergic stimulation of FGF-2 promoter in cardiac myocytes and in adult transgenic mouse hearts. *Am J Physiol* **276**, H826–33 (1999).
383. Peifley, K. A. & Winkles, J. A. Angiotensin II and endothelin-1 increase fibroblast growth factor-2 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **242**, 202–208 (1998).
384. Endoh, M., Pulsinelli, W. A. & Wagner, J. A. Transient global ischemia induces dynamic changes in the expression of bFGF and the FGF receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **22**, 76–88 (1994).
385. Taverna, S. *et al.* Shedding of membrane vesicles mediates fibroblast growth factor-2 release from cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 51911–51919 (2003).
386. Clarke, M. S., Caldwell, R. W., Chiao, H., Miyake, K. & McNeil, P. L. Contraction-induced cell wounding and release of fibroblast growth factor in heart. *Circulation Research* **76**, 927–934 (1995).
387. Schultz, J. E. *et al.* Fibroblast growth factor-2 mediates pressure-induced hypertrophic response. *J. Clin. Invest.* **104**, 709–719 (1999).
388. Pellioux, C. *et al.* Dilated cardiomyopathy and impaired cardiac hypertrophic response to angiotensin II in mice lacking FGF-2. *J. Clin. Invest.* **108**, 1843–1851 (2001).
389. House, S. L. *et al.* Cardiac-specific overexpression of fibroblast growth factor-2 protects against myocardial dysfunction and infarction in a murine model of low-

- flow ischemia. *Circulation* **108**, 3140–3148 (2003).
390. Jiang, Z.-S. *et al.* High molecular weight FGF-2 promotes postconditioning-like cardioprotection linked to activation of the protein kinase C isoforms Akt and p70 S6 kinase. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **87**, 798–804 (2009).
391. Kardami, E. *et al.* Fibroblast growth factor-2 and cardioprotection. *Heart Failure Reviews* **12**, 267–277 (2007).
392. Ancey, C. *et al.* Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture. *Cytokine* **18**, 199–205 (2002).
393. Kakkar, R. & Lee, R. T. Intramyocardial Fibroblast Myocyte Communication. *Circulation Research* **106**, 47–57 (2010).
394. Hirota, H. *et al.* Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* **97**, 189–198 (1999).
395. Hirota, H., Yoshida, K., Kishimoto, T. & Taga, T. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 4862–4866 (1995).
396. Kamimura, D., Ishihara, K. & Hirano, T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **149**, 1–38 (2003).
397. Diaz, J. A. *et al.* Critical role for IL-6 in hypertrophy and fibrosis in chronic cardiac allograft rejection. *Am. J. Transplant.* **9**, 1773–1783 (2009).
398. Kunisada, K. *et al.* Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes. *Circulation* **98**, 346–352 (1998).
399. Wang, F. *et al.* Regulation of cardiac fibroblast cellular function by leukemia inhibitory factor. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **34**, 1309–1316 (2002).
400. Wollert, K. C. *et al.* Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* **271**, 9535–9545 (1996).
401. Schmitz, J. *et al.* IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* **23**, 479–490 (2005).
402. Sanada, S. *et al.* IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J. Clin. Invest.* **117**, 1538–1549 (2007).
403. Seki, K. *et al.* Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ Heart Fail* **2**, 684–691 (2009).
404. Torre-Amione, G. *et al.* Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Journal of the American College of Cardiology* **27**, 1201–1206 (1996).
405. Torre-Amione, G. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* **93**, 704–711 (1996).
406. Bozkurt, B. *et al.* Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* **97**, 1382–1391 (1998).
407. Turner, N. A. *et al.* Mechanism of TNFalpha-induced IL-1alpha, IL-1beta and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovascular Research* **76**, 81–90 (2007).



408. Yue, P., Massie, B. M., Simpson, P. C. & Long, C. S. Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure. *Am J Physiol* **275**, H250–8 (1998).
409. Shivakumar, K. *et al.* Paracrine effects of hypoxic fibroblast-derived factors on the MPT-ROS threshold and viability of adult rat cardiac myocytes. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* **294**, H2653–H2658 (2008).
410. Zhou, Y., Bourcy, K. & Kang, Y. J. Copper-induced regression of cardiomyocyte hypertrophy is associated with enhanced vascular endothelial growth factor receptor-1 signalling pathway. *Cardiovascular Research* **84**, 54–63 (2009).
411. Kaza, E. *et al.* Up-regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 prevents angiogenesis in hypertrophied myocardium. *Cardiovascular Research* **89**, 410–418 (2011).
412. Zentilin, L. *et al.* Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction. *FASEB J.* **24**, 1467–1478 (2010).
413. Tsoporis, J. N., Izhar, S., Proteau, G., Slaughter, G. & Parker, T. G. S100B-RAGE dependent VEGF secretion by cardiac myocytes induces myofibroblast proliferation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **52**, 464–473 (2012).
414. Accornero, F. *et al.* Placental growth factor regulates cardiac adaptation and hypertrophy through a paracrine mechanism. *Circulation Research* **109**, 272–280 (2011).
415. Chen, W. & Frangogiannis, N. G. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *BBA - Molecular Cell Research* 1–9 (2012). doi:10.1016/j.bbamcr.2012.08.023
416. Dewald, O. *et al.* Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *The American Journal of Pathology* **164**, 665–677 (2004).
417. Dobaczewski, M., Gonzalez-Quesada, C. & Frangogiannis, N. G. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **48**, 504–511 (2009).
418. Dewald, O. *et al.* CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circulation Research* **96**, 881–889 (2005).
419. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* **204**, 3037–3047 (2007).
420. Frangogiannis, N. G. *et al.* Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **30**, 2567–2576 (1998).
421. Frangogiannis, N. G. *et al.* Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* **98**, 699–710 (1998).
422. Kawaguchi, M. *et al.* Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **123**, 594–604 (2011).
423. Siwik, D. A., Pagano, P. J. & Colucci, W. S. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **280**, C53–60 (2001).
424. Lijnen, P., Papparella, I., Petrov, V., Semplicini, A. & Fagard, R. Angiotensin II-

- stimulated collagen production in cardiac fibroblasts is mediated by reactive oxygen species. *J. Hypertens.* **24**, 757–766 (2006).
425. Xie, Z., Singh, M. & Singh, K. ERK1/2 and JNKs, but not p38 kinase, are involved in reactive oxygen species-mediated induction of osteopontin gene expression by angiotensin II and interleukin-1beta in adult rat cardiac fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **198**, 399–407 (2004).
426. Barcellos-Hoff, M. H. & Dix, T. A. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol. Endocrinol.* **10**, 1077–1083 (1996).
427. Park, S. K. *et al.* Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **284**, 966–971 (2001).
428. Turner, N. A. *et al.* Interleukin-1 stimulates proinflammatory cytokine expression in human cardiac myofibroblasts. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* **297**, H1117–H1127 (2009).
429. Lafontant, P. J. *et al.* Oncostatin M differentially regulates CXC chemokines in mouse cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **291**, C18–26 (2006).
430. Li, J. *et al.* Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction. *Cardiovascular Research* **56**, 235–247 (2002).
431. Bujak, M. & Frangogiannis, N. G. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **57**, 165–176 (2009).
432. Robbins, C. S. & Swirski, F. K. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 2685–2693 (2010).
433. Dobaczewski, M., Xia, Y., Bujak, M., Gonzalez-Quesada, C. & Frangogiannis, N. G. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *The American Journal of Pathology* **176**, 2177–2187 (2010).
434. Frangogiannis, N. G. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation Research* **110**, 159–173 (2012).
435. Dobaczewski, M., Chen, W. & Frangogiannis, N. G. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling in cardiac remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **51**, 600–606 (2011).
436. Frangogiannis, N. G. *et al.* IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J. Immunol.* **165**, 2798–2808 (2000).
437. Hinz, B. *et al.* The Myofibroblast. *The American Journal of Pathology* **170**, 1807–1816 (2007).
438. Dobaczewski, M. *et al.* Smad3 Signaling Critically Regulates Fibroblast Phenotype and Function in Healing Myocardial Infarction. *Circulation Research* **107**, 418–428 (2010).
439. Knowlton, A. A. *et al.* Rapid expression of fibronectin in the rabbit heart after myocardial infarction with and without reperfusion. *J. Clin. Invest.* **89**, 1060–1068 (1992).
440. Arslan, F. *et al.* Lack of fibronectin-EDA promotes survival and prevents adverse remodeling and heart function deterioration after myocardial infarction. *Circulation Research* **108**, 582–592 (2011).
441. Naugle, J. E. *et al.* Type VI collagen induces cardiac myofibroblast differentiation: implications for postinfarction remodeling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H323–30 (2006).
442. Zhao, X.-H. *et al.* Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity

- through the Rho signaling pathway. *Journal of Cell Science* **120**, 1801–1809 (2007).
443. Murphy-Ullrich, J. E. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J. Clin. Invest.* **107**, 785–790 (2001).
444. Frangogiannis, N. G. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiological Reviews* **92**, 635–688 (2012).
445. Blankesteyn, W. M., Essers-Janssen, Y. P., Verluyten, M. J., Daemen, M. J. & Smits, J. F. A homologue of Drosophila tissue polarity gene frizzled is expressed in migrating myofibroblasts in the infarcted rat heart. *Nat. Med.* **3**, 541–544 (1997).
446. Zymek, P. *et al.* The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts. *Journal of the American College of Cardiology* **48**, 2315–2323 (2006).
447. Sun, Y. & Weber, K. T. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovascular Research* **46**, 250–256 (2000).
448. Frangogiannis, N. G., Michael, L. H. & Entman, M. L. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovascular Research* **48**, 89–100 (2000).
449. Zhao, W., Lu, L., Chen, S. S. & Sun, Y. Temporal and spatial characteristics of apoptosis in the infarcted rat heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325**, 605–611 (2004).
450. Takemura, G. *et al.* Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circulation Research* **82**, 1130–1138 (1998).
451. Hinz, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 526–537 (2007).
452. Griffin, M., Lee, H. W., Zhao, L. & Eghbali-Webb, M. Gender-related differences in proliferative response of cardiac fibroblasts to hypoxia: effects of estrogen. *Mol. Cell. Biochem.* **215**, 21–30 (2000).
453. Agocha, A., Lee, H. W. & Eghbali-Webb, M. Hypoxia regulates basal and induced DNA synthesis and collagen type I production in human cardiac fibroblasts: effects of transforming growth factor-beta1, thyroid hormone, angiotensin II and basic fibroblast growth factor. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **29**, 2233–2244 (1997).
454. Zhao, X. & Eghbali-Webb, M. Gender-related differences in basal and hypoxia-induced activation of signal transduction pathways controlling cell cycle progression and apoptosis, in cardiac fibroblasts. *Endocrine* **18**, 137–145 (2002).
455. Clancy, R. M. *et al.* Role of hypoxia and cAMP in the transdifferentiation of human fetal cardiac fibroblasts: implications for progression to scarring in autoimmune-associated congenital heart block. *Arthritis Rheum.* **56**, 4120–4131 (2007).
456. Tamamori, M., Ito, H., Hiroe, M., Marumo, F. & Hata, R. I. Stimulation of collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts by exposure to hypoxic culture conditions and suppression of the effect by natriuretic peptides. *Cell Biol. Int.* **21**, 175–180 (1997).
457. Sen, C. K., Khanna, S. & Roy, S. Perceived hyperoxia: oxygen-induced remodeling of the reoxygenated heart. *Cardiovascular Research* **71**, 280–288 (2006).
458. Roy, S. *et al.* Oxygen sensing by primary cardiac fibroblasts: a key role of p21(Waf1/Cip1/Sdi1). *Circulation Research* **92**, 264–271 (2003).
459. Roy, S. *et al.* P21waf1/cip1/sdi1 as a central regulator of inducible smooth muscle actin expression and differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4837–4846 (2007).



460. Chen, K., Li, D., Zhang, X., Hermonat, P. L. & Mehta, J. L. Anoxia-reoxygenation stimulates collagen type-I and MMP-1 expression in cardiac fibroblasts: modulation by the PPAR-gamma ligand pioglitazone. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **44**, 682–687 (2004).
461. Grobe, J. L. *et al.* ACE2 overexpression inhibits hypoxia-induced collagen production by cardiac fibroblasts. *Clin. Sci.* **113**, 357–364 (2007).
462. Zhang, X., Azhar, G., Nagano, K. & Wei, J. Y. Differential vulnerability to oxidative stress in rat cardiac myocytes versus fibroblasts. *Journal of the American College of Cardiology* **38**, 2055–2062 (2001).
463. Li, P. F., Dietz, R. & Harsdorf, von, R. Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett.* **448**, 206–210 (1999).
464. Chanyshv, B. *et al.* Conditioned medium from hypoxic cells protects cardiomyocytes against ischemia. *Mol. Cell. Biochem.* **363**, 167–178 (2012).
465. Liu, X.-W., Taube, M. E. & Jung, K.-K. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Protects Human Breast Epithelial Cells From Extrinsic Cell Death: a Potential Oncogenic Activity of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1. *Cancer Research* **65**, 898–906 (2005).
466. Haviernik, P. *et al.* Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 overexpression in M1 myeloblasts impairs IL-6-induced differentiation. *Oncogene* **23**, 9212–9219 (2004).
467. Roten, L. *et al.* Effects of gene deletion of the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-type 1 (TIMP-1) on left ventricular geometry and function in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **32**, 109–120 (2000).
468. Creemers, E. E. J. M. *et al.* Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**, H364–71 (2003).
469. Ikonomidis, J. S. *et al.* Accelerated LV remodeling after myocardial infarction in TIMP-1-deficient mice: effects of exogenous MMP inhibition. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* **288**, H149–H158 (2004).
470. Creemers, E. E. J. M., Cleutjens, J. P. M., Smits, J. F. M. & Daemen, M. J. A. P. Matrix Metalloproteinase Inhibition After Myocardial Infarction: A New Approach to Prevent Heart Failure? *Circulation Research* **89**, 201–210 (2001).
471. Di Lisa, F. & Bernardi, P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovascular Research* **70**, 191–199 (2006).
472. Elrod, J. W. *et al.* Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca(2+) exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 3680–3687 (2010).
473. Hirata, N. *et al.* Isoflurane differentially modulates mitochondrial reactive oxygen species production via forward versus reverse electron transport flow: implications for preconditioning. *Anesthesiology* **115**, 531–540 (2011).
474. Hannon, J. D. & Cody, M. J. Effects of volatile anesthetics on sarcolemmal calcium transport and sarcoplasmic reticulum calcium content in isolated myocytes. *Anesthesiology* **96**, 1457–1464 (2002).
475. Yamamura, K., Steenbergen, C. & Murphy, E. Protein kinase C and preconditioning: role of the sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H2484–90 (2005).
476. Ljubkovic, M. *et al.* Isoflurane preconditioning uncouples mitochondria and protects

- against hypoxia-reoxygenation. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **292**, C1583–90 (2007).
477. Cour, M. *et al.* Inhibition of mitochondrial permeability transition to prevent the post-cardiac arrest syndrome: a pre-clinical study. *European Heart Journal* **32**, 226–235 (2011).
478. Tsai, M.-S. *et al.* The difference in myocardial injuries and mitochondrial damages between asphyxial and ventricular fibrillation cardiac arrests. *Am J Emerg Med* **30**, 1540–1548 (2012).
479. Radhakrishnan, J. *et al.* Circulating levels of cytochrome c after resuscitation from cardiac arrest: a marker of mitochondrial injury and predictor of survival. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H767–75 (2007).