



**HAL**  
open science

# Ischémie critique chronique des membres inférieurs : implication mitochondriale chez l'Homme et mise au point d'un modèle murin permettant l'évaluation de conditionnements pharmacologiques

Anne Lejay

► **To cite this version:**

Anne Lejay. Ischémie critique chronique des membres inférieurs : implication mitochondriale chez l'Homme et mise au point d'un modèle murin permettant l'évaluation de conditionnements pharmacologiques. Hématologie. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ078 . tel-01236507

**HAL Id: tel-01236507**

**<https://theses.hal.science/tel-01236507>**

Submitted on 1 Dec 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.

**Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé**

Mitochondries, Stress Oxydant et Protection Musculaire – EA 3072

Année universitaire 2013/2014

N° attribué par la bibliothèque :

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

*Discipline* : Sciences du Vivant

*Domaine* : Physiologie et Biologie des Organismes, Populations Interactions

## **ISCHEMIE CRITIQUE CHRONIQUE DES MEMBRES INFÉRIEURS : IMPLICATION MITOCHONDRIALE CHEZ L'HOMME ET MISE AU POINT D'UN MODELE MURIN PERMETTANT L'ÉVALUATION DE CONDITIONNEMENTS PHARMACOLOGIQUES**

Présentée et soutenue publiquement par

**Anne LEJAY**

Le 17 Septembre 2014

Membres du jury :

Rapporteur Externe :	Professeur Philippe KOLH	Liège
Rapporteur Externe :	Professeur Georges LEFTHERIOTIS	Angers
Rapporteur Interne :	Professeur Bruno MOULIN	Strasbourg
Examineur Externe :	Professeur Jean-Luc MAGNE	Grenoble
Directeur de Thèse :	Professeur Bernard GENY	Strasbourg

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>4</b>
<b>ABBREVIATIONS</b>	<b>5</b>
<b>PUBLICATIONS FAISANT L'OBJET DE LA THESE</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>7</b>
<b>RAPPELS</b>	<b>10</b>
<b>1. L'ischémie critique chronique</b>	<b>11</b>
1.1 De Leriche et Fontaine à l'ischémie critique chronique	11
1.2 Définition de l'ischémie critique chronique	11
1.3 Données épidémiologiques	12
1.4 Facteurs de risque	12
1.5 Prise en charge	13
<b>2. La mitochondrie</b>	<b>14</b>
2.1 Structure des mitochondries	14
2.2 Fonctionnement de la mitochondrie	16
2.3 Régulation transcriptionnelle mitochondriale	20
<b>3. Le stress oxydant</b>	<b>22</b>
3.1 Différentes formes de radicaux libres	22
3.2 Source cellulaire de radicaux libres	23
3.3 Systèmes antioxydants	24
3.4 Dommages cellulaires	26
3.5 Mitohormesis	30
<b>4. L'ischémie-reperfusion</b>	<b>31</b>
4.1 L'ischémie	31
4.2 La reperfusion	31
4.3 Interactions mitochondries / radicaux libres de l'oxygène	33
4.4 Ischémie-reperfusion et ischémie critique chronique	34
<b>TRAVAUX DE RECHERCHE</b>	<b>37</b>
<b>1. Problématique et hypothèse</b>	<b>38</b>
<b>2. Matériels et méthode</b>	<b>38</b>
2.1 Population	39
2.2 Schémas expérimentaux	39
2.3 Protocoles de conditionnement pharmacologique	44
2.4 Paramètres étudiés	47
<b>3. Analyse statistique</b>	<b>51</b>

- 1** Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping.
- 2** Skeletal muscle mitochondrial function in peripheral arterial disease : usefulness of muscle biopsy.
- 3** Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle.
- 4** Increased lower limb ischemia-reperfusion-induced skeletal muscles injury in diabetes is associated with impaired endogenous protective kinases pathways and anabolic/catabolic balance.
- 5** First realistic model of chronic critical limb ischemia closely mimicking human pathology.
- 6** Opposite effects of statins on chronic critical limb ischemia mouse skeletal muscle : deleterious effects of primary prevention versus protective effects of secondary prevention.
- 7** Protective effects of N-acétyl-cystein post-conditioning in critical limb ischemia.
- 8** Mitochondrial dysfunction is impaired in critical limb ischemia, increased by ischemia-reperfusion, and restaured by L-arginine preconditioning.

<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>136</b>
<b>1. Physiopathologie de l'artériopathie des membres inférieurs</b>	<b>137</b>
1.1 Interactions entre stress oxydant et fonction mitochondriale	137
1.2 Implication des voies de protection RISK et SAFE	139
1.3 Apports de nos études	143
<b>2. Physiopathologie et traitement de l'ischémie critique chronique</b>	<b>145</b>
2.1 Pertinence du modèle animal	145
2.2 Pré-, et/ou post-conditionnement pharmacologique par NAC, statine ou L-Arginine	148
<b>3. Synthèse</b>	<b>156</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>157</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>159</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>179</b>

- 1.** Cryopreservation with dimethyl sulfoxide prevents accurate analysis of skinned skeletal muscle fibers mitochondrial respiration.
- 2.** Remote effects of lower limb ischemia-reperfusion : impaired lung, unchanged liver, and stimulated kidney oxidative capacities.

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## FIGURES

Figure 1 : Structure de la mitochondrie	14
Figure 2 : Cycle de Krebs	16
Figure 3 : Chaîne de transport des électrons	17
Figure 4 : Structure de l'ATP synthase	19
Figure 5 : Radicaux libres et antioxydants enzymatiques	25
Figure 6 : Production de ROS, ouverture du mPTP, et apoptose	28
Figure 7 : Voies de l'apoptose	29
Figure 8 : Ischémie-reperfusion	32
Figure 9 : Taux de calcium intracellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion	32
Figure 10 : Participation mitochondriale aux lésions d'ischémie-reperfusion	34
Figure 11 : Physiopathologie de l'AOMI	35
Figure 12 : Voie d'abord et ligature fémorale droite	40
Figure 13 : Voie d'abord et ligature iliaque droite	41
Figure 14 : Mise au point du modèle : schéma expérimental	42
Figure 15 : Réalisation des scintigraphies	43
Figure 16 : Conditionnement pharmacologique par n-acétyl-cystéine	44
Figure 17 : Conditionnement pharmacologique par statines	45
Figure 18 : Conditionnement pharmacologique par L-arginine	46
Figure 19 : Evolution de la consommation en oxygène	48
Figure 20 : Analyse de la capacité de rétention calcique	50
Figure 21 : Implication mitochondriale dans la physiopathologie de l'ICC	138
Figure 22 : La voie RISK	140
Figure 23 : La voie SAFE	142
Figure 24 : Ischémie-reperfusion et muscle squelettique – place du diabète	144
Figure 25 : Effets de la NAC	150
Figure 26 : Effets des statines au niveau cellulaire	152
Figure 27 : Mode d'action intracellulaire du conditionnement pharmacologique	156

## TABLEAUX

Tableau 1 : Vitesses de réaction de la NAC avec les ROS	148
---	-----

# ABBREVIATIONS

ANT	adenine nucleotide translocator
AOMI	artériopathie oblitérante des membres inférieurs
Cyp3A4	cytochrome P450 isozyme 3A4
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
GC	guanylate cyclase
GPX	glutathion peroxydase
GR	glutathion reductase
GSH	glutathion (forme réduite)
GSK-3 $\beta$	glycogène synthase kinase
GSSG	glutathion (forme oxydée)
ICC	ischémie critique chronique
IR	ischémie reperfusion
K <sub>m</sub>	canal K <sup>+</sup> mitochondrial
mPTP	pore de transition de perméabilité
NAC	n-acétyl cystéine
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	anion superoxyde
OH <sup>•</sup>	radical hydroxyle
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
JAK	janus kinase
PI3K	phosphatidyl-inositol-3-kinase
PKC	protéine kinase C
PKG	protéine kinase G
RISK	reperfusion injury salvage kinase
ROS	radicaux libres de l'oxygène
SAFE	survivor activating factor enhancement
SOD	superoxyde dismutase
STAT	signal transducer activator of transcription
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor alpha

## PUBLICATIONS FAISANT L'OBJET DE LA THESE

### - **Articles originaux acceptés**

- Pottecher J, Guillot M, Belaidi E, Charles AL, **Lejay A**, Gharib A, Diemunsch P, Geny B. Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg* 2013;57:1100-8.
- **Lejay A**, Meyer A, Schlagowski AI, Charles AL, Singh F, Bouitbir J, Pottecher J, Chakfé N, Zoll J, Geny B. Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;50:101-105.
- Meyer A, Charles AL, Zoll J, Guillot M, **Lejay A**, Singh F, Schlagowski AI, Isner ME, Pisteu C, Charloux A, Geny B. Cryopreservation with dimethyl sulfoxide prevents accurate analysis of skinned skeletal muscle fibers mitochondrial respiration. *Biochimie* 2014;100:227-33.
- Mansour Z, Charles AL, Kindo M, Pottecher J, Chamaraux-Tran TN, **Lejay A**, Zoll J, Mazzucotelli JP, Geny B. Remote effects of lower limb ischemia-reperfusion: Impaired lung, unchanged liver and stimulated kidney oxidative capacities. *Biomed Res Int* 2014, In press.

### - **Articles originaux soumis**

- **Lejay A**, Choquet P, Thaveau F, Singh F, Schlagowski AI, Charles AL, Laverny G, Metzger D, Zoll J, Chakfé N, Geny B. First realistic model of chronic critical limb ischemia closely mimicking human pathology. *Br J Surg* (soumis).
- Pottecher J, Laverny G, **Lejay A**, Bouitbir J, Charles AL, Thaveau F, Meyer A, Zoll J, Singer M, Diemunsch P, Metzger D, Geny B. Increased lower limb ischemia-reperfusion-induced skeletal muscles injury in diabetes is associated with impaired endogenous protective kinases pathways and anabolic/catabolic balance. *Eur Heart J* (en cours de soumission).

### - **Communications orales :**

- **Lejay A**, Thaveau F, Choquet P, Zoll J, Charles AL, Chakfé N, Geny B. Mise au point d'un modèle murin d'ischémie critique chronique des membres inférieurs. *Société de Chirurgie Vasculaire*. Paris 2012.
- **Lejay A**, Thaveau F, Charles AL, Zoll J, Chakfé N, Geny B. Statines et ischémie critique chronique. *Société de Chirurgie Vasculaire*, Bordeaux 2014.
- **Lejay A**, Thaveau F, Charles AL, Zoll J, Chakfé N, Geny B. Effects of preconditionning and postconditionning statin treatment on skeletal muscle in a murine model of critical limb ischemia. *European Society of Vascular Surgery*, Stockholm 2014.

### - **Chapitre de livre :**

- **Lejay A**, Charles AL, Zoll J, Bouitbir J, Thaveau F, Piquard F, Geny B. Skeletal muscle mitochondrial function in peripheral arterial disease : usefulness of muscle biopsy. *Muscle biopsy*. Editions Saunders 2011.

# **INTRODUCTION**

Qu'elle concerne le myocarde, le cerveau ou le muscle squelettique, **l'ischémie** compromet à très court terme la survie cellulaire, mais également la survie de l'organe et celle de l'organisme. Il est donc primordial de prévenir la survenue de l'ischémie, et lorsque celle-ci survient, de la corriger de la façon la plus rapide et la plus efficace possible. Néanmoins, la **reperfusion**, c'est à dire la restitution d'un flux sanguin dans l'organe ischémique, bien qu'étant vitale pour la survie de l'organe et de l'individu, va dans un premier temps aggraver les lésions ischémiques avec une majoration de la nécrose et de l'apoptose cellulaire et une augmentation de l'inflammation locale induisant une atteinte fonctionnelle de l'organe reperfusé et des organes à distance. Ainsi, les conséquences de l'ischémie sont à considérer en association avec les conséquences de la reperfusion, dans le cadre commun du **syndrome d'ischémie-reperfusion** (Gillani 2012).

Le **muscle strié squelettique**, qui correspond à 40% de la masse corporelle et est impliqué dans quasiment toutes les fonctions de l'organisme, subit de graves lésions d'ischémie-reperfusion au cours de la progression de **l'artériopathie**, notamment lors de l'ischémie critique chronique des membres inférieurs qui correspond à un stade très avancé d'insuffisance artérielle chronique. Les masses musculaires sont ainsi soumises à un stress d'ischémie-reperfusion permanent (Pipinos 2008). Après avoir précisé les lésions musculaires observées lors **d'ischémies de courte durée**, il nous a semblé pertinent d'explorer l'atteinte de la respiration mitochondriale myocytaire chez des patients souffrant **d'ischémie critique chronique des membres inférieurs** et d'analyser les mécanismes impliqués à l'aide d'un modèle animal que nous avons mis au point.

Le **traitement** de l'ischémie critique chronique repose sur la revascularisation chirurgicale, lorsque celle-ci est possible. Toutefois, le pronostic de l'ischémie critique chronique des membres inférieurs est extrêmement sombre, et la moitié des patients ne pourra pas bénéficier d'un traitement chirurgical, l'artériopathie étant trop avancée pour pouvoir réaliser un geste de revascularisation (Norgren 2007). Ceci explique l'intérêt de développer des alternatives médicamenteuses à la chirurgie, ayant pour but de limiter les lésions d'ischémie-reperfusion, réduisant ainsi la dysfonction mitochondriale et la production de radicaux libres.

Nos voies de recherche permettant de protéger le muscle squelettique des lésions d'ischémie-reperfusion sont centrées sur des molécules **diminuant la production de radicaux libres**. Ainsi, la n-acétyl-cystéine ou les statines semblent être des candidats adéquats (Samuni 2013, Szarszoi 2008). La L-Arginine devrait aussi avoir un effet protecteur en **modulant les voies de signalisation protectrices musculaires endogènes** (RISK en particulier).

Toutefois, il n'existe à l'heure actuelle pas de modèle murin d'ischémie critique chronique des membres inférieurs regroupant les 3 critères nécessaires au diagnostic. En effet, le diagnostic d'ischémie critique chronique des membres inférieurs ne peut être posé que si les 3 éléments suivants sont réunis : présence de signes cliniques (douleurs de décubitus ou

troubles trophiques), mesures hémodynamiques confirmant le degré d'ischémie, et durée des symptômes supérieure à 15 jours (Norgren 2007).

De même, les données en pathologie humaine sont très rares alors que la revascularisation chirurgicale des patients en ischémie critique chronique, nécessitant un clampage artériel en amont et en aval de la zone à ponter, engendre *de facto* une situation d'ischémie-reperfusion supplémentaire à celle déjà générée par l'ischémie critique chronique.

Enfin, beaucoup reste à découvrir sur les voies pharmacologiques susceptibles de lutter contre les effets délétères de l'ischémie-reperfusion dans cette situation.

Dans ce contexte, nos **objectifs** étaient les suivants :

1 / Réaliser une mise au point des mécanismes impliqués dans l'ischémie-reperfusion, étudiant en particulier l'interaction mitochondrie-stress oxydant.

2 / Analyser l'atteinte mitochondriale musculaire de patients présentant une ischémie critique chronique des membres inférieurs, diabétiques ou non, avant et après pontage fémoro-poplité.

3 / Mettre au point un modèle murin d'ischémie critique chronique des membres inférieurs

4 / Déterminer sur ce modèle les effets de trois conditionnements pharmacologiques :

a / le conditionnement par n-acétyl-cystéine

b / le conditionnement par statines

c / le conditionnement par L-arginine

en nous intéressant particulièrement au stress oxydant et voies de signalisation RISK et SAFE, peu connus lors de l'ischémie-reperfusion musculaire squelettique.

Après avoir mis en place des notions importantes pour la compréhension de notre problématique de recherche (Rappels sur l'ischémie critique des membres inférieurs, la mitochondrie, le stress oxydant, et les mécanismes d'ischémie-reperfusion), nous présenterons nos travaux de recherche et ouvrirons une discussion générale dont la conclusion nous amènera à évoquer nos perspectives.

# **RAPPELS**

# 1. L'ISCHEMIE CRITIQUE CHRONIQUE

Le terme d'ischémie critique chronique (ICC) des membres inférieurs définit un stade très avancé d'insuffisance artérielle. Le pronostic du membre, mais également le pronostic vital du patient sont en jeu. La prise en charge de l'ICC est complexe et lourde, ce qui explique que le diagnostic doit être précis.

## 1.1 De Leriche et Fontaine à l'ischémie critique chronique

La classification de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) selon Leriche et Fontaine date de 1954 (*Fontaine 1954*). Cette classification divisait l'AOMI en 4 stades différents: le stade 1 était caractérisé par l'abolition asymptomatique d'un pouls, le stade 2 correspondait à la claudication intermittente, le stade 3 aux douleurs de décubitus, et le stade 4 aux troubles trophiques. Par la suite, le développement des techniques d'explorations fonctionnelles vasculaires a conduit les soignants à s'interroger sur l'hétérogénéité des stades 3 et 4. En effet, devant des situations cliniques identiques (douleurs de décubitus ou troubles trophiques), les écarts entre les mesures hémodynamiques (pression de perfusion, analyse de la microcirculation du pied) pouvaient être très importants, correspondant ainsi à des cas de sévérité et de pronostic très différents (*Müller-Bühl 1999*). En effet, l'existence de signes d'AOMI ne suffit pas à cataloguer telle douleur de décubitus comme stade 3 ou tel trouble trophique comme stade 4. L'imputabilité des symptômes à l'AOMI et donc à l'insuffisance artérielle par la quantification du degré d'ischémie du pied est souvent négligée. Ainsi, le concept d'ICC est apparu, dans le souci de mieux décrire et codifier les cas d'insuffisance artérielle, de façon à mieux juger et comparer les divers traitements proposés (*Dormandy 2000, Norgren 2007*).

## 1.2 Définition de l'ischémie critique chronique

Le diagnostic d'ICC doit associer 3 données : les signes cliniques (douleurs de décubitus ou troubles trophiques), une quantification objective du degré d'ischémie, et une durée des symptômes supérieure à 15 jours (*Becker 2007, Norgren 2007*).

### 1.2.1 Douleurs de décubitus, troubles trophiques

Les douleurs de décubitus de l'insuffisance artérielle intéressent d'abord l'avant-pied, ainsi que les orteils. Au début, il s'agit de douleurs de décubitus qui s'estompent en mettant le talon hors du lit, puis le patient est obligé de laisser pendre la jambe hors du lit pour trouver le sommeil. Finalement le patient est obligé de passer la nuit assis au fauteuil, et à ce stade un œdème du pied et de la cheville s'installe.

Les troubles trophiques correspondent aux ulcérations et gangrènes directement secondaires à l'insuffisance artérielle. Ils siègent au niveau des orteils, ou des malléoles. Ils sont généralement douloureux, et peuvent être humides ou secs.

### 1.2.2 Quantification hémodynamique

Les mesures de pressions distales (à la cheville et au gros orteil) sont obligatoires à la confirmation du diagnostic. Pour les patients présentant des douleurs de décubitus, le diagnostic d'ICC peut être évoqué si la pression à la cheville est inférieure à 50 mm Hg, ou si

la pression à l'orteil est inférieure à 30 mm Hg. Pour les patients présentant des troubles trophiques, le diagnostic d'ICC peut être évoqué si la pression à la cheville est inférieure à 70 mm Hg, ou si la pression à l'orteil est inférieure à 50 mm Hg.

### 1.2.3 Durée des symptômes

Il est spécifié que le terme d'ICC implique la chronicité et qu'il ne s'applique pas à l'ischémie aiguë de membre. Le diagnostic d'ICC n'est donc posé qu'en présence de signes cliniques validés hémodynamiquement, existant depuis au moins 15 jours.

## 1.3 Données épidémiologiques

L'épidémiologie de l'ICC n'est pas connue avec précision, mais on estime qu'environ 3% des patients porteurs d'une AOMI se présentent d'emblée en ICC, et que 10% des patients porteurs d'une AOMI au stade de claudication intermittente évolueront vers une ICC. L'incidence de l'ICC en Europe se situe entre 500 et 1000 par million d'habitants et par an (*Dormandy 2000, Norgren 2007, Jensen 2006*). Le traitement initial de l'ICC correspond à une amputation majeure d'emblée dans 25% des cas, une revascularisation chirurgicale dans 50% des cas, un traitement médical en l'absence de possibilité de revascularisation dans 25% des cas. A un an de la prise en charge initiale, 25% des patients sont décédés, 30% sont vivants avec une amputation majeure, 20% sont toujours en ICC, et seulement 25% ont passé favorablement le cas de l'ischémie critique. L'ICC génère de ce fait 100 à 300 amputés majeurs par million d'habitants et par an (*Rajagopalan 2002*).

Ainsi, si pour le patient porteur d'une AOMI au stade de claudication intermittente le risque cardiovasculaire systémique est largement dominant par rapport au risque local d'amputation majeure, pour le patient porteur d'une AOMI au stade d'ICC le risque de décès cardiovasculaire et le risque d'amputation majeure à court terme augmentent de façon dramatique (respectivement d'un facteur 10 et d'un facteur 50) avec un risque d'amputation majeure qui prend le pas sur le risque cardiovasculaire (*Muluk 2001, Norgren 2007*). Un tel pronostic implique donc que le diagnostic d'ICC soit précis.

## 1.4 Facteurs de risque

Les facteurs de risque d'athérosclérose chez le patient en ICC sont les mêmes que ceux de tout patient ayant une artériopathie athéroscléreuse ; les plus importants, en dehors de l'âge, étant le tabagisme et le diabète (*Bismuth 2001, Diehm 2006, Murabito 2002*). Ils se distinguent toutefois par le fait qu'ils sont plus souvent associés et mal contrôlés, voire totalement négligés avant la survenue d'une ICC et même après (*Murabito 2002*).

Le diabète offre la plus forte corrélation avec la prévalence de l'ICC (*Faglia 2006, Jensen 2006*). Il multiplie par 4 à 5 le risque d'ICC et par 10 le risque d'amputation majeure, il abaisse l'âge de survenue d'une ICC. Diabète et tabac conjuguent et potentialisent leurs effets vasculaires délétères pour faire du diabétique-tabagique le patient le plus à risque d'ICC et d'amputation (*Jensen 2006*). Le patient diabétique est le plus propice à concentrer les

facteurs propices à la survenue d'une ICC : macroangiopathie distale réduisant le lit d'aval poplitéo-jambier, microangiopathie altérant l'hyperhémie réactionnelle et la perméabilité capillaire, neuropathie diminuant la sensibilité cutanée favorisant ainsi la survenue de lésions cutanées (Faglia 2006).

## 1.5 Prise en charge

Dès le diagnostic d'ICC suspecté, il faut le confirmer rapidement par mesures hémodynamiques. Le diagnostic confirmé, il faut alors étudier en imagerie vasculaire la possibilité d'une reconstruction artérielle pour accroître la pression de perfusion distale, tout en optimisant la prise en charge médicale.

Au terme de l'évaluation clinique et de l'évaluation en exploration fonctionnelle vasculaire, 3 situations peuvent se présenter :

- L'examen clinique, la quantification du degré d'ischémie et l'imagerie vasculaire s'accordent à définir une option de revascularisation avec de bonnes chances de succès, elle est proposée et réalisée après préparation optimale du patient.
- Cliniquement le pronostic local apparaît extrêmement réservé (extension importante des troubles trophiques), la quantification hémodynamique confirme le caractère sévère du degré d'ischémie, et l'imagerie vasculaire ne montre pas d'option raisonnable de revascularisation : une amputation de première intention est proposée.
- En imagerie vasculaire il existe une option de revascularisation, mais le pronostic local est sombre et l'exploration hémodynamique met en évidence un degré sévère d'ischémie : l'option de revascularisation est en général tentée après avoir informé le patient des réserves.

Les options de revascularisation se discutent actuellement en chirurgie endovasculaire et en chirurgie conventionnelle. A l'heure actuelle la chirurgie endovasculaire prend une place de plus en plus importante, car les limites de ce type de chirurgie se repoussent de jour en jour et permettent notamment de traiter des lésions plus longues, plus complexes, et d'étendre le champ d'action aux artères de jambes, voire du pied. Quel que soit le mode de reconstruction artérielle choisi, lorsque la revascularisation est possible, il est impératif que le patient soit suivi régulièrement avec prise en charge optimale de ses facteurs de risque et surveillance du membre opéré.

### *En résumé,*

*Le diagnostic d'ICC est lourd de conséquences pour le patient (haut risque d'amputation majeure à court et moyen terme, haut risque de complications et de décès cardiovasculaire). Le diagnostic doit être précis, et est posé si les 3 conditions suivantes sont réunies : présence de douleurs de décubitus ou de troubles trophiques, degré d'ischémie quantifié par mesures hémodynamiques, et évolution des symptômes depuis 15 jours minimum. La prise en charge de ces patients est lourde, l'évaluation de l'arbre artériel doit être précise, de façon à proposer une option de revascularisation (chirurgie endovasculaire ou chirurgie conventionnelle) lorsque celle-ci est possible. L'absence de possibilité de revascularisation ne signifie pas obligatoirement amputation, il existe une place pour les traitements médicaux, même si le pronostic de l'ICC non revascularisable reste extrêmement sombre.*

## 2. LA MITOCHONDRIE

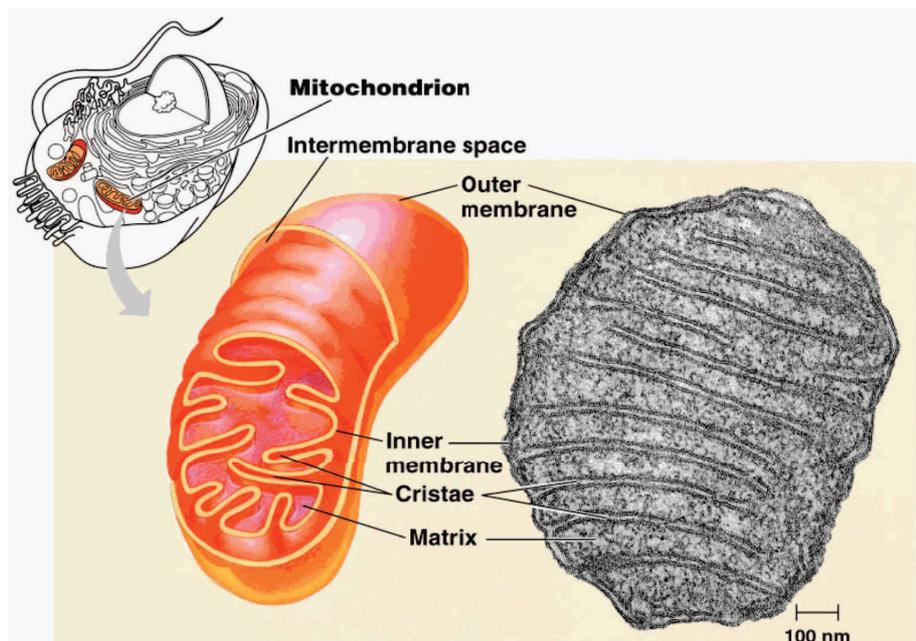
La mitochondrie est un organite riche en composants biochimiques dont le rôle majeur est la production d'énergie (*Wiesner 1992, Halestrap 2009, Taylor 1992*). En plus d'assurer l'approvisionnement cellulaire en énergie, les mitochondries ont d'autres rôles vitaux pour le bon fonctionnement de la cellule. Elles participent à l'homéostasie calcique, à la régulation du pH intracellulaire, à la synthèse d'hormones stéroïdes, ainsi qu'à la régulation de la thermogénèse. De plus, elles constituent un des principaux sites de production des radicaux libres jouant un rôle clé dans plusieurs voies de signalisation intracellulaire.

Les mitochondries occupent environ 30 à 40% du volume de la cellule cardiaque. Les muscles squelettiques ont par contre un contenu variable en mitochondries. Elles peuvent occuper 1% du volume cellulaire dans les muscles glycolytiques, et jusqu'à 6 à 30% du volume cellulaire dans les muscles oxydatifs.

Les rappels suivants sont issus du travail de l'équipe d'accueil 3072 « Mitochondries, stress oxydant et protection musculaire ».

### 2.1 Structure des mitochondries

La mitochondrie est un organite hautement spécialisé dans la transformation d'énergie, elle est de forme longitudinale, et contient deux membranes : la membrane externe et la membrane interne, délimitant un espace inter-membranaire et une matrice. Les replis caractéristiques de la membrane interne sont appelés crêtes mitochondriales (Figure 1).



**Figure 1 : Structure d'une mitochondrie.**

Source : Lejay A, et al. *Muscle biopsy 2011* (ed Saunders).

### **2.1.1 La membrane externe**

C'est une membrane rigide dans laquelle un nombre important de protéines sont enchâssées. Ces protéines permettent les échanges entre le cytosol et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie en formant des pores qui autorisent d'une part la translocation de protéines, et permettent d'autre part les échanges de métabolites de petits poids moléculaires via des porines. La porine, également appelée voltage dépendant anion channel, est la principale voie par laquelle transitent les métabolites régulant la respiration mitochondriale.

### **2.1.2 L'espace inter-membranaire**

L'espace inter-membranaire se situe entre les deux membranes et contient des protéines qui jouent un rôle majeur dans l'énergétique mitochondriale et la mort cellulaire (*Duchen 2004, Ventura-Clapier 2004*).

### **2.1.3 La membrane interne**

La membrane interne présente une perméabilité réduite et sélective, elle forme la barrière la plus distincte entre le cytosol et la matrice mitochondriale. Cette perméabilité sélective permet de maintenir un gradient de concentration pour les protéines, les ions et les métabolites.

Des transporteurs permettent les échanges entre les compartiments et participent au bon fonctionnement de la mitochondrie. Ces transporteurs sont représentés par les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'Adénine Nucleotide Translocator (ANT), et par les protéines découplantes :

- Les complexes de la chaîne respiratoire sont ancrés dans la membrane interne. Ils assurent le maintien du gradient de protons et la formation d'ATP.
- L'ANT est constitué de deux sous-unités de 32 kDa et d'un site unique de liaison à l'ATP ou l'ADP. Selon sa conformation, l'ANT fait face, alternativement, à la matrice ou à l'espace inter-membranaire. L'ATP mitochondriale est échangée par l'ADP cytosolique dans un rapport 1:1. L'ANT est exprimé par trois isoformes : ANT1, ANT2 et ANT3. Chez l'Homme, l'ANT1 est l'isoforme exprimée de manière prédominante dans le muscle cardiaque et squelettique, l'ANT2 est ubiquitaire, exprimée dans tous les tissus en quantité variable en fonction de l'activité respiratoire du tissu. L'ANT3 a un faible niveau d'expression dans le cerveau, le foie, le rein, le cœur et les muscles squelettiques.
- Les protéines découplantes sont enchâssées dans la membrane interne et permettent le passage de protons de la matrice à l'espace inter-membranaire. Ce phénomène de fuite induit un couplage incomplet entre les phosphorylations et les oxydations, appelé respiration mitochondriale découplée. Une partie de l'énergie est ainsi perdue sous forme de chaleur. Concernant le rôle physiologique de ce découplage, il se pourrait que cette fuite des protons permette de diminuer la production des radicaux libres par une augmentation de l'oxydation de l'ubiquinone, et donc minimise le stress oxydant et les dégâts inhérents au niveau de l'ADN. Les protéines découplantes joueraient donc un rôle de protection contre le stress oxydant (*Echtay 2002*).

### 2.1.4 La matrice mitochondriale

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

## 2.2 Fonctionnement de la mitochondrie

Les voies de dégradation des lipides et des hydrates de carbone se rejoignent au niveau de la mitochondrie avec l'acétyl CoA qui est métabolisé au cours du cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs (Figure 2). A la fin du cycle, une molécule d'acétyl CoA fournira 2 molécules de  $\text{CO}_2$ , 3 molécules de NADH, 1 molécule de  $\text{FADH}_2$  et une molécule d'ATP. Les transporteurs d'hydrogène et d'électrons NADH et  $\text{FADH}_2$ , réagissent ensuite avec les enzymes de la chaîne respiratoire pour réduire l'oxygène en eau et synthétiser de l'ATP : c'est la phosphorylation oxydative, le processus majeur de fourniture d'énergie pour les fibres des muscles squelettiques et cardiaque.

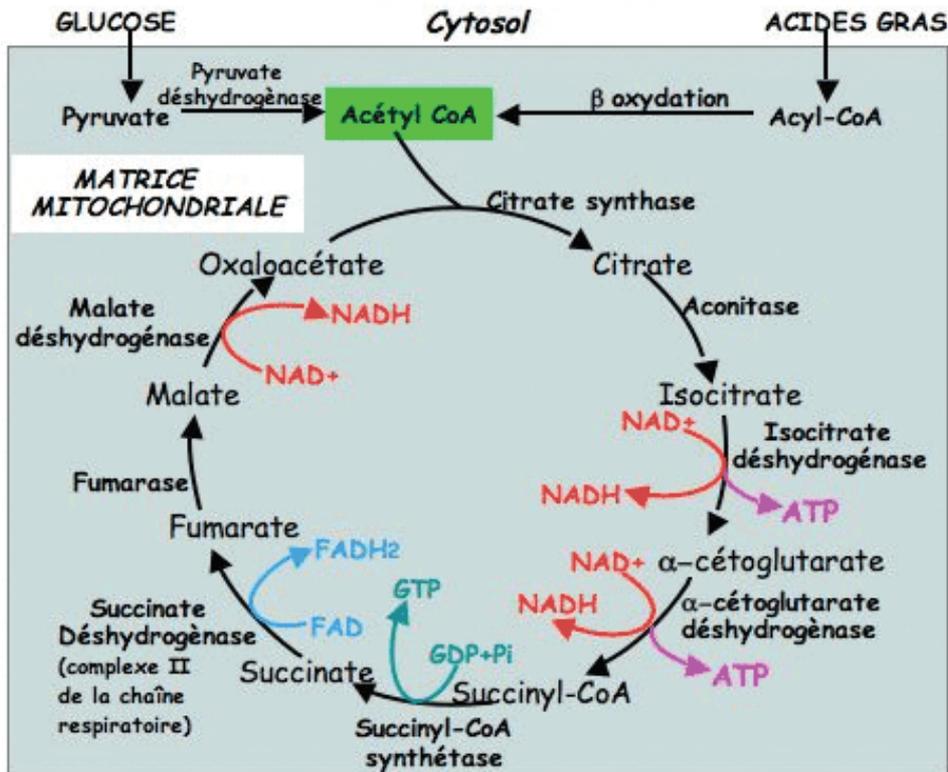


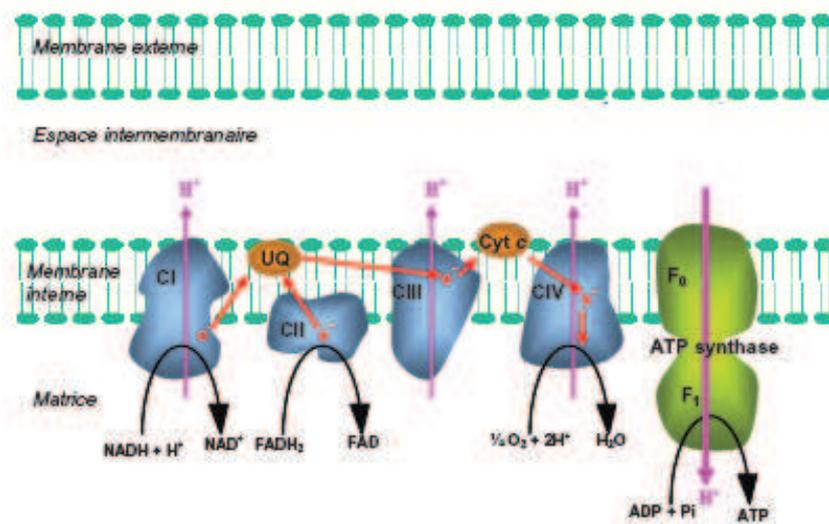
Figure 2 : Le Cycle de Krebs.

Source : Stock D, et al. Science 1999.

La chaîne de transport des électrons, encore appelée chaîne respiratoire mitochondriale est composée de 5 complexes :

- le complexe I ou NADH déshydrogénase
- le complexe II ou Succinate déshydrogénase
- le complexe III ou Ubiquinol-cytochrome c réductase
- le complexe IV ou Cytochrome c oxydase
- le complexe V ou ATP synthase.

Les électrons sont ainsi transportés par le NADH et le  $\text{FADH}_2$ , respectivement aux complexes I et II qui transfèrent les électrons à l'ubisemiquinone, cette dernière les acheminant au complexe III. L'arrivée des électrons au complexe IV constitue la fin de la chaîne d'oxydoréduction et entraîne la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Les réactions associées au passage d'un l'électron au niveau des complexes I, III et IV entraînent le passage d'un proton vers l'espace inter-membranaire à travers les complexes. Ce passage établit un gradient électrochimique de protons qui crée une force proton-motrice utilisée par le complexe V pour phosphoryler des molécules d'ADP en ATP, assurant le couplage de la chaîne des oxydoréductions avec la production d'ATP (*Stock 1999*).



**Figure 3 : Chaîne de transport des électrons.**

*Source : Stock D, et al. Science 1999.*

### **2.2.1 Complexe I : NADH déshydrogénase**

C'est la première enzyme de la chaîne respiratoire. Elle catalyse le transfert de 2 électrons du NADH à l'ubiquinone (ou coenzyme Q10), ce transfert étant couplé à la translocation de 4 protons au travers de la membrane, ce qui participe à la force proton-motrice. Cette enzyme est constituée d'environ 45 sous-unités, dont 38 sont codées par le génome nucléaire, tandis que 7 autres sont codées par le génome mitochondrial. Avec son poids moléculaire de 980 kDa environ, elle constitue l'un des plus gros complexes protéiques membranaires. Le domaine hydrophile de ce complexe contient le site de liaison du NADH, la flavine mononucléotide qui est le premier accepteur d'électrons, et neuf centres Fer/Soufre constituant le centre catalytique de l'enzyme. Le système de pompage des protons est quant à lui localisé dans la partie membranaire du complexe (*Sazanov 2007, Kao 2003*).

### **2.2.2 Complexe II : Succinate déshydrogénase**

Le complexe II joue un rôle important au niveau mitochondrial puisqu'il fait à la fois partie de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs. Il est composé de quatre sous-unités (A à D). Les sous-unités A et B constituent le domaine hydrophile de l'enzyme dépassant dans la matrice tandis que les sous-unités C et D constituent le domaine d'ancrage du complexe dans la membrane interne mitochondriale. Les quatre gènes codant pour ces quatre sous-unités font partie du génome nucléaire. Ce complexe qui oxyde le succinate en fumarate peut cependant, dans certaines conditions, fonctionner dans le sens inverse. De plus, dans certains tissus tels que le rein, la quantité de complexes II est particulièrement élevée par rapport à certaines autres enzymes matricielles (comme la citrate synthase). Dans ce cas, la succinate déshydrogénase délivre aux ubiquinones une quantité d'électrons supérieure à ce que le cytochrome c peut transporter, ce qui favorise une suroxydation des ubiquinones. Ce phénomène peut entraîner un flux réverse d'électrons au travers du complexe I, entraînant une réduction plus importante de ce complexe, ce qui favorise la production de radicaux libres (*Bourgeron 1995*).

### **2.2.3 Complexe III : Ubiquinol-cytochrome c réductase**

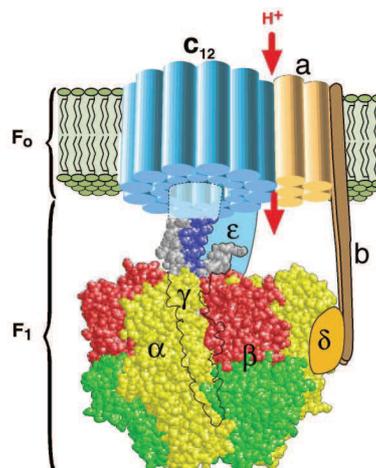
Il contient 4 groupes prosthétiques redox actifs : 2 cytochromes b (bL et bH), le cytochrome c1 et un centre Fer/Soufre. Ce complexe est composé de 11 sous-unités protéiques parmi lesquelles les sous-unités III, IV et V constituent les groupes redox, les 8 autres sous-unités ne comportant pas de groupement prosthétique. La majorité de ces sous-unités est codée par le génome nucléaire, seule la sous-unité comprenant les cytochromes b est codée par le génome mitochondrial. Cette enzyme catalyse le transfert de 2 électrons de l'ubiquinol au cytochrome c. Cette étape est associée au transfert de 4 protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire. Ainsi, des électrons dérivant de l'oxydation de l'ubiquinol sont recyclés par le site ubiquinol réductase de cette enzyme ce qui permet le pompage des protons (*Borisov 2002*).

### 2.2.4 Complexe IV : Cytochrome c oxydase

Il appartient à la superfamille des oxydases à hème-cuivre. Son isoforme humaine est composée de 13 sous-unités dont 3 (Cox I, Cox II et Cox III) sont codées par le génome mitochondrial. Les électrons cédés par le cytochrome c entrent dans ce complexe protéique par le centre cuivre CuA puis sont transférés successivement à l'hème puis au site actif binucléaire où s'effectue la liaison de l'oxygène et sa réduction en eau. Durant cette étape, 4 protons sont consommés et 4 autres sont transloqués de la matrice vers l'espace inter-membranaire (*Borisov 2002*).

### 2.2.5 Complexe V : ATP synthase

Elle est composée de 2 sous-complexes (Figure 4). La partie  $F_0$  est insérée dans la membrane interne mitochondriale et conduit les protons depuis l'espace inter-membranaire vers la matrice. Cette partie, chez les mammifères, est composée de 5 sous-unités (A6, b, c, d et Oligomycin Sensitivity Conferral Protein). Le segment  $F_1$  est matriciel, au contact de la membrane interne et utilise le gradient de protons pour convertir l'ADP en ATP et vice versa. Il est composé de 5 sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  dans un ratio 3, 3, 1, 1, 1). Des protéines accessoires (e, f, g et F6) sont également associées à ce complexe. Le fonctionnement de ce dernier repose sur les sous-unités c (au nombre de 10) de la partie  $F_0$  qui, connectées à la sous-unité  $\gamma$  de  $F_1$ , agissent comme un rotor qui utilise le passage des protons à travers le stator (sous-unités A6, b, d et OSCP) pour fonctionner. La sous-unité  $\gamma$  cause, quant à elle, un changement conformationnel dans le trimère circulaire de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la partie  $F_1$  et permet ainsi successivement la liaison de l'ADP puis la réaction avec le phosphate inorganique pour générer l'ATP et enfin le relargage de l'ATP (*Wang 1998*).



**Figure 4 : Structure de l'ATP synthase.**

*Source : Wang H, et al. Nature 1998.*

## 2.3 Régulation transcriptionnelle mitochondriale

La mitochondrie possède son propre génome, mais celui-ci ne code que pour une partie des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les autres protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire. Cette double origine des protéines mitochondriales nécessite une régulation fine et coordonnée de leur expression. Par conséquent, il existe des facteurs régulateurs clés codés par le génome nucléaire qui vont permettre d'une part la transcription du génome mitochondrial et d'autre part l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales. Ces facteurs régulateurs sont représentés par le peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1  $\alpha$  et  $\beta$ , les nuclear respiratory factors, et le facteur de transcription mitochondriale A.

### 2.3.1 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1

Le peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator  $\alpha$  (PGC1- $\alpha$ ) est considéré comme un des cofacteurs centraux de la régulation de la biogenèse mitochondriale (*Wu 1999*). La compréhension de la fonction de PGC1- $\alpha$  dans la biogenèse mitochondriale a été améliorée par l'utilisation de modèles animaux présentant un gain ou une perte de fonction de ce facteur. Ainsi, des souris déficientes pour PGC1- $\alpha$  présentent une diminution du nombre de mitochondries et une diminution des capacités oxydatives dans les muscles lents (*Leone 2005*). A l'inverse, la surexpression de PGC1- $\alpha$  résulte en une conversion des fibres rapides du muscle squelettique en fibres lentes (*Lin 2002*).

Le peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator  $\beta$  (PGC1- $\beta$ ) est un co-activateur transcriptionnel présentant une forte homologie de structure avec celle de PGC1- $\alpha$ . Le PGC1- $\beta$  coactive en partie les mêmes facteurs de transcription que le PGC1- $\alpha$  pour induire l'expression de gènes cibles communs tels que les gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial (*Kressler 2002*).

### 2.3.2 Nuclear respiratory factors

Les nuclear respiratory factors (NRFs) sont représentés par le NRF1 et le NRF2. Ce sont des éléments majeurs des processus de biogenèse mitochondriale. Ils régulent en aval la réplication et la transcription mitochondriale permettant ainsi une expression coordonnée des gènes nucléaires et mitochondriaux afin d'assurer un fonctionnement mitochondrial correct (*Scarpulla 2008*).

### 2.3.3 Facteur de transcription mitochondriale A

Le facteur de transcription mitochondriale A (TFAm) assure un rôle de facteur de transcription, mais est également indispensable au maintien et à la réplication du génome mitochondrial. Ainsi, les facteurs NRF1, NRF2 et le TDAm sont requis pour la réplication de l'ADN mitochondrial (*Fischer 1988, Ekstrand 2004, Scarpulla 2008*).

*En résumé,*

*La production d'énergie aérobie dans le muscle est dépendante de la capacité à produire de l'ATP lors du processus de phosphorylation oxydative qui se déroule à l'intérieur de la mitochondrie. Au cours de la phosphorylation oxydative, des électrons sont transférés de molécules réductrices vers des oxydants tels que l'oxygène au cours de réactions d'oxydoréduction. Ce sont ces réactions redox qui libèrent de l'énergie, utilisée pour former des molécules d'ATP. Ces réactions sont réalisées par une série de complexes protéiques situés dans la membrane interne des mitochondries, formant la chaîne respiratoire. L'énergie libérée par la circulation des électrons le long de la chaîne respiratoire sert à pomper des protons à travers la membrane mitochondriale et générer un gradient électrochimique et un gradient de pH à travers cette membrane. Les protons, en s'accumulant, accroissent la pression chimiosmotique par rapport à celle qui règne à l'intérieur de la mitochondrie. En retournant à l'intérieur de la mitochondries, ils passent à travers le canal ionique de l'ATP synthase, enzyme complexe qui utilise l'énergie chimiosmotique de ces protons pour permettre la phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP.*

*La biogenèse mitochondriale est régulée par de nombreux co-activateurs, tels que les PGC1 $\alpha$  et  $\beta$ , les NRFs, et le TFAM. Ces co-facteurs sont au centre d'un système complexe de régulation du métabolisme énergétique, en régulant l'expression de gènes liés à de nombreuses fonctions métaboliques impliquées dans la réponse aux besoins énergétiques cellulaires.*

### 3. LE STRESS OXYDANT

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

Les radicaux libres de l'oxygène (ROS) produits par les cellules ont été traditionnellement considérés comme des produits toxiques du métabolisme. Le stress oxydant intracellulaire peut être défini comme un déséquilibre de la balance entre la production des ROS d'un côté et son élimination de l'autre. La capacité à éliminer les ROS est appelée capacité antioxydante de la cellule, et permet d'empêcher les lésions oxydatives.

#### 3.1 Différentes formes de radicaux libres

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

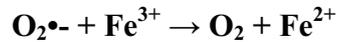
L'O<sub>2</sub> est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitales externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en anion superoxyde : O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, puis en peroxyde d'hydrogène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

L'appellation ROS inclut les radicaux libres dérivés de l'oxygène : anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

L'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. La dismutation de cet O<sub>2</sub><sup>•-</sup> entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production. Selon la réaction de Fenton, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe<sup>2+</sup>), en un ion OH<sup>-</sup> et un radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) :



Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) qui régénère le  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  selon la réaction d'Haber-Weiss :



Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), d'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et de fer permet la production de radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ). L' $OH^{\bullet}$ , avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L' $OH^{\bullet}$  apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS.

## 3.2 Source cellulaire de radicaux libres

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

### 3.2.1 La xanthine oxydase

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' $O_2^{\bullet-}$  (*McKelvey 1988*).

### 3.2.2 La NADPH oxydase

La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (*Babior 1999*). En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d' $O_2^{\bullet-}$  au niveau des vaisseaux. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (*Krause 2004*).

### 3.2.3 Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (*Turrens 2003*). La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS (*Morel 1999*). Il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum.

### 3.2.4 Les peroxysomes

Les peroxysomes sont une importante source de production d' $H_2O_2$  cellulaire (Boveris 1972). Toutefois, l' $H_2O_2$  est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d' $H_2O_2$  produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase.

### 3.2.5 La mitochondrie

La principale source de ROS est la mitochondrie et plus précisément au niveau de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires (Balaban 2005).

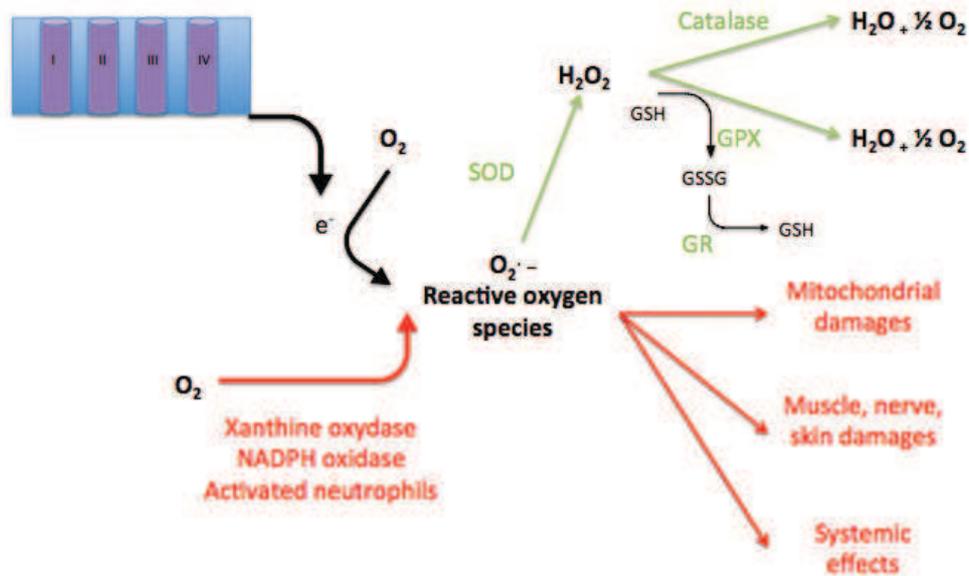
La chaîne respiratoire est une source permanente de ROS, et près de 3% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie est incomplètement réduit et produit des ROS (Boveris 1973). Mais ces estimations sont réalisées à partir de mesure *in vitro* sur des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentration saturante en substrats. Il est vraisemblable que la production mitochondriale de ROS *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,4 à 0,8%) (Hansford 1997). Il existe deux sites de production de ROS : les complexes I et III.

## 3.3 Systèmes antioxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (Mates 1999).

### 3.2.1 Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense contre les ROS. Ces antioxydants enzymatiques sont représentés par la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase, et la catalase (Figure 5).



**Figure 5 : Radicaux libres et antioxydants enzymatiques.**

Source : Lejay A, et al. *Muscle biopsy 2011* (ed Saunders).

La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$ . La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD ou SOD1), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD ou SOD2) et une forme extracellulaire (EC-SOD ou SOD3). Il a été montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter-membranaire. La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouve dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries.

La glutathion peroxydase (GPX) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ . Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG). Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (Mates 1999).

La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPX maintienne sa fonction. La GPX et la GR sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries.

La catalase est également responsable de l'élimination d' $H_2O_2$  par une transformation en  $H_2O$  et  $O_2$ . Contrairement à la GPX, l'affinité de la catalase pour l' $H_2O_2$  est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues (Mates 1999). Cette

enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol.

### 3.2.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart des systèmes antioxydants non enzymatiques ne sont pas synthétisés par l'organisme et sont apportés par l'alimentation : il s'agit des oligoéléments, du glutathion réduit (GSH), de l'ubiquinone, du cytochrome c et des vitamines E et C.

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

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPX). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (*Mates 1999*).

Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant. L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxy. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (*Podda 1996*).

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

Les vitamines E ( $\alpha$ -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être des plus importantes dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique. La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l' $O_2^{\bullet-}$  et l' $OH^{\bullet}$ . Elle peut aussi réduire le radical  $\alpha$ -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (*Podda 1996*).

## 3.4 Dommages cellulaires

Les dommages induits par le stress oxydant correspondent à la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines, et des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité de la cellule, voire à l'apoptose, en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (mPTP).

### 3.4.1 Peroxydation lipidique

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation. L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines (*Marnett 1999*).

### 3.4.2 Oxydation des protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Ces réactions d'oxydation peuvent être classées en deux catégories : celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique d'une part, et celles qui modifient les peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique d'autre part. Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures : perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases (*Stadtman 2002*).

### 3.4.3 Dommages de l'ADN

Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, les mitochondries sont ainsi les premières cibles des ROS. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire.

Plusieurs éléments peuvent expliquer cette situation :

- l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial
- la localisation de l'ADN mitochondrial proche de la membrane interne
- des mécanismes de réparation frustrés
- une structure circulaire sans intron, ce qui augmente le risque de mutations pathogènes.

L'idée d'un « cercle vicieux » est avancée pour expliquer les altérations mitochondriales dans certaines pathologies : des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire pourraient augmenter la production de ROS et induire ainsi une augmentation progressive des mutations du génome mitochondrial et des protéines synthétisées. Comme le génome mitochondrial code pour quelques sous-unités de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (7 sous-unités du complexe I, 1 du complexe III, 3 du complexe IV et 2 de l'ATP synthase), leur défaut d'expression pourrait exacerber la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire au profit de la production de ROS. Ainsi, plus la fuite d'électrons est importante, plus la formation de ROS provoquant de nombreuses mutations mitochondriales aggraverait ce phénomène (*Beckman 1998*).

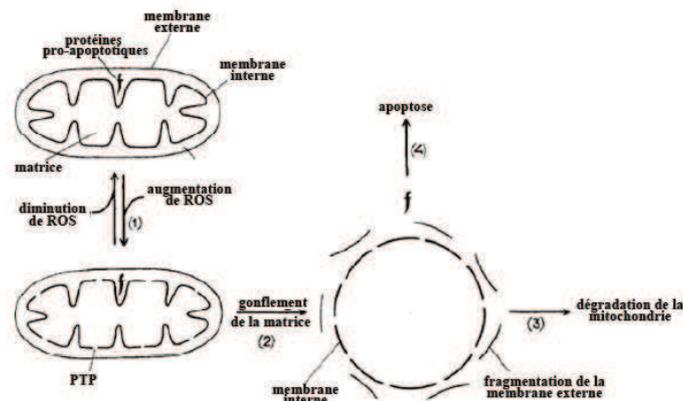
### 3.4.4 Apoptose par ouverture du pore de transition de perméabilité

Les fonctions de la mitochondrie sont donc particulièrement exposées aux dommages oxydatifs provoquant principalement une diminution de la synthèse d'ATP mais engageant

également la cellule dans un programme de mort cellulaire par apoptose avec l'induction de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP).

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

L'ouverture du mPTP est très finement régulée. Le calcium matriciel apparaît comme étant son inducteur le plus puissant, nécessaire et suffisant (*Bernardi 1999*). Les ROS agissent également directement sur l'ouverture du mPTP (Figure 6).



**Figure 6 : Production de ROS, ouverture du mPTP et apoptose.**

Source : *Skulachev VP. FEBS Letters 1996.*

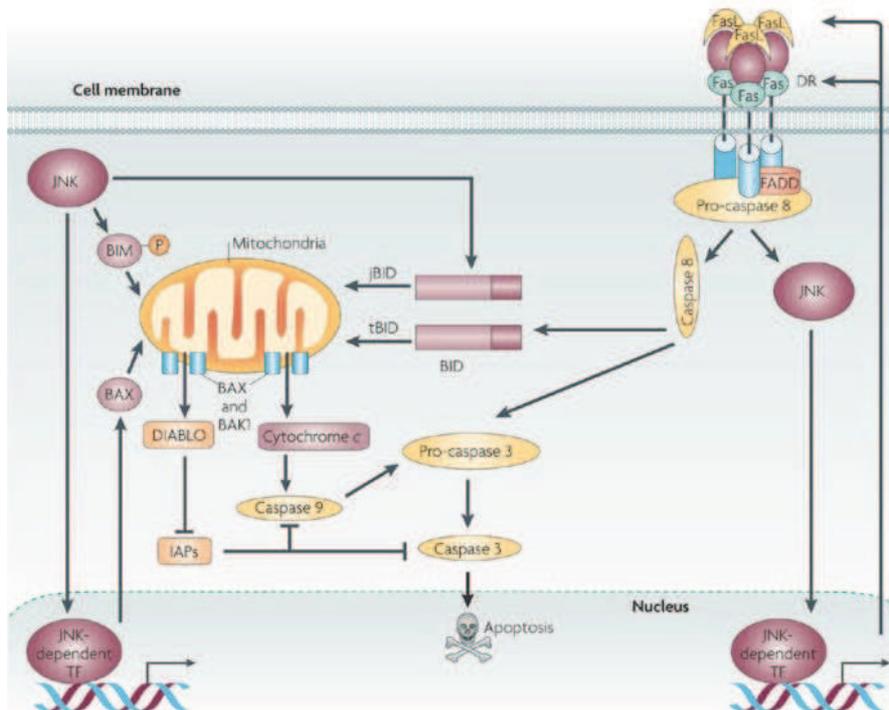
On distingue 2 grandes voies de signalisation aboutissant à la mort cellulaire :

- une voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs membranaires appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF
- une voie dite intrinsèque, mettant particulièrement en jeu la mitochondrie, impliquant des protéines appartenant à la superfamille de Bcl-2.

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

La voie extrinsèque fait intervenir des récepteurs membranaires, notamment le récepteur Fas. La signalisation par Fas recrute un complexe composé d'une molécule adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) et de la procaspase-8. La formation de ce

complexe entraîne le clivage de la caspase-8 qui est alors produite sous sa forme dimérique active, puis la cascade d'activation séquentielle des différentes caspases parmi lesquelles la caspase-3. Ces différentes protéases effectuent le clivage de plusieurs molécules, parmi lesquelles des protéines de structure et des protéines impliquées dans les systèmes de réparation cellulaire. Il existe 2 voies de transduction du signal de la voie Fas, dépendant du type cellulaire. Dans les cellules de type 1 comme les thymocytes, la caspase 8 active directement la caspase 3. Dans les cellules de type 2 comme les hépatocytes, la caspase 8 active Bid, provoquant la libération du cytochrome c, ce qui provoque alors l'activation de la caspase 3 (Figure 7).



**Figure 7 : Voies de l'apoptose.**

*Source : Clarke P, et al. Nature Reviews Microbiology 2009.*

L'activation intrinsèque de l'apoptose conduit à l'insertion de protéines pro-apoptotiques telles que Bcl-2 associated X protein (BAX) et Bcl-2 antagonist killer (BAK1) dans la membrane des mitochondries où elles s'oligomérisent. Ces complexes multimériques provoquent la rupture des membranes mitochondriales et l'ouverture du mPTP. La conséquence est d'une part la perte du gradient électrochimique entre la membrane interne et la matrice, et la libération de protéines pro-apoptotiques dans le cytoplasme d'autre part. Ces protéines pro-apoptotiques libérées sont l'AIF (Apoptosis-Inducing Factor), Smac/DIABLO (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase, Direct Inhibitor of Apoptosis protein Binding protein with Low pI) et le cytochrome c. Le cytochrome c ainsi libéré dans le cytoplasme clive et active la caspase 9.

### 3.5 Mitohormesis

L'hormesis est défini comme l'activation des propriétés cellulaires protectrices et réparatrices induites par un stress physiologique modéré. Depuis quelques décennies, il était admis que l'augmentation des radicaux libres était le principal responsable du processus du vieillissement et de la diminution de la durée de vie des organismes. Durant ces années, un certain nombre d'études se sont efforcées de diminuer le stress oxydant à l'aide de molécules antioxydantes. Cependant, les résultats de ces études furent surprenants. En effet, elles ont démontré que les molécules antioxydantes avaient peu ou pas d'effets mais surtout que les ROS étaient essentiels à l'activation de voies de signalisation aboutissant à une augmentation de la durée de vie des organismes. Ces différentes études ont permis de mettre à jour un nouveau concept nommé « mitohormesis ». Ainsi, la génération de ROS mitochondriaux peut activer la biogenèse mitochondriale et la défense contre ces radicaux libres (Ristow 2014, Barbieri 2014).

*En résumé,*

*Le stress oxydant peut être défini comme un déséquilibre de la balance entre la production des ROS d'un côté et son élimination de l'autre. La production de ROS est normale pour tous les organismes vivant en aérobie, et ne constitue pas en soi une situation de stress oxydant. En effet, la cellule dispose d'un système complexe de détoxification contre les ROS comprenant des enzymes (SOD, GPX, GR, catalase), ainsi que d'autres molécules non enzymatiques apportées par l'alimentation (oligoéléments, vitamines, cytochromes). Les dommages induits par le stress oxydant correspondent à la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines, des mutations de l'ADN, voire l'apoptose. Toutefois, le stress oxydant peut avoir un effet bénéfique, en activant la biogenèse mitochondriale, c'est le mitohormesis.*

## 4. L'ISCHEMIE-REPERFUSION

L'ischémie musculaire squelettique va provoquer des lésions locales irréversibles dont l'importance dépend du temps écoulé avant la reperfusion. La reperfusion, effectuée avant d'atteindre les lésions irréversibles, va limiter les lésions irréversibles du territoire de l'ischémie, mais va elle-même provoquer des lésions supplémentaires.

### 4.1 L'ischémie

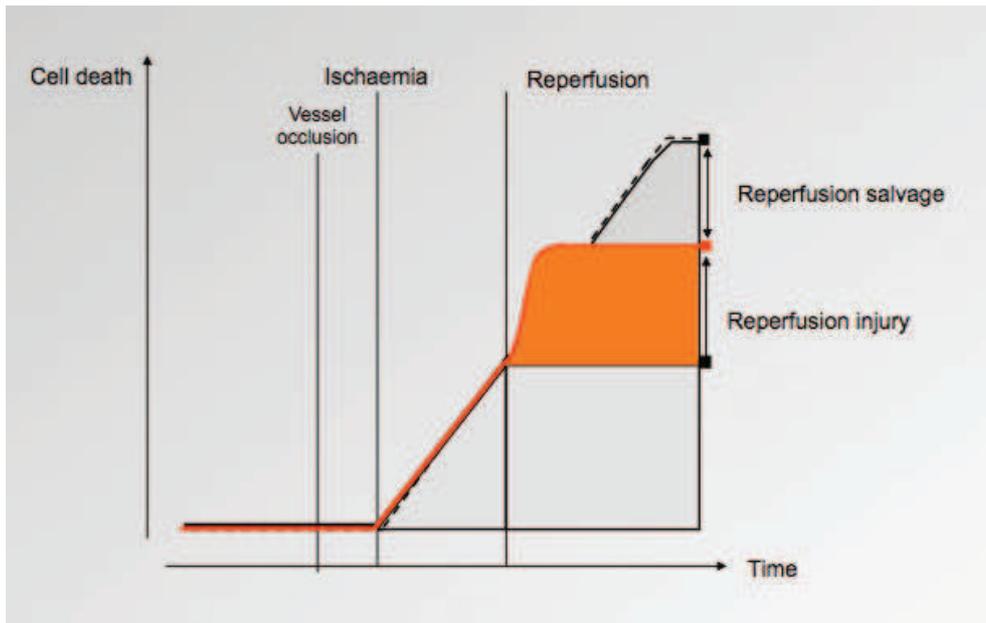
L'ischémie musculaire squelettique est la conséquence de l'interruption de la circulation sanguine au niveau du territoire concerné, ce qui prive les différents tissus de l'apport en oxygène et en éléments nutritifs. Ceci va entraîner la consommation des réserves d'oxygène, et donc le passage à un métabolisme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

Au cours de la phase précoce de l'ischémie, l'ATP est généré par la glycolyse (*Khalil 2006*). Il s'en suit une déplétion des réserves en glycogène, un métabolisme en anaérobie, et une acidose lactique locale. Un œdème cellulaire se crée. En effet, la cellule va essayer de corriger l'acidose à travers l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et le cytoplasme va être saturé en ions  $\text{Na}^+$ , provoquant un appel osmotique. L'œdème cellulaire est aggravé par la dysfonction de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (ATP-dépendant) par manque d'ATP (*Cour 2011*). Par la suite, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  s'active dans son mode inverse pour épurer les ions  $\text{Na}^+$  du cytosol, provoquant l'entrée d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . L'ischémie prolongée va ainsi aboutir à une accumulation accrue des ions  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau du cytosol, provoquant l'activation de médiateurs chimiques et enzymatiques, incluant la phospholipase A2 et les lysozymes. La phospholipase A2 va métaboliser les phospholipides membranaires en acide arachidonique, un précurseur des médiateurs de l'inflammation, tandis que les lysozymes vont digérer les cellules nécrotiques.

L'ischémie provoque la production de ROS dans le cytoplasme, même si la quantité de ROS produite reste habituellement dans les limites des défenses antioxydantes cellulaires. L'ischémie va ainsi initier la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase. L'ischémie provoque également une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (*Thaveau 2007*).

### 4.2 La reperfusion

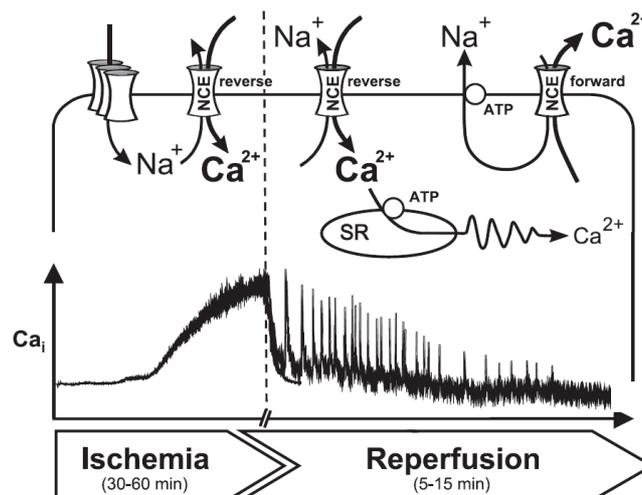
Les lésions provoquées par l'ischémie sont proportionnelles à la durée de l'ischémie. Il a donc été proposé de limiter les effets délétères de l'ischémie en assurant une reperfusion la plus précoce possible. Toutefois, la reperfusion elle-même s'accompagne d'une majoration des lésions cellulaires. En effet, la réoxygénation va certes interrompre les lésions induites par l'ischémie, mais elle va provoquer une série de lésions propres, dites lésions de reperfusion (Figure 8).



**Figure 8 : Ischémie-reperfusion.**

*Source : Thibault et al, Heart Fail Rev 2007.*

Plus précisément, au cours des premières minutes de reperfusion, la correction rapide de l'acidose par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  va provoquer une activation inverse de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et donc augmenter le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (Cour 2011). Par la suite, le  $\text{Na}^+$  va être épuré par des canaux  $\text{Na}^+$  utilisant l'ATP de nouveau disponible. A ce moment là, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  va refonctionner selon son mode normal pour épurer le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique vers le milieu extracellulaire (Figure 9).



**Figure 9 : Taux de calcium intracellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion.**

*Source : Piper et al, Cardiovascular Research 2004.*

L'ischémie ainsi que les premières minutes de reperfusion vont provoquer une accumulation du calcium cytosolique. Au cas où la reperfusion a lieu à un stade où les lésions restent réversibles, la sortie du sodium (par disponibilité de l'ATP) va entraîner la sortie du calcium jusqu'à normalisation du taux cytosolique.

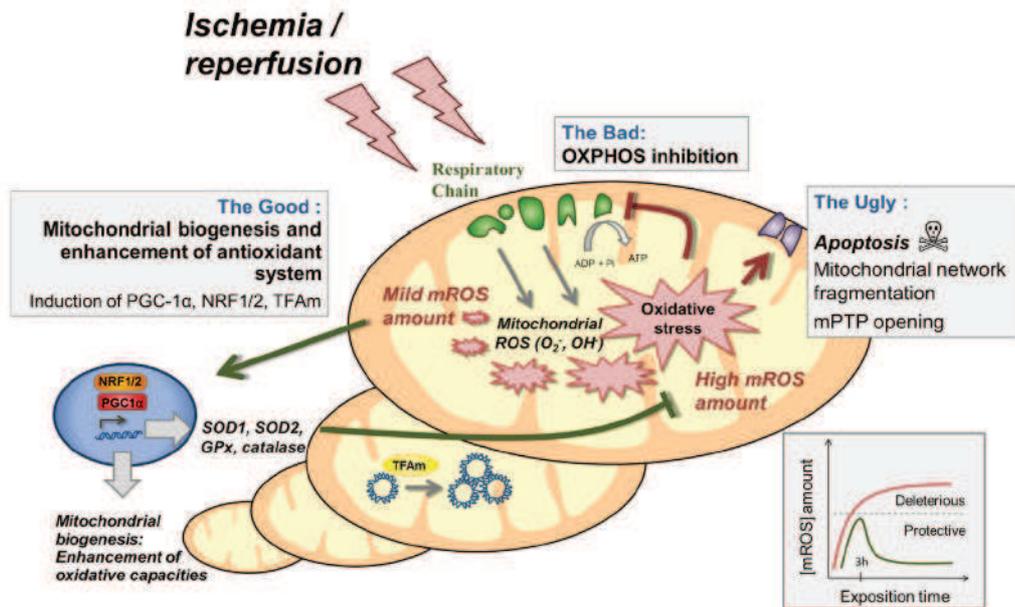
Lors de la reperfusion, la chaîne respiratoire mitochondriale du muscle squelettique est atteinte, et il existe également une production massive de ROS (*Charles 2011, Norwood 2004*). Lors de la reperfusion, la xanthine oxidase produite pendant l'ischémie va catalyser la formation d'acide urique à partir de l'hypoxanthine, accompagnée de la formation de grandes quantités de ROS. Les ROS ainsi produits vont dépasser les défenses antioxydantes cellulaires, entraînant la peroxydation des acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire et des lésions tissulaires locales. La peroxydation des lipides est accompagnée de l'activation du complément, la libération d'acide arachidonique et la synthèse accrue des molécules d'adhésion endothéliale.

Tous ces éléments vont provoquer un changement brusque de la perméabilité de la membrane mitochondriale, dû à l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale. Ceci entraîne la libération des facteurs pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire mitochondrial vers le cytosol par rupture de la membrane mitochondriale externe, et donc l'apoptose.

### **4.3 Interactions mitochondries / radicaux libres de l'oxygène : « the Good, the Bad, and the Ugly »**

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération de ROS et les défenses anti-oxydantes de l'organisme.

Le rôle des ROS est très complexe car les ROS peuvent avoir un rôle physiologique voire protecteur, ou alors un rôle délétère, en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, les ROS sont générés en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables notamment de réguler le phénomène de biogenèse mitochondriale ou d'activer les systèmes anti-oxydants. Formés en trop grande quantité, les ROS deviennent pathologiques, en activant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires. En outre, leur nature instable les rend très réactifs et donc capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apoptose (Figure 10).



**Figure 10 : Participation mitochondriale aux lésions d'ischémie-reperfusion.**

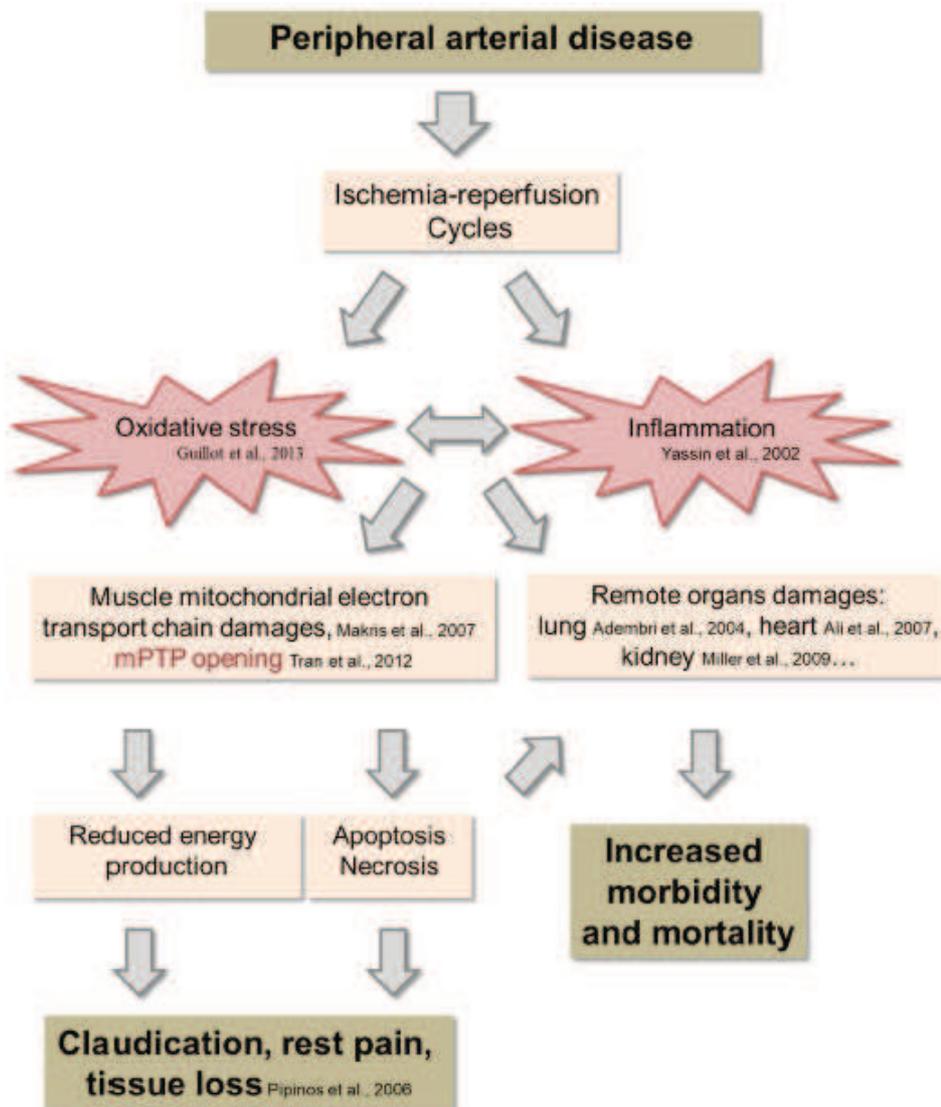
Source : Lejay A, et al. *Int J Biochem Cell Biol* 2014.

#### 4.4 Ischémie-reperfusion et ischémie critique chronique

L'AOMI correspond à des cycles répétés d'ischémie-reperfusion au niveau du muscle squelettique. En effet, les sténoses ou occlusions artérielles liées à l'artériopathie correspondent à des situations d'ischémie, notamment lorsque le patient réalise un effort. L'apport sanguin ne correspond alors plus aux besoins du muscle squelettique. Par la suite, en situation de repos, il existe une reperfusion relative du muscle squelettique. Ces cycles d'ischémie-reperfusion répétés vont être délétères pour le muscle, en provoquant la production de ROS et une réponse inflammatoire systémique.

Ainsi, il existe une atteinte locale, mitochondriale, par altération de la chaîne respiratoire et ouverture du mPTP, mais également une atteinte systémique. En effet, la réponse inflammatoire systémique résulte de l'activation des médiateurs inflammatoires, largement représentés par les cytokines (interleukines 1, 6, 8, 10 et TNF $\alpha$ ) et par les leucocytes (Klausner 1988). Ces leucocytes, activés au niveau du site de l'ischémie-reperfusion, vont d'abord provoquer une réaction inflammatoire locale, puis être transportés par le flux sanguin de la reperfusion vers la circulation systémique. Ils vont alors être partiellement séquestrés au niveau des poumons, et au niveau des reins, générant ainsi des lésions à distance (Adembri 2004, Yassin 2002, Mansour 2014).

Les lésions mitochondriales provoquant une diminution de la production d'énergie, mais également l'apoptose et la nécrose des tissus amplifient ainsi les symptômes de l'AOMI, notamment les douleurs de décubitus ou les troubles trophiques liés à l'ICC (Figure 11).



**Figure 11 : Physiopathologie de l'AOMI.**

Source : Lejay A, et al. *Int J Biochem Cell Biol* 2014.

*En résumé,*

*L'ischémie du muscle squelettique, correspondant à l'interruption de l'apport sanguin au niveau du territoire musculaire concerné, va provoquer des lésions locales dont l'importance dépend du temps écoulé avant la reperfusion. La reperfusion correspond à la restauration du flux sanguin, mais va elle même provoquer, initialement, des lésions supplémentaires. Elle sera néanmoins bénéfique à long terme si elle est réalisée assez précocement.*

*Les lésions d'ischémie-reperfusion sont liées à des mécanismes cellulaires complexes, notamment au niveau mitochondrial, avec atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale et production de ROS.*

*L'ischémie-reperfusion provoque également des lésions à distance par le biais d'une réaction inflammatoire systémique médiée par les cytokines inflammatoires et les leucocytes activés, les poumons et les reins étant les sites privilégiés de ces lésions.*

# **TRAVAUX DE RECHERCHE**

# 1. PROBLEMATIQUE ET HYPOTHESE

L'ischémie critique chronique définit un stade avancé d'insuffisance artérielle chronique, et il existe une part importante de patients ne pouvant bénéficier d'un traitement curatif chirurgical, l'atteinte étant trop évoluée pour pouvoir réaliser un geste de revascularisation. Dans ce contexte, il est licite d'étudier des voies pharmacologiques permettant de protéger le muscle squelettique de l'ICC. Par ailleurs, les patients pouvant bénéficier d'un geste de revascularisation sont soumis à des lésions d'ischémie-reperfusion supplémentaires à celles de l'ICC, car le geste de revascularisation nécessite un clampage temporaire de l'axe d'amont et de l'axe d'aval, de façon à réaliser le geste chirurgical. Il n'existe cependant pas de modèle d'ICC murin décrit permettant de reproduire exactement les éléments observés chez l'homme.

Notre **objectif** était donc triple : étudier l'atteinte mitochondriale chez les patients souffrant d'ICC notamment chez les patients diabétiques, avant et après revascularisation ; mettre au point un modèle murin d'ICC ; et étudier les effets de plusieurs conditionnements pharmacologiques, à savoir la n-acétyl-cystéine, les statines et la L-arginine.

Notre **hypothèse** est que le conditionnement pharmacologique peut avoir un effet bénéfique sur le muscle squelettique en ICC, d'une part en réduisant le stress oxydant et/ou d'autre part en activant des voies de signalisation intracellulaires protectrices. Ainsi, la NAC devrait protéger le muscle squelettique. De la même façon, l'effet délétère des statines a déjà été mis en évidence au niveau du muscle squelettique, mais paradoxalement l'administration de statines dans l'ICC est recommandée, de façon à réduire le risque cardio-vasculaire des patients. Notre hypothèse est que l'administration de statines une fois l'ICC installée peut être protectrice et non délétère par deux mécanismes: en activant d'une part des voies de signalisation intracellulaires, et en augmentant les défenses anti-oxydantes du muscle par les épisodes d'ischémie-reperfusion répétés liés à l'ICC. En réalisant un protocole d'IR sur ICC, nous voulions correspondre aux situations cliniques de gestes de revascularisation réalisés pour ICC, notre hypothèse étant que l'IR majore les lésions d'ICC, et que la L-arginine pouvait avoir un effet protecteur en stimulant la voie du NO (*Articles 5 à 8*).

Avant de nous lancer sur cette piste, nous avons en collaboration avec l'équipe, étudié plus avant les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'ischémie-reperfusion aiguë et certaines limites méthodologiques (cryopréservation) (*Articles 1 à 4*).

## 2. MATERIELS ET METHODE

Les analyses à partir de biopsies musculaires humaines ont été réalisées chez des patients ayant au préalable donné leur consentement écrit dans le cadre d'un protocole de recherche clinique (PHRC 3262 des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg). Ces expérimentations ont été réalisées après l'accord du comité d'éthique et enregistrées sur le site [clinical.trials.org](http://clinical.trials.org) (NCT02117206).

Les expérimentations animales ont été réalisées selon les recommandations en recherche animale en vigueur, et après obtention des autorisations du comité d'éthique en recherche animale de l'Université de Strasbourg (CREMEAS N° AL/70/77/02/13).

## **2.1 Population**

### **2.1.1 Patients**

Vingt et un patients ont participé à ce travail. Seize patients présentaient une ICC des membres inférieurs, nécessitant un geste de revascularisation, et cinq patients étaient des patients dits « contrôle », car ne présentant pas d'AOMI. Pour les 16 patients en ICC, la biopsie de muscle gastrocnémien a été réalisée au décours de l'intervention chirurgicale, à savoir avant et après la réalisation d'un pontage fémoro-poplité sous-articulaire. Parmi ces 16 patients, 6 étaient diabétiques, les 10 autres ne présentaient pas de diabète. Pour les 5 patients contrôle, la biopsie du muscle gastrocnémien a été réalisée à l'occasion du prélèvement de veine saphène au décours d'un pontage aorto-coronarien.

L'étude de la respiration mitochondriale a été réalisée immédiatement après prélèvement des biopsies musculaires, que ce soit pour les patients en ICC (diabétiques ou non) ou pour les patients ne présentant pas d'AOMI.

### **2.1.2 Animaux : souris et rats**

Au total, 80 souris Swiss mâles (28-32 grammes), et 30 souris Black 6 (28-32 grammes) ont été incluses. Sur l'ensemble de ces animaux, 30 souris ont été nécessaires à l'établissement du modèle animal, 20 à l'étude du conditionnement pharmacologique par NAC, et 30 à l'étude du conditionnement pharmacologique par statines. Les 30 souris Black-6 ont été utilisées pour l'étude du conditionnement pharmacologique par L-arginine dans le cadre de l'IR sur ICC.

Au total, 54 rats Wistar (250-300 grammes) ont été inclus. Sur l'ensemble de ces animaux, 18 rats ont été nécessaires à l'étude de l'ischémie-reperfusion aiguë sur le muscle squelettique après clampage aortique, et 36 rats ont été utilisés pour l'étude des lésions d'ischémie-reperfusion aiguë dans le cadre du diabète.

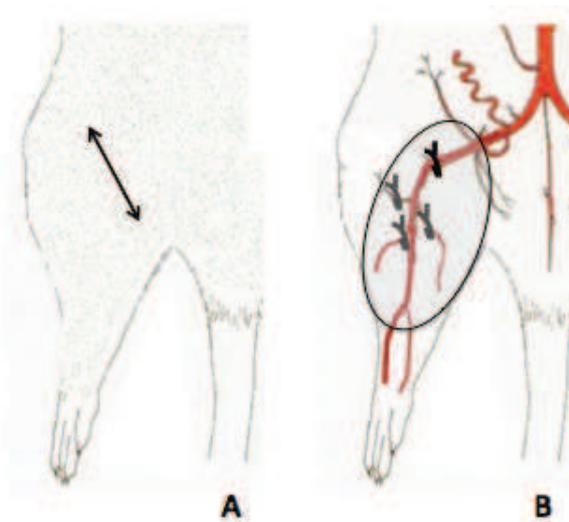
## **2.2 Schémas expérimentaux**

### **2.2.1 Modèle d'Ischémie critique chronique (ICC)**

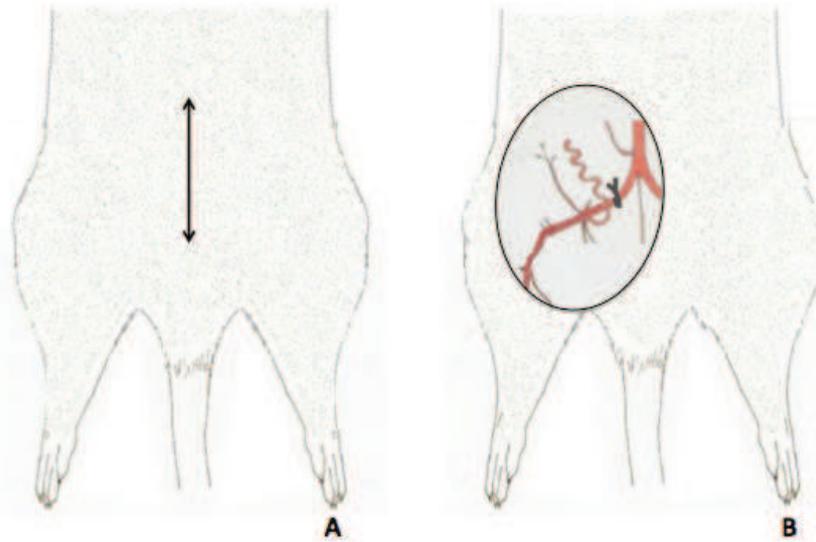
Le protocole opératoire est réalisé sous anesthésie générale en 2 temps : à J<sub>0</sub> une ligature fémorale droite, à J<sub>4</sub> une ligature iliaque droite. Dans ce modèle le membre postérieur gauche sert de membre contrôle (*Thaveau 2009*). L'induction de l'anesthésie générale se fait dans une boîte hermétique ventilée par un mélange d'isoflurane à 3% (Aerrane®, Baxter, USA) et d'oxygène. L'entretien de l'anesthésie, pour la chirurgie et pour les scintigraphies se

fait en ventilation spontanée à travers un masque-entonnoir délivrant un mélange d'isoflurane à 1,3% et d'air, et assurant la récupération du gaz expiré et en excès. La ligature fémorale droite est donc réalisée à J<sub>0</sub>, l'animal étant installé en décubitus dorsal sur table chauffante (Minerve®, Esternay, France). Un abord oblique en haut et en dehors est réalisé à la face ventrale de la racine du membre postérieur droit, sur 1 centimètre de longueur (Figure 12A). L'artère fémorale droite est exposée sous microscope opératoire sur une longueur comprise entre l'artère épigastrique superficielle et la bifurcation des artères saphène et poplitée. Une ligature par 5 nœuds est ensuite réalisée au polypropylène 7/0 (Ethicon®, Texas, USA) au niveau de la partie proximale exposée, les 3 premières collatérales sont ligaturées également (Figure 12B). L'incision est ensuite refermée par un surjet de polypropylène 5/0 (Ethicon®, Texas, USA).

La ligature iliaque est réalisée 4 jours plus tard, une laparotomie médiane xypho-pubienne est réalisée (Figure 13A), les viscères sont réclinés en dehors de la cavité abdominale de façon à exposer la trifurcation aortique. Le péritoine est ensuite incisé sous microscope opératoire, et l'artère iliaque droite est exposée. Une ligature par 5 nœuds de polypropylène 7/0 (Ethicon®, Texas, USA) est réalisée au niveau de l'artère iliaque droite à 1 cm en aval de son origine (Figure 13B). Les viscères sont réintégrés, et la laparotomie médiane est fermée en 2 plans : le plan musculaire par un surjet de polypropylène 6/0 (Ethicon®, Texas, USA) et le plan cutané par une surjet de polypropylène 5/0 (Ethicon®, Texas, USA).



**Figure 12 : Voie d'abord et ligature fémorale droite**



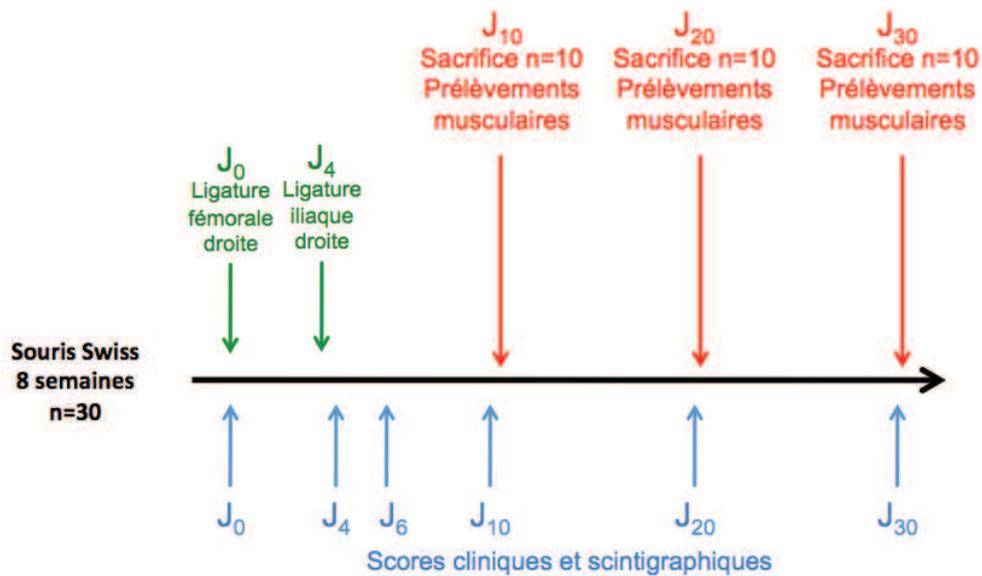
**Figure 13 : Voie d'abord et ligature iliaque droite**

Pour l'ensemble des animaux, l'évaluation de la douleur est réalisée selon le code des expressions faciales chez la souris décrit par Langford, et déterminant le niveau de douleur à partir du niveau d'amincissement des orbites, du froncement du museau, du gonflement des joues, de la position des oreilles, et de la position des moustaches, ce qui permet d'apprécier le niveau de douleur : normal, modéré, ou sévère (*Langford 2010*). Une analgésie par l'injection de tramadol (Tramadol®, Paris, France) par voie intrapéritonéale est réalisée dès l'apparition d'une douleur modérée.

Pour mettre au point le modèle d'ICC, les 30 souris Swiss sont divisées en 3 groupes : 1 groupe de 10 souris sacrifiées à J<sub>10</sub>, un groupe de 10 souris sacrifiées à J<sub>20</sub>, et un groupe de 10 souris sacrifiées à J<sub>30</sub>. Jusqu'au sacrifice par dislocation cervicale, les animaux sont examinés cliniquement et des scintigraphies sont réalisées à intervalles réguliers : avant toute chirurgie, puis à J<sub>4</sub> avant la ligature iliaque, à J<sub>6</sub>, à J<sub>10</sub>, à J<sub>20</sub>, et à J<sub>30</sub> (Figure 14). Tous les animaux ont été élevés dans un environnement thermique neutre ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), avec une période lumineuse de 12 heures par jour. La nutrition et l'hydratation étaient en libre accès.

Le jour du sacrifice, des prélèvements musculaires sont réalisés au niveau du membre ischémique et au niveau du membre contrôle :

- les muscles gastrocnémiens pour les mesures de respiration mitochondriale, de capacité de rétention calcique, et de production de radicaux libres par résonance paramagnétique électronique,
- les muscles tibialis pour analyses histologiques par coloration hématoxyline-éosine, marquage au dihydroéthidium, et analyse des ARN.



**Figure 14 : Mise au point du modèle : Schéma expérimental.**

Le degré d'ischémie a été validé de manière clinique, par l'intermédiaire de scores décrits dans la littérature (*Stabile 2003*), et par scintigraphies planaires au MIBI sous gamma-caméra dédiée au petit animal. Pour évaluer l'atteinte tissulaire, nous avons utilisé le score en 5 points décrit par *Stabile*<sup>28</sup> : un aspect normal du membre est coté 1, une pâleur du membre 2, une cyanose 3, une nécrose 4, et une amputation spontanée d'un ou plusieurs orteils 5. Le score a été calculé à J<sub>0</sub> (avant toute ligature), à J<sub>4</sub> (1 heure après la ligature iliaque), à J<sub>6</sub>, à J<sub>10</sub>, à J<sub>20</sub>, et à J<sub>30</sub>.

Pour évaluer l'atteinte fonctionnelle, nous avons utilisé le score en 4 points décrit par *Stabile*. Une fonction normale du membre postérieur est cotée 0, l'animal étant alors capable d'effectuer une flexion des orteils de manière à résister à une traction active sur la queue. Lorsque l'animal est capable d'effectuer une flexion plantaire, mais qu'il est incapable de réaliser une flexion des orteils, le score fonctionnel est de 1. Lorsque l'animal ne peut pas réaliser de flexion plantaire mais qu'il ne traîne pas la patte, le score fonctionnel est de 2. Le score d'atteinte fonctionnelle d'un animal qui traîne la patte est de 3 (*Stabile 2003*). Le score a été calculé à J<sub>0</sub> (avant toute ligature), à J<sub>4</sub> (1 heure après la ligature iliaque), à J<sub>6</sub>, à J<sub>10</sub>, à J<sub>20</sub>, et à J<sub>30</sub>.

Pour évaluer la perfusion tissulaire, nous avons réalisé des scintigraphies planaires au MIBI sous gamma-caméra dédiée au petit animal (Gaede Medizinsysteme GmbH®, Fribourg, Allemagne) dans le service d'Imagerie Préclinique, UF 6237, Pôle d'Imagerie Médicale des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (Pr Constantinesco, Dr Choquet). Sous anesthésie

générale par isoflurane 1,3% (Aerrane®, Baster, USA), l'animal étant installé dans le lit chauffé d'une cellule d'imagerie dédiée à l'acquisition des images chez le petit animal (Minerve®, Esternay, France), des scintigraphies d'une durée de 15 minutes ont été réalisées, 30 minutes après l'injection du traceur (MIBI) au niveau de la veine caudale (Figure 15). Les scintigraphies ont été réalisées à J<sub>0</sub> (avant la ligature fémorale), à J<sub>4</sub> (avant la ligature iliaque), à J<sub>6</sub>, puis à J<sub>10</sub>, J<sub>20</sub>, et J<sub>30</sub>. L'analyse de la perfusion tissulaire a été effectuée de manière semi-quantitative. Des régions d'intérêt d'égales dimensions et de formes identiques ont été tracées autour du membre atteint et du membre controlatéral. La fixation du MIBI étant le reflet de la perfusion tissulaire, le rapport du nombre de coups comptés dans la région atteinte et la région normale contrôle donne une indication du déséquilibre de perfusion tissulaire induit par les ligatures.



**Figure 15 : Réalisation des scintigraphies**

### **2.2.2 Modèles d'IR aiguë**

Notre équipe utilise deux modèles d'IR, une technique d'ischémie bilatérale des membres inférieurs par clampage aortique sous-rénal, et une technique d'ischémie unilatérale par mise en place d'un garrot à la racine du membre.

La technique d'ischémie bilatérale par clampage aortique sous-rénal est réalisée par laparotomie médiane. L'aorte abdominale sous-rénale est disséquée et libérée de ses adhérences. Toutes les collatérales aortiques prenant naissance de l'aorte entre les artères rénales et la bifurcation aortique sont coagulées par une sonde thermique (GEIGER®, thermal cautery unit) puis sectionnées, évitant ainsi une vascularisation résiduelle des membres inférieurs par collatéralité.

La technique d'ischémie unilatérale par application d'un garrot à la racine du membre a été utilisée pour le protocole d'IR sur ICC, dans le cadre du conditionnement par L-arginine. Cette technique est réalisée par application d'un garrot à la racine du membre sans dissection préalable des plans cutané ou musculo-aponévrotique. Le garrot correspond à une boucle de

Vicryl 1.0 sur tirette. Les temps d'ischémie et de reperfusion étaient respectivement de 2 heures et 2 heures.

Dans les deux modèles, l'ischémie était authentifiée par l'apparition d'une cyanose de la ou des patte(s) ainsi que par l'élévation de la lactatémie capillaire (Lactate Pro® LT1710; Arkray, KGK, Japan) au-delà de 10mmol/L.

## 2.3 Protocoles de conditionnement pharmacologique

### 2.3.1 Conditionnement pharmacologique par n-acétyl-cystéine

Des souris Swiss mâles âgées de 8 semaines (n=20) ont été utilisées pour l'étude du conditionnement pharmacologique par n-acétyl-cystéine. Tous les animaux ont été opérés selon le modèle d'ICC, à savoir une ligature fémorale droite et des 3 premières collatérales à J<sub>0</sub>, suivie d'une ligature iliaque droite à J<sub>4</sub>.

Les animaux ont été divisés en 2 groupes : 1 groupe ICC+NAC ayant bénéficié du conditionnement par n-acétyl-cystéine à la dose de 300 mg/kg/j dans l'eau de boisson à partir de J<sub>6</sub> (n=10); et un groupe ICC n'ayant pas bénéficié du conditionnement par n-acétyl-cystéine (n=10).

Les animaux ont été sacrifiés à J<sub>30</sub>. Les muscles gastrocnémiens ont été prélevés au niveau du membre ischémique et au niveau du membre contrôle dans les 2 groupes, pour étude de la respiration mitochondriale, de la production de radicaux libres, et de la capacité de rétention calcique (Figure 16).

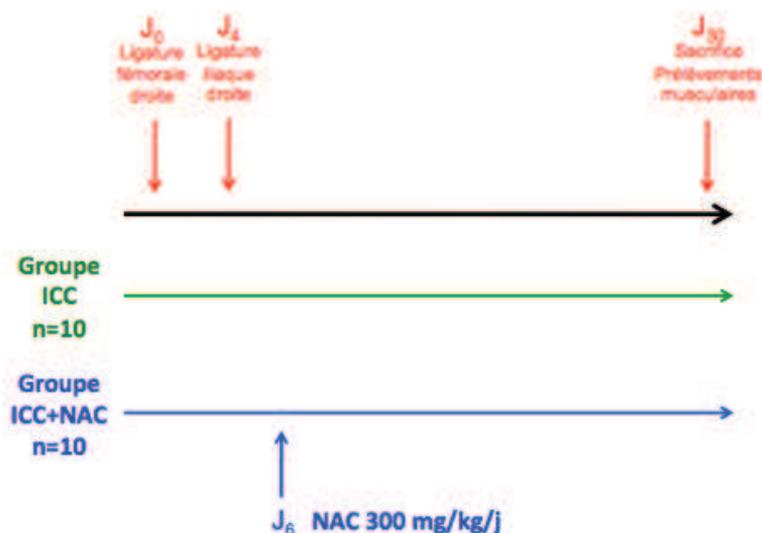


Figure 16 : Conditionnement pharmacologique par n-acétyl-cystéine.

### 2.3.2 Conditionnement pharmacologique par statines

Des souris Swiss mâles âgées de 8 semaines (n=30) ont été utilisées pour l'étude du conditionnement pharmacologique par statines. Tous les animaux ont été opérés selon le modèle d'ICC, à savoir une ligature fémorale droite et des 3 premières collatérales à J<sub>0</sub>, suivie d'une ligature iliaque droite à J<sub>4</sub>.

Les animaux ont été divisés en 3 groupes : un groupe préconditionnement (n=10), un groupe post-conditionnement (n=10), et un groupe ICC (n=10). Les statines ont été administrées à la dose de 5 mg/kg/j dans l'eau de boisson 30 jours avant la ligature fémorale, et ce jusqu'au sacrifice : ces souris constituent le groupe pré-conditionnement (PRE-CON). Les statines ont été administrées à la dose de 5 mg/kg/j dans l'eau de boisson à 10 souris 6 jours après la ligature fémorale, et ce jusqu'au sacrifice : ces souris constituent le groupe post-conditionnement (POST-CON). Les 10 autres souris constituent le groupe ICC.

Les animaux ont été sacrifiés à J<sub>30</sub>. Les muscles gastrocnémiens ont été prélevés au niveau du membre ischémique et au niveau du membre contrôle dans les 3 groupes, pour étude de la respiration mitochondriale, de la production de radicaux libres, et de la capacité de rétention calcique (Figure 17).

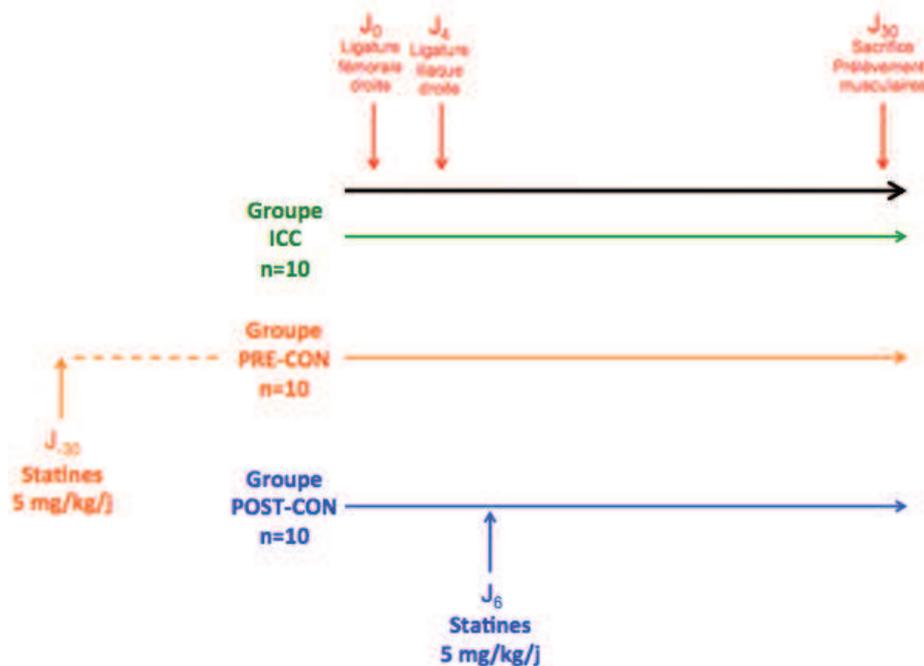


Figure 17 : Conditionnement pharmacologique par statines.

### 2.3.3 Conditionnement pharmacologique par L-arginine

Des souris Black-6 mâles âgées de 8 semaines (n=30) ont été utilisées pour l'étude du conditionnement pharmacologique par L-arginine. Tous les animaux ont été opérés selon le modèle d'ICC, à savoir une ligature fémorale droite et des 3 premières collatérales à J<sub>0</sub>, suivie d'une ligature iliaque droite à J<sub>4</sub>.

Un protocole d'ischémie-reperfusion par application d'un garrot à la racine de la cuisse a été appliqué à 20 souris en ICC. Ce protocole correspondait à 2 heures d'ischémie par garrot à la racine de la cuisse droite, suivies de 2 heures de reperfusion. Les 10 animaux n'étant pas soumis au protocole d'ischémie-reperfusion correspondent au groupe ICC.

La L-arginine a été administrée à la dose de 50 mg/kg par injection intra-veineuse au niveau de la veine caudale à 10 souris, juste avant la reperfusion: ces souris constituent le groupe ICC+IR+L-arginine. Les 10 animaux n'ayant pas bénéficié du conditionnement par L-arginine constituent le groupe ICC+IR.

Les animaux ont été sacrifiés à J<sub>30</sub>. Les muscles gastrocnémiens ont été prélevés au niveau du membre ischémique et au niveau du membre contrôle, pour étude de la respiration mitochondriale et de la production de radicaux libres (Figure 18).

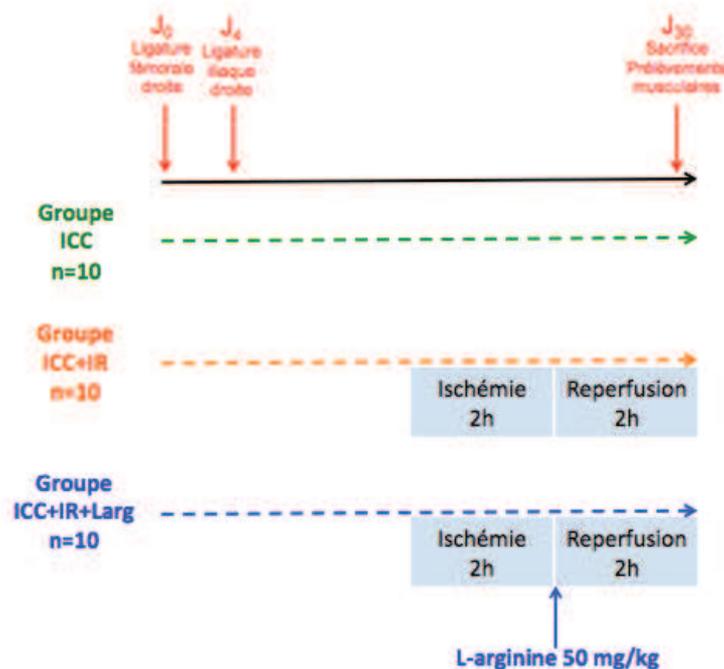


Figure 18 : Conditionnement pharmacologique par L-arginine.

## 2.4 Paramètres étudiés

### 2.4.1 Protocole d'étude de la respiration mitochondriale

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

Après prélèvement du muscle gastrocnémien, l'échantillon tissulaire (30-50mg) est immédiatement placé dans la solution S à 4°C, permettant ainsi de maintenir les fibres musculaires dans des conditions physiologiques. L'analyse de la respiration mitochondriale doit être réalisée en extemporané, car nous avons récemment démontré que la congélation réduisait de façon significative les valeurs de respiration mitochondriale au niveau musculaire squelettique, et que ceci ne permettait plus de mettre en évidence l'atteinte mitochondriale liée à l'ischémie reperfusion (*Meyer 2014*). Ces fibres sont ensuite disséquées à l'aide de pinces de précision, sous loupe binoculaire. Cette étape est essentielle afin de permettre l'accès de la saponine aux membranes des fibres musculaires. Puis intervient l'étape de perméabilisation, les fibres étant placées dans un tube de solution S + saponine (50 µg/ml) sous agitation durant 30 minutes à 4°C (*Kusnetsov 2008*). Cette étape permet de détruire sélectivement le sarcolemme sans endommager les membranes mitochondriales, moins riches en cholestérol. Les fibres sont ensuite replacées dans un tube de solution S pendant 10 minutes, toujours sous agitation, afin d'éliminer la saponine. Finalement, elles sont placées dans des tubes contenant de la solution R (2x5 minutes), afin d'éliminer l'ATP, l'ADP et la PCr, tout en maintenant l'homéostasie cellulaire.

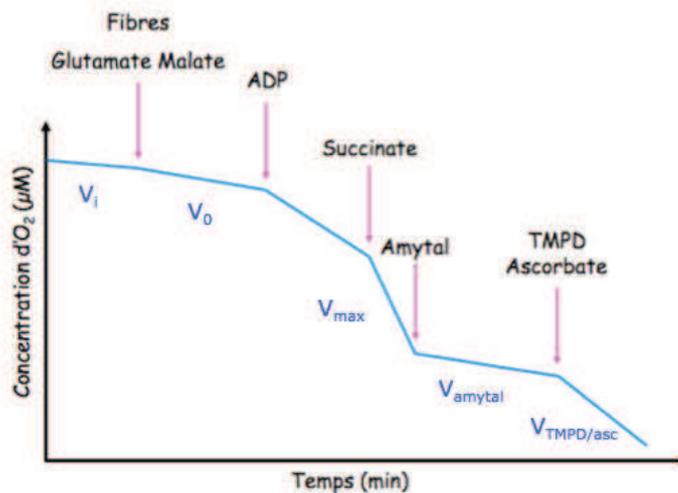
Les analyses se font dans des chambres oxygraphiques thermostatées reliées à un bain-marie à 22,1°C pour les fibres musculaires perméabilisées (Strathkelvin Instruments®, Glasgow, Ecosse). Pour mesurer la décroissance de la concentration d'oxygène dans les chambres, des électrodes de Clark sont utilisées, reliées à un logiciel qui analyse les variations de concentration en oxygène. Ceci va permettre de calculer la vitesse de consommation d'oxygène pour les différentes chambres, qui constitue le reflet de l'activité de la chaîne de respiration mitochondriale (Figure 19).

Différents substrats sont injectés pour activer les différents complexes de la chaîne de respiration mitochondriale :

- Initialement, les fibres musculaires sont placées dans la solution R contenant les substrats qui vont générer du NADH, équivalent réducteur qui donne des électrons au complexe I : glutamate (5 mM) et malate (2 mM). La consommation d'oxygène ainsi mesurée correspond à l'activité de base de la chaîne de respiration mitochondriale au travers des complexes I, III et IV ( $V_0$ ).
- De l'ADP (2 mM) et du succinate (25mM) sont ensuite injectés, permettant une stimulation maximale de la chaîne de respiration mitochondriale à travers de ces

complexes I, II, III et IV ( $V_{max}$ ). Le rapport  $V_{max}/V_0$  constitue l'ACR (acceptor control ratio) qui permet de quantifier le couplage phosphorylation/oxydation et donc l'efficacité de la phosphorylation oxydative.

- L'adjonction d'amytal (0,02 mM) va bloquer le complexe I et entraîner un arrêt du fonctionnement de la chaîne de respiration mitochondriale.
- L'ajout du TMPD (0,5 mM) et de l'ascorbate (0,5 mM) stimule l'activité du complexe IV à son maximum, ce qui permet son étude indépendamment du fonctionnement des autres complexes ( $V_{TMPD}$ ).



**Figure 19 : Evolution de la consommation en oxygène.**

A la fin de la manipulation des muscles squelettiques, les fibres sont récupérées, déshydratées et pesées. Toutes les vitesses sont exprimées en  $\mu mol O_2/min/g$  de fibres en poids sec.

## 2.4.2 Détection des radicaux libres tissulaires

### Marquage des radicaux libres avec le dihydroéthidium

Des coupes de muscles tibialis congelés d'une épaisseur de  $10 \mu m$  réalisées au cryostat sont incubées pendant 30 minutes à  $37^\circ C$  avec la DHE (dihydroéthidium ;  $2.5 \mu M$ ). La DHE produit une fluorescence rouge quand elle est oxydée en éthidium bromide par les ROS, essentiellement l'anion superoxyde. Les coupes sont ensuite montées dans du Vectashield® (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA). On examine ensuite les coupes sous un microscope à épifluorescence avec un objectif X20 (Nikon Eclipse E800).

### Détection des ROS par résonance paramagnétique électronique (RPE)

La technique de RPE consiste prolonger la durée de vie des ROS en les associant à une sonde moléculaire qui facilite leur détection. Par ailleurs, soumis à un champ électromagnétique d'intensité connue et à une radiation micro-onde de fréquence et

d'amplitudes connues, un échantillon tissulaire absorbe les radiations de façon proportionnelle à la quantité d'électrons non appariés qu'il contient (*Vergely 2003*). Il devient alors possible de quantifier tous les radicaux libres (chacun ayant un spectre d'absorption déterminé) et pas seulement une espèce radicalaire.

Après prélèvement musculaire, l'échantillon tissulaire de muscle gastrocnémien (20-30mg) est immédiatement placé dans la solution de Krebs, permettant ainsi de maintenir les fibres musculaires dans des conditions physiologiques. Ces fibres sont ensuite disséquées et coupées en fragments de 1 à 2 mm<sup>3</sup>, sous loupe binoculaire à 4°C. Les fragments tissulaires sont finalement rincés deux fois dans la solution de Krebs. La solution tampon utilisée est du Krebs-Hepes. Il contient : NaCl 99 mM, KCl 4,69 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,03 mM, D(+) Glucose 5,6 mM, Na-Hepes 20 mM. Il a été ajouté à cette solution 25µM de déféroxamine et 5µM de DETC, afin d'éviter une auto-oxydation de la CMH par la solution de Krebs. La CMH (1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetraméthylpyrrolidine HCl) est une sonde moléculaire qui s'oxyde en présence des électrons non appariés des espèces réactives de l'oxygène, sous une forme stable dans le temps. C'est cette CMH oxydée que l'on va ensuite mesurer.

L'incubation du tissu avec la CMH est réalisée dans un incubateur thermo-régulé et sous atmosphère contrôlée (NOXYGEN<sup>®</sup>, Allemagne). Les fragments tissulaires sont ainsi placés dans une plaque multi-puits, en présence de Krebs et de CMH (200µM). La plaque est mise à incuber pendant 30 minutes à 37°C, avec comme paramètres atmosphériques : N<sub>2</sub> 97,8%, O<sub>2</sub> 2,2% et +20mmHg de pression pour reproduire la pression partielle d'oxygène présente au niveau tissulaire. La quantification des ROS est réalisée sur un aliquot de 40µL de surnageant par résonance paramagnétique électronique thermorégulé à 15°C (Noxygen<sup>®</sup>, Allemagne). Ainsi, 40µl de surnageant sont prélevés sur la plaque et analysés par résonance paramagnétique électronique. Les paramètres de réglages permettant de détecter la CMH oxydée sont les suivants : center field g = 2, field sweep 60 G, microwave power 60 mW, modulation amplitude 2,48 G, conversion time 10,24 ms, time constant 40,96 ms.

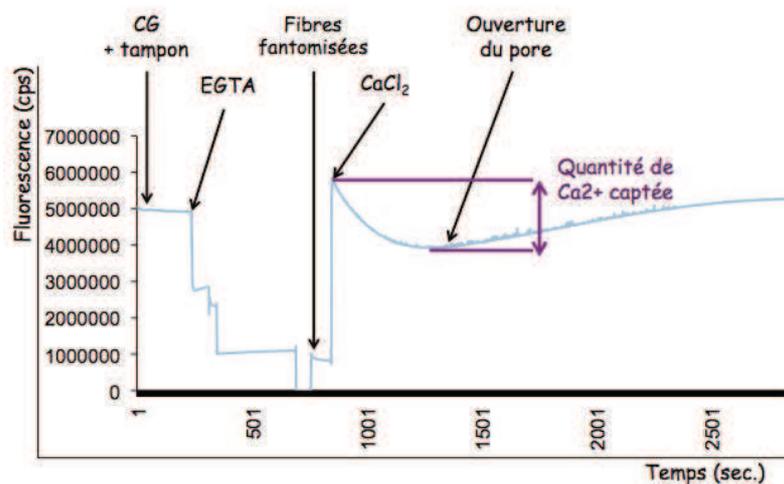
La quantité de CMH oxydée, et donc la production des ROS, est mesurée par l'intensité du signal de résonance recueilli. A la fin de la manipulation, les fragments tissulaires sont récupérés, déshydratés et pesés. La production des ROS est exprimée en µmol/min/mg de fibres en poids sec.

### **2.4.3 Mesure de la capacité de rétention calcique**

Le calcium matriciel est le principal facteur déclenchant l'ouverture du mPTP. Déterminer la résistance du mPTP à une charge calcique croissante (ou capacité de rétention calcique) permet d'analyser la facilité avec laquelle le pore s'ouvre et donc sa tendance à entraîner les phénomènes d'apoptose. La mesure de la capacité de rétention calcique correspond donc à soumettre les mitochondries de fibres musculaires perméabilisées (1 à 1,5 mg de poids sec) à une charge calcique croissante par ajouts itératifs de calcium (1mM dans 5µL toutes les 2 min) dans le milieu extracellulaire (tampon CRC contenant Tris-Base 20mM ; saccharose 150mM ; KCl 50mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM ; succinate 5mM ; EGTA 9mM ; pH 7,4). Un marqueur colorimétrique (le calcium green 1µM; excitation-emission, 500–530 nm) permet de quantifier le calcium extra-mitochondrial dans le milieu. A chaque ajout de calcium dans le milieu, le signal du calcium green augmente de façon abrupte puis décroît. En effet, tant que le mPTP reste fermé, les mitochondries emmagasinent le calcium dans l'espace matriciel permettant le retour des concentrations extra-mitochondriales de calcium à l'état de base. Lorsque le mPTP s'ouvre, les mitochondries relarguent le calcium emmagasiné de façon

brutale, provoquant un pic de l'indicateur colorimétrique. La capacité de rétention calcique est exprimée en  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de poids sec.

Comme le calcium extra-mitochondrial peut interagir avec le matériel contractile des muscles (filaments de myosine) ainsi qu'avec le réticulum sarcoplasmique, il est nécessaire de fantomiser les muscles pour les en débarrasser. Les fibres ont donc dans un premier temps été perméabilisées à l'aide de la saponine puis lavées dans du tampon S. Ensuite, elles ont été incubées 30 minutes sous agitation à  $4^\circ\text{C}$  dans un tampon R+KCl (KCL 800mM ;  $\text{CaK}_2\text{EGTA}$  2.77mM ;  $\text{K}_2\text{EGTA}$  7.23mM ;  $\text{MgCl}_2$  1.38mM ; imidazole 20mM ; taurine 20mM ; dithiothreitol 0.5mM ; K-sulfonate de methane 90mM ; Na-sulfonate de methane 10mM; glutamate 5mM ; malate 2mM ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3mM ; pH 7) pour extraire la myosine puis lavées trois fois 10 minutes dans du tampon CRC+BSA (Tris-Base 20mM ; saccharose 150mM ; KCl 50mM ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2mM ; succinate 5mM; EGTA 9mM; BSA 2mg/ml ; pH 7.4).



**Figure 20 : Analyse de la capacité de rétention calcique.**

#### 2.4.4 Analyse histologique

Les muscles tibialis sont prélevés au niveau du membre contrôle et au niveau du membre ischémique lors du sacrifice des animaux. Les prélèvements musculaires sont plongés dans l'azote liquide puis congelés à  $-80^\circ\text{C}$ . Des séries de coupes de  $10\ \mu\text{m}$  d'épaisseur de muscle tibialis sont ensuite réalisées avec un microtome cryostatique, et une analyse des coupes par coloration hématoxyline-éosine est faite.

#### 2.4.5 Analyses ARN

Les analyses ARN concernent les principales enzymes antioxydantes (SOD 1, SOD 2, catalase), les cytokines inflammatoires (IL6,  $\text{TNF}\alpha$ , IGF1), et les marqueurs de biogenèse mitochondriale (Nrf1,  $\text{PGC}\ 1\alpha$ ,  $\text{PGC}\ 1\beta$ ). Les ARN sont isolés avec du TRIzol Reagent (Invitrogen®, Life Technologies), et  $2\ \mu\text{g}$  d'ARN sont convertis en cDNA à l'aide de la SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen®, Life Technologies) et des primers. Ensuite une RT-PCR quantitative est réalisée en utilisant le QuantiTect™ SYBR Green PCR kit (Roche).

### 3. ANALYSE STATISTIQUE

Les analyses statistiques ont été réalisées à partir du logiciel Graphpad Prism 5® (GraphaPad Software, San Diego, USA). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  déviation standard. Les membres contrôles et les membres ischémiques des mêmes animaux ont été comparés par un test t de Student sur échantillons appariés. Les membres contrôles et les membres ischémiques d'animaux de séries différentes ont été comparés par un test de Student. Les résultats sont jugés statistiquement significatifs pour une valeur de  $p$  inférieure à 0,05.

# **RESULTATS**

## 1. Effets de l'ischémie-reperfusion sur le muscle squelettique

**Section de l'article "Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping".**

*Nous ne présentons ici que les résultats utiles pour la thèse.*

### **Objectifs :**

L'objet de cette étude est d'étudier les effets de l'ischémie reperfusion (IR) sur le muscle squelettique, en termes de respiration mitochondriale, de stress oxydant et d'analyse histologique.

### **Matériel et Méthodes :**

L'étude a été réalisée sur des rats Wistar (250-300 grammes), avec un groupe Contrôle (n=8), et un groupe IR (n=10) soumis à 2 heures d'ischémie par clampage aortique et 3 heures de reperfusion. Les muscles gastrocnémiens ont été prélevés pour analyse de la fonction respiratoire mitochondriale par oxygraphie, de la production de radicaux libres par marquage au dihydroéthidium, et de l'inflammation par immunohistochimie.

### **Résultats :**

Il existe une atteinte de la fonction respiratoire mitochondriale dans le groupe IR, avec un taux d'ACR et une vitesse oxydative maximale diminués:  $ACR = 1,38 \pm 0,06$  vs  $1,98 \pm 0,20$  ( $p < 0,01$ ),  $V_{max} = 4,08 \pm 0,38 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  vs  $5,98 \pm 0,56 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  ( $p < 0,05$ ) dans les groupes IR et Contrôle respectivement. La production de radicaux libres est augmentée dans le groupe IR :  $3992 \pm 706 \text{ UI}$  vs  $1812 \pm 322 \text{ UI}$  ( $p < 0,05$ ). Le muscle ischémique montre une infiltration par des macrophages, témoignant de l'inflammation.

### **Conclusion :**

L'IR génère une atteinte mitochondriale associée à augmentation du stress oxydant, avec altération de la fonction respiratoire. On observe aussi également des lésions histologiques liées à l'inflammation.

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

Julien Pottecher, MD, PhD,<sup>a,b</sup> Max Guillot, MD,<sup>b,c</sup> Elise Belaidi, PhD,<sup>d</sup> Anne-Laure Charles, PhD,<sup>b,e</sup> Anne Lejay, MD,<sup>b,f</sup> Abdallah Gharib, PhD,<sup>d</sup> Pierre Diemunsch, MD, PhD,<sup>a,b</sup> and Bernard Geny, MD, PhD,<sup>b,e</sup> *Strasbourg and Lyon, France*

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

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

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

**Conclusions:** Cyclosporine A normalized ROS production, decreased inflammation, and restored mitochondrial coupling during aortic cross-clamping. Incomplete  $V_{max}$  protection might be due to low cyclophilin D expression in gastrocnemius, preventing CsA from blocking mPTP opening. (*J Vasc Surg* 2013;57:1100-8.)

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

From Pôle Anesthésie Réanimation Chirurgicale, SAMU, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg,<sup>a</sup> Equipe d'Accueil 3072, Institut de Physiologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg,<sup>b</sup> and Service de Réanimation Médicale, Hôpital de Hautepierre,<sup>c</sup> Strasbourg; Inserm U1060-CarMen & service d'Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires, Hospices Civils de Lyon & Université Claude Bernard Lyon1, Lyon<sup>d</sup>; and Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Pôle de Pathologie Thoracique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg,<sup>e</sup> and Service de Chirurgie Cardiovasculaire, Pôle de Cardiologie, Hôpitaux Universitaires, CHRU de Strasbourg,<sup>f</sup> Strasbourg.

Author conflict of interest: none.

Additional material for this article may be found online at [www.jvascsurg.org](http://www.jvascsurg.org).  
Reprint requests: Professeur Bernard Geny, Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles et Equipe d'Accueil 3072, Université et Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France (e-mail: [bernard.geny@chru-strasbourg.fr](mailto:bernard.geny@chru-strasbourg.fr)).

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

0741-5214/\$36.00

Copyright © 2013 by the Society for Vascular Surgery.

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

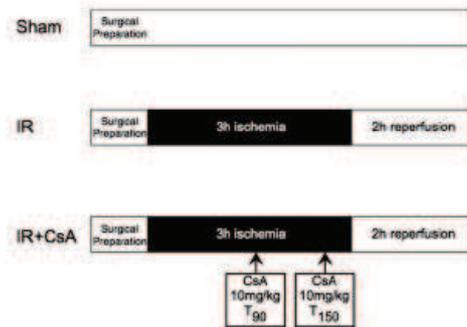
Open abdominal aortic aneurysm repair is a surgical intervention commonly carried out in high-risk surgical patients with advanced cardiovascular disease and complicated outcomes.<sup>1</sup> It requires aortic cross-clamping, which induces skeletal muscle ischemia-reperfusion (IR) injury that largely participates in perioperative and long-term morbidity.<sup>2,3</sup> Several mechanisms are involved in these alterations, with key factors being increased reactive oxygen species (ROS) production and impaired mitochondrial function. Particularly, the mitochondrion is a central player in cell survival. Indeed, mitochondria are the source of adenosine triphosphate (ATP) storage, the main core of ROS generation<sup>4</sup> and the mainstay of apoptosis regulation. At the same time, the mitochondria are an early target of IR mechanisms. Indeed, ROS overproduction mediates IR-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscles.<sup>5</sup> Molecular pathways then converge to a mitochondrial key target, the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), whose opening causes both cell necrosis and apoptosis.<sup>6</sup>

In order to rescue skeletal muscle from infarction, local and remote ischemic preconditioning equivalently protected muscles' mitochondrial function against IR-induced injury.<sup>7</sup> Ischemic postconditioning, characterized by repeated cycles of IR performed at the onset of reperfusion, was also thought to be protective, but recent data suggest it should be used with caution.<sup>8,9</sup> Furthermore,

repetitive vascular clamping in atherosclerotic patients is neither always feasible nor devoid of side effects,<sup>10</sup> so there is obviously a need for an alternative approach.

Pharmacologic conditioning is an option, and cyclosporine A (CsA), a potent mPTP opening inhibitor, is extremely powerful in protecting cardiomyocytes from IR.<sup>11</sup> Indeed, CsA binds to cyclophilin D and inhibits mPTP opening, preventing mitochondrial dysfunction, oxidative phosphorylation uncoupling, and ultimately cell death.<sup>12</sup> Cyclophilins are ubiquitous proteins, highly conserved during evolution and identified in the genomes of mammals, plants, insect, fungi, and bacteria.<sup>13</sup> This suggests that CsA effects should also be observed in a variety of tissues, including human tissues. Other intracellular mechanisms also could be at play. Thus, reduced ROS production and reduced inflammation potentially might participate in CsA biologic effects.<sup>14</sup> Recently, Askar and Bozkurt<sup>15</sup> administered CsA before femoral occlusion and observed decreased numbers of rolling, sticking, and transmigrating neutrophils in skeletal muscles submitted to 4 hours of ischemia and 24 hours of reperfusion. Importantly, acute CsA administration should not be associated with deleterious effects linked to persistent immunosuppression. Thus, short-term CsA does not affect cutaneous or musculofascial wound healing in clinically relevant dose.<sup>16</sup>

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



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

opening might differ in myocardium and gastrocnemius muscles.

## METHODS

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

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

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

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

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

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

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

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

respiration was determined in gastrocnemius muscle.

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

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

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

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

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

Basal oxygen consumption ( $V_0$ ), and maximal fiber respiration ( $V_{max}$ ) rates were measured at 22.1°C under continuous stirring in the presence of saturating amount of adenosine diphosphate (ADP) as a phosphate acceptor. Relative contributions of the respiratory chain complexes I, III, and IV to the global mitochondrial respiratory rates also were determined. When  $V_{max}$  was recorded, electron flow went through complexes I, III, and IV. Complex I was blocked with amobarbital (Amytal; 0.02 mM), and complex II was stimulated with succinate (25 mM). Mitochondrial respiration then allowed determination of complex II, III, and IV activities ( $V_{succ}$ ). N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD; 0.5 mM) and ascorbate (0.5 mM) were added as artificial electron donors to cytochrome c. Under these conditions, the activity of cytochrome c oxidase (complex IV) was determined as an isolated step of the respiratory chain ( $V_{TMPD/Asc}$ ). Mitochondrial coupling (coupling of phosphorylation to oxidation) was determined by calculating the acceptor control ratio (ACR), the ratio between ADP-stimulated respiration ( $V_{mea}$ ) over basal respiration (without ADP) with glutamate and malate as substrate ( $V_0$ ). Fibers were then harvested and dried for 15 minutes at 150°C. Respiration rates are expressed as  $\mu$ mol O<sub>2</sub>/min/g dry weight (DW).

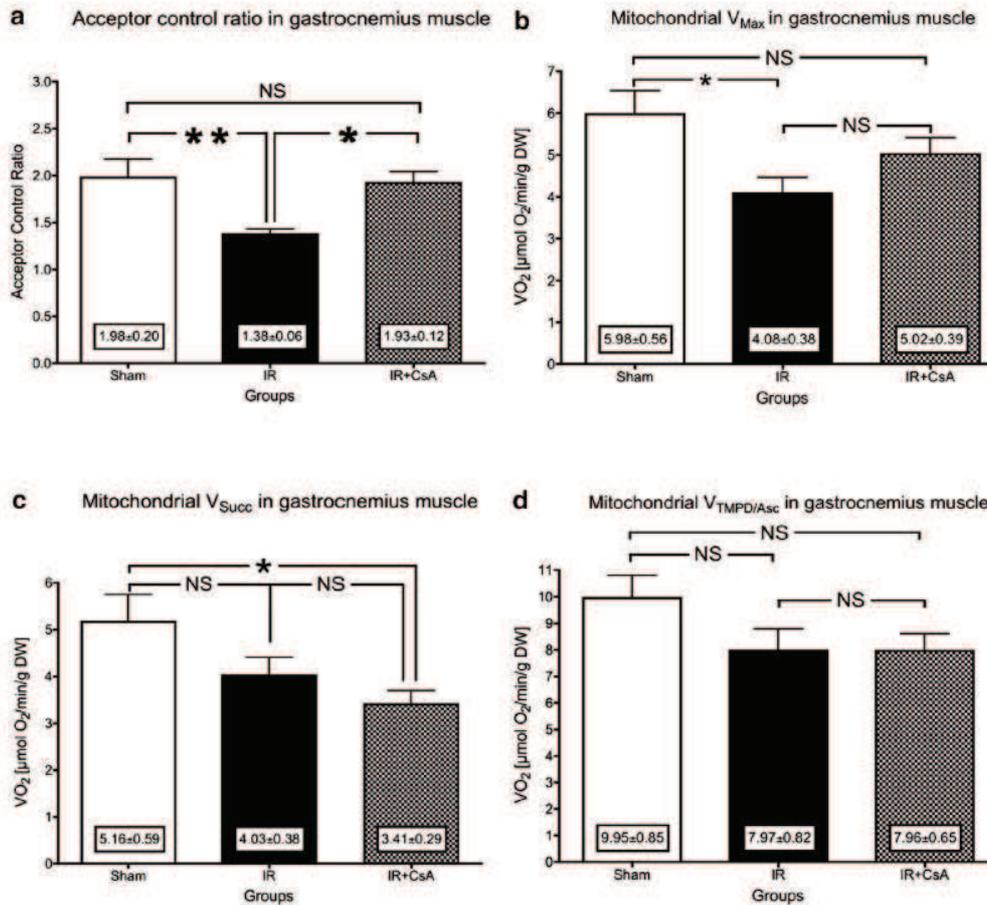
**Dihydroethidium staining.** To detect the presence of ROS in skeletal muscles, serial sections (10  $\mu$ m thick) were cut on a cryostat microtome and incubated with dihydroethidium (DHE), which produces red fluorescence when oxidized to ethidium bromide by ROS including superoxide anion (see Appendix,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

**Immunohistochemical procedure.** To detect gastrocnemius inflammation, we used monocyte macrophage-2 (Millipore, Billerica, Mass) antibody on 10- $\mu$ m-thick serial sections of muscles (see Appendix, online only).<sup>9</sup>

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

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

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



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

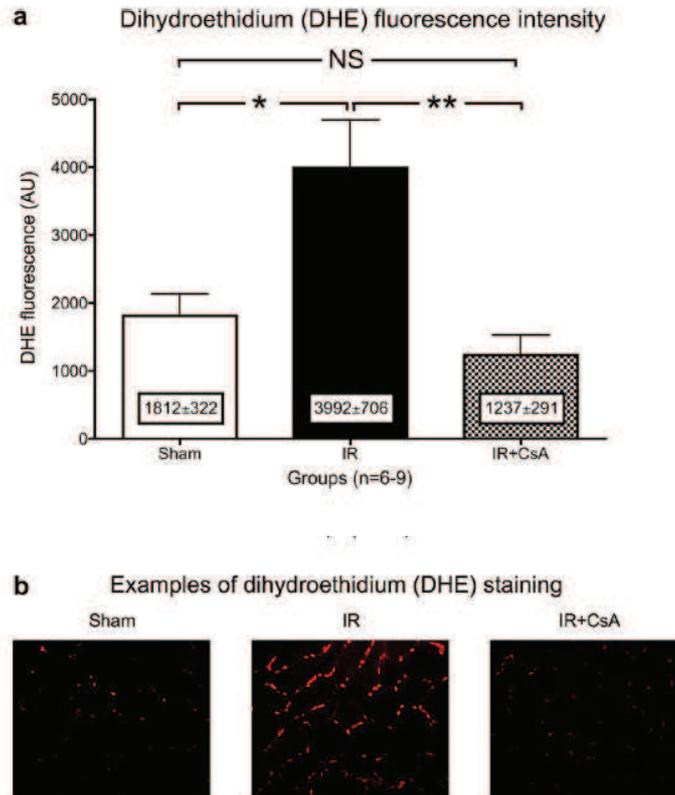
Diego, Calif). One-way analysis of variance was used in all groups, with post-test analysis between groups using the Newman-Keuls test correcting for multiple comparisons.  $P < .05$  (two-tailed) was considered significant. As previously observed, eight to 10 rats per group were required to demonstrate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

## RESULTS

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

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

IR decreased muscle mitochondrial coupling and respiratory chain complexes activities. The ACR was significantly reduced (from  $1.98 \pm 0.20$  to  $1.38 \pm 0.06$ ; -30%;  $P = .0092$ ; Fig 2, *a*). The  $V_o$  tended to decrease after IR from  $3.16 \pm 0.34$  to  $2.96 \pm 0.28$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g DW}$  in sham and IR, respectively. The  $V_{max}$  was significantly decreased (from  $5.98 \pm 0.56$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g DW}$  to  $4.08 \pm 0.38$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g DW}$ ; 32%,  $P = .015$ ; Fig 2, *b*) after 3 hours ischemia and 2 hours reperfusion in gastrocnemius muscle.  $V_{succ}$  and  $V_{TMPO/Asc}$  decreases were not statistically significant after IR (Fig 2, *c* and *d*).



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

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

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

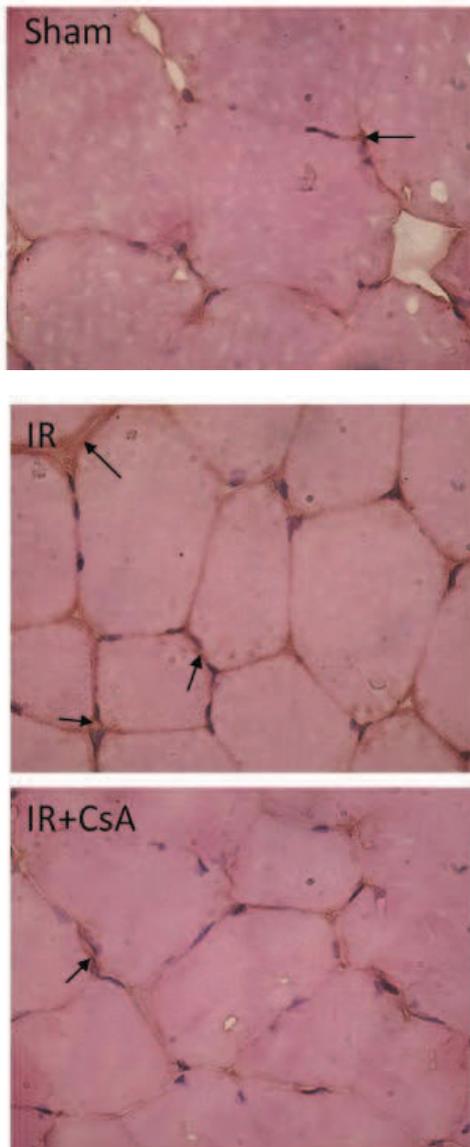
#### Effects of CsA in sham rats and on IR-induced deleterious effects

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

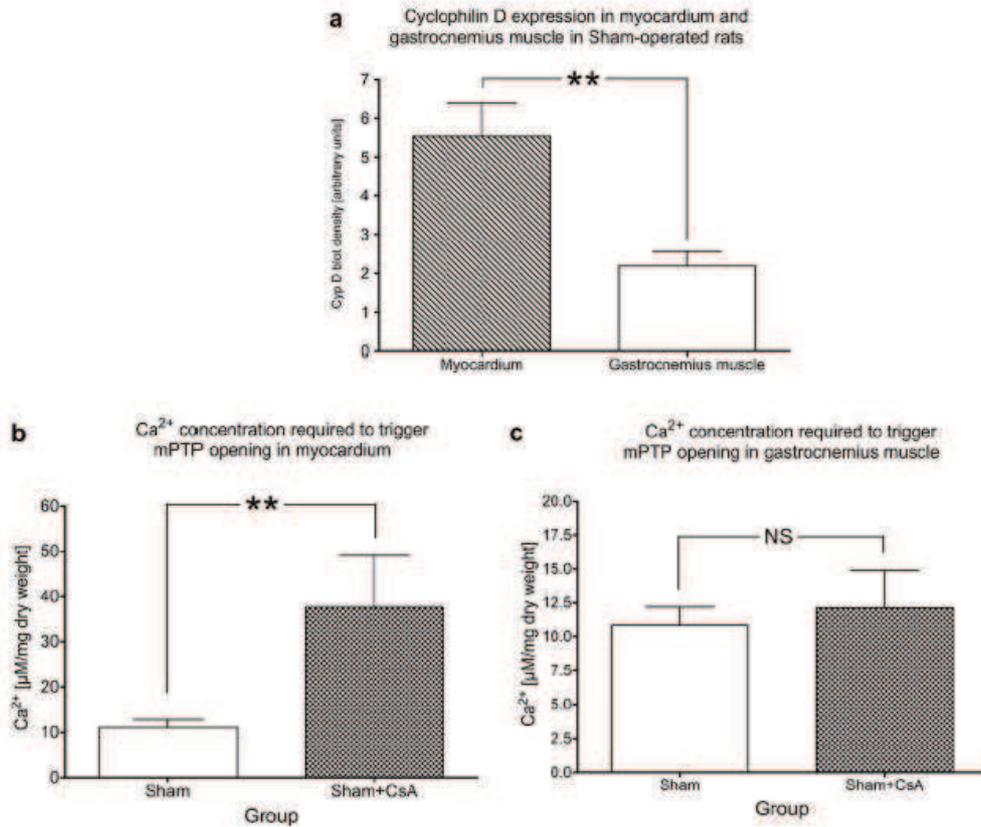
**Cyclophilin D expression in heart and gastrocnemius muscles.** Cyclophilin D expression relative to  $\beta$ -actin was twice as large in myocardium compared with gastrocnemius in sham rats ( $5.52 \pm 0.86$  AU vs  $2.19 \pm 0.38$  AU;  $P = .009$ ; Fig 5, *a*).

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

#### DISCUSSION

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

Human skeletal muscle withstands 2.5 hours of warm global ischemia before histologic injuries appear<sup>21</sup> and muscular ATP pool is exhausted.<sup>22</sup> However, in surgical clinical practice, although 3 hours of aortic clamping time is longer than in most surgical procedures, aortic clamp may be prolonged in robot-assisted laparoscopy and/or by unpredictable complications such as arterial thrombosis and vasospasm. Knowing that even subtle muscle impairments may increase morbidity after abdominal aortic aneurysm repair,<sup>2</sup> muscle protection during vascular surgery appears mandatory.



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

Aortic cross-clamping significantly impaired both mitochondrial coupling and mitochondrial oxidative capacity, supporting that mitochondrial respiratory chain dysfunction is a sensitive marker of IR injury. Hind limb IR also increased ROS production, as inferred from the enhanced DHE staining in IR muscle. Similarly, IR increased muscle inflammation. These data, in line with previous results,<sup>5,6</sup> further support that mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress and inflammation are key factors involved in IR mechanisms.

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

conditioning with CsA is effective in protecting the myocardium from IR injury.<sup>11,20</sup>

In our study, CsA totally restored mitochondrial coupling. Accordingly, rats fed with CsA 10 mg/kg/d and 25 mg/kg/d for 3 weeks significantly decreased their gastrocnemius V<sub>0</sub> (-40% and -45%, respectively), and CsA dose dependently increased the ACR in gastrocnemius muscles.<sup>27</sup> Changes in V<sub>0</sub> were less marked here, perhaps because of the shorter duration of the experiments, but our results are in line with these data.<sup>27</sup>

Reduced oxidative stress likely participated in CsA beneficial effects, as other protective approaches such as ischemic postconditioning also decrease IR-induced ROS production and muscle mitochondrial dysfunction.<sup>5,6</sup> Accordingly, a constant cross-talk takes place between the coupling of phosphorylation to oxidation and mitochondrial ROS generation.<sup>28</sup> Mitochondrial

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

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

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

CsA vehicle can specifically decrease complex I activity without altering mitochondrial coupling.<sup>31</sup> Complex I activity of the mitochondrial respiratory chain largely participates in  $V_{max}$ , and incomplete restoration of  $V_{max}$  might partly be explained by a potential deleterious effect of CsA vehicle on complex I. Nevertheless, such data

were obtained in vitro using a concentration range much higher than that used in our study. Compared with peak CsA values observed 3 hours after administration in late heart transplant recipients ( $808 \pm 295$  ng/mL), our blood CsA concentrations appeared higher.<sup>32</sup> However, they were well within the effective ranges previously demonstrated to protect myocardium from IR injury.<sup>20</sup> Furthermore, our additional experiment showed that similar CsA doses did not affect gastrocnemius mitochondrial function. Thus, an alternative explanation should be explored.

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

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

Another potential mechanism explaining our results may be inferred from the actions of CsA upon B- and T-cell activation. The CsA upregulates immunoglobulin production in preactivated B cells,<sup>36</sup> but CsA inhibits calcineurin-dependent nuclear factor of activated T cell dephosphorylation and interrupts the transcription of genes coding for interleukin-2, interleukin-4, and CD40 ligand. This decreases the efficacy of T-cell-dependent immune defenses<sup>37</sup> and deserves further study.

## CONCLUSIONS

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

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

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

## REFERENCES

1. Lovegrove RE, Javid M, Magee TR, Galland BB. A meta-analysis of 21,178 patients undergoing open or endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 2008;95:677-84.
2. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Reza Nouraei SA, Akthar AM, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 2007;116:398-105.

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

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

*Additional material for this article may be found online at [www.jvascsurg.org](http://www.jvascsurg.org).*

## **2. Fonction mitochondriale du muscle squelettique dans l'artériopathie des membres inférieurs : intérêt de la biopsie musculaire.**

L'insuffisance d'apport en oxygène a longtemps été considérée comme la principale cause des manifestations liées à l'artériopathie des membres inférieurs (AOMI), mais l'atteinte mitochondriale apparaît comme un facteur étiologique majeur.

L'AOMI va entraîner au niveau du muscle squelettique des cycles répétés d'ischémie reperfusion (IR). Ainsi, lorsque le patient marche, la demande en oxygène est majorée et le muscle se trouve en situation d'ischémie car les apports sanguins sont insuffisants pour pallier à la demande en oxygène. Par contre, lors du repos, le muscle squelettique se trouve en situation de reperfusion. Ce sont ainsi les cycles répétés d'IR qui sont délétères pour le muscle squelettique, entraînant une véritable mitochondriopathie, car ces cycles d'IR vont générer la production de radicaux libres d'une part, et conduire à l'inflammation d'autre part. Le stress oxydant va altérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, conduisant à une diminution de la production d'énergie, mais également à l'apoptose. Un cercle vicieux se crée, entraînant la production de radicaux libres et majorant les lésions de la chaîne respiratoire mitochondriale. La conjonction du stress oxydant et de l'inflammation va conduire aux lésions musculaires, nerveuses et cutanées observées dans l'AOMI.

Il existe plusieurs méthodes permettant d'étudier l'atteinte du muscle squelettique dans l'AOMI à partir de biopsies musculaires, telles que l'étude du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale par respirométrie, l'étude du stress oxydant par marquage au dihydroéthidium ou résonance paramagnétique électronique, l'étude de la capacité de rétention calcique, ainsi que les études histologiques. L'étude de biopsies musculaires de patients présentant une AOMI met en évidence une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, une augmentation du stress oxydant, une diminution de la capacité de rétention calcique, ainsi que des modifications histologiques avec un aspect myopathique du muscle, des lésions liées à l'inflammation, ainsi qu'une augmentation du nombre de fibres de type I.

En conclusion, les lésions de l'AOMI sont liées aux cycles répétées d'IR, ayant des conséquences directes sur la fonction mitochondriale, et peuvent être objectivées sur les biopsies musculaires de patients artériopathes. Des protocoles de conditionnement (ischémique ou pharmacologique) sont à l'étude, pour protéger la fonction mitochondriale des lésions liées à l'IR.

## Skeletal Muscle Mitochondrial Function in Peripheral Arterial Disease: Usefulness of Muscle Biopsy

A. Lejay, A.L. Charles, J. Zoll, J. Bouitbir,  
F. Thaveau, F. Piquard and B. Geny  
University of Strasbourg  
France

### 1. Introduction

#### 1.1 Peripheral arterial disease

Peripheral arterial disease (PAD) is a manifestation of atherosclerosis which produces stenoses and occlusions in lower limbs arteries. PAD was commonly divided in four stages, introduced by Rene Fontaine in 1954 (Fontaine *et al.*, 1954): stage 1 defined an asymptomatic patient, stage 2 defined a patient presenting with a significant impairment of his ability to walk (intermittent claudication). Then claudication worsens and the patient develops rest pain in stage 3, and non-healing ulcers or gangrene in stage 4.

Recently, other criteria have been proposed for the diagnosis of PAD. Stage 2 of Leriche is now called « functional ischemia », and stages 3 and 4 are now called « critical ischemia » (Norgren *et al.*, 2007). Critical ischemia is called this way because of its poor prognosis. With this new classification, the diagnosis of critical limb ischemia requires both clinical criteria, but also hemodynamic criteria (ankle-brachial index, toe pressure). Normal values of ankle-brachial index are between 0,9 and 1,3. PAD is characterized by ankle-brachial values under 0,9 (0,4-0,9: functional ischemia, <0,4: critical ischemia). The normal value of the toe pressure is 60-65 mm Hg, it can be normal or within the limits of the normal in functional ischemia, but it is commonly under 10 mm Hg in critical ischemia. These hemodynamic criteria objectify the arterial etiology of the lesions, because it is sometimes difficult to define the exact origin of rest pain or tissue loss (diabetes, venous insufficiency...).

Insufficient oxygen supply secondary to reduced blood flow is presumed to be the main physiologic cause for the manifestations of peripheral arterial disease, but more recently the presence of mitochondriopathy in chronically ischemic skeletal muscle has been proposed. Suboptimal energy production from defective mitochondria participates in PAD pathogenesis in addition to reduced oxygen supply (Marbini *et al.*, 1986; Lundgren *et al.*, 1989; Bhat *et al.*, 1999; Brass *et al.*, 2001; Pipinos *et al.*, 2008a)(Figure 1).

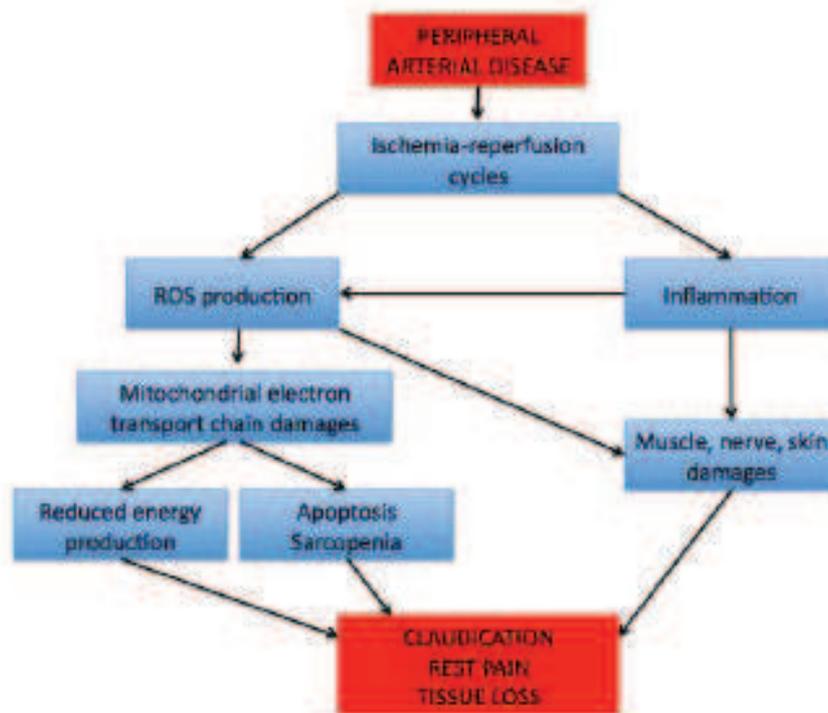


Fig. 1. Pathogenesis of peripheral arterial disease

## 1.2 Mitochondrial function and oxidative stress

Every action requires energy, and this energy is stored in adenosine triphosphate (ATP) molecules that are produced in the mitochondria by the process of oxidative phosphorylation. Mitochondria are present in every cell, but there are in high concentrations in muscle cells because high energetic requirements of muscles.

### 1.2.1 Structure of mitochondria

Mitochondria are enclosed within two membranes: the outer membrane and the inner membrane. The outer membrane is a relatively simple phospholipid bilayer, containing protein structures called porins which allow molecules of 10 kilodaltons in weight to pass through it. This explains why the outer membrane is completely permeable to nutrient molecules, ions, ATP and ADP molecules. The inner membrane is more complex in structure than the outer membrane because it contains electron transport chain, ATP synthetase, and transport proteins. It is freely permeable only to oxygen, carbon dioxide and water. The wrinkles, or folds, are organized into layers called cristae, which increase total surface area of the inner membrane (figure2).

Outer and inner membranes delineate two compartments: the intermembrane space, and the cytoplasmic matrix. The intermembrane space is located between the inner and the outer membranes. It has an important role in oxidative phosphorylation. The cytoplasmic matrix contains the enzymes that are responsible for citric acid cycle reactions. The matrix also contains dissolved oxygen, water, and carbon dioxide.

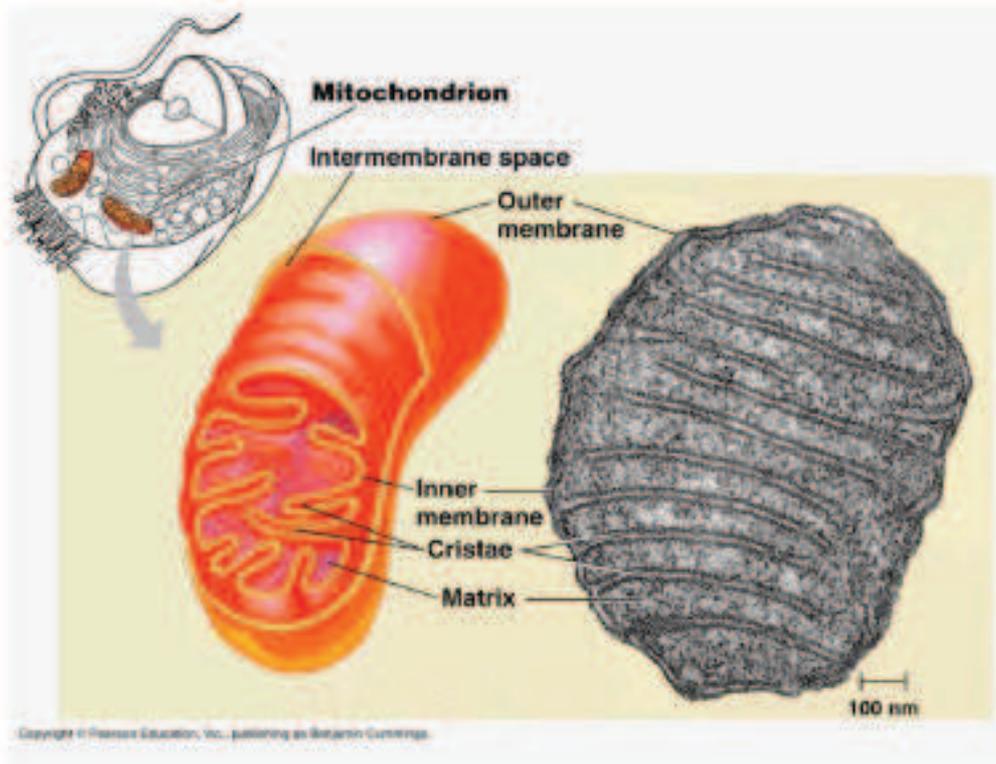


Fig. 2. Mitochondrial structure. (source: Pearson education, Inc., publishing as Benjamin Cummings).

### 1.2.2 Functions of mitochondria

One of the major mitochondrial functions is cellular respiration. It is a chemical process of releasing energy stored in glucose. The energy utilized in breaking down glucose is supplied by ATP molecules, and ATP molecules are produced by mitochondria. The entire process of aerobic cellular respiration is a three step process:

- Glycolysis: Glucose is a six carbon sugar. The enzymes in the cytoplasmic matrix initiate glycolysis in which a glucose molecule is oxidized to two molecules of three carbon sugars. Products of glycolysis are two molecules of ATP, two molecules of pyruvic acid and two NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) molecules (which are electron carrying molecules)

- Citric Acid Cycle (Krebs cycle): This is the second phase of cellular respiration. The three carbon molecules which have been produced as a result of glycolysis are converted into acetyl compounds. However, the intermediary reactions of this process yield ATP molecules of energy, NAD and FAD molecules too. NAD and FAD molecules are further reduced in the Citric Acid Cycle to high energy electrons
- Electron Transport: The electron transport chain is constituted of a series of electron carriers generated in the membrane of the mitochondria from Citric Acid Cycle. The ATP molecules are further produced by the chemical reactions of these electron carrier molecules. A eukaryotic cell produces about 36 ATP molecules after cellular respiration.

In fact, mitochondrial function in cellular energy metabolism is concerned with the processes of fatty acid and pyruvate oxidation, resulting in the formation of acetyl-CoA, which is subsequently oxidized in the Citric Acid Cycle. When combined, these processes generate reduced coenzymes, which deliver electrons to oxygen to form water, through the respiratory chain of the inner membrane. The whole process of fat and carbohydrate oxidation is strongly exergonic and the normal mitochondrion conserves the major part of this energy in the form of ADP phosphorylation to ATP. This dependence on oxygen is critical in skeletal muscle. Under normal circumstances, skeletal muscle has the capacity to increase its energy turnover, and this makes the transition from rest to exercise. Efficient oxygen delivery is very important for normal mitochondrial function, and patients suffering from peripheral arterial disease have a decreased blood flow to the legs due to arteriosclerosis, making less oxygen available to the mitochondria.

Other main mitochondrial functions are control of cell cycle, management of apoptosis, monitoring of cell differentiation, growth and development and reactive oxygen species production and clearance.

### 1.2.3 Mitochondria and reactive oxygen species

Mitochondria, main energy sources of the cells, are causes and targets of increased oxidative stress. Thus, the role of mitochondria extends far beyond energy production, as they are important generators of reactive oxygen species (ROS), which can act either as second messengers or as a source of cellular damage, depending on the produced amount. ROS are a double-edged sword: they are beneficial by playing an important role in cell signaling involved in antioxidant defense network, but could be harmful by inducing excessive oxidative stress resulting in protein carboxylation, lipids peroxidation and DNA damage. These free radicals have oxidizing properties, and they react in the environment where they are produced with a variety of biological substrates: fats, carbohydrates, proteins and DNA. There are also environmental factors that generate free radicals: pollution, sun exposure, smoking, consumption of alcohol or drugs, physical exercise. These situations induce an overproduction of reactive oxygen species. There are also defense systems that can regulate the production of these species: free radicals are neutralized by enzymatic systems (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase), elements (copper, zinc, iron, selenium), as well as antioxidants such as vitamins A, C and E (Figure 3).

ROS include radical species such as primary superoxide  $O_2^{\cdot-}$ , and its conjugated acid hydroperoxyl radical  $HO_2^{\cdot}$ . Also included are the hydroxyl ( $\cdot OH$ ), carbonate ( $CO_3^{\cdot-}$ ), peroxy ( $RO_2^{\cdot}$ ), and alkoxy ( $RO^{\cdot}$ ) radical. Also some non-radical species are ascribed to

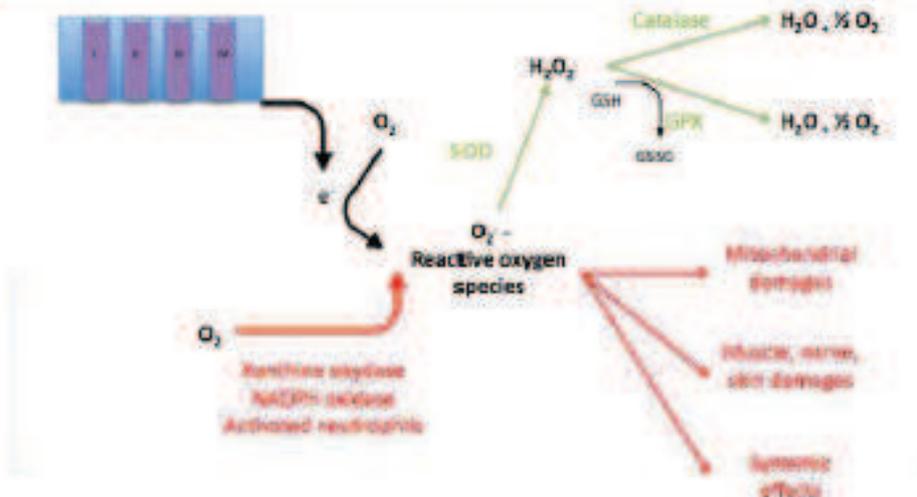


Fig. 3. Reactive oxygen species in peripheral arterial disease. SOD: superoxide dismutase; GPX: glutathione peroxidase

ROS, namely  $H_2O_2$ , HOCl, fatty acid hydroperoxides (FAOOH), reactive aldehydes, singlet oxygen and other compounds (Chance *et al.*, 1979). Superoxide anion  $O_2^{\cdot -}$  is the most important, it is a fairly stable compound, especially in an aqueous environment at neutral pH. Its toxicity is principally based on generation of further reactive species, called "downstream products" of  $O_2^{\cdot -}$ , which are then able to attack intracellular biomolecules.

There are currently seven separate sites of mitochondrial ROS production that have been identified (Figure 4) (Brand *et al.*, 2004).

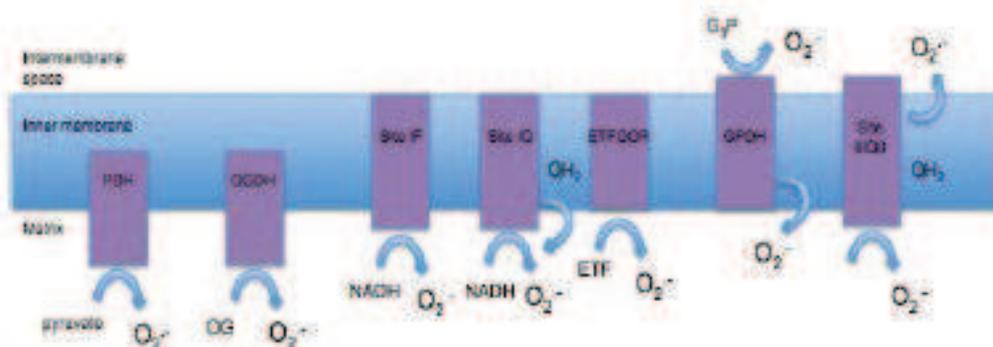


Fig. 4. Sites and topology of mitochondrial superoxide production. PDH: pyruvate dehydrogenase ; OGDH: 2-oxoglutarate dehydrogenase ; Site IF: NADH binding site of complex I ; Site IQ: ubiquinone reduction site of complex I ; ETFQOR: electron transferring flavoprotein ubiquinone oxidoreductase ; GPDH: glycerol 3-phosphate dehydrogenase ; Site IIIQO: quinone binding site of the Q-cycle in complex III.

The relative importance of each site to total superoxide production in isolated mitochondria is contentious, partly because of different assays, different substrates and different sources of mitochondria. Most assays of superoxide production from defined sites measure maximal capacities for superoxide production, and the actual rate from each site in the absence of inhibitors is not known. During reverse electron transport from succinate to NAD<sup>+</sup>, complex I can produce superoxide at high rates (Han *et al.*, 2001; Votyakova & Reynolds, 2001; Kushnareva *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2003; Turrens, 2003; Lambert & Brand, 2004), although the physiological relevance is unclear (Votyakova & Reynolds, 2001). During forward electron transport from NAD-linked substrates (which may be more physiological), most mitochondria produce superoxide at high rates after addition of inhibitors such as rotenone (for complex I) (Han *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; St-Pierre *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2003; Lambert & Brand, 2004) or antimycin A (for complex III) (Liu *et al.*, 2002; St-Pierre *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2004). Other physiologically relevant substrates, such as fatty acids and glycerol 3-phosphate, may cause superoxide production from sites that are less active during pyruvate oxidation, such as ETF-Q oxidoreductase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase.

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> in the matrix is converted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by matrix MnSOD, while O<sub>2</sub><sup>•-</sup> released to the intramembrane space is partly dismutated by intermembrane space CuZnSOD (Inoue *et al.*, 2005). Any residual O<sub>2</sub><sup>•-</sup> which diffuses into the cytosol is similarly converted by the cytosolic CuZnSOD. If any mitochondrial O<sub>2</sub><sup>•-</sup> can reach the extracellular space, it is then detoxified by extracellular CuZnSOD (SOD<sub>2</sub>) (Brand, 2010). Non-enzymatic lipoperoxidation is also a detoxification reaction. It can be considered not only as a detoxification reaction, but, due to its self-propagating nature, also as a new radical source initiated by the highly reactive radicals. Glutathione-based systems, including glutathione S transferase and the thioredoxin system, including peroxiredoxins, constitute the major redox buffer in the cytosol. Other detoxification systems (degrading H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ROS) are proteins of thioredoxin family, acting in concert with the thioredoxin-dependent peroxide reductase, and a family glutathione-S- transferase. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can be reduced to water by catalase or glutathione peroxidase, or alternatively to the hydroxyl radical in the presence of reduced copper or iron (Camello-Almaraz *et al.*, 2006).

Increased oxidative stress plays a key role in PAD and IR-induced muscular impairments. Both increased ROS secondary to mitochondrial dysfunction and decreased ROS catabolism are involved (Figures 1 and 5).

## 2. Mitochondrial and oxidative stress analysis of muscle biopsies

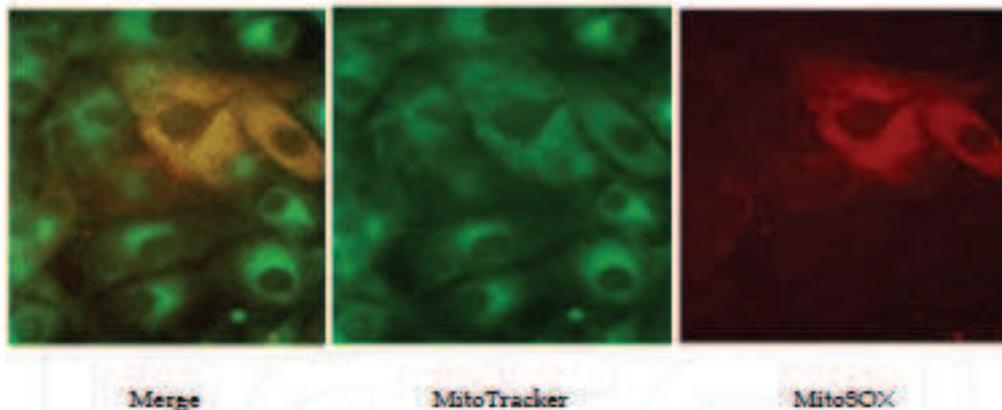
### 2.1 Histological methods

#### 2.1.1 Histological analysis of skeletal muscle mitochondria

Mitochondria can be detected in confocal microscopy by conventional fluorescent stains, such as rhodamine 123 and tetramethylrhodamine. These stains are readily sequestered by functioning mitochondria, but they are subsequently washed out of the cells once the mitochondrion's membrane potential is lost. This characteristic limits their use in experiments in which cells must be treated with aldehyde-based fixatives or other agents

that affect the energetic state of the mitochondria. To overcome this limitation, it is possible to use a series of mitochondrion selective stains (MitoTracker probes®) that are concentrated by active mitochondria and well retained during cell fixation. Because these mitochondrion selective stains are also retained following permeabilization, the sample retains the fluorescent staining pattern characteristic of live cells during subsequent processing steps for immunocytochemistry, in situ hybridization or electron microscopy.

MitoSOX® Red mitochondrial superoxide indicator is a fluorogenic dye for highly selective detection of superoxide in the mitochondria of live cells. It is live-cell permeant and is rapidly and selectively targeted to the mitochondria. Once in the mitochondria, it is oxidized by superoxide (but not by other reactive oxygen species) and exhibits red fluorescence. Oxidation of the probe is prevented by superoxide dismutase. The oxidation product becomes highly fluorescent (excitation/emission maxima of approximately 510/580 nm) upon binding to nucleic acids. Cells adhering to coverslips have to be covered by 1 or 2 mL of 5  $\mu$ M of MitoSOX® reagent working solution, and incubated for 10 minutes at 37°C, protected from light. They are then washed gently three times with warm buffer, and mounted in warm buffer for confocal microscopy imaging (Mukhopadhyay *et al.*, 2007) (figure 5).



**Fig. 5** Assessment of superoxide generation. MitoSOX Red stain (top panel) revealed the presence of superoxide anion MitoSOX Red colocalized with MitoTracker Green (middle panel) in merged images (bottom panels), indicating that the excess superoxide anion was concentrated in mitochondria (Quinzii *et al.*, 2008).

In transmission electron microscopy, mitochondrial ultrastructure can be studied. The material is fixed, embedded, sectioned, and then examined. It is important to note that the sections must be less than 0.1  $\mu$ m in thickness, even less than 0.05  $\mu$ m, in order to show the structural details described with enough clarity for profitable study of the mitochondria (Frey *et al.*, 2002) (figure 6).

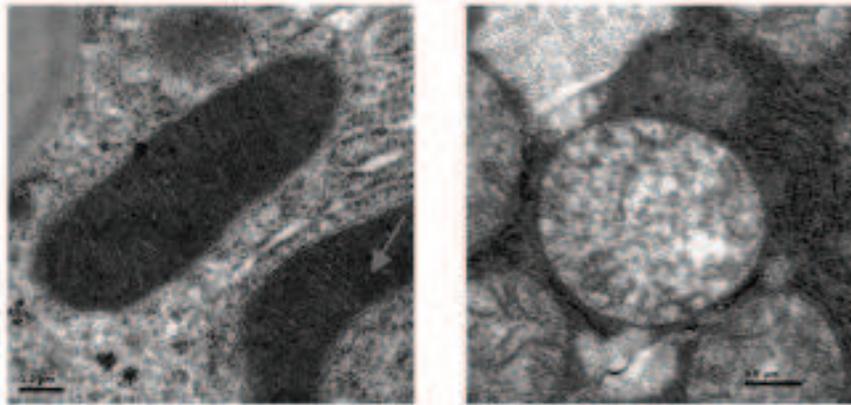


Fig. 6. Micrographs of transmission electron microscopy sections of mitochondria. TEM  $\times 60K$ . The left photo represent a healthy mitochondrion the arrow indicates the cristae; the right photo represents a swelling mitochondrion (Li *et al.*, 2010).

### 2.1.2 Microscopy fluorescence: Dihydroethidium staining

To detect the presence of ROS in skeletal muscles, serial sections (10  $\mu\text{m}$ -thick) are cut on a cryostat microtome, mounted into glass slides and incubated with 2.5  $\mu\text{M}$  dihydroethidium (DHE). DHE produces red fluorescence when oxidized to ethidium bromide (EtBr), mainly by superoxide anion. After staining, sections are examined under an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E800) and emission signal are recorded with a Zeiss filter (Dikalov *et al.*, 2007) (figure 7).

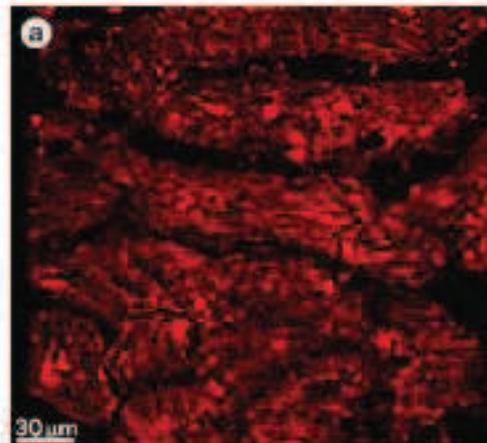


Fig. 7. A representative photo of Superoxide production by dihydroethidium staining of tissue in the acute phase of stress cardiomyopathy (Nef *et al.*, 2006)

Inhibitors of NADPH oxidase (diphenylene iodonium) and xanthine oxidase are known to reduce mitochondrial superoxide production through inhibiting NADH ubiquinone oxidoreductase (complex I) (Riganti *et al.*, 2004).

## 2.2 Functional methods

### 2.2.1 Mitochondrial respiratory chain complexes activities using saponin skinned fibres

The mitochondrial respiratory chain complexes activities study is described in an other chapter. This technique is based on the measure of oxygen consumption in skinned fibres in order to determine the functional oxidative capacity of the skeletal muscle in its cellular environment (Vekler *et al.*, 1987; Riganti *et al.*, 2004) (see the chapter from Charles *et al.* for much more explanations and the description of the methods).

### 2.2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production in permeabilized fibres

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production is assessed in permeabilized fibres (Kuznetsov *et al.*, 2008) in response to sequential addition of substrates and inhibitors (Anderson & Neuffer, 2006). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production is measured with Amplex Red reagent (Invitrogen), which reacts with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a 1:1 stoichiometry catalyzed by HRP (Horse Radish Peroxidase; Fluka Biochemika) to yield the fluorescent compound resorufin and molar equivalent O<sub>2</sub>. Resorufin has excitation/emission characteristics of 565/587 nm and is extremely stable once formed. Fluorescence is measured continuously [change in fluorescence ( $\Delta F$ )/sec] with a spectrofluorometer with temperature control and magnetic stirring. After a baseline,  $\Delta F$  (reactants only) is established; the reaction is initiated by addition of a permeabilized fibre bundle to 600  $\mu$ l of buffer Z with glutamate (5 $\mu$ M) and malate (2.5 $\mu$ M) as substrates for complex I and succinate (5 $\mu$ M) for complex II. ADP (2mM) is injected in the reaction buffer and led to a reduction in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release, which is expected when electron flow through the respiratory chain is stimulated. Finally, addition of the complex I inhibitor amytal (2mM) and the complex III inhibitor antimycin (5 $\mu$ M) led to interruption of normal electron flow and induced an increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release.

## 3. Mitochondrial dysfunctions during peripheral arterial disease

During PAD, significant muscles ischemia/reperfusion is well known to induce skeletal muscles alterations (Figure 1). The pathogenesis of PAD manifestations is lead to the development of athero-occlusive disease in the lower limb arteries. Arterial stenoses usually do not affect the blood supply at rest, but at the time of walking or other exercise, they make the leg ischemic and painful forcing the patient to rest. At rest, perfusion returns again to normal levels. These cycles of ischemia and reperfusion launch a cascade of inflammatory changes and induce the production of ROS in the skeletal muscle. Multiple daily ischemia/reperfusion events initiated by simple activities such as walking result, over time, in morphological and ultrastructural changes in both the contractile element of the muscle and its mitochondria. Dysfunctional mitochondria then further lower the already decreased (by compromised blood supply) energy levels in the pathologic muscle and become sources of ever increasing levels of ROS and possibly inducers of apoptosis. A vicious cycle is thus initiated gradually leading to deteriorating mitochondrial function and escalating ROS production with ongoing damage of every structure in the myocytes. Apoptosis, along with cellular necrosis (from ischemia, reactive oxygen species, and low energy levels), may then be induced, eventually leading to a severe myopathy that significantly affects the function and performance of PAD limbs. In addition, nerves, skin, and subcutaneous tissues

damages are formed, ultimately leading to the characteristically atrophic legs of patients with advanced PAD having thin muscles; brittle, hairless, and thin skin with shiny texture; and impaired sensorimotor function. On the basis of these concepts, it is easy to understand how claudication, rest pain, and tissue loss find their place in the heart of this continuum of events, coming into view as the external manifestations of ongoing tissue injury and deterioration (Blaisdell, 2002; Pipinos *et al.*, 2008a).

### 3.1 Selected experimental data (Table 1)

Author	Journal	Year	Histology	Oxidative stress	Respirometry
Makris	Vascular	2007	Myopathic features Drop in total protein content Increased mitochondrial content	Increased oxidative stress	Bioenergetic decline  Inadequate oxidative phosphorylation  Decreased ATP energy production
Pipinos II	J Vasc Surg	2000	Myopathic features  Increased mitochondrial content, more oxidative type fibres.	- Increased oxidative stress : xanthine oxidase and activated neutrophils are source of ROS	Decreased activities of complexes I, III, and IV.
Pipinos II	Vasc Endovasc Surg	2008b		- Alteration of activity and expression of MnSOD. - Damage to mtDNA	
Brass	Vasc Med	1996 2000			
Wallace	Am Heart J	2000	Increased mitochondrial content	Increased oxidative stress	-
Levak-Frank	J Clin Invest	1996	Increased mitochondrial content	-	-
Wredenberg	Proc Nath Acad Sci USA	1999			

Table 1. Experimental data

Peripheral arterial disease is a consequence of compromised blood supply to the ischemic limb (Brass, 1996; Brass & Hiatt, 2000). Experimental data show that skeletal muscle responds to inflow arterial occlusion with the development of myopathic histological changes, a drop in total protein content, and a trend toward decreased wet weight (Makris, et al., 2007; Pipinos, et al., 2008b). Peripheral arterial disease is characterized by a significant increase in the mitochondrial content of skeletal muscle, and mitochondrial proliferation is characteristic of mitochondrial diseases and aging (Levak-Frank et al., 1995; Wallace, 2000; Wredenberg et al., 2002; Makris et al., 2007; Pipinos et al., 2008b). In skeletal muscle, an upregulation of mitochondrial biogenesis may be associated with an alteration of muscle fibre type toward the more oxidative type I and IIa fibres (Pipinos et al., 2008b).

Defective mitochondria are central to this myopathy, through compromised performance as primary energy producers and regulators of oxygen radical species. Thus, PAD myopathy is characterized by an increased content of dysfunctional mitochondria having significant defects in electron transport chain complexes I, III, and IV (Pipinos et al., 2000; Pipinos et al., 2008b). These defects are associated with a bioenergetic decline, characterized by inadequate oxidative phosphorylation, decreased ATP energy production, and increased oxidative stress (Makris et al., 2007; Pipinos et al., 2008b). Ischemic skeletal muscle sustains substantial oxidative injuries indicated by an increase in protein carbonylation and lipid peroxidation adducts. Under resting conditions, a large proportion of cellular reactive oxygen species is produced in the mitochondria (Wallace, 2000).

Thus, ischemia/reperfusion is the central problem in animals with inflow arterial occlusion (Brevetti et al., 2001). Ischemia/reperfusion increases oxidative stress, triggers inflammation and oxidative damage to the tissues, and initiates mitochondrial injury and dysfunction. Mitochondrial dysfunction can then be perpetuated by repeated destructive cycles of ischemia/reperfusion, causing amplification of respiratory chain defects, compromised bioenergetics, increased reactive oxygen species production, diminished MnSOD antioxidant activity. The combination of compromised bioenergetics and worsening oxidative stress may then lead to progressive oxidative damage of structures in the myocytes (Brass, 1996; Brass & Hiatt, 2000; Makris et al., 2007; Pipinos et al., 2008a).

There are non-invasive techniques that can evaluate *in vivo* the mitochondrial energy transformation by the monitoring of the tissue oxygen level: either directly with the <sup>31</sup>phosphorous magnetic resonance spectroscopy (Hands et al., 1990; Greiner et al., 2006), or indirectly with infrared spectroscopy (Hands et al., 1986; Watanabe et al., 2004; Ubbink & Koopman, 2006). The <sup>31</sup>phosphorous magnetic resonance spectroscopy is used to determine the concentrations of metabolites involved in muscle energy metabolism (phosphocreatin, inorganic phosphate, and ATP). From these data, free ADP and pH may be calculated (Quistorff et al., 1993). The infrared spectroscopy is used to measure the state of oxygen saturation in hemoglobin and myoglobin in blood and muscle at a given time and a given location. It can be considered as an indirect measure of the muscle perfusion versus oxygen consumption (Comerota et al., 2003).

Mitochondrial function may also be evaluated by respirometry on muscle biopsies. The feasibility, indications, contra-indications are now well known and such a technique become usual in specialized centers. Thus, skeletal muscle biopsies can be obtained during surgery, or they can be obtained under local anesthesia. Biopsy sites can be anesthetized with a 2%

lidocaine solution, and 1.0 cm incisions can be made through the skin and gastrocnemius fascia. A modified 5 mm Bergstrom biopsy needle can then be inserted 10-15 mm and used to obtain 40 to 50 mg of skeletal muscle. Contraindications are essentially represented by bleeding disorders, infection at biopsy sites, or allergy to local anesthetics.

### 3.2 Selected clinical data (Table 2)

Author	Journal	Year	Histology	Oxidative stress	Respirometry
Makris	Vascular	2007	Myopathic features Increased mitochondrial content More type I fibres	Increased oxidative stress	Bioenergetic decline
Pipinos II	J Vasc Surg	2000		Increased oxidative stress : xanthine oxidase and activated neutrophils are source of ROS	Decreased activities of complexes I, III, and IV.
Pipinos II	Vasc Endovasc Surg	2008		Alteration of activity and expression of MnSOD Damage to mtDNA	
Brass	Vasc Med	2000		Increased oxidative stress	

Table 2. Clinical data.

Previous studies have shown that PAD is associated with alterations in skeletal muscle histology (Brass & Hiatt, 2000; Makris *et al.*, 2007; Pipinos *et al.*, 2006b). Necrotic and regenerating fibres as well as inflammation have been seen in the diseased legs in comparison to contralateral legs of patients with unilateral peripheral arterial disease hospitalized for surgical evaluation. Furthermore, in the setting of aortic aneurysm repair in human, light microscopy revealed a consistent granulocyte infiltration in the ischemic and reperfused skeletal muscle. Ultrastructural damage to the muscle fibers was seen during ischemia and became more severe upon reperfusion. The recruitment of granulocytes into the muscle tissue paralleled the activation of the blood complement system and an increase in circulating neutrophils (Formigli L *et al.*, 1992).

#### 3.2.1 Patients with functional ischemia

The <sup>31</sup>P phosphorous magnetic resonance spectroscopy examination shows a higher inorganic phosphate/phosphocreatin ratio compared to control patients (Hands *et al.*, 1986; Zatina *et al.*, 1986; Hands *et al.*, 1990). The infrared spectroscopy examination shows a large drop in

the oxygen saturation in the muscle and an increased oxygenation recovery time after exercise when compared to control patients (Kemp *et al.*, 2001; Comerota *et al.*, 2003). Histological examination shows more type I muscle fibres containing a high amount of mitochondria in the gastrocnemius muscle of patients with functional ischemia. In addition, the severity of the peripheral arterial disease was correlated with the increased percentage of type I fibres (Makitie & Teravainen, 1977).

### 3.2.2 Patients with critical limb ischemia

The <sup>31</sup>P-magnetic resonance spectroscopy examination shows a higher intracellular pH, and a higher inorganic phosphate/phosphocreatin ratio compared to control patients (Hands *et al.*, 1986; Zatina *et al.*, 1986; Hands *et al.*, 1990). The infrared spectroscopy examination shows a large decrease in the oxygen saturation in the muscle and an increased oxygenation recovery after surgery. Respirometry shows a reduced mitochondrial respiratory rate in the gastrocnemius muscle compared to control patients (Pipinos *et al.*, 2003; Pipinos *et al.*, 2006). The reduced respiratory rate is specifically located to complexes I, III and IV enzymes of the respiratory chain; probably due to reactive oxygen species generated damage (Sjostrom *et al.*, 1980; Pipinos *et al.*, 2003).

## 4. Improving mitochondrial function and reducing oxidative stress: selected experimental and clinical results (Table 3)

Author	Journal	Year	Type	Histology	Oxidative stress	Respirometry	Necrosis
Tran	Eur J Pharmacol	2011	Pre	-	Decreased superoxide production	C I, III and IV activities normalized	Reduced infarct size
Andreadou	Mini Rev Med Chem	2006a,b	Pre Post	-	-	-	
Martou	J Appl Physiol	2006	Pre	Normal morphology	-	-	-
Addison	Am J Physiol Heart Circ Physiol	2003	Pre	Attenuation of neutrophil accumulation	Decreased oxidative stress	No bioenergetic decline	-
Thaveau	J Vasc Surg	2007	Pre	-	-	Restoration of complexes I and II activities	-

Okorie	Eur Heart J	2011	Post		Decreased oxidative stress by inhibition of the opening of mPTP		
McAllister	Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol	2006	Post	-			
Eberlin	Plast Reconstr Surg	2009	Post	Decreased of injured fibres			Reduced infarct size
Charles	Br J Surg	2011	Post	-	Decreased oxidative stress Preserved antioxidant defense	Increased complexes I, II, III, and IV activities	
Tsubota	Eur J Vasc Endovasc Surg	2010	Post	Attenuation of neutrophil accumulation			Reduced tissue necrosis

Table 3. Effects of pre- and post-conditioning. This table summarizes clinical studies realized on pre- or postconditioning.

#### 4.1 Ischemic pre- and post-conditioning

Besides reducing preoperative ischemic time and surgery duration, ischemic preconditioning - defined as brief episodes of ischemia/reperfusion applied before sustained ischemia- decreases skeletal muscle mitochondrial dysfunction, enhances limb and remote organ protections. Furthermore, remote and local ischemic preconditioning equivalently protects skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping (Mansour *et al.*, in Press). Nevertheless, ischemia occurrence is difficult to predict and might limit a broader use of ischemic preconditioning. Controlled reperfusion appears thus as a valuable therapeutic approach after limb ischemia and ischemic post-conditioning, characterized by repeated cycles of IR performed at the onset of reperfusion, appeared safe and easy to perform.

Ischemic preconditioning has been mainly elucidated in experimental cardiac ischemia. Ischemic preconditioning utilizes endogenous as well as distant mechanisms in skeletal muscle, liver, lung, kidney, intestine and brain in animal models to convey varying degrees of protection from ischemia/reperfusion injury (Ambros *et al.*, 2007). Specifically, preconditioned tissues exhibit altered energy metabolism, better electrolyte homeostasis and genetic reorganization, as well as less oxygen-free radicals and activated neutrophils release, reduced apoptosis and better microcirculatory perfusion. To date, there are few human studies, but trials suggest that different organ in human such as heart, liver, lung and

skeletal muscle acquire protection after ischemia/reperfusion (Sjostrom *et al.*, 1980; Ali *et al.*, 2007; Cheung M *et al.*, 1996; Kharbanda *et al.*, 2002). It has been showed that ischemic preconditioning positively influenced muscle metabolism during reperfusion, and this results in an increase in phosphocreatin production and higher oxygen consumption (Andreas *et al.*, 2011).

Experimental data showed that ischemic postconditioning confers protection against different organ injuries caused by longer circulatory occlusions during elective major vascular surgeries, because it causes a significant reduction in systemic inflammatory response (TNF-alpha, oxygen-derived free radicals) (Eberlin *et al.*, 2009). Besides the heart (Skyschally *et al.*, 2009), postconditioning is also effective in salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury and the mechanism likely involves inhibition of opening of the mPTP and/or reduced oxidative stress (Szejarto *et al.*, 2009; Tsubota *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010; Guyrkovic *et al.*, 2011; Mc Allister *et al.*, 2008; Charles *et al.*, 2011). There are few human studies, but it has been showed that postconditioning by intermittent early reperfusion reduces ischemia/reperfusion injury, that might depend on K(ATP) channel activation, and is mimicked by inhibition of the mPTP at reperfusion (Okorie *et al.*, 2011).

#### 4.2 Pharmacological protection of skeletal muscle in the setting of ischemia/reperfusion

Although preconditioning is a powerful form of protection, its clinical application is limited because of practical reasons. In fact, the short ischemic insults in preconditioning have to be applied before the onset of sustained period of ischemia which cannot be precisely anticipated. On the contrary, the very brief insults in postconditioning have to be applied immediately after the end of the long ischemia thus making the intervention more easily applicable. Both mechanisms limit the reperfusion injury but easier approaches deserve to be studied.

Pharmacological preconditioning and postconditioning represent ideal alternatives that may substitute the short ischemic insults for pharmaceuticals means. The components of preconditioning share two main pathways, one that involves the mitochondrial K(ATP) channels- free radicals and PKC and another one that involves adenosine and PKC. Reperfusion injury salvage kinases (RISK) prevent the mitochondrial permeability transition pores (mPTP) opening which destroy the mitochondria and cause cell death. PC *via* PKC and postconditioning *via* gradual restoration of pH at reperfusion up-regulate RISK and preserve viable part of the ischemic region. In order to confer pharmacological protection, novel therapeutic strategies, based on the knowledge of the ligands, of the receptors and of the intracellular signaling pathways have emerged (Addison *et al.*, 2003; Gamboa *et al.*, 2003; Martou *et al.*, 2006; Andreadou *et al.*, 2006b). Adenosine, nicorandil, tempol, coenzyme Q and other agents (Addison *et al.*, 2003; Gamboa *et al.*, 2003; Martou *et al.*, 2006; Thaveau *et al.*, 2010) have been already used as pharmacological mimetics of ischemic preconditioning. Furthermore, agents that increase RISK or directly prevent mPTP are also under investigation as postconditioning analogues (Andreadou *et al.*, 2006a; Tsubota *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2011). Antioxidant systems are also important: several endogenous antioxidant systems are found in muscle tissue, these include alpha-tocopherol, histidine-containing dipeptides, and antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase, superoxide dismutase,

and catalase. The contribution of alpha-tocopherol to the oxidative stability of skeletal muscle is largely influenced by diet. Dietary supplementation of tocopherol has been shown to increase muscle alpha-tocopherol concentrations and to inhibit lipid oxidation. Dietary selenium supplementation has also been shown to increase the oxidative stability of muscle presumably by increasing the activity of glutathione peroxidase, and dietary restriction improves systemic and muscular oxidative stress (Rodrigues *et al.*, 2011). The oxidative stability of skeletal muscle is also influenced by the histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine (Chan & Decker, 1994).

## 5. Conclusions / Perspectives

Mitochondria are the main energy source of the cells and mitochondrial dysfunction is associated with cell and organ impairment. Consistently, IR has been shown to induce skeletal muscle mitochondrial dysfunctions in animals and humans and improving skeletal muscle mitochondrial function is an interesting and clinically pertinent therapeutic goal. Indeed, improving skeletal muscle mitochondrial function enhances walking capacities in patients suffering from peripheral arterial disease.

Muscle biopsy allows to precisely determine the deleterious effects of IR on skeletal muscle and can be used to better stratify patient's risk and to guide therapy. Ischemic pre- and post-conditioning and pharmacologic conditioning allows protection of skeletal muscle in the setting of ischemia/reperfusion, decreasing mitochondrial respiratory chain injury, reducing reactive oxygen species (ROS) production and enhancing muscles antioxidant defence.

Future work will be useful to determine whether even smaller biopsies, analyzed after being frozen, might yield the same information.

## 6. References

- Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, Zhong A, Moses M, Forrest CR & Pang CY. (2003). Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H1435-1443.
- Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraei SA, Akthar AM, Boyle JR, Varty K, Kharbanda RK, Dufka DP, & Gaunt ME. (2007). Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 116,196-105.
- Ambros JT, Herrero-Fresneda I, Borau OG & Boira JM. (2007). Ischemic preconditioning in solid organ transplantation: from experimental to clinics. *Transpl Int* 20, 219-229.
- Anderson EJ & Neuffer PD. (2006). Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C044-851.
- Andreadou I, Iliodromitis EK, Koufaki M, Farmakis D, Tsotinis A & Kremastinos DT. (2008a). Alternative pharmacological interventions that limit myocardial infarction. *Curr Med Chem* 15, 3204-3213.

- Andreadou I, Iliodromitis EK, Koufaki M & Kremastinos DT. (2006b). Pharmacological pre- and post- conditioning agents: reperfusion-injury of the heart revisited. *Mini Rev Med Chem* 8, 952-959.
- Andreas M, Schmid AI, Keilani M, Doberer D, Bartko J, Crevenna R, Moser E & Wolzt M. (2011). Effect of ischemic preconditioning in skeletal muscle measured by functional magnetic resonance imaging and spectroscopy: a randomized crossover trial. *J Cardiovasc Magn Reson* 13, 32.
- Bhat HK, Hiatt WR, Hoppel CL & Brass EP. (1999). Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Circulation* 99, 807-812.
- Blaisdell FW. (2002). The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 10, 620-630.
- Brand MD. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 45, 466-472.
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL & Parker N. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 37, 755-767.
- Brass EP. (1996). Skeletal muscle metabolism as a target for drug therapy in peripheral arterial disease. *Vasc Med* 1, 55-59.
- Brass EP & Hiatt WR. (2000). Acquired skeletal muscle metabolic myopathy in atherosclerotic peripheral arterial disease. *Vasc Med* 5, 55-59.
- Brass EP, Hiatt WR, Gardner AW & Hoppel CL. (2001). Decreased NADH dehydrogenase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase in peripheral arterial disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H603-609.
- Brevetti LS, Paek R, Brady SE, Hoffman JL, Sarkar R & Messina LM. (2001). Exercise-induced hyperemia unmasks regional blood flow deficit in experimental hindlimb ischemia. *J Surg Res* 96, 21-26.
- Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ & Camello PJ. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C1082-1088.
- Chan KM & Decker EA. (1994). Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 34, 403-426.
- Chance B, Sies H & Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605.
- Charles AL, Guilbert AS, Bouitbir J, Goette-Di Marco P, Enache I, Zoll J, Piquard F & Geny B. (2011). Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg* 96, 511-516.
- Cheung MM, Kharbanda RK & Konstantinov IE. (2006). Randomized controlled trial of the effects of the remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol* 47, 2277-2282.
- Comerotz AJ, Throm RC, Kelly P & Jaff M. (2008). Tissue (muscle) oxygen saturation (StO<sub>2</sub>): a new measure of symptomatic lower-extremity arterial disease. *J Vasc Surg* 38, 724-729.

- Dikalov S, Griending KK & Harrison DG. (2007). Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 49, 717-727.
- Eberlin KR, McCormack MC, Nguyen JT, Tafidede HS, Randolph MA & Austen WG, Jr. (2009). Sequential limb ischemia demonstrates remote postconditioning protection of murine skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg* 123, 85-165.
- Fontaine R, Kim M & Kierny R. (1954). [Surgical treatment of peripheral circulation disorders]. *Helv Chir Acta* 21, 499-533.
- Formigli L, Lombardo LD, Adembri C, Brunelleschi S, Ferrari E, Novelli GP. Neutrophils as mediators to human skeletal muscle ischemia-reperfusion syndrome. *Hum Pathol* 1992;23:627-34.
- Frey TG, Renken CW & Perkins GA. (2002). Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta* 1555, 196-203.
- Gamboa A, Ertl AC, Costa F, Farley G, Manier ML, Hachey DL, Diedrich A & Biaggioni I. (2005). Blockade of nucleoside transport is required for delivery of intraarterial adenosine into the interstitium: relevance to therapeutic preconditioning in humans. *Circulation* 108, 2631-2635.
- Greiner A, Esterhammer R, Meisner H, Biebl M, Muhlthaler H, Fraedrich G, Jaschke WR & Schocke MF. (2006). High-energy phosphate metabolism during incremental calf exercise in patients with unilaterally symptomatic peripheral arterial disease measured by phosphor 31 magnetic resonance spectroscopy. *J Vasc Surg* 43, 978-986.
- Gyurkovics E, Aranyi P, Stangl R, Onody P, Ferreira G, Lotz G, Kupczulik P, & Smjarto A. (2011). Postconditioning of the lower limb - protection against the reperfusion syndrome. *J Surg Res* 169,139-147.
- Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D & Cadenas E. (2003). Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 278, 5557-5563.
- Han D, Williams E & Cadenas E. (2001). Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 353, 411-416.
- Hands LJ, Payne GS, Bore PJ, Morris PJ & Radda GK. (1986). Magnetic resonance spectroscopy in ischaemic feet. *Lancet* 2, 1391.
- Hands LJ, Sharif MH, Payne GS, Morris PJ & Radda GK. (1990). Muscle ischaemia in peripheral vascular disease studied by 31P-magnetic resonance spectroscopy. *Eur J Vasc Surg* 4, 637-642.
- Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I & Utsumi K. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 10, 2495-2505.
- Kemp GJ, Roberts N, Bimson WE, Bakran A, Harris PL, Gilling-Smith GL, Brennan J, Rankin A & Frostick SP. (2001). Mitochondrial function and oxygen supply in normal and in chronically ischemic muscle: a combined 31P magnetic resonance spectroscopy and near infrared spectroscopy study in vivo. *J Vasc Surg* 34, 1103-1110.

- Kharbanda RK, Motensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, Vogel M, Sorensen K, Redington AN, & MacAllister R. (2002). Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 106,2881-2885.
- Kushnareva Y, Murphy AN & Andreyev A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem J* 368, 545-553.
- Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R & Kunz WS. (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 3, 965-976.
- Lambert AJ & Brand MD. (2004). Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 279, 39414-39420.
- Levak-Frank B, Radner H, Walsh A, Stollberger R, Knipping G, Hoefler G, Sattler W, Weinstock PH, Breslow JL & Zechner R. (1995). Muscle-specific overexpression of lipoprotein lipase causes a severe myopathy characterized by proliferation of mitochondria and peroxisomes in transgenic mice. *J Clin Invest* 96, 976-986.
- Li YG, Ji DF, Zhong S, Shi LG, Hu GY & Chen S. (2010). Saponins from *Panax japonicus* protect against alcohol-induced hepatic injury in mice by up-regulating the expression of GPX3, SOD1 and SOD3. *Alcohol Alcohol* 45, 320-331.
- Liu Y, Fiskum G & Schubert D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80, 760-767.
- Lundgren F, Dahllof AG, Schersten T & Bylund-Fellenius AC. (1989). Muscle enzyme adaptation in patients with peripheral arterial insufficiency: spontaneous adaptation, effect of different treatments and consequences on walking performance. *Clin Sci (Lond)* 77, 485-493.
- Maljutic J & Teravainen H. (1977). Histochemical changes in striated muscle in patients with intermittent claudication. *Arch Pathol Lab Med* 101, 658-663.
- Makris KI, Nella AA, Zhu Z, Swanson SA, Casale GP, Gutti TL, Judge AR & Pipinos II. (2007). Mitochondriopathy of peripheral arterial disease. *Vascular* 15, 336-343.
- Mansour Z, Bouitbir J, Charles AL, Talha S, Kindo M, Pottecher J, Zoll J & Geny B. (in Press). Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rats skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg*.
- Marbini A, Gemignani F, Scoditti U, Rustichelli P, Bragaglia MM & Govoni E. (1986). Abnormal muscle mitochondria in ischemic claudication. *Acta Neurol Belg* 86, 304-310.
- Martou G, O'Blenes CA, Huang N, McAllister SE, Neligan PC, Ashrafpour H, Pang CY & Lipa JE. (2006). Development of an in vitro model for study of the efficacy of ischemic preconditioning in human skeletal muscle against ischemia-reperfusion injury. *J Appl Physiol* 101, 1335-1342.
- McAllister SE, Ashrafpour H, Cahoon N, Huang N, Moses MA, Neligan PC, Forrest CR, Lipa JE & Pang CY. (2008). Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle

- from reperfusion injury: efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R681-689.
- Mukhopadhyay P, Rajesh M, Yoshihiro K, Hasko G & Pacher P. (2007). Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 203-208.
- Muller FL, Liu Y & Van Remmen H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 279, 49064-49073.
- Nef HM, Mollmann H, Troidl C, Kostin S, Bottger T, Voss S, Hilpert P, Krause N, Weber M, Rolf A, Dill T, Schaper J, Hamann CW & Elsasser A. (2006). Expression profiling of cardiac genes in Tako-Tsubo cardiomyopathy: insight into a new cardiac entity. *J Mol Cell Cardiol* 44, 395-404.
- Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, Bell K, Caporusso J, Durand-Zaleski I, Komori K, Lammner J, Liapis C, Novo S, Rasavi M, Robbs J, Schaper N, Shigematsu H, Sapoval M, White C, White J, Clement D, Creager M, Jaff M, Mohler E, 3rd, Rutherford RB, Sheehan P, Sillezen H & Rosenfield K. (2007). Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 33 Suppl 1, S1-75.
- Okorie MI, Bhavsar DD, Ridout D, Charakida M, Deanfield JE, Loukogeorgakis SP & MacAllister FJ. (2011). Postconditioning protects against human endothelial ischaemia-reperfusion injury via subtype-specific KATP channel activation and is mimicked by inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *Eur Heart J* 32, 1266-1274.
- Park JW, Kang JW, Jeon WJ & Na HS. (2010). Postconditioning protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Microsurgery* 30, 223-229.
- Pipinos II, Judge AR, Selsby JT, Zhu Z, Swanson SA, Nella AA & Dodd SL. (2008a). The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: Part 2. Oxidative stress, neuropathy, and shift in muscle fiber type. *Vasc Endovascular Surg* 42, 101-112.
- Pipinos II, Judge AR, Zhu Z, Selsby JT, Swanson SA, Johanning JM, Baxter BT, Lynch TG & Dodd SL. (2006). Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease. *Free Radic Biol Med* 41, 262-269.
- Pipinos II, Sharov VG, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Todor A, Filis KA & Sabbah HN. (2003). Abnormal mitochondrial respiration in skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 36, 827-832.
- Pipinos II, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A & Boska MD. (2000). Phosphorus 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy suggests a mitochondrial defect in claudicating skeletal muscle. *J Vasc Surg* 31, 944-952.
- Pipinos II, Swanson SA, Zhu Z, Nella AA, Weiss DJ, Gutt TL, McComb RD, Baxter BT, Lynch TG & Casale GP. (2008b). Chronically ischemic mouse skeletal muscle exhibits myopathy in association with mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R290-296.
- Quinzii CM, Lopez LC, Von-Moltke J, Nairi A, Krishna S, Schuelke M, Salviati L, Navas P, DiMauro S & Hirano M. (2008). Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *FASEB J* 22, 1874-1885.

- Quistorff B, Johansen L & Sahlin K. (1993). Absence of phosphocreatine resynthesis in human calf muscle during ischaemic recovery. *Biochem J* 291 (Pt 3), 661-666.
- Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, Costamagna C, Bosia A & Ghigo D. (2004). Diphenyletiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *J Biol Chem* 279, 47726-47731.
- Rodrigues L, Crisostomo J, Matafome P, Louro T, Nunes E & Seica R. (2011). Dietary restriction improves systemic and muscular oxidative stress in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Physiol Biochem*.
- Skyschally A, van Caster P, Iliodromitis EK, Schultz R, Kremastinos DT & Heusch G. (2009). Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. *Basic Res Cardiol* 104, 469-483.
- Sjostrom M, Angquist KA & Riss O. (1980). Intermittent claudication and muscle fiber fine structure: correlation between clinical and morphological data. *Ultrastruct Pathol* 1, 309-326.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ & Brand MD. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277, 44784-44790.
- Szijarto A, Gyurkovics E, Aranyi P, Onody P, Stangl R, Tatrai M, Lotz G, Mihaly Z, Hegedus V, Blazovics A & Kupcsuljok P. (2009). Effect of postconditioning in major vascular operations on rats. *Magy Seb* 62,180-187.
- Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, Chakfé N, Kretz JG, Piquard F & Geny B. (2007). Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 46,541-547.
- Thaveau F, Zoll J, Bouitbir J, N'Guessan B, Plobner P, Chakfe N, Kretz JG, Richard R, Piquard F & Geny B. (2010). Effect of chronic pre-treatment with angiotensin converting enzyme inhibition on skeletal muscle mitochondrial recovery after ischemia/reperfusion. *Fundam Clin Pharmacol* 24, 333-340.
- Tran TP, Tu H, Pipinos II, Muellenman RL, Albadawi H & Li YL. (2011). Tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscles: Involvement of superoxide. *Eur J Pharmacol* 650, 326-334.
- Tsubota H, Marui A, Esaki J, Bir SC, Ikeda T & Sakata R. (2010). Remote postconditioning may attenuate ischaemia-reperfusion injury in the murine hindlimb through adenosine receptor activation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 40, 804-809.
- Turrens JF. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Ubbink DT & Koopman B. (2006). Near-infrared spectroscopy in the routine diagnostic work-up of patients with leg ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 31, 394-400.
- Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI & Saks VA. (1967). Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim Biophys Acta* 892, 191-196.
- Votyakova TV & Reynolds IJ. (2001). DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79, 266-277.
- Wallace DC. (2000). Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. *Am Heart J* 139, S70-S85.

### **3. Participation mitochondriale aux lésions d'ischémie-reperfusion du muscle squelettique.**

La mitochondrie assure la production d'énergie de la cellule à partir de la chaîne respiratoire mitochondriale. C'est aussi une source très importante de radicaux libres. Ces radicaux libres peuvent avoir un rôle de seconds messagers en activant les défenses anti-oxydantes de la cellule, ou alors au contraire un rôle délétère, en fonction de leur concentration. La mitochondrie participe également à l'apoptose, possédant au niveau de sa membrane interne le pore de transition de perméabilité. L'augmentation de calcium intracellulaire va entraîner l'ouverture du pore de transition de perméabilité, et ainsi guider la cellule vers la voie de l'apoptose. L'ouverture du pore de transition de perméabilité génère également la production de radicaux libres.

Une dysfonction mitochondriale va être pathologique pour l'organisme. Les patients porteurs d'une artériopathie des membres inférieurs présentent une diminution de leur capacités oxydatives. Les défenses anti-oxydantes sont également altérées chez ces patients, qui ne peuvent plus lutter contre la production accrue et trop importante de radicaux libres produite. Ceci va conduire à des dommages protéiques et lipidiques au niveau du muscle squelettique. Ces patients présentent enfin une altération de la capacité de rétention calcique, générant l'ouverture du pore de transition de perméabilité, et conduisant la cellule à l'apoptose.

Ainsi, dans l'artériopathie des membres inférieurs, la mitochondrie joue un rôle central, avec une altération des capacités oxydatives précédée par une augmentation de la production de radicaux libres. La connaissance de la physiopathologie des lésions d'ischémie-reperfusion au niveau mitochondrial ouvre ainsi la voie à des thérapeutiques prometteuses, telles que le conditionnement ischémique ou le conditionnement pharmacologique.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biociel](http://www.elsevier.com/locate/biociel)



Organelles in focus

## Mitochondria: Mitochondrial participation in ischemia–reperfusion injury in skeletal muscle



Anne Lejay<sup>a,b</sup>, Alain Meyer<sup>a,c</sup>, Anna-Isabel Schlagowski<sup>a,c</sup>, Anne-Laure Charles<sup>a</sup>, François Singh<sup>a,c</sup>, Jamal Bouitbir<sup>d</sup>, Julien Pottecher<sup>a,e</sup>, Nabil Chakfé<sup>a,b</sup>, Joffrey Zoll<sup>a,c</sup>, Bernard Geny<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Equipe d'Accueil 3072, Mitochondrie, Stress oxydant et Protection Musculaire, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, Institut de Physiologie, 67000 Cedex, France

<sup>b</sup> Service de chirurgie vasculaire et transplantation rénale, Pôle de cardiologie, Hôpitaux Universitaires, CHRU de Strasbourg, 67000 Cedex, France

<sup>c</sup> Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Pôle de Pathologie Thoracique Hôpitaux Universitaires, CHRU de Strasbourg, 67000 Cedex, France

<sup>d</sup> Swiss Center for Applied Human Toxicology (SCAHT), University of Basel, Klingelbergstrasse 61, 4056 Basel, Switzerland

<sup>e</sup> Service d'anesthésie – réanimation chirurgicale Hautepierre, Pôle anesthésie-réanimations chirurgicales-SAMU/SMUR, Hôpitaux Universitaires, CHRU de Strasbourg, 67000 Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 December 2013

Received in revised form 7 February 2014

Accepted 16 February 2014

Available online 26 February 2014

#### Keywords:

Mitochondria

Ischemia–reperfusion

Oxidative stress

Vascular disease

Muscle conditioning

### ABSTRACT

Irrespective of the organ involved, restoration of blood flow to ischemic tissue is vital, although reperfusion *per se* is deleterious. In the setting of vascular surgery, even subtle skeletal muscle ischemia contributes to remote organ injuries and perioperative and long-term morbidities. Reperfusion-induced injury is thought to participate in up to 40% of muscle damage.

Recently, the pathophysiology of lower limb ischemia–reperfusion (IR) has been largely improved, acknowledging a key role for mitochondrial dysfunction mainly characterized by impaired mitochondrial oxidative capacity and premature mitochondrial permeability transition pore opening. Increased oxidative stress triggered by an imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and clearance, and facilitated by enhanced inflammation, appears to be both followed and instigated by mitochondrial dysfunction.

Mitochondria are both actors and target of IR and therapeutic strategies modulating degree of ROS production could enhance protective signals and allow for mitochondrial protection through a mitohormesis mechanism.

© 2014 Published by Elsevier Ltd.

### 1. Organelle facts

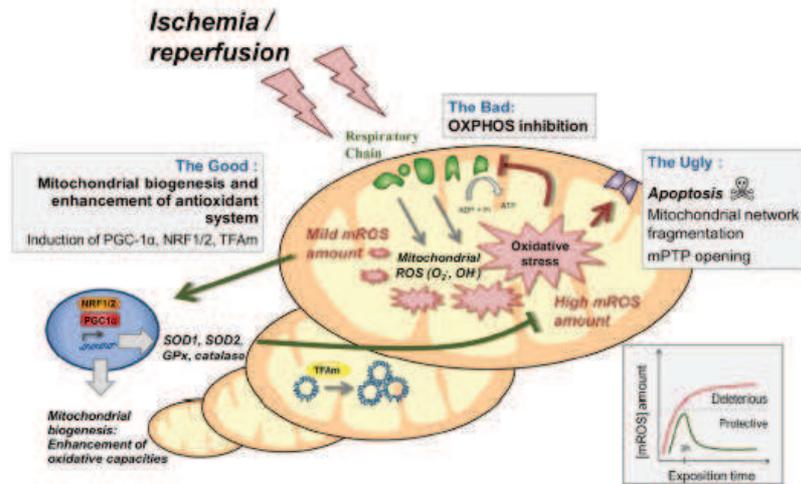
- Mitochondria produce ATP, the main energy source of cells and generate ROS, acting either as causes of cellular injuries or as second messengers allowing mitohormesis.
- Mitohormesis is a phenomenon triggered by moderate oxidative stress activating mitochondrial biogenesis and therefore improving cellular and mitochondrial antioxidant capacities.
- Ischemia–reperfusion increases oxidative stress, inflammation and triggers oxidative damage in tissues.

- Lower limb ischemia–reperfusion initiates muscle mitochondrial dysfunctions including reduced oxidative capacity and mitochondrial pore transition opening.
- Skeletal muscle injuries aggravate the prognosis of patients suffering from peripheral arterial disease.
- Ischemic conditioning generally protects skeletal muscle, reducing ROS production, inflammation and mitochondrial dysfunctions.

### 2. Introduction

Life requires energy, and this energy is stored in adenosine triphosphate (ATP) molecules that are produced in the mitochondria by oxidative phosphorylation. The roles of mitochondria extend far beyond energy production, as they are important generators of reactive oxygen species (ROS), which can either act as second messengers or as a source of cellular damage, depending on the amount produced.

\* Corresponding author at: Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles et Equipe d'Accueil 3072, Université et Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67001 Strasbourg, France. Tel.: +33 3 69550879; fax: +33 3 69 55 18 26.  
E-mail address: [Bernard.Geny@chru-strasbourg.fr](mailto:Bernard.Geny@chru-strasbourg.fr) (B. Geny).



**Fig. 1.** Mitochondria and reactive oxygen species interactions: the good, the bad and the ugly. ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; GPx, glutathione peroxidase; mPTP, mitochondrial permeability transition pore; ROS, reactive oxygen species; NRF, nuclear respiratory factor; PGC-1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha; Pi, inorganic phosphate; SOD, superoxide dismutase; TFAM, transcription factor A, mitochondrial.

Peripheral arterial disease (PAD) is a very common manifestation of atherosclerosis related to lower limb arterial stenosis or occlusions. The resulting ischemia leads to exercise or resting pain and, ultimately, to tissue necrosis resulting in leg amputation.

Insufficient oxygen supply was long presumed to be the main and sole cause for the manifestations of PAD; however, reperfusion-related impairment in skeletal muscle mitochondria associated with oxidative stress now appear as key mechanisms.

Such recent advances in mitochondrial participation to IR injury in skeletal muscle support new therapeutic approaches targeting mitochondria. Reducing the amount of ROS perceived by the cells might allow for a shift from a vicious (increased ROS, increased mitochondrial dysfunction, further ROS increase and oxidative damage) to a virtuous cycle (ROS signaling, mitochondrial protection and antioxidative system stimulation) (Fig. 1).

## 2.1. Organelle function and cell physiology

The physiological functions of mitochondria include ATP production, ROS generation and detoxification, apoptosis involvement, regulation of cytoplasmic and mitochondrial matrix calcium, metabolite synthesis and catabolism. An abnormality in any of these processes can be termed as mitochondrial dysfunction and can impair cell physiology which, when considering skeletal muscle cells, includes contractility and participation in glycemic control.

### 2.1.1. Oxidative phosphorylation

This process allows the production by the mitochondrial respiratory chain complexes of cellular free energy in the form of ATP and is one of the most prominent functions of mitochondria. Maximal oxidative capacity varies widely depending on the prominence of muscle fiber types (Meyer et al., 2014) and exercise capacity appears linked to skeletal muscle mitochondrial oxidative capacities and coupling. Interestingly, type I muscle fibers (slow-twitch oxidative fibers with high mitochondrial content) participate in euglycemia maintenance, as opposed to the more glycolytic type II fibers (Dela and Helge, 2013).

### 2.1.2. Mitochondrial permeability transition pore (mPTP)

An increase in calcium concentration in the mitochondrial matrix triggers this high-conductance inner membrane channel opening. While transient openings may serve the purpose of providing a fast Ca<sup>2+</sup> release mechanism, persistent mPTP opening is followed by a deregulated release of matrix Ca<sup>2+</sup>, termination of oxidative phosphorylation, matrix swelling with inner membrane unfolding and eventually outer membrane rupture with release of apoptotic proteins and cell death. Pore opening can also cause production of reactive oxygen species, as shown by the occurrence of "superoxide flashes" triggered by transient openings of the mPTP in cardiomyocytes (Wang et al., 2008). The molecular nature of mPTP remains under debate. The long-standing notion that mPTP formation occurs at contact sites of the inner and outer membranes through voltage-dependent anion channel (VDAC) and the adenine nucleotide translocator (ANT) is unlikely since VDAC- and ANT-null mitochondria still display a cyclosporin A permeability transition. Interestingly, reconstituted dimers of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase form a channel with properties identical to those of the mPTP, leading to the hypothesis that complex V dimers may actually form the pore (Bernardi, 2013).

### 2.1.3. Mitochondrial dynamics

Mitochondria are highly dynamic organelles that undergo fission (division) and fusion (joining). Mitochondrial fission and fusion play critical roles in maintaining functional mitochondria in stress conditions. Fusion helps mitigate stress by mixing the contents of partially damaged mitochondria. Fission enables the removal of damaged mitochondria and is necessary to create new mitochondria, but can also facilitate apoptosis during high levels of cellular stress (Youle and van der Bliek, 2012). These processes are regulated by GTPases including optic atrophy protein and mitofusin 1 and 2 for fusion, and dynamin-related protein 1 (Drp1) and the Drp1 targeting molecule fission 1 (Fis1) for fission.

### 2.1.4. Reactive oxygen species (ROS)

Under resting conditions, over 90% of cellular ROS is produced in the mitochondria. The major sites for ROS generation are electron transport chain complexes I and III. Interestingly, ROS are a

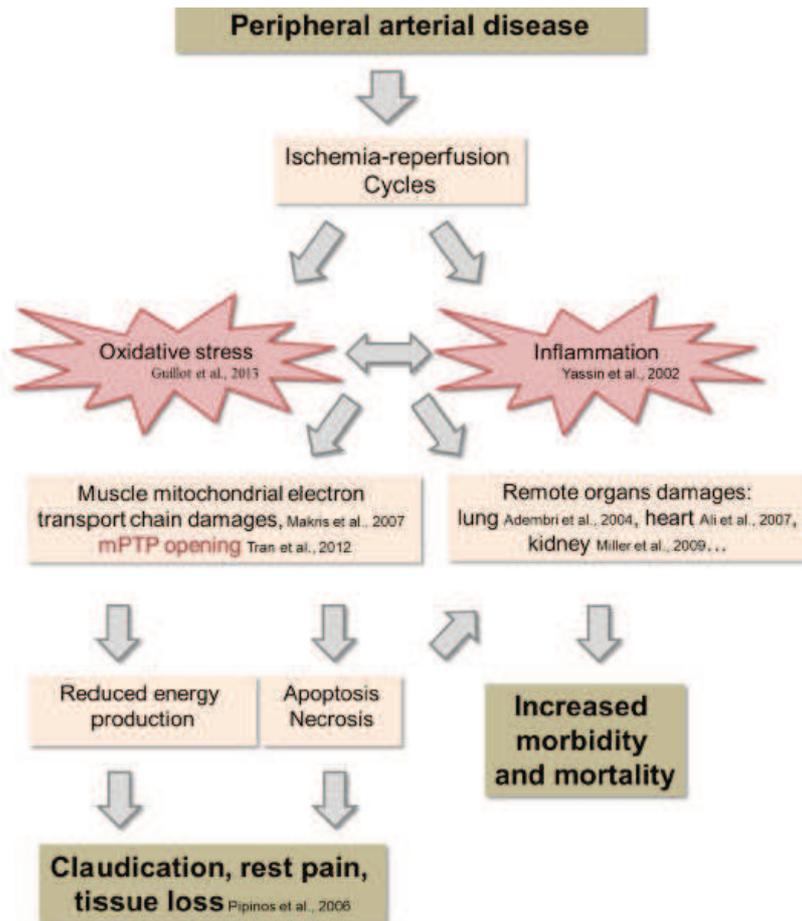


Fig. 2. Implication of mitochondria in the pathophysiology of peripheral arterial disease.

Modified from Pipinos et al., (2006).

double-edged sword. They are beneficial via cell signaling involved in the antioxidant defense network, but can be harmful by inducing oxidative stress (Zorov et al., 2006). Superoxide anion ( $O_2^{\bullet -}$ ) appears to be a highly important ROS, its toxicity being related to the generation of further reactive species able to attack intracellular biomolecules and resulting in protein carboxylation, lipid peroxidation and DNA damage.

Defense systems can reduce ROS-induced damage. Briefly,  $O_2^{\bullet -}$  in the matrix is converted to  $H_2O_2$  by matrix MnSOD (SOD2), while  $O_2^{\bullet -}$  released in the intermembrane space is partly dismutated by intermembrane space CuZnSOD (SOD1). Any residual  $O_2^{\bullet -}$  that diffuses into the cytosol is converted by cytosolic CuZnSOD. If mitochondrial  $O_2^{\bullet -}$  reaches the extracellular space, it is detoxified by extracellular CuZnSOD (SOD3). Glutathione-based systems constitute the major redox buffer in the cytosol and  $H_2O_2$  can also be reduced to water by catalase or glutathione peroxidase.

### 3. Organelle pathology

There are a number of muscular pathologies associated with mitochondrial dysfunction due to either a primitive defect in mitochondrial protein or to secondary injury in the setting of general disease such as diabetes, cardiac or pulmonary failure, cancer and/or inflammatory diseases (Moylan and Reid, 2007). With particular focus oriented toward cardiovascular diseases, data indeed demonstrate an impairment of skeletal muscle mitochondria with decreased mitochondrial oxidative capacities in patients suffering from peripheral arterial disease (PAD) (Brass and Hiatt, 2000; Brass et al., 2001; Pipinos et al., 2000, 2006; Makris et al., 2007). This dependence on oxygen and ATP is critical in skeletal muscle. In PAD muscle, suboptimal energy production from defective mitochondria participates in pathogenesis in addition to reduced oxygen supply (Pipinos et al., 2006) while damage to the mitochondria enhances the production of ROS. Furthermore, MnSOD (the initial

line of ROS defense in mitochondria) has been found to be deficient in PAD muscles (Pipinos et al., 2006; Makris et al., 2007). These findings reflect an impaired mitochondrial antioxidant defense system which is unable to respond to abnormally elevated ROS production, leading to significant oxidative damage to muscle proteins and lipids. Of note, IR-induced injury differs according to the skeletal muscle phenotype and thus, type II fibers probably sustain more damage than type I muscle fibers.

Although not fully elucidated in skeletal muscle, the origin of mitochondrial dysfunction related to ischemia–reperfusion has been studied in the myocardium and can occur at several levels. A decrease in electron transport chain (ETC) protein may result from increased autophagy and/or from decreases in PGC1- $\alpha$  protein content (Lee et al., 2012). Posttranslational alterations of ETC in the ischemic myocardium are also involved, including increased protein tyrosine nitration of complex I and complex II, decreased protein S-glutathionylation of complex II, inactivation of Fe-S protein of complex III and increased hyperphosphorylation of complex IV. Finally, during ischemia and/or reperfusion phases, a loss of mitochondrial cardiolipin (a mitochondrial membrane phospholipid) has also been proposed to explain the decline in complex I (Paradies et al., 2004), III and complex IV activities.

Accordingly, ischemia–reperfusion of the lower limb, largely studied in experimental models using either aortic cross-clamping or leg tourniquet, has confirmed the reduction in mitochondrial oxidative capacity associated with increased ROS production (Brandão et al., 2003; Charles et al., 2011). Although endogenous up-regulation of mitochondrial biogenesis and enhancement of the antioxidant defense may delay muscle injury, IR also increases the Bax/Bcl2 ratio and reduces the capacity for mitochondrial calcium retention thus favoring early mPTP opening and apoptosis (Mansour et al., 2012a; Tran et al., 2012). Interestingly, reduced Cyp-D expression in gastrocnemius muscle likely prevented cyclosporin A from blocking mPTP opening during lower-limb IR (Pottecher et al., 2013).

Taken together, both apoptosis and necrosis can lead to tissue loss and ultimately to leg amputation. In addition, nerve, skin and subcutaneous tissue damages also occur, leading to the character-

istic “trophic legs” of patients with advanced PAD having thin and brittle muscles, and thin hairless skin with impaired sensorimotor function. Interestingly, surgical by-pass or endovascular therapies do not always relieve patient symptoms. Leg pain has consequently been related to metabolic alterations rather than to reduced blood flow. Furthermore, even subtle skeletal muscle alterations participate in inflammation and remote organ injuries aggravating patient morbidity and mortality rates through multi-organ failure (Yassin et al., 2002; Adembri et al., 2004; Fowkes et al., 2006; Ali et al., 2007; Miller et al., 2009) (Fig. 2).

Importantly, a better understanding of PAD pathophysiology and particularly in view of the fact that defective mitochondria and oxidative stress are central to this myopathy allows for new therapeutic approaches. Increased ROS production occurs before mitochondrial dysfunction (Guillot et al., 2013) suggesting that strategies aiming to reduce ROS production might be successful.

Accordingly, ischemic preconditioning (i.e. repeated short lasting ischemia–reperfusion cycles applied before sustained ischemia) has been shown to protect both ischemic muscles and remote organs in experimental animals and humans (Eberlin et al., 2008; Mansour et al., 2012a; Ali et al., 2007). Controlled reperfusion and ischemic post-conditioning (applied at the onset of reperfusion) was also shown to protect skeletal muscle from IR injuries (Beyersdorf and Schlensak, 2009; McAllister et al., 2008). This is clinically relevant since improved skeletal muscle mitochondrial function is associated with enhanced walking capacities, both in healthy subjects and in patients suffering from PAD.

Similarly, pharmacological approaches using a mimetic of the antioxidant system also decrease ROS production, protect muscle mitochondrial function and reduce infarct size (Tran et al., 2012).

During IR, mitochondria undergo fission that is dependent on Drp1 activation. Inhibition of Drp1 activation by Mdivi-1 (mitochondrial division inhibitor 1) was indeed shown to preserve mitochondrial morphology, lower mitochondrial reactive oxygen species, reduce cytosolic calcium (Sharp et al., 2014), prevent mPTP opening as well as reduce infarct size. Mdivi-1 was conversely protective if administered prior to or following myocardial ischemia, thereby opening promising therapeutic strategies in other organs submitted to IR (Sharp et al., 2014).

#### 4. Future outlook

Controversial data have nevertheless been reported. Local and remote ischemic post-conditioning was found to decrease muscle mitochondrial function and trigger ROS production and inflammation (Mansour et al., 2012b). The temporal relationship between inflammation, oxidative stress and mitochondrial function hence deserves further investigation. There is also a need to investigate the main source of ROS arising in skeletal muscle during IR and, in particular, the specific extent of mitochondrial, xantine and NADPH oxidase involvement. Further studies with regard to molecular pathways (SAFE, RISK, etc.) ultimately acting on the mPTP are also warranted in order to determine whether these endogenous protective pathways are impaired by IR.

Finally, defining the threshold level of ROS that will induce mitohormesis rather than oxidative stress is of key importance. This represents an obvious challenge knowing that such a threshold may vary according to the metabolic phenotype of the organ involved in IR and to comorbidity factors (hypertension, diabetes, old age, etc.) often present in patients suffering from PAD.

In summary, mitochondrial dysfunction resulting from- and enhancing ROS production is clearly a key mechanism involved in the deleterious effects of IR on skeletal muscles. While accessible to therapy, further knowledge is nonetheless needed to allow a broader translation of ischemic conditioning into clinical practice.

#### Acknowledgments

We gratefully thank Anne-Marie Kasprovicz for expert secretarial assistance and Pierre Pothier for English revision.

#### References

- Adembri C, Kastamoniti E, Bertolozzi I, Vanni S, Dorigo W, Coppo M, et al. Pulmonary injury follows systemic inflammatory reaction in infrarenal aortic surgery. *Crit Care Med* 2004;32:1170–7.
- Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraei SA, Akthar AM, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 2007;116:198–105.
- Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol* 2013;4:95.
- Beyersdorf F, Schlensak C. Controlled reperfusion after acute and persistent limb ischemia. *Semin Vasc Surg* 2009;22:52–7.
- Brandão ML, Roselino JES, Piccinato CE, Cherni J. Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J Surg Res* 2003;110:235–40.
- Brass EP, Hiatt WR. Acquired skeletal muscle metabolic myopathy in atherosclerotic peripheral arterial disease. *Vasc Med* 2000;5:55–9.
- Brass EP, Hiatt WR, Gardner AW, Hoppel CL. Decreased NADH dehydrogenase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase in peripheral arterial disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H603–9.
- Charles AL, Guilbert AS, Boutbir J, Goette-Di Marco P, Enache I, et al. Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg* 2011;98:511–6.
- Dela F, Helge JW. Insulin resistance and mitochondrial function in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:11–5.
- Eberlin KR, McCormack MC, Nguyen JT, Tarlidede HS, Randolph MA, Austen WG Jr. Ischemic preconditioning of skeletal muscle mitigates remote injury and mortality. *J Surg Res* 2008;148:24–30.

- Fowkes FG, Anandan CL, Lee AJ, Smith FB, Tzoulaki I, Rumley A, et al. Reduced lung function in patients with abdominal aortic aneurysm is associated with activation of inflammation and hemostasis, not smoking or cardiovascular disease. *J Vasc Surg* 2006;43:474–80.
- Guillot M, Charles AL, Chamaraux-Tran TN, Bouitbir J, Meyer A, Zoll J, et al. Oxidative stress precedes skeletal muscle mitochondrial dysfunction during experimental aortic cross-clamping but is not associated with early lung, heart, brain, liver or kidney mitochondrial impairment. *J Vasc Surg* 2013, in press.
- Lee HL, Chen CL, Yeh ST, Zweier JL, Chen YR. Biphasic modulation of the mitochondrial electron transport chain in myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302:H1410–22.
- Makris KI, Nella AA, Zhu Z, Swanson SA, Casale GP, Gutti TL, et al. Mitochondriopathy of peripheral arterial disease. *Vascular* 2007;15:336–43.
- McAllister SE, Ashrafpour H, Cahoon N, Huang N, Moses MA, Neligan PC, et al. Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:681–9.
- Mansour Z, Bouitbir J, Charles AL, Talha S, Kindo M, Pottecher J, et al. Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg* 2012a;55:497–505.
- Mansour Z, Charles AL, Bouitbir J, Pottecher J, Kindo M, Mazzucotelli JP, et al. Remote and local ischemic preconditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia–reperfusion. *J Vasc Surg* 2012;56:774–82.
- Meyer A, Charles AL, Zoll J, Guillot M, Lejay A, Singh F, et al. Cryopreservation with dimethyl sulfoxide prevents accurate analysis of skinned skeletal muscle fibers mitochondrial respiration. *Biochimie* 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2014.01.014>, in press, PMID: 24472439.
- Miller CC 3rd, Villa MA, Sutton J, Lau D, Keyhani K, Estrera AL, et al. Serum myoglobin and renal morbidity and mortality following thoracic and thoraco-abdominal aortic repair: does rhabdomyolysis play a role? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009;37:388–94.
- Moylan JS, Reid MB. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve* 2007;35:411–29.
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese 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.
- Pipinos II, Judge AR, Zhu Z, Selsby JT, Swanson SA, Johanning JM, et al. Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease. *Free Radic Biol Med* 2006;41:262–9.
- Pipinos II, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Boska MD. Phosphorus 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy suggests a mitochondrial defect in claudicating skeletal muscle. *J Vasc Surg* 2000;31:944–52.
- Pottecher J, Guillot M, Belaidi E, Charles AL, Lejay A, Gharib A, et al. Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg* 2013;57:1100–8.
- Sharp WW, Fang YH, Han M, Zhang HJ, Hong Z, Banathy A, et al. Dynamin-related protein 1 (Drp1)-mediated diastolic dysfunction in myocardial ischemia–reperfusion injury: therapeutic benefits of Drp1 inhibition to reduce mitochondrial fission. *FASEB J* 2014;28:316–26.
- Tran TP, Tu H, Liu J, Muelleman RL, Li YL. Mitochondria-derived superoxide links to tourniquet-induced apoptosis in mouse skeletal muscle. *PLoS ONE* 2012;7:e43410.
- Wang W, Fang H, Groom L, Cheng A, Zhang W, Liu J, et al. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 2008;134:279–90.
- Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MJ, Rowlands BJ. Lower limb ischemia–reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg* 2002;26:115–21.
- Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 2012;337:1062–5.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:509–17.

#### **4. L'altération de la balance anabolique/catabolique et l'inhibition des voies de protection endogènes aggravent les lésions d'ischémie reperfusion du muscle squelettique chez la souris diabétique.**

##### **Objectifs :**

Le diabète est un facteur de risque cardiovasculaire, de pronostic défavorable dans le cadre de l'artériopathie des membres inférieurs. Notre hypothèse est que la balance anabolique/catabolique, de même que les kinases endogènes protectrices sont altérées par l'ischémie-reperfusion dans le muscle squelettique diabétique.

##### **Matériel et Méthodes :**

Des biopsies de muscles de patients diabétiques en ischémie critique ont été prélevées, analysées par oxymétrie (respiration mitochondriale) et comparées à des biopsies de muscles non diabétique, avant et après revascularisation chirurgicale. Pour étudier les voies de signalisation intracellulaires impliquées, des biopsies de muscle squelettique de rats diabétiques ont été comparés à des rats non diabétiques, après ischémie-reperfusion ou non : nous avons analysé la respiration mitochondriale, la production de radicaux libres, le taux de superoxyde dismutase (SOD), la balance anabolique/catabolique (mTOR/FOXO1), ainsi que les voies de protection endogènes (RISK et SAFE).

##### **Résultats :**

Après ischémie-reperfusion, la diminution de la respiration mitochondriale était plus importante chez les patients diabétiques, mais également expérimentalement chez les rats, avec une atteinte de l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Au niveau des animaux soumis à l'ischémie-reperfusion, l'augmentation des radicaux libres, la diminution de SOD, et la diminution de la balance anabolique/catabolique était majorée chez les animaux diabétiques. Le taux de kinases des voies RISK et SAFE était diminué après ischémie-reperfusion chez les animaux diabétiques.

##### **Conclusion :**

Il existe une altération de la balance anabolique/catabolique et une inhibition des voies de protection endogènes RISK et SAFE chez les animaux diabétiques. Ces voies de protection pourraient être des cibles de traitements futurs.

**Worsening of lower limb mitochondrial injury after aortic clamping in type 1 diabetes is associated with exacerbated oxidative stress, reduced endogenous protective kinases and impaired anabolic/catabolic balance in skeletal muscles.**

Julien POTTECHER, MD, PhD ; Gilles LAVERNY, PhD ; Anne Lejay, MD ; Thien-Nga CHAMARAUX-TRAN, MD ; Jamal BOUITBIR, PhD ; Max GUILLOT, MD, PhD ; Christiane DAMGE, MD, PhD ; Anne-Laure CHARLES, PhD ; Joffrey ZOLL, PhD ; Mervyn SINGER, MD, PhD ; Pierre DIEMUNSCH, MD, PhD ; Daniel Metzger, PhD ; Bernard Geny, MD, PhD.

**Aims:** To investigate whether type 1 diabetes worsens hind limb ischaemia-reperfusion injury through increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction, impaired endogenous protective kinases and an anabolic/catabolic imbalance.

**Methods and results:** Biopsies of gastrocnemius muscles were taken in six type 1 diabetic and six matched non-diabetic patients presenting with critical limb ischaemia, both before and after revascularization (NCT02117206). In complementary laboratory studies, streptozotocin-induced diabetic rats and vehicle-treated non-diabetic rats were randomized to control or to ischaemia-reperfusion (IR) injury induced by 3h aortic cross-clamping and 2h of reperfusion. Mitochondrial respiration was determined in both human and rat gastrocnemius muscle. In addition, reactive oxygen species production, protein levels of superoxide dismutase (SOD2), endogenous protective kinases (RISK and SAFE) and anabolic/catabolic balance (mTOR/FOXO1, cleaved caspase-3) were investigated in rat gastrocnemius muscle. After IR, the decline in mitochondrial respiration was more severe in diabetic patients and rats compared to their non-diabetic counterparts, and this affected all mitochondrial respiratory enzymes. In ischaemic animals, the increased levels of reactive oxygen species and cleaved caspase-3 were greater in streptozotocin than in vehicle-treated rats, relative to their nonischaemic controls. The protein level of SOD2, and kinases of RISK, SAFE and mTOR pathways were also reduced to a larger extent after IR in streptozotocin-treated rats.

**Conclusion:** Concurrent diabetes worsens skeletal muscle mitochondrial dysfunction after IR in both patients and rats. In diabetic rats, this was associated with increased oxidative stress and apoptosis, reduced endogenous protective kinases, and a switch to a net catabolic state.

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

## INTRODUCTION

Peripheral vascular disease (PVD) represents a major burden in the diabetic

population with an increase in both prevalence and severity and a 40-fold increased risk of amputation (1). Mechanisms underlying PVD in diabetes involve both vascular (2) and muscular pathology (3). Recent findings suggest that

mitochondrial oxidative phosphorylation may be impaired in the lower limb muscles of type 1 diabetic patients without obvious vascular abnormalities (4) and may precede hyperglycemia in type 2 diabetes (5). After lower limb revascularization, mitochondrial dysfunction may also be an early sign, cellular metabolic alterations before necrosis (6). Amplified oxidative stress may likewise play a role in ischaemia-reperfusion-induced (IR) skeletal muscle injury, since both diabetes and IR are associated with increased reactive oxygen species (ROS) production and reduced antioxidant defences (7).

In myocytes, IR injury triggers the reperfusion injury salvage kinases (RISK) (8) and survivor activating factor enhancement (SAFE) pathways (9). Their activation promotes cell protection, inhibits mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening and prevents apoptosis. On recovery from an IR injury, skeletal muscle anabolism is activated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. Moreover, in diabetic rats, a muscular catabolic phenotype was associated with a reduced phosphorylation of forkhead transcription factor-1 (FoxO1), favouring muscular atrophy and myocyte apoptosis (10). Type 1 diabetes may thus impair SAFE and RISK-induced protection and induce a catabolic state after IR injury.

The aims of this study were therefore (1) to investigate whether type 1 diabetes exacerbates the deleterious effects of hind limb IR on mitochondrial respiration in diabetic patients presenting with critical limb ischaemia, (2) to explore whether skeletal muscle protective kinases and anabolic/catabolic balance are compromised in streptozotocin-treated diabetic rats, and (3) to investigate whether type 1 diabetes aggravates the deleterious effects of hind-limb IR through increased mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis, reduced endogenous protective kinases, and a dysregulated

anabolic/catabolic balance in rat skeletal muscle.

## METHODS

### Patients

Our population constituted diabetic and non-diabetic patients undergoing vascular

surgery who had been randomized to the control limb of a prospective trial investigating the muscular effects of L-arginine (NCT02117206). Approval was obtained from the Institutional Review Board (Comité de Protection des Personnes “EST IV”), as was written informed consent. Type 1 diabetic patients (“d”) presenting with critical limb ischaemia requiring infrainguinal bypass were matched against non-diabetic patients (“n”) undergoing the same procedure.

Biopsies of gastrocnemius muscles were taken before and after revascularization. Mitochondrial respiration was studied in saponin-skinned fibres of gastrocnemius muscles, as previously described (6) and detailed in the electronic supplementary material (ESM).

### Animal model

Experiments were performed on 8 week old male Wistar rats (Dépre, Saint-Doulchard, France). The study conformed to the ‘Principles of laboratory animal care’ (NIH publication 85–23, revised 1985) and was approved by the Institutional Animal Care Committee (CREMEAS AL/02/10/06/2009).

### Experimental design

Seven weeks after vehicle or streptozotocin injection, rats (referred to as non-diabetic

“n”, and diabetic “d”, respectively) were randomly assigned to control (CON) or IR group, as shown in ESM (Figure E1). The

control groups (nCON, dCON, 8 per group) underwent 5 hours' isoflurane anaesthesia and similar surgical manipulation to the IR groups, with the exception of hind-limb ischaemia. The ischaemia-reperfusion groups (nIR and dIR, 10 per group) underwent 3 hours' ischaemia induced by infra-renal aortic occlusion and collateral vessel ligation, followed by 2 hours' reperfusion. Ischaemia was clinically characterized by

cyanosis and lack of an arterial pulse distal to the clamp, and biochemically by an increase in capillary blood lactate measured in the right foot (Lactate Pro device, LT1710; Arkray, KGK, Japan) (11). After reperfusion, gastrocnemius muscles were harvested and then either kept on ice or frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Animals were killed by heart retrieval under deep anaesthesia.

### Statistics

All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean, and analyzed using Prism software (GraphPad Prism 5, Graph Pad Software, San Diego, USA). Differences between groups were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA), simultaneously testing diabetic status and ischaemia, with a post-hoc Newman-Keuls correction. Within group differences were analyzed by Student's t test and a one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni correction. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### A) Effects of type 1 diabetes on skeletal muscle mitochondrial respiration in humans

Six insulin-treated type 1 diabetic patients were matched to 6 non-diabetic patients

whose characteristics are presented in the ESM (Table E1 and Figures E2 to E4).

Before revascularization, mitochondrial respiration in gastrocnemius muscle biopsies was similar between diabetic and non-diabetic patients (Figure 1A). After revascularization, baseline (V<sub>0</sub>), maximal (V<sub>Max</sub>), succinate-driven (V<sub>Succ</sub>), and TMPD/ascorbate-driven (VTMPD/Asc) respiration in non-diabetic patients fell by 17%, 10%, 15% and 14% respectively; however, this was only significant for V<sub>Succ</sub> (p=0.011). On the other hand, IR in type 1 diabetic patients induced a significant decrease in V<sub>0</sub>, V<sub>Max</sub>, V<sub>Succ</sub>, and VTMPD/Asc (37%, 40%, 38% and 34%, respectively) compared to their preIR control values (Figure 1B).

As the small volume muscle biopsy samples did not allow an in-depth histologic and biochemical analyses, we utilized the animal study to investigate pathways potentially involved in mitochondrial dysfunction and its association with histological injury.

### B) Effects of type 1 diabetes on rat skeletal muscle mitochondrial function and oxidative stress.

#### 1. Skeletal muscle mitochondrial respiratory chain complexes activities in type-1 diabetic rats.

In the absence of ADP, V<sub>0</sub> was similar in streptozotocin- and vehicle-treated rats. However, with saturating concentrations of ADP, addition of glutamate + malate, succinate, or TMPD + ascorbate (substrates for maximal Complex I, III, IV (V<sub>Max</sub>), Complex II, III, IV (V<sub>Succ</sub>) and Complex IV-driven (VTMPD/Asc) respiration, respectively) revealed a 2-fold decrease in oxygen consumption in the streptozotocin-treated rats (Figure 2A).

#### 2. Reactive oxygen species production and antioxidant defence in streptozotocin-

*treated rats.*

Raw ROS production in gastrocnemius (fluorescence on dihydroethidium (DHE)-stained histological sections) was non-significantly increased in streptozotocin-compared to vehicle-treated animals (Figures 3A). However, ROS production by diabetic skeletal muscle mitochondria may be confounded by concurrent changes in respiration rates. This may leave raw, unadjusted ROS levels unchanged, yet increased when considered relative to electron transport (7). Consequently, the mean DHE fluorescence was divided by the mitochondrial respiration rate from skinned fibres. The DHE/V<sub>0</sub> ratio was 2-fold higher in streptozotocin than in vehicle-treated rats. Similar results were observed when mitochondria were fuelled with substrates and ADP: 4.8-fold increase in DHE/V<sub>Max</sub> ratio, 5-fold increase in DHE/V<sub>Succ</sub> ratio and 3.7-fold increase in DHE/V<sub>TMPD/Asc</sub> ratio (Figure 3B).

As increased ROS production could be countered by a simultaneous increase in antioxidant defences, we analysed the protein level of mitochondrial manganese superoxide dismutase (SOD2), whose level was similar in streptozotocin and vehicle-treated rats (Figure 3C).

### **C). Endogenous protective pathways and anabolic/catabolic balance in streptozotocin-treated animals.**

We analysed the protein levels of effectors of the RISK and SAFE pathways for three

reasons: (1) RISK and SAFE are triggered by increased oxidative stress, (2) the RISK

pathway is stimulated by insulin, which is deficient in streptozotocin-treated animals (12) and (3) a decrease in RISK and SAFE levels activates GSK3 $\beta$  thus triggering mitochondrial dysfunction and apoptosis (13).

#### *1. RISK pathway*

The RISK involves multiple effectors among which phosphatidylinositol 3-kinase (Pi3K) and protein kinase B (Akt) are key components. The Pi3K level, as represented by the p85 $\alpha$  regulatory subunit, was similar in streptozotocin- and vehicle-treated rats, as was the protein level of the inactive form of Akt. By contrast, the active phosphorylated forms of Akt were 2-fold lower in streptozotocin-treated rats (Figure 4A), thus the protective effects of the RISK protein kinase B are decreased in type 1 diabetic rats.

#### *2. SAFE pathway*

The protein level of the inactive form of STAT3 (signal transducer and activator of transcription-3) was similar in streptozotocin- and vehicle-treated rats whereas its active phosphorylated form was 3.5-fold higher in the streptozotocin-treated rats (Figure 4B), indicating up-regulation of stress-responsive pathways.

#### *3. GSK3 $\beta$*

The active and phosphorylated forms of GSK3 $\beta$  were similar in streptozotocin-treated compared to vehicle-treated rats (Figure 4C). Taken together, our data suggest that streptozotocin-induced diabetes triggers a decrease in phosphorylated Akt level, that is offset by a increase in phosphorylated STAT3, resulting in an unchanged GSK3 $\beta$  activation.

#### *4. Anabolic/catabolic balance*

As type 1 diabetic rat skeletal muscle had a reduced mass on histologic sections (Figure E6) and lower phospho-Akt levels compared to vehicle-treated rats, we investigated the protein levels of the anabolic (mTOR) and catabolic (FoxO1, cleaved caspase-3) effectors. Both total and phosphorylated levels of mTOR were lower in streptozotocin-treated rats, as was phosphorylated 4E-BP1, the downstream

target of mTOR required to initiate eukaryotic translation, which was 3-fold lower in the streptozotocin-treated rats (Figure 5A).

FoxO1 transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 which causes skeletal muscle atrophy (14). Dephosphorylation of FoxO1 also cleaves caspase-3, the key “executioner” of apoptosis (15). In streptozotocin-treated rats, the catabolic form of FoxO1 was non-significantly increased, but the level of the inactive form of FoxO1 was 3-fold reduced, resulting in an increased active/inactive FoxO1 ratio, which reflects a switch to a net catabolic state. However, the levels of cleaved caspase-3 were similar in vehicle- and streptozotocin-treated rats (Figure 5B).

Taken together, our results demonstrate a downregulation of anabolic pathways and an up-regulation of catabolic factors.

#### **D) Effects of IR on skeletal muscle mitochondrial respiration and oxidative stress in streptozotocin- and vehicle-treated rats.**

As IR induced a more severe mitochondrial injury in diabetic than in non-diabetic patients, we determined whether IR had similar effects in streptozotocin-treated rats, and if oxidative stress would also be increased.

##### *1. Mitochondrial respiratory chain activity in non-diabetic and diabetic rats after IR*

Compared to vehicle-treated rats, V0 was 3-fold lower in streptozotocin-treated rats after IR (Figure 2A). IR injury also induced a 3.3-fold and a 2-fold VMax decrease in streptozotocin- and vehicle-treated animals, respectively. However, VMax was significantly more reduced in type 1 diabetic rats ( $p < 0.05$ , Figure 2B).

While IR did not alter VSucc in the non-

diabetic animals, it did induce a significant decrease in VSucc in streptozotocin-treated rats ( $-60 \pm 7\%$ ;  $p < 0.001$ ). IR did not alter VTMPD/Asc in either streptozotocin- or vehicle-treated animals (Figure 2B). Taken together, these results show that IR injury impairs mitochondrial respiration to a larger extent in diabetic rats.

##### *2. ROS production and antioxidant defence in non-diabetic and diabetic animals after IR*

IR injury induced a two-fold increase in raw DHE fluorescence in vehicle-treated ( $p < 0.001$ ), but not in streptozotocin-treated rats (Figures 3A and 3B). However, ROS production normalized either to V0 (DHE/V0), VMax (DHE/VMax) or VSucc (DHE/VSucc) was significantly increased after IR injury in both streptozotocin- and vehicle-treated rats and to a larger extent in diabetic animals (Figure 3B). Increased ROS production was not offset by an increase in SOD2, whose level was 3-fold lower in streptozotocin-treated rats after IR (Figure 3C). Taken together, these results suggest an increased oxidative stress in the

gastrocnemius muscle of diabetic rats following IR injury.

#### **E). Effects of IR on endogenous protective pathways and anabolic/catabolic balance in**

##### **vehicle-treated and streptozotocin-treated rats**

##### *1. RISK pathway*

IR had no significant influence on the p85 $\alpha$  protein level in both streptozotocin- and vehicle-treated rats. The protein level of the inactive form of Akt was only decreased significantly by IR in streptozotocin-treated rats ( $p < 0.05$ ). Compared to their non-ischæmic controls, both phosphorylated forms of Akt were reduced after IR in vehicle- and

streptozotocin-treated animals, but the fall was much larger in streptozotocin-treated rats (Figure 4A).

## 2. *SAFE pathway*

The protein level of the inactive form of STAT3 was significantly decreased in streptozotocin-treated rats only ( $p < 0.001$ ; Figure 4B). In vehicle-treated animals, IR induced a non-significant increase in the active form of STAT3. Conversely, IR induced a nonsignificant decrease in streptozotocin-treated animals. As a result, STAT3 activity seems to go in the opposite direction after IR, with a decreased activity in the streptozotocin- and an increased activity in the vehicle-treated animals.

## 3. *GSK3 $\beta$*

Ischaemia-reperfusion had no significant influence on active GSK3 $\beta$  protein level in vehicle-treated animals, but induced a 36% decrease in streptozotocin-treated rats ( $p < 0.05$ ; Figure 4C). Conversely, while the protein level of phospho-GSK3 $\beta$  was not altered by IR in vehicle-treated animals, it fell markedly in streptozotocin-treated rats ( $p < 0.0001$ ), resulting in a 2.8 fold decrease in phospho-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  ratio. Thus, the active form of GSK3 $\beta$  predominates after IR in streptozotocin-treated animals, and may induce mitochondrial dysfunction by opening mPTP. Taken together, our results indicate that type-I diabetes was associated with a reduced protection against IR injury. We therefore investigated whether the diabetic state was also associated with increased muscle wasting after IR.

## 4. *Anabolic/catabolic balance*

IR had no significant effect on either mTOR or phospho-mTOR levels in gastrocnemius from vehicle-treated animals. Conversely, both were reduced in streptozotocin-treated rats at baseline and reduced further followed IR ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively), resulting in an unchanged phospho-mTOR/mTOR ratio.

In both vehicle-treated and streptozotocin-treated rats, IR did not alter 4E-BP1 protein levels (Figure 5A). Conversely, IR

induced a significant decrease in phospho-4E-BP1 protein level in streptozotocin-treated rats ( $p < 0.001$ ). Similarly, IR had no significant effect on either FoxO1 or phospho-FoxO1 protein levels in vehicle-treated animals but a marked decrease in FoxO1 was seen in streptozotocin-treated

rats ( $p < 0.001$ ). As a result, the p-FoxO1/FoxO1 ratio was not altered in streptozotocin-treated rats subjected to IR. In both vehicle- and streptozotocin-treated rats, IR induced an increased level of cleaved caspase-3 compared to non-ischaemic controls, but the increase was much larger (6-fold) in diabetic animals (Figure 5B). These results suggest a decrease in protein synthesis, an unaltered protein breakdown, and a large induction of myocyte apoptosis during IR in type-1 diabetic rats.

## DISCUSSION

The main results of this study are that: (1) IR has deleterious effects on skeletal muscle in patients presenting with critical limb ischaemia, and these are more severe in type 1 diabetics compared to non-diabetic patients, (2) streptozotocin-induced insulinopenic diabetes significantly impairs mitochondrial respiration affecting all complexes, increases oxidative stress, and inhibits both protective and anabolic pathways while favouring a net catabolic state in rat gastrocnemius muscle, and (3) the deleterious effects of IR are more pronounced in streptozotocin-treated rats (Figure 6).

Mitochondrial alterations in type 1 diabetes

Consonant with previous results (16), long-

term hyperglycaemia induces a significant reduction in complex I, II and III activities in rat skeletal muscle. In addition, we found that IR induced a larger decrease in mitochondrial respiration in diabetic patients with critical limb ischaemia. We also found a profound reduction in V<sub>0</sub> and V<sub>Max</sub> (50%) in the gastrocnemius of streptozotocin-treated rats, and a significant (60%) decrease in succinate dehydrogenase (Complex II)-driven respiration compared to healthy controls.

#### Oxidative stress in type 1 diabetes and IR

Mitochondrial complexes I and III are the sites accounting for most superoxide anion production. In the early stages of diabetes, mitochondrial complex III undergoes assembly defects that lead to decreased activity and increased superoxide generation (17). Herlein et al. observed that superoxide anion production was greater in diabetic mitochondria when considered in relation to electron transport activity (7). Our results are in line with these findings, and give credence to the hypothesis that ROS production is increased in muscles from streptozotocin-treated rats and is not offset by increased antioxidant defences.

The combined influence of hyperglycaemia and ROS in diabetic muscles undergoing an IR insult will trigger the polyol pathway flux that burns up antioxidants and endogenous protective effectors (such as STAT3 (18)), perpetuating a vicious circle. Diabetes and worsening of skeletal muscle IR injury through defective protective pathways and distorted anabolic/catabolic balance. Streptozotocin-treated rats were markedly insulinopenic; this feature may contribute to a worse skeletal muscle injury after an IR insult. Indeed, insulin participates in maintaining endogenous protective effectors such as Pi3K-Akt and STAT3, independent of glycaemic control (19). In insulinopenic diabetes, the phosphorylation

of Pi3K, Akt and STAT3 is reduced, resulting in increased GSK3 $\beta$  activity that promotes mPTP opening (20) and triggers apoptosis. Wegrzyn et al. demonstrated that phosphorylated STAT3 was required for optimal function of the electron transport chain, independently of its transcriptional activity. Indeed, in STAT3<sup>-/-</sup> cells, V<sub>Max</sub> and V<sub>Succ</sub> were reduced by 70% and 50%, respectively (21).

Diabetes impairs skeletal muscle anabolism and induce tissue catabolism in mice (10). We corroborated this finding in rat skeletal muscle and additionally found that the phosphorylated forms of upstream (mTOR) and downstream (4E-BP1) effectors of the anabolic pathway were further reduced in diabetic animals after IR injury, impairing muscle regeneration (22).

Although more clinically relevant, experiments on human tissue could not be carried out extensively, as the material quantity was small. Consequently, we decided to investigate only mitochondrial function on human tissue, and study upstream and downstream pathways in gastrocnemius muscles harvested from streptozotocin-treated rats. We acknowledge that our model was a pharmacologic model of type 1 diabetes whose effects on skeletal muscle could be due to a direct action of streptozotocin on muscle fibres (23). However, our animal results, though obtained in a severe model of untreated type 1 diabetes, were consistent with those found in diabetic patients.

As Western blot analyses were all performed after 3 hours' ischaemia and 2 hours' reperfusion, the results presented here only reflect a single timepoint, whereas the mechanisms at play in the RISK and SAFE pathways occur in a dynamic fashion.

With respect to therapy, restoring euglycaemia with acute insulin treatment failed to restore cardioprotection in the

setting of experimental IR (24). As GSK3 $\beta$  is activated in diabetes and favours mPTP opening at the onset of reperfusion, inhibition of GSK3 $\beta$  may provide a strategy to protect diabetic muscles from IR injury (25). Cyclosporine A (CsA) prevents mPTP opening and has been shown to reduce skeletal muscle injury in the setting of IR (26). In healthy animals, CsA also inhibited IR-induced ROS production and partially protected the mitochondrial respiratory chain (27). Whether CsA provides protection in diabetic skeletal muscle merits further assessment.

## CONCLUSION

Type 1 diabetes is associated with profound mitochondrial respiratory chain alterations, increased oxidative stress, reduced endogenous protective kinases and a switch from an anabolic to catabolic state in rat skeletal muscle, that are exacerbated after IR. This may contribute towards the high failure rate of surgical revascularizations in diabetic patients suffering from peripheral vascular disease.

## ACKNOWLEDGEMENTS:

We are greatly indebted to Miss Fabienne Goupilleau and Isabelle Bentz, for their extensive expertise in animal models and invaluable technical assistance.

## REFERENCES

1. American Diabetes Association. Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diab Care*. 2003;26:3333–3341.
2. Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular

disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J*. 2013;34:2436–2443.

3. Delli Pizzi S, Madonna R, Caulo M, Romani GL, De Caterina R, Tartaro A. MR angiography, MR imaging and proton MR spectroscopy in-vivo assessment of skeletal muscle ischemia in diabetic rats. *PLoS One*. 2012;7:e44752.

4. Karakelides H, Asmann YW, Bigelow ML, Short KR, Dhatariya K, Coenen-Schimke J, Kahl J, Mukhopadhyay D, Nair KS. Effect of insulin deprivation on muscle mitochondrial ATP production and gene transcript levels in type 1 diabetic subjects. *Diabetes*. 2007;56:2683–2689.

5. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2004;350:664–671.

6. Charles AL, Guilbert AS, Bouitbir J, Goette-Di Marco P, Enache I, Zoll J, Piquard F, Geny B. Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg*. 2011;98:511–516.

7. Herlein JA, Fink BD, Henry DM, Yorek MA, Teesch LM, Sivitz WI. Mitochondrial superoxide and coenzyme Q in insulin-deficient rats: increased electron leak. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2011;301:R1616–R1624.

8. Pedretti S, Raddatz E. STAT3 $\alpha$  interacts with nuclear GSK3 $\beta$  and cytoplasmic RISK pathway and stabilizes rhythm in the anoxic-reoxygenated embryonic heart. *Basic Res Cardiol*. 2011;106:355–369.

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

40.

10. Hulmi JJ, Silvennoinen M, Lehti M, Kivelä R, Kainulainen H. Altered REDD1, myostatin, and Akt/mTOR/FoxO/MAPK signaling in streptozotocin-induced diabetic muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302:E307–E315.

11. Noll E, Bouitbir J, Collange O, Zoll J, Charles AL, Thaveau F, Diemunsch P, Geny B. Local but not systemic capillary lactate is a reperfusion biomarker in experimental acute limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012;43:339–340.

12. Folli F, Saad MJ, Backer JM, Kahn CR. Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1993;92:1787–1794.

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

14. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004;117:399–412.

15. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009;361:1570–1583.

16. Remor AP, de Matos FJ, Ghisoni K, da Silva TL, Eidt G, Búrigo M, de Bem AF, Silveira PCL, de León A, Sanchez MC, Hohl A, Glaser V, Gonçalves C-A, Quincozes-Santos A, Rosa RB, Latini A. Differential effects of insulin on peripheral diabetes related changes in mitochondrial bioenergetics: Involvement of advanced glycosylated end products. *Biochim*

*Biophys Acta.* 2011;1812:1460–1471.

17. Munusamy S, Saba H, Mitchell T, Megyesi JK, Brock RW, MacMillan-Crow L. Alteration of renal respiratory Complex-III during experimental type-1 diabetes. *BMC Endocr Disord.* 2009;9:2.

18. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. Diabetes Abolishes Morphine-Induced Cardioprotection via Multiple Pathways Upstream of Glycogen Synthase Kinase-3. *Diabetes.* 2007;56:127–136.

19. Carvalho E, Eliasson B, Wesslau C, Smith U. Impaired phosphorylation and insulin-stimulated translocation to the plasma membrane of protein kinase B/Akt in adipocytes from Type II diabetic subjects. *Diabetologia.* 2000;43:1107–1115.

20. Tonks KT, Ng Y, Miller S, Coster ACF, Samocha-Bonet D, Iseli TJ, Xu A, Patrick E, Yang JYH, Junutula JR, Modrusan Z, Kolumam G, Stöckli J, Chisholm DJ, James DE, Greenfield JR. Impaired Akt phosphorylation in insulin-resistant human muscle is accompanied by selective and heterogeneous downstream defects. *Diabetologia.* 2013;56:875–885.

21. Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NBV, Zhang Q, Koeck T, Derecka M, Szczepanek K, Szelag M, Gornicka A, Moh A, Moghaddas S, Chen Q, Bobbili S, Cichy J, Dulak J, Baker DP, Wolfman A, Stuehr D, Hassan MO, Fu XY, Avadhani N, Drake JJ, Fawcett P, Lesnefsky EJ, Larner AC. Function of Mitochondrial Stat3 in Cellular Respiration. *Science.* 2009;323:793–797.

22. Ratchford SM, Bailey AN, Senesac HA, Hocker AD, Smolkowski K, Lantz BA, Jewett BA, Gilbert JS, Dreyer HC. Proteins regulating cap-dependent translation are downregulated during total knee arthroplasty. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2012;302:R702–R711.

23. Krause MP, Riddell MC, Gordon CS,

Imam SA, Cafarelli E, Hawke TJ. Diabetic myopathy differs between Ins2Akita<sup>+/-</sup> and streptozotocin-induced Type 1 diabetic models. *J Appl Physiol*. 2009;106:1650–1659.

24. Drenger B, Ostrovsky IA, Barak M, Nechemia-Arbely Y, Ziv E, Axelrod JH. Diabetes blockade of sevoflurane postconditioning is not restored by insulin in the rat heart: phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated inhibition. *Anesthesiology*. 2011;114:1364–1372.

25. Ghaboura N, Tamareille S, Ducluzeau P-H, Grimaud L, Loufrani L, Croué A, Tourmen Y, Henrion D, Furber A, Prunier F. Diabetes mellitus abrogates erythropoietin-induced cardioprotection against ischemic-reperfusion injury by alteration of the RISK/GSK-3 $\beta$  signaling. *Basic Res Cardiol*. 2010;106:147–162.

26. McAllister SE, Ashrafpour H, Cahoon N, Huang N, Moses MA, Neligan PC, Forrest CR, Lipa JE, Pang CY. Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R681–R689.

27. Pottecher J, Guillot M, Belaidi E, Charles AL, Lejay A, Gharib A, Diemunsch P, Geny B. Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg*. 2013;57:1100–1108.

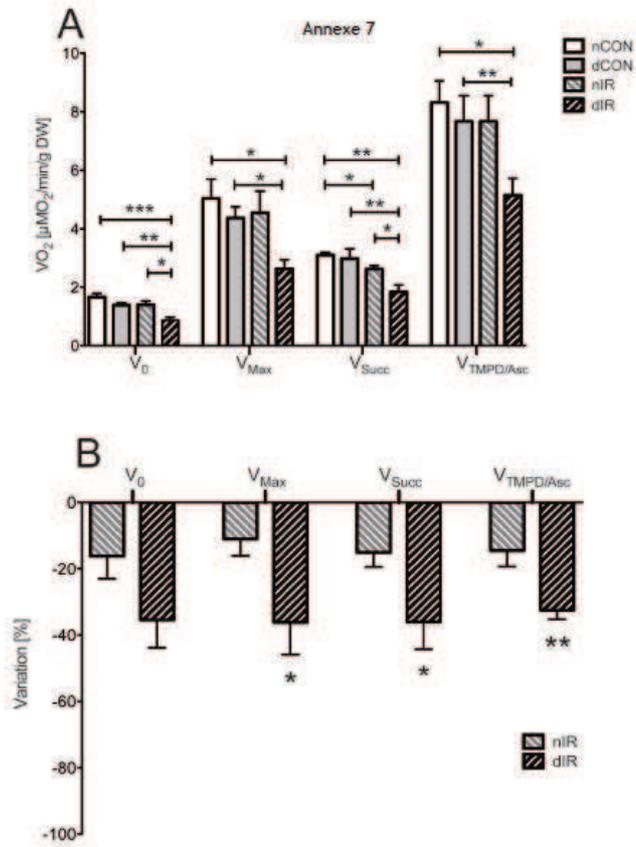


Figure 1

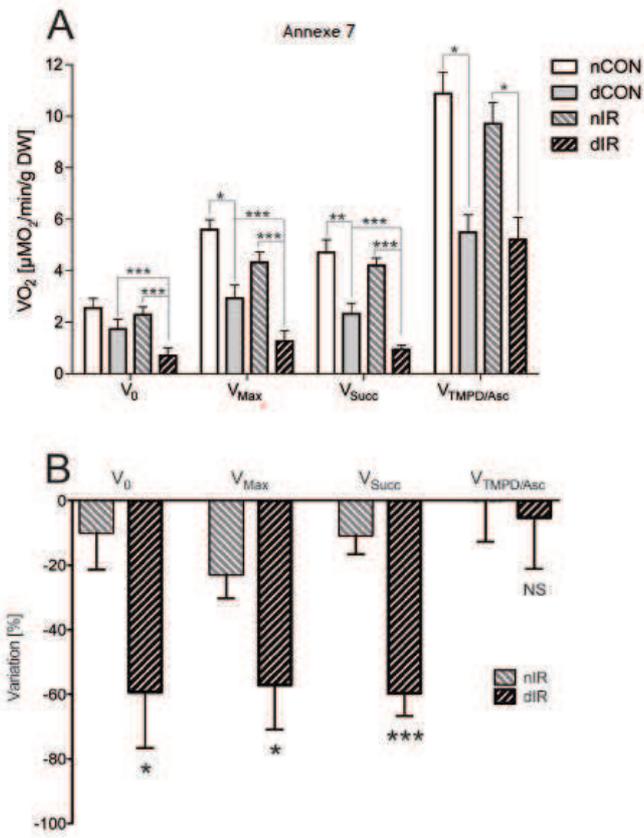


Figure 2

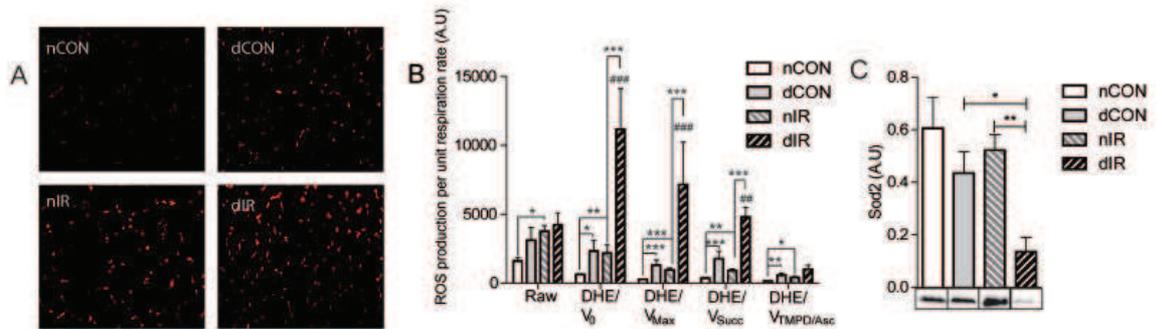


Figure 3

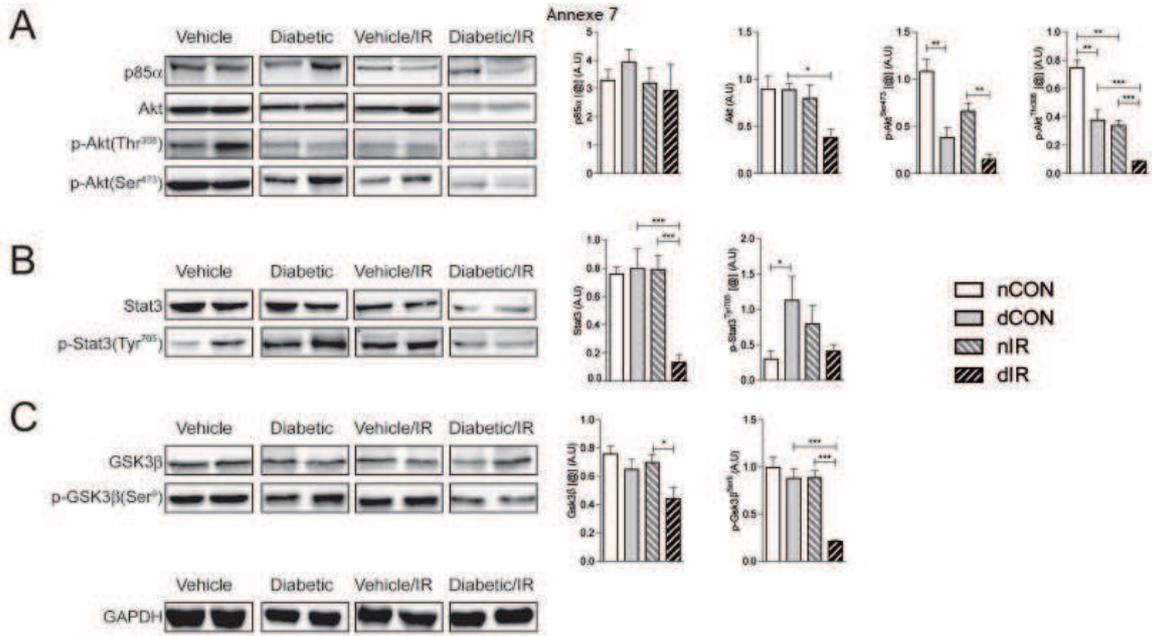


Figure 4

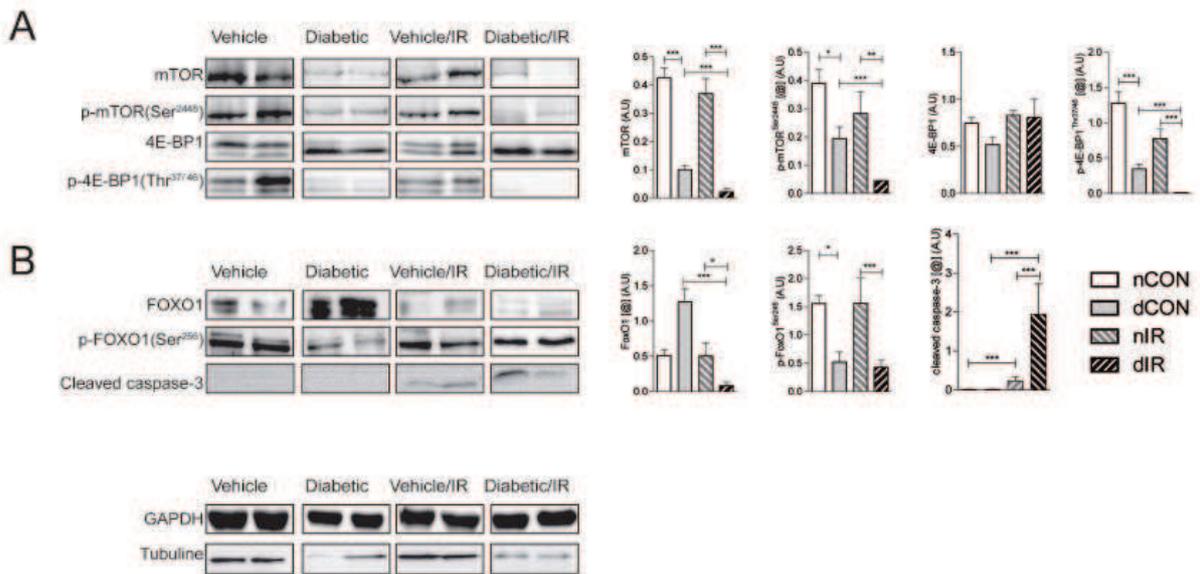


Figure 5

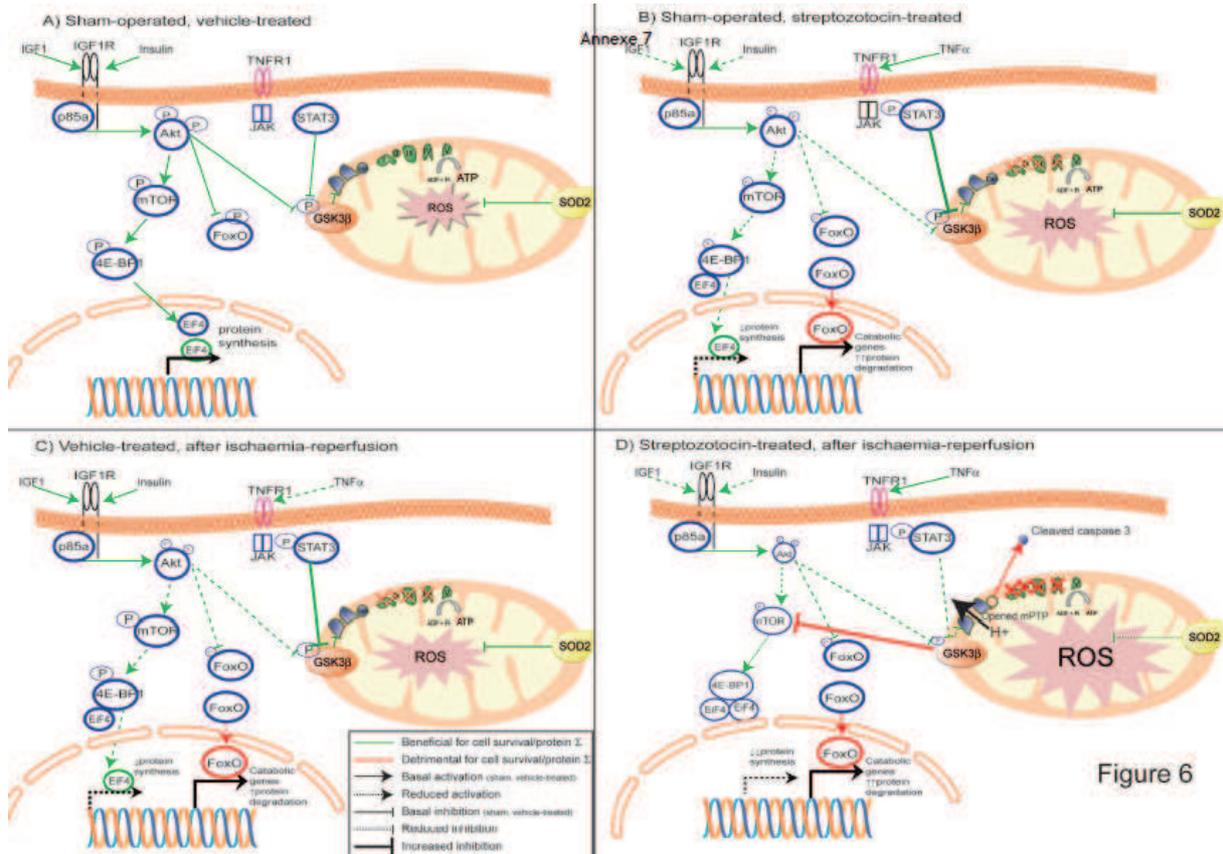


Figure 6

## **5. Mise au point d'un modèle animal d'ischémie critique chronique des membres inférieurs.**

### **Objectifs :**

Il est difficile d'obtenir un modèle d'ischémie critique chronique des membres inférieurs chez la souris, en raison de la néoangiogenèse très rapide et de la collatéralité artérielle très importante. L'objectif de ce travail est de mettre au point un modèle d'ischémie critique des membres inférieurs se rapprochant au plus près de la pathologie humaine, et de le valider à la fois *in vivo*, et *ex vivo*.

### **Matériel et Méthodes :**

Un protocole de double ligature artérielle (ligature fémorale droite et des 3 premières collatérales à J0, puis ligature iliaque droite à J4) a été réalisé chez 28 souris Swiss âgées de 8 semaines au début du protocole, le membre postérieur gauche servant de contrôle. L'ischémie a été confirmée par des scores cliniques cotant les dommages tissulaires et fonctionnels, et par des scintigraphies au MIBI, à J0, J4, J6, J10, J20, et J30. Lors du sacrifice, les muscles gastrocnémiens et tibialis ont été prélevés, pour analyse de la respiration mitochondriale, de la capacité de rétention calcique, de la production de radicaux libres (par résonance paramagnétique et par marquage au dihydroéthidium), analyse histologique, et analyse ARN de la biogenèse, de l'inflammation et des systèmes anti-oxydants.

Des biopsies de muscle gastrocnémiens de patients présentant une ischémie critique chronique ont été comparées à des biopsies de patients contrôle sans artériopathie (NCT02117206).

### **Résultats :**

Les scores cliniques et les scintigraphies ont confirmé l'ischémie critique, pendant toute la durée du protocole. Les muscles ischémiques ont mis en évidence une altération de la fonction respiratoire mitochondriale, une augmentation de la production de radicaux libres, ainsi qu'une diminution de la capacité de rétention calcique. Les muscles ischémiques ont également montré une diminution des capacités anti-oxydantes, une inflammation et un aspect myopathique.

Les biopsies de patients en ischémie critique chronique ont montré également une atteinte de l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

### **Conclusion :**

Notre modèle d'ischémie critique chronique est valide, et stable dans le temps.

## First realistic model of chronic critical limb ischemia closely mimicking human pathology

Anne LEJAY, MD; Philippe CHOQUET, MD; Fabien THAVEAU, MD, PhD; François SINGH; Anna SCHLAGOWSKI; Anne-Laure CHARLES, PhD; Gilles LAVERNY, PhD.; Daniel METZGER, PhD; Joffrey ZOLL, PhD; Nabil CHAKFE, MD, PhD; Bernard GENY, MD, PhD.

**Objective:** To establish a chronic mouse model of critical limb ischemia (CLI) with *in-* and *ex vivo* validation, closely mimicking human pathology. Indeed, there is currently no satisfactory experimental model of CLI due to neoangiogenesis and arterial collaterality.

**Materials and Methods:** 28 Swiss mice were submitted to sequential unilateral femoral (Day 0) and iliac ligatures (Day 4). Ischemia was confirmed by clinical scores (tissue and functional damages) and MIBI scintigraphies at Days 0, 4, 6, 10, 20, and 30. At Days 10, 20 and 30, muscle mitochondrial respiration and calcium retention capacity using respirometry and fluorimetry and reactive oxygen species (ROS) production using dihydroethidium (DHE) staining and electronic paramagnetic resonance were investigated, together with transcripts of mitochondrial biogenesis, inflammation and antioxidant enzymes. Histological analysis was also performed.

Biopsies of human gastrocnemius muscles were obtained during planned surgical procedures in 10 patients presenting with CLI and in 5 control patients operated for coronary revascularization without significant peripheral arterial disease (NCT02117206).

**Results:** Clinical and scintigraphic scores confirmed CLI, together with impaired mitochondrial respiration, calcium retention capacity and biogenesis. Ischemic muscles also demonstrated increased production of ROS, decreased antioxidant enzymes, inflammation and myopathic features. These defects were stable over time (Days 10, 20 and 30)

Interestingly, all complexes of the mitochondrial respiratory chain were impaired in CLI patients, as compared to controls, further validating the animal model.

A) **Conclusions:** Sequential femoral and iliac ligatures closely mimic human functional, clinical, scintigraphic and skeletal muscle mitochondrial characteristics and could prove useful to test therapeutic approaches.

**Key words:** critical limb ischemia, perfusion, scintigraphy, mitochondria, oxidative stress, inflammation, myopathy.

### Introduction

Critical limb ischemia (CLI) defines an advanced stage of chronic arterial insufficiency. It is a manifestation of peripheral arterial disease that describes patients with typical ischemic rest pain, or

patients with ischemic skin lesions, either ulcers or gangrene<sup>1-4</sup>. The term CLI should only be used in relation to patients with chronic ischemic disease, defined as the presence of symptoms for more than 2 weeks<sup>4</sup>. Diagnosis of CLI should also only be made in patients with symptoms

attributable to objectively-proven arterial occlusive disease, and verified by ankle or toe pressure. The diagnosis of CLI is thus a clinical diagnosis of chronic arterial disease, but inevitably supported by objective tests<sup>4</sup>. CLI is estimated to develop in 500 to 1000 individuals per million persons per year<sup>1-3</sup>. Progression of the disease can result in amputation of the affected limb. Moreover, CLI has important functional implications and a major impact on the quality of life. Quality of life indices of patients with CLI have been reported to be similar to those of terminal cancer patients<sup>1</sup>. In addition, CLI is associated with increased mortality (the 1-year mortality is around 25% and may be as high as 45% after amputation)<sup>1,4</sup>. However, despite recent advances in surgical and endovascular techniques, a large number of patients with CLI is not eligible for these revascularization procedures, because of anatomic location of the lesions, the extent of the disease, or extensive comorbidity, largely supporting the need for adequate experimental models allowing to test new therapeutic approaches<sup>1</sup>.

The pathophysiology of lower-limb ischemia-reperfusion has been greatly improved with both skeletal muscle dysfunction and increased oxidative stress appearing as key factors<sup>5-6</sup>. Accordingly, studies in humans have demonstrated myopathy features in bright-field microscopy, with oxidative damages and an increased level of apoptosis, although peripheral arterial disease (PAD) and clinical characteristics of these patients were not completely defined. While muscle mitochondrial dysfunction was observed, a specific study of mitochondrial respiratory chain complex activities in well-defined CLI patients still remains to be conducted<sup>7-8</sup>.

All of these alterations should necessarily be observed in relevant experimental model of CLI. Furthermore, notwithstanding that ischemia induces

neovascularization and formation of collateral vessels explaining that even after femoral artery excision, the perfusion of the limb returns to normal within a few days, the stability of the lesions over time should ideally be obtained<sup>9</sup>.

The main objective of the present study was to develop and comprehensively characterize, both *in-* and *ex vivo*, a chronic and stable CLI experimental model, closely mimicking human functional, clinical, scintigraphic and skeletal muscle mitochondrial pathology. Indeed, such a model is currently lacking and may prove useful to test therapeutic approaches. To further validate the model, skeletal muscle mitochondrial function was also tested in patients with well-defined CLI.

## Methods

### Animals

Twenty-eight Swiss male mice weighting 30-35 grams were handled according to French laws for animal use and care and in accordance with the guidelines of the European Community Council.

### *Critical limb ischemia model*

Surgery was performed under general anesthesia. The induction of general anesthesia was conducted in an airtight ventilated chamber with a mixture of 3% isoflurane (Aerrane ®, Baxter Healthcare) and air. Maintenance of anesthesia was ensured by spontaneous ventilation through a mask delivering a mixture of 2% isoflurane and air.

Ligation of the right femoral artery was performed midway between the superficial epigastric artery and the bifurcation of the popliteal and saphenous arteries under microscope. Three collateral vessels were also ligatured. Four days later, ligation of the right iliac artery 0.5

cm distal to its origin was performed by laparotomy. In this unilateral ischemia model, the contralateral limb can be considered as a control<sup>10</sup>.

Animals were sacrificed at 10, 20 or 30 days after surgery in order to study *in vivo* perfusion as well as *ex vivo* muscle damage over time.

### ***In vivo follow-up of clinical and functional damages and of limb perfusion***

Using already-established clinical scores, clinical tissue damage was graded as follows: normal or white aspect of the limb, toe cyanosis or necrosis, and spontaneous amputation of a toe were attributed 1, 2, 3, 4 or 5 points, respectively<sup>11</sup>.

Functional damages were graded as follows: normal function of the limb, plantar flexion without toe flexion, no plantar flexion, and dragging the limb were attributed 0, 1, 2 or 3 points, respectively<sup>11</sup>.

Tissue perfusion was assessed with gamma camera scans (Gaede MedizinSysteme ® GmbH) under general anesthesia, the animals being placed in a dedicated heating cell (Minerva ®, Esternay, France). Scans lasting 15 minutes were performed 30 minutes after injection of the tracer (MIBI) at the tail vein, at Day 0 (before femoral ligation), Day 4 (before iliac ligation), and at Days 6, 10, 20, and 30.

### ***Ex vivo muscle analysis***

At Day 30, ischemic and contralateral gastrocnemius tibialis muscles were collected. Gastrocnemius muscles were harvested and immediately used for measurement of mitochondrial respiration, calcium retention capacity and production of free radicals. Tibialis muscles were frozen in order to perform histological sections and transcripts analyses.

### ***Mitochondrial respiratory chain complex activities***

Respiration of saponin-permeabilized gastrocnemius muscle fibers was measured with a Clark electrode, in both human and mice muscles<sup>12</sup>. ADP (2 mM) was added in order to study electron flow through complexes I, III and IV. Succinate (25 mM) was then added, to determine the maximal oxidative capacity: V<sub>max</sub> (complexes I, II, III and IV activities). Addition of Amytal (0.02 mM) subsequently inhibited complex I, allowing determine V<sub>amytal</sub> (complexes II, III, and IV activities). Addition of N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD 0.5 mM) and ascorbate (0.5 mM) specifically activated complex IV (V<sub>tmpd</sub>).

### ***Calcium retention capacity***

Calcium retention capacity of gastrocnemius muscle fibers measured by spectrofluorometry is the amount of calcium required to enable the opening of the mitochondrial transition pore, thereafter leading to apoptosis<sup>13</sup>. Calcium pulses (20  $\mu$ mol/L) were applied to the skinned gastrocnemius muscle fibers, until calcium release. The number of calcium additions needed to trigger mitochondrial permeability transition provided the calcium retention capacity.

### ***Production of reactive oxygen species using electron paramagnetic resonance***

Gastrocnemius muscles (1 mm<sup>3</sup> fragments) were incubated with a CMH molecular probe (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine HCl), which is oxidized in the presence of unpaired electrons of reactive oxygen species. The amount of oxidized CMH, and thus the amount of free radicals produced, was measured by the intensity of the resonance signal.

### *Histological analysis: muscle structure and ROS production*

Tibialis muscles were immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C. Muscles were then embedded in paraffin, and 10  $\mu$ m thick sections were prepared using a cryostat microtome, and mounted onto glass slides. Two types of analyses were subsequently performed: images of slide specimens stained with hematoxylin and eosin were acquired under bright-field microscopy, while other slides were incubated with 2.5  $\mu$ M dihydroethidium (DHE). DHE produces red fluorescence when oxidized to ethidium bromide, mainly by superoxide anion. After staining, sections were examined under epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E800) and emission signals recorded.

### *Transcripts protein encoding for mitochondrial biogenesis, antioxidant defense and inflammation*

Main transcripts encoding proteins involved in mitochondrial biogenesis (PGC1 $\alpha$ ,  $\beta$ , and Nrf1), antioxidative enzymes (Sod 1, Sod 2, catalase) and inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL6, IGF1) were analyzed. Two  $\mu$ g of RNA, isolated with TRIzol Reagent (Invitrogen), were converted to cDNA with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies) and hexamer primers according to the supplier's protocol. Quantitative RT-PCR was performed using the QuantiTect<sup>TM</sup> SYBR Green PCR kit (Roche) according to the supplier's protocol. The primers are presented in Supplemental Digital Content (SDC1).

### **Human muscle biopsies**

Fifteen patients gave written informed consent and the protocol was approved by the Ethical Review Board for Human Studies and declared to Clinical Trials (NCT02117206).

Surgical biopsies of the gastrocnemius muscles were performed

through an incision at the inner side of the calf in 10 patients presenting with CLI at the time of open femoropopliteal bypass revascularization (CLI patients). Five biopsies were performed in patients free of peripheral arterial disease, during surgery for coronary revascularization, through an incision performed for saphenous vein harvesting (CAD control patients).

### **Data analysis**

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5<sup>®</sup> (GraphPad Software, Inc). Results are expressed as means and standard deviations. Differences between measurements of ischemic and control muscles (of the same mice) were evaluated by a two-tailed Student's *t*-test. Comparison between ischemic muscles or comparison between control muscles were assessed by a Student's *t*-test. P values  $\leq$  0.05 were considered as indicative of statistical significance.

### **Results**

#### **B) Experimental Model**

#### ***Follow-up of clinical and functional parameters and of limb perfusion***

##### *Clinical and functional damages*

Among the 28 mice, one mouse died at Day 1 in the Day 10-sacrifice group and 1 mouse died at Day 4 in the Day 30-sacrifice group. Clinical examination of the 26 remaining mice showed tissue damage (toe necrosis in 22 mice, cyanosis in 4 mice) as well as functional damages (20 mice dragged the ischemic limb, 6 mice could not achieve plantar flexion), (Figure 1, A and B).

##### *Limb perfusion*

MIBI scans showed hypoperfusion of the ischemic limb, in comparison to control limb and such hypoperfusion remained stable until Day 30 after surgery (Figure 1C).

## *Ex vivo muscle analysis*

### **Mitochondrial respiratory chain complex activities**

Mitochondrial respiration was significantly impaired in ischemic muscles comparatively to control muscles at Days 10, 20 and 30 after surgery. This was also true for all mitochondrial respiratory chain complexes.

At Day 10, V<sub>0</sub> was  $2.05 \pm 1.01$  vs.  $3.57 \pm 1.02$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  ( $p < 0.001$ ) in ischemic and control legs, respectively. Maximal oxidative capacity (V<sub>max</sub>) was  $6.97 \pm 2.41$  vs.  $10.29 \pm 2.02$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  ( $p < 0.001$ ). Complexes II, III and IV activity (V<sub>amytal</sub>) was  $4.32 \pm 1.84$  vs.  $6.87 \pm 1.46$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  ( $p < 0.001$ ). Finally, complex IV activity (V<sub>tmpd</sub>) was  $8.27 \pm 2.47$  vs.  $11.01 \pm 2.60$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  ( $p < 0.001$ ) in ischemic and control legs, respectively.

At Day 20, V<sub>0</sub> was  $1.90 \pm 0.70$  vs.  $3.26 \pm 0.41$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  ( $p < 0.01$ ); V<sub>max</sub>:  $7.30 \pm 1.59$  vs.  $9.86 \pm 1.44$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  ( $p < 0.001$ ); and V<sub>tmpd</sub> =  $8.07 \pm 1.25$  vs.  $10.25 \pm 0.93$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  ( $p < 0.001$ ) in ischemic and control legs, respectively.

At Day 30, V<sub>0</sub> was  $2.33 \pm 0.70$  vs.  $3.34 \pm 0.84$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  ( $p = 0.01$ ) in ischemic and control legs, respectively. Maximal oxidative capacity (V<sub>max</sub>) was  $7.93 \pm 0.99$  vs.  $10.09 \pm 2.87$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  ( $p = 0.01$ ). Complexes II, III and IV activity (V<sub>amytal</sub>) was  $4.99 \pm 0.58$  vs.  $6.45 \pm 2.39$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  ( $p = 0.06$ ). Finally, complex IV activity (V<sub>tmpd</sub>) was  $8.68 \pm 1.18$  vs.  $10.36 \pm 2.02$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  ( $p = 0.04$ ) in ischemic and control legs, respectively (Figure 2A).

### *Calcium retention capacity*

Calcium retention capacity (CRC) was also impaired in ischemic muscles as compared to control muscles:  $7.3 \pm 1.2$  vs.

$10.6 \pm 1.2$   $\mu\text{mol/mg dw}$  for mice sacrificed at Day 10 ( $p < 0.001$ ).

At Day 20, CRC was  $20.68 \pm 0.9$   $\mu\text{mol/mg dw}$  vs.  $11.4 \pm 0.7$   $\mu\text{mol/mg dw}$  ( $p < 0.001$ ).

At Day 30, CRC was  $7.4 \pm 1.6$   $\mu\text{mol/mg dw}$  vs.  $11.9 \pm 0.9$   $\mu\text{mol/mg dw}$  ( $p < 0.001$ ) in ischemic and control legs, respectively (Figure 2B).

### *Production of reactive oxygen species using electron paramagnetic resonance and DHE staining*

Production of free radicals was increased in ischemic gastrocnemius as compared to control muscles:  $0.089 \pm 0.033$  vs.  $0.080 \pm 0.022$   $\mu\text{mol/min/mg dw}$  for mice sacrificed at Day 10 ( $p = 0.46$ );  $0.102 \pm 0.024$  vs.  $0.083 \pm 0.034$   $\mu\text{mol/min/mg dw}$  for mice sacrificed at Day 20 ( $p = 0.01$ ); and  $0.084 \pm 0.029$  vs.  $0.051 \pm 0.031$   $\mu\text{mol/min/mg dw}$  for mice sacrificed at Day 30 ( $p = 0.03$ ).

Fluorescence after DHE staining was also higher in ischemic tibialis fibers:  $3622 \pm 604$  arbitrary units of fluorescence vs.  $1224 \pm 324$  arbitrary units of fluorescence ( $p < 0.01$ ) (Figure 3, A and B).

### *Stability of the model over time*

As shown in Figure 1, clinical, functional and scintigraphic parameters were similar in the control leg at days 10, 20 and 30 after surgery. Importantly, impairments in ischemic legs were also stable during the study follow-up.

Mitochondrial respiration, calcium retention capacity and production of free radicals showed a similar evolution, demonstrating the stability of the model (Figure 1, 2, 3, SDC 2).

### *Transcripts encoding proteins involved in mitochondrial biogenesis, antioxidant defense and inflammation*

RNA analysis revealed a decrease in biogenesis, with a decrease in PGC 1 $\alpha$  : -63% (p=0.01), -44% (p=0.01), and -41% (p=0.04) at Days 10, 20 and 30, respectively ; in PGC 1 $\beta$  : -60% (p=0.01); -36% (p=0.03); and -49% (p=0.01) at Days 10, 20 and 30, respectively, and a decrease in NRF 1 : -19% (p=0.04) -35% (p=0.02) and -41% (p=0.02) at Days 10, 20 and 30, respectively.

Anti-oxidant system was impaired at Days 10, 20 and 30: SOD 1: -39% (p=0.01), -44% (p=0.01), and -32% (p=0.04), respectively; SOD 2: -59% (p=0.01), -38% (p=0.04), and -41% (p=0.02), respectively; Catalase: -60% (p=0.01), -36% (p=0.04), -49% (p=0.03), respectively.

Inflammation increased significantly at Days 10 and 20 for IGF 1: +176% (p=0.01) and +45% (p=0.03), respectively, and at Day 10 for IL 6 and TNF $\alpha$ : +193% (p=0.01) and +290% (p=0.01), respectively (Figure 4).

### *Histological analysis: muscle structure*

Chronically ischemic tibialis muscle exhibited myopathic features, as established by hemotoxylin-eosin coloration with a wider range in fiber size, a more rounded shape, centrally located nuclei, and smaller cross-sectional areas compared to control fibers (Figure 3C).

### **Impaired mitochondrial function in CLI patients**

Clinical and biological characteristics of CAD control and CLI patients are presented in Table 1. CAD control and CLI patients were non-diabetic patients, and had no comorbidities in terms of renal, pulmonary or cerebral disease.

With regard to muscle mitochondrial respiratory chain complex activities, complexes I, II, III and IV were impaired in patients presenting with critical limb ischemia as compared to control patients:  $V_0 = 1.36 \pm 0.33$  vs.  $1.73 \pm 0.39$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  (p=NS);  $V_{\text{max}} = 4.58 \pm 0.81$  vs.  $7.18 \pm 1.65$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  (p=0.02);  $V_{\text{succ}} = 3.43 \pm 1.27$  vs.  $5.61 \pm 1.57$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  (p=0.03); and  $V_{\text{tmpd}} = 7.91 \pm 1.81$  vs.  $11.54 \pm 2.52$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$  (p=0.03) (Table 1).

### **Discussion**

Chronic critical limb ischemia defines an advanced stage of arterial insufficiency with high morbidity and mortality rates supporting the need for therapeutic improvements. However, there is currently no satisfactory CLI experimental model because of neoangiogenesis and arterial collaterality and therefore, adequate experimental data are difficult to obtain<sup>18-22</sup>.

Herein, we propose a new CLI model which, for the first time, fulfills all criteria defining CLI (clinical signs, hypoperfusion and chronicity) and is further validated by data obtained in control and CLI patients.

### **Patients with CLI demonstrate impaired mitochondrial respiratory chain complex activities**

Patients with CLI demonstrated all established characteristics of the disease, namely long-duration lower limb pain, trophic alteration and hypoperfusion as demonstrated by arteriography. In order to further characterize CLI physiopathology, muscle biopsies were performed and impaired mitochondrial respiration was observed in all patients. Although this is consistent with previous data showing decreased mitochondrial oxidative capacities in PAD patient, the novelty of

the present work resides in the fact that PAD patients were well defined, e.g. all clearly suffering from CLI, and secondly, that complexes I, II, III and IV of the mitochondrial respiratory chain were analyzed and found to be impaired<sup>6-8</sup>.

The mechanisms involved in such muscle alteration in humans have not been fully described although, as inferred from acute animal models, they likely associate reduced oxygen supply leading to reduced energy production secondary to defective mitochondria and increased oxidative stress<sup>4-6,16</sup>. Indeed, an impaired mitochondrial antioxidant defense system unable to respond to abnormally elevated ROS has been shown to damage muscle proteins and lipids<sup>5,16-17</sup>.

Ideally, all these alterations should be present and stable over time in a chronic experimental model of CLI.

#### **Classic criteria were fulfilled for the validation of our experimental model of chronic critical limb ischemia**

Current recommendations require that both clinical signs and symptoms are present for more than 2 weeks along with objective measurements of arterial perfusion in order to diagnose CLI<sup>4</sup>. By using already-established clinical scores and MIBI scintigraphies, the present model fully complies with these recommendations<sup>11</sup>.

While clinical scores are not routinely used when characterizing animal models, they can nevertheless be easily transposed since animals also present with several degrees of lower limb impotency and, moreover, the observed tissue lesions follow the same pattern as in humans, ranging from a cyanotic aspect of the limb to necrosis.

Tissue perfusion is also an important feature to consider when investigating CLI. Rather than using invasive arteriography, scintigraphy was

preferentially used, since already proven to be a good approach for cardiac or skeletal muscle perfusion studies<sup>18-19</sup>. Indeed, such noninvasive technique enables to follow potential perfusion changes over time. Furthermore, Tc-99m MIBI (MIBI) scintigraphy can detect hypoperfusion earlier than with Laser Doppler Imaging, since the uptake of this radiopharmaceutical compound is dependent on the distribution of regional blood flow, an early indicator of hypoperfusion<sup>18</sup>. Currently, MIBI scintigraphies are under consideration for the study of peripheral arterial disease in patients<sup>20</sup>. Finally, in the present study, particular care was taken to follow the animals until 30 days after the first surgical ligation, thus allowing assess the observed symptoms and hypoperfusion for a period of over 2 weeks<sup>4</sup>.

The pathophysiology of lower limb ischemia-reperfusion has been largely improved in recent years and, as a result, we further investigated key mechanisms such as muscle mitochondrial function and oxidative stress.

#### **Experimental CLI impairs mitochondrial function, increases oxidative stress and results in muscle myopathy.**

Given that mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress are largely involved in acute lower limb ischemia, we investigated whether these elements are also key factors in CLI.

Accordingly, in our CLI model, ischemic murine muscles displayed impaired mitochondrial respiration involving all mitochondrial respiratory chain complexes. Furthermore, early Ca<sup>++</sup> release in the ischemic muscle was also observed herein. These data support that chronically ischemic muscles are prompt to apoptosis. Finally, mitochondrial dysfunctions were associated with a reduced

mitochondrial biogenesis, which also probably participated in the chronic alteration of ischemic muscles.

Mitochondria may potentially be both actors and targets in chronic ischemia-reperfusion-related injuries since they both enhance and are impaired by ROS production. In the present model, increased production of reactive oxygen species was observed using electron paramagnetic resonance and DHE staining, and thus likely participated in muscle alterations. A reduction in anti-oxidant capacities was also observed, since mRNA encoding superoxide dismutases 1 and 2 and catalase, the main enzymes involved in ROS detoxification, were significantly decreased in ischemic muscles. Similarly, Pipinos et al. observed that ischemic mouse muscle was associated with decreased MnSOD activity<sup>7</sup>.

In addition, inflammation markers were increased, primarily at day 10 after surgery. Indeed, Il-6 and TNF-alpha returned to normal levels at day 20, which was also observed for IGF-1 at day 30 after surgery. It is well known that inflammation participates in acute IR-induced muscle disease<sup>21</sup>, although it is noteworthy to note that such inflammation was not long-

standing, suggesting that long-term anti-inflammatory therapy may not be useful in CLI.

Finally, ischemic muscles exhibited myopathy features, with ischemic myofibers demonstrating a broader range in terms of size, a more rounded shape, centrally located nuclei and smaller cross-sectional area compared to control fibers.

In **conclusion**, the present study, in addition to further characterizing muscle alterations in CLI patients, shows that sequential artery ligations lead to a valid CLI mouse model based on both *in vivo* (clinical, functional and perfusion scores) and *ex vivo* (mitochondrial respiration, biogenesis, calcium retention capacity and oxidative stress) impaired functions.

Studies aiming to reduce such impairments may benefit from this experimental model and therefore help to better define efficient therapeutic strategies to be proposed in patients with CLI.

### Acknowledgments

This work was supported by a grant from the French Society of Vascular Surgery and the delegation of clinical research and innovation from the University Hospital of Strasbourg.

### REFERENCES

1. Sprengers R, Lips D, Moll F, et al. Progenitor cell therapy in patients with critical limb ischemia without surgical options. *Ann Surg* 2008;247:411-420.
2. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzler NR, et al. ACC/AHA 2005 practice guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease. *Circulation* 2006;113:463-654.
3. Becker F, Robert-Ebadi H, Ricco JB, et al. Critical limb ischemia: Definitions, epidemiology, clinical presentation and prognosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011;42:S4-12.
4. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007;33:S1-75.
5. Lejay A, Meyer A, Schlagowski A, et al. Mitochondria : mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2014 ;50:101-105.
6. Brass EP, Hiatt WR. Acquired skeletal

- muscle metabolic myopathy in atherosclerotic peripheral arterial disease. *Vasc Med*. 2000;5:55-59.
7. Pipinos II, Judge AR, Selsby JT, et al. The myopathy of peripheral arterial occlusive disease. Oxidative stress, neuropathy, and shift in muscle fiber type. *Vasc Endovascular Surg*. 2008;42:101-112.
  8. Mitchell RG, Duscha BD, Robbins JL, et al. Increased levels of apoptosis in gastrocnemius skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *Vasc Med* 2007;12:285-290.
  9. Tang GL, Chang DS, Sarkar R, Wang R, Messina LM. The effect of gradual or acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis, and inflammation in rat hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* 2005;41:312-320.
  10. Thaveau F, Zoll J, Bouitbir J, et al. Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2009;155:65-69.
  11. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, et al. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* 2003;108:205-210.
  12. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, et al. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;3:965-976.
  13. Picard M, Csukly K, Robillard M, et al. Resistance to Ca<sup>2+</sup>-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:659-668.
  14. Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witsenbichler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 1998;152:1667-1679.
  15. Waters RE, Terjung RL, Peters KG, Annex BH. Preclinical models of human peripheral arterial occlusive disease: implications for investigation of therapeutic agents. *J Appl Physiol* 2004;97:773-780.
  16. Makris KI, Nella AA, Zhu Z, et al. Mitochondriopathy of peripheral arterial disease. *Vascular* 2007;15:336-343.
  17. Brass EP, Hiatt WR, Gardner AW, et al. Decreased NADH dehydrogenase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase in peripheral arterial disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:603-609.
  18. Kuśmierk J, Dabrowski J, Bienkiewicz M, et al. Radionuclide assessment of lower limb perfusion using <sup>99m</sup>Tc-MIBI in early stages of atherosclerosis. *Nucl Med Rev Cent East Eur* 2006;9:18-23.
  19. Miles KA, Barber RW, Wraight EP, et al. Leg muscle scintigraphy with <sup>99m</sup>Tc-MIBI in the assessment of peripheral vascular (arterial) disease. *Nucl Med Commun* 1992;13:593-603.
  20. Winant CD, Aparici CM, Zelnik YR, et al. Investigation of dynamic SPECT measurements of the arterial input function in human subjects using simulation, phantom and human studies. *Phys Med Biol* 2012;57:375-393.
  21. Diepenhorst G, Van Gulik T, Hack E. Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Ann Surg* 2009;249:889-899.

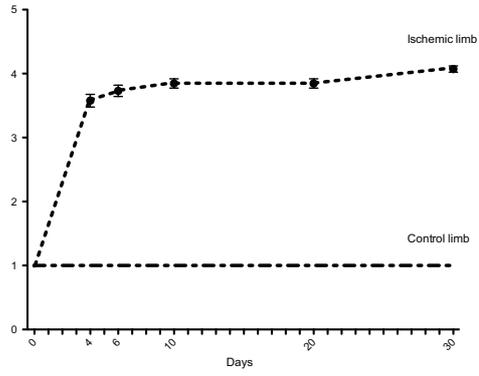
**Table I: Clinical, hemodynamic and mitochondrial characteristics of control and critical limb ischemia patients**

	CAD control patients (n=5)	CLI patients (n=10)	p
Mean age	63.2 years (SEM 1, range 54-86)	62.8 years (SEM 1, range 51-84)	NS
Body mass index	22.8 kg/m <sup>2</sup>	21.6 kg/m <sup>2</sup>	NS
Mean ankle pressure	140 mm Hg	30 mm Hg	<0.001
Systolic systemic blood pressure	150 mm Hg	155 mm Hg	NS
Diastolic systemic blood pressure	90 mm Hg	88 mm Hg	NS
Mean systemic blood pressure	120 mm Hg	120 mm Hg	NS
Heart rate	95 p/min	90 p/min	NS
Mitochondrial respiration (mean ± SD):			
V <sub>0</sub>	1.73 ± 0.39	1.36 ± 0.33	NS
V <sub>max</sub>	7.18 ± 1.65	4.58 ± 0.81	0.02
V <sub>succ</sub>	5.61 ± 1.57	3.43 ± 1.27	0.03
V <sub>tmpd</sub>	11.54 ± 2.52	7.91 ± 1.81	0.03
ACR	4.18 ± 0.62	3.60 ± 1.24	NS

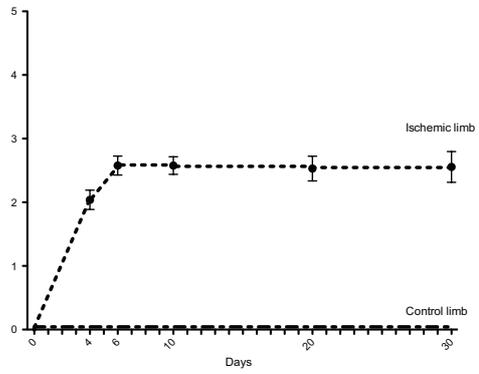
CAD : coronary artery disease , CLI : critical limb ischemia, V<sub>0</sub> : Basal mitochondrial oxydative capacity; V<sub>max</sub> : Maximal mitochondrial oxidative capacity, V<sub>amytal</sub> : Complexes II, III and IV activity, V<sub>tmpd</sub> : Complexe IV activity, ACR : acceptor control ratio.

**Figure 1: Clinical, functional, and perfusion scores**

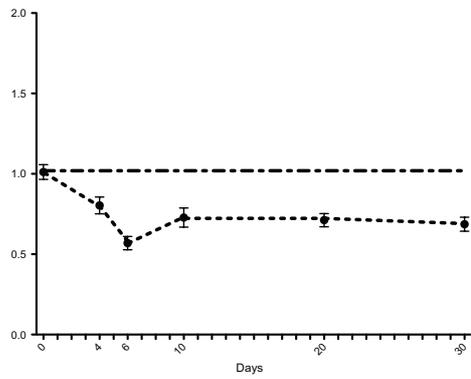
**A. Clinical score**



**B. Functional Score**

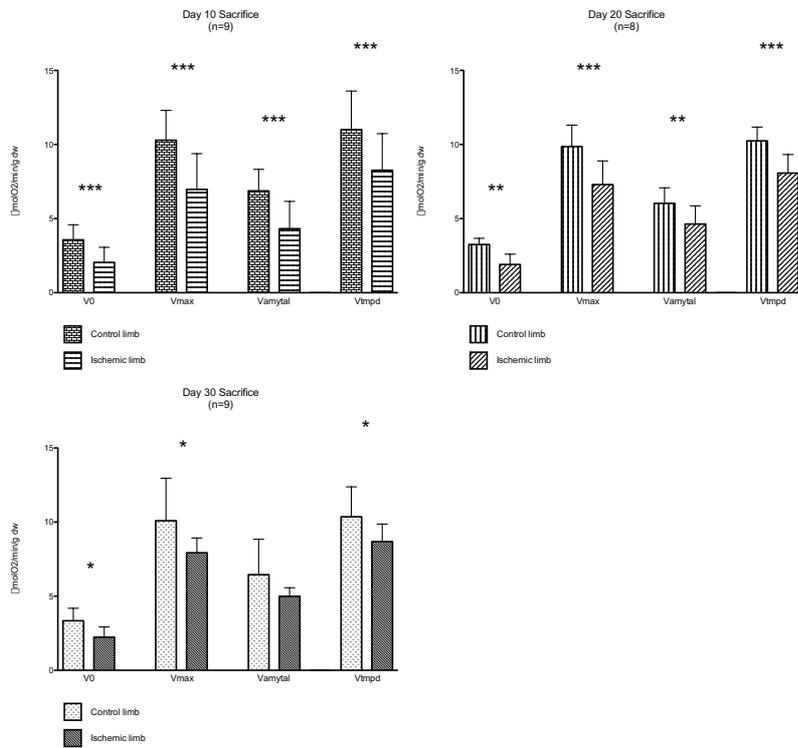


**C. Perfusion score**



**Figure 2: Mitochondrial respiration and calcium retention capacity**

**A. Mitochondrial respiration**

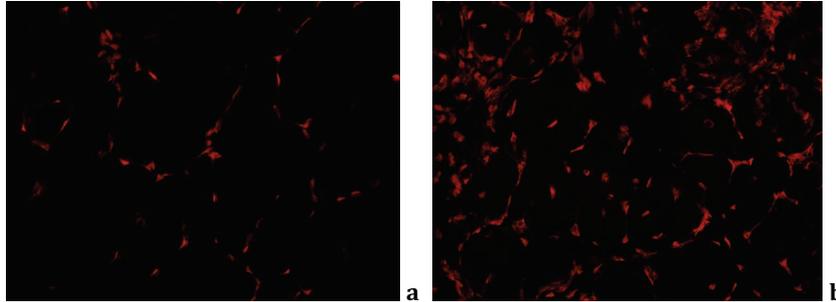


**B. Calcium retention capacity**

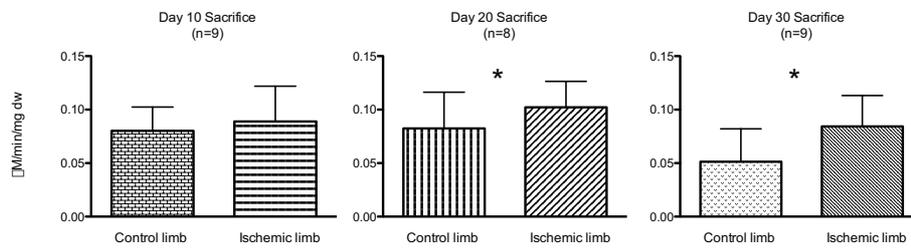


**Figure 3: Dihydroethidium stain, production of free radicals, and hematoxylin-eosin stain**

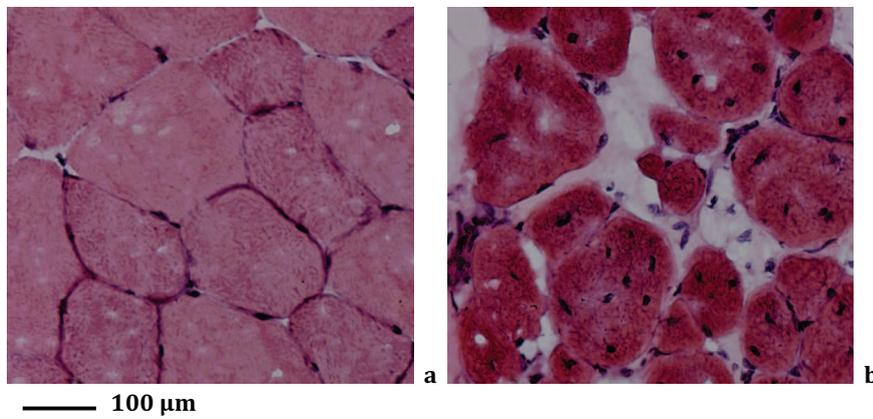
**A. Dihydroethidium stain (a Control limb, b Ischemic limb)**



**B. Production of free radicals**

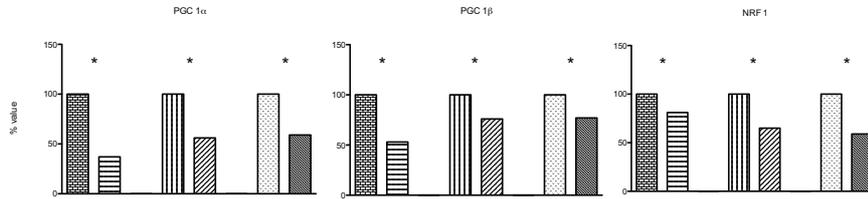


**C. Hematoxylin-eosin stain (a Control limb, b Ischemic limb, x40)**

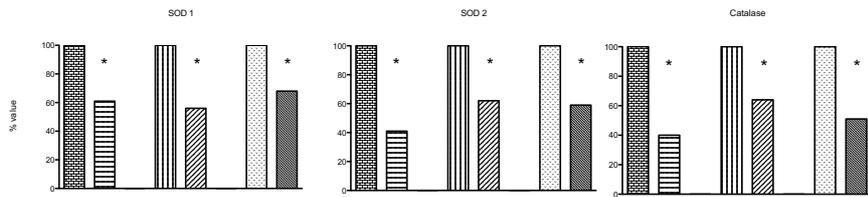


**Figure 4 : Transcripts encoding proteins involved in mitochondrial biogenesis, anti-oxidant defense and inflammation.**

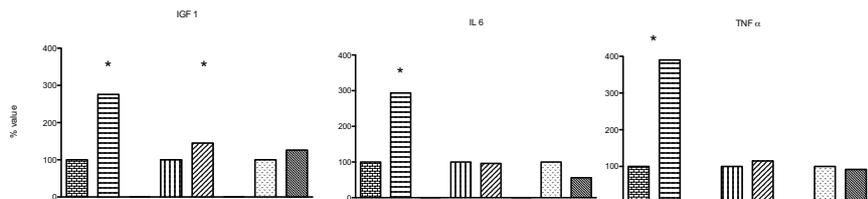
**A. Biogenesis**



**B. Anti-oxidant defense**



**C. Inflammation**



## SDC 1

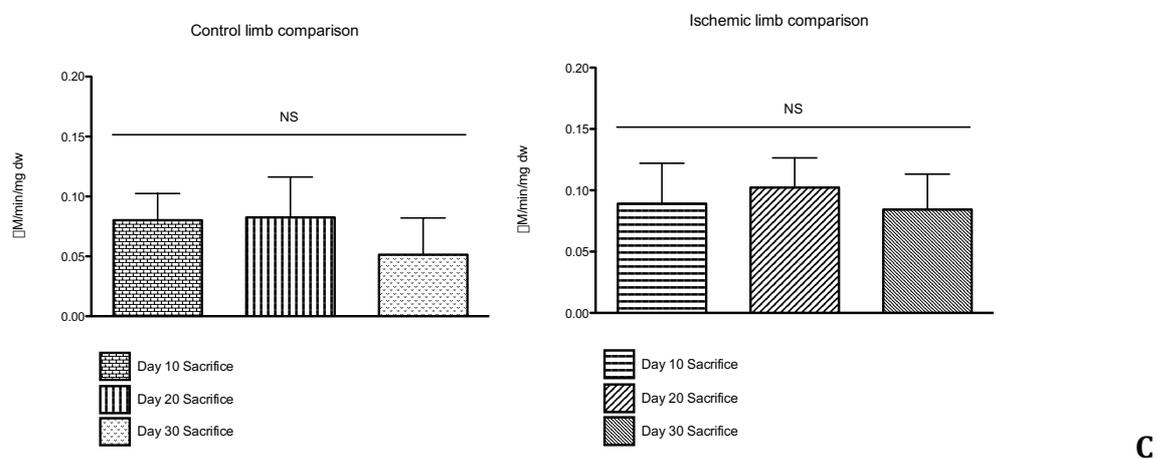
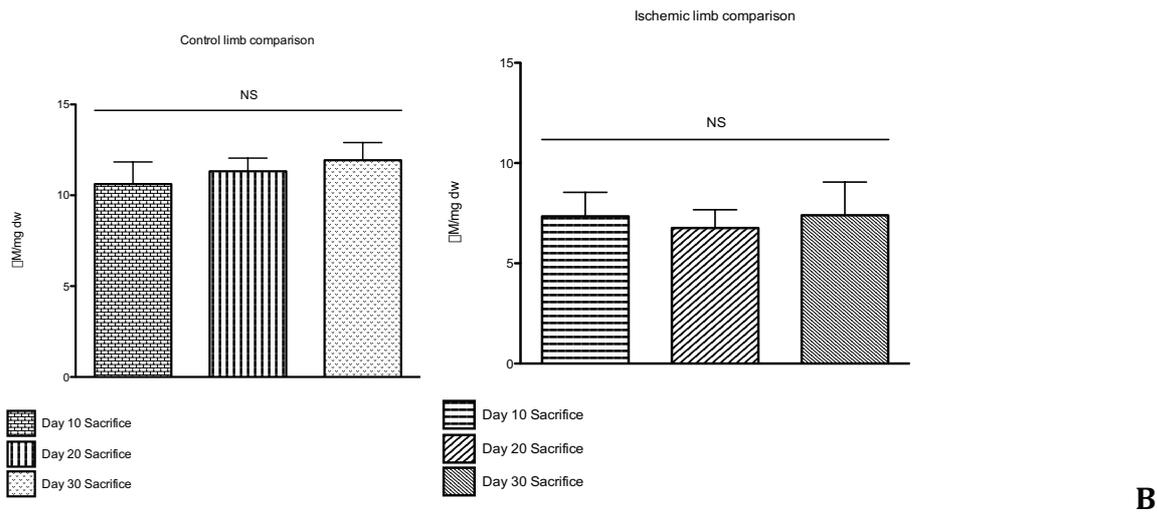
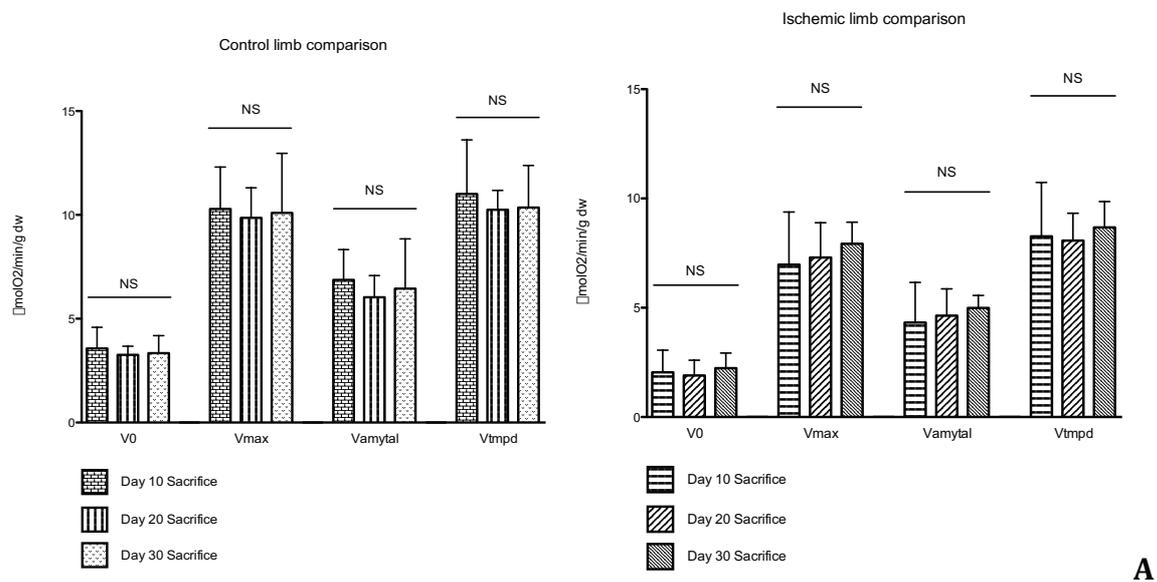
### *Muscle antioxidant defense, inflammation and mitochondrial biogenesis*

Main antioxidative enzymes (Sod 1, Sod 2, catalase), inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL6, IGF1), and markers of mitochondrial biogenesis (Nrfl, PGC1 $\alpha$ , PGC1 $\beta$ ) were RNA analyzed. RNA was isolated with TRIzol Reagent (Invitrogen). Two  $\mu$ g of RNA were converted to cDNA with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies) and hexamer primers according to the supplier's protocol. Quantitative RT-PCR was performed using the QuantiTect<sup>TM</sup> SYBR Green PCR kit (Roche) according to the supplier's protocol. The primers are presented below.

Primers were : for *mSod1*, 5'-CCAGTGCAGGACCTCATTTT-3' (sense) and 5'-TTGTTTCTCATGGACCACCA-3' (antisense); for *mSod2*, 5'-CGAGGAGAAGTACCACGAG-3' (sense) and 5'-GCTTGATAGCCTCCAGCAAC-3' (antisense) ; for *mCatalase*, 5'-CACTGACGAGATGGCACACT-3' (sense) and 5'-TGTGGAGAATCGAACGGCAA-3' (antisense) ; for *mPGC-1a*, 5'-AAGTGTGGAAGTCTCTGGAAGT-3' (sense) and 5'-GGGTTATCTTGGTTGGCTTTATG-3' (antisense) for *mPgc-1b*, 5'-CTACCAGAGCCCACCCAGTA-3' (sense) and 5'-CAGGATGAGGAGCCAGAACT-3' (antisense) ; for *mTnf-a*, 5'-CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA-3' (sense) and 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3' (antisense) ; for *mIl-6*, 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3' (sense) and 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3' (antisense) ; for *mNrfl*, 5'-TGGAGTCCAAGATGCTAATG-3' (sense) and 5'-AGAGCTCCATGCTACTGTTC-3' (antisense) ; for *mmTfa*, 5'-TCGCATCCCCTCGTCTATCA-3' (sense) and 5'-CCACAGGGCTGCAATTTTCC-3' (antisense). *18 S* was used as an internal control (5'-TCGTCTTCGAAACTCCGACT-3' (sense) and 5'-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3' (antisense).

## SDC 2

Stability of the model over time (A mitochondrial respiration, B calcium retention capacity, C production of free radicals)



## **6. Effets opposés des statines sur le muscle squelettique en ischémie critique chronique : effets délétère de la prévention primaire versus effets protecteurs de la prévention secondaire.**

### **Objectifs :**

Les statines sont couramment employées, notamment dans le cadre de la pathologie cardiovasculaire. Toutefois, leur principal effet secondaire est la myotoxicité, pouvant aller de la simple gêne à une véritable rhabdomyolyse. Leur effet délétère sur le muscle squelettique, *a contrario* de leur effet bénéfique sur le muscle cardiaque a déjà été démontré. Il est cependant recommandé de prescrire des statines aux patients en ischémie critique chronique. Nous avons voulu donc spécifiquement étudier les effets des statines sur le muscle squelettique, selon le délai d'instauration du traitement (avant ou après l'installation de l'ischémie critique).

### **Matériel et Méthodes :**

Trente souris Swiss âgées de 8 semaines ont fait l'objet de cette étude : toutes ont été opérées selon notre modèle d'ischémie critique, à savoir une ligature fémorale droite ainsi que des 3 premières collatérales à J0, suivie d'une ligature iliaque droite à J4. Parmi ces 30 souris, 10 correspondaient au groupe contrôle, 10 ont bénéficié d'un traitement par statines (atorvastatine 5mg/kg/j) 30 jours avant la chirurgie, et jusqu'au sacrifice à 30 jours, et 10 ont bénéficié d'un traitement par statines 6 jours après la chirurgie et jusqu'au sacrifice à J30. Nous avons étudié la respiration mitochondriale, la production de radicaux libres, et la capacité de rétention calcique.

### **Résultats :**

L'administration de statines avant l'installation de l'ischémie critique chronique a un effet délétère, elle entraîne une diminution de la fonction respiratoire mitochondriale et de la capacité de rétention calcique, ainsi qu'une augmentation de la production de radicaux libres. L'administration de statines une fois l'ischémie critique installée a un effet protecteur, en restaurant la fonction respiratoire mitochondriale et la capacité de rétention calcique, ainsi qu'en diminuant le stress oxydant.

### **Conclusion :**

L'action des statines n'est pas la même en fonction du délai d'instauration du traitement. Les statines sont délétères en prévention primaire, mais protectrices en protection secondaire. Les voies de signalisation intracellulaires utilisées ne sont vraisemblablement pas les mêmes, avec l'implication potentielle des voies RISK et SAFE dans la prévention secondaire.

**Opposite effects of statins on chronic critical limb ischemia mouse skeletal muscle : deleterious effects of primary prevention versus protective effects of secondary prevention**

Anne LEJAY, MD; Philippe CHOQUET, MD; Fabien THAVEAU, MD, PhD; François SINGH; Anna SCHLAGOWSKI; Anne-Laure CHARLES, PhD; Gilles LAVERNY, Ph.D.; Daniel METZGER, PhD; Joffrey ZOLL, PhD; Nabil CHAKFE, MD, PhD; Bernard GENY, MD, PhD.

**Objectives:** Statins are widely used, particularly in the context of cardiovascular disease. However, the main side effect is myotoxicity, ranging from annoyance to real rhabdomyolysis. Their deleterious effects on skeletal muscle, in contrast to their beneficial effects on cardiac muscle have been demonstrated. It is however recommended to prescribe statins to patients with chronic critical limb ischemia. The aim of this study is to specifically study the effects of statins on skeletal muscle depending on the time of initiation of the treatment (before or after the onset of critical limb ischemia).

**Material and Methods:** Thirty Swiss mice 8 weeks old were submitted to critical limb ischemia by sequential arterial ligation. Ten mice corresponded to the control group, 10 received atorvastatin treatment before the onset of critical limb ischemia until sacrifice, and 10 received atorvastatin after the onset of critical limb ischemia until sacrifice. Mitochondrial respiration, production of free radicals, and calcium retention capacity were studied.

**Results:** Administration of statins before the onset of critical limb ischemia has deleterious effects, causing a decrease in mitochondrial respiratory function and calcium retention capacity, and an increased production of free radicals. Administration of statins after the onset of critical limb ischemia has protective effects, by restoring mitochondrial respiratory function and calcium retention capacity, and by reducing oxidative stress.

**Conclusion:** Statins have not the same muscular effect, depending on the time of treatment initiation. They are deleterious in primary prevention, but protective in secondary prevention. Intracellular signaling pathways used are probably not the same, with the potential involvement of RISK and SAFE pathways in secondary prevention.

## INTRODUCTION

Critical limb ischemia (CLI) defines an advanced stage of peripheral arterial disease, with high rates of mortality and cardiovascular events. Direct evidence supporting the use of statins to lower cholesterol levels in CLI patients comes from the Heart Protection Study (HPSCG 2002), demonstrating that in CLI patients aggressive low-density cholesterol (LDL)

lowering was associated with a marked reduction in cardiovascular events (myocardial infarction, stroke, and vascular death). Thus, in CLI patients, statins should be the primary agents to lower LDL cholesterol levels in order to reduce cardiovascular events (Norgren 2007). In fact, statins are used to lower cholesterol by inhibiting HMG-CoA reductase in the liver and are generally regarded as safe. However, the most common statin related adverse drug

reaction is skeletal muscle toxicity that ranges from mild to severe and is believed to occur in up to 10-15% of exposed subjects in real world practice (Norata 2014).

Otherwise, a myopathy characterized by mitochondrial pathology and oxidative stress is present in patients with CLI. This myopathy is characterized by an increase content of dysfunctional mitochondria having significant defects in electron transport chain complexes. These defects are associated with a bioenergetics decline, characterized by inadequate oxidative phosphorylation, decreased ATP energy production, and increased oxidative stress (Pipinos 2008).

The purpose of this study is to determine the mitochondrial effects of statins on CLI skeletal muscle, depending on the time when the statin treatment was initiated: before or after the onset of CLI.

## **METHODS**

### **Animals**

Thirty Swiss male mice weighting 30-35 grams were handled according to French laws for animal use and care and in accordance with the guidelines of the European Community Council.

### **Critical limb ischemia model**

Critical limb ischemia was obtained through our established animal of CLI (Lejay 2014). Surgery was performed under general anesthesia. The induction of general anesthesia was conducted in an airtight ventilated chamber with a mixture of 3% isoflurane (Aerrane ®, Baxter Healthcare) and air. Maintenance of anesthesia was ensured by spontaneous ventilation through a mask delivering a mixture of 2% isoflurane and air.

Ligation of the right femoral artery was performed midway between the superficial epigastric artery and the bifurcation of the popliteal and saphenous arteries under microscope. Three collateral vessels were also ligatured. Four days later, ligation of the right iliac artery 0.5 cm distal to its origin was performed by laparotomy. In this unilateral ischemia model, the left limb can be considered as a control (Thaveau 2009).

### **Statins administration**

Mice were divided into 3 groups: all mice were operated, but 10 received no treatment (NO-TREAT group), 10 mice received 5mg/kg/j atorvastatin in drinking water 30 days before surgery until sacrifice (PRE-CON group), and 10 mice received 5mg/kg/j atorvastatin in drinking water 6 days after surgery (after the onset of CLI) until sacrifice (POST-CON group).

### **Ex vivo muscle analysis**

At Day 30, ischemic and contralateral gastrocnemius muscles were collected and immediately used for measurement of mitochondrial respiration, calcium retention capacity and production of free radicals.

Respiration of saponin-permeabilized gastrocnemius muscle fibers was measured with a Clark electrode. ADP (2 mM) was added in order to study electron flow through complexes I, III and IV. Succinate (25 mM) was then added, to determine the maximal oxidative capacity:  $V_{max}$  (complexes I, II, III and IV activities). Addition of Amytal (0.02 mM) subsequently inhibited complex I, allowing determine  $V_{Amytal}$  (complexes II, III, and IV activities). Addition of N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD 0.5 mM) and ascorbate (0.5 mM) specifically activated complex IV ( $V_{tmpd}$ ).

Calcium retention capacity of gastrocnemius muscle fibers measured by

spectrofluorometry is the amount of calcium required to enable the opening of the mitochondrial transition pore, thereafter leading to apoptosis (Picard 2008). Calcium pulses (20  $\mu\text{mol/L}$ ) were applied to the skinned gastrocnemius muscle fibers, until calcium release. The number of calcium additions needed to trigger mitochondrial permeability transition provided the calcium retention capacity.

In order to study production of free radicals, gastrocnemius muscles (1  $\text{mm}^3$  fragments) were incubated with a CMH molecular probe (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine HCl), which is oxidized in the presence of unpaired electrons of reactive oxygen species. The amount of oxidized CMH, and thus the amount of free radicals produced, was measured by the intensity of the resonance signal.

### Data analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5® (GraphPad Software, Inc). Results are expressed as means and standard deviations. Differences between measurements of ischemic and control muscles (of the same mice) were evaluated by a two-tailed Student's *t*-test. Comparison between ischemic muscles or comparison between control muscles were assessed by a Student's *t*-test. P values  $\leq 0.05$  were considered as indicative of statistical significance.

## RESULTS

### Mitochondrial respiration

Administration of statins before the onset of CLI shows an impaired mitochondrial respiration both in non-ischemic and in ischemic limbs. In non-ischemic limbs, V0

was  $3.47 \pm 0.24$  vs.  $2.91 \pm 0.58$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight (dw) ( $p < 0.05$ ) in NO-TREAT and PRE-CON groups, respectively. Maximal oxidative capacity (Vmax) was  $9.86 \pm 0.86$  vs.  $6.78 \pm 1.29$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dw ( $p < 0.001$ ). Complexes II, III and IV activity (Vamytal) was  $6.35 \pm 0.79$  vs.  $4.94 \pm 1.32$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dw ( $p < 0.05$ ). Finally, complex IV activity (Vtmpd) was  $10.62 \pm 0.76$  vs.  $8.56 \pm 0.80$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dw ( $p < 0.001$ ). In ischemic limbs, V0 was  $2.39 \pm 0.18$  vs.  $1.91 \pm 0.51$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight (dw) ( $p < 0.05$ ) in NO-TREAT and PRE-CON groups, respectively. Vmax was  $7.11 \pm 1.14$  vs.  $5.03 \pm 1.14$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dw ( $p < 0.001$ ). Vamytal was  $4.44 \pm 0.61$  vs.  $3.33 \pm 0.94$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dw ( $p < 0.01$ ). Finally, Vtmpd was  $8.49 \pm 1.25$  vs.  $6.67 \pm 1.18$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dw ( $p < 0.01$ ).

Administration of statins after the onset of CLI restores mitochondrial respiration in non-ischemic limbs, and improves mitochondrial respiration in ischemic-limbs. In non-ischemic limbs, V0 was  $3.47 \pm 0.24$  vs.  $3.39 \pm 0.65$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight (dw) ( $p = \text{NS}$ ) in NO-TREAT and POST-CON groups, respectively. Maximal oxidative capacity (Vmax) was  $9.86 \pm 0.86$  vs.  $9.08 \pm 1.89$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dw ( $p = \text{NS}$ ). Complexes II, III and IV activity (Vamytal) was  $6.35 \pm 0.79$  vs.  $5.77 \pm 1.50$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dw ( $p = \text{NS}$ ). Finally, complex IV activity (Vtmpd) was  $10.62 \pm 0.76$  vs.  $10.38 \pm 1.82$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dw ( $p = \text{NS}$ ). In ischemic limbs, V0 was  $2.39 \pm 0.18$  vs.  $3.11 \pm 0.62$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight (dw) ( $p < 0.01$ ) in NO-TREAT and POST-CON groups, respectively. Vmax was  $7.11 \pm 1.14$  vs.  $8.85 \pm 2.07$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dw ( $p < 0.05$ ). Vamytal was  $4.44 \pm 0.61$  vs.  $5.60 \pm 1.25$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dw ( $p < 0.05$ ). Finally, Vtmpd was  $8.49 \pm 1.25$  vs.  $10.63 \pm 2.53$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dw ( $p < 0.05$ ) (Figure 1).

### Calcium retention capacity

Administration of statins before CLI decreased calcium retention capacity. In non-ischemic muscles, calcium retention capacity was  $11.96 \pm 0.92$  vs.  $8.38 \pm 0.81$   $\mu\text{M}/\text{mg dw}$  in NO-TREAT group and in PRE-CON group respectively ( $p < 0.001$ ). In ischemic muscles, calcium retention capacity was  $7.01 \pm 0.97$  vs.  $5.76 \pm 0.92$   $\mu\text{M}/\text{mg dw}$  in NO-TREAT group and in PRE-CON group respectively ( $p < 0.01$ ).

Administration of statins after the onset of CLI restores calcium retention capacity in non-ischemic muscles and improves calcium retention capacity in ischemic muscles. In non-ischemic muscles, calcium retention capacity was  $11.96 \pm 0.92$  vs.  $11.16 \pm 1.29$   $\mu\text{M}/\text{mg dw}$  in NO-TREAT group and in POST-CON group respectively ( $p = \text{NS}$ ). In ischemic muscles, calcium retention capacity was  $7.01 \pm 0.97$  vs.  $10.92 \pm 1.24$   $\mu\text{M}/\text{mg dw}$  in NO-TREAT group and in POST-CON group respectively ( $p < 0.001$ ) (Figure 2).

### Production of free radicals

Administration of statins before the onset of CLI increases production of free radicals, both in non-ischemic and ischemic muscles. Production of free radicals in NO-TREAT group as compared to PRE-CON group is  $0.073 \pm 0.022$  vs.  $0.132 \pm 0.054$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg dw}$  in non-ischemic muscles ( $p < 0.01$ ), and  $0.105 \pm 0.023$  vs.  $0.161 \pm 0.077$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg dw}$  in ischemic muscles respectively ( $p < 0.05$ ).

Administration of statins after the onset of CLI decreases the production of free radicals in ischemic muscles but has no effect on non-ischemic muscles. Production of free radicals in NO-TREAT group as compared to POST-CON group is  $0.073 \pm 0.022$  vs.  $0.105 \pm 0.023$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg dw}$  in non-ischemic muscles ( $p = \text{NS}$ ), and  $0.105 \pm 0.023$  vs.  $0.084 \pm 0.018$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg dw}$  in ischemic muscles respectively ( $p < 0.05$ ) (Figure 3).

## DISCUSSION

Statins are the most frequently prescribed medication in developed countries, especially in patients with CLI. They reduce cardiovascular-related morbidity and mortality in patients with or without coronary artery disease (Jasinska 2007). Indeed, it has been shown that reduction in LDL cholesterol was beneficial in patients suffering from CLI, since it allowed to significantly reduce cardiovascular events, such as myocardial infarction, or stroke. It is therefore recommended to prescribe statins to all patients with CLI, or without arteriopathy but at high cardiovascular risk (Norgren 2007). However, the most common effects associated with taking statins is muscle toxicity ranging from muscle pain to rhabdomyolysis that sometimes persist several months after treatment withdrawal (Echaniz-Laguna 2010). We specifically wanted to study in this work the effects of statins on the skeletal ICC muscle, especially at the mitochondrial level, depending on the time of initiation of the treatment, either before the onset of CLI, or after the onset of CLI.

Use of statins before the onset of CLI has deleterious effects, because we demonstrated an involvement of the mitochondrial respiratory function, a decreased calcium retention capacity, and an increased production of free radicals, both in non-ischemic and in ischemic muscles. Mitochondrial alteration with taking statins has been clearly established as well, since a reduction in ATP synthesis was observed after administration of statins on human myocytes (Nishimoto 2003). In fact, impairment of the mitochondrial respiratory chain due to statins causes a depolarization of the inner mitochondrial membrane and a calcium flux through the mitochondrial transition permeability pore, and through the calcium-sodium exchanger. To a lesser extent, statins can also cause activation of

ryanodine receptors of the sarcoplasmic reticulum and thereby increase the cytosolic calcium rate. This increase in cytosolic calcium is deleterious and can lead to apoptosis (Sirvent 2005, Sirvent 2008). It has also been shown that in skeletal muscle statins induce high-oxidative stress, responsible of transcriptional deactivation of mitochondrial biogenesis as well as mitochondrial dysfunctions (Bouitbir 2012).

Use of statins after the onset of CLI has positive effects, because we showed that statins administration leads to the restoration of mitochondrial respiration and calcium retention capacity in non-ischemic muscles, but also improves mitochondrial respiration and calcium retention capacity by lowering oxidative stress in ischemic-muscles. Our hypothesis is that signaling pathways borrowed by statins are not the same if statins are administered before or after the onset of CLI. In fact, CLI can causes cycles of ischemia-reperfusion, which can have conditioning effects, potentiated by statins. Some teams have shown that statins could act through the RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase) pathway. The RISK pathway is activated in response to a ligand binding at a very large number of membrane receptors. It is composed of a group of “survival kinases” including the phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) and Akt. The RISK pathway will affect the cell survival by inhibiting apoptosis and by inhibiting opening of the mitochondrial transition permeability pore (Hausenloy 2004). In fact, the RISK pathway can be directly activated by statins, without requiring the binding of a ligand to its receptor, but directly by activating PI3K-Akt (Hausenloy 2007). This is not demonstrated in skeletal muscle, but experimentally demonstrated in neuronal, pulmonary and cardiac cells. In neuronal cells, it has been shown that the PI3K-Akt signaling pathway is activated by statins, generating via the eNOS pathway a

cerebral protective effect (Srivastava, 2012, Cheng 2013, Yu 2013). In fact, the brain protective effect of statins via activation of the PI3K-Akt is currently one of the main issue of research against neurodegenerative diseases. In lungs, it has been shown that statins activate PI3K-Akt, resulting in a protective effect against pulmonary ischemia-reperfusion injury (Wu 2012). At the heart level, administration of statins has been shown to restore endothelial function, reduce apoptosis and decrease production of free radicals. These protective effects are mediated via the activation of the PI3K-Akt (Tousoulis 2014, Pan 2014). Thus, when administered after the onset of CLI, statins could have protective effects on skeletal muscle by activating the RISK pathway, as described in many other cell types.

In conclusion, statins can have opposite effects at the skeletal level. They can be toxic for mitochondria by free radicals excessive production before the onset of CLI. After the onset of CLI and due to ischemia-reperfusion cycles, they can have protective effects, probably through the activation of the RISK pathway.

## FIGURES LEGEND

**Figure 1:** Mitochondrial respiration in non-ischemic and ischemic limbs.

$V_0$ : Basal mitochondrial oxydative capacity;  $V_{max}$ : Maximal mitochondrial oxidative capacity,  $V_{amytal}$ : Complexes II, III and IV activity,  $V_{tmpd}$ : Complexe IV activity, NO-TREAT group: no treatment, PRE-CON group: atorvastatin 5mg/kg/j 30 days before surgery until sacrifice, POST-CON group: atorvastatin 5 mg/kg/j 6 days after surgery until sacrifice.

**Figure 2:** Calcium retention capacity in non-ischemic and ischemic limbs.

**Figure 3:** Production of free radicals in non-ischemic and ischemic limbs.

## REFERENCES

- Boutbir J, Charles AL, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx J, et al. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J* 2012;33:1397-1407.
- Cheng WH, Ho WY, Chang CF, Lu PJ, Cheng PW, Yeh TC, et al. Simvastatin induces a central hypotensive effect via Ras-mediated signalling to cause eNOS up-regulation. *Br J Pharmacol* 2013;170 :847-854.
- Echaniz-Laguna A, Mohr M, Tranchant C. Neuromuscular symptoms and elevated creatine kinase after statin withdrawal. *N Engl J Med* 2010;362:564-565.
- Hausenloy D, Yallon D. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004;61:448-460.
- Hausenloy D, Yellon D. Reperfusion injury salvage kinase signaling: taking a risk for cardioprotection. *Heart Fail Rev* 2007;12:217-234.
- Heart Protective Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals : a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360:7-22.
- Jasinska M, Owczarek J, Orszulak-Michalak D. Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep* 2007;59:483-499.
- Nishimoto T, Tozawa R, Amano Y, Wada T, Imura Y, Sugiyama Y, et al. Comparing myotoxic effects of squalene synthase inhibitor, T-91485, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors in human myocytes. *Biochem Pharmacol* 2003;66:2133-2139.
- Norata GD, Tibolla G, Catapano AL. Statins and skeletal muscles toxicity : from clinical trials to everyday practice. *Pharmacol Res* 2014 (in press).
- Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007;33:S1-75.
- Pan Q, Xie X, Guo Y, Wang H. Simvastatin promotes cardiac microvascular endothelial cells proliferation, migration and survival by phosphorylation of p70 S6K and FoxO3a. *Cell Biol Int* 2014;38:599-609.
- Picard M, Csukly K, Robillard M, Godin R, Ascah A, Bourcier-Lucas C, et al. Resistance to Ca<sup>2+</sup>-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:659-668.
- Pipinos I, Swanson S, Zhu Z, Nella AA, Weiss DJ, Gutti TL, et al. Chronically ischemic mouse skeletal muscle exhibits myopathy in association with mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:290-296.
- Sirvent P, Mercier J, Vassort G, Lacampagne A. Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca<sup>2+</sup> signaling alteration in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:1067-1075.

Sirvent P, Mercier J, Lacampagne A. New insights into mechanisms of statin-associated myotoxicity. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:333-338.

Srivastava K, Bath PM, Bayraktutan U. Current therapeutic strategies to mitigate the eNOS dysfunction in ischaemic stroke. *Cell Mol Neurobiol* 2012;32:319:336.

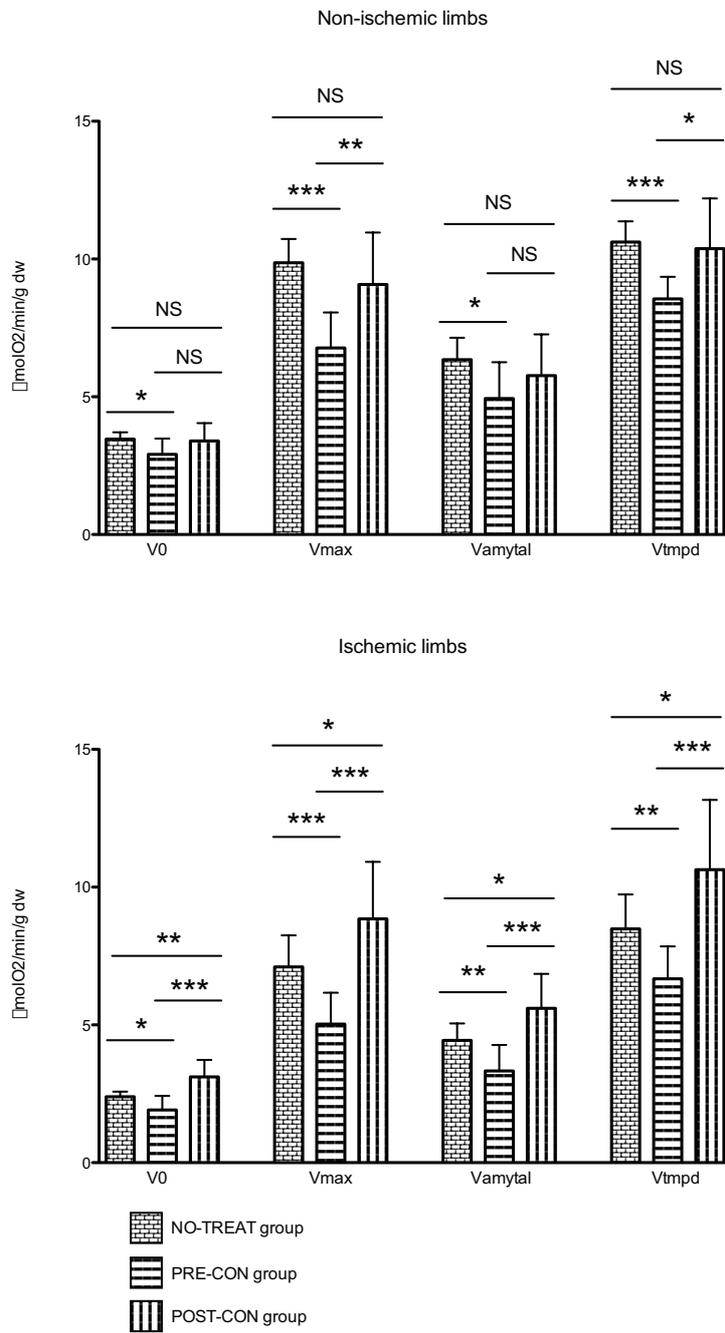
Thaveau F, Zoll J, Bouitbir J, Ribera F, Di Marco P, Chakfé N, et al. Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2009;155:65-69.

Tousoulis D, Olikonomou E, Siasos G, Stefanadis C. Statins in heart failure with preserved and reduced ejection fraction. An update. *Pharmacol Ther* 2014;141:79-91.

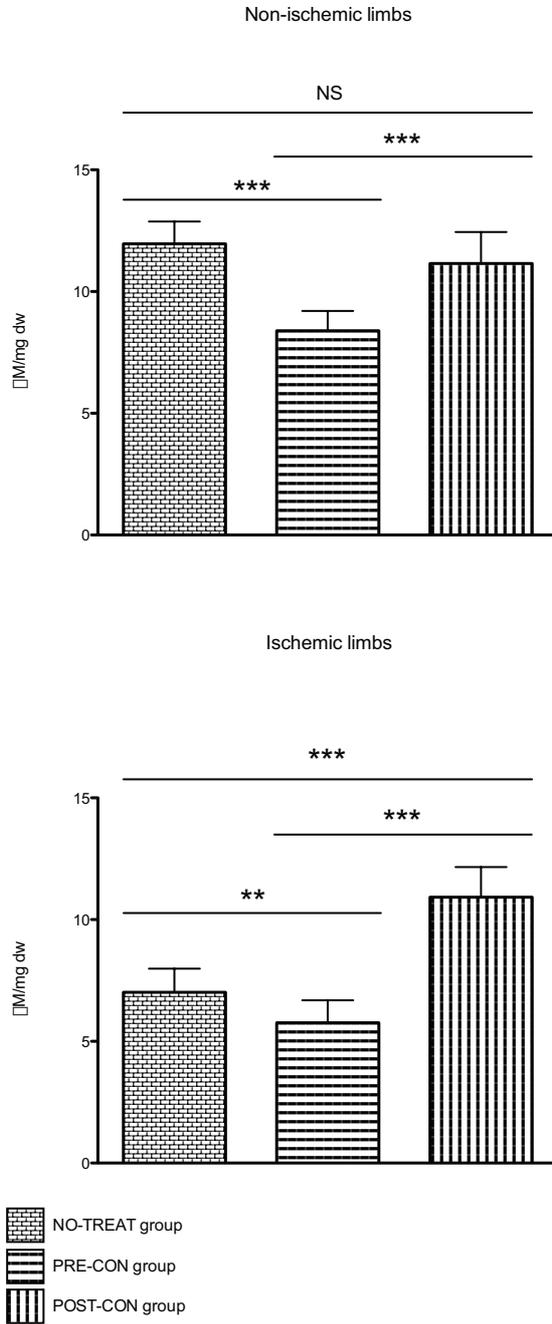
Wu Y, Lv J, Feng D, Jiang F, Fan X, Ahang Z, et al. Restoration of alveolar type II cell function contributes to simvastatin-induced attenuation of lung ischemia-reperfusion injury. *Int J Mol Med* 2012;30:1294-1306.

Yu YQ, Long L, Yan JQ, Wei L, Pan MQ, Gao HM, et al. Simvastatin induces neuroprotection in 6-OHDA-lesioned PC12 via the PI3K/AKT/caspase 3 pathway and anti-inflammatory responses. *CNS Neurosci Ther* 2013;19:170-177

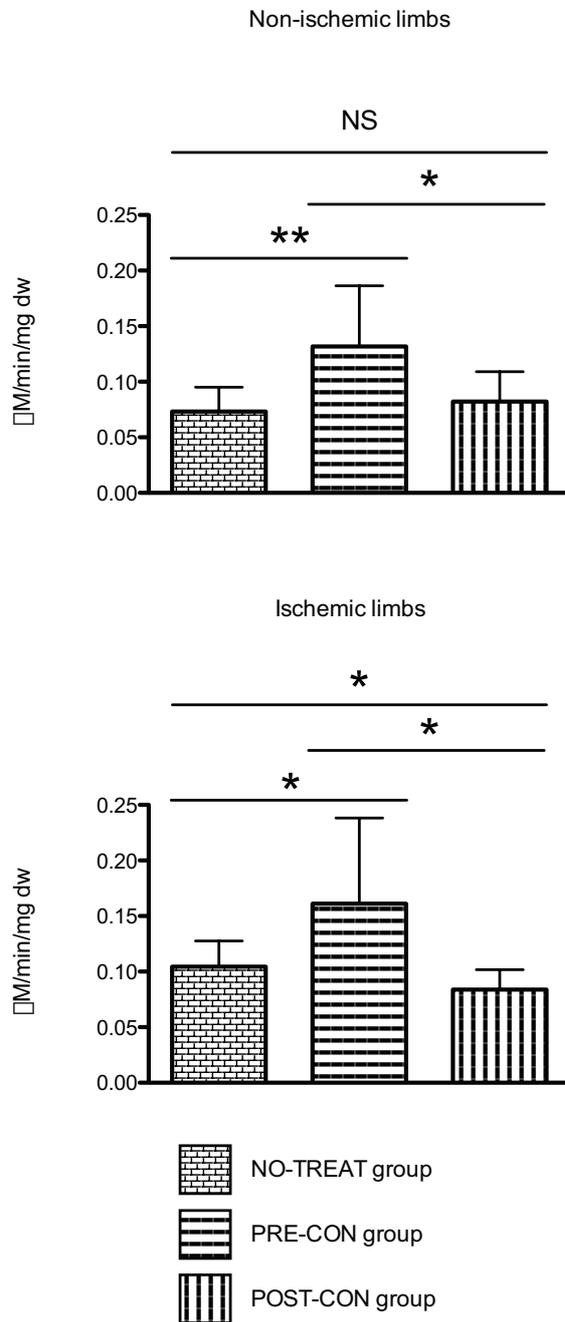
**Figure 1:** Mitochondrial respiration in non-ischemic and ischemic limbs.



**Figure 2: Calcium retention capacity**



**Figure 3: Production of free radicals**



## **7. Effets protecteurs de la N acetyl cysteine sur le muscle squelettique en ischémie critique chronique**

### **Objectifs :**

La N acétyl cystéine est la forme acétylée de la cystéine, et est le précurseur le plus immédiat et le plus efficace du glutathion (GSH). Le système GSH est le mécanisme principal de détoxification des radicaux libres et des métabolites ionisés, ce qui fait de la N acetyl cysteine un «capteur» de radicaux libres. L'atteinte du muscle squelettique dans l'ischémie critique chronique étant essentiellement liée au stress oxydant, nous avons voulu étudier l'effet de la N acétyl cysteine sur le muscle squelettique en ischémie critique chronique.

### **Matériel et Méthodes :**

Vingt souris Swiss âgées de 8 semaines ont fait l'objet de cette étude: toutes ont été opérées selon notre modèle d'ischémie critique, à savoir une ligature fémorale droite ainsi que des 3 premières collatérales à J0, suivie d'une ligature iliaque droite à J4. Parmi ces 20 souris, 10 correspondaient au groupe contrôle, 10 ont bénéficié d'un traitement par N acetyl cysteine (300 mg/kg/j) 6 jours après la chirurgie et ce jusqu'au sacrifice à 30 jours. Nous avons étudié la respiration mitochondriale, la production de radicaux libres, et la capacité de rétention calcique au niveau des muscles gastrocnémiens prélevés lors du sacrifice.

### **Résultats :**

L'administration de N acetyl cysteine a un effet protecteur sur le muscle squelettique en ischémie critique chronique, en restaurant la fonction respiratoire mitochondriale et la capacité de rétention calcique, ainsi qu'en diminuant la production de radicaux libres.

### **Conclusion :**

L'effet de la N acetyl cysteine sur le muscle squelettique en ischémie critique chronique est bénéfique, puisqu'elle restaure les capacités oxydatives et la capacité de rétention calcique, et diminue le stress oxydant.

## **8. Ischémie-reperfusion sur ischémie critique chronique : altération du muscle squelettique et effet protecteur du préconditionnement par L-arginine.**

### **Objectifs :**

L'ischémie critique chronique (ICC) définit un stade avancé d'insuffisance artérielle chronique. Lorsqu'un geste de revascularisation est possible, les patients nécessitent un clampage de l'axe artériel d'amont et de l'axe artériel d'aval, de façon à pouvoir réaliser le pontage vasculaire. Ainsi, même si le geste de revascularisation est obligatoire dans le cadre d'un sauvetage de membre, il nécessite une ischémie temporaire de façon à réaliser le geste. Cette ischémie, et la reperfusion qui lui fait suite, peuvent être délétères pour le muscle squelettique. Nous avons voulu étudier les effets de l'ischémie reperfusion (IR) sur le muscle squelettique déjà en ICC, et les potentiels effets protecteurs de la L-arginine (précurseur du NO) en préconditionnement.

### **Matériel et Méthodes :**

Trente souris Black 6 âgées de 8 semaines ont fait l'objet de cette étude: toutes ont été opérées selon notre modèle d'ischémie critique, à savoir une ligature fémorale droite ainsi que des 3 premières collatérales à J0, suivie d'une ligature iliaque droite à J4. Parmi ces 30 souris, 10 correspondaient au groupe contrôle (groupe ICC), 10 ont été soumises à un protocole d'ischémie reperfusion par méthode du tourniquet au niveau du membre postérieur droit (groupe ICC-IR), et 10 ont été soumises à ce même protocole mais ont bénéficié d'un traitement par injection de L-arginine par voie intraveineuse juste avant la reperfusion (groupe ICC-IR-Larg). Nous avons étudié la respiration mitochondriale et la production de radicaux libres lors du sacrifice des animaux, 30 jours après la chirurgie.

### **Résultats :**

L'IR majore encore les lésions d'ICC, avec une altération majeure de la fonction respiratoire mitochondriale et une production de radicaux libres accrue dans le groupe ICC-IR par rapport au groupe ICC. L'administration de L-arginine en préconditionnement a un effet protecteur, puisqu'une restauration de la fonction respiratoire mitochondriale et une diminution de la quantité de radicaux libres sont observées.

### **Conclusion :**

La L-arginine a un effet protecteur dans les lésions d'IR sur le muscle squelettique en ICC.

# **DISCUSSION GENERALE**

# 1. PHYSIOPATHOLOGIE DE L' AOMI (Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs)

L'AOMI est grave, surtout en raison de l'atteinte des autres territoires, particulièrement coronaire et cervico-encéphalique. On considère globalement que l'espérance de vie des sujets atteints d'AOMI est réduite de plus de 10 ans par rapport à une population de même âge indemne d'artériopathie. Schématiquement, au bout de 5 ans, 20% des patients souffriront de complications cardiovasculaires, 20% décéderont (dont la moitié de cardiopathie ischémique), et 25% des patients verront leur AOMI s'aggraver, dont 1/5 subiront une amputation majeure (*Norgren 2007*).

Le traitement de l'ischémie critique chronique (ICC) est difficile. En effet, le traitement initial de l'ICC correspond à une amputation majeure d'emblée dans 25% des cas (car l'atteinte est trop évoluée pour pouvoir réaliser un geste de revascularisation permettant d'obtenir une cicatrisation), un traitement médical en l'absence de possibilité de revascularisation dans 25% des cas, une revascularisation chirurgicale dans 50% des cas. A un an de la prise en charge initiale, 25% des patients sont décédés, 30% ont nécessité une amputation majeure, 20% sont toujours en ICC, et seulement 25% ont passé favorablement le cas de l'ischémie critique (*Norgren 2007*). L'ICC génère de ce fait 100 à 300 amputés majeurs par million d'habitants et par an (*Rajagopalan 2002*). Le pronostic de l'ICC est donc très sombre, et le traitement difficile, ce qui explique l'intérêt d'une meilleure connaissance de la physiopathologie de l'artériopathie, de façon à pouvoir imaginer d'autres voies thérapeutiques.

## 1.1 Interactions entre stress oxydant et fonction mitochondriale

L'atteinte mitochondriale dans l'artériopathie des membres inférieurs est maintenant clairement établie, correspondant à la notion de *myopathie artéritique* (*Pipinos 2007, Pipinos 2008, Brass 2000, Weiss 2013*). En effet, les sténoses et/ou oblitérations progressives des artères des membres inférieurs vont entraîner une hypoperfusion, engendrant une claudication, puis à un stade ultérieur des douleurs de décubitus ou des troubles trophiques. Cette altération de l'hémodynamique artérielle ne va cependant pas être la seule raison de la limitation fonctionnelle de ces patients, car le *stress oxydant et la dysfonction mitochondriale* jouent un rôle très important (*Mc Dermott 2004, Koutakis 2010, Pipinos 2008*).

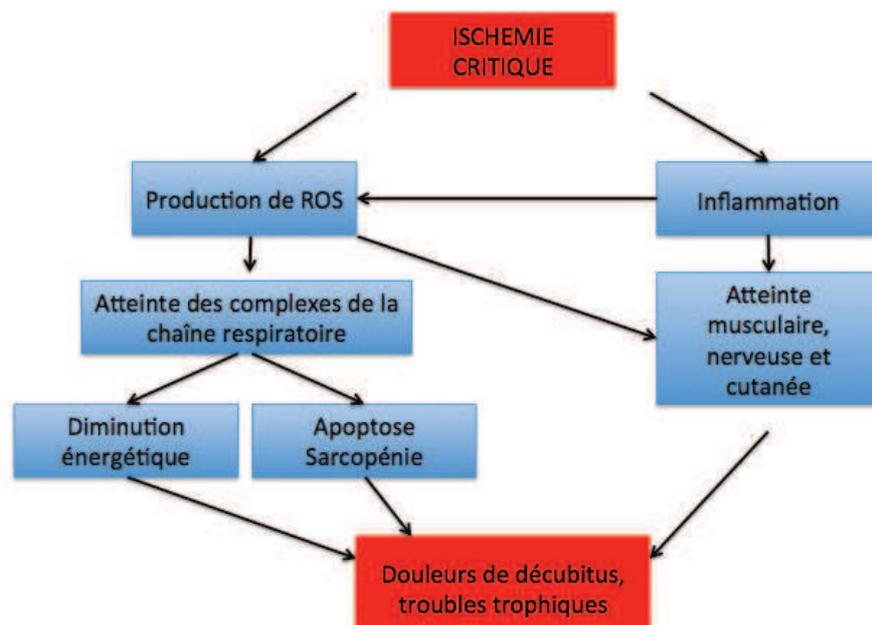
Ceux-ci sont d'ailleurs majorés lors de l'enchaînement de séquences de marche puis de repos qui correspond à autant de cycles d'ischémie et de reperfusion. Ainsi, les manifestations liées à l'ICC, longtemps présumées comme uniquement secondaires à l'hypoperfusion des membres inférieurs, sont également liées à l'IR, associant atteinte mitochondriale et donc une production inappropriée d'énergie (*Pipinos 2006*). La limitation fonctionnelle des patients est liée d'une part à l'altération de l'hémodynamique distale, mais également à la mitochondriopathie qui lui est associée (*Pipinos 2006, Pipinos 2007, Pipinos 2008, Brass 2000*). En effet, cette myopathie est caractérisée par une dégénération des myofibrilles conduisant à une fibrose progressive (*Regensteiner 1993*).

Cette dysfonction mitochondriale va générer la production de radicaux libres, ayant un effet délétère sur le muscle squelettique (*Kemp 2005*). La physiopathologie de l'AOMI, qu'elle soit aiguë ou chronique, s'explique donc à la fois par la dysfonction mitochondriale et

la production de radicaux libres, mais également par l'inflammation, en générant une véritable myopathie métabolique. (Pipinos 2006, Makris 2007).

La *production de radicaux libres* est l'élément central dans la physiopathologie de l'AOMI. Elle précède l'atteinte mitochondriale (Guillot M 2014). La production de ROS va stimuler les mécanismes anti-oxydants de la cellule, mais ces mécanismes vont rapidement être dépassés, et le stress oxydant ainsi généré va altérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette altération de la respiration mitochondriale va à son tour générer un stress oxydant, et un cercle vicieux se produit, puis que le stress oxydant va altérer la chaîne respiratoire mitochondriale, qui va elle-même générer des ROS (Lejay 2014). Cette augmentation majeure du niveau oxydatif de la cellule va entraîner l'apoptose, et ainsi générer les signes cliniques de l'AOMI.

L'*inflammation* joue un rôle également, en parallèle de l'atteinte liée au stress oxydant. Elle va expliquer l'atteinte musculaire et nerveuse observée dans l'AOMI, mais également être à l'origine d'un stress oxydant marqué, expliquant ainsi que les capacités anti-oxydantes de la cellule soient rapidement dépassées (Figure 21).



**Figure 21 : Implication mitochondriale dans la physiopathologie de l'ICC.**

Source : d'après Lejay A, et al. Muscle Biopsy 2011.

*L'origine de la dysfonction mitochondriale* liée à l'ischémie-reperfusion a été étudiée de manière expérimentale au niveau du muscle squelettique et peut être expliquée par plusieurs éléments. Ainsi, une atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale peut entraîner une diminution en protéines PGC 1 $\alpha$ , témoignant d'une atteinte de la régulation transcriptionnelle mitochondriale (Lee 2012). Par ailleurs, une atteinte spécifique des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale a été mise en évidence, avec nitration des complexes I et II, une inactivation du centre Fe-S du complexe III, et une hyperphosphorylation du complexe IV. Enfin, l'atteinte des complexes pourrait être expliquée par la diminution du contenu mitochondrial en cardiolipine (Paradies 2004).

Cette atteinte des complexes de la chaîne respiratoire va entraîner une diminution énergétique dans la cellule, mais également provoquer l'*apoptose*. En effet, le ratio Bax/Bcl2 est augmenté, et la capacité de rétention calcique mitochondriale est diminuée, favorisant ainsi l'ouverture du pore de transition mitochondrial, et donc l'apoptose (Tran 2012). L'apoptose, couplée à l'inflammation et à la diminution énergétique vont expliquer les signes cliniques de l'ICC : l'aspect fin, brillant et dépilé de la peau, l'amyotrophie, et les troubles trophiques à type d'ulcères ou de gangrène. Concernant les douleurs de décubitus, elles sont davantage attribuables aux troubles métaboliques et à la production inadéquate d'énergie qu'à l'hypoperfusion proprement dite (Moylean 2007).

## 1.2 Implication des voies de protection RISK et SAFE

Le *conditionnement* peut être considéré comme un puissant mécanisme de protection ubiquitaire (cœur, rein, foie, tube digestif, système nerveux, muscle squelettique) contre les effets délétères de l'ischémie-reperfusion. Le pré-conditionnement ischémique est déclenché par une ou plusieurs séquences brèves d'ischémie-reperfusion réalisées peu de temps avant la survenue d'une ischémie-prolongée suivie d'une reperfusion (Murry 1986). Tout se passe comme si l'organe venant de subir une ou plusieurs ischémies brèves gardait en mémoire cette agression et mettait en jeu des mécanismes endogènes lui permettant de mieux tolérer une ischémie prolongée à venir. Ainsi, les effets bénéfiques du pré-conditionnement ischémique se traduisent par une vitesse de déplétion de l'ATP diminuée lors d'ischémies subséquentes. De plus, la reperfusion intermittente permet l'évacuation des catabolites en grande partie des lésions liées à la reperfusion, tels que les lactates, ou les ions H<sup>+</sup> responsables de l'acidose. Il est cependant difficile d'appliquer ce procédé de pré-conditionnement ischémique en pratique clinique courante car il nécessite de connaître exactement le moment où survient l'ischémie, ce qui n'est pas le cas lors d'une urgence pour ischémie aiguë. Toutefois, le phénomène de *pré-conditionnement ischémique* peut être naturellement présent chez les patients souffrant d'ischémie chronique. En effet, pour les patients souffrant par exemple d'angor, l'effort correspond à des situations d'ischémie de relativement courtes durées, et le repos correspond à des situations de reperfusion. Ainsi, il a été démontré que les effets négatifs liés à la reperfusion sont diminués chez les patients angineux chroniques présentant un syndrome coronarien aigu par rapport aux patients présentant un syndrome coronarien aigu mais n'ayant jamais eu d'antécédent cardiaque (Murry 1986). Il en est de même pour les patients souffrant d'AOMI, que ce soit d'ischémie d'effort ou d'ischémie critique : en effet, les situations d'effort correspondent à des situations d'ischémie, tandis que les situations de repos correspondent à des situations de reperfusion.

Si le pré-conditionnement ischémique est en soi un mécanisme de défense physiologique intéressant, les études expérimentales se sont rapidement orientées vers la recherche d'agents *pharmacologiques* susceptibles également de protéger l'organe soumis à l'ischémie-reperfusion (Hausenloy 2007). Le conditionnement pharmacologique peut ainsi cibler des voies spécifiques de protection contre l'ischémie-reperfusion comme la *voie RISK* (*Reperfusion Injury Salvage Kinase*) ou la *voie SAFE* (*Survivor Activating Factor Enhancement*).

### 1.2.1 La voie RISK

La voie RISK est activée en réponse à la fixation de ligands au niveau d'un nombre très important de récepteurs membranaires, tels que les récepteurs aux facteurs de croissance ou les récepteurs couplés aux protéines G (Hausenloy 2004). Elle est composée d'un groupe de kinases « pro-survie » incluant la phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K), Akt, RAS, MEK 1/2, et Erk 1/2. La voie RISK va avoir un effet sur la survie cellulaire en inhibant l'apoptose d'une part, et en inhibant l'ouverture du mPTP d'autre part (Figure 22).

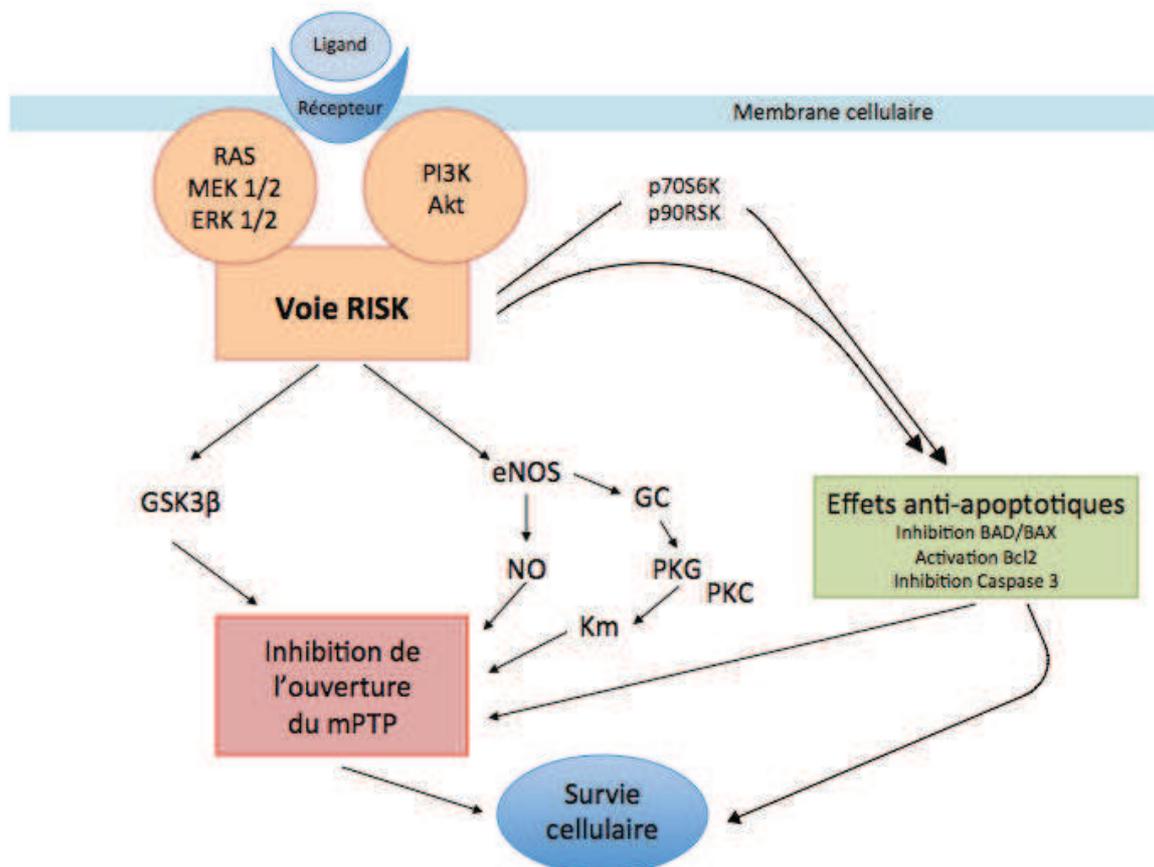


Figure 22 : La voie RISK.

Source : modifié d'après Hausenloy D, et al. Heart Fail Rev 2007.

L'activation de PI3K-Akt, et RAS-MEK 1/2-ERK 1/2 va entraîner la phosphorylation et donc l'inactivation de la protéine pro-apoptotique BAD, soit directement, soit indirectement par le recrutement d'autres protéines kinases : p70S6K et p90RSK (*Harada 2001*). Suite à un signal apoptotique, la protéine pro-apoptotique BAX va changer de conformation et ainsi gagner la mitochondrie, ou elle va induire le relargage de cytochrome c en formant un pore dans la membrane mitochondriale externe, ou alors en interagissant avec le mPTP pour provoquer son ouverture. L'activation de la voie PI3K-Akt ou de la voie RAS-MEK 1/2-ERK 1/2 inhibe le changement conformationnel de la protéine BAX et a donc un effet anti-apoptotique de ce fait (*Yamagushi 2001, Tsurata 2002*). Par ailleurs, l'activation de la voie RAS-MEK 1/2-ERK 1/2 va inhiber l'activation de la caspase 3, et activer Bcl2, ce qui a également un effet anti-apoptotique.

L'activation de la voie PI3K-Akt va aussi phosphoryler eNOS (endothelialnitricoxide synthase), produisant ainsi du monoxyde d'azote, ayant des effets protecteurs au niveau cellulaire (*Dimmeler 1999*). Par ailleurs, il a été démontré que le monoxyde d'azote inhibait l'ouverture du mPTP (*Balakirev 1997*). Le monoxyde d'azote ainsi généré va également activer la guanylatecyclase (GC), qui va activer la protéine kinase G (PKG), qui va avec la protéine kinase C (PKC) phosphoryler et donc ouvrir le canal K<sup>+</sup> mitochondrial (Km). L'afflux massif de K<sup>+</sup> ainsi généré entraîne une alcalinisation de la matrice mitochondriale, conduisant à l'inhibition de l'ouverture du mPTP (*Andrukhiv 2005*).

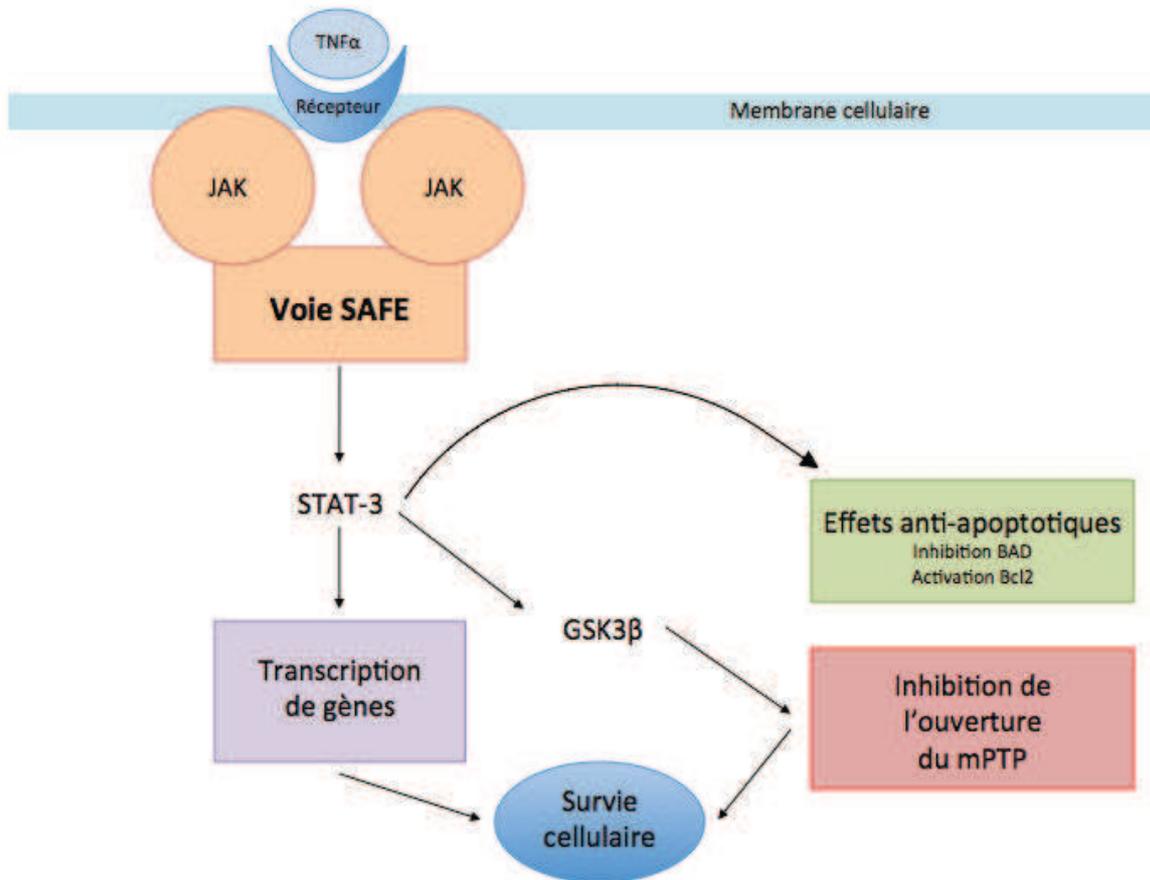
L'activation de PI3K-Akt, et RAS-MEK 1/2-ERK 1/2 va enfin entraîner la phosphorylation de la glycogène synthase kinase (GSK-3 $\beta$ ). La forme phosphorylée est la forme inhibée, c'est cette forme qui est capable d'inhiber l'ouverture du mPTP et donc d'avoir un effet protecteur (*Nishihara 2007*).

### 1.2.2 La voie SAFE

Depuis quelques années, une autre voie dénommée SAFE (Survivor Activating Factor Enhancement) est l'objet de travaux croissants (*Burley 2007, Lecour 2009, Schultz 2009*) (Figure 23).

Cette voie implique le tumornecrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), les Janus Kinases (JAK) et le Signal transduceractivator of transcription (STAT). Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire présente dans toutes les cellules, induisant des lésions cellulaires et l'apoptose après fixation sur le récepteur de type 1, mais conférant un effet protecteur après fixation sur le récepteur de type 2 (*Monden 2007, Schultz 2009*). Après liaison du TNF $\alpha$  sur son récepteur spécifique de type 2, les deux protéines JAKs adjacentes à ce récepteur se phosphorylent et provoquent l'activation des protéines STAT, dont le principal acteur est la protéine STAT-3. Les JAKs font partie de la famille des tyrosines kinases qui sont couplées à des récepteurs membranaires. Les JAKs jouent un rôle majeur dans la transduction du signal du cytosol vers le noyau (*Boengler 2008*). Les STAT appartiennent à la famille des protéines transcriptionnelles. L'activation des STAT par les JAKs entraîne leur phosphorylation et leur transformation en formes homodimériques ou hétérodimériques qui seront transloquées dans le noyau. Une fois dans le noyau, STAT-3 inhibe l'ouverture du mPTP, et induit la transcription de gènes (*Lecour 2009*). La voie JAK-STAT-3 peut également être activée par la fixation d'autres ligands sur les récepteurs membranaires, comme l'interleukine 6 ou des facteurs de croissance.

Une fois activée, STAT-3 va également avoir un effet anti-apoptotique puisqu'elle va inhiber la protéine pro-apoptotique BAD, et activer la protéine anti-apoptotique Bcl2. STAT-3 va également inhiber l'ouverture du mPTP par la voie de la GSK3 $\beta$  (Gross 2006).



**Figure 23 : La voie SAFE.**

*Source : modifié d'après Hausenloy D, et al. Heart Fail Rev 2007.*

### 1.2.3 « Cross-talk » entre les voies RISK et SAFE

L'interaction entre les voies RISK et SAFE n'est pas formellement prouvée. Cependant, il semblerait qu'il y ait un lien entre les deux voies, avec une interaction entre PI3K-Akt et STAT-3 d'une part, et interaction entre MEK 1/2- ERK 1/2 et STAT-3 d'autre part.

Concernant les interactions PI3k-Akt et STAT-3, la sous-unité p85 de la PI3K pourrait se lier à STAT-3 phosphorylé et par conséquent entraîner la phosphorylation des tyrosine-kinases (Gross 2006). Il a également été démontré au niveau des cellules endothéliales pulmonaires que l'activation de STAT-3 est dépendante de la production de monoxyde d'azote liée à la voie PIK3-Akt (Zhang 2005). Par ailleurs, la phosphorylation de STAT-3 semble dépendante de l'activation de PI3K (Gross 2006).

Les interactions entre MEK 1/2- ERK 1/2 et STAT-3 ne sont pas formellement prouvées, mais la phosphorylation de STAT-3 pourrait être dépendante de la voie ERK 1/2, tandis que l'inactivation de la voie JAK/STAT-3 entraînerait l'inhibition de la phosphorylation de MEK 1/2 (Giannopoulou 2006).

*Il est cependant à noter que l'étude de l'effet protecteur des voies RISK et SAFE a été menée essentiellement au niveau du muscle cardiaque, et qu'il existe très peu de données concernant le muscle squelettique. Les données actuelles au niveau du muscle squelettique mettent en évidence l'implication majeure de la voie RISK, notamment par l'intermédiaire de l'activation du système eNOS conduisant à l'inhibition de l'ouverture du mPTP (Miyachi 2012, Murata 2013). L'implication de la voie SAFE serait moindre (Bibli 2014).*

### **1.3 Apports de nos études**

Notre travail a confirmé l'atteinte de la fonction respiratoire mitochondriale et l'implication du stress oxydant dans la myopathie induite par l'ischémie-reperfusion tant chez l'Homme que chez l'animal.

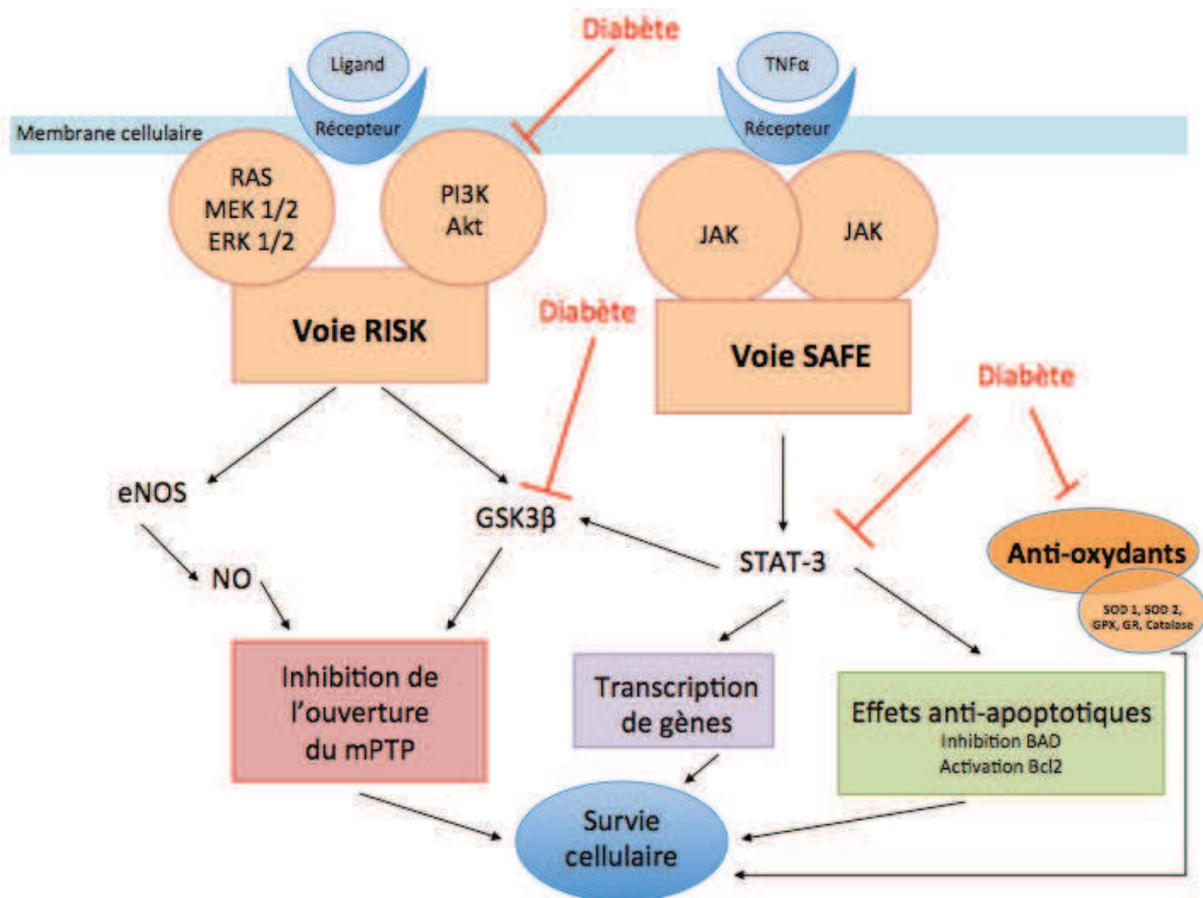
Si les données expérimentales sont assez nombreuses et concordantes dans la littérature dans le cadre de l'ischémie-reperfusion aiguë, il y a très peu de données concernant la pathologie humaine.

Notre apport est de confirmer l'atteinte mitochondriale chez des patients bien caractérisés sur le plan clinique ce qui n'était pas le cas auparavant. Nous montrons également, ce qui n'a pas été largement prouvé, que le diabète aggrave de façon significative les lésions liées à l'ischémie-reperfusion chez l'Homme et, nous analysons pour la première fois l'implication des voies RISK et SAFE dans le cadre de l'ischémie-reperfusion chez l'animal sain et diabétique. En effet, la taille des biopsies musculaires réalisées chez ces patients ne permet pas de réaliser d'autres analyses, l'étude des voies de signalisation intracellulaires a donc été réalisée sur des modèles animaux.

Ainsi, nous avons mis en évidence que les effets délétères de l'IR sont majorés chez les animaux diabétiques. En effet, il existe chez les animaux diabétiques une atteinte plus importante de la fonction respiratoire mitochondriale, avec également une augmentation de la production de radicaux libres, les systèmes anti-oxydants se trouvant dépassés par la quantité de radicaux libres produite. Nous avons mis en évidence qu'il existait chez les animaux diabétiques une inhibition des voies de protection intracellulaires. En effet, il existe une diminution de la phosphorylation de PI3K, Akt, et de STAT-3, témoignant bien de l'implication des voies de protection.

L'inhibition des voies de protection RISK et SAFE due au diabète a déjà été mise en évidence au niveau du muscle cardiaque, mais pas au niveau du muscle squelettique. Cette inhibition a lieu directement via l'inhibition de PI3K-Akt, GSK-3 $\beta$ , mais également STAT-3 (Yin 2012).

Nos travaux mettent donc clairement en évidence l'implication des voies de protection RISK et SAFE dans les lésions d'IR au niveau du muscle squelettique, ainsi que leur inhibition dans le cadre du diabète, expliquant l'atteinte majorée dans cette situation (Figure 24).



**Figure 24 : Ischémie-reperfusion et muscle squelettique – place du diabète.**

*Source : modifié d'après Hausenloy D, et al. ,Heart Fail Rev 2007*

*et d'après Yin X, et al. Exp Diabetes Res 2012.*

## 2. PHYSIOPATHOLOGIE ET TRAITEMENT DE L'ISCHEMIE CRITIQUE CHRONIQUE (ICC)

### 2.1 Pertinence du modèle animal

L'analyse de la littérature se heurte à l'hétérogénéité des séries de patients et à l'absence de précision quant à la nature exacte des symptômes, les patients étant tous considérés comme « artériopathes » (*Pipinos2006, Pipinos2007, Pipinos 2008, Brass 2000*). Cependant, le pronostic et la prise en charge des patients artériopathes n'est pas la même, selon la symptomatologie initiale. En effet, les patients présentant une claudication intermittente bénéficieront le plus souvent d'un réentraînement à la marche, tandis que les patients présentant une ischémie critique chronique des membres inférieurs nécessitent obligatoirement un geste de revascularisation chirurgicale, lorsqu'un tel geste est possible.

De plus, le pronostic des patients présentant une ischémie critique chronique des membres inférieurs est défavorable, avec un haut risque d'amputation majeure, et un haut risque de décès cardio-vasculaire (*Norgren 2007*). Ainsi, la mortalité à 1 an des patients en ICC est de 25%, et peut aller jusqu'à 45% après amputation majeure (*Sprengers 2008, Norgren 2007*).

Dans notre étude, tous les paramètres nécessaires au diagnostic d'ICC sont présents chez les patients, à savoir signes cliniques (douleurs de décubitus ou troubles trophiques), mesures objectives témoignant de l'hypoperfusion artérielle (index de pression systolique à la cheville, pression transcutanée en oxygène), et durée des symptômes supérieure à 15 jours, rendant homogène notre cohorte de patients.

Il existe peu de modèles d'ICC décrits dans la littérature. Et, comme nous allons le voir, aucun modèle actuellement décrit ne répond aux 3 critères nécessaires au diagnostic d'ICC, à savoir des signes cliniques, des mesures objectives de l'hypoperfusion, et une durée des symptômes supérieure à 15 jours.

Le premier modèle d'ischémie chronique date de 1953, avec l'injection d'agents sclérosants au niveau de l'artère fémorale commune chez le lapin (*Longland 1953*). Ce modèle était associé à une mortalité importante des animaux, liée à une atteinte artérielle importante, pourtant plus aiguë que chronique. Dès lors, plusieurs modèles d'ischémie des membres inférieurs ont été développés. Ces modèles se sont cependant heurtés au niveau important de collatéralité artérielle, ainsi qu'à l'angiogenèse rapide, expliquant qu'il est difficile d'obtenir un modèle chronique, et que de nombreux modèles correspondent plutôt à des modèles aigus. En effet, il existe chez l'animal un niveau de collatéralité artérielle très important, bien plus que chez l'homme. Par exemple chez le chien, il a été décrit qu'il était nécessaire de ligaturer au minimum 14 branches artérielles (issues de l'artère iliaque, de l'artère fémorale commune et de l'artère fémorale profonde) pour avoir un retentissement sur le flux d'aval (*Sunder-Plassman1984*). De la même façon, il existe un réseau de collatérales très important chez le rat et la souris, en raison de l'absence d'artère fémorale profonde (*Siefert 1985*).

Il est ainsi difficile d'obtenir un modèle chronique d'ischémie. La méthode du tourniquet, très fréquemment employée, est une méthode d'ischémie aiguë. Elle permet d'obtenir une interruption brutale de l'ensemble du flux sanguin au niveau du membre soumis à l'ischémie. Toutefois, ce modèle impose également l'interruption veineuse, mais également une atteinte nerveuse et musculaire directe, par la compression elle-même. Ce modèle est ainsi utilisé pour étudier les lésions d'ischémie-reperfusion de courtes durées, et non sur une période de plusieurs semaines (*Thaveau 2009*).

Dans l'idée d'obtenir un modèle chronique, la ligature des axes artériels a également été proposée. Le degré d'ischémie ainsi obtenu dépend du niveau de la ligature. Toutefois, après ligature isolée de l'artère fémorale commune ou de l'artère iliaque commune la perfusion du membre reste inchangée (*Challis 1986, Janda 1974*). Il faut donc associer plusieurs ligatures, le plus souvent une ligature de l'artère fémorale et une ligature des principales collatérales pour observer une réduction du flux sanguin, mais cette diminution de l'apport artériel ne s'observe que durant 5 jours (*Siefert 1985*). Ainsi, une ligature chirurgicale, même proximale (au niveau de l'artère iliaque commune) et même accompagnée d'une ligature des collatérales artérielles, ne suffit pas pour proposer un modèle d'ischémie chronique.

En 1992, un modèle d'ischémie chronique a été proposé chez le lapin, non pas par ligature artérielle, mais par excision de l'ensemble de l'axe artériel du membre (depuis l'artère fémorale commune jusqu'à l'artère poplitée (*Pu 1992*). Des artériographies réalisées 90 jours après la chirurgie ont mis en évidence une hypoperfusion du membre dont l'axe artériel avait été excisé. Il s'agit du premier modèle d'ischémie chronique. Toutefois, le niveau de collatéralité artérielle est plus important chez la souris que chez le lapin, en raison de l'absence d'artère fémorale profonde. Ainsi chez la souris, l'ensemble de la collatéralité artérielle provient des branches de l'artère iliaque interne (*Couffinhal 1998, Murohara 1998, Waters 2004*). *Nous souhaitons mettre au point un modèle d'ICC chez la souris et non reprendre ce modèle d'ICC chez le lapin, afin de pouvoir travailler par la suite avec des souris KO.*

Dans notre modèle murin d'ICC, en réalisant une ligature séquentielle, associant dans un premier temps une ligature de l'artère fémorale et de ses 3 premières collatérales, suivie d'une ligature de l'artère iliaque commune 4 jours plus tard, nous observons une hypoperfusion prolongée et stable dans le temps. La ligature de l'artère iliaque commune permet de bloquer la collatéralité issue des branches de l'artère iliaque interne, et est réalisée au moment où le flux sanguin reviendrait théoriquement à la normale.

Ce modèle répond aux critères définis par le TASC II, à savoir l'association de signes cliniques, de mesures de perfusion artérielle, et d'une durée des symptômes supérieure à 15 jours (*Norgren 2007*). Nous avons utilisé des scores cliniques déjà décrits dans la littérature, permettant d'objectiver l'atteinte artérielle par la présence de troubles trophiques au niveau des extrémités, mais également le retentissement fonctionnel lié à l'hypoperfusion (*Stabile 2003*). Nous avons également utilisé la scintigraphie au MIBI en réalisant un ratio entre la partie distale du membre contrôle et la partie distale du membre ischémique, ce qui permet également de valider l'hypoperfusion distale du membre ischémique. Nous avons préféré utiliser la scintigraphie au MIBI pour son caractère moins invasif que l'artériographie. Nous avons également préféré utiliser une méthode reproductible, par rapport au laser Doppler qui nécessite par exemple un environnement constant. En effet, cette méthode d'évaluation de la perfusion artérielle par scintigraphie au MIBI a été jugée valide, et ce dès les premiers stades de l'artériopathie (*Kusmieriek 2006*). La durée des symptômes est supérieure à 15 jours, ce qui

fait de notre modèle un modèle valide.

Un autre intérêt du modèle est que l'animal est son propre témoin. En effet, l'effet systémique de l'ICC est minime, et il n'y a pas de différence entre le membre contrôle d'une souris en ICC par rapport aux membres d'une souris n'ayant pas été mise en ICC. Ceci permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaires aux expérimentations (Thaveau 2009).

La particularité de notre modèle est d'étudier l'ICC *in vivo* mais également *ex vivo*, directement au niveau du muscle squelettique, *via* la respiration mitochondriale, la capacité de rétention calcique, et la production de radicaux libres. Nous avons ainsi mis en évidence que l'ICC chez la souris entraînait une véritable myopathie associée à une dysfonction mitochondriale (par altération de la fonction respiratoire mitochondriale et diminution de la capacité de rétention calcique), et une production accrue de radicaux libres. Cette atteinte mitochondriale est par ailleurs stable dans le temps dans notre modèle, une fois l'ICC installée, que ce soit concernant l'atteinte des capacités oxydatives, de la capacité de rétention calcique, ou de la production de radicaux libres. Par ailleurs, en réalisant des coupes histologiques, un aspect de myopathie a été clairement mis en évidence, associant une sarcopénie et une fibrose du muscle ischémique. Ce type d'atteinte au niveau histologique a déjà été décrit chez le patient présentant une ICC, avec une sarcopénie, une perte de force et une atteinte fonctionnelle liée à l'atteinte histologique (Brass 2000). De la même façon, notre modèle démontre que l'inflammation, et l'altération des systèmes anti-oxydants et de la biogenèse mitochondriale entrent en jeu dans l'ICC.

Une des **limites** de ce modèle est qu'il ne correspond pas réellement à une situation d'ICC chez l'homme. En effet, l'ICC survient sur des artères déjà pathologiques, dans un contexte spécifique : patient présentant de nombreux facteurs de risque cardiovasculaires (hypertension artérielle, tabagisme, diabète, dyslipidémie), et patient présentant souvent des comorbidités liées à l'atteinte artérielle (coronaropathie, insuffisance rénale). Or notre modèle de ligature séquentielle est réalisé sur artères saines, ce qui ne correspond pas à la réalité des patients artériopathes.

Pour pallier à cette limite, il faudrait réaliser ce modèle d'ICC sur des animaux présentant une hypertension artérielle, un diabète et une dyslipidémie. *A l'heure actuelle, nous avons réalisé le modèle sur des souris Apo E-/- présentant une hypercholestérolémie, les résultats en terme de fonction respiratoire mitochondriale, production de radicaux libres et capacité de rétention calcique ne mettant pas en évidence de différence par rapport aux souris Swiss.*

Une autre limitation de ce modèle est représentée par le fait que l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs chez l'homme est de genèse bien plus complexe. En effet, elle se développe à des endroits différents et multiples (artères iliaques, artères fémorales superficielles), de façon progressive, dans des zones où le flux sanguin est le plus turbulent et la pression transmurale plus importante. Il s'agit de sténoses puis d'oblitérations progressives, et non de ligatures ou excisions brutales comme dans tout modèle d'ischémie chez l'animal.

## 2.2 Voies thérapeutiques : pré- ou post-conditionnement pharmacologique par NAC, statine ou L-Arginine.

### 2.2.1 Conditionnement pharmacologique par la NAC

#### C) Mécanismes d'action de la NAC

Un des intérêts de la N-acétyl-cystéine est qu'elle présente une très bonne biodisponibilité par administration orale. En effet, la NAC est chargée négativement pour un pH à 7,4, de part son groupement COOH<sup>-</sup> et son groupement SH<sup>-</sup>. Une fois dans l'estomac, à un pH plus acide (entre 1,5 et 3,3), elle devient neutre et peut diffuser passivement et entrer dans la circulation systémique (*Samuni 2013*). Nous avons donc choisi dans notre protocole d'administrer la NAC par voie orale, du fait de cette bonne disponibilité, mais également pour éviter le stress lié à une injection par voie intrapéritonéale, ou les difficultés liées à une injection quotidienne par voie intraveineuse.

La n-acétyl cystéine est la forme acétylée (efficacement métabolisée) de la cystéine, et est le précurseur le plus immédiat et le plus efficace du glutathion (GSH). Le système GSH est le mécanisme principal de détoxification des radicaux libres et des métabolites ionisés (*Dumaswala2001*), localisé en partie dans la mitochondrie. En effet, la présence de GSH cellulaire est le facteur limitant lors d'une production accrue de radicaux libres, et la NAC permet au système anti-oxydant d'être en quantité suffisante pour pouvoir répondre à un stress oxydant plus important. La NAC a donc ainsi un rôle de « scavenger » de radicaux libres, c'est à dire un rôle de « piègeur » (*Davis 2001, Zaffarullah 2003*).

Les propriétés anti-oxydantes de la NAC sont intéressantes dans les situations d'ischémie-reperfusion, et permettent d'induire un conditionnement pharmacologique. La NAC réagit très faiblement avec l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), mais réagit très fortement avec le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>), qui est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène (Tableau 1). Le radical hydroxyle entraîne de multiples dommages cellulaires et apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS, ce qui fait de la NAC un anti-oxydant très important.

Composant	Vitesse de réaction	Conditions
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	68	pH 7, 24°C
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,85	pH 7, 24°C
OH <sup>•</sup>	1,36 x 10 <sup>10</sup>	pH 7, 24°C

**Tableau 1 : Vitesses de réaction de la NAC avec les ROS.**

Source : *Samuni Y, et al. BiochimBiophys Acta 2013.*

Les effets de la NAC sont multiples puisque la NAC interagit avec de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. La NAC a ainsi un effet dans la régulation de l'apoptose, dans la carcinogenèse, dans l'expression des gènes et la transduction du signal, ainsi qu'au niveau mitochondrial. Les effets principaux nous intéressant dans ce travail sont les effets de la NAC sur la régulation de l'apoptose, et les effets mitochondriaux.

Les effets de la NAC sur la régulation de l'apoptose sont contradictoires. En effet, l'effet modulateur peut être positif ou négatif, car il dépend à la fois de la dose de NAC administrée, du type cellulaire, mais également du statut oxydatif de la cellule. La NAC peut ainsi entraîner l'arrêt du cycle cellulaire en inhibant la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire, dans de nombreux types cellulaires (kératinocytes, hépatocytes, fibroblastes, neuroblastes). Par contre, la NAC peut inhiber l'apoptose en présence de radicaux libres en quantités importantes. En effet, la voie apoptotique initiée par  $O_2\bullet$ -et  $H_2O_2$  entraîne l'activation de la caspase 3 et la fragmentation de l'ADN, mais le traitement par NAC va inhiber cette voie en up-régulant la synthèse des enzymes anti-oxydantes telles que les SOD, la GPX et la catalase (Oh 2006). L'effet anti-apoptotique de la NAC peut également être lié à l'activation de la voie RISK, puisque la NAC active directement la voie ERK 1/2 (Yan 1998, Li 2000).

La NAC va également avoir un *effet protecteur direct au niveau mitochondrial*, puisqu'un traitement prolongé par NAC permet d'améliorer le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, en augmentant les capacités oxydatives de la cellule (Cocco 2005, Barbosa 2010). Toutefois, dans notre laboratoire, il a été démontré que la NAC à fortes doses était capable d'inhiber la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui pourrait avoir pour effet d'augmenter la production de ROS. Une production limitée de ROS peut cependant être favorable à la cellule, permettant d'induire un phénomène de mitohormèse, en augmentant les défenses anti-oxydantes et en améliorant le métabolisme cellulaire. Il s'agit là de tout le paradoxe lié à la dose d'administration de la NAC.

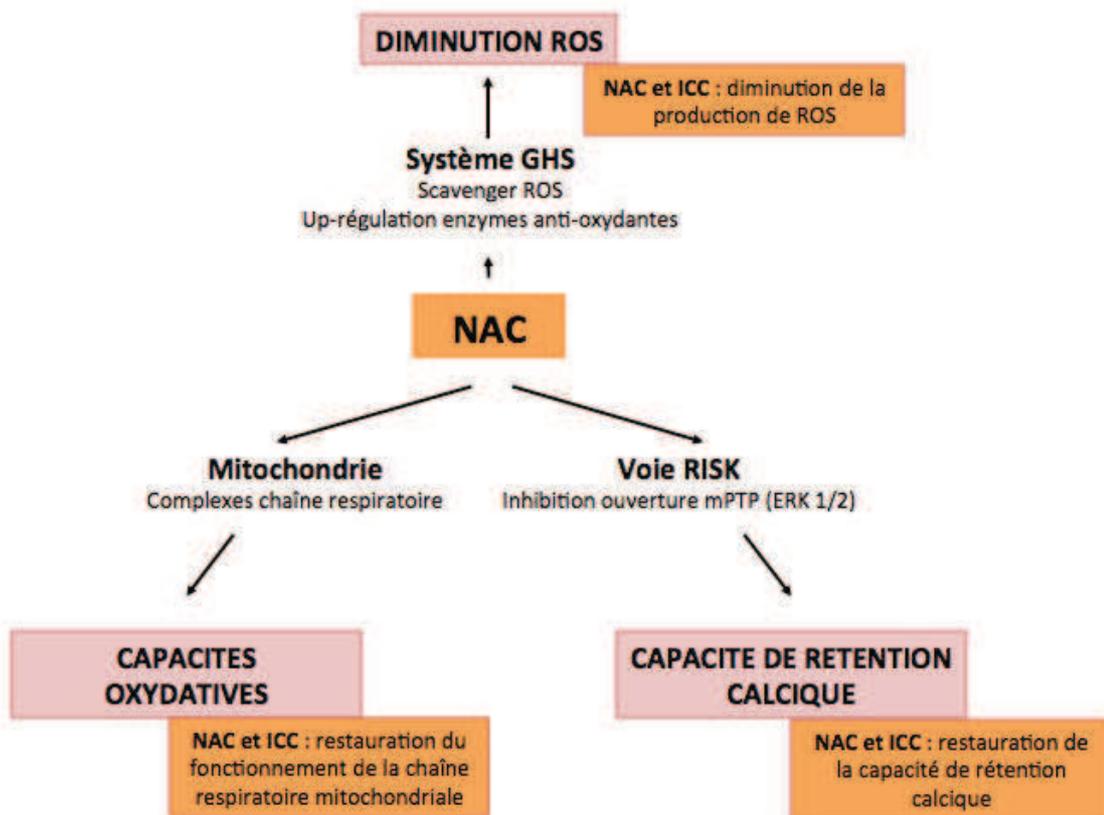
#### **D) NAC et IR musculaire squelettique**

Nos résultats peuvent aisément être expliqués par les différents modes d'action de la NAC. La diminution de la production de radicaux libres est vraisemblablement liée d'une part à la synthèse de glutathion, le système GSH permettant alors la détoxification des ROS ; mais également à l'up-régulation des enzymes anti-oxydantes. La restauration du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale est probablement liée au fait que la dose de NAC utilisée pour notre protocole est une faible dose, et qu'à cette dose le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale peut être amélioré. De la même façon, l'amélioration de la capacité de rétention calcique peut être expliquée par l'activation de la voie RISK, par l'intermédiaire d'ERK 1/2, ce qui va conduire à l'inhibition du mPTP.

Les effets de la NAC sur le muscle squelettique ont déjà été étudiés dans le cadre de lésions d'IR aiguës. La particularité de notre étude réside dans l'aspect chronique de l'ischémie. L'administration de NAC dans l'IR aiguë entraîne une diminution de la peroxydation lipidique (liée à la détoxification des ROS par la NAC) ainsi qu'une diminution de l'infiltration en neutrophiles (ce qui témoigne d'une diminution du caractère inflammatoire) (Koksal 2003). Dans le cadre de l'ischémie aiguë, l'administration de NAC ne permet cependant pas de diminuer de façon significative la quantité plasmatique de ROS (Da Silveira 2009, Roseguini 2014). Il est cependant important de préciser que ces études correspondent à l'administration aiguë de NAC, ainsi que des protocoles d'IR aiguës.

Dans notre expérience, la NAC est administrée dès l'ICC installée, et jusqu'au sacrifice, c'est à dire pendant plusieurs semaines. Nous observons ainsi une diminution de la quantité de ROS, liée vraisemblablement aux cycles répétés d'IR liés à l'ICC, permettant de stimuler de façon importante les mécanismes anti-oxydants. En effet, les effets protecteurs nécessitent une IR modérée, comme ceux observés dans l'ICC. L'implication des voies RISK et SAFE n'est restée à démontrer au cours de l'IR chronique du muscle squelettique, mais l'inhibition du mPTP constatée après administration de NAC dans notre protocole suggère l'implication de la voie RISK (Figure 25).

Nous nous sommes spécifiquement intéressés à l'étude de la fonction respiratoire mitochondriale, mais plusieurs études ont étudié la force contractile du muscle squelettique soumis à l'IR, après conditionnement ou non par NAC (Roseguini 2014, Katz 2014). L'administration de NAC permettrait ainsi de restaurer les capacités contractiles du muscle squelettique (Roseguini 2014, Katz 2014). Nous n'avons pas réalisé de mesures des capacités contractiles dans notre modèle, que ce soit dans l'ischémie critique isolée, ou dans le cadre du conditionnement pharmacologique, et cette étude des capacités contractiles pourrait être une voie de recherche à explorer à l'avenir.



**Figure 25 : Effets de la NAC.**

Source : modifié d'après Samuni Y, et al. *BiochBiophys Acta* 2013.

## 2.2.2 Conditionnement pharmacologique par statine

### A) Mécanismes d'action et myopathie liée aux statines

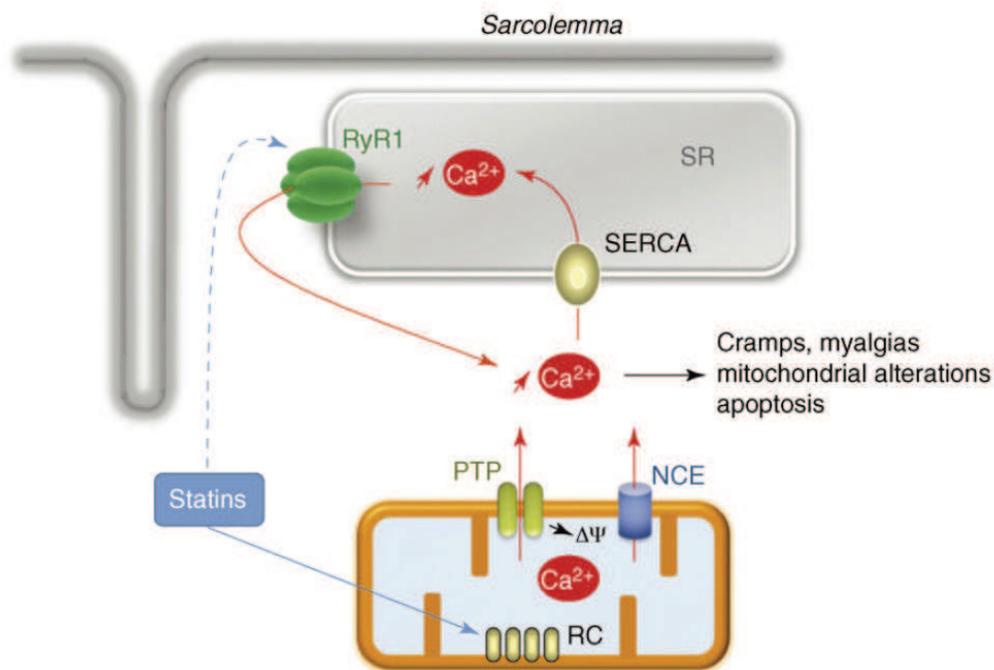
Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'effet des statines sur le muscle squelettique, notre équipe ayant déjà étudié de façon approfondie l'effet des statines au niveau du muscle cardiaque (*Bouitbir 2011*). En effet, les statines sont couramment prescrites, notamment chez les patients en ICC. Il a ainsi été démontré qu'une politique agressive de réduction du taux de LDL cholestérol était bénéfique chez les patients en ICC, puisqu'elle permettait de réduire de façon significative les évènements cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral). Il est donc recommandé de prescrire des statines à tous les patients en ICC, ou sans AOMI mais à haut risque cardiovasculaire (*Norgren 2007*). Les dernières recommandations préconisent un taux de LDL-cholestérol inférieur à 2,59 mmol/L chez les patients présentant une ICC, ce taux étant abaissé à 1,81 mmol/L s'il existe une atteinte coronarienne ou carotidienne associée.

Toutefois, l'effet le plus courant lié à la prise de statines est la toxicité musculaire allant de la simple gêne fonctionnelle à de véritables myopathies aux statines, chez près de 10% des patients (*Norata 2014*). L'incidence des effets myotoxiques liés aux statines est variable dans la littérature, et dépend essentiellement de la définition de la toxicité utilisée pour les différentes études cliniques. Les symptômes musculaires liés au traitement par statines peuvent correspondre à une myalgie, une myosite, voire une rhabdomyolyse. Selon la classification de l'American College of Cardiology, une myalgie définit une douleur musculaire sans élévation de la créatine kinase, une myosite correspond à une douleur musculaire associée à une faiblesse musculaire et à l'augmentation de la créatine kinase (inférieure à 10 fois la limite supérieure normale) et une rhabdomyolyse correspond aux symptômes musculaires avec élévation de la créatine kinase à plus de 10 fois la limite supérieure de la normale, avec également une élévation de la créatinine (*Joy 2009*). Les mécanismes sous-jacents sont encore mal définis, mais les résultats des différentes études cliniques et expérimentales publiées mettent clairement en évidence le fait que les statines induisent une toxicité au niveau du muscle squelettique (*Thompson 2003, Sirvent 2008, Norata 2014*).

Différents facteurs peuvent interférer avec la survenue d'une myopathie aux statines. L'augmentation de la biodisponibilité des statines peut être un de ces facteurs, et peut être due à l'altération des voies de dégradation, que cette altération soit liée au vieillissement, à une insuffisance rénale ou à une insuffisance hépatique. Les interactions pharmaceutiques jouent également un rôle important : l'incidence des myopathies aux statines est en effet plus importante en cas de polymédication (*Law 2006*). En effet, la simvastatine et l'atorvastatine sont métabolisées par le cytochrome P450 isozyme 3A4 (Cyp3A4), qui est une voie de dégradation partagée par de nombreuses molécules pharmaceutiques. Ainsi, dans plus de 60% des cas de rhabdomyolyse aux statines, il est noté une prise concomitante de molécules pouvant inhiber ou entrer en compétition avec le Cyp3A4, comme la cyclosporine, l'amiodarone ou les macrolides par exemple (*Law 2006*). L'exercice physique est également un facteur pouvant interférer avec la survenue d'une myopathie aux statines (*Bouitbir 2011*).

La myotoxicité observée lorsque les statines sont administrées avant l'installation de l'ICC est multifactorielle. En effet, les statines vont agir à plusieurs niveaux de la cellule : elles vont avoir une action au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et également au niveau du réticulum sarcoplasmique. La conjonction de ces actions peut conduire à l'apoptose

de la cellule (Figure 25). L'atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale a été mise en évidence au niveau de biopsies musculaires de patients traités par statines (Sirvent 2008). Une des explications de cette altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale est l'inhibition de la synthèse du coenzyme Q10 (ou ubiquinone) par les statines. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction générale de cette thèse, le coenzyme Q10 est un transporteur d'électrons, essentiel au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. La survenue d'une myopathie liée à la réduction du taux de coenzyme Q10 dans la cellule est décrite (Marcoff 2007). La dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale après traitement par statines a été ainsi clairement établie, puisqu'une diminution de la synthèse d'ATP est observée après administration de statines sur des myocytes humains (Nishimoto 2003). Cette atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale va dépolariser la membrane interne mitochondriale, et entraîner un flux de calcium à travers le mPTP, et à travers l'échangeur calcium-sodium (Sirvent2005, Velho 2006, Kaufmann 2006, Pierno 2006). Cette augmentation du taux de calcium cytosolique va activer la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique. Toutefois, le calcium ainsi accumulé dans le réticulum sarcoplasmique va être à nouveau relargué via les récepteurs ryanodine. Les statines vont également, dans une plus faible mesure, provoquer l'activation des récepteurs ryanodine et ainsi provoquer l'augmentation de calcium cytosolique. C'est cette augmentation de calcium cytosolique qui est délétère, et qui va être à l'origine des symptômes musculaires liés à la myopathie aux statines (Sirvent 2005, Liantonio 2007). Cette augmentation de calcium intracellulaire peut conduire à l'apoptose. Il a été démontré qu'un traitement par statines chez le rat provoquait l'activation des voies de l'apoptose, notamment les caspases 3 et 9 (Sacher 2005) (Figure 26).



**Figure 26 : Effets des statines au niveau cellulaire**

Source : Sirvent P, et al. *Curr Opin Pharmacol* 2008.

(RyR1 récepteur ryanodine, SR réticulum sarcoplasmique, SERCA pompe calcique du réticulum sarcoplasmique, RC chaîne respiratoire, NCE échangeur calcium sodium).

## B) Statines et IR musculaire squelettique

Malgré ces données plutôt « inquiétantes », nous avons voulu étudier spécifiquement l'effet des statines sur le muscle squelettique au niveau cellulaire, et notamment au niveau mitochondrial, en fonction du délai d'instauration du traitement. En effet, *notre hypothèse est que le moment d'instauration du traitement est crucial et que des effets bénéfiques peuvent être observés sur un muscle ayant déjà activé ses défenses antioxydantes*. Nous comparons donc une prévention primaire de l'ICC (avant l'instauration de l'ICC) à une prévention secondaire (une fois l'ICC installée).

Nos résultats semblent conforter cette hypothèse puisque le traitement par statines en prévention primaire altère la chaîne respiratoire mitochondriale et diminue la capacité de rétention calcique. Cette atteinte mitochondriale s'accompagne d'une production accrue de radicaux libres. Notre équipe avait déjà mis en évidence l'effet opposé des statines au niveau du muscle squelettique en comparaison au muscle cardiaque (*Bouitbir 2012*). En effet, au niveau du muscle cardiaque, les statines vont avoir un effet protecteur, la production de radicaux libres générée favorisant la biogenèse mitochondriale. Par contre, au niveau du muscle squelettique, l'effet est délétère car la production de radicaux libres est excessive, et va induire l'apoptose. Ainsi, au niveau du muscle squelettique, l'effet pro-oxydant des statines est majoritaire. Les symptômes musculaires peuvent ainsi être expliqués par la toxicité liée aux statines, d'autant plus qu'il a été démontré que les statines réduisaient les capacités régénératives du muscle squelettique, en diminuant les capacités de croissance, de fusion, et de différenciation des myoblastes *in vivo* (*Sirvent 2008*).

L'instauration d'un traitement par statines en prévention secondaire, c'est à dire une fois l'ICC installée a des effets opposés. Notre hypothèse est donc que les voies de signalisation empruntées par les statines ne sont pas les mêmes si elles sont administrées sur le muscle squelettique n'étant pas encore en ischémie critique, ou sur le muscle squelettique déjà ischémique. En effet, les cycles répétés d'ischémie-reperfusion peuvent renforcer le caractère oxydatif du muscle lui permettant ainsi de lutter plus efficacement contre le stress oxydant.

*Une hypothèse complémentaire mérite d'être explorée. Certaines équipes ont montré que les statines pouvaient agir au niveau de la voie RISK*. En effet, la voie RISK est activée le plus souvent par la fixation de ligands sur des récepteurs membranaires, mais l'activation par les statines se ferait directement par l'activation des voies de signalisation intracellulaires, sans qu'il n'y ait nécessairement besoin de la fixation d'un ligand à son récepteur (*Hausenloy 2007*). En effet, les statines pourraient activer directement la voie PI3K-Akt, et ainsi avoir l'effet protecteur de toutes les voies de signalisation intracellulaires liées à l'activation de PI3K-Akt, à savoir l'effet anti-apoptotique, l'inhibition de l'ouverture du mPTP, et la survie cellulaire.

Les effets bénéfiques des statines par activation de la voie RISK ne sont pas démontrés au niveau du muscle squelettique, mais ont été mis en évidence de manière expérimentale au niveau du système nerveux central, au niveau pulmonaire, et au niveau cardio-vasculaire. Au niveau du système nerveux central, il a été démontré de manière expérimentale que la voie PI3K-Akt ainsi que la voie RAS-ERK 1/2 sont les voies de signalisation des statines, et qu'en activant le système eNOS les statines avaient un effet protecteur cérébral (*Srivastava 2012, Cheng 2013, Yu 2013*). De la même façon, après un accident vasculaire cérébral hémorragique, l'administration de statines a un effet protecteur, par phosphorylation de Akt et de GSK3 $\beta$  (*Yang 2012*). L'activation de GSK3 $\beta$  après traitement par statines permet

également la formation de neurites (axones ou dendrites) au niveau neuronal (*Jin 2012*). L'effet protecteur des statines au niveau cérébral via l'activation de la voie PI3K-Akt est actuellement une des voies principales de recherche contre les maladies neuro-dégénératives, telles que la maladie de Parkinson par exemple (*Xu 2013*). Au niveau pulmonaire, il a été démontré que les statines activaient la voie PI3K-Akt, avec pour conséquence un effet protecteur sur les lésions d'ischémie-reperfusion pulmonaires (*Wu 2012*). Au niveau cardiaque, l'administration de statines permet de restaurer la fonction endothéliale, de diminuer l'apoptose et la production de radicaux libres. Ces effets protecteurs se font via l'activation de la voie PI3K-Akt (*Li 2012, Tousoulis 2014, Pan 2014*). L'administration expérimentale de statines au niveau de cellules souches mésenchymateuses transplantées au niveau d'une zone cardiaque infarctée permet d'améliorer la fonction myocardique, en augmentant la survie des cellules greffées. Ceci se fait par l'activation de la voie Akt et de la voie ERK 1/2, permettant ainsi l'activation de la protéine anti-apoptotique Bcl2, et l'inhibition de BAX (*Song 2012, Zhang 2013*). L'activation de la protéine Bcl2 via la voie Akt intervient également après traitement par statines dans l'insuffisance cardiaque post hypertensive. Ainsi, l'insuffisance cardiaque conduit à la fibrose par l'apoptose des cellules cardiaques. L'administration de statines, en activant les mécanismes anti-apoptotiques, a un effet protecteur, et permet de réduire la taille de la zone fibrotique (*Zhang 2012*). Au niveau vasculaire, l'administration de statines a un effet protecteur en activant la voie PI3K-Akt, associée à l'activation de eNOS (*Rossoni 2011, Bi 2013*). Ainsi, administrées une fois l'ICC installée, les statines auraient un effet protecteur en activant la voie RISK, et possiblement la voie PI3K-Akt, comme décrit dans de nombreux autres types cellulaires.

Fait intéressant, il a été démontré que les statines pouvaient avoir un effet protecteur à distance, après IR du muscle squelettique. Ainsi, après administration de statines avant IR aiguë musculaire squelettique, les atteintes rénales et pulmonaires sont diminuées (*Cowled 2008*). Autre élément intéressant, l'administration de statines a des animaux diabétiques permet de restaurer les fonctions musculaires après IR du muscle squelettique (*Emmanueli 2007*). Ces résultats sont en accord avec notre travail, puisque nous avons mis en évidence chez l'animal diabétique une altération plus importante de la fonction respiratoire mitochondriale, une production accrue de radicaux libres, et surtout une inhibition des voies de protection. L'administration de statines pourrait ainsi pallier à l'inhibition des voies de protection, ce qui annihilerait les effets proprement liés au diabète. Une limitation de notre travail est que nous n'avons pas encore étudié les voies de signalisation intracellulaires, mais nous l'analyse des voies RISK et SAFE fait partie de nos perspectives.

### **2.2.3 Conditionnements pharmacologiques par la L-Arginine**

Pour terminer, nous avons voulu étudier l'effet de l'administration de L-arginine dans l'IR sur ICC. En effet, lorsque les lésions liées à l'ICC sont accessibles à un traitement chirurgical, les patients en ICC pourront bénéficier d'un pontage. Ceci nécessite, pour la durée du geste chirurgical, l'interruption du flux sanguin en amont et en aval de la zone à ponter, induisant une situation d'IR supplémentaire à l'ICC pré-existante. Nous avons donc voulu étudier les effets de l'IR sur l'ICC, et les effets du préconditionnement par L-arginine, un précurseur du NO.

## **A) Mécanismes d'action de la L-Arginine**

Approche nouvelle, le conditionnement par L-arginine nous a permis d'étudier les lésions d'IR aiguës sur ICC, qui sont encore majorées par rapport aux lésions d'ICC isolées. Ceci correspond à une situation clinique courante et nous permettra de préciser les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la protection que nous avons observées chez des patients traités par L Arginine lors de pontages fémoro-poplités (PHRC F. Thaveau).

L'IR induit une altération de l'endothélium (*Ku 1982*). Cette altération l'endothéliale est un facteur important des lésions liées à l'IR. Elle est caractérisée essentiellement par une diminution de la capacité de l'endothélium à libérer du NO, associée également à une production de radicaux libres (*Rubanyi 1986, Gryglewski 1986*). En effet, le NO a un rôle protecteur, car -en certaines quantités- il va permettre de réduire la production de radicaux libres, mais également l'accumulation des neutrophiles et l'expression des molécules d'adhésion. Ainsi, compte tenu du rôle central du NO en tant qu'agent vasodilatateur, mais aussi en tant qu'inhibiteur de l'aggrégation plaquettaire et de l'adhésion leucocytaire, il nous a paru essentiel de cibler le NO par le conditionnement pharmacologique dans le cadre des lésions d'IR.

## **B) L Arginine et IR musculaire squelettique**

L'effet protecteur du NO endogène dans les lésions d'IR a été démontré au niveau cardiaque, notamment par l'administration d'inhibiteurs de l'arginase; l'arginase étant un agent régulateur de la production de NO en entrant en compétition avec la NO synthase pour leur substrat commun, la L-arginine (*Kovamees 2014*). Il a également été démontré que l'administration de L-arginine permet d'améliorer la fonction endothéliale après IR (*Settergren 2009*). Plusieurs études, ayant mis en évidence le rôle protecteur central du NO dans les lésions d'IR *in vitro*, ont également démontré que l'administration de L-arginine améliorait les lésions d'IR *in vivo* (*Weyrich 1992, Otani 2009*). Ainsi, en améliorant la biodisponibilité du NO, il a été mis en évidence une augmentation de la biodisponibilité d'eNOS, mais également une activation par phosphorylation d'Akt et d'ERK, avec donc implication de la voie RISK (*Rani 2013, Penna 2013*). D'autres études mettent en évidence une diminution du stress oxydant après administration de L-arginine dans le cadre de l'IR (*Krauss 2011, Sosnowski 2012*).

Nos résultats, avec l'amélioration de la fonction respiratoire mitochondriale et la diminution de radicaux libres après pré-conditionnement par L-arginine, sont en faveur d'un effet protecteur, possiblement lié à l'activation de la voie RISK.

### 3. SYNTHÈSE : Implication des défenses anti-oxydantes et des voies RISK et SAFE dans la protection musculaire contre l'ischémie-reperfusion

Dans notre modèle d'ICC des membres inférieurs, le conditionnement par NAC, statines et L-arginine, une fois l'ICC installée, induit une diminution de la production de radicaux libres, avec restauration de la fonction respiratoire mitochondriale, mais également restauration de la capacité de rétention calcique.

Notre hypothèse est que l'effet protecteur des conditionnements, une fois l'ICC installée, est dû à l'activation d'une part des défenses anti-oxydantes et d'autre part des voies des voies de signalisation intracellulaires (Figure 27).

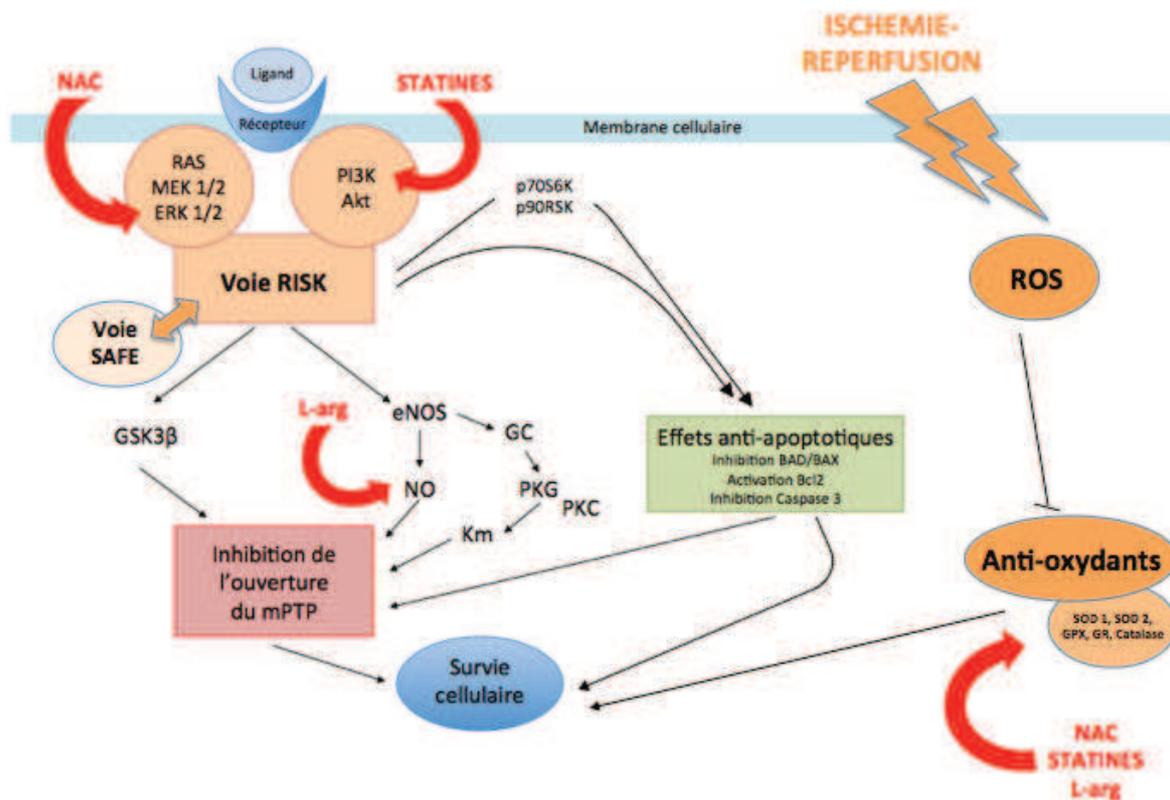


Figure 27 : Mode d'action intracellulaire du conditionnement pharmacologique.

Source : modifié d'après Hausenloy D, et al. Heart Fail Rev 2007.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Nous basant sur des résultats obtenus lors de protocoles d'ischémie-reperfusion de courte durée et sur la littérature, nous avons mis au point un modèle valide d'ICC, témoignant de l'atteinte mitochondriale du muscle squelettique et confirmant la myopathie artérielle, observée à la fois chez l'animal et chez l'homme. Ainsi, les manifestations liées à l'ICC ne sont pas seulement dues à l'hypoperfusion du membre atteint, mais l'atteinte mitochondriale est au centre de la pathologie, associée à une production accrue de radicaux libres et à une inflammation. Notre modèle est stable dans le temps et répond aux trois critères indispensables pour établir le diagnostic d'ICC, à savoir l'association de signes cliniques et de mesures objectives témoignant de l'hypoperfusion du membre atteint, pour une durée supérieure à 15 jours. Ce modèle peut donc être considéré comme valide, et présente l'avantage principal que l'animal est son propre témoin.

Nos différents protocoles de conditionnement pharmacologique ont permis de mettre en évidence un effet protecteur de la NAC, de la L-arginine, mais également des statines lorsqu'elles sont instaurées après l'installation de l'ICC. Ces effets protecteurs interviennent au niveau mitochondrial, en restaurant la fonction respiratoire mitochondriale et la capacité de rétention calcique. On observe aussi une diminution de la présence de radicaux libres. Il est fort probable que les voies de signalisation intracellulaires soient impliquées, notamment la voie RISK, et dans une moindre mesure la voie SAFE.

Nos **perspectives** immédiates sont de confirmer plus avant ces hypothèses mécanistiques, en étudiant les systèmes anti-oxydants mis en jeu et les voies de signalisation intracellulaires, et notamment les différents acteurs impliqués dans les voies RISK et SAFE, tels que PI3K-Akt, ou encore le système eNOS. Pour ce faire, nous utiliserons les tissus congelés lors des expérimentations et les techniques développées lors du travail expérimental sur les rats diabétiques.

Nous avons aussi pour objectif expérimental d'analyser de plus près l'atteinte mitochondriale d'organes situés à distance du site d'ischémie -en particulier le rein- et de comparer ces données à celles obtenues lors de la greffe rénale.

Enfin, nous souhaitons mieux protéger les patients que nous prenons en charge dans le service, en analysant les données obtenues lors du PHRC N°3262 intitulé « Effets protecteurs de la L-arginine dans l'ischémie-reperfusion au cours de pontages fémoro-poplités pour ischémie critique chronique » et en démarrant le protocole intitulé « Effets protecteurs du préconditionnement ischémique sur les fonctions cardiaque, rénale, pulmonaire et musculaire après clampage aortique » (PRI 2014 HUS N°5831) qui nous permettra de vérifier si le conditionnement ischémique est protecteur chez l'Homme lors d'une cure d'anévrisme de l'aorte abdominale.

# **BIBLIOGRAPHIE**

Adembri CC, Kastamoniti EE, Bertolozzi II, Vanni SS, Dorigo WW, Coppo MM, et al. Pulmonary injury follows systemic inflammatory reaction in infrarenal aortic surgery. *Crit Care Med* 2004;32:1170-1177.

Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraei SA, Akthar Am, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair : a randomized controlled trial. *Circulation* 2007 ;116 :198-205.

Andrukhiv A. Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:2067-2074.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999;93:1464-1476.

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

Balakirev MY, Khramtsov VV, Zimmer G. Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide. *Eur J Biochem* 1997;246 :710-718.

Barbieri E, Sestili P, Vallorani L, Guescini M, Calcabrini C, Gioacchini AM, et al. Mitohormesis in muscle cells: a morphological, molecular, and proteomic approach. *Muscles Ligaments Tendons J* 2014;3:254-266.

Barbosa PR, Cardoso MR, Daufenbach JF, Goncalves CL, Machado RA, Roza C, et al. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in the brain of rats after renal ischemia is prevented by N-acetylcysteine and deferoxamine. *Metab Brain Dis* 2010;25:219-225.

Becker F, Loppinet A. Chronic critical ischemia of the legs. Definition and management. *Ann Cardiol Angeiol* 2007;56:63-69.

Beckman KB, Ames BN. Mitochondrial aging: open questions. *Ann NY Acad Sci* 1998;854:118-127.

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

Bi XY, He X, Zhao M, Yu XJ, Zang WJ. Role of endothelial nitric oxide synthase and vagal activity in the endothelial protection of atorvastatin in ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 2013;61:391-400.

Bibli SI, Andreadou I, Lazaris E, Zoga A, Varnavas V, Andeou CC, et al. Myocardial protection provided by chronic skeletal muscle ischemia is not further enhanced by ischemic pre- or post-conditioning: comparative effects on intracellular signaling. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2014;19:220-227.

Bismuth J, Klitfod L, Sillesen H. The lack of cardiovascular risk factor management in patients with critical limb ischemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001;21:143-146.

Boengler K, Buechert A, Heinen Y, Roeskes C, Hilfiger-Kleiner D, Heusch G, et al. Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT-3 deficient mice. *Circ Res* 2008;102:131-135.

Bolcal C, Yildirim V, Doganci S, Sargin M, Aydin A, Eken A, et al. Protective effects of antioxidant medications on limb ischemia reperfusion injury. *J Surg Res* 2007;139:274-279.

Borisov VB. Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies. *Mol Aspects Med* 2002 ;23 :385-412.

Boutbir J, Charles AL, Rasseneur L, Dufour S, Piquard F, Geny B, et al. Atorvastatin treatment reduces exercise capacities in rats: involvement of mitochondrial impairments and oxidative stress. *J Appl Physiol* 2011;111:1477-1483.

Boutbir J, Charles AL, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx J, et al. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J* 2012;33:1397-1407.

Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Péquignot E, et al. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 1995;11:144-149.

Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J* 1972;128:617-630.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J* 1973;134:707-716.

Brass EP, Hiatt WR. Acquired skeletal muscle metabolic myopathy in atherosclerotic peripheral arterial disease. *Vasc Med* 2000;5:55-59.

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

Challis RA, Hayes DJ, Petty RF, Radda GK. An investigation of arterial insufficiency in rat hindlimb : a combined Pnmr and blood flow study. *Biochem* 1986;236:461-467.

Chance B. Reaction of oxygen with the respiratory chain in cells and tissues. *J Gen Physiol* 1965;49:163-195.

Charles AL, Guilbert AS, Bouitbir J, Goette-Di Marco P, Enache I, Zoll J, et al. Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg* 2011;98:511-516.

Cheng WH, Ho WY, Chang CF, Lu PJ, Cheng PW, Yeh TC, et al. Simvastatin induces a central hypotensive effect via Ras-mediated signalling to cause eNOS up-regulation. *Br J Pharmacol* 2013;170 :847-854.

Clarke P, Tyler K. Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nat Rev Microbiology* 1999 ;7 :144-155.

Cocco T, Sgobbo P, Clemente M, Lopriore B, Grattagliano L, Di Paola M, et al. Tissue-specific changes of mitochondrial functions in aged rats : effect of a long-term dietary treatment with N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med* 2005;38:796-805.

Couffinhal T, Silver M, Kearney M, Sullivan A, Witsenbichler B, Magner M, et al. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in Apo E<sup>-/-</sup> mice. *Circulation* 1999 ;99 :3188-3198.

Cour M, Gomez L, Mewton N, Ovize M, Argaud L. Postconditioning: From the Bench to Bedside. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 2011;16:117-130.

Cowled PA, Khanna A, Laws PE, Field JB, Fitridge RA. Simvastatin plus nitric oxide synthase inhibition modulates remote organ damage following skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *J Invest Surg* 2008;21:119-126.

Da Silveira M, Yoshida WB. Trimetazidine and N-acetylcysteine in attenuating hind-limb ischemia and reperfusion injuries: experimental study in rats. *Int Angiol* 2009;28:412-417.

Davis W Jr, Ronai Z, Tew KD. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296:1-6.

Diehm N, Shang A, Silvestro A, Do DD, Dick F, Schmidli J, et al. Association of cardiovascular risk factors with pattern of lower limb atherosclerosis in 2659 patients undergoing angioplasty. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;31:59-63.

Dimmeler S, Fleming L, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependant phosphorylation. *Nature* 1999;399:601-605.

Dormandy JA, Rutherford RB. Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg* 2000;31:1-296.

Duchen MR. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 2004;25:365-451.

Dumaswala UJ, Zhuo L, Mahajan S, Nair PN, Shertzer HG, Dibello P, et al. Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *Am J Physiol* 2001;280:867-873.

Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 2002;415:96-99.

Ekstrasnd MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet* 2004;13:935-944.

Emanuelli C, Monopoli A, Kraenkel N, Meloni M, Gadau S, Campesi I, et al. Nitropravastatin stimulates reparative neovascularisation and improves recovery from limb ischemia in type A diabetic mice. *Br J Pharmacol* 2007;150:873-882.

Faglia E, Clerici G, Clerissi J, Gabrielli L, Losa S, Mantero M, et al. Early and five-year amputation and survival rate of diabetic patients with critical limb ischemia : dat of a cohort study of 564 patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;32:484-490.

Fisher RP, Clayton DA. Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 1988;8:3496-3509.

Fontaine R, Kim M, Kieny R. Die chirurgische behandlung der peripheren durchblutungsstörungen. *Helvetica Chirurgica* 1954;5:499-533.

Giannopoulou M, Iszkula SC, Dai C, Tan X, Yang J, Michalopoulos GK, et al. Distinctive role of Stat3 and Erk-1/2 activation in mediating interferon-gamm inhibition of TGF-beta1 action. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:1234-1240.

Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury* 2012;43:670-675.

Gryglewski rj, Palmer RMJ, Mancada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-460.

Gross ER, Gross GJ. Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* 2006;70:212-221.

Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection : JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK3beta. *AM J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:827-834.

Guillot M, Charles AL, Chamaroux-Tran TN, Bouitbir J, Meyer A, Zoll J, et al. Oxidative stress precedes skeletal muscle mitochondrial dysfunction during experimental aortic cross-clamping but is not associated with early lung, heart, brain, liver or kidney mitochondrial impairment. *J Vasc Surg* 2013;3:145-151.

Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr* 1997;29:89-95.

Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2009;46:821-831.

Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada M, Korsmeyer SJ. P70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the proapoptotic molecule BAD. *Proc Nat Acad Sci USA* 2001;98:9666-9670.

Hausenloy D, Yallon D. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004;61:448-460.

Hausenloy D, Yellon D. Reperfusion injury salvage kinase signaling: taking a risk for cardioprotection. *Heart Fail Rev* 2007;12:217-234.

Janda J, Linhart J, Kasalicky J. Experimental chronic ischemia of the skeletal muscle in the rat. *Physiol* 1974;23:521-525.

Jensen SA, Vatten LJ, Myhre HO. The prevalence of chronic critical lower limb ischemia in a population of 20000 subjects 40-69 years of age. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;32:60-65.

Jin Y, Sui HJ, Dong Y, Ding Q, Qu WH, Yu SX, et al. Atorvastatin enhances neurite outgrowth in cortical neurons in vitro via up-regulating the Akt/mTOR and Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathways. *Acta Pharmacol Sin* 2012;33:861-872.

Joy TR, Hegele RA. Statinrelated myopathy. *Ann Inter Med* 2009;150:858-868.

Kao MC, Di Bernardo S, Matsuno-Yagi A, Yagi T. Characterization and topology of the membrane domain Nqo10 subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* 2003;42:4534-4543.

Katz A, Hernandez A, Caballero DM, Briceno JF, Amezcua LV, Kosterina N, et al. Effects of N-acetylcysteine on isolated mouse skeletal muscle: contractile properties, temperature dependence, and metabolism. *Pflugers Arch* 2014;466:577-585.

Kaufmann R, Torok M, Zahno A, Waldhauser KM, Brecht K, Krähenbühl S. Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:2415-2425.

Kemp G. Mitochondrial dysfunction in chronic ischemia and peripheral vascular disease. *Mitochondrion* 2005;4:629-640.

Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury *Plast Reconstr Surg* 2006;117:1024-1033.

Klausner JM, Anner H, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, et al. Lower torso ischemia-induced lung injury is leukocyte dependent. *Ann Surg* 1988;208:761-767.

Koksal C, Bozkurt K, Cangel U, Ustundag N, Konukoglu D, Musselim B, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion injury by N acetyl cysteine in a rat Hind limb ischemia model. *J Surg Res* 2003;111:236-239.

Koutakis P, Johanning JM, Haynatzki GR, Myers SA, Stergiou N, Longo GM, et al. Abnormal joint powers before and after the onset of claudication symptoms. *J Vasc Surg* 2010;52:340-347.

Lovamees O, Shemyakin A, Pernow J. P183 arginase inhibition protects from ischemia-reperfusion injury in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 2014;103:1-32.

Krause KH. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *J Infect Dis* 2004;57:28-29.

Krauss H, Sosnowski P, Biczysko W, Majewski P, Jableka A, Miskowiak B, et al. Effects of L-arginine and NG-nitro L-arginine methyl ester (L-NAME) on ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle, small and large intestines. *Chin J Physiol* 2011;54:7-18.

Kressler D, Schreiber SN, Knutti D, Kralli A. The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 2002;277:13918-13925.

Ku DD. Coronary vascular reactivity after acute myocardial infarction. *Science* 1982;218:576-578.

Kuśmierek J, Dabrowski J, Bieńkiewicz M. Radionuclide assessment of lower limb perfusion using <sup>99m</sup>Tc-MIBI in early stages of atherosclerosis. *Nucl Med Rev Cent East Eur* 2006;9:18-23.

Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;3:965-976.

Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, et al. Coding a facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Meth* 2010;7:447-449.

Law M, Rudnick AR. Statin safety: a systematic review. *Am J Cardiol* 2006;97:52-60.

Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, et al. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury : does it go beyond the RISK pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2009 ;47 :32-40.

Lee HL, Chen CL, Yeh ST, Zweier JL, Chen YR. Biphasic modulation of the mitochondrial electron transport chain in myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302:410-422.

Lejay A, Charles AL, Zoll J, Bouitbir J, Thaveau F, Piquard F, Geny B. Skeletal muscle mitochondrial function in peripheral arterial disease : usefulness of muscle biopsy. *Muscle Biopsy*, ed Saunders 2011.

Lejay A, Meyer A, Schlagowski A, Charles AL, Singh F, Boutibir J, et al. Mitochondria : mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;50 :101-105.

Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, et al. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 2005;3:101.

Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. Thiol antioxidant, N-acetylcysteine, activates extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;275:789-794.

Li CB, Li XX, Chen YG, Gao HQ, Bao MC, Zhang J, et al. Simvastatin exerts cardioprotective effects and inhibits the activity of Tho-associated protein kinase in rats with metabolic syndrome. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:759-764.

Liantonio A, Giannuzzo V, Cippone V, Camerino GM, Pierno S, Camerino DC. Fluvastatin and atorvastatin affect calcium homeostasis of rat skeletal muscle fibers in vivo and in vitro by impairing the sarcoplasmic reticulum/mitochondria  $Ca^{2+}$  release system. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;321:626-634.

Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang C-Y, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 2002;418:797-801.

Longland CJ. The collateral circulation of the limb. *Am R Coll Surg Engl* 1953;13:161-181.

Makris KI, Nella AA, Zhu Z, Swanson SA, Casale GP, Gutti TL, et al. Mitochondriopathy of peripheral arterial disease. *Vascular* 2007;15:336-343.

Mansour Z, Charles AL, Kindo M, Pottecher J, Chamaraux-Tran TN, Lejay A, et al. Remote effects of lower limb ischemia-reperfusion: Impaired lung, unchanged liver and stimulated kidney oxidative capacities. *Biomed Res Int* 2014, In press.

Marcoff L, Thompson PD. The role of Coenzyme Q10 in statin-associated myopathy: a systematic review. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2231-2237.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999;424:83-95.

Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32:595-603.

Mc Dermott MM, Criqui MH, Greenland P, Guralnik JM, Liu K, Pearce WH, et al. Leg strength in peripheral arterial disease : associations with disease severity and lower-extremity performance. *J Vasc Surg* 2004;39:523-530.

McKelvey TG, Höllwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U, Jones HP. Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am J Physiol* 1988;254:753-760.

Meyer A, Charles AL, Zoll J, Guillot M, Lejay A, Singh F, et al. Cryopreservation with dimethyl sulfoxide prevents accurate analysis of skinned skeletal muscle fibers mitochondrial respiration. *Biochimie* 2014;100:227-33.

Miller CC, Villa MA, Sutton J, Lau D, Keyhani K ; Estrera AL, et al. Serum myoglobin and renal morbidity and mortality following thoracic and thoraco-abdominal aortic repair : does rhabdomyolysis play a role ? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009;37:388-394.

Miyauchi T, Miyata M, Ikeda Y, Akasaki Y, Hamada N, Shirasawa T, et al. Waon therapy upregulates Hsp90 and leads to angiogenesis through the Akt-endothelial nitric oxide synthase pathway in mouse hindlimb ischemia. *Circ J* 2012;76:1712-1721.

Monden Y, Kubota T, Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T, et al. Tumor necrosis factor alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:743-753.

Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J* 1999;342:481-496.

Moylan JS, Reid MB. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve* 2007;35:411-429.

Müller-Bühl U, Wiesemann A, Oser B. Correlation of hemodynamic and functional variables with the angiographic extent of peripheral arterial occlusive disease. *Vasc Med* 1999;4:247-251.

Muluk V, Kelley ME. Outcome events in patients with claudication, a 15-year study in 2777 patients. *J Vasc Surg* 2001;33:251-258.

Murabito JM, Evans JC, Nieto K, Larson MG, Levy D, Wilson PW. Prevalence and clinical correlates of peripheral arterial disease in the Framingham Offspring Study. *Am Heart J* 2002;143:961-965.

Murata I, Ooi K, Shoji S, Motohashi Y, Kan M, Ohtake K, et al. Acute lethal crush-injured rats can be successfully rescued by a single-injection of high-dose dexamethasone through a pathway involving PI3K-Akt-eNOS signaling. *J Trauma Acute Care Surg* 2013;75:241-249.

Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauter SC, Masuda H, Kalka C, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998;101:2567-2578.

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

Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, et al. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:564-570.

Nishimoto T, Tozawa R, Amano Y, Wada T, Imura Y, Sugiyama Y, et al. Comparing myotoxic effects of squalene synthase inhibitor, T-91485, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors in human myocytes. *Biochem Pharmacol* 2003;66:2133-2139.

Norata GD, Tibolla G, Catapano AL. Statins and skeletal muscles toxicity: from clinical trials to everyday practice. *Pharmacol Res* 2014 (in press).

Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg* 2007;45 :5-67.

Norwood MGA, Bown MJ, Sayers RD. Ischaemia-reperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;28:234-245.

Oh SH, Lim SC. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependant pathway in HepG2 celles and this is inhibited through N-acetylcysteine mediated catalase upregulation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;212:212-223.

Otani H. The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:1913-1928.

Pan Q, Xie X, Guo Y, Wang H. Simvastatin promotes cardiac microvascular endothelial cells proliferation, migration and survival by phosphorylation of p70 S6K and Fox03a. *Cell Biol Int* 2014;38:599-609.

Paradies G, Petrosillo G, Pistolese 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;94:53-59.

Penna C, Perrelli MG, Tullio F, Angotti C, Camporeale A, Poli V, et al. Diazoxide postconditioning induces mitochondrial protein S-nytrosylation and a redox-sensitive mitochondrial phosphorylation/translocation of RISK elements : no role for SAFE. *Basic Res Cardiol* 2013;108:371.

Pierno S, Didonna MP, Cippone V, De Luca A, Pisoni M, Frigeri A, et al. Effects of chronic treatment with statins and fenofibrate on rat skeletal muscle : a biochemical, histological and electrophysiological study. *Br J Pharmacol* 2006;149:909-919.

Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular Research* 2004;61:365-371.

Pipinos I, Judge AR, Zhu Z, Selsby JT, Swanson SA, Johanning JM, et al. Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease. *Free Radical Biol and Med* 2006;41:262-269.

Pipinos I, Judge AR, Selsby JT, Zhu Z, Swanson SA, Nella AA, et al. The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 1. Functional and histomorphological changes and evidence for mitochondrial dysfunction. *Vasc Endovasc Surg* 2007;41:481-489.

Pipinos I, Swanson SA, Zhu Z, Nella AA, Weiss DJ, Gutti TL, et al. Chronically ischemic mouse skeletal muscle exhibits myopathy in association with mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:290-296.

Pipinos I, Judge AR, Selsby JT, Zhu Z, Swanson SA, Nella AA, et al. The myopathy of peripheral arterial occlusive disease. Oxidative stress, neuropathy, and shift in muscle fiber type. *Vasc Endovascular Surg* 2008;42:101-112.

Podda M, Weber C, Traber MG, Packer L. Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinone. *J Lipid Res* 1996;37:893-901.

Pu L, Jackson S, Lachapelle KJ, Arekat Z, Graham AM, Lisbona R, et al. A persistent hindlimb ischemia model in the rabbit. *J Invest Surg* 1994;7:49-60.

Rajagopalan S, Grossman PM. Management of chronic critical limb ischemia. *Cardiol Clin* 2002;20:535-545.

Rani N, Bharti S, Manchanda M, Nag TC, Ray C, Chauhan SS, et al. Regulation of heat shock proteins 27 and 70, p-Akt/p-eNOS and MAPKs by naringin dampens myocardial injury and dysfunction in vivo after ischemia/reperfusion. *Plos One* 2013;8:82577.

Regensteiner JG, Wolfel EE, Brass EP, Carry MR, Ringel SP, Hargarten ME, et al. Chronic changes in skeletal muscle histology and function in peripheral arterial disease. *Circulation* 1993;87:413-421.

Ristow M, Schmeisser K. Mitohormesis: promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species. *Dose Response* 2014;12:288-341.

Roseguini BT, Silva LM, Polotow TG, Barros MP, Souccar C, Han SW. Effects of N-acetylcysteine on skeletal muscle structure and function in a mouse model of peripheral arterial insufficiency. *J Vasc Surg* 2014 (epub ahead of print).

Rossoni LV, Wareing M, Wenceslau CF, Al-Abri M, Cobb C, Austin C. Acute simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via AMP-activated protein kinase and reduces contractility of isolated rat mesenteric resistance arteries. *Clin Sci* 2011;121:449-458.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250:822-827.

Sacher J, Weigl L, Werner M, Szegedi C, Hohenegger M. Delineation of myotoxicity induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors in human skeletal muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:1032-1041.

Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830:4117-4129.

Sazanov LA. Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* 2007;46:2275-2288.

Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological Reviews* 2008;88:611-638.

Schultz R, Heusch G. Tumor necrosis factor-alpha and its receptors A and 2 : Yin and Yang in myocardial infarction ? *Circulation* 2009 ;119 :1355-1359.

Settergren M, Bohm F, Malmstrom RE, Channon KM, Pernow J. L-arginine and tetrahydrobiopterin protects against ischemia-reperfusion-induced endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2009;204:73-88.

Siefert FC, Banker M, Lane B, Bagge Un Anagnostopoulos CE. An evaluation of resting arterial ischemia models in the rat hindlimb. *J Cardiovasc Surg* 1985;26:502-508.

Sirvent P, Mercier J, Vassort G, Lacampagne A. Simvastatine triggers mitochondria-induced Ca<sup>2+</sup> signaling alteration in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:1067-1075.

Sirvent P, Mercier J, Lacampagne A. New insights into mechanisms of statin-associated myotoxicity. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:333-338.

Skulachev VP. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Letters* 1996;397:7-10.

Song L, Yang YJ, Dong QT, Qian HY, Xu H, Meng XM, et al. Atorvastatin protects swine bone marrow mesenchymal stem cells from apoptosis through AMPK but not PI3K/Akt pathway. *Zhonghua Zhi* 2011;39:1033-1038.

Sosnowski P, Krauss H, Bogdanski P, Suliburska J, Jablecka A, Cieslewicz A, et al. The influence of short-term L-arginine supplementation on rats muscular and hepatic cells in ischemia-reperfusion syndrome. *J Physiol Biochem* 2012;68:1-9.

Sprengers R, Lips D, Moll F, et al. Progenitor cell therapy in patients with critical limb ischemia without surgical options. *Ann Surg* 2008;247:411-420.

Srivastava K, Bath PM, Bayraktutan U. Current therapeutic strategies to mitigate the eNOS dysfunction in ischaemic stroke. *Cell Mol Neurobiol* 2012;32:319-336.

Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, La Sala A, et al. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* 2003;108:205-210.

Stadtman ER, Levine RL. Why have cells selected reactive oxygen species to regulate cell signaling events? *Hum Exp Toxicol* 2002;21:83.

Stahl D, Souder N, Probe R, Sampson W, Tharakan B, Ward D. The effects of hypothermia and L-arginine on skeletal muscle function in ischemia-reperfusion injury. *J Orthop Trauma* 2012 ;26 :579-584.

Stock D, Leslie AG, Walker JE. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 1999;286:1700-1705.

Sunder-Plassman L, Gandolfo AM, Utz ZC. Effectiveness of buflomedil in arterial occlusive disease. Modification of transcutaneous oxygen pressure in a placebo-controlled double-blind study. *MMW Munch Med Wochenschr* 1984;126:247-248.

Szarszoi O, Maly J, Ostadal P. Effect of acute and chronic simvastatin treatment on post-ischemic contractile dysfunction in isolated rat heart. *Physiol Research* 2008;57:793-796.

Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 2005;6:389-402.

Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, Chafke N, Kretz JG, Piquard F, et al. Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 2007;46:541-547.

Thaveau F, Zoll J, Bouitbir J, Ribera F, Di Marco P, Chakfé N, et al. Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2009;155:65-69.

Thibault H, Piot C, Ovize M. Postconditioning in man. *Heart Fail Rev* 2007;12:245-248.

Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *J Am Med Assoc* 2003;289:1681-1690.

Tousoulis D, Olikonomou E, Siasos G, Stefanadis C. Statins in heart failure with preserved and reduced ejection fraction. An update. *Pharmacol Ther* 2014;141:79-91.

Tran TP, Tu H, Pipinos I, Muelleman RL, Albadawi H, Li YL. Tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscles: Involvement of superoxide. *Eur J Pharmacol* 2011;650:328-334.

Tran TP, Tu H, Liu J, Muelleman RL, Li YL. Mitochondria-derived superoxide links to tourniquet-induced apoptosis in mouse skeletal muscle. *Plos One* 2012;7:43410.

Tsurata F, Masuyama N, Gotoh Y. The phosphatidylinositol 3-kinase –Akt pathway suppresses BAX translocation to mitochondria. *J Biol Chem* 2002;277:14040-14047.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal Physiol* 2003;552:335-344.

Velho JA, Okanobo H, Degasperi GR, Matsumoto MY, Alberici LC, Cosso RG, et al. Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition. *Toxicology* 2006;219:124-132.

Ventura-Clapier R, Kaasik A, Veksler V. Structural and functional adaptations of striated muscles to CK deficiency. *Mol Cell Biochem* 2004;256:29-41.

Vergely C, Maupoil V, Clermont G, Bril A, Rochette L. Identification and quantification of free radicals during myocardial ischemia and reperfusion using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch Biochem Biophys* 2003;420:209-216.

Wang H, Oster G. Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature* 1998;396:279-282.

Waters R, Terjung R, Peters K, Annex B. Preclinical models of human peripheral arterial occlusive disease: implications for investigation of therapeutic agents. *J Appl Physiol* 2004;97:773-780.

Weiss DJ, Casale GP, Koutakis P, Nella A, Swanson SA, Zhu Z, et al. Oxidative damage and myoiber degeneration in the gastrocnemius of patients with peripheral arterial disease. *J Transl Med* 2013;11:230.

Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 1992;86:279-288.

Wiesner RJ, Kurowski TT, Zak R. Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol Endocrinol* 1992;6:1458-1467.

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999;98:115-124.

Wu Y, Lv J, Feng D, Jiang F, Fan X, Ahang Z, et al. Restoration of alveolar type II cell function contributes to simvastatin-induced attenuation of lung ischemia-reperfusion injury. *Int J Mol Med* 2012;30:1294-1306.

Xu YQ, Long L, Yan JQ, Wei L, Pan MQ, Gao HM, Zhou P, et al. Simvastatin induces neuroprotection in 6-OHDA-lesioned PC12 via the PI3K/Akt/caspase 3 pathway and anti-inflammatory responses. *CNS Neurosci Ther* 2013;19:170-177.

Yamaguchi H, Wang HG. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* 2001;20:7779-7786.

Yan CY, Greene LA. Prevention of PC-12 cell death by N-acetylcysteine requires activation of the Ras pathway. *J Neurosci* 1998;18:4042-4049.

Yang D, Han Y, Zhang J, Chopp M, Seyfried DM. Statins enhance expression of growth factors and activate the PI3K/Akt-mediated signaling pathway after experimental intracerebral hemorrhage. *World J Neurosci* 2012;2:74-80.

Yassin MM, Denis D, Harlin M. Lower-limb Ischemia-Reperfusion Injury Triggers a Systemic Inflammatory Response and Multiple Organ Dysfunction. *W J Surg* 2002;26:115-121.

Yin X, Zheng Y, Zhai X, Zhao X, Cai L. Diabetic inhibition of preconditioning- and postconditioning-mediated myocardial protection against ischemia/reperfusion injury. *Exp Diabetes Res* 2012;198048.

Yu YQ, Long L, Yan JQ, Wei L, Pan MQ, Gao HM, et al. Simvastatin induces neuroprotection in 6-OHDA-lesioned PC12 via the PI3K/AKT/caspase 3 pathway and anti-inflammatory responses. *CNS Neurosci Ther* 2013;19:170-177.

Zaffarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of n-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003 ;60 :6-20.

Zhang X, Shan P, Alam J, Fu XY, Lee PJ. Carbon monoxide differentially modulates STAT1 and STAT 3 and inhibits apoptosis via a phosphatidylinositol3-kinase/Akt and p38 kinase-dependent STAT3 pathway during anoxia-reoxygenation injury. *Biochem* 2005;280:8714-8721.

Zhang WB, Du QJ, Li H, Sun AJ, Qiu ZH, Wu CN, Zhao G, et al. The therapeutic effect of rosuvastatin on cardiac remodelling from hypertrophy to fibrosis during the end-stage hypertension in rats. *J Cell Mol Med* 2012;16:2227-2237.

Zhang Z, Li S, Cui M, Gao X, Sun D, Qin X, et al. Rosuvastatin enhances the therapeutic efficacy of adipose-derived mesenchymal stem cells for myocardial infarction via PI3K/Akt and MEK/ERK pathways. *Basic Res Cardiol* 2013;108:333.

# **ANNEXES**



## Research paper

## Cryopreservation with dimethyl sulfoxide prevents accurate analysis of skinned skeletal muscle fibers mitochondrial respiration



Alain Meyer<sup>a,b,\*</sup>, Anne-Laure Charles<sup>b</sup>, Joffrey Zoll<sup>a,b</sup>, Max Guillot<sup>a,c</sup>, Anne Lejay<sup>a,d</sup>, François Singh<sup>a,b</sup>, Anna-Isabel Schlagowski<sup>a,b</sup>, Marie-Eve Isner-Horobeti<sup>a,c</sup>, Cristina Pisteu<sup>a,b</sup>, Anne Charlioux<sup>a,b</sup>, Bernard Geny<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Equipe d'Accueil 2072 "Mitochondries, stress oxydant et protection musculaire", Fédération de Médecine Translationnelle, Université de Strasbourg, Institut de Physiologie, 67000 Cedex, France

<sup>b</sup>Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Pôle de Pathologie Thoracique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Cedex, France

<sup>c</sup>Service de Réanimation Médicale, Pôle d'Urgences, Réanimations Médicales, Centre Antipoison, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Cedex, France

<sup>d</sup>Service de Chirurgie Vasculaire et de Transplantation Rénale, Pôle de cardiologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Cedex, France

\* Institut Universitaire de Réadaptation Clémenceau, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Cedex, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 September 2013

Accepted 17 January 2014

Available online 25 January 2014

## Keywords:

Muscle

Mitochondria

Oxygraphy

Cryopreservation

DMSO

Ischemia

## ABSTRACT

Impact of cryopreservation protocols on skeletal muscle mitochondrial respiration remains controversial. We showed that oxygen consumption with main mitochondrial substrates in rat skeletal muscles was higher in fresh samples than in cryopreserved samples and that this difference was not fixed but grew significantly with respiration rates with wide fluctuations around the mean difference. Very dose results were observed whatever the muscle type and the substrate used. Importantly, the deleterious effects of ischemia-reperfusion observed on fresh samples vanished when cryopreserved samples were studied. These data demonstrate that this technic should probably be performed only extemporaneously.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

### 1. Introduction

Oxygraphic measurement of mitochondrial respiration in permeabilized muscle fibers is a powerful tool allowing the precise determination of the mitochondrial respiratory chain complexes activities. Using this technique, proposed for the first time by Chance and Williams [1], basal oxygen consumption in state 4 ( $V_0$ ), and thereafter maximal fiber respiration rates are measured consecutively in the absence and presence of saturating amounts of adenosine diphosphate (ADP). The relative contribution of respiratory chain complexes I, II, III and/or IV to the global mitochondrial respiration rates can be determined using several substrates. When  $V_{ADP}$  is recorded, electron flow travels through complexes I, III and IV. When complex I is blocked with amytal and complex II stimulated with succinate, mitochondrial respiration determines complexes II, III and IV activities ( $V_{succ}$ ). Upon *N, N, N', N'*-tetramethyl-*p*-

phenylenediaminedihydrochloride (TMPD) and ascorbate additions, complex IV activity is determined as an isolated step of the respiratory chain ( $V_{TMPD}$ ) [2–5] (Supplemental Fig. 1).

Mitochondrial respiration in skeletal muscle determination is a potent tool for the diagnosis of primary respiratory chain defects in mitochondrial cytopathies [4]. It is also very useful for the assessment of acquired impairment of mitochondrial respiration that may occur in numerous situations, ranging from acute to chronic disease, such as septic shock [5], chronic obstructive pulmonary disease [6] and ischemia-reperfusion [7]. Interestingly, even subtle skeletal muscle ischemia contributes to remote organ injuries, contributing to immediate and to long-term morbidities [8–11]. Skeletal muscle mitochondrial respiration is very sensitive to physiological processes such as low physical activity [12] and aging [13] and oxygraphic measurement of mitochondrial respiration in permeabilized muscle fibers allows highlighting positive effects of therapeutic interventions such as drugs intake [7], diet [13] or exercise programs [12].

To guarantee mitochondrial intactness, mitochondrial respiration is recorded immediately after muscle biopsy, which is an important restriction for its wide use, both in experimental and

\* Corresponding author. Equipe d'Accueil 3072, Université et Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France. Tel.: +33 3 69 55 08 79; fax: +33 3 69 55 18 26.

E-mail address: [Alain.meyer1@chu-strasbourg.fr](mailto:Alain.meyer1@chu-strasbourg.fr) (A. Meyer).

clinical settings. Therefore, cryopreservation methods have been developed that may allow the storage of samples for further analysis, or shipment from a center in which respiration assessment is not available to a center which performs this method.

However, the effect of cryopreservation on mitochondrial respiration of skeletal muscle needs further assessment in view of the conflicting results previously reported. Kuznetsov et al. have proposed a protocol after which, in almost all cases, they recorded no significant decrease of  $V_{ADP}$  and  $V_{succ}$  in frozen human *vastus intermedius* and rat ventricle or *soleus* [14]. On the other hand, using very similar methods, Larsen et al. observed that cryopreservation did not protect mitochondrial respiration in human *vastus intermedius* and *deltoideus* from a significant drop of  $V_{ADP}$  and  $V_{succ}$  [15].

Furthermore, there is not published information about the agreement between the results obtained in cryopreserved and fresh samples, according to Bland and Altman analysis [16]. To further address this issue, besides investigating correlation coefficients, we tested the agreement of mitochondrial respiration measurements in fresh and cryopreserved samples on five skeletal muscles characterized by different oxidative capacities, using main substrates that allowed determination of the respiratory chain activity from complex I to IV, from complex II to IV, and of complex IV (Supplemental Fig. 1).

We also determined whether cryopreservation might prevent the diagnosis of mild but significant mitochondrial impairment in a rat model of lower limb ischemia.

Finally, to approach mechanisms potentially involved in cryopreservation deleterious effects, we investigated the specific effect of DMSO on mitochondrial respiration and assessed the integrity of the outer mitochondrial membrane after cryopreservation using cytochrome *c* test.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and experimental design

Adult Wistar rats (male, 250–300 g) were used in all experiments. The investigation conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996).

First, we compared 120 paired results (fresh versus cryopreserved muscles) in six normal animals. Then, we investigated the effects of lower limb ischemia-reperfusion on mitochondrial respiratory chain complexes activities in six rats with experimental aortic cross-clamping and six controls. As described previously, ischemia-reperfusion group had 3 h ischemia induced by aortic clamping and collateral vessel ligation, followed by 2 h of reperfusion while control group underwent only anesthesia and a midline laparotomy [16]. Finally, we assessed the integrity of the outer mitochondrial membrane with cytochrome *c* test in 9 cryopreserved *gastrocnemius* samples and the effect of the cryopreservation solution on mitochondrial respiration by exposition of fresh samples either to ice-cold relaxing solution alone ( $n = 9$ ) or additionally containing 30% DMSO ( $n = 9$ ).

### 2.2. Preparation of muscle fibers and cryopreservation

Immediately after sacrifice, *rectus femoris* ( $n = 6$ ), *gastrocnemius* ( $n = 6$ ), *soleus* ( $n = 6$ ), *plantaris* ( $n = 6$ ) and *vastus intermedius* ( $n = 6$ ) muscles were removed from animals and were carefully dissected in ice-cold relaxing solution containing  $\text{CaK}_2\text{EGTA}$  (2.77 mM),  $\text{K}_2\text{EGTA}$  (7.23 mM with 100 nM of free  $\text{Ca}^{2+}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (6.56 mM with 1 mM of free  $\text{Mg}^{2+}$ ), imidazole (20 mM), taurine (20 mM), dithiothreitol (0.5 mM), K-methane sulfonate (50 mM),  $\text{Na}_2\text{ATP}$  (5.7 mM) and  $\text{PCr}$  (15 mM). Dissection of each sample was

performed using two pairs of extra sharp forceps. The samples were then split in two sections. One was analyzed immediately for mitochondrial respiration as described below, the other was cryopreserved.

Cryopreservation experiments were performed as described by Kuznetsov et al. [14]. Briefly, carefully dissected fibers were immersed in 100  $\mu\text{l}$  of relaxing solution (using 1.8 ml NUNC cryotubes) additionally containing 30% dimethyl sulfoxide (DMSO) concentrations and 10 mg/ml fatty acid-free BSA and equilibrated with cryopreservation solution for 5 s. These fibers were then immediately frozen in liquid nitrogen at uniform freezing rates and kept in  $-80^\circ\text{C}$  between a median time of 10 days (range 7–12 days).

For further analysis, tubes were placed in a water bath at  $37^\circ\text{C}$ . When the cryopreservation medium was completely thawed, fibers were immediately transferred and washed in the medium for respiration measurement. Fibers were then permeabilized as described below and used for respiration analysis.

### 2.3. Muscle mitochondrial respiration measurements and coupling

The relative contribution of the respiratory chain complexes I, II, III and IV to the global mitochondrial respiratory rate was studied on saponin-skinned fibers, as described previously [13,17]. Oxygen consumption was measured polarographically with a Clark-type electrode (Strathkelvin Instruments, Glasgow, UK). The chamber volume in the Clark-electrode was 3 ml and stirrer speed was 750 rpm. When maximal fiber respiration ( $V_{ADP}$ ) was recorded, electron flow went through complexes I, III and IV, because of the presence of glutamate (5 mmol/l) and malate (2 mmol/l). Then, complex I was blocked with amytal (0.02 mmol/l) and complex II was stimulated with succinate (25 mmol/l). Mitochondrial respi-

ration in these conditions determined complex II, III and IV activities ( $V_{succ}$ ). To explore the complex IV activity,  $N,N,N',N'$ -tetramethyl-*p*-phenylenediaminedi hydrochloride (TMPD, 0.5 mmol/l) and ascorbate (0.5 mmol/l) were added as an artificial electron donor to complex IV ( $V_{TMPD}$ ). Results were expressed in  $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight.

Mitochondrial coupling was inferred from the ratio (RCR) between state 3 respiratory capacities ( $V_{ADP}$ ) and basal oxygen consumption in state 4 ( $V_D$ ).

### 2.4. Cytochrome *c* test

To assess the integrity of the outer mitochondrial membrane, 10  $\mu\text{M}$  cytochrome *c* was added during state 3 respiration with succinate in 9 cryopreserved *gastrocnemius* samples.

### 2.5. Effect of DMSO on muscle mitochondrial respiration

To determine whether DMSO might impair muscle mitochondrial respiration, we submitted dissected fresh *gastrocnemius* samples during 10 min to either the ice-cold relaxing solution alone ( $n = 9$ ) or to the ice-cold relaxing solution additionally containing 30% DMSO ( $n = 9$ ). Then the fibers were transferred and washed in the medium for respiration measurement as described above.

### 2.6. Statistical analysis

All data are expressed as means  $\pm$  standard error of mean (except when other indication is provided, i.e. when standard deviation or 95% confidence interval (95% CI) are used). Pearson's tests were used to analyze correlations between the data after checking that the distribution of the values was normal. The Mann Whitney *U* test was performed to compare the results obtained in cryopreserved muscle samples with the one obtained in fresh muscle

samples. Analysis of variance (ANOVA) was performed using Kruskal Wallis test to determine whether mitochondrial respiration was differently affected by the five muscles and the four substrates used. Post hoc testing was performed using Dunn's multiple comparison tests. Values of  $P < 0.05$  were considered significant.

To compare the mitochondrial respiration measurements and evaluate whether there was agreement or bias, we used the method of Bland and Altman [18], where the difference between each set of determination ( $V_{\text{cryopreserved}} - V_{\text{fresh}}$ ) is plotted against the mean of the two measurements ( $(V_{\text{cryopreserved}} + V_{\text{fresh}})/2$ ). Limits of agreement were defined as mean ( $V_{\text{cryopreserved}} - V_{\text{fresh}}$ )  $\pm$  (1.96 standard deviation (SD)).

Statistical analyses were performed using Prism data base (GraphPad Prism 5, Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Oxygen consumption of cryopreserved muscle samples significantly correlated with oxygen consumption of fresh muscle samples

When all paired results were considered together regardless the muscle type and the substrate ( $n = 120$ ), oxygen consumption in the cryopreserved muscle samples significantly correlated with oxygen consumption in the fresh muscle samples ( $r = 0.91$  [95% CI: 0.88, 0.94],  $p < 0.0001$ ) (Fig. 1).

Correlations between measurements in cryopreserved and fresh samples were also found when muscle types were considered separately, ranging from  $r = 0.89$  [95% CI: 0.76, 0.95] in *gastrocnemius* ( $p < 0.0001$ ),  $r = 0.90$  [95% CI: 0.79–0.96] in *plantaris* ( $p < 0.0001$ ),  $r = 0.92$  [95% CI: 0.83–0.97] in *vastus intermedius* and *rectus femoris* ( $p < 0.0001$ ) to  $r = 0.98$  [95% CI: 0.94, 0.99] in *soleus* ( $p < 0.0001$ ).

When respiration results were analyzed according to each substrate, significant correlations were maintained in presence of saturating amount of ADP, ranging from  $r = 0.79$  [95% CI: 0.60, 0.90] for  $V_{\text{TMPD}}$  ( $p < 0.0001$ ),  $r = 0.80$  [95% CI: 0.62–0.90] for  $V_{\text{succ}}$  ( $p < 0.0001$ ) to  $r = 0.83$  [95% CI: 0.66, 0.91] for  $V_{\text{ADP}}$  ( $p < 0.0001$ ). However,  $V_0$  in cryopreserved muscles did not correlate with  $V_0$  in fresh muscles ( $r = 0.28$  [95% CI: -0.10, 0.59],  $p = 0.14$ ).

#### 3.2. Cryopreservation decreased mitochondrial respiration rates

Oxygen consumption in cryopreserved samples was significantly decreased compared to fresh sample in all muscles, regardless the substrate (Fig. 2). The decrease ranged from  $-0.86 \pm 0.30 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  ( $V_0$  fresh vs  $V_0$  cryopreserved) in the

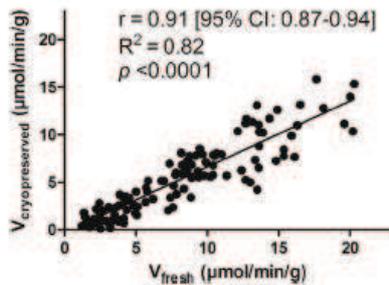


Fig. 1. Oxygen consumptions in cryopreserved and in fresh skeletal muscle samples are correlated. Oxygen consumption with four different substrates in fresh plotted versus paired cryopreserved samples of five different muscles from six Wistar rats (all substrates, all muscles, 120 paired results).

*soleus*,  $p < 0.01$ ), to  $-6.91 \pm 0.34 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  ( $V_{\text{TMPD}}^{\text{fresh}}$  vs  $V_{\text{TMPD}}^{\text{cryopreserved}}$ ) in the *vastus intermedius*,  $p < 0.01$ ). Expressed as percentage of the absolute value in the fresh sample, decrease of oxygen consumption ranged from  $-14.83 \pm 2.36\%$  ( $V_{\text{TMPD}}^{\text{fresh}}$  vs  $V_{\text{TMPD}}^{\text{cryopreserved}}$ ) in the *soleus*,  $p < 0.05$ ) to  $-61.00 \pm 7.78\%$  ( $V_0^{\text{fresh}}$  vs  $V_0^{\text{cryopreserved}}$ ) in the *vastus intermedius*,  $p < 0.05$ ).

An ANOVA analysis demonstrated that the magnitude of the diminution in oxygen consumption after cryopreservation did differ depending of muscle type (Table 1) and was generally higher in *vastus intermedius* and *plantaris*, which were the muscles with the highest oxygen consumption. Some of these differences vanished when the drop of oxygen consumption after cryopreservation was normalized by oxygen consumption of the fresh sample.

When the muscle samples were pooled to analyze the effect of cryopreservation according to the substrates, a drop of oxygen consumption was found whatever the substrate, ranging from  $-1.61 \pm 0.20 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  ( $-47.67\%$ ) for  $V_0^{\text{fresh}}$  versus  $V_0^{\text{cryopreserved}}$  ( $p < 0.001$ ), to  $-3.40 \pm 0.46 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  ( $-23.17\%$ ) for  $V_{\text{TMPD}}^{\text{fresh}}$  versus  $V_{\text{TMPD}}^{\text{cryopreserved}}$  ( $p < 0.001$ ). The drop was significantly lower for  $V_0$  compared to  $V_{\text{ADP}}$  ( $-3.40 \pm 0.40 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ,  $p < 0.01$ ) and  $V_{\text{TMPD}}$  ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3F). However, these differences vanished when the drop of oxygen consumption after cryopreservation was normalized by oxygen consumption of the fresh sample. Taken as a whole, these results suggest that the higher the oxygen consumption capacity of the muscle, the higher the difference between fresh and cryopreserved samples.

Mitochondrial coupling, as inferred from the RCR, increased significantly ( $p < 0.05$ ) in two muscles, the *rectus femoris* ( $+2.75 \pm 1.39 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) and the *vastus intermedius* ( $+1.406 \pm 0.29 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) (Fig. 3).

#### 3.3. Cryopreservation disrupted the outer mitochondrial membrane

After cryopreservation, state 3 respiratory capacities with cytochrome *c* was significantly increased ( $+106 \pm 31.69\%$ ,  $p < 0.05$ ) as compared to corresponding controls. This supports that outer mitochondrial membrane was not entirely preserved in cryopreserved samples (Fig. 3).

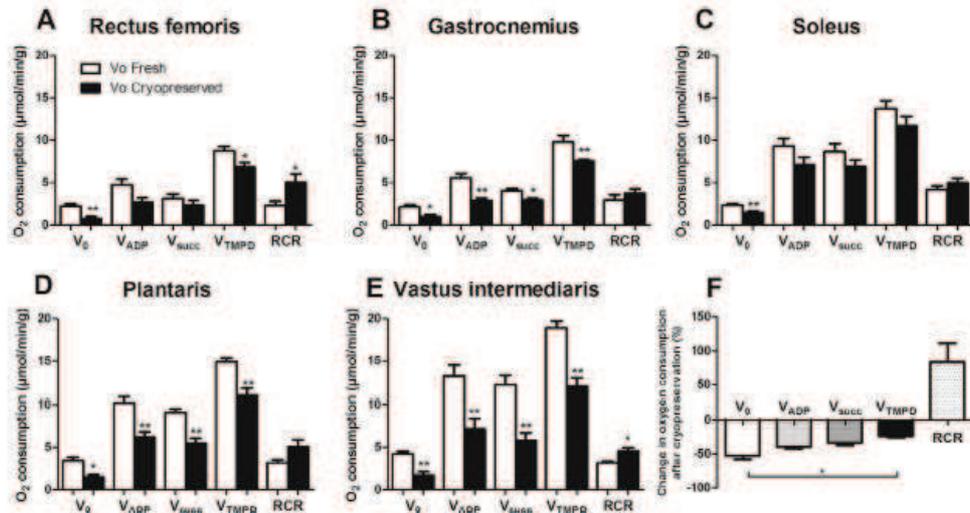
#### 3.4. DMSO exposition decreased $V_0$ and $V_{\text{ADP}}$

We observed a significant reduction in  $V_0$  ( $2.59 \pm 0.15$  vs  $1.78 \pm 0.23$ ,  $p < 0.05$ ) and  $V_{\text{ADP}}$  ( $7.78 \pm 0.35$  vs  $6.19 \pm 0.51$ ,  $p < 0.05$ ) in fresh muscles samples with ice-cold relaxing solution containing 30% DMSO as compared to fresh muscles samples with ice-cold relaxing only (Fig. 4). RCR tended to increase although this was not significant.

#### 3.5. Bland and Altman analysis demonstrated negative bias, growing with magnitude of the measurements and large limits of agreement

To get more insight into the effect of cryopreservation on mitochondrial analysis, we compared the results obtained in cryopreserved and fresh muscle samples using the Bland and Altman method (Fig. 5 and Table 2).

Considering oxygen consumption in all paired results ( $n = 120$ , Fig. 4), the mean of the differences between cryopreserved and fresh samples was  $-2.79 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  [95% CI:  $-3.18$ ,  $+2.39 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ], with wide limits of agreement between the two methods ( $-7.13$ ,  $+1.56 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ). Expressed in relative value, this mean difference between cryopreserved and fresh reached  $-51.45\%$  [95% CI:  $-21.30$ ,  $+4.15\%$ ] of the respiration rate, with ( $-127.78$ ,  $+24.88\%$ ) limits of agreement. The higher the respiration rate, the higher the difference between cryopreserved and fresh respiration values



**Fig. 2.** Cryopreservation decreases oxygen consumption.  $V_0$ ,  $V_{ADP}$ ,  $V_{succ}$ ,  $V_{TMPD}$  and RCR in fresh and cryopreserved rectus femoris ( $n = 6$ ) (A), gastrocnemius ( $n = 6$ ) (B), soleus ( $n = 6$ ) (C), plantaris ( $n = 6$ ) (D) and vastus intermediaris ( $n = 6$ ) (E) samples from Wistar rats. Mean decrease in  $V_0$ ,  $V_{ADP}$ ,  $V_{succ}$  and  $V_{TMPD}$  (difference between results in cryopreserved minus results in fresh samples) when pooling results obtained in rectus femoris, gastrocnemius, soleus, plantaris and vastus intermediaris (30 paired results for each substrate) (F). \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ .

( $r = -0.54$  [95% CI:  $-0.66, -0.40$ ],  $p < 0.0001$ ). In addition, the scatter of the differences increased as the respiration rate increased. Of note, we do not find correlation between storage duration of cryopreserved samples and difference between respiration in fresh and cryopreserved samples.

Analyzing results according to either the substrate or the muscle provided similar results (Table 2). The mean differences between cryopreserved and fresh respiration results ranged from  $-1.55$  [95% CI:  $-1.99, -1.11$ ] (rectus femoris) to  $-5.49$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  [95% CI:  $-6.46, -4.52$ ] (vastus intermediaris) and limits of agreements from  $(-3.76, +0.34)$  (soleus) to  $(-10.23, -0.75$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) (vastus intermediaris). In most series, the differences between fresh and cryopreserved respiration results correlated with the respiration rates.

### 3.6. Cryopreservation prevented the detection of mitochondrial respiration defect induced by lower limb ischemia-reperfusion

To investigate whether cryopreservation might have consequences on the diagnosis of abnormal mitochondrial respiration, we used a rat model of lower limb ischemia characterized by lowered mitochondrial respiration. When studied on fresh samples  $V_{ADP}$  was significantly decreased in ischemic plantaris of the rats compared to control animals ( $9.63 \pm 0.46$  vs  $8.04 \pm 0.24$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 6). This difference vanished when cryopreserved plantaris were studied. Indeed, after cryopreservation,  $V_{ADP}$  of plantaris was  $6.82 \pm 0.84$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  in rats with chronic ischemia of inferior limb and  $6.73 \pm 0.59$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  in controls ( $p = 0.82$ ).

**Table 1**

Cryopreservation decreases oxygen consumption. Mean decrease in  $V_0$ ,  $V_{ADP}$ ,  $V_{succ}$  and  $V_{TMPD}$  after cryopreservation (difference between result in fresh minus result in cryopreserved sample) in rectus femoris ( $n = 6$ ), gastrocnemius ( $n = 6$ ), soleus ( $n = 6$ ), plantaris ( $n = 6$ ) and vastus intermediaris ( $n = 6$ ).

	Rectus femoris	Gastrocnemius	Soleus	Plantaris	Vastus intermediaris	ANOVA <i>p</i>
<b>Decrease in <math>V_0</math></b>						
Absolute value ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ )	$-1.50 \pm 0.50$	$-1.19 \pm 0.24$	$-0.86 \pm 0.30$	$-1.96 \pm 0.57$	$-2.50 \pm 0.31$	<b>&lt;0.05</b>
Relative value (%)	$-57.17 \pm 19.02$	$-57.00 \pm 7.84$	$-33.83 \pm 10.39$	$-52.50 \pm 14.21$	$-61.00 \pm 7.78$	0.31
<b>Decrease in <math>V_{ADP}</math></b>						
Absolute value ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ )	$-2.00 \pm 0.52$	$-2.70 \pm 0.56$	$-2.22 \pm 0.50$	$-3.96 \pm 0.72$	$-6.10 \pm 2.16^{**}$	<b>&lt;0.005</b>
Relative value (%)	$-42.50 \pm 6.98$	$-46.83 \pm 5.93$	$-24.00 \pm 4.67$	$-38.50 \pm 5.88$	$-47.00 \pm 6.16$	0.074
<b>Decrease in <math>V_{succ}</math></b>						
Absolute value ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ )	$-0.79 \pm 0.33$	$-1.10 \pm 0.31$	$-1.78 \pm 0.47$	$-3.59 \pm 0.46$	$-6.44 \pm 0.76$	<b>&lt;0.001</b>
Relative value (%)	$-28.17 \pm 33.78$	$-26.33 \pm 5.92$	$-19.83 \pm 4.36$	$-40.00 \pm 5.18$	$-53.50 \pm 5.49$	<b>&lt;0.05</b>
<b>Decrease in <math>V_{TMPD}</math></b>						
Absolute value ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ )	$-1.91 \pm 0.34$	$-2.27 \pm 0.84$	$-1.96 \pm 0.25$	$-3.94 \pm 1.039$	$-6.91 \pm 0.34$	<b>&lt;0.01</b>
Relative value (%)	$-21.67 \pm 3.40$	$-21.00 \pm 6.16$	$-14.83 \pm 2.36$	$-25.83 \pm 6.71$	$-36.70 \pm 4.19$	<b>&lt;0.05</b>
<b>Change in RCR</b>						
Absolute value ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ )	$+0.77 \pm 0.62$	$+0.87 \pm 0.81$	$+1.86 \pm 0.85$	$+2.75 \pm 1.39$	$+1.41 \pm 0.29$	0.73
Relative value (%)	$+42.50 \pm 29.23$	$+31.83 \pm 26.71$	$+65.50 \pm 29.93$	$+231.7 \pm 118.4$	$+45.00 \pm 9.46$	0.62

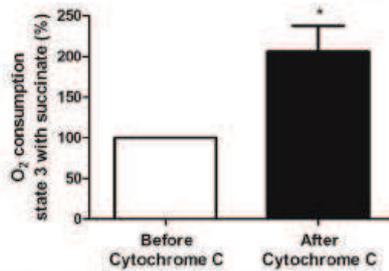


Fig. 3. Cryopreservation does not protect entirely mitochondrial outer membrane. Oxygen consumption in cryopreserved gastrocnemius samples ( $n = 9$ ) during state 3 respiration with succinate before and after adding  $10 \mu\text{M}$  cytochrome  $c$ . \*:  $p < 0.05$ .

#### 4. Discussion

The main result of this study is to demonstrate that, although mitochondrial respiration of fresh samples strongly correlates to that of cryopreserved muscle samples, cryopreservation cannot generally be used instead of fresh samples when analyzing mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and/or IV activities. Indeed, respiration was systematically lower in cryopreserved samples, with fluctuations around the mean difference that exceeded the usually acceptable limits of agreements [19]. Accordingly, the deleterious effects of ischemia-reperfusion on mitochondrial respiration observed on fresh samples vanished when cryopreserved samples were studied.

Previous data concerning reliability of mitochondrial respiration analysis on muscle samples cryopreserved with DMSO are sparse and controversial. Kuznetsov et al. have compared respiration in fresh versus frozen muscles samples with two substrates ( $V_{\text{ADP}}$  and  $V_{\text{succ}}$ ) and using 3 different muscles (human *vastus intermedius*, rat ventricle and rat *soleus*). Larsen et al. have assessed respiration with the same substrates, in two human muscles (*vastus intermedius* and *deltoideus*). Statistical analysis compared the means in fresh and cryopreserved samples from each group supporting a need for further evaluations.

In this study, the use of four mitochondrial substrates and five skeletal muscles characterized by different oxidative capacities allowed a wide assessment of the cryopreservation effects on mitochondrial chain functioning in skeletal muscle. The sample size reached 120 paired results when all data were pooled, providing a good statistical power.

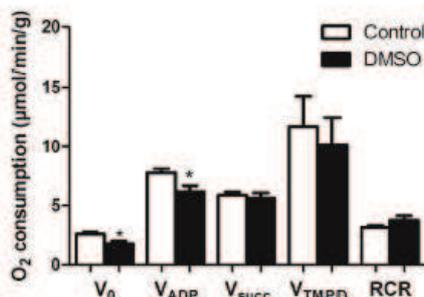


Fig. 4. DMSO exposition decreased  $V_0$  and  $V_{\text{ADP}}$ .  $V_0$ ,  $V_{\text{ADP}}$ ,  $V_{\text{succ}}$ ,  $V_{\text{TMPD}}$  and RCR in fresh gastrocnemius washed with ice-cold relaxing solution alone or additionally containing 30% DMSO ( $n = 9$ ). \*:  $p < 0.05$ .

The linear correlation of 0.91 between the two analysis for all the samples might implies that they are a good surrogate and therefore that they might be useful in certain context but, importantly, respiration was systematically lower in cryopreserved as compared to fresh samples strongly suggesting a deleterious effect of cryopreservation. On the other hand, the RCR increased in *rectus femoris* and *vastus intermedius*. Although the RCR was in the range reported in the literature [20–22] we cannot totally exclude that state 4 rates might have been overestimated since it is strongly influenced by almost every functional aspect of oxidative phosphorylation [23]. However, bioenergetics dysfunction can alter  $V_{\text{ADP}}$  without affecting RCR [24] and the significant increase in RCR observed in two muscles in our study should probably not be viewed as a lack of cryopreservation deleterious effect. Rather a specific effect of DMSO might be involved since RCR tended to increase in fresh muscles exposed to DMSO. Thus, DMSO might decrease oxidative respiration without impairing mitochondrial coupling.

Further, extending previous work, we used the Bland and Altman test, where the differences between the two measurements for each paired samples are plotted against the mean of the two measurements, allowing a simple and pertinent assessment of agreement between two measurement methods: i) The mean difference evaluates the bias between the two measurements. ii) The limits of agreement ( $\pm 1.96\text{SD}$  of the differences) assess the random fluctuations around this mean. If the differences within limits of agreement are not important, the two methods may be used interchangeably. iii) Finally, the bias may be fixed or may show relationship with the measurements. If there is a fixed bias, it can be adjusted for by subtracting the mean difference from the new method. This is not possible when the methods do not agree equally through the range of measurements. Using the protocol of cryopreservation described by Kuznetsov et al., we found good correlation between fresh and cryopreserved muscle samples. However, correlation does not mean agreement and Bland Altman analysis clearly showed that results obtained in cryopreserved samples were lower than in fresh samples with fluctuations around the mean difference that exceeded the usually acceptable limits of agreements [19]. Moreover, the differences between respiration in cryopreserved and fresh samples was not fixed but growth with

increasing respiration rates very close results were observed whatever the muscle type and whatever the substrate used.

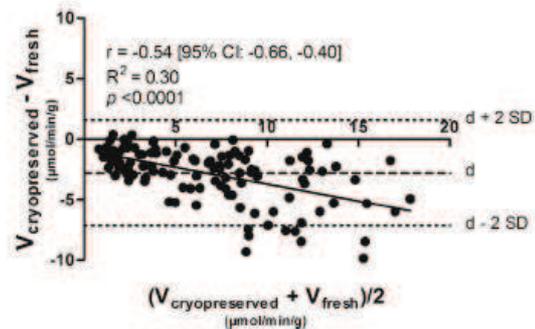


Fig. 5. Cryopreservation introduces negative bias, growing with magnitude of the measurements and large limits of agreement. Graphic presentation of the difference between the two measurements ( $V_{\text{cryopreserved}} - V_{\text{fresh}}$ ) versus the mean of the two measurements ( $(V_{\text{cryopreserved}} + V_{\text{fresh}})/2$ ), according to Bland and Altman method (1986) (all substrates, all muscles, 120 paired results). Horizontal lines indicate the mean of difference or bias ( $d$ ) and limits of agreement ( $d - 2\text{SD}$  and  $d + 2\text{SD}$ ).

**Table 2**

Cryopreservation introduces negative bias, growing with magnitude of the measurements and large limits of agreement regardless muscle type and substrates. Bland and Altman's analysis of agreement between oxygen consumption measured in fresh and cryopreserved samples, according to each substrate and each muscle.

	Difference ( $V_{\text{cryopreserved}} - V_{\text{fresh}}$ ) ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ )	Limit of agreements (bias $\pm$ 1.96SD) ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ )	Correlation (Pearson's coefficient) between difference and average of the respiration measurements ( $(V_{\text{cryopreserved}} + V_{\text{fresh}})/2$ ) ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ )
$V_{\text{O}}$	-1.61 [95% CI: -1.96, -1.25]	(-3.74, +0.53)	-0.36 [95% CI: -0.64, -0.0015], $p < 0.05$
$V_{\text{ADP}}$	-3.40 [95% CI: -4.16, -2.63]	(-7.59, +0.79)	-0.51 [95% CI: -0.73, -0.18], $p < 0.005$
$V_{\text{max}}$	-2.74 [95% CI: -3.60, -1.88]	(-7.44, +1.97)	-0.68 [95% CI: -0.82, -0.38], $p < 0.0001$
$V_{\text{maxO}}$	-3.34 [95% CI: -4.31, -2.49]	(-8.37, +1.57)	-0.51 [95% CI: -0.73, -0.18], $p < 0.05$
Rectus femoris	-1.55 [95% CI: -1.99, -1.11]	(-3.70, +0.60)	-0.26 [95% CI: -0.60, +0.16], $p = 0.21$
Gastrocnemius	-1.82 [95% CI: -2.39, -1.25]	(-4.60, +0.97)	-0.41 [95% CI: -0.70, -0.0028], $p < 0.05$
Soleus	-1.71 [95% CI: -2.13, -1.29]	(-3.76, +0.34)	-0.39 [95% CI: -0.69, +0.0028], $p = 0.057$
Plantaris	-3.36 [95% CI: -4.11, -2.62]	(-7.02, +0.29)	-0.33 [95% CI: -0.65, +0.081], $p = 0.11$
Vastus intermedius	-5.49 [95% CI: -6.46, -4.52]	(-10.23, +0.75)	-0.60 [95% CI: -0.81, -0.27], $p < 0.005$

Investigating an eventual pathophysiological consequence of such result, we observed that cryopreservation prevented the detection of the decrease of  $V_{\text{ADP}}$  in the muscles of rats submitted to ischemia-reperfusion. Taken as a whole, our results prevent the use of cryopreserved in place of fresh samples even if further studies will be useful to discriminate whether this finding is due to the reduction in the magnitude of the measurement, which would require larger samples to attain statistically significant differences, or that cryopreservation may change the natural history of the damage progress induced by ischemia-reperfusion.

How does cryopreservation impact mitochondrial respiration? Several mechanisms deserve to be discussed.

Storage of the samples is not likely to play a role because time between cryopreservation and analyze of the samples was short in this study and we did not find correlation between storage duration and difference of respiration between fresh and cryopreserved samples.

DMSO may have a toxic effect on mitochondrial complexes. To minimize this potential effect, fibers were transferred to the respiration medium immediately on thawing, as it was done in previous studies [14,15]. However, we cannot totally eliminate a deleterious effect of DMSO on our fibers and accordingly, we observed that short duration exposure to DMSO significantly mildly reduced muscle mitochondrial respiration. This is consistent with previous data demonstrating that there is a significant reduction in activity in fresh mitochondria washed with DMSO compared to freshly isolated mitochondria of the brain Ref. [25].

Freezing may also disrupt inner mitochondrial membrane. In Kusnetsov et al, found a trend toward an increase in oxygen consumption after cytochrome c addition in cryopreserved samples [14] while Larsen et al. found this increase to be significant [15]. In our cryopreserved samples, cytochrome c addition enhanced significantly mitochondrial respiration, supporting that the present protocol of cryopreservation does not perfectly preserve outer mitochondrial membrane in muscle samples.

## 5. Conclusion

This study demonstrates that available cryopreservation protocols of skeletal muscle samples do impact mitochondrial respiration analysis likely in relation with DMSO and outer mitochondrial membrane damage. This might have important implications for both physiological research and clinical investigations. Developments of new methods of cryopreservation allowing reliable analyze of mitochondrial respiration on this tissue are still needed.

## Acknowledgments

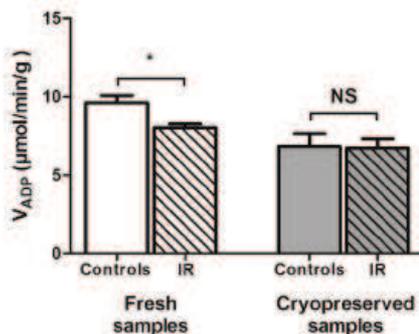
We thank Fabienne Goupilleau, Isabelle Bentz and Anne-Marie Kasproicz for their expert biological and secretarial assistance.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2014.01.014>.

## References

- [1] B. Chance, G.R. Williams, A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation, *Nature* 175 (1955) 1120–1121.
- [2] V.A. Saks, V.I. Veksler, A.V. Kuznetsov, L. Kay, P. Sikk, T. Tiivel, L. Tranqui, J. Olivares, K. Winkler, F. Wiedemann, W.S. Kunz, Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo, *Mol. Cell. Biochem* 184 (1998) 81–100.
- [3] A.V. Kuznetsov, V. Veksler, F.N. Gellerich, V. Saks, R. Margreiter, W.S. Kunz, Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 965–976.
- [4] A.J.M. Janssen, J.A.M. Smeitink, L.P. van den Heuvel, Some practical aspects of providing a diagnostic service for respiratory chain defects, *Ann. Clin. Biochem* 40 (2003) 3–8.
- [5] D. Brealey, M. Brand, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, R. Smolenski, N.A. Davies, C.E. Cooper, M. Singer, Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock, *Lancet* 360 (2002) 219–223.
- [6] A. Meyer, J. Zoll, A.-L. Charles, A. Charloix, F. De Blay, P. Diemunsch, J. Sibilia, F. Piquard, B. Geny, Skeletal muscle mitochondrial dysfunction during chronic obstructive pulmonary disease: central actor and therapeutic target, *Exp. Physiol.* 98 (2013) 1063–1078.
- [7] S. Talha, J. Boultbir, A.-L. Charles, J. Zoll, P. Goette-Di Marco, F. Meziani, F. Piquard, B. Geny, Pretreatment with brain natriuretic peptide reduces



**Fig. 6.** Cryopreservation prevents the detection of mitochondrial respiration defect induced by lower limb ischemia-reperfusion. Comparison of the analysis of  $V_{\text{max}}$  in plantaris of rats with lower limb ischemia-reperfusion (IR) and their controls when performed on fresh or cryopreserved samples ( $n = 6$ ). \*;  $p < 0.05$ .

- skeletal muscle mitochondrial dysfunction and oxidative stress after ischemia-reperfusion, *J. Appl. Physiol.* 114 (2013) 172–179.
- [8] M.M.I. Yassin, D.W. Harkin, A.A.B. Barros D'Sa, M.L. Halliday, B.J. Rowlands, Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction, *World J. Surg.* 26 (2002) 115–121.
- [9] C. Adembri, E. Kastamonli, I. Bertolozzi, S. Vanni, W. Dorigo, M. Coppo, C. Pratesi, A.R. De Gaudio, G.F. Gensini, P.A. Modesti, Pulmonary injury follows systemic inflammatory reaction in infrarenal aortic surgery, *Crit. Care Med.* 32 (2004) 1170–1177.
- [10] C.C. Miller 3rd, M.A. Villa, J. Sutton, D. Lau, K. Keyhani, A.L. Estreza, A. Azzizadeh, S.M. Coogan, H.J. Safi, Serum myoglobin and renal morbidity and mortality following thoracic and thoraco-abdominal aortic repair: does rhabdomyolysis play a role? *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 37 (2009) 388–394.
- [11] Z.A. Ali, C.J. Callaghan, E. Lim, A.A. Ali, S.A.R. Nouraei, A.M. Akthar, J.R. Boyle, K. Varty, R.K. Kharbada, D.P. Dutka, M.E. Gaunt, Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial, *Circulation* 116 (2007) 898–905.
- [12] J. Zoll, H. Sanchez, B. N'Guessan, F. Ribera, E. Lampert, X. Bigard, B. Semurier, D. Fortin, B. Geny, V. Veksler, R. Ventura-Clapier, B. Mettauer, Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle, *J. Physiol. Lond.* 543 (2002) 191–200.
- [13] A.-L. Charles, A. Meyer, S. Dal-Ros, C. Auger, N. Keller, T.G. Ramamoorthy, J. Zoll, D. Metzger, V. Schini-Kerth, B. Geny, Polyphenols prevent ageing-related impairment in skeletal muscle mitochondrial function through decreased reactive oxygen species production, *Exp. Physiol.* 98 (2013) 536–545.
- [14] A.V. Kuznetsov, W.S. Kunz, V. Saks, Y. Ussov, J.-P. Mazat, T. Letellier, F.N. Gellertich, R. Margreiter, Cryopreservation of mitochondria and mitochondrial function in cardiac and skeletal muscle fibers, *Anal. Biochem.* 319 (2003) 296–303.
- [15] S. Larsen, C. Wright-Paradis, E. Gnaiger, J.W. Helge, R. Boushel, Cryopreservation of human skeletal muscle impairs mitochondrial function, *Cryo Lett.* 33 (2012) 170–176.
- [16] A.-L. Charles, A.-S. Guilbert, J. Boutbir, P. Goette-Di Marco, I. Enache, J. Zoll, F. Piquard, B. Geny, Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping, *Br. J. Surg.* 98 (2011) 511–516.
- [17] A. Garnier, J. Zoll, D. Fortin, B. N'Guessan, F. Lefebvre, B. Geny, B. Mettauer, V. Veksler, R. Ventura-Clapier, Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II, *Circ. Heart Fail.* 2 (2009) 342–350.
- [18] J.M. Bland, D.G. Altman, Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, *Lancet* 1 (1986) 307–310.
- [19] A. Charfoux, E. Lonsdorfer-Wolf, R. Richard, E. Lampert, M. Oswald-Mammosser, B. Mettauer, B. Geny, J. Lonsdorfer, A new impedance cardiograph device for the non-invasive evaluation of cardiac output at rest and during exercise: comparison with the "direct" Fick method, *Eur. J. Appl. Physiol.* 82 (2000) 313–320.
- [20] A. Zangarelli, E. Chanseume, B. Morio, C. Brugère, L. Mosoni, P. Rousset, C. Giraudet, V. Patrac, P. Gachon, Y. Boirie, S. Walrand, Synergistic effects of caloric restriction with maintained protein intake on skeletal muscle performance in 21-month-old rats: a mitochondria-mediated pathway, *FASEB J.* 20 (2006) 2439–2450.
- [21] S. Kumaran, K.S. Panneerselvam, S. Shila, K. Sivarajan, C. Panneerselvam, Age-associated deficit of mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle: role of carnitine and lipoic acid, *Mol. Cell. Biochem.* 280 (2005) 83–89.
- [22] M. Guillot, A.-L. Charles, T.N. Chamaraux-Tran, J. Boutbir, A. Meyer, J. Zoll, F. Schneider, B. Geny, Oxidative stress precedes skeletal muscle mitochondrial dysfunction during experimental aortic cross-clamping but is not associated with early lung, heart, brain, liver, or kidney mitochondrial impairment, *J. Vasc. Surg.* (2013), in press, PMID: 24095040.
- [23] M.D. Brand, D.G. Nicholls, Assessing mitochondrial dysfunction in cells, *Biochem. J.* 435 (2011) 297–312.
- [24] D.J. Milner, M. Mavroidis, N. Weisleder, Y. Capetanaki, Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function, *J. Cell Biol.* 150 (2000) 1283–1298.
- [25] V.N. Nukala, I.N. Singh, L.M. Davis, P.G. Sullivan, Cryopreservation of brain mitochondria: a novel methodology for functional studies, *J. Neurosci. Methods* 152 (2006) 48–54.

## Research Article

# Remote Effects of Lower Limb Ischemia-Reperfusion: Impaired Lung, Unchanged Liver, and Stimulated Kidney Oxidative Capacities

Z. Mansour,<sup>1,2</sup> A. L. Charles,<sup>1,3</sup> M. Kindo,<sup>1,2</sup> J. Pottecher,<sup>1</sup> T. N. Chamaraux-Tran,<sup>1</sup>  
A. Lejay,<sup>1</sup> J. Zoll,<sup>1,3</sup> J. P. Mazzucotelli,<sup>1,2</sup> and B. Geny<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *Equipe d'Accueil 3072 "Mitochondries, Stress Oxydant et Protection Musculaire", Fédération de Médecine Translationalnelle, Institut de Physiologie, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France*

<sup>2</sup> *Service de Chirurgie Cardiovasculaire, Pole de Cardiologie, Hopitaux Universitaires, CHRU de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France*

<sup>3</sup> *Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Pole de Pathologie Thoracique, Hopitaux Universitaires, CHRU de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France*

Correspondence should be addressed to B. Geny; [bernard.geny@chru-strasbourg.fr](mailto:bernard.geny@chru-strasbourg.fr)

Received 20 February 2014; Accepted 28 May 2014; Published 4 August 2014

Academic Editor: Koichiro Wada

Copyright © 2014 Z. Mansour et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Remote organ impairments are frequent and increase patient morbidity and mortality after lower limb ischemia-reperfusion (IR). We challenged the hypothesis that lower limb IR might also impair lung, renal, and liver mitochondrial respiration. Two-hour tourniquet-induced ischemia was performed on both hindlimbs, followed by a two-hour reperfusion period in C57BL6 mice. Lungs, liver and kidneys maximal mitochondrial respiration ( $V_{max}$ ), complexes II, III, and IV activity ( $V_{succ}$ ), and complex IV activity ( $V_{TMPD}$ ) were analyzed on isolated mitochondria. Lower limb IR decreased significantly lung  $V_{max}$  ( $29.4 \pm 3.3$  versus  $24 \pm 3.7$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dw}$ , resp.;  $P = 0.042$ ) and tended to reduce  $V_{succ}$  and  $V_{TMPD}$ . IR did not modify liver but increased kidneys mitochondrial respiration ( $79.5 \pm 19.9$  versus  $108.6 \pm 21.4$ ,  $P = 0.035$ , and  $126 \pm 13.4$  versus  $142.4 \pm 10.4$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dry weight}$  for  $V_{max}$  and  $V_{succ}$ , resp.). Kidneys mitochondrial coupling was increased after IR ( $6.5 \pm 1.3$  versus  $8.8 \pm 1.1$ ,  $P = 0.008$ ). There were no histological changes in liver and kidneys. Thus, lung mitochondrial dysfunction appears as a new early marker of hindlimb IR injuries in mice. Further studies will be useful to determine whether enhanced kidneys mitochondrial function allows postponing kidney impairment in lower limb IR setting.

## 1. Introduction

Peripheral arterial disease is a frequent pathology and corresponds to a major public health problem. The symptomatology ranges from intermittent claudication to tissue necrosis needing amputation [1]. A better knowledge on ischemia and reperfusion-specific deleterious effects results in new therapies able to reduce skeletal muscle mitochondrial dysfunctions such as ischemic and/or pharmacologic pre- or postconditioning. Thus, reducing oxidative stress and skeletal muscle mitochondrial dysfunction becomes a major goal in the setting of lower limb ischemia-reperfusion (IR) [2, 3].

Importantly, even subtle muscle damage can lead to significant remote organ injuries, and, thus, improving our knowledge on the mechanisms involved in such lesions appears mandatory. Indeed, lower limb ischemia-reperfusion is well known to result in remote organ injuries, key factors increasing perioperative and long-term morbidities [4–8].

Pulmonary injuries have been described after aortic cross-clamping, in humans and in animals, and systemic inflammation has been incriminated along with leukocytes sequestration in lung parenchyma. Histology also showed partial atelectasis with collapsed and pinched alveoli, thicker and felted alveolar walls. Pulmonary damages have been thus

largely involved in patient mortality and morbidity through decreased  $\text{FIO}_2/\text{PaO}_2$  ratio and impaired oxygenation [6–12].

Liver damage related to lower limb ischemia-reperfusion was less demonstrated but, in view of the detoxification role of the liver, it might concentrate inflammatory cells triggered by lower limb IR and should be affected, as previously reported in the setting of gut IR [13].

Kidneys are particularly concerned in the remote alteration phenomenon after skeletal muscle ischemia-reperfusion injuries. Yassin et al. showed renal dysfunction on a Wistar rat model with bilateral hindlimb IR injuries [8]. Gyurkovics et al. described histological lesions with swollen, vacuolated tubular cells and precipitated hyaline cylinders within the tubular lumen [12]. Clinical studies also showed renal injuries following supra- or infrarenal abdominal aortic surgery [4, 14, 15].

Mitochondria are key factor involved in skeletal muscle alteration during lower limb IR, and, interestingly, skeletal muscle mitochondrial dysfunctions occur early and are reversible after therapy [16–20]. Accordingly, mitochondria are considered as a central player in cell survival and are main source of ATP and reactive oxygen species generation. Mitochondria are also a central pathway of apoptosis [2].

Protecting remote organ mitochondria might therefore be a goal since mitochondrial dysfunction might lead to the multiorgan failure syndrome. However, very few data [21] are available on the effect of lower limb IR on mitochondrial function of main organ involved in the multiorgan failure syndrome such as the lungs, liver, and kidneys.

The aim of this study was therefore to challenge the hypothesis that lower limb IR results in lung, renal, and/or liver mitochondrial oxidative capacities impairment. We therefore investigated specifically their mitochondrial respiratory chain complexes activities and mitochondrial coupling that might be early markers of remote injuries.

## 2. Methods

**2.1. Animals.** Experiments were performed on 8 to 10 weeks male C57BL6 mice (Dépre, France) weighing 20–24 g. Animals were housed in a neutral temperature environment ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) on a 12:12 hour photoperiod and were provided with food and water *ad libitum*. Procedures were conducted in accordance with Helsinki Accords for Humane Treatment of Animals during Experimentation.

**2.2. Anesthesia, Ischemia-Reperfusion Protocol, and Organ Harvesting.** Mice were ventilated with gas mixture of 4% isoflurane (AERRANE, BAXTER S.A.S.) and oxygen in a hermetic anaesthetic induction cage and placed on heating blankets (MINERVE, Esternay, France). Spontaneous ventilation was allowed through an oxygen-delivering mask, with different concentrations of isoflurane depending on the surgical stage (2% during painful stimuli and 1% during latent periods).

Then, a tourniquet was placed around each groin without skin incision. The Sham group (Sham group,  $n = 6$ ) had no ischemia. The ischemia-reperfusion group (IR group,

$n = 6$ ) had a 2-hour ischemia by tightening both tourniquets. To limit potential variability, the same surgeon performed all tourniquet procedures at the same height and strength. Venous and arterial circulation was thus clamped, but no local crush injury was observed.

After a 2-hour reperfusion period, a midline laparotomy was performed, and both kidneys were dissected from the retroperitoneum and harvested by cutting renal vessels and ureters. The liver was then freed, and large specimens were retrieved from both lobes without cutting the hilum to preserve hepatic vessels and continue the thoracic procedure and harvesting.

A midline sternotomy followed. Pleurae were opened, and both lungs were harvested by cutting pulmonary vessels and main bronchi at the level of the hilum. This stage was performed quickly since mice had spontaneous ventilation that was made impossible when pleurae were opened. Mice were then sacrificed by heart harvesting.

**2.3. Extraction of Lung, Liver, and Kidneys Mitochondria.** All operations were carried out on ice. A piece of tissue was placed into buffer A containing 50 mM Tris, 1 mM EGTA, 70 mM Sucrose, and 210 mM Mannitol, pH 7.40 at  $+4^\circ\text{C}$ . Tissue was finely minced with scissors, placed in buffer A, and homogenized with a tissue grinder. Then, the homogenate was centrifuged at  $1300 \times g$  for 3 min,  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant was centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min,  $4^\circ\text{C}$ , to sediment mitochondria. Finally, the mitochondrial pellet was washed twice and then suspended in 50 mM Tris, 70 mM Sucrose, and 210 mM Mannitol, pH 7.4 at  $+4^\circ\text{C}$ . Protein content was routinely quantified with a Bradford assay using bovine serum albumin as a standard.

**2.4. Study of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes Activities and Mitochondrial Coupling.** Oxygen consumption was measured polarographically by using a Clark-type electrode (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Scotland).

When maximal fibre respiration ( $V_{\text{max}}$ ) was recorded, electron flow went through complexes I, III, and IV (Figure 1), because of the presence of glutamate (5 mM) and malate (2 mM). Complex I was blocked with amyltal (0.02 mM), and complex II was stimulated with succinate (25 mM). Mitochondrial respiration in these conditions allowed determining complexes II, III, and IV activities ( $V_{\text{succ}}$ ). After that, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD, 0.5 mM) and Ascorbate (0.5 mM) were added as an artificial electron donor to complex IV. Complex IV activity was then determined as an isolated step of the respiratory chain ( $V_{\text{TMPD}}$ ).

The degree of coupling between oxidation and phosphorylation was inferred from the acceptor control ratio (ACR:  $V_{\text{max}}/V_0$ ).

**2.5. Standard Liver and Kidneys Histology.** Liver and kidneys tissue sections were stained with haematoxylin-eosin, as previously described [13].

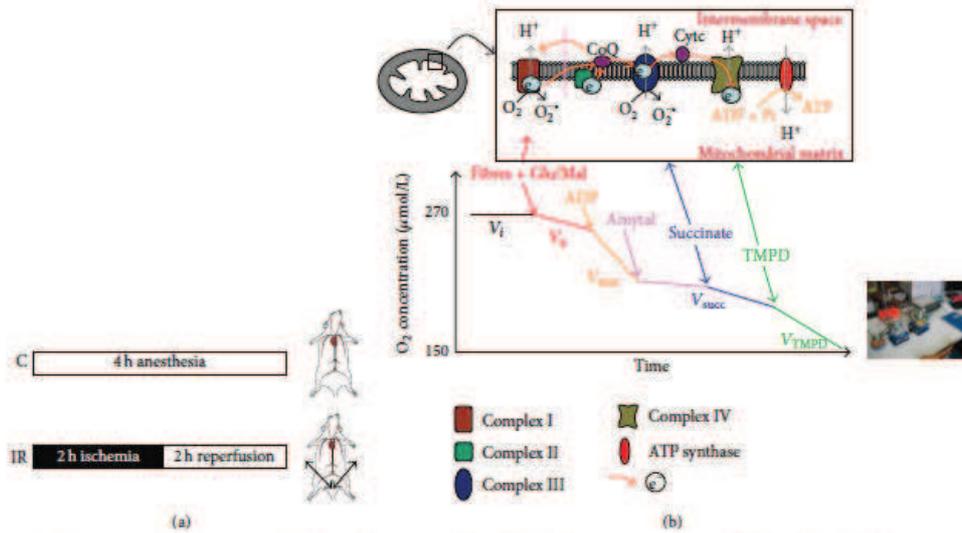


FIGURE 1: (a) Experimental design. C: control; IR: ischemia-reperfusion. (b) Schematic representation of the mitochondrial respiratory chain with specific substrates and inhibitors. C<sub>I</sub>: complex I (NADH-CoQ reductase), C<sub>II</sub>: complex II (succinate-CoQ reductase), C<sub>III</sub>: complex III (CoQH<sub>2</sub>-c reductase), C<sub>IV</sub>: complex IV (cytochrome c oxidase, COX), and TMPD: N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride. Schematic oxygraph trace showing oxygen consumption by the permeabilized skeletal myofibers, using indicated substrates and inhibitors: V<sub>i</sub>, before ADP; V<sub>max</sub>, complexes I, III, and IV activities, using glutamate and malate; V<sub>succ</sub>, complexes II, III, and IV activities, using succinate; V<sub>TMPD/suc</sub>, complex IV activity using TMPD/Ascorbate.

2.6. *Statistics.* SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analyses. Graphics were generated by GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Means were compared between groups using a *t*-test. Results are shown as mean ± standard error (mean ± SEM in graphics). Results with a *P* value less than 0.05 were considered statistically significant.

**3. Results**

Measuring oxygen consumption allowed determining the functional oxidative capacity of each organ mitochondrial function and particularly the relative contribution of the respiratory chain complexes I, II, III, and IV to the global mitochondrial respiratory rate.

**3.1. Effects of Lower Limb Ischemia-Reperfusion on Lung, Liver, and Kidney Mitochondrial Respiratory Chain Complexes Activities**

**3.1.1. Lower Limb Ischemia-Reperfusion Impaired Lung Mitochondrial Maximal Oxidative Capacity.** IR decreased lung maximal oxidative capacity (Figure 2). Thus, V<sub>max</sub> decreased from 29.4 ± 3.3 to 24.0 ± 3.7 μmol O<sub>2</sub>/min/g dry weight (-18.4%, *P* = 0.042; Figure 1). V<sub>succ</sub> decrease was not statistically significant after IR (51.8 ± 8.9 versus 45.4 ± 7.5 μmol O<sub>2</sub>/min/g dry weight; -12.4%, *P* = 0.254), and

V<sub>TMPD</sub> was nearly identical in both groups (98.6 ± 8.3 versus 93.6 ± 15.4 μmol O<sub>2</sub>/min/g dry weight; -5.1%, *P* = 0.540).

Thus, as inferred from the data obtained with each specific substrate we observed that complex I of the lung mitochondrial respiratory chain was impaired by lower limb IR.

**3.1.2. Lower Limb Ischemia-Reperfusion Did Not Alter Liver Mitochondrial Function.** Indeed, lower limb IR caused a slight, not statistically significant, increase in liver mitochondrial respiratory values (Figure 3). V<sub>max</sub> increased from 77.4 ± 7.7 to 84.8 ± 12.0 μmol O<sub>2</sub>/min/g dry weight (+9.6%, *P* = 0.234; Figure 2). V<sub>succ</sub> increased from 87.7 ± 9.4 to 95.1 ± 16.7 μmol O<sub>2</sub>/min/g dry weight (+8.4%, *P* = 0.367), and V<sub>TMPD</sub> increased from 132.8 ± 13.9 to 143.7 ± 25.3 μmol O<sub>2</sub>/min/g dry weight (+8.2%, *P* = 0.373).

Thus, lower limb IR failed to alter liver mitochondrial function, and all complexes of the mitochondrial respiratory chain (complexes I, II, III, and IV) showed a similar 9% trend to increase their activities.

**3.1.3. Lower Limb Ischemia-Reperfusion Enhanced Renal Mitochondrial Function.** Both renal V<sub>max</sub> and V<sub>succ</sub> were significantly increased after IR (Figure 4). V<sub>max</sub> increased from 79.5 ± 19.9 to 108.6 ± 21.4 μmol O<sub>2</sub>/min/g dry weight (+36.6%, *P* = 0.035; Figure 3). V<sub>succ</sub> increased from 126.0 ± 13.4 to 142.4 ± 10.4 μmol O<sub>2</sub>/min/g dry weight (+13.0%, *P* =

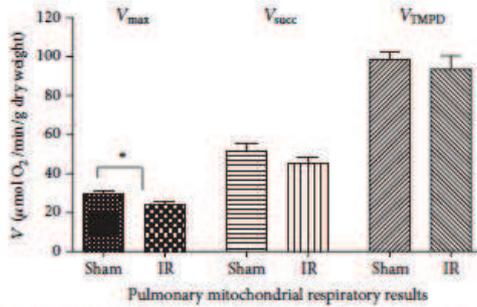


FIGURE 2: Effects of lower limb ischemia/reperfusion on lung mitochondrial respiratory chain complexes activities. (A)  $V_{max}$ , complexes I, III, and IV activities, using glutamate and malate; (B)  $V_{succ}$ , complexes II, III, and IV activities, using succinate; (C)  $V_{TMPD/asc}$ , complex IV activity using TMPD/Ascorbate, as mitochondrial substrates. Data are presented in Sham and after ischemia-reperfusion (IR). Results are expressed as means  $\pm$  SEM; \* $P < 0.05$ .

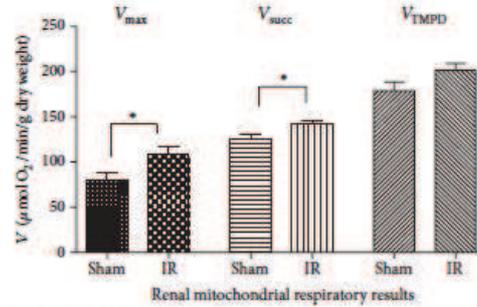


FIGURE 4: Effects of lower limb ischemia/reperfusion on kidney mitochondrial respiratory chain complexes activities. (A)  $V_{max}$ , complexes I, III, and IV activities, using glutamate and malate. (B)  $V_{succ}$ , complexes II, III, and IV activities, using succinate. (C)  $V_{TMPD/asc}$ , complex IV activity using TMPD/Ascorbate, as mitochondrial substrates. Data are presented in Sham and after ischemia-reperfusion (IR). Results are expressed as means  $\pm$  SEM; \* $P < 0.05$ .

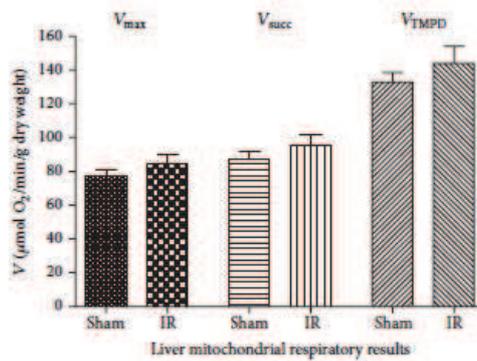


FIGURE 3: Effects of lower limb ischemia/reperfusion on liver mitochondrial respiratory chain complexes activities. (A)  $V_{max}$ , complexes I, III, and IV activities, using glutamate and malate. (B)  $V_{succ}$ , complexes II, III, and IV activities, using succinate. (C)  $V_{TMPD/asc}$ , complex IV activity using TMPD/Ascorbate, as mitochondrial substrates. Data are presented in Sham and after ischemia-reperfusion (IR). Results are expressed as means  $\pm$  SEM.

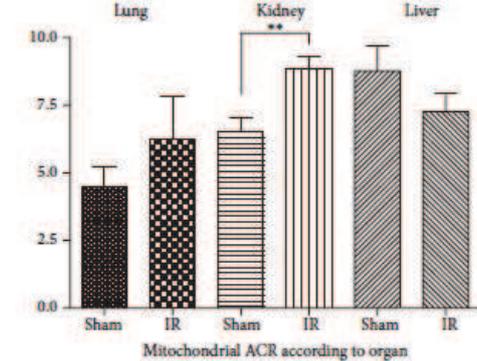


FIGURE 5: Effects of lower limb ischemia/reperfusion on lung, liver, and kidney mitochondrial coupling. ACR: acceptor complex ratio ( $V_{max}/V_0$ ). Data are presented in Sham and after ischemia-reperfusion (IR). Results are expressed as means  $\pm$  SEM; \* $P < 0.05$ .

$P = 0.346$ ) and the liver ( $8.8 \pm 2.3$  versus  $7.3 \pm 1.7$ ,  $P = 0.229$ ), in Sham and IR, respectively (Figure 5).

0.039).  $V_{TMPD}$  tended to increase after IR, but this failed to reach statistical significance ( $178.9 \pm 22.8$  versus  $201.3 \pm 19.1$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g dry weight}$ ;  $+12.5\%$ ,  $P = 0.094$ ).

Thus, complexes I, II, and III activities of the mitochondrial renal respiratory chain were enhanced after IR.

**3.2. Effects of Lower Limb Ischemia-Reperfusion on Lung, Liver, and Kidney Mitochondrial Coupling.** Mitochondrial coupling was enhanced in kidney after lower limb ischemia-reperfusion ( $6.5 \pm 1.3$  versus  $8.8 \pm 1.1$ ;  $P = 0.008$  in Sham and IR mice, resp.). No significant differences were observed concerning, respectively, the lung ( $4.5 \pm 1.8$  versus  $6.2 \pm 3.6$ ,

**3.3. Effects of Lower Limb Ischemia-Reperfusion on Liver and Kidney Structure.** Liver and kidney tissue sections, stained with haematoxylin-eosin, demonstrated normal architecture and thus no change was observed after IR (data not shown).

#### 4. Discussion

The main results of this study are to demonstrate for the first time that tourniquet-induced bilateral hindlimb ischemia-reperfusion (1) impairs lung maximal oxidative capacity, (2) does not modify liver mitochondrial function, and (3) unexpectedly stimulates kidney mitochondrial respiratory

chain complexes activities and coupling in experimental mice.

Lower limb ischemia-reperfusion procedures are routinely performed throughout the world using either artery clamping or tourniquet. Particularly, tourniquet is widely used during orthopaedic surgeries in order to reduce bleeding in the operating zone. These procedures are associated not only with local skeletal muscle mitochondrial dysfunctions but also with remote lesions, generally assessed histologically or at a global, functional level. Since remote lesions largely participate in patient's morbidity and mortality, a better knowledge of pathophysiological mechanisms involved might be useful to open new therapeutic perspectives. In this view, investigation on remote organ mitochondrial functions might be particularly interesting since mitochondrial dysfunction occurs early in skeletal muscles submitted to IR and is likely to be avoided using adapted strategies of ischemic or pharmacologic conditioning [22–24].

Although we showed no lung mitochondrial alteration after lower limb IR secondary to aortic cross-clamping in rats [21], the present study demonstrates the implication of mitochondria in remote pulmonary lesions after tourniquet-induced bilateral lower limb ischemia-reperfusion in mice. Accordingly, pulmonary injuries occur after major vascular surgeries and are largely involved in patient's mortality

and morbidity [6–12]. Lungs are privileged sites for remote lesions after skeletal muscle ischemia-reperfusion, mostly by attracting and sequestering leukocytes [9, 11]. Rajmakers et al. showed enhanced protein leak index in lung parenchyma after aortic surgery [25], and Adembri et al. found increased need in oxygen delivery to maintain normal systemic oxygenation, an indirect proof of alveolar alteration [6]. Interestingly, an experimental model of lung transplantation characterized by pulmonary ischemia-reperfusion also resulted in mitochondrial dysfunction likely leading to energy loss, oxidative stress, apoptosis, and ultimately to organ failure [26]. Our data are in line with these results, although mitochondria were not deprived of oxygen or nutrients.

Taken together, these data support that circulating factors might be responsible for the reduced mitochondrial respiratory chain complexes observed after lower limb IR. On the other hand, incomplete hypoxia during aortic cross-clamping might be associated with a reduction of the deleterious factors released, as compared to tourniquet-induced complete bilateral hindlimb ischemia [21]. Alternatively, mice might be more prone to IR damage than rats [27], possibly suggesting species differences and supporting specific studies in humans.

The circulating factors involved in remote organ damage are not totally known, but reactive oxygen species, cytokines, and complements factors associated with increased circulating leukocytes are likely to play a key role. Accordingly, studies reducing these factors allow organ protection, including lung protection [28–30]. Stimulation of the protective pathways such as RISK, SAFE, and heat shock protein might also be useful [2, 28, 30].

Liver mitochondrial function was not impaired in our study. This is consistent with the fact that humans liver dysfunction is observed mainly when lower limb IR is complicated by a shock, linked to multiorgan failure [13],

and supports a greater resistance of the liver. Accordingly, no histological change was observed in the liver in this study, and increased hepatic enzyme after experimental lower limb IR has been attributed to muscle rather than to liver dysfunction [21].

Concerning the kidneys, we expected to observe impairments in mitochondrial respiration. Indeed, many experimental and clinical reports demonstrated that kidneys are key targets in the setting of IR. Thus, Miller et al. demonstrated a "relationship between intraoperative leg ischemia and postoperative renal failure, providing epidemiological evidence that the ischemic leg may be an important contributor to rhabdomyolysis-like renal morbidity after thoracoabdominal aortic surgery" [15]. The importance of peripheral muscle ischemia-reperfusion and rhabdomyolysis as a significant factor in the renal alterations was also stressed in other studies [4, 31]. Tallgren et al. noticed increased preoperative albuminuria and postoperative acute renal dysfunction in 22% of patients with a 4% incidence of postoperative renal failure [14]. They incriminated changes in renal perfusion (hypotension, low cardiac output), nephrotoxic agents, inflammatory and neuroendocrine stress, and rhabdomyolysis. Interestingly, Ali et al. demonstrated that renal impairment well responded to therapeutic approach such as ischemic preconditioning [5].

The kidney functional enhancement observed in this study might correspond to the fact that kidneys had to filter circulating toxic whose numbers highly increase during lower limb IR. Therefore, their energetic capacities needed to be improved. A secondary damage might then occur later, when kidneys mitochondrial defences are overloaded by a higher amount of oxidative stress and inflammatory factors. Accordingly, we did not observe histological change in the kidney early after reperfusion, but other authors demonstrated tubular cell necrosis after 24 h of reperfusion following a 2-hour femoral artery occlusion [32].

*Limitations of the Study.* There is a possibility that damaged mitochondria drop out from the supernatant during the isolation procedure but it is unlikely a major event since studies demonstrated decrease in oxidative capacities after centrifugation, supporting the presence of impaired mitochondria [13, 33].

A temporal response to ischemia looking at different time point of reperfusion might be very interesting. This might help discover new pattern of mitochondrial activities in different organs, and, particularly, this might allow determining when and why lung and kidneys functions are impaired after lower limb IR. Further, this will pave the way for new therapeutic approaches. In this view, circulating leukocytes and platelets or released molecules might be analysed by performing cellular depletion or serum transfusion experiments and proteomic assessment of the plasma.

## 5. Conclusions

Tourniquet-induced bilateral hindlimb ischemia-reperfusion leads to differential remote organ mitochondrial effects. Liver appeared to be well preserved but lungs were early damaged.

Better knowing the pathophysiology of lung injury might help to focus therapeutic approach on lung mitochondrial functions, since they were beneficial for skeletal muscle in lower limb IR settings. Additionally, further kinetic studies will be useful to confirm whether and when kidneys mitochondrial dysfunctions occur and how to reduce these remote organ mitochondrial dysfunctions.

### Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

### References

- [1] L. Norgren, W. R. Hiatt, K. Bell et al., "Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II)," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 33, no. 1, supplement, pp. S1-S75, 2007.
- [2] A. Lejay, A. Meyer, A. I. Schlagowski et al., "Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 50, pp. 101-105, 2014.
- [3] L. W. Kraiss, M. S. Conte, R. L. Geary, M. Kibbe, and C. K. Ozaki, "Setting high-impact clinical research priorities for the Society for Vascular Surgery," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 57, no. 2, pp. 493-500, 2013.
- [4] C. C. Miller III, M. A. Villa, J. Sutton et al., "Serum myoglobin and renal morbidity and mortality following thoracic and thoraco-abdominal aortic repair: does rhabdomyolysis play a role?" *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 37, no. 4, pp. 388-394, 2009.
- [5] Z. A. Ali, C. J. Callaghan, E. Lim et al., "Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial," *Circulation*, vol. 116, no. 11, pp. 1198-1205, 2007.
- [6] C. Adembi, E. Kastamoniti, I. Bertolozzi et al., "Pulmonary injury follows systemic inflammatory reaction in infrarenal aortic surgery," *Critical Care Medicine*, vol. 32, no. 5, pp. 1170-1177, 2004.
- [7] F. G. R. Fowkes, C. L. C. Anandan, A. J. Lee et al., "Reduced lung function in patients with abdominal aortic aneurysm is associated with activation of inflammation and hemostasis, not smoking or cardiovascular disease," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 43, no. 3, pp. 474-480, 2006.
- [8] M. M. I. Yassin, D. W. Harkin, A. A. B. Barros D'Sa, M. I. Halliday, and B. J. Rowlands, "Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction," *World Journal of Surgery*, vol. 26, no. 1, pp. 115-121, 2002.
- [9] D. Gadaleta, G. A. Fantini, M. F. Silane, and J. M. Davis, "Leukotriene generation and pulmonary dysfunction following aortic cross clamp in humans," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 723, pp. 470-472, 1994.
- [10] G. A. Fantini and M. S. Conte, "Pulmonary failure following lower torso ischemia: clinical evidence for a remote effect of reperfusion injury," *The American Surgeon*, vol. 61, no. 4, pp. 316-319, 1995.
- [11] J. M. Klausner, H. Anner, I. S. Paterson et al., "Lower torso ischemia-induced lung injury is leukocyte dependent," *Annals of Surgery*, vol. 208, no. 6, pp. 761-767, 1988.
- [12] E. Gyurkovics, P. Aranyi, R. Stangl et al., "Postconditioning of the lower limb-protection against the reperfusion syndrome," *Journal of Surgical Research*, vol. 169, no. 1, pp. 139-147, 2011.
- [13] O. Collange, A. L. Charles, J. Bouitbir et al., "Methylene blue protects liver oxidative capacity after gut ischaemia-reperfusion in the rat," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 45, no. 2, pp. 168-175, 2013.
- [14] M. Tallgren, T. Niemi, R. Pöyhkä et al., "Acute renal injury and dysfunction following elective abdominal aortic surgery," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 33, no. 5, pp. 550-555, 2007.
- [15] C. C. Miller III, M. A. Villa, P. Achouh et al., "Intraoperative skeletal muscle ischemia contributes to risk of renal dysfunction following thoracoabdominal aortic repair," *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, vol. 33, no. 4, pp. 691-694, 2008.
- [16] F. Thaveau, J. Zoll, O. Rouyer et al., "Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 46, no. 3, pp. 541-547, 2007.
- [17] A.-. Charles, A.-. Guilbert, J. Bouitbir et al., "Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping," *British Journal of Surgery*, vol. 98, no. 4, pp. 511-516, 2011.
- [18] Z. Mansour, J. Bouitbir, A. L. Charles et al., "Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 55, no. 2, pp. 497-e1, 2012.
- [19] I. I. Pipinos, A. R. Judge, Z. Zhu et al., "Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 41, no. 2, pp. 262-269, 2006.
- [20] S. E. McAllister, H. Ashrafpour, N. Cahoon et al., "Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism," *The American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 295, no. 2, pp. R681-R689, 2008.
- [21] M. Guillot M, A. L. Charles, T. N. Chamaroux-Tran et al., "Oxidative stress precedes skeletal muscle mitochondrial dysfunction during experimental aortic cross-clamping but is not associated with early lung, heart, brain, liver, or kidney mitochondrial impairment," *Journal of Vascular Surgery*, 2013.
- [22] T. P. Tran, H. Tu, I. I. Pipinos, R. L. Muelleman, H. Albadawi, and Y. Li, "Tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscles: Involvement of superoxide," *European Journal of Pharmacology*, vol. 650, no. 1, pp. 328-334, 2011.
- [23] S. Talha, J. Bouitbir, A. Charles et al., "Pretreatment with brain natriuretic peptide reduces skeletal muscle mitochondrial dysfunction and oxidative stress after ischemia-reperfusion," *Journal of Applied Physiology*, vol. 114, no. 2, pp. 172-179, 2013.
- [24] J. Pottecher, M. Guillot, E. Belaidi et al., "Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 57, no. 4, pp. 1100-1108, 2013.
- [25] P. G. H. M. Raijmakers, A. B. J. Groeneweld, J. A. Rauwerda, G. J. J. Teule, and C. E. Hack, "Acute lung injury after aortic surgery: the relation between lung and leg microvascular permeability to <sup>111</sup>Indium-labelled transferrin and circulating mediators," *Thorax*, vol. 52, no. 10, pp. 866-871, 1997.

- [26] S. Sommer, S. Sommer, B. Sinha et al., "Ischemia-reperfusion injury-induced pulmonary mitochondrial damage," *Journal of Heart and Lung Transplantation*, vol. 30, no. 7, pp. 811–818, 2011.
- [27] Z. Mansour, A. L. Charles, J. Boutbir et al., "Remote and local ischemic preconditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia-reperfusion," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 56, no. 3, pp. 774.e1–782.e1, 2012.
- [28] D. Garbaisz, Z. Turoczi, A. Fulop et al., "Therapeutic option for managing lung injury induced by infrarenal aortic cross-clamping," *Journal of Surgical Research*, vol. 185, no. 1, pp. 469–476, 2013.
- [29] Ç. Olguner, U. Koca, A. Kar et al., "Ischemic preconditioning attenuates the lipid peroxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion," *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, vol. 50, no. 2, pp. 150–155, 2006.
- [30] H. S. Gedik, K. Korkmaz, H. Erdem, E. Karakilic, G. Lafci, and H. Ankarali, "Protective effect of heparin in the end organ ischemia/reperfusion injury of the lungs and heart," *Journal of Cardiothoracic Surgery*, vol. 7, no. 1, article 123, 2012.
- [31] S. G. Holt and K. P. Moore, "Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis," *Intensive Care Medicine*, vol. 27, no. 5, pp. 803–811, 2001.
- [32] M. A. Takhtfooladi, A. Jahanshahi, G. Jahanshahi, A. Sotoudeh, H. A. Takhtfooladi, and M. Khansari, "Protective effect of N-acetylcysteine on kidney as a remote organ after skeletal muscle ischemia-reperfusion," *Acta Cirurgica Brasileira*, vol. 27, no. 9, pp. 611–615, 2012.
- [33] Y. Barafli, A. L. Charles, V. Wolff et al., "Age modulates Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles liver toxicity. Dose-dependent decrease in mitochondrial respiratory chain complex activities and coupling in middle-aged as compared to young rats," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 474081, 10 pages, 2014.

## RESUME

L'ischémie critique chronique définit un stade avancé d'insuffisance artérielle chronique. Le diagnostic d'ischémie critique chronique nécessite trois éléments : des signes cliniques (douleurs de décubitus ou troubles trophiques), des mesures de perfusion artérielle témoignant de l'ischémie, ainsi qu'une durée des symptômes supérieure à 15 jours. Nous avons mis au point un modèle d'ischémie critique chronique pertinent chez la souris, en réalisant une ligature fémorale droite associée à la ligature des trois premières collatérales artérielles, suivie d'une ligature iliaque droite 4 jours plus tard.

Nous avons ensuite étudié à partir de ce modèle l'atteinte mitochondriale liée à l'ischémie critique chronique, notamment l'altération de la fonction respiratoire mitochondriale, la diminution de la capacité de rétention calcique, et la production de radicaux libres. Nous avons mis en évidence par analyse histologique l'aspect myopathique du muscle squelettique en ischémie critique chronique.

Enfin, nous avons testé différents protocoles de conditionnement pharmacologique, de façon à mettre en œuvre des voies de protection spécifiques du muscle squelettique. Nous avons donc mis en évidence un effet protecteur de la N acétyl cystéine, des statines et de la L arginine, si ces molécules sont instaurées après l'installation de l'ischémie critique chronique. Le système antioxydant et les voies de protection RISK et SAFE seraient potentiellement impliquées dans cet effet protecteur.

## ABSTRACT

Critical limb ischemia defines an advanced stage of peripheral arterial disease and peripheral arterial insufficiency. The diagnosis of critical limb ischemia requires three elements : clinical signs (rest pain or trophic disorders), arterial perfusion measures demonstrating the level of ischemia, as well as a duration of symptoms for more than 15 days. We developed a critical limb ischemia model in mice, nearly mimicking human pathology, by right femoral artery ligation associated to the ligation of the first three collaterals, followed by right artery ligation 4 days later.

We then studied from this model the mitochondrial impairment associated with critical limb ischemia, including impaired mitochondrial respiratory function, reduced calcium retention capacity, and increased production of free radicals. We also demonstrated histologically the myopathy of skeletal muscle in critical limb ischemia.

Once these changes highlighted, we tested different pharmacological conditioning, in order to identify protective molecules in critical limb ischemia. We thus demonstrated a protective effect of N acetyl cysteine, statins and L-arginine, if administered after the onset of critical limb ischemia. The antioxidant system and the protection pathways RISK and SAFE may be involved in this protective effect.