



HAL
open science

Mécanismes cellulaires précoces impliqués dans la dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation mécanique

Haikel Dridi

► **To cite this version:**

Haikel Dridi. Mécanismes cellulaires précoces impliqués dans la dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation mécanique. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONT4005 . tel-01585539

HAL Id: tel-01585539

<https://theses.hal.science/tel-01585539>

Submitted on 11 Sep 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par
Université de Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences du
Mouvement Humain
Et de l'unité de recherche INSERM U1046-UMR 9214
Physiologie et Médecine Expérimentale du Cœur et du
Muscle

Spécialité : **Physiologie**

Présentée par **Haikel Dridi**

**Mécanismes cellulaires précoces
impliqués dans la dysfonction
diaphragmatique induite par la ventilation
mécanique**

Soutenue le 01 Septembre 2016 devant le jury composé de

Jacques Mercier, PU-PH, Université de Montpellier
Bruno Allard, PU, Université Lyon 1
Catherine Coirault, CR1 INSERM, Institute de
Myologie Paris
Andrew Marks, DR, Université de Columbia
Stefan Matecki, PU-PH, Université de Montpellier
Alain Lacampagne, DR1 CNRS, Université de
Montpellier

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Co-directeur
Co-directeur



Remerciement

Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
Du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers
Par qui nos âmes sont fleuries.

Marcel Proust

Le temps met tout
En lumière.

Thalès

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il ! Alors j'y cède en disant en grand Merci aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

J'adresse de sincères remerciements aux membres du Jury qui ont accepté de juger ce travail :

-Merci au P^r Jacques Mercier d'avoir accepté de présider mon jury.

-Merci au D^r Catherine Coirault et P^r Bruno Allard d'être les rapporteurs de ma thèse.

-Merci au P^r Andrew Marks de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineur.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Stefan Matecki et Alain Lacampagne qui furent pour moi deux directeurs de thèse attentifs et disponibles malgré leurs nombreuses charges. Leurs compétences, leur rigueur scientifique et leur clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été de vrais « parents » de thèse et resteront des moteurs de mon travail de chercheur.

Merci Sylvain de m'avoir accueilli dans ton unité et de m'avoir donné l'occasion de réaliser cette thèse. Je tiens à souligner ton excellente capacité à imiter l'accent du sud.

Je remercie toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées dans l'unité 1046. Merci pour votre support et vos encouragements. Je pense particulièrement aux collègues du bureau, Azzouz, Bruno et André. Merci pour la bonne humeur, les discussions animées et le café du matin.

Merci Patrice pour ton aide, ta disponibilité et ta bonne humeur qui n'ont jamais diminué durant ces 3 dernières années.

Merci Jean-Marc pour ta bonne humeur, pour les nombreux cafés que tu m'as offert et pour les bonnes discussions du midi.

Merci Nadège et Annick de m'avoir aidé surtout pour toutes les formalités administratives souvent très compliquées.

Merci Tadjou de m'avoir aidé pour résoudre les problèmes informatiques, maintenant j'ai un ordinateur qui tourne bien et j'en suis très content.

Merci Olivier, pour toutes les discussions qui débute sur le bon pourcentage du gel et se termine sur l'accélération d'une goutte d'eau au Niagara. Merci pour tes conseils précieux. J'ai finalement appris que je suis l'avenir.

Merci Jean-Yves d'avoir participé de différentes manières au bon déroulement de cette thèse et merci surtout pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

Merci Boris d'avoir participé à mes présentations depuis mon master malgré ta charge de travail. Tes remarques et conseils m'ont beaucoup appris.

Merci Nathalie pour ton aide et ta participation considérable à mes travaux de thèse. Merci pour ta disponibilité et tes conseils et aussi de m'avoir initié à l'électrophysiologie.

Merci Jérémy et Jérôme pour les discussions animées et tous vos conseils qui m'ont beaucoup aiguillé tout au long de cette belle expérience.

Merci Frank et Charlotte pour tous vos conseils et votre bonne humeur.

Merci Gérald et Gilles pour beaucoup de choses ; pour l'ouverture d'esprit, le pot de vendredi et convivialité du repas de midi.

Merci Stéphane, Pascal et Cécile pour les bons conseils et la bonne humeur.

Merci Catherine, Tamim et Pascal pour les conseils, les discussions intéressantes et votre bonne humeur.

Merci **Monsieur Chakouri**, pour beaucoup de choses, merci de « multiplier les biens et partager les maux ». Pour le café de dimanche à Palavas, pour la clope de vendredi, pour les discussions animées et pleines d'autres et c'est peut-être le bon moment pour dévoiler la vérité : On a jamais été en couple !

Merci **Docteur Moreau** d'avoir participé à une partie non négligeable de ces travaux, pour ta bonne humeur et pour toutes les discussions qu'on a pu avoir. J'ai vraiment appris beaucoup de choses et tu m'as permis de découvrir le monde des bisounours (alias les pédiatres).

Merci Nour, Marion, Cacylde, Mohamad et Mathilde d'avoir partagé avec moi le stress de la thèse, sans vous je me serais senti seul quand je travaillais le weekend.

Merci Albano pour tes conseils et pour la bonne humeur. Merci de nous avoir montré les meilleurs moyens de changer d'air et de nous faire profiter de ton bel écran pour apprécier la beauté de la nature. J'ai appris aussi qu'il faut toujours faire des burpees pour garder la forme.

Merci Amanda pour ta bonne humeur et ta disponibilité pour aider les autres. Merci de m'avoir aidé à surmonter mes difficultés avec l'anglais.

Merci Fabienne d'avoir su gérer toutes mes commandes et mes missions. Merci pour tes compléments récurrents sur mes chemises, sache que ça m'a toujours fait plaisir de les entendre. Merci Monia, Maylan et Laura pour la bonne humeur et les ondes positives que vous envoyez autour de vous.

Merci aux collègues du bureau et de travail Christophe, Rim, Hélène et Myriam.

Merci à tous mes amis en dehors de l'U1046 qui m'ont beaucoup soutenue durant ces dernières années :

Merci Badr pour ton soutien régulier et merci de m'avoir aidé à décrocher du boulot dans les périodes les plus stressantes.

Merci Chaima d'avoir demandé de mes nouvelles régulièrement et de m'avoir remonté le moral pendant les périodes difficiles. J'en suis vraiment reconnaissant et je te souhaite la réussite dans ta thèse que tu soutiendras bientôt.

Merci Justine d'avoir été à mes côtés durant cette dernière période assez difficile pour moi. Ton charmant sourire m'a donné suffisamment d'énergie pour continuer.

Un très grand **Merci** à toute la famille Lacampagne, en dehors du contexte professionnel : Merci Alain, Celine et Malou de m'avoir chaleureusement accueilli plusieurs fois chez vous aux USA. Je vous rappelle que ma proposition de vous faire découvrir les recoins de la Tunisie est toujours d'actualité.

Mes remerciements vont aussi à ma famille et mes amis qui, avec cette question récurrente, «quand est-ce que tu la soutiens cette thèse? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final.

Sommaire

Listes des abréviations et illustrations	4
Préambule	9
Revue de la littérature	11
1. Dysfonction diaphragmatique et ventilation mécanique.....	13
1.1. Intérêt et contexte d'utilisation clinique.....	13
1.2. La Dysfonction Diaphragmatique induite par la ventilation : historique d'une découverte.....	14
2. La VIDD : Une myopathie, plusieurs mécanismes.....	21
2.1. L'atrophie musculaire: Est-elle seule ?.....	21
2.2. Stress oxydant et atrophie	25
2.3. La mitochondrie, organe crucial dans la régulation de l'homéostasie cellulaire.....	29
2.3.1. Fission et mitophagie.....	57
2.3.2. Les différents rôles de l'AMP kinase.....	60
3. Homéostasie calcique et couplage excitation contraction	69
3.1. Implication du Réticulum sarcoplasmiques, rôle des récepteurs à la Ryanodine 1 (RYR1)	69
3.2. Calcium et Mitochondrie :.....	77
3.3. Altération de l'homéostasie calcique et production de ROS.....	83
Objectifs	87
Méthodologie.....	89
Modèle d'étude.....	90
1.1. La ventilation mécanique chez la souris.....	91
1.2. La ventilation mécanique chez les patients.....	94
Fonction et morphologie musculaire	96
1.1. Mesures de propriétés contractiles d'un muscle en ex-vivo.....	97
2.2. Détermination de la typologie musculaire.....	99
2.3. Microscopie électronique.....	100
2.4. Analyse et traitement des images.....	103
Etudes fonctionnelle et biochimique du récepteur à la Ryanodine	104
3.1. Technique de Bilayer	105
3.2. Immunoprecipitation du RyR1 et FKBP12	108
3.3 Libération spontanée du Ca ²⁺ par le RyR1 : Calcium Sparks.....	111

Etudes des voies signalétiques d'un point de vue protéique.....	114
4.1. Dosage des protéines musculaires par Immunoblotting.....	115
4.2. Analyses Statistiques des résultats	120
Résultats	121
Etudes 1 : La dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique	122
1.1. Objectif de l'étude.....	122
1.2. Protocole	124
1.3. Résultats	126
1.4. Discussion	130
1.5. Article 1: Leaky ryanodine receptors contribute to diaphragmatic weakness during mechanical ventilation	134
Etudes 2 : Impact du stress oxydant mitochondrial sur le RyR1 et activation de la protéolyse calcium dépendante au cours de la ventilation mécanique chez la souris	151
2.1. Objectif de l'étude.....	151
2.2. Protocole	152
2.3. Résultats	153
2.4. Discussion.....	156
2.5. Article 2: Mitochondrial-Induce oxidative stress triggers RyR1 abnormalities and underlies Ca ²⁺ -dependent proteolysis in the diaphragm of mechanically ventilated mice.....	160
Etudes 3: Rôle de la dynamique mitochondriale dans la VIDD	187
Objectif de l'étude.....	187
Protocole	189
3.3. Résultats	192
3.4. Discussion.....	200
3.5. Article 3 : Rôle de la dynamique mitochondriale dans la VIDD.....	203
Discussion générale et perspectives	205
Bibliographies	219

Listes des abréviations et illustrations

AICAR: 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
AKAP121 : A-kinase anchor protein 121
AKT: protéine kinase B
AMP: adénosine monophosphate
AMPK: AMP-activated protein kinase
ARNm: acide ribonucléique messenger
Atg: autophagy related genes
ATP: adénosine-5'-triphosphate
BAX: Bcl-2-associated X
Bnip3: BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
BPCO: Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
C2C12: ligné cellulaire de myoblaste de souris
Ca²⁺: Calcium
CDK1: Cyclin-dependent kinase 1
CEC: couplage excitation-contraction
Cellules ECs: cellules souches embryonnaires
CJs: Jonction de crête mitochondriale
DHPR: récepteur des dihydropyridines
Dnm: Dynamin-like GTPases
Dnm1: homologue de Drp1
Drp1: Dynamin related protein-1
E2 et E3: ubiquitine ligase E2 et E3
EiF4EBP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
eIF4E: Eukaryotic initiation factors
FIS1: Mitochondrial fission 1 protein
FKBP12: FK506 binding protein
FMLP: phénylalanine
FoxO: Forkhead box O3
GED: GTPase effector domains

GPx-1: glutathion peroxydase
GTP: guanosine triphosphate
HUWE1: E3 ubiquitin-protein ligase
IF1: Inhibiteur de l'ATPase mitochondriale
IGF: insulin-like growth factor-1
IMM: inner mitochondrial membrane
IMS: inner membrane space
JNK: c-Jun N-terminal kinases
KHC: isoforme de kinesin
KO: knockout
L- OPA1: long isoforms of OPA1
LC3: light chain 3
mAKAP: A-Kinase Anchor protein
MARCH V: E3 ligase appelée aussi MITOL
MCU: mitochondria calcium uniporter
Mdiv1: mitochondrial division inhibitor
MFF: Mitochondrial Fission Factor
Mfn: Mitofusine
MiD49: mitochondrial dynamics proteins of 49 kDa
MiD51: mitochondrial dynamics proteins of 51 kDa
MitoPLD: phospholypase de Type D
MnSOD: Superoxide dismutase
mTOR: mamalian target of rapamycin
MTP18: Mitochondrial protein 18kD
MuRF-1: muscle ring finger-1
NADPH oxydase: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydase
NO synthase: nitric oxyde synthase
OMA1 et YME1L: zinc metallopeptidase
OMM: outer mitochondrial membrane
ONOO⁻: ion peroxydrite
OPA1: optic atrophy 1
P: action de phosphorylation.

p70s6K: Ribosomal protein S6 kinase beta-1
PARKIN: E3 ubiquitine ligase codé par le gène PARK2
PDE4D3: phosphodéastérase
PGC1-alpha: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta
PGC1-beta: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta
PI3K: phosphoinositide 3-kinase
PINK1: PTEN-induced putative kinase 1
PKC: Proteine Kinase C
PMA: phorbol12-myristate 13-acetate
PMCA: plasma membrane ca²⁺ ATPase
PP1: Protein phosphatase 1
Pparg1b: gene codant pour peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta

PTP : port de perméabilité mitochondrial
Raptor: regulatory-associated protein of mTOR
RE: Réticulum Endoplasmique
RNS: reactive nitrogen species
ROS: espèces réactive à l'oxygène
RS: Réticulum Sarcoplasmique
RyR1: Récepteur à la ryanodine de type 1
SENP5: protéase sentrin/SUMO
SERCA: sarco/endoplasmic reticulum CA²⁺ ATPase
Siah2: siah E3 ubiquitin protein ligase 2

S-OPA1: short isoforms of OPA1
STAT: Signal transducer and activator of transcription
SUMO: biquitin-like modifier
TNF: Facteur de Nécrose Tumorale
TT: Tubules transverses
TwPtr: Pression trans-diaphragmatique
Ub: Ubiquitination
Ubc9: ubiquitin conjugating enzyme 9
UCP2: uncoupling protein 2

ULK1: mammalian homolog of Atg1

USP30: débiqutylase mitochondriale

VDAC: Voltage-dependent anion channels

VDCC: voltage-dependent Ca²⁺ channels

VIDD: dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation mécanique

VM: Ventilation mécanique

VMC: Ventilation Mécanique Contrôlée

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie du thorax et diaphragme touraco-abdominal.....	12
Figure 2 : Historique de l'état de connaissance sur la VIDD	16
Figure 3 : Devenir d'une cohorte de ventilation mécanique prolongé durant la première année post-extubation.....	18
Figure 4 : Illustration de la régulation de la voie AKT/mTOR dans le diaphragme au cours de la ventilation spontanée et la ventilation mécanique.....	22
Figure 5 : Dépression globale de la synthèse protéique dans la cellule par les ROS	24
Figure 6 : Illustration de la voie de signalisation des ROS	26
Figure 7 : Cycle de vie de la mitochondrie.....	32
Figure 8: La fusion de la membrane interne et externe : un évènement indépendant ou simultané ?	36
Figure 9 : un modèle de recrutement de Parkin à la mitochondrie endommagée.....	38
Figure 10: Le mécanisme par lequel PINK1/ Parkin entrave la motilité mitochondriale.....	40
Figure 11 : Remodelage des crêtes mitochondriales par OPA1	44
Figure 12: Induction de la fission mitochondriale par Drp1 et d'autres éléments cytoplasmique.....	46
Figure 13 : Un modèle de fission mitochondriale	48
Figure 14: modification biochimique et Fission/fusion mitochondriale.....	52
Figure 15: Le rôle de MITOL dans la détermination de la morphologie mitochondriale.	54
Figure 16 : Les différents types de régulations du DRP1.....	56
Figure 17 : La régulation protéolytique d'OPA1 et balance de la dynamique mitochondriale.	58
Figure 18: La mitophagie chez la levure et les mammifères.....	62
Figure 19: Régulation et activation de l'AMP kinase	64
Figure 20 : AMPK et Fission mitochondriale.....	66
Figure 21 : Structure et mutations du complexe macromoléculaire RyR1.....	70
Figure 22 : effet des catécholamines sur la régulation du calcium intracellulaire dans le coeur.....	72
Figure 23: Régulation de la fonction mitochondriale et de la bioénergétique par le Ca ²⁺	74
Figure 24 : proximité et interaction entre la mitochondrie et le RS	76
Figure 25: Effet délétère du calcium sur la mitochondrie	78

Préambule

En forme de voûte allongée transversalement, séparant les cavités thoracique et abdominale, le diaphragme est une cloison musculo-tendineuse dont la composition diffère peu des muscles périphériques. Il est constitué à 55% environ de fibres musculaires lentes de type I (fibres fonctionnant en aérobie et très résistantes à la fatigue), à 21% de fibres rapides de type IIA (fonctionnant en aérobie et relativement résistantes à la fatigue) et à 24% de fibres rapides de type IIB (fonctionnant en anaérobie et fatigables rapidement).

Le diaphragme est un des muscles dont le pourcentage de fibres résistantes à la fatigue est le plus élevé. Ce profil oxydatif prépondérant, riche en mitochondries source de production d'espèce oxygénoréactive nécessite au sein de la fibre musculaire diaphragmatique la présence de systèmes protecteurs antioxydants très développés par rapport aux autres muscles squelettiques. Bien que le diaphragme soit une entité très résistante à la fatigue qui a développé des protections efficaces vis-à-vis d'une agression oxydante, toute altération ou remodelage de ce tissu peut engendrer des conséquences physiopathologiques, altérant la fonction de la pompe ventilatoire du diaphragme, pouvant engager le pronostic vital ou, à un plus faible niveau d'atteinte, se répercuter sur la qualité de vie des individus. Parmi ces atteintes, celle induite par la ventilation mécanique représente un exemple de pathologie musculaire acquise tout à fait remarquable par son mécanisme initiateur encore mal compris et sa rapidité de mise en place.

En effet, la ventilation mécanique, chez les patients de réanimation, a pour but de suppléer une fonction vitale. Cependant, elle peut « paradoxalement » être à l'origine de l'altération des propriétés contractiles des muscles respiratoires, appelée dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation (DDIV). Dans cette pathologie, l'altération mitochondriale comme nous le verrons dans cette revue de la littérature, semble être un élément majeur dans son initiation.

En microscopie optique sur cellules vivantes, les mitochondries apparaissent sous forme de granules, de bâtonnets ou de filament de longueur variables. Ces structures sont mobiles et modifient continuellement leur position et leur morphologie. Par ailleurs, elles sont capables de se diviser et de fusionner entre elles et de modifier leurs liens étroits avec le Réticulum Sarcoplasmique, source d'échanges calciques.

Une telle dynamique confère à la mitochondrie plusieurs rôles cruciaux dans l'homéostasie cellulaire: un puissant générateur d'énergie, un régulateur de l'homéostasie calcique, un censeur du destin cellulaire et un acteur de la plasticité musculaire.

Dans cette revue de la littérature, après avoir présenté les aspects cliniques impliqués par la ventilation mécanique en réanimation ainsi que les mécanismes physiopathologiques connus, nous décrirons des données récentes sur la dynamique mitochondriale. Ceci nous permettra ensuite de proposer une nouvelle approche de la physiopathologie de la VIDD, avec l'implication de la dynamique mitochondriale dans cette pathologie musculaire acquise.

Revue de la littérature

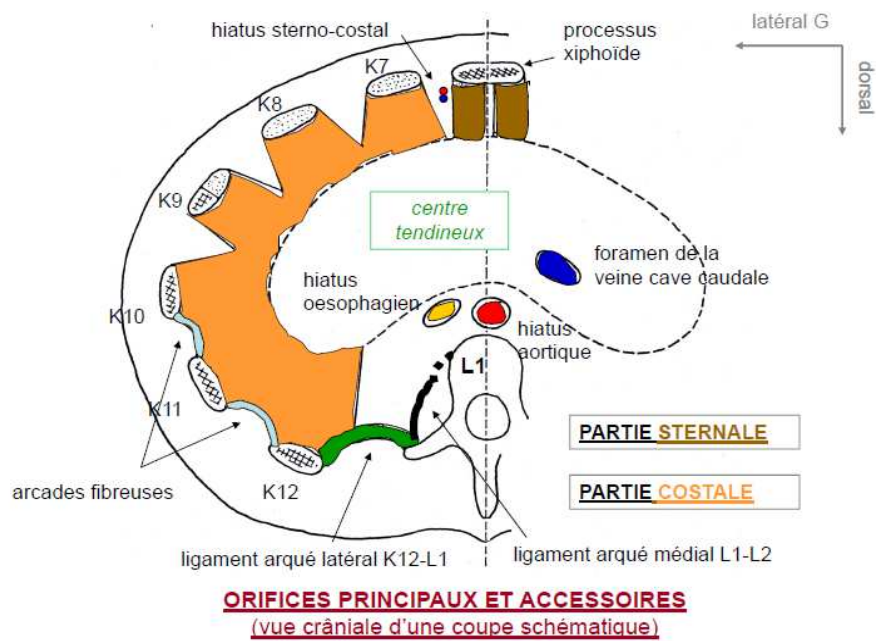
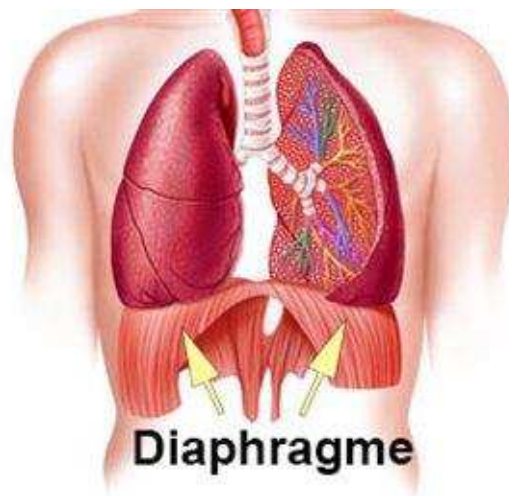


Figure 1 : Anatomie du thorax et diaphragme thoraco-abdominal

D'après professeur Philippe Chaffanjon, université de grenoble 2012

1. Dysfonction diaphragmatique et ventilation mécanique

1.1. Intérêt et contexte d'utilisation clinique

Chez les patients en soin intensif, la ventilation mécanique contrôlée (VMC) appelée aussi VM par convention, remplace la fonction de pompe du diaphragme, afin d'assurer les échanges respiratoires et de réduire le travail du diaphragme. La VM est le premier support vital utilisé en réanimation et est indiquée dans plusieurs contextes pathologiques tels que la défaillance respiratoire, les états de mal asthmatique, la Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), les maladies neuromusculaires, les overdoses de drogues ou encore la récupération d'une anesthésie générale. Chez ces patients, du fait de difficulté d'extubation, un support ventilatoire prolongé sera nécessaire. Cette dysfonction, observée dans au moins 50 % des patients en réanimation, a été mise en cause dans l'allongement important de la durée d'hospitalisation, dans les difficultés de sevrage de la ventilation mécanique et dans l'augmentation du risque de co-morbidité et de mortalité (Esteban et al., 2002).

L'existence d'une dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation mécanique (DDIV) chez l'homme, n'a été que très récemment mise en évidence (Jaber et al., 2011a; Levine et al., 2008a). Dans ces études, elle a été corrélée à une atrophie musculaire diaphragmatique et à des phénomènes lésionnels de la structure du sarcomère associés à une protéolyse.

Au cours de ces 15 dernières années, grâce au modèle animal, nos connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la genèse de la DDIV ont beaucoup progressé, bien qu'il reste, notamment au niveau des mécanismes d'initiation de cette pathologie des inconnues.

1.2. La dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation : historique d'une découverte.

Les études cliniques évaluant l'existence d'une dysfonction diaphragmatique associée à la ventilation mécanique sont très rares. L'étude rétrospective de **Knisely** en 1988 (Knisely et al., 1988) est la première à suggérer que la VM de longue durée prédispose les myofibrilles des nourrissons et des nouveau-nés à l'atrophie diaphragmatique. Bien que provocante en son temps, cette étude n'a pas fourni une preuve directe confirmant que la VM prolongée favorise l'atrophie diaphragmatique (Knisely et al., 1988). Ce n'est que bien plus tard que ce concept a été repris, avec les premières études, qui ont rapporté une diminution de la force générée par le diaphragme chez les patients de réanimation en VM prolongée (> 48-72 h) lors d'une mesure ponctuelle (Laghi et al., 2003; Watson et al., 2001). En valeur absolue, la valeur moyenne de la pression trans-diaphragmatique, qui reflète la contraction du diaphragme (TwPtr), enregistré chez des patients ventilés pour une longue durée (>5 jours), était significativement plus basse par rapport à des patients ventilés pour une courte période (<2h), (16.5 +5.2 vs. 20.1 +2.5 cm H₂O; P=0.03). Ce n'est que beaucoup plus tardivement qu'une étude clinique a montré pour la première fois la présence d'une atrophie du diaphragme chez l'homme, ventilé mécaniquement (Levine et al., 2008a). Notre groupe a complété complété cette étude en montrant que la TwPtr pouvait diminuer progressivement avec la durée de la ventilation et perdre 32% de son amplitude au bout de 5 jours (Jaber et al., 2011b). Cette atteinte fonctionnelle était corrélée avec des atteintes histo-morphologiques mises en évidence en microscopie électronique. En effet, les coupes des diaphragmes issus des patients ventilés plus que 5 jours montraient une ultrastructure anormale, un désassemblage myofibrillaire et des sarcomères désorganisés. La magnitude de ces lésions était également corrélée avec la durée de ventilation ($r^2=0.8$; P < 0.001).

Notre compréhension de la dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation mécanique (VIDD) a largement évolué au cours les 25 dernières années grâce à l'apport du modèle animal.

La première étude prospective de Le Bourdelles (Le Bourdelles et al., 1994) a révélé que 48h de MV totalement contrôlée chez le rat se traduit par une perte importante de la masse musculaire et une réduction de la force contractile du diaphragme (Le Bourdelles et al., 1994). Cette étude originale a été confirmée sur le diaphragme de babouin ventilé mécaniquement (Anzueto et al., 1997). Suite à ces premiers travaux, l'intérêt de la communauté scientifique pour la DDIV a très rapidement augmenté; cela s'est manifesté par une augmentation du nombre d'études animales publiées. Ces travaux ont conclu que la VM prolongée induit rapidement une atrophie et une dysfonction contractile du diaphragme (Cader et al., 2010; Criswell et al., 2003; Gayan-Ramirez et al., 2003a; Radell et al., 2002; Sassooun et al., 2002a; Shanely et al., 2002a, 2003a). Ces premières études ont révélé que le stress oxydant était un élément central dans la genèse de la DDIV. Depuis, beaucoup d'études ont suivie, avec une augmentation exponentielle du nombre des publications (Powers et al., 2013) (**Voir figure 2**).

Les résultats de cette production scientifiques seront présentés très succinctement dans un chapitre ultérieur, avant que cette revue de la littérature se concentre plus spécifiquement sur les mécanismes émergents, impliquant la mitochondrie et ses liens avec le réticulum sarcoplasmique, deux organites interrégulés et contrôlant la fonction musculaire.

La Dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation : implication pour les patients

Les soins donnés aux patients nécessitant une ventilation mécanique sont très couteux, avec des résultats souvent décevant à plus ou long terme (Cox et al., 2007; Nelson et al., 2004).

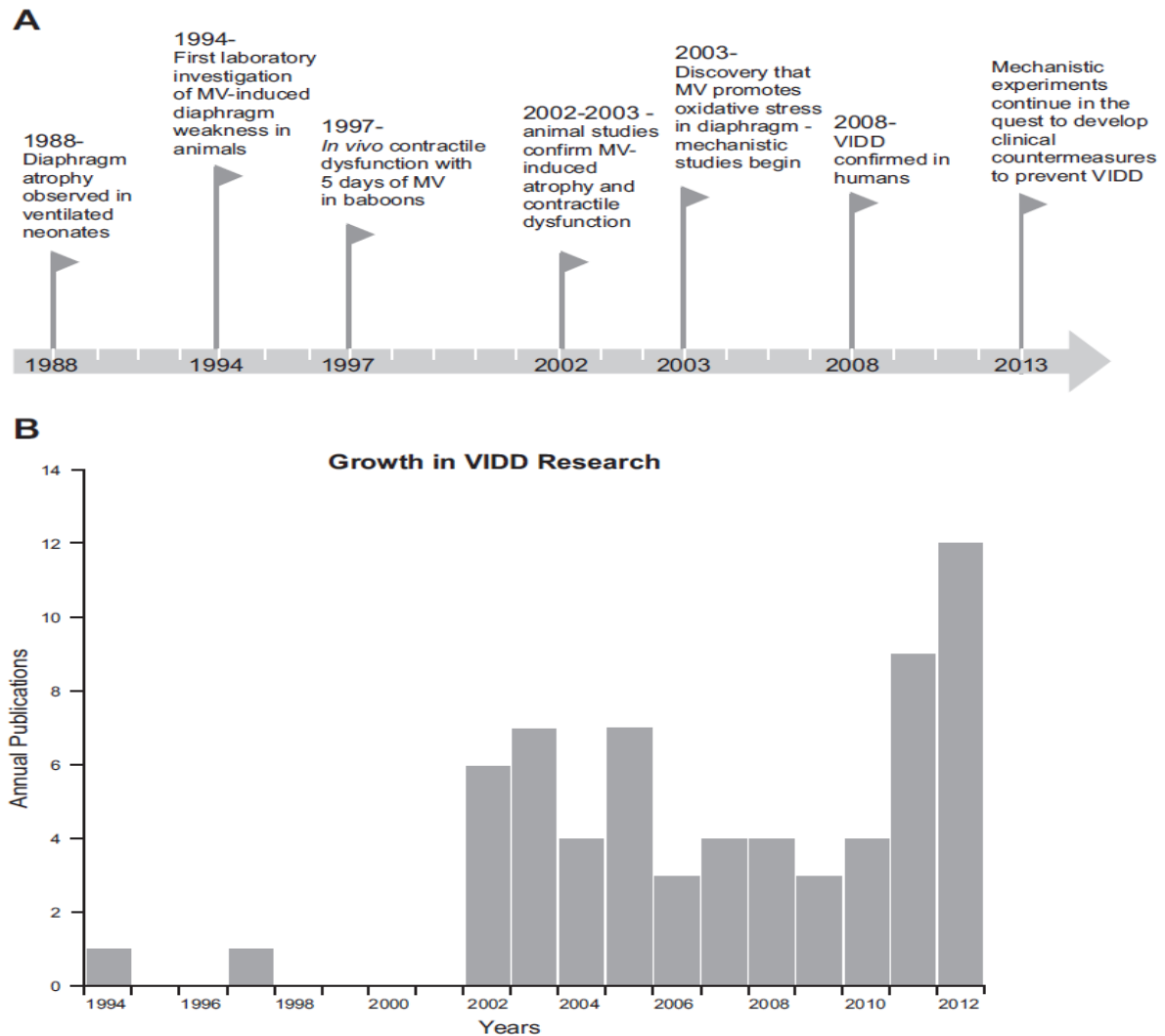


Figure 2 : Historique de l'état de connaissance sur la VIDD

A. Illustration schématique des grandes découvertes et de l'évolution historique de l'état de connaissance sur la dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation mécanique.

B. Augmentation du nombre de publications portant sur la DDIV au cours des années.

Figure prise de la revue de Scott Powers 2013

En 2005 aux USA, les coûts de santé des patients ventilés excédaient ceux des patients septiques, ou encore ceux traités pour un infarctus du myocarde (Medicare et al., 2015). Ces dépenses annuelles dépassent 20 billion de dollars sans compter les frais de réhabilitation (Nelson et al., 2007).

Bien avant et dans le but de donner de la pertinence aux recherches mécanistiques et aux essais thérapeutiques, nous allons aborder le devenir des patients ventilés à court et à long terme.

Malgré la qualité des soins qu'ils reçoivent et leur coût, une année plus tard ceux qui survivent souffrent souvent d'une incapacité à accomplir les tâches quotidiennes avec une mauvaise qualité de vie (Nelson et al., 2004). Mark Unroe en 2010 (Unroe et al., 2010), a décrit les répercussions post-ventilation dans une étude réalisée sur une cohorte de 126 patients ventilés: seulement 56% d'entre eux ont survécu une année après leur sevrage de la ventilation mécanique (**voir figure 3**). Parmi les survivants l'auteur a noté 150 réadmissions dans des unités de soins intensifs dans les 3 mois qui suivent l'extubation.

Bien que la présence d'une dysfonction diaphragmatique semblent participer à la mauvaise qualité de vie du patient, après le sevrage du ventilateur, très peu d'études ont évalué la récupération de la DDIV sur model animal.

En contradiction avec les données cliniques observées chez l'homme, Thomas et ses collaborateurs (Thomas et al., 2013) ont montré que la DDIV est rapidement et complètement réversible chez un modèle de rat ventilé 24 heures.

En accord avec l'étude de Bruells de 2014, Thomas et ses collaborateurs avaient montré une récupération quasi-complète de la VIDD chez le rat 24h après l'extubation. Ces auteurs avaient noté également une récupération de l'atrophie avec une remise en route des processus de synthèse des protéines contractiles du diaphragme. Cependant, ces résultats restent à prendre avec des précautions vis-à-vis la transposition chez l'homme, car elles n'évaluaient pas la

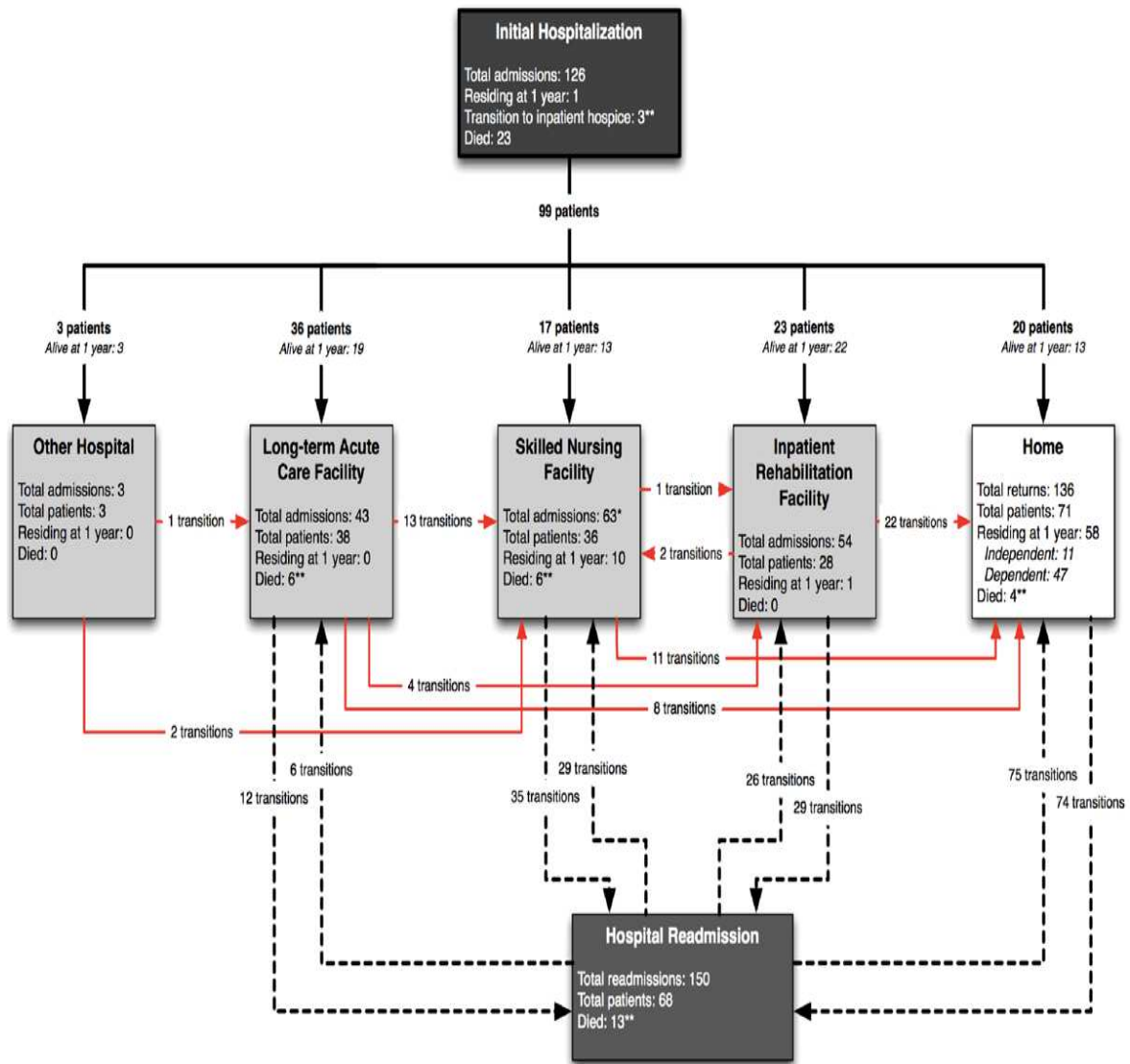


Figure 3 : Devenir d’une cohorte de ventilation mécanique prolongée durant la première année post-extubation. 126 patients sont admis pour ventilation mécanique. 99 (79%) sont libérés. 23 décédés et 1 patient reste encore hospitalisé au moment de l’étude. 457 transitions dans les différents services de prise en charge durant l’année suivant l’extubation. Les lignes discontinues représentent la direction et le nombre total de transition durant cette année. Les lignes rouges présentent les transitions post-ventilation incluant le retour à la maison (Unroe et al., 2010)

récupération à long terme (une semaine voir un mois après l'extubation) (Bruells et al., 2014; Thomas et al., 2013).

Ainsi, il n'existe actuellement aucune d'étude qui a suivi l'évolution de la fonction diaphragmatique post-ventilation sur le plan moléculaire et fonctionnel à partir des premières heures de l'extubation jusqu'à plusieurs semaines.

Les recherches fondamentales, cliniques ou translationnelles actuelles se focalisent sur la description et l'identification mécanistique en vue de développer des approches thérapeutiques en vigueur. Dans le chapitre suivant de cette thèse nous allons donc les exposer brièvement.

Résumé Partie I

Bien qu'elle soit le premier support vital utilisé en réanimation, la ventilation mécanique contrôlée peut engager le pronostic vital des patients avec des complications principalement musculaires respiratoires. Ces complications sont jugées chez l'homme comme chez l'animal par un critère fonctionnel qui est la capacité du diaphragme à générer une force. Dans la plupart des cas, elles sont accompagnées, par des atteintes histologiques comme des lésions et de l'atrophie due à la protéolyse et l'altération des processus de protéosynthèse.

Ainsi, la prise en charge du patient nécessitant une ventilation mécanique en réanimation, bien que très coûteuse, avec un impact majeur sur le coût de la santé, présente des résultats fonctionnels à plus ou moins long terme décevants, mettant en avant l'importance de développer toute thérapeutique permettant de limiter la DDIV. Dans la partie II nous allons exposer les mécanismes subcellulaires impliqués dans la DDIV, ainsi que les thérapies ciblées dans le futur proche.

2. La VIDD : une myopathie, plusieurs mécanismes

2.1. L'atrophie musculaire: est-elle seule ?

De nombreuses études chez l'animal, ont montré que la VM entraîne une atrophie musculaire diaphragmatique rapide chez plusieurs espèces (*eg*, souris, rat, lapin, cochon) (Anzueto et al., 1997; Capdevila et al., 2003; Gayan-Ramirez et al., 2003b, 2005; McClung et al., 2007a; Shanely et al., 2002a) sans effet sur les muscles squelettiques périphériques pour des périodes de ventilation mécanique allant de 12h à 18h (McClung et al., 2007a; Shanely et al., 2002b). La vitesse d'apparition de l'atrophie du diaphragme ventilé est largement supérieure à celle induite par dénervation (lésion des nerfs phréniques) (Geiger et al., 2003) ou à celle observée au niveau des muscles locomoteurs lors d'une période d'alitement. Ainsi, il faut 96 heures de mise au repos (expérience du bed rest) d'un muscle locomoteur pour atteindre le même degré d'atrophie d'un diaphragme ventilé 12 heures (Thomason et al., 1989). La principale raison réside dans le fait que le diaphragme est le seul muscle qui n'est pas soumis à la pesanteur, rendant toute inactivité plus délétère.

Il existe plusieurs mécanismes qui sont impliqués dans l'atrophie musculaire dont les plus connus sont la diminution de la synthèse et l'augmentation de la dégradation des protéines de la machinerie contractile. Nous détaillerons plus que brièvement ces mécanismes, qui ont été très largement présentés dans de nombreuses thèses précédentes, avec une illustration schématique dans le cadre de la DDIV (**voir figure 4**).

Il est largement admis que l'augmentation de l'activité contractile favorise la synthèse protéique alors que la mise au repos résulte en une diminution de la synthèse des protéines (Burd et al., 2012; Kumar et al., 2012). Cette dérégulation observée au cours de la DDIV semble être due à un défaut de la traduction des protéines, considérant que le taux des ARNm reste inchangé (Shanely et al., 2004a; Zhu et al., 2005a).

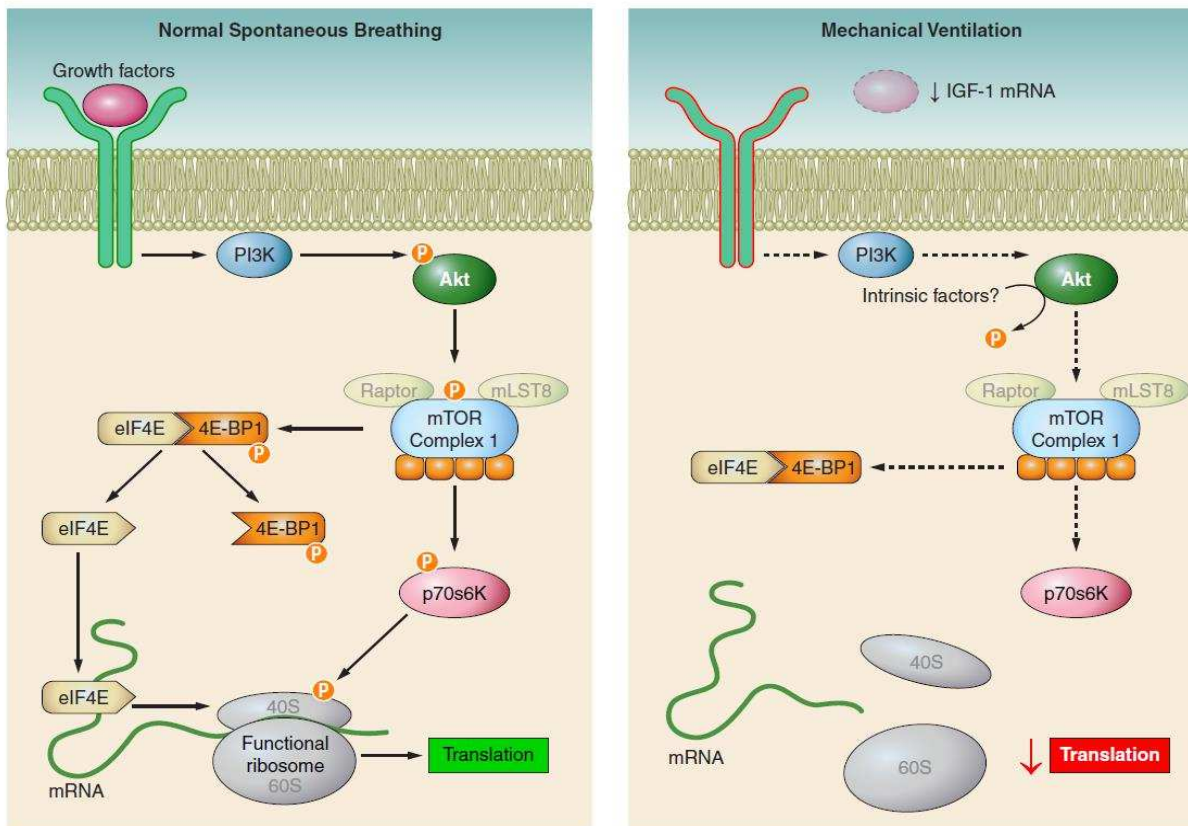


Figure 4 : Illustration de la régulation de la voie AKT/mTOR dans le diaphragme au cours de la ventilation spontanée et la ventilation mécanique.

PI3K(phosphoinositide 3-kinase) ; AKT (protein kinase B) ; mTOR(mammalian target of rapamycin); raptor(regulatory-associated protein of mTOR); eIF4E(Eukaryotic initiation factors) ; 4E-BP1(Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1);p70s6K(Ribosomal protein S6 kinase beta-1); IGF(insulin-like growth factor-1).P action de phosphorylation.(Powers et al., 2013)

En effet, dans le muscle squelettique, la synthèse protéique est largement dépendante de l'efficacité de la traduction (Kimball and Jefferson, 2006). C'est dans ce sens que la voie de signalisation AKT/mTOR (mammalian Target of rapamycin) joue un rôle dans la régulation de la traduction (Bodine et al., 2001). Les expérimentations animales et les études chez l'homme montrent, suite à une ventilation mécanique, une diminution de l'activation de la voie AKT (AKT: protéine kinase B) due à son hypophosphorylation (Levine et al., 2011a; McClung et al., 2007b). Ceci a pour conséquence, une diminution de la phosphorylation de p70S6K1 (Ribosomal protein S6 kinase beta-1) et d'EiF4EBP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1). Cette voie est régulée en amont par IGF-1 et des facteurs intrinsèque qui sont réprimés par la ventilation mécanique, par des mécanismes encore mal compris (Bodine, 2006; Gayan-Ramirez et al., 2003a) (**Voir figure 4**).

Cependant l'atrophie diaphragmatique chez le rat et chez l'homme apparaît très rapidement, dès les premières 12-24h, ce qui a permis de prédire une implication beaucoup plus importante des phénomènes de protéolyse que ceux de la protéosynthèse. En effet la MV augmente l'activité des 4 systèmes protéolytiques majeurs :

- a) Macroautophagy: c'est un processus catabolique qui dégrade les protéines du cytosquelette et les organites cellulaires comme la mitochondrie, que l'on détaillera dans la partie Fission et mitophagie (page 57) (Cook et al. 2012(Goll et al., 2003a), en utilisant des protéases lysosomales.
- b) Les calpaines: sont des cystéines qui favorisent l'atrophie musculaire en dégradant un grand nombre de protéines cellulaires (Goll et al., 2003a).
- c) Les caspases 3: sont des protéases de la famille des cystéines qui jouent un rôle important dans l'apoptose et peuvent aussi contribuer à la dégradation des complexes

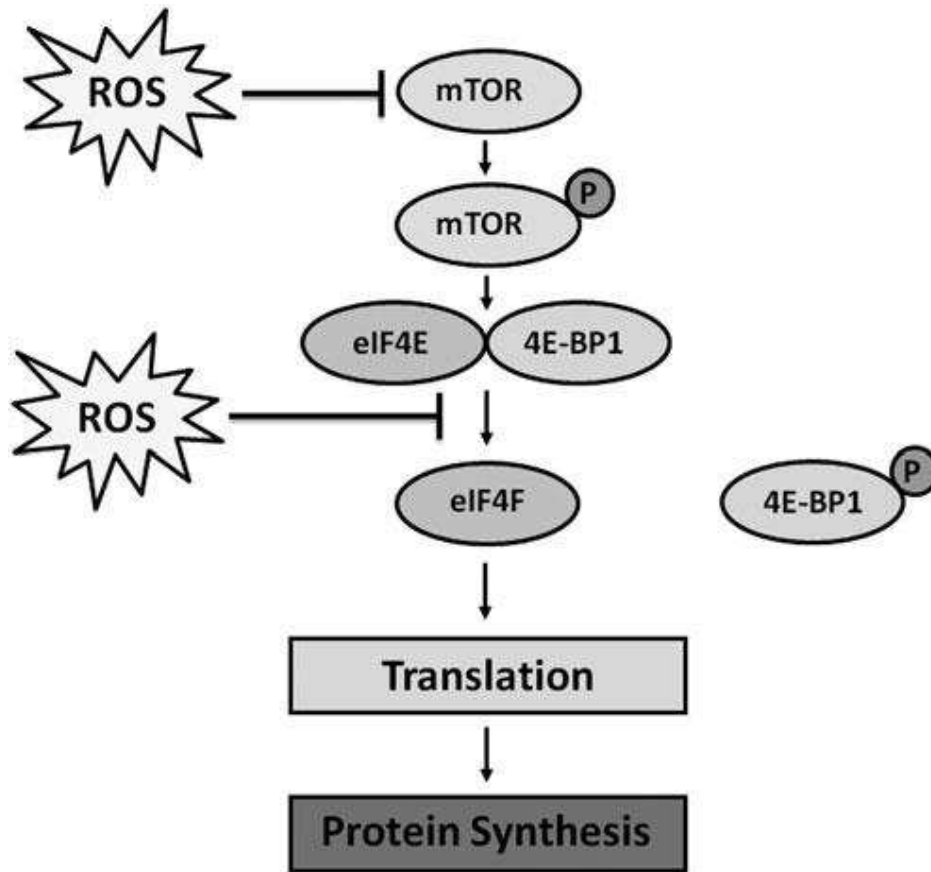


Figure 5 : Dépression globale de la synthèse protéique dans la cellule par les ROS.

C'est un mécanisme potentiel pour expliquer l'impact de la surproduction de ROS sur la synthèse protéique. Les ROS peuvent inhiber la traduction des protéines au niveau de l'étape de l'initiation via la réduction de la phosphorylation d'eIF4E et 4EBP1 (Powers et al., 2011).

actine/myosine durant une période de mise au repos du muscle (Du et al., 2004; McClung et al., 2007a)

- d) Le système Ubiquitin protéasome: est un système multi-enzymatique et un des acteurs majeurs de la protéolyse intracellulaire. Il fonctionne en deux grandes étapes. Le substrat (protéine cible) est d'abord marqué par une petite protéine ubiquitaire grâce à une cascade enzymatique spécialisée. Ce marquage permet par la suite la reconnaissance et la dégradation de la protéine polyubiquitinylée par un complexe protéolytique de 2000 kDa, le protéasome 26S.

Récemment il a été évoqué que la régulation de ces voies protéolytiques (ubiquitine/protéasome, calpaines, caspases3) dépendent largement du statut oxydant de la cellule. En effet les espèces réactive à l'oxygène (ROS) produites dans le diaphragme au cours de la VM est un prérequis pour l'activation de la protéolyse et l'induction de l'atrophie (**Voir figure 5**) (Agten et al., 2011a; Betters et al., 2004a; McClung et al., 2007b; Whidden et al., 2010a). Dans la partie suivante nous allons détailler succinctement l'implication du stress oxydant dans la genèse de la DDIIV ainsi que ses voies de signalisation.

2.2. Stress oxydant et atrophie

Les mécanismes responsables du stress oxydant au niveau du diaphragme ventilé sont nombreux et associés à une diminution de la capacité antioxydante du diaphragme avec une augmentation de la production des espèces oxygénoréactive (Falk et al., 2006, 2006; Powers et al., 2011a).

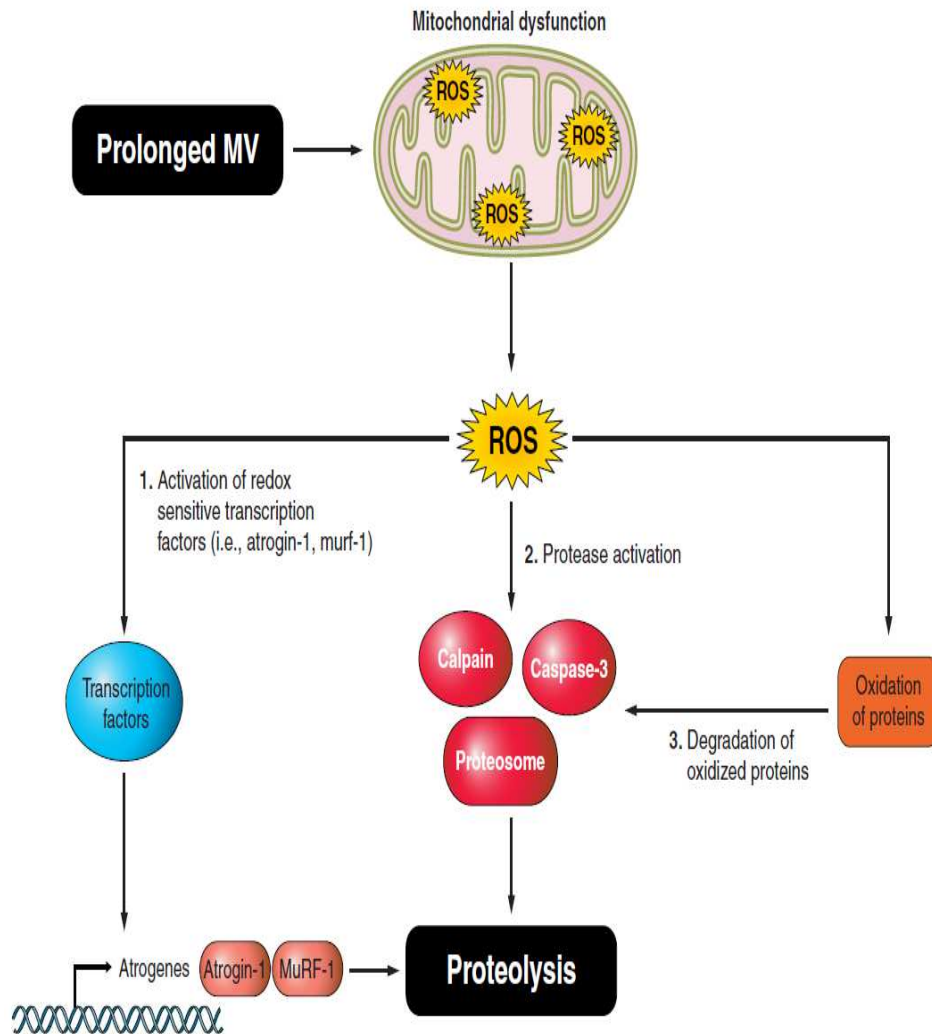


Figure 6 : Illustration de la voie de signalisation des ROS (reactive oxygen species) impliquée dans l'augmentation de la protéolyse dans le diaphragme au cours de la ventilation mécanique (Powers et al., 2013).

Les sources de production de ROS sont nombreuses (eg, NADPH oxydase, xanthine oxydase, NO synthase ou la mitochondrie). La mitochondrie reste le site dominant de la production des ROS impliqués dans la DDIV (Falk et al., 2011; McClung et al., 2009a; Powers et al., 2011b; Van Gammeren et al., 2007b; Whidden et al., 2009a).

En effet, 12 heures de VM chez le rat augmentent dans le diaphragme la production des ROS mitochondriaux (Powers et al., 2011c). Ces ROS ont été également impliqués dans la genèse d'une peroxydation lipidique et une oxydation des protéines contractiles du diaphragme (Kavazis et al., 2009a). Plus récemment, un traitement par antioxydant spécifique de la mitochondrie a montré qu'il pouvait prévenir l'activation des voies protéolytiques impliquées dans la DDIV, ainsi que le déficit fonctionnel (Powers et al., 2011c). Ces données indiquent que la production mitochondriale des ROS est un signal en amont pour l'activation des protéases du diaphragme ventilé.

En effet, plusieurs études ont montré que le stress oxydant peut activer la protéolyse via de nombreuses voies: Premièrement en augmentant l'expression des gènes autophagiques (Beclin-1 et cathepsine L) et ceux du système ubiquitine protéasome. Plus précisément, *in vitro* il a été montré que l'exposition de myotubes C2C12 (lignée cellulaire de myoblastes de souris) à l'H₂O₂ augmente l'expression des protéines E2, E3 ligases, E2_{14K}, atrogin-1 et muscle ring finger-1 (MuRF-1) qui contribuent à la dégradation protéique (Li et al., 2003a; McClung et al., 2009b). De la même façon la voie du TNF- α augmente aussi l'expression d'atrogin-1 (Li et al., 2005). Plusieurs pathologies caractérisées par un stress oxydant telles que la BPCO (broncho-pneumopathie chronique obstructive) et le vieillissement sont accompagnées par une inflammation systémique qui contribue à la fonte musculaire caractéristique de ces pathologies. Le TNF- α est une cytokine importante dans l'induction de l'atrophie musculaire. Chez la souris

par exemple, l'injection du TNF- α diminue rapidement la production de force musculaire et augmente l'atrophie d'une manière dépendante de la dose infusée (Hardin et al., 2008; Reid et al., 2002). Ces altérations sont prévenues par un traitement antioxydant (trolox). La voie TNF- α induit l'atrophie par l'intermédiaire des ROS qui vont agir directement sur la caspase 3 ou encore le système ubiquitine protéasome et ses enzymes protéolytiques (Hardin et al., 2008; Ji, 2001; Supinski and Callahan, 2006). Cependant le lien qui pourrait exister entre inflammation et DDIV n'a pas été clairement démontré.

La production des ROS au cours de la VM est associée à une activation des calpaines (Powers et al., 2011b; Whidden et al., 2010a). Le mécanisme spécifique de cette activation reste non investigué. Il est a été lié potentiellement à l'augmentation du calcium cytosolique induite par les ROS, sans pour autant qu'une relation de cause à effet a été clairement démontré (Goll et al., 2003a; Powers et al., 2011a). La production de ROS active aussi la caspase 3 (Powers et al., 2011; Whidden et al., 2010a) via la voie intrinsèque de l'apoptose (activation de la caspase 9 ou la caspase12). Enfin, l'oxydation des protéines musculaires au cours de la ventilation mécanique augmente leurs susceptibilité à l'action du protéasome 20S, les calpaines et les caspases3 (Grune and Davies, 2003; Grune et al., 2003; Smuder et al., 2010). **(Voir Figure 6).**

Pour plus de détails sur l'induction de l'atrophie par les espèces réactives à l'oxygène: voir les références suivantes (Pellegrino et al., 2011; Powers et al., 2007, 2011a, 2012a; Sukhanov et al., 2011; Tisdale, 2007).

Bien que les liens entre induction d'un stress oxydant, activité protéolytique et atrophie ont été clairement établis au cours de la ventilation mécanique, dans les phases initiales de la VIDD ce n'est pas le cas. En effet, récemment Mrozek et al. ont montré pour la première fois sur un modèle de souris ventilées 6 heures, une altération de la force contractile diaphragmatique

associée à la présence d'un stress oxydant, mais sans activation de la calpaine 1, 2 ou 3 et surtout sans atteinte histologique (lésion sarcomérique) et sans atrophie (Mrozek et al., 2012a). D'autres études concomitantes ont décrit une persistance de la dysfonction contractile après la correction de l'atrophie diaphragmatique par un traitement préventif avec du leupeptine (un régulateur de la calpastatin qui diminue l'activité des calpaines et prévient la protéolyse) (Powers et al., 2002; Sassoon et al., 2002a; Yang et al., 2002a). Ainsi, l'atrophie et l'altération de la force contractile peuvent être dissociées.

Plusieurs mécanismes pourraient être mis en jeu pour expliquer un déficit contractile sans atrophie comme par exemple, une altération du couplage excitation-contraction du fait d'une altération de l'homéostasie calciques (Bellinger et al., 2008a, 2009a; Marx et al., 1998a, 2001; Reiken et al., 2003a), ou encore une dégradation de la titine (Ottenheijm et al., 2006), protéine essentielle pour maintenir la structure sarcomérique. Ces mécanismes qui peuvent être activés par la présence initiale d'un stress oxydant (Kavazis et al., 2009b) pourraient jouer un rôle précoce et important pour initier la DDIV. La mitochondrie semble être l'acteur majeur de ce stress oxydant.

En effet parmi les autres sources possible de ROS au cours de la ventilation mécanique, la xanthine oxydase ou la NADPH oxydase semblent jouer un rôle mineur dans la VIDD (McClung et al., 2009a) (McClung et al., 2009a). Dans ce qui va suivre nous allons exposer les mécanismes physiopathologiques qui peuvent être à l'origine de la production de ROS mitochondriale.

2.3. La mitochondrie, organite crucial dans la régulation de l'homéostasie cellulaire

La fonction la plus connue de la mitochondrie est la production d'ATP. Néanmoins cet organite est largement impliqué dans d'autres fonctions cellulaires. Par exemple elle peut jouer un rôle

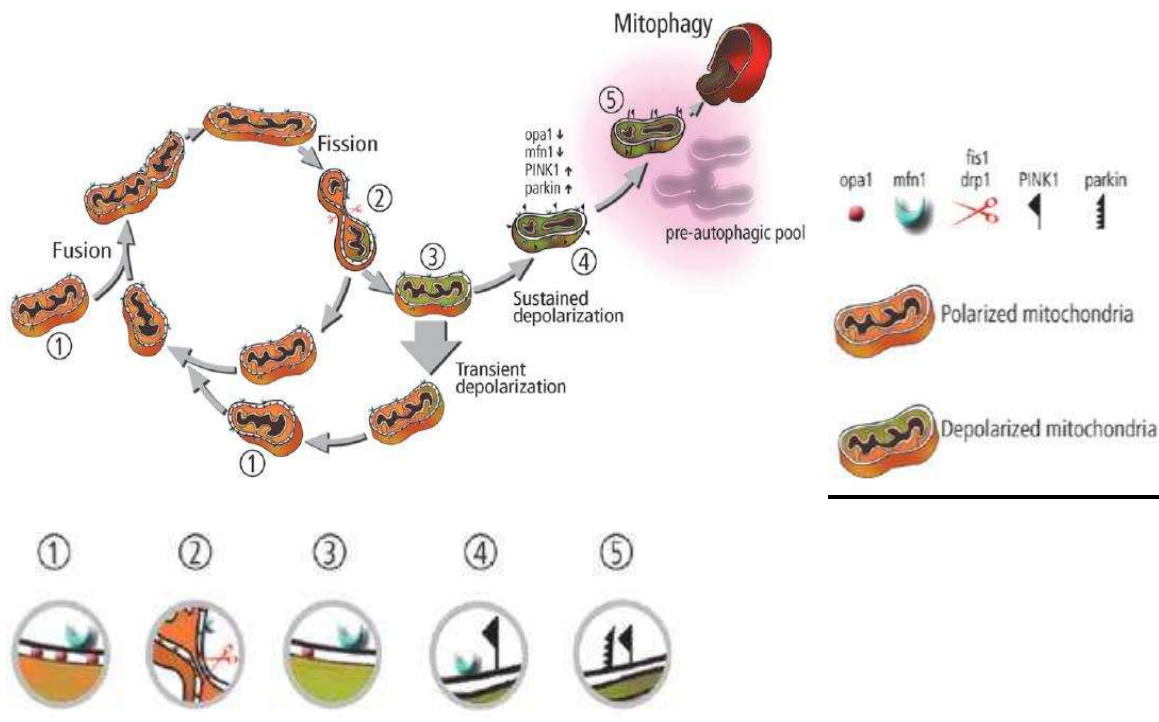


Figure 7 : Cycle de vie de la mitochondrie.

Illustration schématique de cycle de vie mitochondrial. Rôle de la dynamique mitochondriale et la mitophagie dans la ségrégation des mitochondries altérées. La mitochondrie fusionne et se divise en continue. Après la fission la mitochondrie peut rester dépolarisée ou restaurer un potentiel normal. La persistance de la dépoliarisation permet de cliver OPA1 et recruter PINK1/Parkin. La mitochondrie peut rester plusieurs heures dans cette état pré-autophagique avant d’être prise en charge par la machinerie autophagique. Les protéines impliquées dans cette dynamique sont indiquées par des numéros qui correspondent à l’étape de leurs interventions dans ce processus (Gilad Twig, Antioxidants & Redox signaling 2011).

dans la régulation de l'apoptose myonucléaire, fonction totalement liée à son rôle dans la régulation de l'homéostasie calcique (McCormack et al., 1990).

La mitochondrie, par l'intermédiaire d'une production continue de ROS, affecte également de multiples cibles qui contrôlent le cycle cellulaire, le métabolisme énergétique ou l'expression de nombreux gènes sensibles (Dröge, 2002). En effet, la mitochondrie produit en continu le radical superoxyde qui est transformé en H₂O₂ par la dismutase, qui diffuse facilement vers le cytosol (Powers and Jackson, 2008a; (Kowaltowski et al., 2009).

La question essentielle à laquelle nous allons essayer de répondre dans la suite de cette revue de la littérature est la suivante: ***pourquoi la mise au repos d'un muscle squelettique en l'occurrence le diaphragme au cours de la ventilation mécanique augmente la production des ROS mitochondriales?***

La réponse à cette question n'existe pas encore, mais il existe plusieurs hypothèses. En effet, il a été mis en évidence que l'inactivité musculaire prolongée est associée à une perturbation de l'homéostasie calcique, et une augmentation de la concentration cytosolique de calcium (Ca²⁺) (cet aspect sera développé dans le chapitre 3 sur la régulation du Ca²⁺ intracellulaire) (Ingalls et al., 1999; Tischler et al., 1990; Weiss et al., 2010). Ainsi l'augmentation de la concentration cytosolique en Ca²⁺ augmente l'influx calcique dans la mitochondrie via le MCU (mitochondria calcium uniporter) (Kowaltowski et al., 2009).

La surcharge calcique intramitochondrial semble être liée à une stimulation des enzymes du cycle de Krebs comme le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase qui augmentent les taux en NADH, stimulent la NO synthase mitochondrial et augmentent la production de ROS (Brookes et al., 2004; Kowaltowski et al., 2009).

La peroxydation des acides gras résultant du stress oxydant d'origine mitochondriale peut également par un phénomène de potentialisation augmenter la production mitochondriale de ROS par découplage des différents éléments protéiques de la chaîne de transports d'électron, ou par inhibition de l'adénine nucléotide transférase (Bhattacharya et al., 2009). L'ADN mitochondrial (ADNm) qui code pour plusieurs protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale est très sensible aux ROS (faible présence d'histones protectives). Ces dommages de l'ADNm peuvent entraîner une dysfonction au niveau de la chaîne respiratoire avec une fuite d'électrons et une moindre production d'ATP. Il a été montré aussi que la peroxydation des acides gras polyinsaturés (PUFAs) par les ROS produit de l'aldéhyde peroxyde qui inhibe l'activité des enzymes mitochondriales (Barrera et al., 2016; Raza et al., 2008).

Le troisième mécanisme qui pourrait être responsable de la surproduction des ROS mitochondriales est la dérégulation des mécanismes de transport des protéines vers la mitochondrie. La majorité des protéines mitochondriales est codée par le génome nucléaire et par la suite transportée vers la mitochondrie. Le renouvellement des composants structurels et fonctionnels de cette dernière dépend largement de la machinerie de transport de ces protéines du cytosol à la mitochondrie. Ainsi toute dérégulation de ces mécanismes de transport augmente la production de ROS due à l'insuffisance des processus de maintenance et de renouvellement du pool mitochondriale endommagé (Singh and Hood, 2011).

Enfin, des phénomènes de fission mitochondriale qui ont été décrit au cours de la ventilation mécanique (Picard et al., 2015a) pourraient également être impliqués dans la production de ROS mitochondriales (Yu et al., 2008a, 2011) (**Voir figure7**).

En effet, *in vivo*, la mitochondrie forme un véritable réseau interconnecté. Les mitochondries adaptent constamment leur morphologie afin de mieux répondre à la demande énergétique de la cellule qui varie en fonction des modifications des conditions extérieures. Ainsi, la forme de ce réseau mitochondrial change en continue du fait d'un cycle constant entre fission et fusion. L'équilibre dynamique entre ces deux phénomènes dépend de la taille, de la forme et de la complexité des connections établies au sein d'un réseau mitochondriale et de sa capacité à gérer la vie de la cellule (Dimmer and Scorrano, 2006).

La morphologie mitochondriale subit des modifications en réponse à une variation de la disponibilité de nutriments dans la cellule. Plusieurs études avaient identifié un lien entre la demande énergétique et l'architecture du réseau mitochondrial. En effet l'exposition des cellules à un environnement riche en nutriments entraîne une fragmentation mitochondriale alors que qu'un environnement pauvre en nutriments entraîne une élongation des mitochondries. Il semble que l'adaptation du métabolisme énergétique implique des adaptations morphologiques de la mitochondrie médiées par l'AMPK secondaire à la modification du ratio AMP/ATP. Ce remodelage mitochondriales sera détaillé dans le chapitre AMPK et fission mitochondriale.

Yu et collaborateurs (Yu et al., 2008a, 2011) ont mis en évidence une corrélation positive entre la présence de fission mitochondriale et la production de ROS par ces même mitochondries sans pour autant que l'on puisse bien déterminer si le phénomène de fission mitochondriale est la cause ou la conséquence de la production de ROS. La fission mitochondriale est accompagnée par une morphologie anormale, un gonflement et un agrégat de mitochondries de petite taille accumulé dans les myocytes (Yu et al., 2006a).

Cette dynamique mitochondriale implique des protéines transmembranaires de la mitochondrie, qu'on appelle «shaping proteins » (Dimmer and Scorrano, 2006; Youle and Karbowski, 2005).

Ainsi la fusion est régulée en partie par L-OPA1 (optic atrophy 1) et la mitofusine 1 et 2. Quant à la fission elle est régulée par Drp1 (dynamic related protein 1) et S-OPA1 (short isoforms of OPA1).

La mitochondrie est constituée de deux membranes bien distinctes (interne et externe) qui nécessitent lors des phénomènes de fusion et fission mitochondriales des mécanismes de régulation complexes et interconnectés que nous allons aborder dans les prochains chapitres.

a. La fusion de la membrane externe

Les mitofusines 1 et 2 (Mfn) orchestrent la fusion de la membrane externe et le maintien du réseau mitochondrial (Mishra and Chan, 2014a). Ces deux isoformes de Mfn possèdent un domaine catalytique de fixation du GTP sur la partie N-terminal et sont liées à la membrane externe de la mitochondrie par la partie C-terminale. Les mitofusines induisent la fusion par des interactions homo ou hétérotopiques qui dépendent de l'hydrolyse du GTP (**Voir figure 8**).

Ainsi la diminution de l'expression des Mfn 1 et 2 ou l'inhibition de l'activité GTPase bloque la fusion mitochondriale. *In vivo*, cette délétion chez la souris entraîne une létalité embryonnaire due à des aberrations mitochondriales au niveau cardiaque aboutissant à la dégénérescence des neurones de Purkinje (Chen et al., 2003).

Ainsi, la possibilité des mitochondries à former des réseaux va dépendre de l'expression des mitofusines qui est régulée par des mécanismes complexes à la fois transcriptionnels et post-transcriptionnels, mais également par le système ubiquitine protéasome qui active leur dégradation. (**Voir Figure 9**)

➤ *Régulation moléculaire des mitofusines : l'ubiquitination*

La phosphorylation et l'ubiquitination des mitofusines modulent la fusion de la membrane mitochondriale (Cohen et al., 2008; Rakovic et al., 2011; Ziviani et al., 2010). Une mutation de la Mfn2 cause une neuropathie périphérique (Charcot-Marie-Tooth de type 2). Cette mutation était initiatrice d'une ubiquitination et en conséquence d'une dégradation de la mitofusine 2 (Amiott et al., 2009). Plusieurs E3 ligases et enzymes déubiquitilases (DUB) ont été identifiées, et l'analyse de ces différents acteurs a révélé que l'ubiquitination des Mfns pourrait avoir des effets différents. D'un côté elle peut déclencher la dégradation des Mfns par le système ubiquitine protéasome entraînant une fission mitochondriale (Cohen et al., 2008; Neutzner and Youle, 2005; Rakovic et al., 2011; Rana et al., 2013; Ziviani et al., 2010). D'un autre côté l'ubiquitination des Mfns peut promouvoir la fusion mitochondriale (Anton et al., 2011, 2013; Cohen et al., 2011). Ce mécanisme sous-jacent a été bien décrit chez la levure. Fzo1 (homologue des Mfns chez les mammifères) est ubiquitiné par la E3 ligase SCF^{Mdm30} pour induire son oligomérisation et stimuler la fusion mitochondriale (Anton et al., 2013).

Chez les mammifères, l'ubiquitination et le turnover des Mfns (synthèse et dégradation) se produisent dans des conditions de stress variées et auraient comme conséquence l'activation de la mitophagie. PINK1 (sérine/thréonine kinase) a été identifié comme une kinase capable de phosphoryler plusieurs protéines situées sur la membrane externe de la mitochondrie telles que la Mfn2. Ainsi PINK1 permet de recruter Parkin (E3 ubiquitine ligase) ce qui permet de déclencher le processus d'ubiquitination de la mitofusine2.

Ainsi, une dérégulation de PINK1 ou PARKIN présente dans certaines pathologies comme la maladie de Parkinson, entraîne une désorganisation des mécanismes de contrôle et de maintien d'un réseau mitochondriale de bonne qualité. Cette défaillance participe aux mécanismes physiopathologiques impliqués.

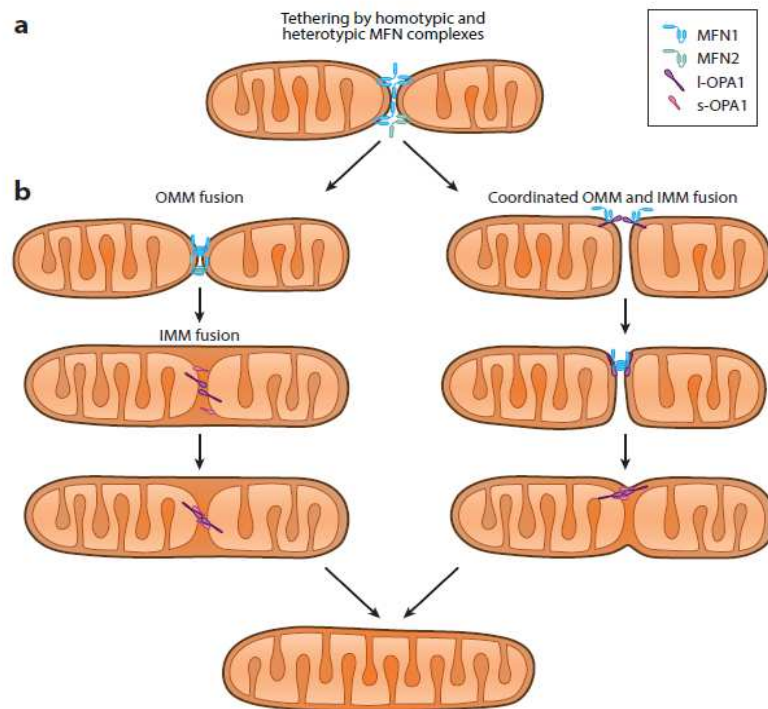


Figure 8 : La fusion de la membrane interne et externe : un évènement indépendant ou simultané ?

- a. représentation schématique d'un contact homotypique entre deux mitochondries (Mfn1-Mfn1 et Mfn2-Mfn2) ou hétérotypique (Mfn1-Mfn2).
- b. (à gauche) la fusion de la membrane externe peut se produire en décalage avec la fusion de la membrane interne. (à droite) la fusion de la membrane externe pourrait être coordonnée avec la fusion de membrane interne. Cet évènement résulte de la formation d'un mitochondrion en regroupant le contenu des deux mitochondries. Abréviations: IMM (inner mitochondrial membrane), OMM (outer mitochondrial membrane), L-OPA1 (long isoforms of OPA1), S-OPA1 (short isoforms of OPA1), MFN (mitofusine)

En effet, dans des conditions normales, PINK1 subit une translocation vers la matrice mitochondriale. Il possède un domaine sensible au potentiel de la membrane mitochondriale qui s'appelle MTS (mitochondria targeted signal). Ce domaine est régulé par des peptidases mitochondriales intra-membranaires (IMM) et souvent soumis à la dégradation (Yamano and Youle, 2013).

Dans des conditions de stress avec une diminution du potentiel de la membrane mitochondriale, PINK1 s'accumule sur la membrane externe et s'échappe à la dégradation. Un tel mécanisme a été décrit comme une régulation explicative de la sélectivité de PINK1 aux mitochondries à faible potentiel membranaire, paramètre de mauvaise qualité, et qui facilite par la suite le recrutement de Parkin du cytosol vers ces mitochondries défaillantes pour déclencher un processus d'ubiquitination (Matsuda et al., 2010; Narendra et al., 2010; Yamano and Youle, 2013). Ainsi, l'activité de PARKIN, qui est réprimée dans les conditions normales, est rétablie au sein des mitochondries dépolarisées (**voir figure 9**).

La stabilisation de PINK1 augmente l'ubiquitination des protéines de la membrane externe dont les mitofusines, qui sont ensuite éliminées par le protéasome. La conséquence est une élimination de la mitochondrie par des mécanismes de fission prépondérante et de mitophagie que nous verrons dans les chapitres ultérieurs.

Le rôle important de cette protéine est mis en avant par la réversion du processus d'ubiquitination par la débiquitilase USP30, qui est une enzyme à effet antagoniste à PARKIN. Elle stabilise donc les mitofusines et les protégées contre la dégradation par le protéasome ce qui améliore les processus de fusion et la viabilité cellulaire (Cunningham et al., 2015; Liang et al., 2015).

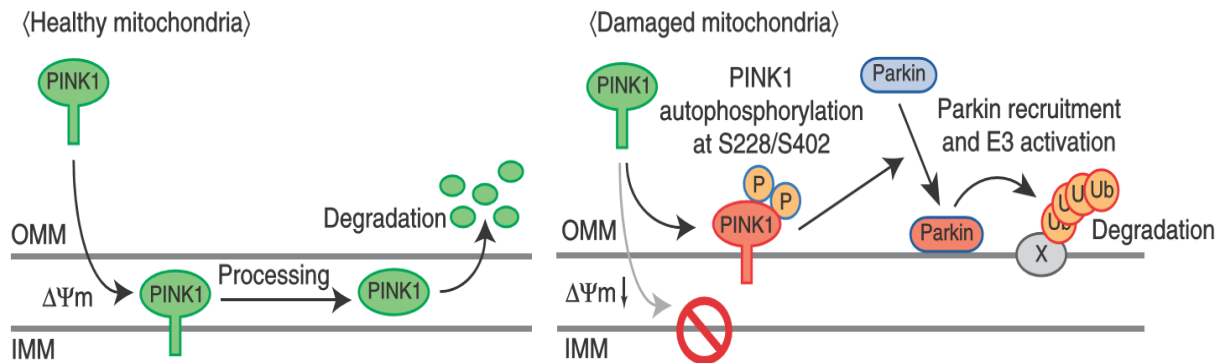


Figure 9: un modèle de recrutement de Parkin à la mitochondrie endommagée.

L'intégrité de la mitochondrie est détectée et traduites à Parkin par deux processus. L'échappement de PINK1 à la dégradation et son autophosphorylation sur la Ser228 et la Ser402. Les deux étapes sont nécessaires pour optimiser le recrutement de Parkin et son activation

(Kei okatsu 2012).

➤ *Régulation moléculaire des mitofusines : la phosphorylation*

Les phénomènes de phosphorylation inhibent la fusion. En effet, la phosphorylation de la Mfn2 par JNK (c-Jun N-terminal kinases) en réponse à un stress cellulaire induit un recrutement de l'E3-ubiquitine ligase HUWE1 qui va ensuite activer la dégradation de la Mfn2 (Leboucher et al., 2012). Ainsi quand on bloque cette phosphorylation on prévient la dégradation de la Mfn2, avec une stimulation plus importante de la fusion qui a une action protectrice vis à vis de la mort cellulaire par des mécanismes d'apoptose ou d'autophagie. PINK1 a été également identifiée comme une kinase capable de phosphoryler une variété de protéines de la membrane mitochondriale externe y compris la Mfn2 (Narendra et al., 2008). En utilisant la technique de co-immunoprécipitation des cellules HEK (Humain embryonic kidney), Chen a montré une augmentation de l'association de Parkin à la mitofusine 2 en réponse à une surexpression de PINK1. Cette association est facilitée par l'action de phosphorylation de la Mfn2 par la sérine/thréonine kinase PINK1 sur trois sites différents : T111, S442 et Y448. Une mutation sur ces résidus en remplaçant la sérine ou la tyrosine par une alanine inhibe complètement l'interaction entre Parkin et la Mfn2 et constitue une barrière vis-à-vis de l'ubiquitination et en conséquence le contrôle de la qualité mitochondriale par la mitophagie. A une échelle plus large, l'inhibition de cette modification post-traductionnelle engendre des mitochondries endommagées. Ceci est largement décrit dans des neuropathies dégénératives comme la maladie de Parkinson (Chan et al., 2011; Chen and Dorn, 2013).

La possibilité de s'organiser en réseau implique également que la mitochondrie puisse se déplacer à l'intérieure du cytoplasme de la cellule. Cette motilité est prise en charge par 3 protéines qui forment un complexe de transport des mitochondries: Miro, Milton et KHC.

Miro est un composant du complexe moteur et adaptateur de transport de la mitochondrie dans la cellule (Wang et al., 2011). Dans les neurones par exemple, le transport de la mitochondrie

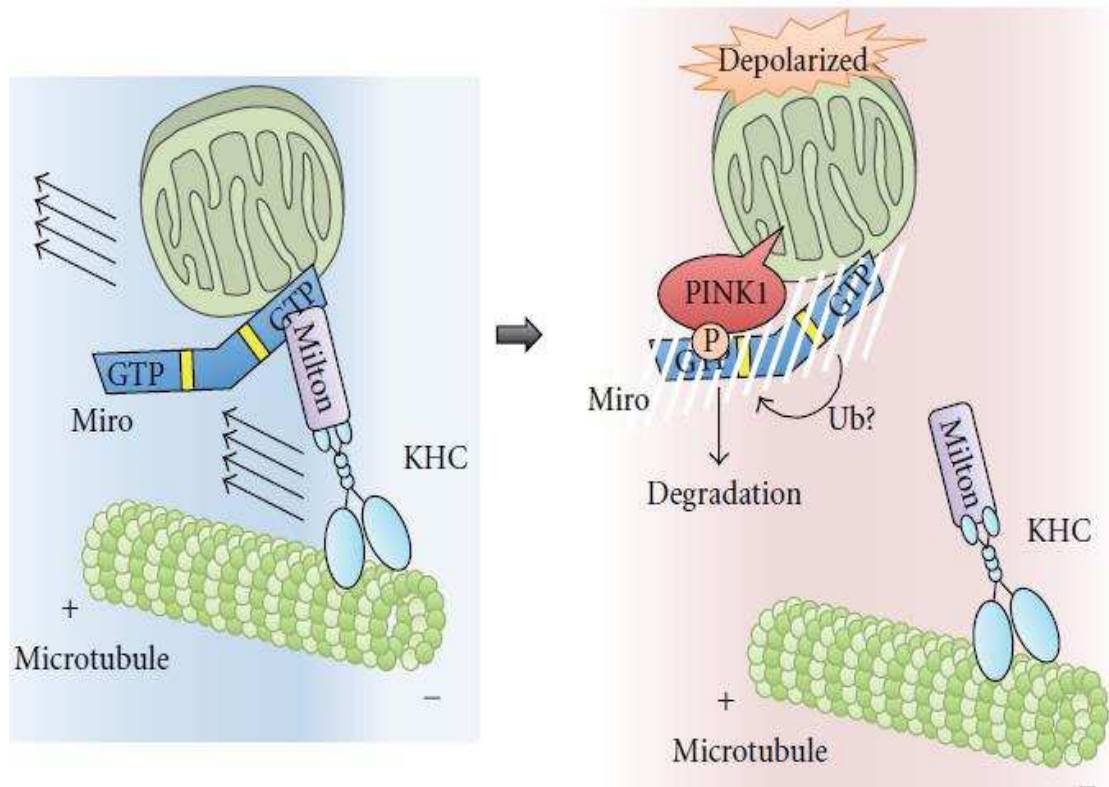


Figure 10: Le mécanisme par lequel PINK1/ Parkin entrave la motilité mitochondriale.

Le transport des mitochondries à longue distance repose sur l'action d'un complexe moléculaire moteur incluant KHC, Milton, et Miro. Quand la mitochondrie se dépolairise, PINK1 se stabilise et phosphoryle Miro sur la Ser156. Une interaction postérieure entre Parkin et Miro entraîne une probable dégradation par le protéasome et entrave la motilité mitochondriale (Wang et al., 2011).

sur une grande distance (corps cellulaire vers l'axone) dépendant de l'action de ce complexe moteur. La protéine KHC (Kinesin Heavy chain) assure la motricité du complexe. Milton (kinesin associated protein) se lie en même temps aux microtubules de transport et Miro qui fixe la mitochondrie à transporter (**Voir figure 10**). Dans les neurones ce processus permet de positionner la mitochondrie à proximité de la synapse afin de maintenir une production locale d'ATP adéquate (Sheng and Cai, 2012). Une étude récente a montré que le recrutement de PINK1 à la membrane des mitochondries dépolarisées entravait la motilité mitochondriale par la phosphorylation de Miro, qui ensuite était dégradé par le complexe ubiquitine protéasome (Wang et al., 2011) (**Voir figure 10**).

Ainsi, comme nous l'avons illustré précédemment, l'augmentation de la dégradation des mitofusines impactent la dynamique mitochondriale. Il en est de même pour la dérégulation de leur synthèse. En effet, des dommages oxydatifs ou génotoxiques bloquant la translocation des ARNm de la Mfn1 entraînent une diminution de sa synthèse avec une fragmentation mitochondriale. De même une stimulation de la translocation des ARNm permet de stabiliser l'expression du Mfn1 et protège contre la mort cellulaire dans l'infarctus myocardique (Li et al., 2014). L'activité transcriptionnelle (stimulation de la transcription du gène correspondant) de la Mfn2 peut être également augmentée par le coactivateur de transcription PGC1-beta (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta) qui est un régulateur important de la fusion mitochondriale (Liesa et al., 2008a). Ainsi sur un modèle de souris KO pour PGC1-beta il existe une diminution de l'expression de la Mfn2 dans les différents tissus. De même, la surexpression du PGC1-beta stimule la biogénèse mitochondriale qui est associé à une augmentation des taux d'ARNm de Mfn2 ainsi que son expression protéique, permettant par la même occasion une élongation mitochondriale, un développement en réseau par des

phénomènes de fusion (Liesa et al., 2008b). Toutefois, cette surexpression augmente aussi l'expression d'autres gènes mitochondriaux notamment OPA1, ainsi il n'est pas possible de conclure que l'effet reporté est spécifique à la Mfn2.

Cette étude de Liease et coll. a mis en évidence une interaction logique entre la biogénèse mitochondriale et la régulation de la fusion de la membrane mitochondriale externe. Un autre acteur de la fusion mitochondriale est la mitoPLD membre de la famille des phospholypase de Type D (codé par PLD6). Elle est également ancrée à la membrane mitochondriale externe. Cette protéine est capable de convertir la cardiolépine en acide phosphatidique (AP). Cette activité enzymatique est un prérequis pour la fusion. En effet, AP facilite le recrutement de plusieurs types de complexes protéiques, des kinases et stimule la machinerie de transport intracellulaire.

L'ablation de la mitoPLD sur un modèle de souris transgénique (MitoPLD^{-/-}) entraîne une fragmentation de la mitochondrie (Choi et al., 2006; Huang et al., 2011).

b. La fusion de la membrane interne

OPA1 (optic atrophy 1) est lié à la membrane interne de la mitochondrie par son domaine transmembranaire N-terminale. Le corps de la protéine incluant les domaines de liaison à la GTP est exposé à l'action des GTPase présentes dans l'espace intramitochondrial. Plusieurs formes d'OPA1 coexistent dans le tissu des mammifères qui résultent d'un épissage alternatif et de clivage protéolytique. Un épissage alternatif d'OPA1 donne naissance à une longue forme d'OPA1 (L-OPA1) qui sera clivée par la suite pour donner une forme courte (S-OPA1). Ce clivage se fait par deux peptidases intra mitochondriales : OMA1 et YME1L (Anand et al., 2014). Les différents stimuli qui induisent une activation de l'OMA1 induisent un clivage de L-OPA1 et en conséquence une accumulation de S-OPA1, ce qui va se traduire par une

fragmentation des mitochondries (Ishihara et al., 2006). Ainsi le rôle de L-OPA1 est de contrebalancer la fission et de préserver le réseau mitochondriale. Récemment il a été montré que la surexpression de L-OPA1 est suffisante pour induire une fusion mitochondriale et maintenir des mitochondries tubulaires alors que la surexpression de S-OPA1 est associée à la fission (Ban et al., 2010; Tondera et al., 2009). Actuellement il est proposé qu'OPA1 pourrait être transporté du cytosol vers la mitochondrie par des mécanismes inconnus pour être par la suite clivé par des peptidases mitochondriales (Anand et al., 2013).

La membrane mitochondriale interne forme des invaginations qu'on appelle crêtes mitochondriales (Perkins et al., 1997). Il a été montré que la surexpression de la forme longue d'OPA1 augmente le nombre de ces crêtes ainsi que leur largeur (Mannella, 2006). Ces crêtes ont un rôle important que nous allons détailler.

A la base, les crêtes forment une jonction qui s'abouche à la membrane interne (CJs), dont l'orifice est restreint (20 à 50 nm de diamètre). Le rôle de ces jonctions est de prévenir la diffusion, entre l'espace contenu dans les crêtes et l'espace intra-membranaire, des protéines et des métabolites séquestrés dans la lumière formée par les crêtes, permettant ainsi la régulation de leur circulation dans la mitochondrie (Mannella, 2006). **Cf. Figure 11.**

Les crêtes mitochondriales sont riches en protéines telles que la frataxine qui est impliquée dans la biogénèse des centres fer/soufre (Pernas and Scorrano, 2016) ou les complexes de la chaîne respiratoire (Cogliati et al., 2013; Gilkerson et al., 2003; Kopek et al., 2013; Vogel et al., 2006). Ces crêtes peuvent varier de configuration (Mannella, 2006; Zick et al., 2009) en fonction des modifications de l'environnement (Hackenbrock, 1966, 1968) telles que la réplication, ou la présence d'un stress métabolique. La conséquence est une modification de l'interaction entre les membranes de différentes crêtes ou l'ouverture de leurs jonctions, ce qui va réguler la diffusion de toute une batterie de protéines que va agir sur la fonction mitochondriale.

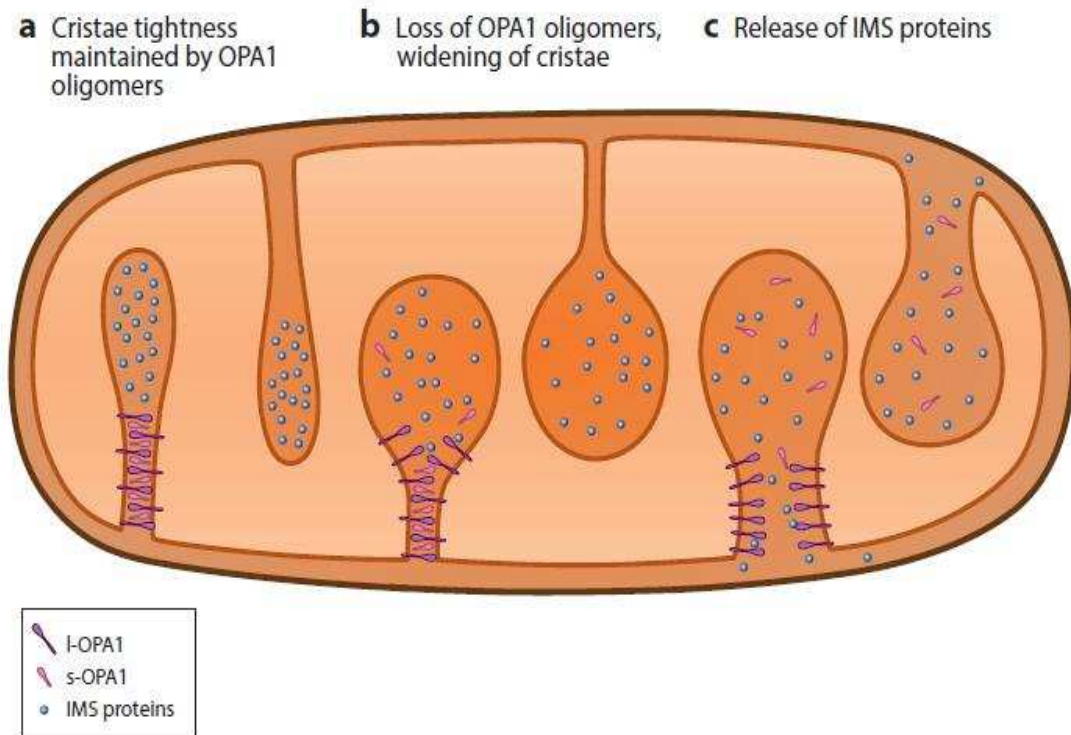


Figure 11 : Remodelage des crêtes mitochondriales par OPA1

- a. Maintenance de la structure de la crête et sa jonction par oligomérisation de L-OPA1 et S-OPA1.
- b. perturbation de l'oligomérisation d'OPA1 et élargissement des crêtes mitochondriales.
- c. Perte de la structure de la crête, ouverture de la jonction et relargage des protéines séquestrées. Abbreviations: IMS (inner membrane space), L-OPA1 (long isoforms of OPA1), S-OPA1 (short isoforms of OPA1)

(Pernas L Annu Rev Physiol. 2016).

En effet, il a été montré par exemple que la réduction de la largeur de ces crêtes diminue le relargage de facteurs pro-apoptotiques suite un stress, limitant ainsi les stimuli de mort cellulaire (Cipolat et al., 2006; Frezza et al., 2006).

Récemment il a été observé que les crêtes mitochondriales sont plus abondantes au niveau des zones de contact ou points de contact électron dense entre les mitochondries. Ceux-ci augmentent avec la stimulation de la biogénèse mitochondriale liée au phénomène de fusion, renvoyant à une possible implication du remodelage de ces crêtes dans la dynamique mitochondriale (Picard et al., 2015b). Bien qu'il existe des protéines qui maintiennent la structure de ces crêtes comme l'ATP synthase et son inhibiteur endogène IF1 (Daum et al., 2013; Faccenda et al., 2013), le mécanisme précis de ce remodelage n'est pas encore bien élucidé.

Toutefois OPA1 semble être un acteur majeur dans ce remodelage (Cipolat et al., 2004; Wong et al., 2000). En effet, la sous-expression de S-OPA1 chez un modèle de souris double KO Yme1L et Oma1 (qui clivent L-OPA1 en S-OPA1) augmente également le nombre de ces crêtes ainsi que leur largeur (Anand et al., 2014). Toutes ces données récentes vont donc dans le sens d'une interaction entre la morphologie des crêtes et la morphologie de la mitochondrie.

c. La fission de la membrane externe

Drp-1 (Dynamamin related protein-1) est responsable de la fission de la membrane mitochondriale externe suite à un signal cellulaire qui induit sa translocation à cette membrane. A ce moment Drp-1 s'oligomérisse au niveau des futurs sites de division de la mitochondrie, en formant une structure en anneau (Friedman et al., 2011). Plusieurs site de liaison et facteurs de recrutement pour Drp-1 ont été identifiés sur la membrane externe de la mitochondrie : FIS1, MFF, MiD49, et MiD51 (**voir figure 12**) (Labbé et al., 2014).

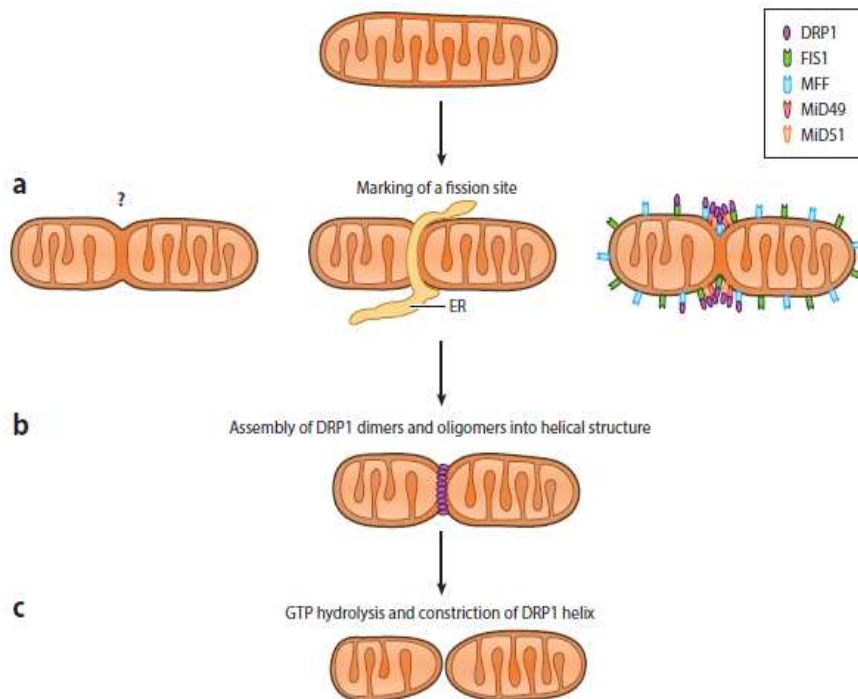


Figure 12: Induction de la fission mitochondriale par Drp1 et d'autres éléments cytoplasmique.

a) Recrutement du Drp1 sur les sites potentiels de fission grâce à des récepteurs spécifiques qui sont associés au RE. Le mécanisme qui associe Drp1 au RE reste inconnu. b) assemblage du Drp1 en forme d'anneau au tour du site de fission. c) Drp1 hydrolyse de la GTP et divise la membrane pour générer deux mitochondries. Abréviations Drp1, dynamin-related protein1; ER, endoplasmic reticulum; Fis1, fission1; GTP, guanosinetriphosphate; IMM, inner mitochondrial membrane; MFF, mitochondrial fission factor; MiD49 et MiD51, mitochondrial dynamics proteins of 49kDa et 51 kDa; OMM, outer mitochondrial membrane (**Pernas L. Annu Rev Physiol. 2016**).

Les sites impliqués dans la fission mitochondriale présentent des points de contact avec le réticulum endoplasmique (RE) et l'actine, qui avec le recrutement de Drp-1 forment des structures multimériques (voir **figure 12 et 13**). Une fois recruté sur la membrane externe de la mitochondrie, le GTP (guanosine triphosphate) s'hydrolyse pour donner de l'énergie nécessaire à la modification de la conformation du Drp-1 et une scission de la membrane mitochondriale (Mears et al., 2011). Il existe plusieurs types de modifications post-traductionnelles du Drp-1 qui peuvent affecter son recrutement par la mitochondrie et son fonctionnement (phosphorylation, ubiquitination, et sumoylation) (van der Blik et al., 2013). Le rôle de Drp-1 est mis en avant par les mitochondries issues des cellules déficitaires en Drp-1, qui adoptent une configuration tubulaire, témoin d'une absence de phénomène de fission. Le rôle d'un équilibre entre fission et fusion mitochondriale, gage d'un bon fonctionnement mitochondrial est mis en avant chez les patients ayant une mutation négative pour Drp-1. Sans que les mécanismes impliqués soient clairement établis, ils présentent un désordre néonatal caractérisé par une microcéphalie congénitale, une atrophie optique, une hypoplasie, une acidose lactique et un taux élevé des acides gras à longue chaîne dans le sérum (Waterham et al., 2007). Certains de ces marqueurs cliniques sont également clairement retrouvés dans les autres mitochondriopathies, mettant en avant une altération du turnover mitochondrial, nécessaire à l'élimination des mitochondries défectueuses.

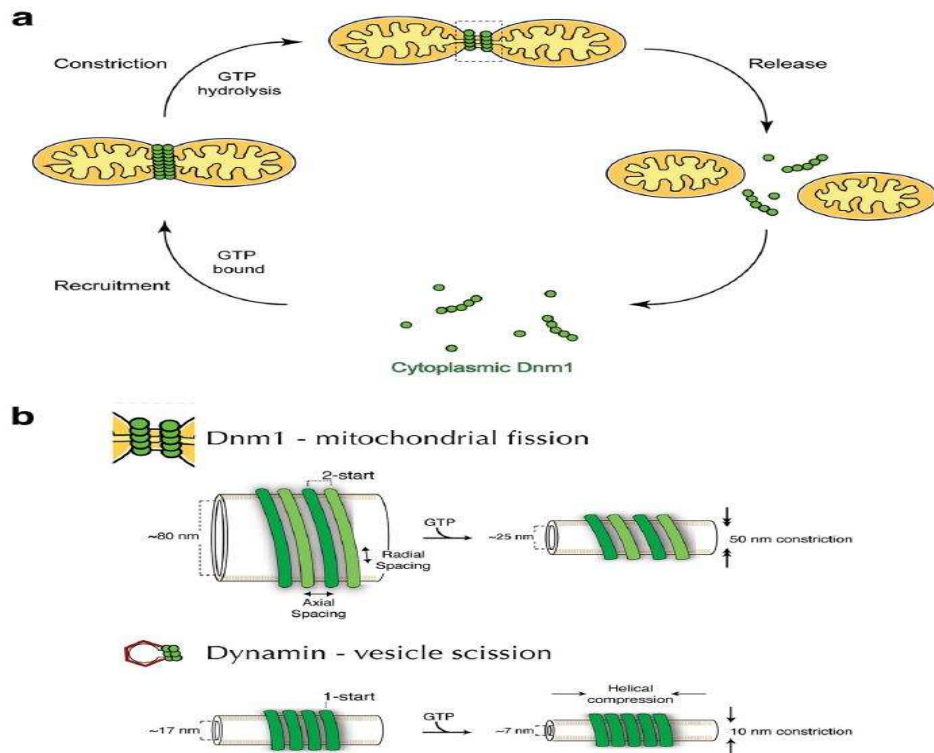


Figure 13 : Un modèle de fission mitochondriale médiée par Dnm1 (homologue de Drp1)

- a. Une force contractile active était proposée pour jouer un rôle dans la fission mitochondriale, ou Dnm1 est recruté par la mitochondrie pour induire une constriction de la membrane mitochondriale.
- b. Différences d’emballage hélicoïdal et les changements de conformations entre Dnm1 et Dyn suite à l’hydrolyse du GTP. Contrairement à Dyn-1, Dnm se rassemble sous forme d’une double hélice sans compression axiale observée quand on rajoute de la GTP. La partie luminal des tubes Dnm1 diminue de 80 à 25 nm alors que celle de la dynamine passe de 20 à 10 nm

(Mears, J.A.Nat. Struct. Mol. Biol. 2011).

➤ **Modifications post-traductionnelles de Drp1 : La phosphorylation**

Ces modifications de Drp1 sont avancées comme un mécanisme émergent qui régule son activité au cours de la fission mitochondriale.

Les premières études basées sur l'observation de la phosphorylation de Drp1 sur le résidu Ser585 par le complexe CDK1/cycline protéine kinase B, suggèrent que ce mécanisme est à l'origine de la fragmentation mitochondriale dans les cellules en mitose (Taguchi et al., 2007). En effet cette phosphorylation affecte en particulier la fonction du domaine du Drp1 GED (GTPase effector domain) et en conséquence les interactions intra et intermoléculaires impliquant le GTP et les enzymes qui l'hydrolyse et aussi entre les molécules de Drp1 eux même recrutés à la surface de la mitochondrie. La conséquence est une nouvelle répartition spatiale des mitochondries, prérequis pour le processus de fission.

D'autres protéines comme Dnm1 (homologue de Drp1), (Mears et al., 2011) dont le mécanisme d'action est décrit dans **la figure 13**, semble être également impliqué dans les phénomènes de fission, une fois phosphorylé par une kinase. Mais le rôle respectif, la part relative de chacun d'eux et leur interaction dans l'induction de la fission mitochondriale sont inconnues.

Toutefois ces deux dernières protéines régulatrices semblent être essentielles pour induire une fission mitochondriale au cours de la mitose afin de maintenir un pool mitochondriale identique dans les deux cellules filles (Bleazard et al., 1999; Otsuga et al., 1998).

Ainsi les quelques études qui se sont intéressées au rôle de la phosphorylation/déphosphorylation sur les différents sites des protéines régulatrices de la fission mitochondriales, se sont focalisées sur Drp1 (Jezek and Plecítá-Hlavatá, 2009; Kanamaru et al., 2012).

Cependant le mécanisme qui lie la phosphorylation du Drp1 sur la serine Ser585 à la fission mitochondriale est encore mal compris.

A côté des effets intramoléculaires directs de la phosphorylation de GED, la stimulation de l'activité du complexe CDK1/cycline protéine kinase B (kinase post-mitotique) phosphoryle directement Drp1 (Yamano and Youle, 2011) et induit donc un phénomène de fission mitochondriale au niveau de la membrane externe, d'autres mécanismes sont également proposés (Harder et al., 2004a; Karbowski et al., 2007; Nakamura et al., 2006a; Wasiak et al., 2007; Yonashiro et al., 2006a). Notamment la présence d'une interaction de Drp1, une fois phosphorylé, avec d'autres protéines impliquées dans la fission comme l'endophiline B1 qui semble également être impliqués dans un phénomène d'induction de fission (Karbowski et al., 2004; Takahashi and Mori, 2011). A l'inverse, le rôle et la régulation des phosphatases sur Drp1 au niveau de la ser585 reste un élément inconnu.

La régulation des différentes kinases qui phosphoryle Drp1 semble être un élément essentiel de sa fonction. En effet, une phosphorylation réversible sur une autre serine (Ser637) du domaine N-terminal de GED sur Drp1 a été récemment identifiée, et médiée par la protéine Kinase A dépendante de l'AMP (Cribbs and Strack, 2007)(Chang and Blackstone, 2007; Cribbs and Strack, 2007). De façon opposée, cette phosphorylation inhibe l'activité GTPase du Drp1 (Chang and Blackstone, 2007). Elle est à l'origine d'une inhibition de la fission mitochondriale et promeut l'élongation de la mitochondrie avec un effet anti-apoptotique d'origine mitochondriale. En effet, un mutant chez le rat surexprimant la protéine Kinase A dépendante de l'AMP à la base de la phosphorylation de la serine 637 sur Drp1, montre une protection vis à vis des phénomènes de fissions et une diminution de la sensibilité à l'apoptose (Cribbs and Strack, 2007). **(Voir figure 14).**

Ces mêmes auteurs ont identifié que la déphosphorylation du Drp1 sur la serine 637 pouvait être également médiée par des phosphatases serine/thréonine (calcineurine) appelée aussi

phosphatase 2B. La conséquence est un phénotype ponctiformes des mitochondries avec activation de l'apoptose d'origine mitochondriale (Cribbs and Strack, 2007).

Ainsi, cette étude révèle un important mécanisme de régulation de la phosphorylation sur Drp1 et ses incidences sur la dynamique mitochondriales et la régulation des messagers de mort cellulaire programmée.

➤ **Modifications post-traductionnelles de Drp1 : Ubiquitination**

Des études récentes ont montré que l'activité du Drp1 pourrait être également modulée par des phénomènes d'ubiquitination. En générale l'ubiquitination est un mécanisme régulateur des protéines cellulaires qui agit par un marquage des protéines activant leur dégradation et réduisant donc leur expression dans un souci de contrôle de qualité des protéines. Le E3 ubiquitine ligase mitochondrial MARCH V (appelée aussi MITOL) a été identifiée comme un régulateur crucial de la dynamique mitochondriale (Karbowski et al., 2007; Nakamura et al., 2006b; Yonashiro et al., 2006b) (**Voir figure 15**).

Mais, initialement proposé comme un promoteur de la fusion mitochondriale (Nakamura et al., 2006b; Yonashiro et al., 2006b), Karbowski et al ont récemment montré un effet opposé, en proposant que MARCH V puisse également soutenir la fission en facilitant le trafic subcellulaire et le recrutement de Drp1 au niveau des sites de division mitochondriale sans affecter la stabilité de Drp1. En effet, une mutation sur le domaine RING de MARCH V résulte en un phénotype mitochondrial marqué par une fusion prononcée (Karbowski et al., 2007).

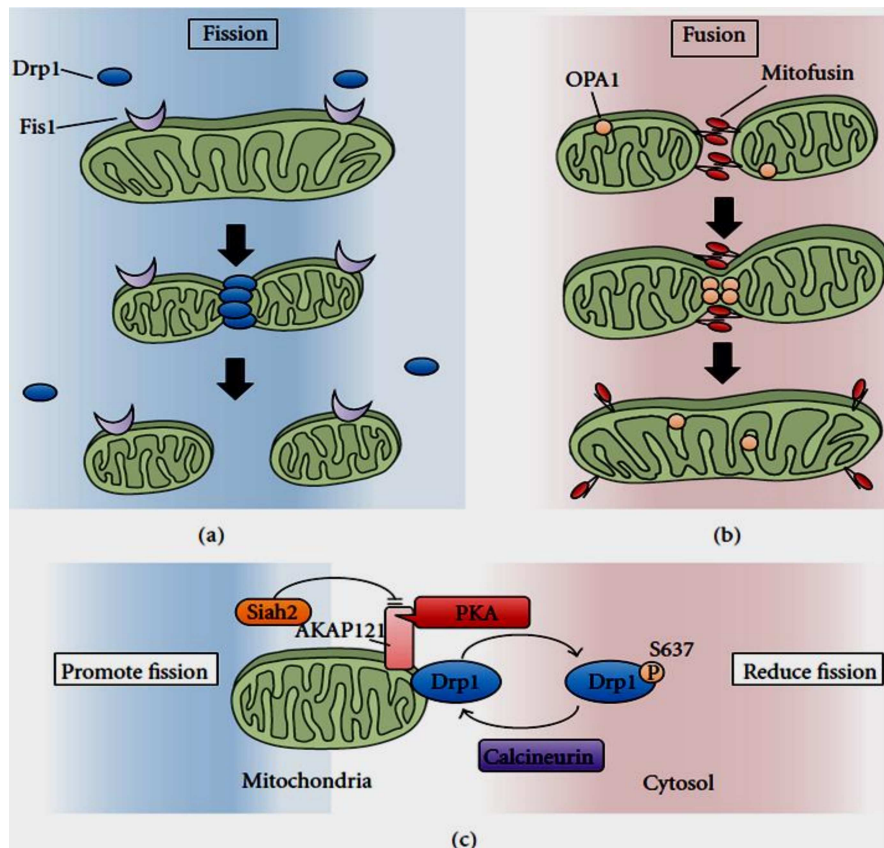


Figure 14: modification biochimique et Fission/fusion mitochondriale.

a. induction de la fission par DRP1. DRP1 est recruté par la membrane externe de la mitochondrie sur les sites potentiels de fission. Fis1 est localisé sur la membrane mitochondriale externe et considéré comme un récepteur de DRP1.

b. la fusion est induite par OPA1 et les mitofusines. L'interaction entre ces différentes protéines attache deux mitochondries adjacentes. Les mitofusines induisent la fusion de la membrane externe tandis qu'OPA1 induit celle de la membrane interne.

c. l'activité du DRP1 est contrôlée par sa phosphorylation sur la Ser637. La PKA induit cette phosphorylation et inhibe la translocation du DRP1 vers les sites de son recrutement sur la membrane de la mitochondrie. AKAP121 est une protéine adaptatrice localisé sur la mitochondrie et qui facilité la phosphorylation du DRP1. Siah2 induit la dégradation d'AKAP121 pour diminuer la phosphorylation du DRP1 ce qui résulte à une fission mitochondriale

(Yusuke Kanamaru 2012).

➤ **Modifications post-traductionnelles de Drp1 : Sumoylation**

Harder et ses collaborateurs ont récemment évoqué que la protéine Small ubiquitin-like modifier (SUMO) est également impliquée dans la régulation de l'activité du Drp1 (Harder et al., 2004b).

La sumoylation est un autre processus de modification post-traductionnel qui aboutit à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines sur une lysine se liant à une protéine cible dans le but de la protéger de la destruction par ubiquitination. La protéine SUMO-1 et son enzyme conjugué Ubc9 agissent comme un stabilisateur du Drp1 vis à vis de la protéolyse conduisant à une fission mitochondriale.

Durant l'apoptose, Drp1 s'associe à la membrane mitochondriale et le turnover entre son ubiquitination et sa sumoylation (le maintien d'une balance) s'estompe (Santel and Frank, 2008).

De la même manière que la régulation de la phosphorylation de Drp1 vue au chapitre précédent, il existe également des processus de desumoylation par la protéase sentrin/SUMO (SENP5) d'origine cytoplasmique, qui va donc favoriser sa dégradation pas des processus d'ubiquitination limitant ainsi le taux de protéines Drp1, avec inhibition des phénomènes de fission mitochondriale (Zunino et al., 2007).

Ainsi, la surexpression de SENP5 inhibe la fragmentation mitochondriale induite par SUMO1 dans un modèle de culture cellulaire, et la perte de fonction de SENP5 résulte en une diminution de la fusion mitochondriale induisant un phénotype ponctiformes et corrélé avec une augmentation de la production de ROS (Zunino et al., 2007). Cette protéine contribue aux effets observés sur la morphologie mitochondriale.

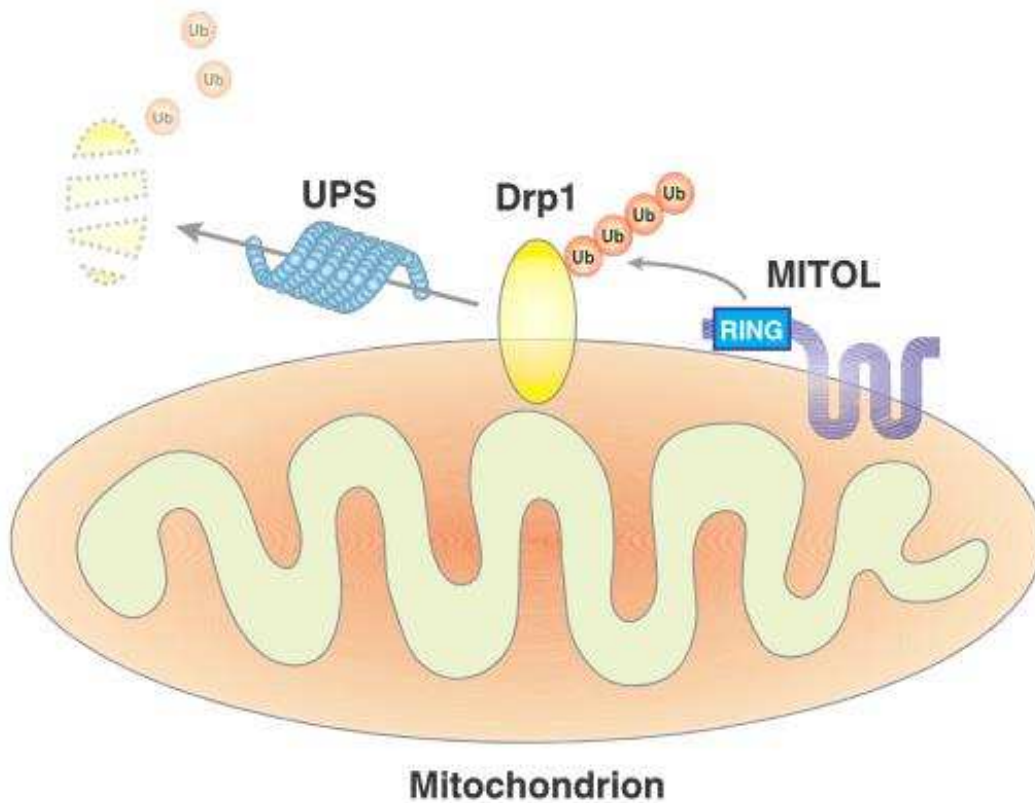


Figure 15: Le rôle de MITOL dans la détermination de la morphologie mitochondriale.

C'est une E3 ubiquitine ligase avec 4 domaines transmembranaire et située sur la membrane externe de la mitochondrie. Elle régule l'ubiquitination du Drp1 et induit sa dégradation par le protéasome 26S (UPS) (Shun et al., 2014).

d. La fission de la membrane interne

Deux protéines majeures ont été proposées pour induire une fission de la membrane interne de la mitochondrie: **MTP18** et **S-OPA1**.

Mitochondrial protein 18kD (MTP18) est une protéine membranaire impliquée dans la maintenance d'une morphologie normale de la mitochondrie (Tondera et al., 2004). Sa déplétion entraîne la fusion mitochondriale alors que son expression ectopique entraîne une fragmentation prononcée d'une façon concomitante avec son rôle dans la fission mitochondriale (Tondera et al., 2005). Cette surexpression est corrélée avec les phénomènes de recrutement de Drp-1 pourtant la nature moléculaire de cette interaction reste un mystère d'où l'importance de mener d'autres études pour comprendre ses mécanismes d'implication dans la fission membranaire.

Le second acteur de la fission de la membrane interne de la mitochondrie est le S-OPA1, généré du clivage protéolytique du L-OPA1 par les deux enzymes OMA1 et YME1L. Le clivage de L-OPA1 se produit à différents sites et a plutôt les mêmes conséquences fonctionnelles: cela limite la fusion et augmente la fission mitochondriale. Les protéases qui sont à l'origine de ce clivage sont activées par différents stimuli comme la perturbation de l'homéostasie cellulaire et les dommages génétiques (Baker et al., 2014). Curieusement l'augmentation de la phosphorylation oxydative stimule le clivage de L-OPA1 par YME1L *in vitro* (Mishra et al., 2014) suggérant que ce dernier est sensible au stress métabolique. En effet c'est probablement à travers OMA1 et YME1L que la mitochondrie adapte sa morphologie pour faire face à la variation de l'homéostasie énergétique de la cellule. **Voir figure 17.**

Table 1: Les différents types de régulations du DRP1.

La régulation de DRP1	
Partenaire	Effet biologique
Bax/Bak	association mitochondriale de DRP1 favorise la fusion dans des conditions
Fis	Proposé comme un récepteur de DRP1
Cyclin B-dependent kinase	Favorise la fission mitochondriale au cours de la mitose via la phosphorylation de DRP1 sur la Ser585
cAMP-dependent kinase (PKA)	Phosphoryle DRP1 sur la Ser637 par la PKA et favorise la fusion
Calcineurine	Déphosphoryle DRP1 sur la Ser637
SUMO1	La sumoylation du DRP1 est corrélée avec une association membranaire stable et un phénotype de fission.
SENP5	Diminue les taux du DRP1 à travers la desumoylation et entraîne une fragmentation mitochondriale.

2.3.1. Fission et mitophagie

La séparation du pool de mitochondries endommagées de celui intact aurait pour but la dégradation de la partie non fonctionnelle. Dans ce cas la fission mitochondriale peut être considérée comme un prérequis pour la mitophagie (Twig et al., 2008). Twig et al ont montré que dans les cellules des mammifères la fission médiée par Drp1 est un élément préalable pour la dégradation de la mitochondrie et que le blocage de l'autophagie entraîne une accumulation des protéines mitochondriales oxydées (Twig et al., 2008). Des résultats contradictoires sur le rôle de la fission dans la mitophagie ont été reportés sur les cellules de la levure. En particulier l'implication de la GTPase Dnm1, un orthologue de Drp1 reste un sujet de grand débat. Sur un screening génomique, la délétion de Dnm1 montre une réduction de la mitophagie tandis que la délétion d'autres facteurs de fission comme Fis1, Mdiv1 et Caf4 ne montre pas un tel changement (Mendl et al., 2011). De même, l'induction de la mitophagie par la suppression de Mdm38 pourrait être prévenue par la délétion de Dnm1 supportant la théorie de la dépendance de la mitophagie vis-à-vis la fission (Nowikovsky et al., 2007). Cependant un deuxième screening ne montre aucun rôle du Dnm1 ou d'autres facteurs de fission dans la mitophagie (Okamoto et al., 2009).

Récemment il a été évoqué avec plus de détails l'effet de l'altération de la dynamique mitochondriale sur la mitophagie en utilisant des tests enzymatiques, biochimiques et de fluorescences (Mendl et al., 2011). Cette étude a montré que la fragmentation mitochondriale toute seule n'est pas suffisante pour induire une mitophagie.

Par ailleurs l'inhibition de la phosphorylation oxydative n'induit pas la mitophagie. En effet quand la fission est bloquée par l'expression d'un dominant négatif variant de Dnm1, le taux de mitophagie induite par la rampamycine n'est pas altéré comparé à la condition contrôle. En

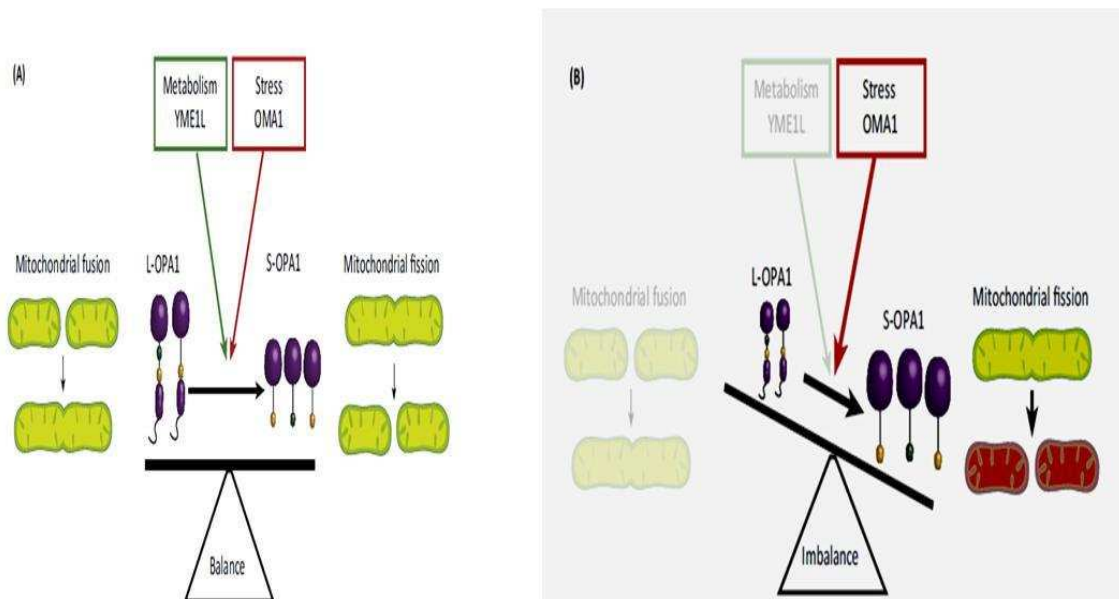


Figure 17: La régulation protéolytique d’OPA1 et balance de la dynamique mitochondriale. La forme L-OPA1 est clivée en forme courte S-OPA1 par la protéase mitochondriale OMA1 et YME1L en réponse à un stress métabolique généralement. L’équilibre entre la forme longue et la forme courte d’OPA1 préserve un réseau mitochondrial réticulé et tubulaire. Dans des conditions de stress, OMA1 est hyper-activée et clive excessivement L-OPA1 en S-OPA1 qui va accélérer la fission et la fragmentation du réseau mitochondrial (Wai et al *sciences* 2016 *Sciences*).

plus les souches déficientes en facteurs de fission Dnm1, Mdv1, ou Caf4 ne montre aucun dérèglement de la mitophagie suite à un traitement de rampamycine.

De façon globale, ces résultats vont dans le sens de la présence de lien entre la fission et la mitophagie sans pour autant qu'il y est une relation de cause à effet constante. Comment peut-on expliquer cette observation? Est-ce que la fission est toujours un prérequis la mitophagie ? La réponse est clairement non. Il existe probablement des protéines qui sont impliquées à la fois dans la fission et la mitophagie.

Bien que des phénomènes de mitophagie peuvent exister sans fission mitochondriale préalable, on ne peut pas totalement exclure l'importance de la morphologie et la dynamique mitochondriale dans la sélection des mitochondries endommagées ou bien son implication dans la signalisation mitochondriale pour induire la mitophagie.

Le comportement dynamique de la mitochondrie préserve l'intégrité et la distribution mitochondriale permettant d'adapter la forme et le fonctionnement à l'altération des demandes physiologiques (Friedman and Nunnari, 2014; Mishra and Chan, 2014b). L'altération de la dynamique mitochondriale est associée à un nombre de maladies neurodégénératives, l'hypertrophie cardiaque ou encore la dysfonction diaphragmatique (Burté et al., 2015; Dorn and Kitsis, 2015; Picard et al., 2015a). La dynamique-like guanosine triphosphatases (GTPases) contrôle la fusion et fission de la membrane mitochondriale. Les mitofusines 1 et 2 orchestrent la fusion de la membrane externe alors qu'OPA1 contrôle celle de la membrane interne. La fission est exécutée par Drp1 recruté à la surface de la mitochondrie en réponse aux stress physiopathologiques. La fusion et fission de la membrane mitochondriale se produisent d'une manière coordonnée et la balance entre les cycles de fusion et fission détermine la forme, la

taille et le nombre total des mitochondries à l'origine d'une large variabilité de la morphologie mitochondriale à travers les différents types de cellule.

L'interprétation de ces résultats aujourd'hui reste difficile, du fait du caractère pléiotrope de la mitochondrie et de ses multiples fonctions. En effet, les altérations de la fonction contractile de la fibre musculaire que l'on peut observer, viennent-elles de l'altération de la dynamique mitochondriale ou bien sont-elles juste une conséquence d'une dysfonction de l'un de ses composants ? De plus, la mitochondrie est fonctionnellement interconnectée avec d'autres organites cellulaires comme le RE (qu'on abordera dans le chapitre 3) et les peroxysomes, ce qui rend son étude difficile *in vivo*.

La coordination de la dynamique mitochondriale est critique pour la fonction bioénergétique et elle est étroitement liée au métabolisme. Les changements de l'ultrastructure et de la dynamique surviennent en réponse à une demande métabolique anormale (Gomes and Scorrano, 2011; Hackenbrock, 1966; Mishra et al., 2014; Patten et al., 2014) et que les mêmes éléments qui sont impliqués dans la fusion mitochondriale sont aussi des régulateurs centraux du métabolisme cellulaire (Sebastián et al., 2012). Les événements de fusion fission contrôlent la qualité mitochondriale, ou la fusion contribue à la maintenance mitochondriale cependant la fission induit également des fragmentations mitochondriales qui semblent pouvoir stimuler l'élimination des mitochondries défectueuses par la mitophagie (Twig et al., 2008; Youle and van der Bliek, 2012) (**Voir figure 18**).

L'inactivité prolongée d'un muscle squelettique entraîne des altérations de la dynamique mitochondriale associée à une dérégulation de la capacité de production de l'ATP. (Kavazis et al., 2009b; Max, 1972; Min et al., 2011; Powers et al., 2011b; Romanello et al., 2010).

Le lien entre ces deux phénomènes pourrait impliquer l'AMP Kinase.

2.3.2. Les différents rôles de l'AMP kinase

L'AMPK est une enzyme intervenant dans le métabolisme énergétique dont l'activité est contrôlée de manière extrêmement sensible par des faibles variations de concentrations en nucléotides intracellulaires essentiellement par l'AMP (Foretz et al., 2006; Hardie and Hawley, 2001). Les cellules musculaires doivent maintenir une balance énergétique positive et stable, caractérisée par un rapport ATP/ADP élevé (ratio 1/10). Lorsque la production d'ATP diminue, cette balance est perturbée et la production de l'AMP augmente. L'activation de l'AMPK est déterminée alors par le rapport AMP/ATP en réponse à une perturbation de l'équilibre entre la production d'énergie et sa consommation (Merrill et al., 1997; Steinberg et al., 2006). L'AMPK est un complexe hétérotrimérique composée de trois sous unités, formant ensemble une enzyme fonctionnelle. Elle comporte une sous unité catalytique α et deux sous unités régulatrices β et γ (Foretz et al., 2006). Quand elle est phosphorylée, elle active toute une batterie de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, le remodelage mitochondriale, la croissance cellulaire, l'autophagie et l'atrophie musculaire (Romanello et al., 2010). Une faible disponibilité d'ATP peut contribuer à l'atrophie musculaire du fait d'une diminution des processus de synthèse et l'augmentation de la protéolyse via la voie AMP Kinase/foxO3 (**Voir figure 19**).

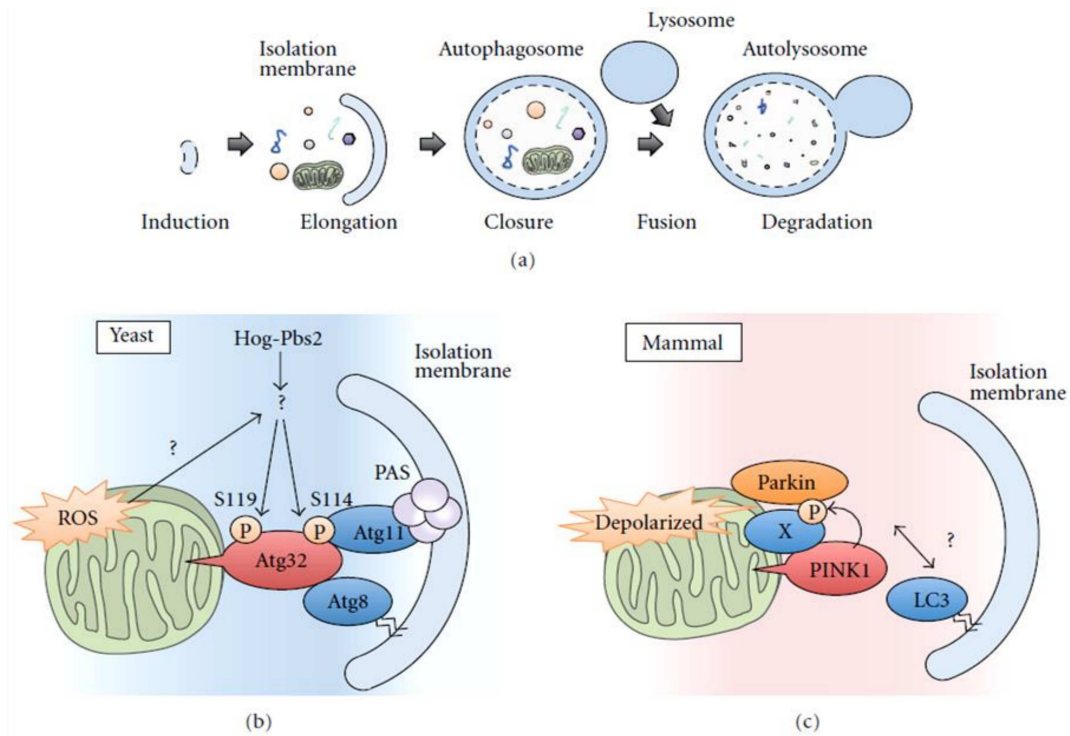


Figure 18: La mitophagie chez la levure et les mammifères.

a. au cours de l'autophagie un compartiment composé de deux membranes englutit une portion du cytoplasme avec les macromolécules et des organelles (mitochondries) pour former un autophagosome. L'autophagosome fusionne avec le lysosome pour former un autolysosome qui va dégrader le contenu englutit.

b. un modèle de mitophagie dans la levure. Les deux MAP Kinases Hog1 et Bbs2 régulent la mitophagie par la phosphorylation de l'Atg32 (une protéine ancrée la surface de la mitochondrie qui régule la mitophagie) sur la Ser119 et Ser114. Cette phosphorylation permet la liaison de la mitochondrie cible à l'autophagosome.

c. un modèle de mitophagie chez les mammifères. Quand la membrane de la mitochondrie est dépolarisée, PINK1 s'accumule sur la membrane externe de la mitochondrie et recrute Parkin du cytosol vers la surface de la mitochondrie dépolarisée. Le complexe PINK1/Parkin permet la liaison de l'autophagosome à la mitochondrie endommagée.

(Yusuke Kanamaru 2012)

Plus précisément l'AMPK, un est senseur énergétique, qui module l'activité du FoxO3 indépendamment d'Akt. Une élévation des taux d'AMPK active FoxO3 et stimule l'expression d'atrogin-1, MuRF-1, LC3, et Bnip3.

Atrogin-1 et MuRF-1 sont des E3 ligases qui jouent un rôle majeur dans la dégradation des protéines contractiles via le système ubiquitine-protéasome. LC3 et Bnip3 sont deux protéines clé de l'autophagie. L'activation de l'AMPK peut être régulée par le stress oxydant (Toyoda et al., 2004). En effet l'isoforme AMPK α 1 est beaucoup plus sensible au stress oxydatif alors que l'AMPK α 2 est plutôt sensible à la variation de la concentration de l'AMP dans la cellule (Salt et al., 1998). Des faibles concentrations de peroxynitrite ONOO $^-$ (<10 μ M) activent l'AMP kinase et ses enzymes en avals comme la eNOS et l'ACC (acétyl-CoA carboxylase) et l'ECs (Enzymes commission numbers). Cette activation se produit indépendamment de la variation du ratio AMP/ATP (Zou et al., 2003, 2004). D'une façon similaire le H₂O₂ peut directement oxyder l'AMPK α et entraîner une S-glutathionylation de la cystéine C299/304 indépendamment de la déplétion en ATP (Zmijewski et al., 2010). Ces études montrent que cette molécule est une cible des ROS par lesquels elle joue le rôle d'un système d'adaptation précoce en réponse à un stress oxydatif (Shirwany and Zou, 2010). D'une façon concomitante l'inhibition de l'AMPK α 1 et AMPK α 2 est corrélée avec une augmentation de la production des ROS dans différents types de cellules et de tissus (Schuhmacher et al., 2011; Wang et al., 2010a, 2010b).

Par exemple l'inhibition de l'AMPK α 1 dans les cellules HUVEC (cellules endothéliales humaines matures isolées à partir de la veine de cordon ombilical) diminue l'expression des gènes impliqués dans la défense antioxydante comme la MnSOD, la glutathion peroxydase (GPx-1), la catalase, la γ -glutamylcystéine synthase, la thioredoxin

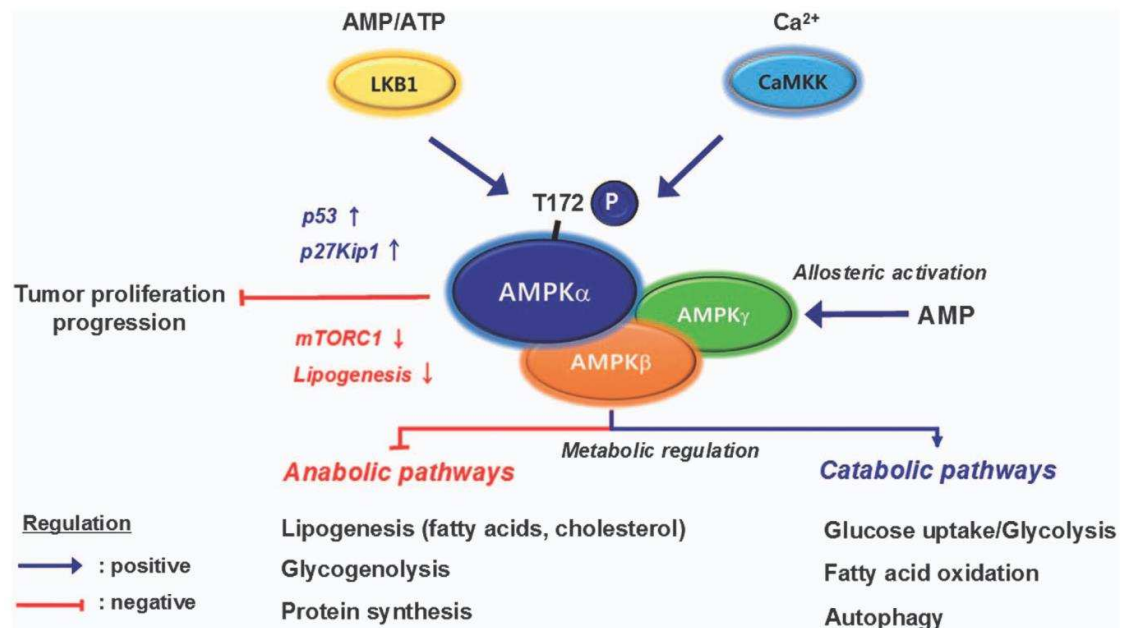


Figure 19: Régulation et activation de l'AMP kinase

L'AMPK est activée de façon allostérique par l'AMP et inhibée par l'ATP par compétition pour un même site de fixation sur la sous unité régulatrice γ . La liaison de l'AMP entraîne la phosphorylation de la sous unité catalytique α sur la Thr 172 par les protéines kinases (LKB1 et CaMK). L'augmentation du ratio AMP/ATP détermine cette activité en réponse à un stress énergétique comme l'exercice physique. L'activation de l'AMPK stimule les réactions métaboliques génératrices d'ATP et réduit les voies anaboliques consommatrices d'ATP (Joungmok Kim et al 2016).

(Colombo and Moncada, 2009) ainsi que Foxo3. En revanche, Ruderman a rapporté que l'activation de l'AMPK diminue le stress oxydant dans des cellules ECs. C'est un rôle émergent de cette molécule comme une voie signalétique qui peut améliorer le statut oxydatif associé à des atteintes cardiovasculaires en stimulant l'expression endogène des gènes antioxydants.

Très récemment, en janvier 2016, un nouveau rôle de l'AMPK a été mis en avant par Toyama et ses collaborateurs (Toyama et al., 2016). L'AMPK a été largement décrite comme étant une sentinelle de l'intégrité mitochondriale en réponse à un stress bioénergétique (Egan et al., 2011; Kim et al., 2011).

La perturbation de la fusion et la fission mitochondriale fait suite à une dérégulation de la bioénergétique suite à un stress métabolique. Néanmoins le lien entre le stress énergétique et la dynamique mitochondriale reste très peu étudiés (Mishra et al., 2014). Précédemment et par approche protéomique et bio-informatique différentes cibles de l'AMPK ont été identifiées (Egan et al., 2011; Gwinn et al., 2008; Li et al., 2011). Au cours de cette étude, il a été identifié une protéine nommée C2 ou f33 et qui est maintenant connue comme un mitochondrial fission factor (MFF) (**Voir figure 20**). C'est une protéine localisée à la membrane externe de la mitochondrie et qui joue un rôle primordial dans la fission de la membrane externe de la mitochondrie. La mitochondrie entretient des liens étroits avec d'autres compartiments de la cellule comme le réticulum sarcoplasmique. Lors de la contraction musculaire la machinerie contractile s'initie grâce au raccourcissement des sarcomères. Considéré comme l'unité fonctionnelle du muscle squelettique, les sarcomères sont les lieux de la transduction chimique du signal nerveux en énergie mécanique contractile.

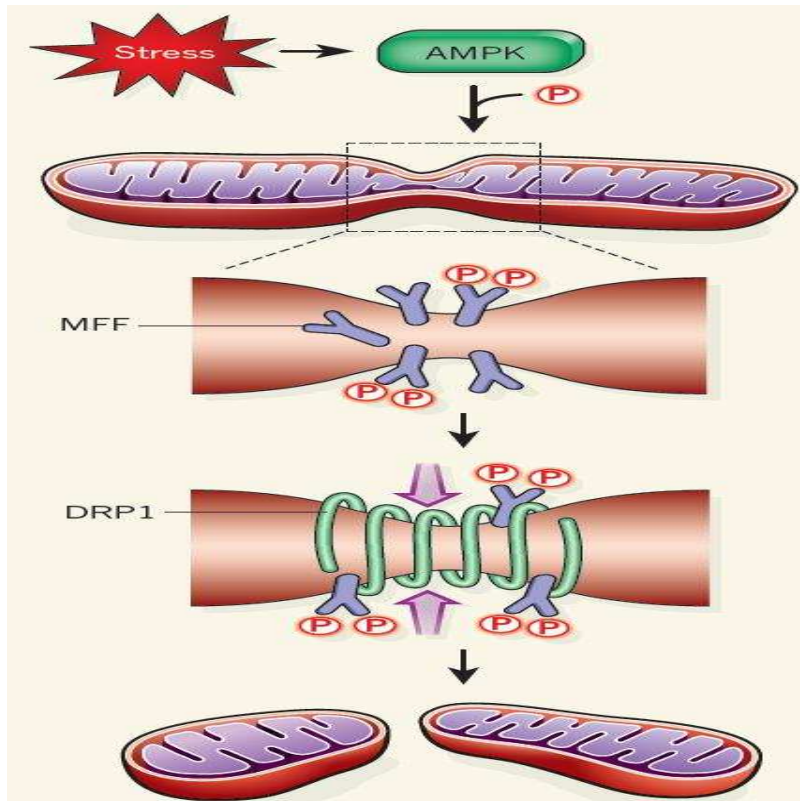


Figure 20 : AMPK et Fission mitochondriale

Les mitochondries centrales énergétique de la cellule existe sous forme fusionnée et peuvent être fragmenter en réponse à un stress. Les recepteurs MFF localisés sur la membrane externe de mitochondrie sont phosphorylable par l'AMPK et permet de recruter DRP1 à la membrane. DRP1 forme par la suite une spirale et agit par constriction pour entrainer la fission de la mitochondrie (Wang et al., 2016 Nature).

Sous la médiation du calcium essentiellement, le réticulum sarcoplasmique est chargé de la séquestration, le relargage et la distribution du calcium à la fibre musculaire, sous l'influence de la propagation du potentiel d'action. Toute dérégulation de l'homéostasie calcique intracellulaire aura ainsi des répercussions fonctionnelles au niveau musculaire. Ainsi la mitochondrie se trouve au centre de ces répercussions puisque par ses liens avec le réticulum Sarcoplasmique, elle intervient pleinement dans la régulation de l'homéostasie calcique. Dans le chapitre suivant nous allons détailler les mécanismes de régulation du calcium intracellulaire ainsi que le rôle de la mitochondrie dans le maintien de l'homéostasie calcique. Dans un deuxième temps nous allons mettre en avant en même temps la dérégulation de ces mécanismes dans une situation pathologiques en l'occurrence la VIDD ainsi que l'effet des anomalies du calcium sur le métabolisme énergétique et ou l'équilibre oxydo-réducteur (production de ROS).

Résumé Partie II

La mitochondrie joue un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie cellulaire en l'occurrence au cours de la ventilation mécanique. Elle est capable de gérer sa taille, sa localisation et ses connexions au sein de son réseau aussi bien qu'avec d'autres organites cellulaires pour contrôler le destin de la cellule.

Dans la troisième partie nous détaillerons comment la mitochondrie interagit avec un partenaire crucial dans la régulation de l'homéostasie calcique qui est le réticulum sarcoplasmique (RS) ainsi que les cibles thérapeutiques potentielles.

3. Homéostasie calcique et couplage excitation-contraction

3.1. Implication du Réticulum sarcoplasmiques, rôle des récepteurs de la Ryanodine 1

La contraction du muscle squelettique est initiée par une augmentation rapide et transitoire du Ca^{2+} myoplasmique résultant de la vidange du réticulum sarcoplasmique (RS). Elle est déclenchée par une dépolarisation membranaire en réponse à l'excitation nerveuse de la fibre musculaire. La dépolarisation se propage jusqu'à des invaginations de la membrane plasmique, les tubules transverses (TT). À ce niveau, la première étape du couplage excitation-contraction (CEC) est l'activation du récepteur des dihydropyridines (DHPR), un canal calcique de la membrane des TT sensible au voltage. La sortie du Ca^{2+} du RS, nécessaire à l'étape suivante pour l'activation des unités contractiles, se fait grâce à un canal calcique exprimé au niveau de la membrane du RS, le récepteur de la Ryanodine de type I (RyR1). Elle est déclenchée par une interaction mécanique directe entre le DHPR activé et le RyR1. Le relâchement de Ca^{2+} du RS est réalisé par un homo-tétramère de sous-unités RyR1 (≈ 565 kDa par sous-unité) auquel sont associées de nombreuses protéines régulatrices (FKBP12, calmoduline, triadine, junctine, calséquestrine...). Chaque sous-unité RyR1 est formée d'une partie transmembranaire carboxy-terminale contenant le pore, et d'une large partie amino-terminale cytoplasmique impliquée dans la régulation de l'activité du canal. L'éventail des effecteurs endogènes de RYR1 comporte aussi bien des ions, des petites molécules (Ca^{2+} , Mg^{2+} , adénine-nucléotides) et des polypeptides (calmoduline, FKBP12, PKA...) (Brillantes et al., 1994a; Marx et al., 2001). Parmi ces effecteurs, L'ancrage de la FKBP12 (appelé également calstabin) au RyR1 est particulièrement important. Il stabilise le canal et le maintien dans un état fermé, ce qui prévient la fuite du calcium du réticulum sarcoplasmique (**Voir figure 21**). Cela facilite un relargage optimum, orchestré et ordonné du calcium vis à vis du couplage excitation contraction (Brillantes et al., 1994a; Marx et al., 1998a). Il a été montré qu'une déplétion pharmacologique de la FKBP12 du récepteur à la ryanodine (avec de la rampaycin ou la FK506) découple l'activité des canaux

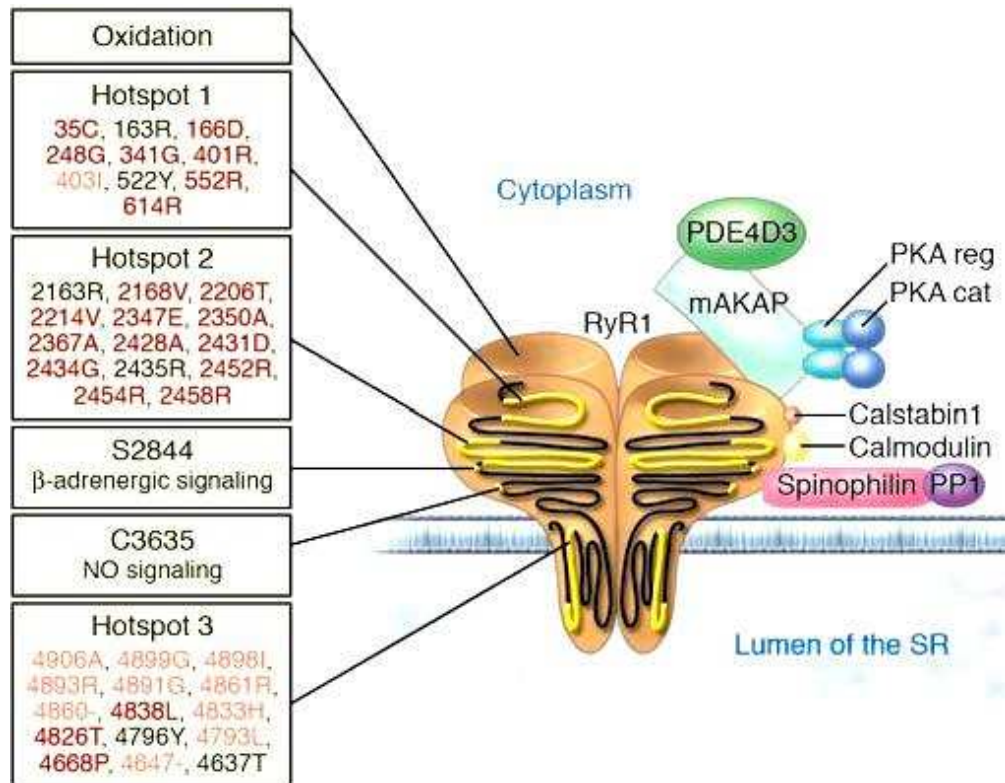


Figure 21 : Structure et mutations du complexe macromoléculaire RyR1

RyR1 forme un complexe macromoléculaire avec la phosphodéastérase PDE4D3, la mAKAP (A-Kinase Anchor protein), une protéine catalytique cat et une sous-unité régulatrice reg de la PKA, la calstabin1, la calmoduline, PP1 et la spinophiline. Les composantes du RyR1 sont schématiquement attachées à un seul monomère du tétramère. A gauche, les signaux du stress qui peuvent affecter le RyR1 sont représentés. Les 3 hotspots sont les zones où il a été identifié des mutations liées à des maladies. Les mutations en rouges sont liées à l'hyperthermie maligne. En rose les centrales cores disease. En noir les mutations mixtes (Andrew M. Bellinger, JCI 2008)

RyR1 avoisinantes, impliquant une fuite constante de calcium vers le cytoplasme et intra mitochondrial, avec altération du couplage excitation contraction et attente contractile fonctionnelle en conséquence (Avila et al., 2003)(**Andrew M. Bellinger 2008**).

Le développement d'une petite molécule (S107), dérivée des benzodiazépines, qui prévient la dissociation de la FKBP12 du complexe RyR1 a permis de limiter les fuites calciques à travers le canal RyR1 et d'améliorer le couplage excitation contraction avec comme conséquence une augmentation de la capacité à générer une force (Bellinger et al., 2008b). De même cette molécule a permis de réduire l'activation des protéases calcium dépendantes tel que la calpaïne (Belcastro, 1993; Bellinger et al., 2008b).

➤ *Implication de la Régulation adrénergique dans le couplage excitation-contraction : bénéfique ou délétère ?*

Le muscle squelettique peut augmenter sa production de force suite à une stimulation adrénergique (Brown et al., 1948; Cairns and Dulhunty, 1993). Dans des conditions de stress la stimulation des récepteurs adrénergiques $\beta 1$ et $\beta 2$ suite à une décharge catécholaminergique, active l'adénylate cyclase et génère un second messager ; l'AMPc. Celui-là va activer la protéine kinase A (PKA) (Lynch and Ryall, 2008; Rockman et al., 2002) (**Voir figure 22**). Shan et ses collaborateurs ont montré qu'une telle activation est à l'origine des phénomènes de phosphorylation impliqués dans la modification des événements calciques et permettent d'améliorer la contractilité de la cardiomyocytes (Shan et al., 2010a). D'une manière concomitante, Daniel Anderson et collaborateurs avaient montré pour la première fois sur un modèle de souris KO (S2844A), ne possédant pas de site de phosphorylation en position sérine 2844, que le stress adrénergique transitoire, par l'intermédiaire de l'activation de la PKA, agit sur la phosphorylation du RyR1 sur son résidus sérine S2844 pour induire une réponse inotrope positive (Andersson et al., 2012). En utilisant un même modèle de souris KO possédant une phosphorylation définitive sur la sérine en position S2844 (S2844D), Reiken et coll.

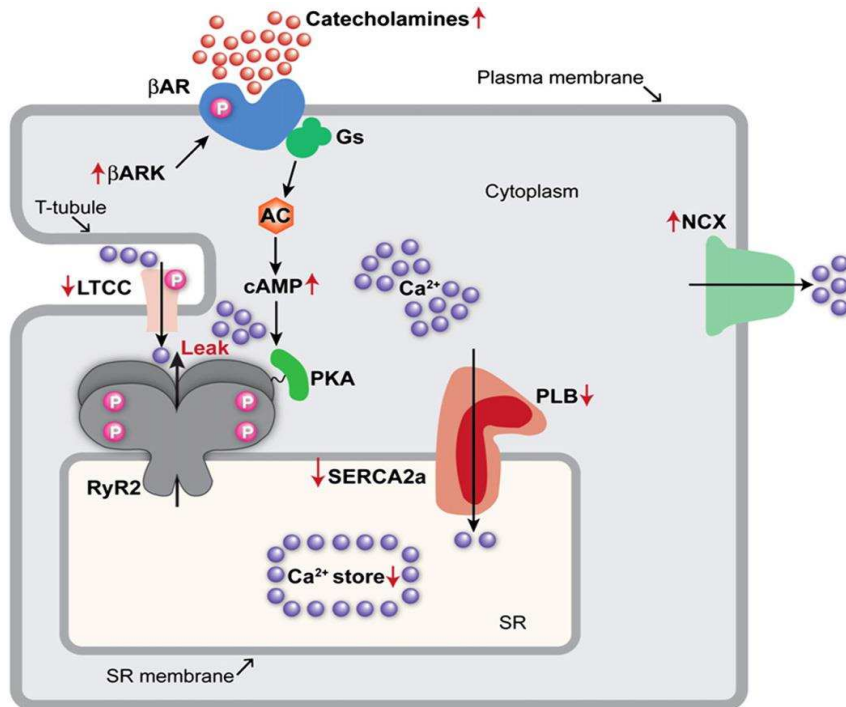


Figure 22 : effet des catécholamines sur la régulation du calcium intracellulaire dans le cœur

Les catécholamines activent la voie bêta adrénergique par stimulation de l'adénylate cyclase (AC) pour générer de l'AMPC, qui active par la suite la protéine kinase A (PKA). La PKA phosphoryle plusieurs cibles pour augmenter les transitoires calciques principalement par son action sur le RyR2. Une activation chronique du système sympathique entraîne une hyper-phosphorylation du RyR2 par la PKA (indiqué avec des P). Cela augmente la probabilité d'ouverture du canal consistante avec des fuites calciques pendant la diastole. A long terme la fuite calcique engendre une déplétion des stocks de calcium dans le réticulum sarcoplasmique. Les flèches indiquent l'augmentation ou la diminution de l'activité ou de l'expression des protéines concernées (Marx SO, Marks AR.2013, J Mol Cell Cardiol).

(Reiken et al., 2003a) ont montré que la phosphorylation de ce résidu d'une manière permanente induit une déstabilisation du canal avec fuite calcique permanente, via la déplétion de la FKBP12. En effet, la conséquence de cette modification post-traductionnelle du récepteur est une atteinte du couplage excitation contraction, avec une perte de force contractile et un allongement du temps de demi contraction (Lamb and Stephenson, 1996).

De plus, les processus de recyclage de calcium quand le canal est défectueux sont consommateurs d'ATP ce qui peut expliquer la fatigue musculaire associée. Le récepteur à la ryanodine est soumis à d'autres modifications post-traductionnelles comme l'oxydation et S-nitrosylation qui peuvent moduler son activité et déréguler l'homéostasie calcique.

Nous allons les aborder dans les prochains chapitres

➤ *L'oxydation et la S-nitrosylation du RyR1*

Le RyR1 est une cible pour les espèces oxygénées réactives (ROS, *reactive oxygen species*) et les espèces azotées réactives (RNS, *reactive nitrogen species*) produites de façon physiologique, notamment lors de l'activité physique. Le RYR1 contient un total de 100 résidus cystéines, la moitié se trouvant à l'état réduit dans le muscle au repos et 6-10 d'entre eux étant plus particulièrement réactifs. L'activation du canal RYR1 serait modulée par des modifications redox de ces thiols par oxydation, S-nitrosylation ou alkylation. Chaque sous-unité compte entre 38 et 48 thiols à l'état libre, sensibles à l'oxydation. L'état d'activation de RYR1 répond de manière biphasique à l'administration de doses croissantes d'oxydants, le maximum d'activation se situant pour un état impliquant 23 SH par unité RYR1.

L'oxyde nitrique NO est également considéré comme un modulateur physiologique de l'état redox de RYR1 par S-nitrosylation.

Bien que ces modifications puissent être intégrés dans le fonctionnement normal de la contraction musculaire, elles ont été également décrites comme des phénomènes délétères dans des pathologies musculaires congénitales ou acquises (défaillances cardiaques, diabète,

dystrophie musculaire du Duchenne) ou avec le vieillissement (Andersson et al., 2011a; Bellinger et al., 2008c, 2009b; Donoso et al., 2011; Fauconnier et al., 2010a; Hidalgo et al., 2000; Shan et al., 2010b; Turan and Vassort, 2011a). De même, des travaux récents réalisés chez la souris et chez l'homme montrent qu'en réponse à un exercice physique intense, RYR1 serait le siège d'un important remodelage, comme décrit précédemment, comportant d'une part une phosphorylation de la Ser 2844 dépendante de la PKA (proteïn kinase A) et une S-nitrosylation des Cys 3635 et 2327, associé à une déplétion de FKBP12. La conséquence est comme précédemment, une fuite importante du Ca^{2+} du RS au travers du canal RYR1 « remodelés » associé à des dommages musculaires via une activation des calpaïne, pouvant participer à la limitation à l'exercice musculaire (Bellinger et al., 2008a).

Ainsi, ces différentes données montrent que les modifications de l'état redox de RyR1 jouent un rôle important dans la modulation de son activité canal. Les différents événements impliqués dans le remodelage de RyR1 normal ou muté pourraient constituer des cibles thérapeutiques comme le suggère l'action du JTV519, une 1,4-benzothiazépine qui provoque la fixation de FKBP12 sur RYR1 et qui améliorerait la fonction musculaire squelettique dans un modèle d'infarctus post-myocardique chez le rongeur (Sacherer et al., 2012).

Compte tenu des liens étroits entre réticulum sarcoplasmique et mitochondrie, la fuite calcique venant du réticulum, va impacter la fonction mitochondriale. C'est ce que nous allons voir dans le prochain chapitre.

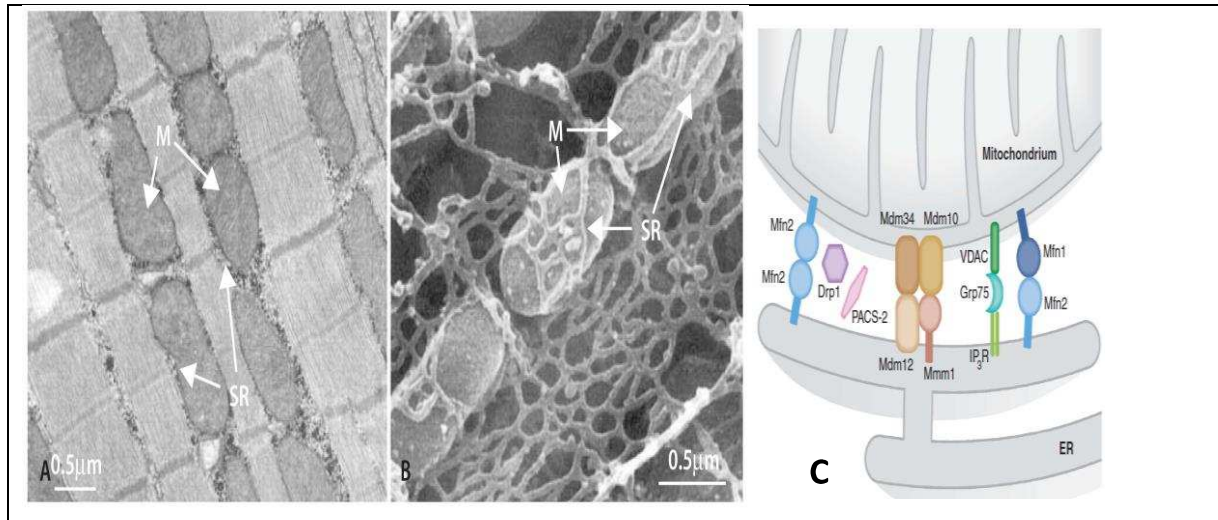


Figure 24 : proximité et interaction entre la mitochondrie et le RS

Coupe longitudinale (A) ou micrographe en scan électronique (B). M: mitochondrie, SR: réticulum sarcoplasmique. (C) Il existe différentes interaction moléculaire permettant des contacts proches entre la mitochondrie et le RS. PACS-2 et Drp1 contrôlent indirectement la distance entre les ponts en impactant la morphologie et la distribution des mitochondries. Le complexe comportant IP3R, la protéine chaperonne GRP75 et le canal mitochondrial VDAC joue un rôle important dans la régulation des flux calciques mitochondriaux. Le complexe formé par les protéines mitochondriales Mdm34 et Mdm10 et celles du réticulum endoplasmique Mmm1 et Mdm12 semblerait réguler les pont RE-mitochondrie. Les mitofusines (Mfn1 et Mfn2) forment un homo-tétramère pour garder les ponts de contacts entre les deux organelles.

3.2. Calcium et Mitochondrie :

Dans le muscle il existe une relation privilégiée entre mitochondrie et le réticulum sarcoplasmique. En effet, une population importante de mitochondrie se trouve près des sites de libération du calcium qui se localise près des stries Z et adjacentes aux citernes terminales du RS (Ogata and Yamasaki, 1985). En 1969 et pour la première fois, Ruby et al, avait mis en évidence la présence des points de contact entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Ruby et al., 1969), que l'on va détailler dans cette revue. Cette proximité entre RS et mitochondrie permet d'assurer des échanges de métabolites et des régulations moléculaires et fonctionnelles réciproques. En effet il a été montré dès 1985 que le captage du calcium par la mitochondrie pourrait intervenir lors de la relaxation musculaire, et notamment dans les muscles lents (Gillis, 1997; Sembrowich et al., 1985). **(Voir figure 23 et 24).**

a) Régulation du calcium cytosolique par la mitochondrie :

Bien que la question du rôle de la mitochondrie dans la régulation du calcium intracellulaire était une controverse dans la littérature, cette fonction est maintenant largement admise et notamment dans les cardiomyocytes (Joiner et al., 2012). La plupart des effets du calcium sur la mitochondrie nécessitent son passage à travers la double membrane mitochondriale, Cependant la machinerie du transport du calcium dans la mitochondrie n'est pas encore totalement élucidée. Les travaux sur ce sujet tendent vers l'implication déterminante dans l'accumulation du calcium mitochondrial, de la membrane mitochondriale externe, perméable aux petites protéines, et de son port de perméabilité mitochondrial (PTP). Le transport du calcium à travers la mitochondrie se fait par différentes voies **(Voir figure 25).**

L'entrée du calcium cytosolique dans la mitochondrie s'effectuent principalement à travers le canal MCU (Uniport mitochondrial calcium) et en sortent par l'activité du NCE ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) par échange avec les ions Na^+ . (Gunter and Pfeiffer, 1990; Rizzuto et al. 2000).

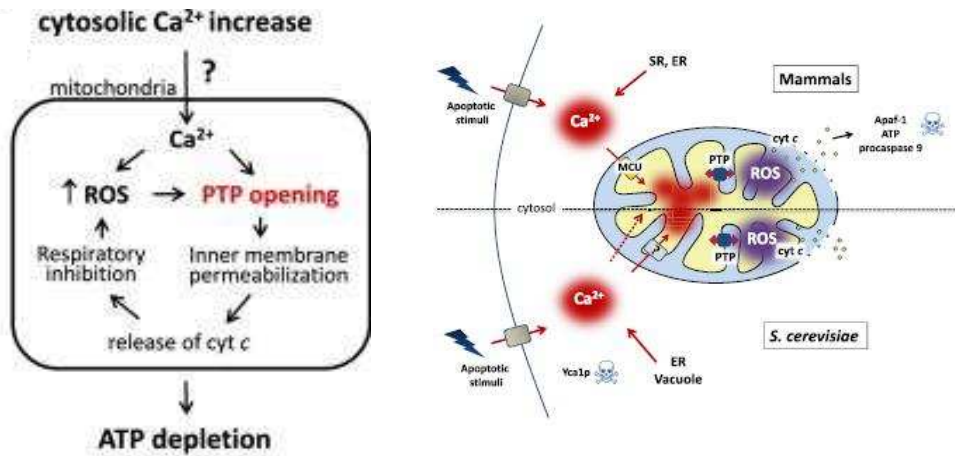


Figure 25: Effet délétère du calcium sur la mitochondrie

L'augmentation du calcium cytosolique entraîne son accumulation dans la mitochondrie via le complexe MCU et induit la production des ROS et l'ouverture du PTP et la libération des facteurs pro-apoptotique comme le cytochrome C. Cela résulte de la formation d'un complexe Apaf-1 qui va cliver la procaspase 9 pour initier la cascade de la mort cellulaire (M.Carraro,P.Bernardi 2016 Cell Calcium)

Les mécanismes d'entrée du calcium dans la mitochondrie sont électrogéniques. Il est sous la dépendance d'une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne, développé par la pompe à proton de la chaîne respiratoire. Ce flux entrant, entraîne une dépolarisation de la membrane, contrôle les taux de production d'ATP et orchestre le destin cellulaire (Hansford, 1994; Orrenius et al., 2003)

.Une étude de patch clamp a montré que ce canal MCU était hautement sélectif pour le calcium ($K_d < 2\text{nM}$) (Kirichok et al., 2004). Il a été montré aussi que l'exposition de la mitochondrie à des hautes concentrations de calcium peut provoquer un gonflement (mitochondrial swelling) menant à la perméabilisation des membranes mitochondriales et à l'induction d'un processus apoptotique. Dans ce processus de mort cellulaire, le pore de perméabilité (PTP) joue un rôle crucial, il est composé du translocateur de nucléotides à adénine (ANT) et VDAC (Marzo et al., 1998; Shimizu et al., 1999).

La porine mitochondriale VDAC est un canal permettant également le passage de métabolite à travers la mitochondrie. La conductance et la sélectivité à certains ions du canal VDAC sont dépendantes du potentiel de membrane de la mitochondrie. A faible voltage (10mV), le canal est stable dans un état d'ouverture longue (jusqu'à 2h). A plus fort voltage (>10mV), tant positif que négatif, VDAC présente plusieurs états de sélectivité et de perméabilité différentes. Il peut basculer vers un état fermé lorsque le potentiel de membrane est supérieur à 30mV. De plus il a été montré que le calcium module la conductance et/ou la durée de l'ouverture de ce canal (Báthori et al., 2006). Depuis 1999, il est reconnu que VDAC joue un rôle majeur dans la mort cellulaire et en particulier dans la voie mitochondriale de l'apoptose et dans la perméabilité membranaire (Shimizu et al., 1999).

b. Influence de la production de ROS sur l'homéostasie calcique : généralités

L'effet régulateur du calcium au niveau mitochondrial, peut être véhiculé par les ROS produits, comme le superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou les radicaux hydroxyles (HO). Les interactions entre les ROS et le calcium sont bidirectionnelles. Les ROS peuvent réguler le calcium intracellulaire et inversement le calcium est essentiel pour la production des ROS (Gordeeva et al., 2003). Ainsi, la régulation de la production des ROS par le calcium et inversement sous-tend le concept du ROS/ Ca^{2+} cross-talk.

En effet, les ROS modulent l'activité de nombreux canaux pompes et échangeurs calciques localisés à la membrane plasmique, mitochondriale ou du réticulum. Ainsi, le canal VDCC (voltage-dependent Ca^{2+} channels) est sensible à l'état redox dû à ses résidus de cystéine localisés au niveau du pore qui forment la sous unité $\alpha 1$ (Hudasek et al., 2004; Mikami et al., 1989). La variation du statut redox peut affecter son expression, sa probabilité d'ouverture et ainsi réguler le trafic calcique entre réticulum et mitochondrie (Bogeski et al., 2010; Trebak et al., 2010). De même au niveau des cardiomyocytes de cochon, l'ajout de ROS exogène peut supprimer le courant calcique de type lent impliqué dans le couplage excitation-contraction (Gill et al., 1995). Les mêmes effets ont été trouvés sur le muscle lisse du lapin après le rajout du sulfhydryle oxydant (Lacampagne et al., 1995). La famille des canaux calciques situés sur la membrane plasmique et qui permettent l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule : famille des TRP (transient receptor potential channel : canal calcique localisé au niveau de la membrane plasmique) et les SOC (Store Operated Channel) sont également modulés par le stress oxydant. Les détails des mécanismes d'action de cette régulation, qui ne font pas partie des objectifs de cette revue de la littérature sont présentés dans les références suivantes (Bogeski et al., 2010, 2012; Dietrich et al., 2006; Gandhirajan et al., 2013; Grupe et al., 2010; Hawkins et al., 2010; Jiang et al., 2014; Shen et al., 2011; Susankova et al., 2006; Takahashi and Mori, 2011; Yamamoto et al., 2008).

Une des cibles majeures des ROS, est le canal RyR1 qui a la capacité à réguler la fréquence et la qualité des événements calciques au cours du couplage excitation contraction. En effet, la majeure partie du calcium libérée par le réticulum sarco-endoplasmique se fait à travers les récepteurs à la ryanodine (RyR) qu'on a évoqué précédemment. Son activité est liée à celle de la pompe SERCA, elle-même sous la régulation de la production de ROS, comme nous le verrons dans le prochain chapitre.

Concernant le canal RyR, les ROS peuvent aussi moduler son activité par oxydation des groupements thiol, augmentant la probabilité d'ouverture du canal et la fuite calcique (Cf chapitres précédent) (Kourie, 1998; Zima and Blatter, 2006) (Terentyev et al., 2008).

Le RyR peut être également modulé par la NADPH oxydase (Espinosa et al., 2006; Hidalgo et al., 2006a; Zima and Blatter, 2006). Cette régulation a été impliquée dans l'optimisation du fonctionnement du canal RyR2, observé sur cardiomyocyte en présence d'un faible taux de ROS en provenance de la NADPH oxydase de type 2 (Donoso et al., 2014).

Mais comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'équilibre entre effet bénéfique et délétère de ces modifications post-traductionnelles du RyRs restent précaires. En effet celles-ci peuvent, à un niveau plus important, déstabiliser le canal, et présenter un élément majeur dans l'altération de l'homéostasie calcique impliquée dans différentes atteintes musculaires aussi variées que la défaillance cardiaque post ischémique, la dystrophie musculaire ou le vieillissement (Belevych et al., 2012; Györke and Carnes, 2008; Terentyev et al., 2008).

c. Effet du ROS sur les ATPases du calcium (SERCA)

La pompe SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase) est largement impliquée dans la restauration des stocks du calcium dans ER/SR. Elle possède également des résidus cystéine

sensibles au statut redox de la cellule et impliqués dans la régulation de son activité enzymatique (Evangelista et al., 2012).

En effet, l'oxydation du composant thiol inhibe l'activité pompe de la protéine SERCA tandis que sa réduction par le DTT (dithiothreitol) et la GSH la stimule (Zima and Blatter, 2006).

La cible des ROS est l'activité ATPasique de la SERCA, inhibant sa liaison et son couplage à l'ATP, et limitant ainsi son potentiel de recaptage du calcium (Cook et al., 2012).

Parmi les différentes cibles des ROS, la cystéine 674 joue un rôle important dans le contrôle redox de la SERCA. Chez un modèle de cellules embryonnaires (EC) humaines ceci est illustré par l'effet stimulant sur l'activité de la SERCA du VEGF (Vascular endothelial growth factor ; une protéine impliquée dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins) dont le mécanisme d'action est une réversion de la S-glutathionylation sur la Cys674 (Evangelista et al., 2012).

Le captage du calcium par la mitochondrie est essentiel à son fonctionnement: à un taux approprié, il stimule les processus métaboliques avec augmentation de la synthèse d'ATP. A un taux plus élevé, il est initiateur de messagers de mort cellulaire. Les mécanismes impliqués sont nombreux, et mériteraient une revue de la littérature à part entière, qui n'est pas l'objectif de celle-ci. Pour plus de détail se référer à la revue générale (Maack and O'Rourke, 2007).

L'augmentation du calcium cytosolique résulte d'une ouverture transitoire du PTP dont le but est de protéger la cellule contre la surcharge calcique. Un tel phénomène est observé dans les pathologies ischémiques (Seidlmayer et al., 2015).

La sensibilité du pore PTP, impliqué dans l'initiation de l'apoptose suite à une surcharge calcique, est également dépendante du niveau de production de ROS mitochondrial (Hajnóczky et al., 2006), suggérant la présence d'une boucle d'amplification entre trouble de l'homéostasie

calcique et surproduction de ROS mitochondrial. Cette boucle d'amplification ou cercle vicieux pourrait être renforcée par deux phénomènes qu'on appelle en anglais « Calcium-induced ROS release, ou ROS induced calcium release » (Aon et al., 2003). Cette boucle d'amplification a bien été mise en évidence dans la pathologie cardiaque, où la surproduction de ROS mitochondriale potentialisée par la surcharge calcique jouent un rôle majeur dans l'initiation de l'apoptose (Webster, 2012).

3.3. Altération de l'homéostasie calcique et production de ROS

Dans des conditions physiologiques le Ca^{2+} a un effet bénéfique sur la fonction mitochondriale. Il stimule la phosphorylation oxydative et augmente en conséquence la synthèse d'ATP. Cependant toute dérégulation des flux calciques vers la mitochondrie pourrait être délétère. En effet sur des mitochondries intactes isolées du cortex cérébrale de rat, Dukens et collaborateurs ont montré une altération des propriétés de la membrane mitochondriale associée à une surproduction de ROS en présence de concentration élevée de Ca^{2+} (Dykens, 1994). Cet effet a été retrouvé dans plusieurs modèles expérimentaux tels que les cardiomyocytes, les astrocytes et la cellule nerveuse (Jou et al., 2010; Petersén et al., 2000; Przygodzki et al., 2005). Cette augmentation de production de ROS induite par le Ca^{2+} est complètement abrogé par le RU360 un inhibiteur du canal MCU. Le mécanisme exact de cette stimulation reste mal connu, malgré l'existence de plusieurs hypothèses:

1. Le calcium peut stimuler les enzymes de cycle de l'acide tricarboxylique (isocitrate déshydrogénase, α -ketoglutarate déshydrogénase, pyruvate déshydrogénase) et ATP synthase pour augmenter la phosphorylation oxydative. Ce processus de synthèse consomme de l' O_2 d'avantage et augmente la probabilité de fuite d'électron de la chaîne respiratoire à l'origine d'une production accrue des ROS. Cette hypothèse se base sur

la régulation bénéfique du calcium dans des conditions de stress physiologique (Brookes et al., 2004; Yan et al., 2006).

2. le calcium induit une production de l'oxyde nitrique (NO^-) via la stimulation de la NOS mitochondriale (mtNOS). L'oxyde nitrique et ses dérivés (ONOO^-) affectent l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire et stimule la production de ROS (Brookes et al., 2004; Duan et al., 2007).
3. Le calcium agit également sur le cytochrome c et affecte son ancrage aux complexes III et IV de la chaîne respiratoire. La dissociation du cytochrome c ralentie le transfert d'électrons entre ces deux complexes et stimule la production de ROS (Brookes et al., 2004; Duan et al., 2007).
4. La surcharge calcique dans la mitochondrie peut également stimuler l'ouverture du PTP. Cette ouverture de canal ionique entraîne une dépolarisation au niveau de la membrane mitochondriale et résulte en un gonflement de la mitochondrie. Ce phénomène est accompagné par une rupture de la membrane mitochondriale et des anomalies au niveau de la chaîne respiratoire ainsi qu'une production accrue des ROS (Brustovetsky et al., 2003; Kowaltowski et al., 1998; Maciel et al., 2001; Panov et al., 2007).

Ainsi, Il semble que la production du ROS mitochondriale et la régulation de l'homéostasie calcique sont largement intriquées en physiopathologie. De même, les changements morphologiques et la régulation de la dynamique mitochondriale sont également sous l'influence des variations de calcium mitochondrial à travers un remodelage des protéines impliquée dans la régulation des flux calcique de façon ROS dépendant. C'est une hypothèse que nous avons voulu aborder dans le cadre de notre modèle de ventilation mécanique chez la souris.

En effet, la VIDD est un excellent exemple de cette interaction entre la présence d'un stress oxydant et la mise en évidence de trouble de l'homéostasie calcique, relaté dans le premier article de ma thèse. En effet, dès 6 heures de ventilation mécanique chez un modèle murin, a été mise en évidence de façon très précoce, la présence d'un stress oxydant d'origine mitochondriale (Powers et al., 2011b) ainsi qu'un trouble de la dynamique mitochondriale associée à des phénomènes de fission précoces. Afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans cette pathologie, la mise en évidence des mécanismes initiateurs des phénomènes observés serait très importante.

En effet, est-ce l'adaptation de la mitochondrie secondaire à la rupture de l'homéostasie énergétique induite par la mise en décharge du diaphragme, qui est à la base d'une production excessive de ROS mitochondriale, initiées par des phénomènes de fissions et de fragmentation, qui sera initiateurs de troubles de l'homéostasie calcique ? Ou inversement, est-ce une perturbation initiale de l'homéostasie calcique induit pas des phénomènes encore mal élucidés, de stress mécanique, qui va initier des phénomènes délétères de remodelage au niveau de la mitochondrie, initiant un stress oxydant ? C'est à ces différentes questions que nous avons du moins en partie voulu répondre, au niveau du deuxième et troisième article de cette thèse.

Résumé Partie III

Au cours du couplage excitation-contraction, la régulation de l'homéostasie calcique est sous la dépendance d'une relation étroite entre mitochondrie et le réticulum sarcoplasmique. L'activité de l'ensemble des protéines canalaire impliquées dans la régulation des flux calciques est régulée par la présence de ROS. Parallèlement, le niveau de calcium intra cellulaire régule également la fonction mitochondriale et la quantité de production de ROS, générant ainsi une boucle d'interaction vicieuse, à la base des effets délétères impliqués dans la VIDD.

L'intervention pharmacologique au niveau de cette boucle, soit en ciblant le remodelage mitochondrial, soit le récepteur à la ryanodine pourrait représenter une thérapeutique d'avenir dans la prévention de la VIDD.

Objectifs

Par sa dynamique, ses liens étroits avec les organites cellulaires et ses nouvelles fonctions émergentes dans la régulation de l'homéostasie cellulaire la mitochondrie impacte sur la physiopathologie musculaire.

Les objectifs de cette thèse s'orientent sur l'implication de la mitochondrie dans la physiopathologie de la dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation mécanique caractérisée principalement par une dysfonction contractile, une atrophie musculaire et une atteinte mitochondriale précoce.

La ventilation mécanique induit des effets délétères sur la fonction musculaire diaphragmatique avec une dysfonction mitochondriale à l'origine d'un stress oxydant important. Notre premier objectif a été d'étudier la répercussion d'un tel stress sur l'homéostasie calcique.

(Article 1)

Dans un second temps nous avons porté notre attention sur les effets précoces et tardifs de ce stress sur la fonction musculaire du diaphragme en étudiant dans ce contexte l'effet d'un antioxydant mitochondriale : le SS31.

(Article 2)

En fin, dans le but d'identifier le lien entre dysfonction mitochondriale au cours de la ventilation mécanique, stress oxydant et trouble de l'homéostasie calcique, nous avons évalué l'impact de phénomènes très précoces de fission mitochondriale induit par la ventilation mécanique avec l'apport de molécule pharmacologique pouvant bloquer ces phénomènes liés à la dynamique mitochondriale.

(Article 3)

Méthodologie

Modèle d'étude Méthodologie 1

Les techniques et les expérimentations utilisées dans ces travaux seront décrites sous forme de fiche technique telle qu'elles étaient réalisées dans le but de permettre de reproduire les expérimentations dans les mêmes conditions. Un court résumé sur le principe de chaque expérience sera présenté afin de faciliter la compréhension du modèle ou la technique en question.

1.1. La ventilation mécanique chez la souris

Principe de l'expérience :

Le but de cette expérience est de mimer les contraintes de la ventilation mécanique totalement contrôlée du patient chez un modèle murin. Les souris sont sédatées et anesthésiées puis intubées et ventilées par un micro ventilateur. Le diaphragme est complètement mis au repos et la respiration est assurée totalement par l'appareil. Les paramètres de la ventilation sont calculés en fonction du poids et des demandes de la souris.

I) Drogue à préparer :

Xylazine

Préparer une solution mère de Xylazine de concentration 20mg/ml (dans du sérum physiologique)

Poids moléculaire 220.33 g/mol

Stocker à 4°C

Le jour de la manip → prendre 100µl d'Xylazine puis QSP 1ml dans du sérum physiologique.
Injecter en **IP** 6µl/g de souris (première drogue à injecter) puis remettez la souris dans une cage à part pendant **5 min**.

Dose : 25 g=150µl

26 g=160µl

27 g=170µl

Pentobarbital

Solution commerciale à 54,7 mg/ml

Préparer une solution fille à partir de la solution commerciale : → prendre 100µl d'Xylazine puis QSP 1ml dans du sérum physiologique.

Injecter en **IP** 6µl/g de souris (deuxième drogue à injecter) puis remettez la souris dans la cage et attendez l'endormissement.

Dose : 25 g=150µl

26 g=160µl

27 g=170µl

Injecter 400µl de Ringer lactate pour l'hydratation d la souris.

II) Intubation et ventilation mécanique

- Induction : Xylazine puis Pentobarbital 5 min après.
- Rajouter 1/3 de la dose si la souris ne s'endort pas après 3 min de l'injection du Pentobarbital.
- Régler le ventilateur (minivent) et le tapis chauffant (37°C).
- Vt=10ml/kg. Exemple (pour 25g mettez 250µl).
- La fréquence = 160 cycle/minute.
- La PEEP= entre 3 et 5 cm de H₂O (dans un bécher).
- Préparer l'otoscope (vérifier l'intensité de la lumière et de l'alimentation).
- Préparer une pince de peau (pour tenir la langue).
- Cathéter bleu =1.9 cm avec un guide d'intubation (insérer le guide dans le cathéter).
- Mettez la souris en décubitus dorsale accrochée des dents sur un plan incliné puis retirez la langue avec la pince sur le côté gauche, introduisez l'otoscope. Une fois vous voyez les cordes vocales introduisez le cathéter.
- Retirez le guide d'intubation et connectez la souris au ventilateur.
- Vérifiez que les mouvements de la cage thoracique sont synchronisés avec les mouvements du respiratoire.

III) Règles à suivre et surveillance

- Il faut tout chronométrer.
- Injecter 100µl de Ringer lactate toute les heures en IP.
- Injecter 100µl de Pentobarbital quand la souris commence à réagir à un pincement de la patte arrière.

Méthodologie : 1 modèle d'étude et ventilation mécanique (VM)

-Si l'intervalle entre deux injections de Pentobarbital est inférieur à 40 min, cela suggère un inconfort de la souris dont la cause doit être très vite recherchée.

-A partir d'une heure de temps: vérifier toute les 5 min.

-Réinjection systématique au bout de 2 heures.

-Délai entre injection du Pentobarbital et endormissement : 3 min.

-Délai entre début de l'endormissement et l'absence de réactivité : 5 à 6 min.



IV) Modèle CPAP (continuous positive airway pressure)

La souris ventilée en CPAP reçoit de l'air en continu dans les voies respiratoires par le biais d'un tube connecté à un compresseur qui délivre de l'air. Le jet d'air crée suffisamment de pression pour garder les voies respiratoires ouvertes, donc elles ne peuvent s'affaisser ou se fermer.

Les souris sont séditées et anesthésiées de la même façon que les souris en ventilation mécanique prolongée.

Elles sont ensuite connectées à un tuyau qui délivre de l'air à 1L/min.

1.2. La ventilation mécanique chez les patients

Les biopsies musculaires diaphragmatiques étaient réalisées sur 2 groupes de patients :

- a) Patients en mort cérébrale et donneur d'organe, ventilés pour une durée > 24.
- b) Patients anesthésiés et ventilés entre 2 à 3 heures pour une chirurgie thoracique afin d'enlever un cancer des poumons.

Tous les patients étaient ventilés via un tube dans la trachée en mode de ventilation totalement contrôlé. Le volume courant était ajusté à 7,0-8,5 ml/kg de masse corporelle.

La fréquence respiratoire était de de 12 à 24 cycle/minute avec une pression de fin d'expiration (PEEP) de l'ordre de 2 à 5 cm H₂O.

Les biopsies (1cm³) étaient obtenues dans la zone costale du diaphragme.

Caractéristiques des patients

	Contrôle	MV
	MV Courte durée	MV Longue durée
Durée de la VM	2.3±0.4	98±65 **
Nombre de patients	10	9
Age (année)	53±9	39±19 *
Sexe (M/F)	9/1	3/6
Poids (kg)	72±15	74±14
Taille (cm)	170±10	170±11
BMI (kg/cm²)	25±5	25±3
Raison de la chirurgie/Cause de la mort cérébrale	Stage 1A adenocarcinoma of the lung	Infarctus (7), Accident de route accident (1), arrêt cardiaque (1)

MV = ventilation mécanique. BMI = Index de masse corporelle (définie comme le poids (kg) divisé par la taille au carré (m)). * p < 0.05; ** p < 0.01

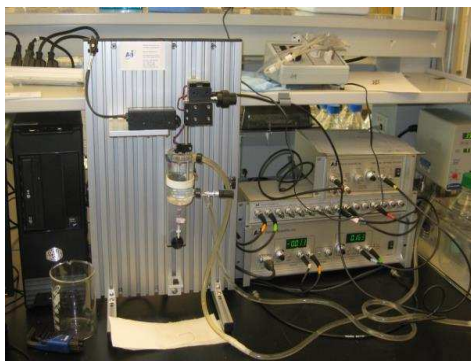
Fonction et morphologie musculaire
Méthodologie 2

1.1. Mesures de propriétés contractiles d'un muscle en ex-vivo

Principe de l'expérience :

L'expérience consiste à disséquer un muscle (diaphragme, EDL ou soléaire) tout en préservant son intégrité. A monter le muscle dans une chambre expérimentale et l'attacher à un capteur de force pour mesurer ses propriétés contractiles en appliquant différents protocoles de stimulation.

Les propriétés contractiles d'un muscle (endurance, force, résistance au stress excentrique) se mesurent grâce à un "set-up" de contractilité. Les muscles (EDL (extensor Digitérium longus), soleus, diaphragme) peuvent être montés verticalement dans une chambre contenant une solution Krebs oxygénée et maintenue à 28°C selon la méthode standard (Petrof et al 1995). Pour le diaphragme (muscle le plus utilisé pour nos expérimentations), une bande de la partie costale est attachée à une plateforme placée dans la chambre de mesure. Le tendon central est fixé à l'aide d'un fil de soie 4.0 sur le bras de transducteur de force et du système d'étirement. Les stimuli sont délivrés par un stimulateur électrique relié à un amplificateur. La force est affichée sur un oscilloscope et les données sont enregistrées sur un ordinateur. La bande diaphragmatique est stimulée par des électrodes placées dans la chambre expérimentale sur les deux côtés du muscle. L'intensité maximale d'une stimulation est déterminée pour chaque muscle. Une fois le ou les protocoles réalisés, il est nécessaire de peser et mesurer le muscle afin de rapporter les données de force en fonction de la surface musculaire stimulée.



Capteur de tension

Cuve (Krebs oxygénée)
28 C

Système de contractilité

Protocole

Force Fréquence sur diaphragme /EDL/soléaire

Twitch= 2ms, 1 train de 600 ms

Stimulation à différentes fréquences pour obtenir la force maximale :

10, 20, 30, 50, 60, 80, 100, 120 Hz

Endurance

Twitch= 2ms, 30Hz, Train=300ms, 1 train/s

Sur l'ordinateur Sampling frequency mettez 100 Hz au lieu de 1000 Hz

Référence : Petrof et al., *AJR Cell Mol Biol*, 1995 / Bellinger et al., *Nat Med*, 2009

Matériels et produits

Set up: model 300C-LR Dual Mode ; Aurora scientific Inc Ontario, Canada

Stimulateur : S48 ; Grass Instrument, Quincy, MA

Logiciel : The dynamic Muscle Control/ Data Acquisition et the Dynamic Muscle control Data Analysis, DCM

Tampon Krebs

Tous les sels sont mis en solution séparément et les solutions mères sont conservées à 4°C

NaHCO₃ et glucose sont à mettre le jour même, en premier NaHCO₃ puis en deuxième le glucose. Compléter avec l'eau distillée, conserver à 4°C.

Le tampon est oxygéné durant toute la durée de l'expérience (95% O₂ et 5% CO₂).

La température de la cuve est maintenue à 28°C à l'aide d'un bain marie.

Méthodologie : 3. Etude fonctionnelle biochimique et fonctionnelle du récepteur à la Ryanodine RyR1

	mM	PM	Sol mère	½ litre
NaCl	118	58,44	172,5 g/l	86,25
KCL	4,8	74,55	35,78 g/l	17,89
MgSO ₄	1,2	246,47	29,58 g/l	14,79
KH ₂ PO ₄	1,2	136,09	16,33 g/l	8,165
CaCl ₂	2,5	147,02	36,80 g/l	18,40
NaHCO ₃	25	84,00	-	
Glucose	11,1	180,16	-	

2.2. Détermination de la typologie musculaire

Principe de l'expérience :

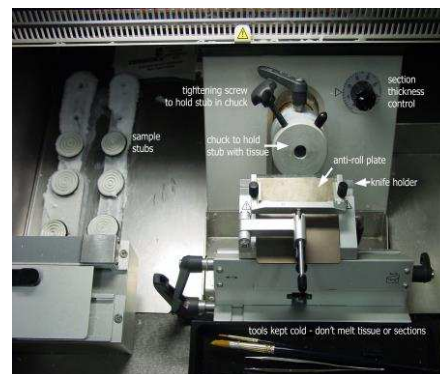
Le but de cette expérience est de pouvoir distinguer les fibres lentes des rapides et de les cerner grâce à un marquage du contour des fibres (dystrophine). L'expérience consiste à colorer les fibres lentes, rapides et la dystrophine en utilisant des anticorps primaires et secondaires couplés à un fluorochrome

Coupe de tissu musculaire congelé

L'échantillon est placé dans une résine (OCT) permettant de le fixer puis de réaliser des coupes de 10µm de tissu cryo-conservé grâce à un cryostat (Microm, HM560). Ces coupes sont ensuite montées sur des lamelles et conservées à -20°C à fin d'y réaliser antérieurement différents types de marquage.



Cryostat

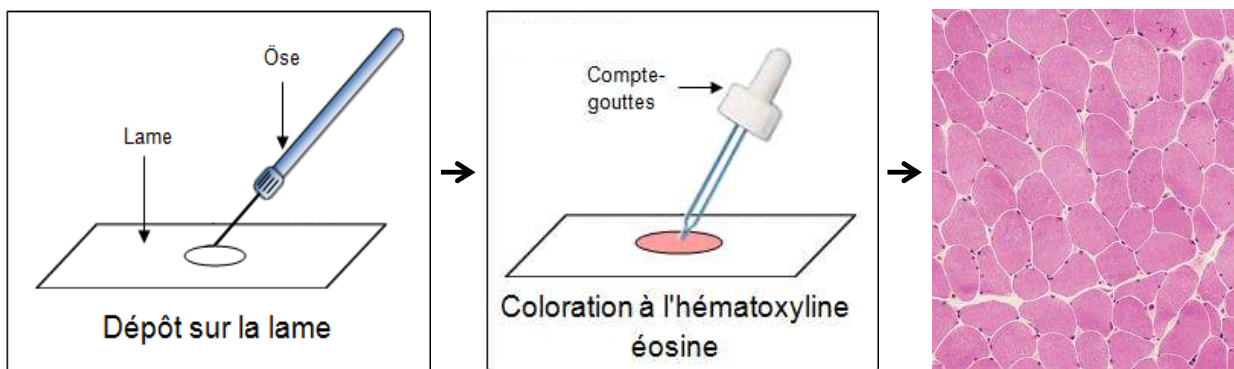


3. Détermination de la morphologie des fibres et l'orientation des plans de coupe

Coloration hématoxyline/éosine :

*50µl d'hématoxyline sont déposés sur la coupe qui est rincée après 3 minutes d'incubation. L'hématoxyline est un colorant violet qui se fixe sur les acides nucléaires et permet donc de révéler les noyaux cellulaires au microscope optique.

*Quelques gouttes d'éosine sont par la suite déposées sur la même lame et mis en incubation pendant 20s puis rincées. L'éosine est un colorant rose permettant de révéler le cytoplasme.



2.3. Microscopie électronique

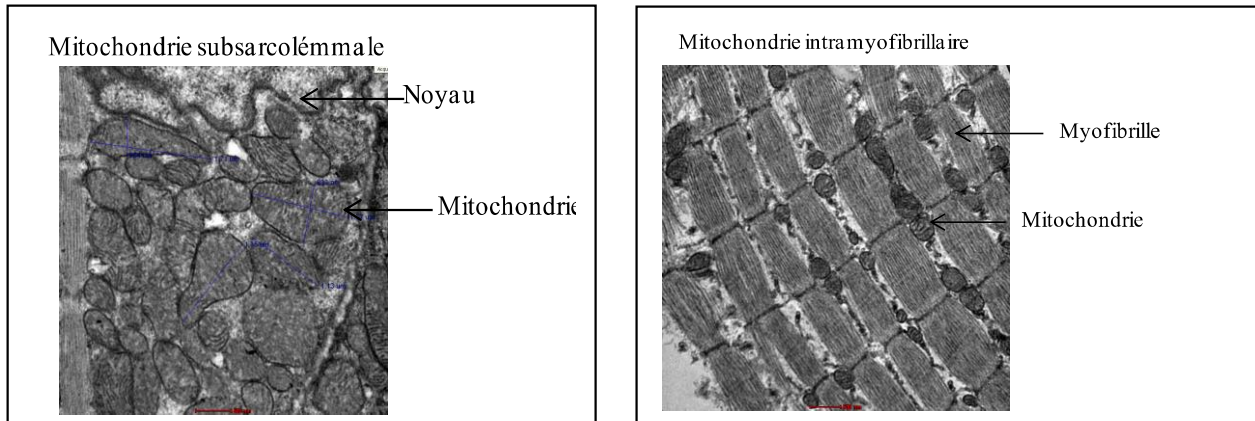
Principe de l'expérience :

Elle consiste à placer un échantillon suffisamment mince sous un faisceau d'électrons, et à utiliser un système de lentilles magnétiques pour projeter l'image électronique de l'échantillon sur un écran phosphorescent qui la transforme en image optique. Dans notre expérience, le but était de voir deux populations de mitochondries dans le diaphragme (intramyofibrillaires et subsarcolémiales), et de pouvoir quantifier des paramètres morphologiques et d'interactions des mitochondries.

-Un morceau de diaphragme d'environ 4mg est placé dans une solution de conservation (150µl de glutaraldéhyde+850µl de tampon sorensen's).

-L'échantillon est amené à la plateforme de microscopie électronique de l'INM (Institut de Neurosciences de Montpellier) afin qu'il soit fixé et analysé en microscopie électronique. Des

photos à différents grossissements, sur des coupes longitudinales ou transversales sur deux populations de mitochondries différentes (Subsarcolémmales et intramyofibrillaires, ont été prise).



Les cellules sont fixées dans un tampon PHEM 0.1M, pH 7.2 contenant 2.5% de glutaraldéhyde pendant toute une nuit à 4°C. Ces échantillons sont ensuite rincés dans le tampon PHEM et post fixés dans 0.5% de tétroxyde d'osmium + 0.8% de ferrocyanure de potassium dans le PHEM pendant 2 heures à température ambiante et à l'obscurité. Après deux lavages à l'eau, les échantillons sont placés dans un automate d'inclusion Micro-onde (Leica, AMW). Les cellules sont déshydratées dans une série de bains d'éthanol (30-100%) et d'acétone absolue.

Puis par des bains progressifs acétone-résine, les cellules sont enrobées dans une résine époxy : EMBED 812, celle-ci est polymérisée à 60°C.

De fines coupes (environ 65 nm; Leica-Reichert Ultracut E) sont alors collectées sur des grilles de cuivre et ceci pour différents niveaux dans le tissu. Puis, elles sont contrastées avec une solution d'acétate d'uranyle 1.5% dans l'éthanol 70% et une solution de citrate de plomb (selon Reynolds) et observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Tecan F20 à 200KV équipé d'une caméra numérique BM-Eagle, dans le Centre de Ressources en Imagerie Cellulaire de Montpellier (France).

5) Détermination de la typologie des fibres musculaires diaphragmatiques par immunofluorescence

Marquage des différentes isoformes de MHC (Myosin heavy Chain)

Les techniques d'immunofluorescence indirecte permettent d'identifier la localisation d'une protéine sur la coupe histologique d'un tissu. L'anticorps primaire permet la réaction antigène-

Méthodologie : 3. Etude fonctionnelle biochimique et fonctionnelle du récepteur à la Ryanodine RyR1

anticorps : La partie variable de l'anticorps primaire est dirigée contre une séquence antigénique d'une protéine cible que l'on souhaite localiser sur un tissu (protéine d'intérêt). L'anticorps secondaire (anti-immunoglobuline) dirigé vers la partie constante de l'anticorps primaire, est couplé à une molécule fluorescente (CY3 ou FITC) dont l'activité est observable au microscope à fluorescence.

Protocole

Les Lames sont placées dans des boites de pétri, sur un papier wattman humidifié.

- 100 µl d'anticorps primaire anti-MHC+ dystrophine sont déposés sur chacune des lames.
- 100µl de PBS sont déposés sur une des lames afin de servir de contrôle négatif
- 1 heure d'incubation.
- Les lames sont rincées deux fois au PBS
- 1h à l'abri de la lumière avec 100 µl d'anticorps secondaire couplés aux fluorochromes.
- 2 rinçages de 5min au PBS sous agitation douce.
- Un 3^{ème} rinçage de 10 min au formol pour fixer la réaction.

Les lamelles sont ensuite montées en plaçant sur chaque coupe une goutte de mowiol (liquide de montage) et de DAPI permettant de colorer les noyaux.

Anticorps primaires

-Anti MHCI, 1/5000^{ème} PBS (Sigma M8421)

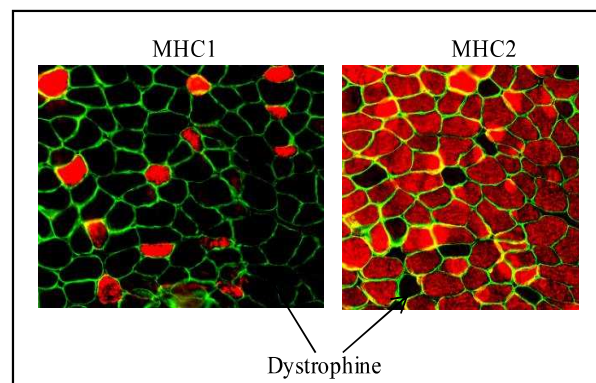
-Anti MHCII,

-Anti-dystrophine K7 1/300^{ème}

Anticorps secondaires

Anti-Rabbit Dylight 488, 1/500^{ème}

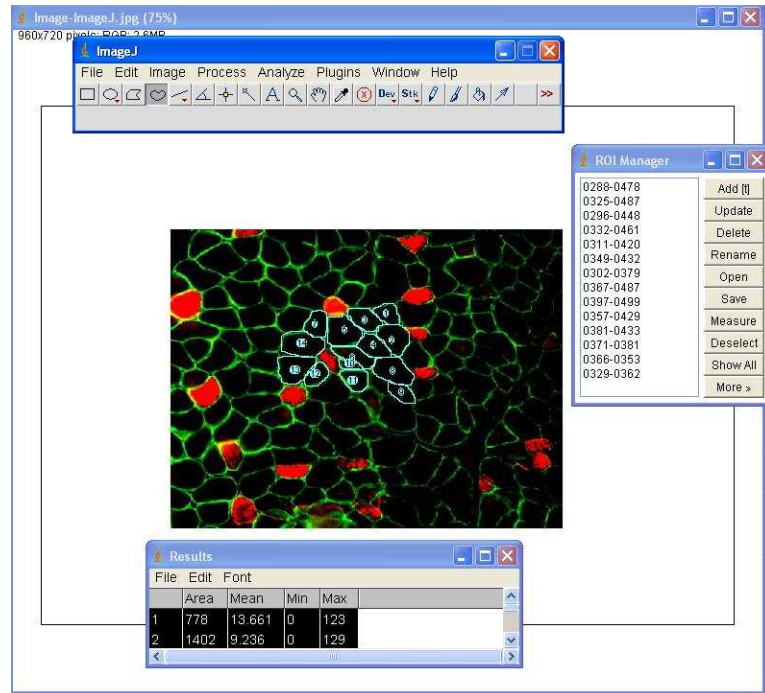
Anti-Mouse Dylight 549, 1/500^{ème}



Références : *Briguet et al., Neurom Disord, 2004.*

2.4. Analyse et traitement des images

La lecture au microscope à fluorescence (Nikon optiphot 2) relié à une caméra numérique couleur (Microvision Instrument) permet de révéler la structure des cellules grâce au marquage d'immunofluorescence ou d'hématoxyline éosine réalisé préalablement.



Pour chaque coupe, différentes zones aléatoires sont photographiées à un grossissement X20. Les images ainsi obtenues sont par la suite fusionnées à l'aide du logiciel Archimed (version 5.3.1, microvision Instrument) pour obtenir le double marquage MHCI ou MHCII avec la dystrophine pour le contour des fibres.

Grâce à un logiciel de traitement d'image ImageJ, une analyse morphologique est réalisée en utilisant les paramètres suivants ;

-Nombre totale des fibres lentes (MHCI), et rapides (MHCII).

-La Surface de section (CSA) de chaque type de fibre

-Le pourcentage de chaque type de fibre.

**Etudes fonctionnelle et biochimique du récepteur à
la Ryanodine
Méthodologie 3**

3.1. Technique de Bilayer

Principe de l'expérience :

C'est une technique électrophysiologique qui permet d'étudier le fonctionnement des canaux ioniques et des complexes moléculaires qui forment des pores. L'objectif de cette technique est d'étudier le comportement d'un canal comme une molécule isolée en l'insérant dans une bicouche lipidique artificielle.

Reconstitution dans les bicouches lipidiques planes

Ce système de reconstitution permet de caractériser à l'échelle moléculaire les canaux ioniques formés par le récepteur à la ryanodine.

Le principe de cette technique consiste à former une bicouche lipidique plane et à mesurer les propriétés électriques de cette bicouche, dans laquelle sont reconstitués les récepteurs à la ryanodine, grâce à la technique du voltage imposé.

Le montage utilisé comprend une chambre de mesure (Warner Instruments) constituée de deux compartiments séparés par une paroi percée d'un orifice (diamètre 200 μm) sur lequel la bicouche lipidique sera « tendue » (figure 1). Les deux compartiments de la chambre, nommés *cis* et *trans*, de part et d'autre de la bicouche lipidique sont reliés par des électrodes Ag/AgCl à une source de tension et un système électronique d'amplification de faibles courants. Les deux compartiments *cis* et *trans* sont remplis de solutions électrolytiques : la solution du compartiment *trans* (1 ml) mimant l'intérieur du réticulum sarcoplasmique est constituée de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 53 mM, KCL 50 mM, HEPES 250 mM, pH 7,35; la solution du compartiment *cis* (1 ml) mimant le cytoplasme comprend EGTA 1 mM, HEPES/Tris 250/125 mM, KCl 50 mM, CaCl_2 0,64 mM, pH 7.35. La concentration des ions Ca^{2+} libres dans le compartiment *cis* est calculée avec le programme WinMaxC (version 2.50; www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html).

Méthodologie : 3. Etude fonctionnelle biochimique et fonctionnelle du récepteur à la Ryanodine RyR1

Les bicouches lipidiques planes sont formées à partir d'un mélange de phosphatidyléthanolamine/phosphatidylcholine (3/1) (Avanti Polar Lipids) solubilisé dans du décane (30 mg/ml) en utilisant la technique de « painted bilayer » (figure 2).

Les vésicules, contenant les récepteurs de la ryanodine, issues des fractions membranaires du réticulum sarcoplasmique sont ajoutées dans le compartiment *cis* de la chambre de mesure. La fusion de ces vésicules avec la bicouche lipidique est facilitée par la création d'un gradient de KCl de part et d'autre de la bicouche (500/50 mM, *cis/trans*) en ajoutant du KCl concentré dans le compartiment *cis*. Après l'insertion de canaux K^+ et Cl^- dans la bicouche lipidique le compartiment *cis* est perfusé avec 10 ml de solution *cis*. Les courants dus aux récepteurs de la ryanodine sont enregistrés à 0 mV avec l'amplificateur BC-525D (Warner Instruments) et filtrés à 1KHz. L'acquisition des données se fait avec l'interface Digidata 1440A et le programme Axoscope 10.2 (fréquence d'acquisition 4 KHz) (Molecular Devices). Les enregistrements de courants sont analysés avec le programme Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Toutes les mesures sont réalisées à température ambiante.

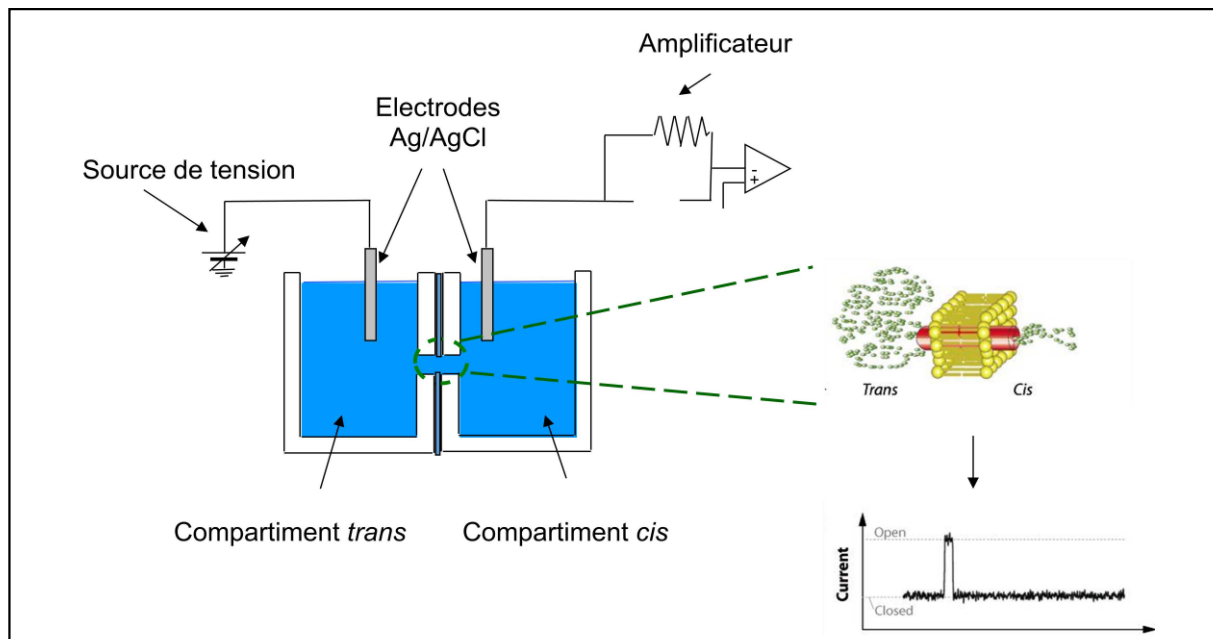


Figure 1 : schéma représentatif de la technique des bicouches lipidiques planes.

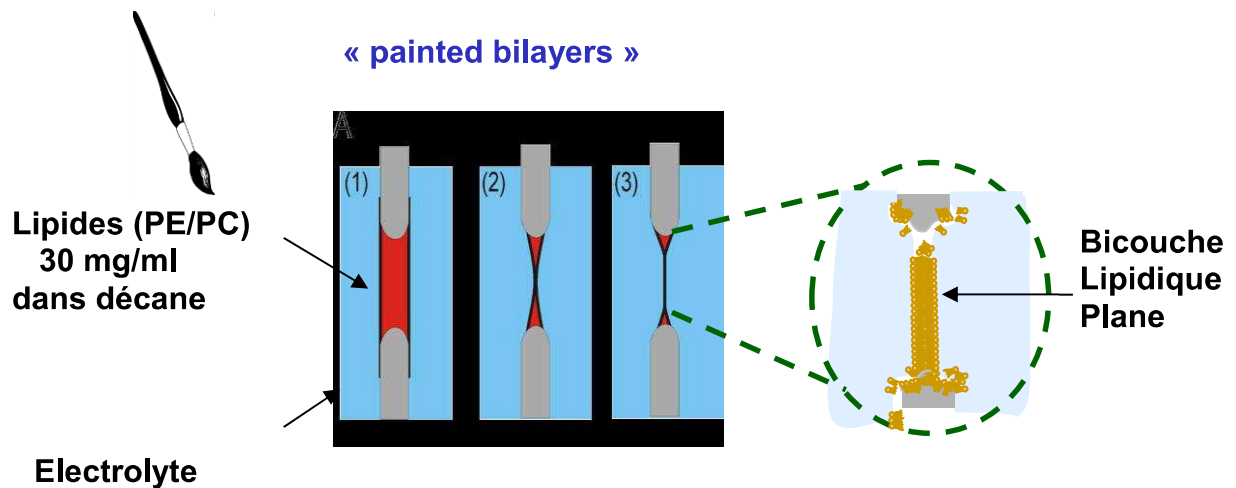


Figure 2 : formation d'une bicouche lipidique par la méthode « painted bilayer » (Mueller et al., 1962). Un pinceau très fin ou bien un capillaire en verre est plongé dans une solution contenant des lipides dissous dans un solvant organique non miscible à l'eau comme le décane. Un coup de pinceau est appliqué sur l'orifice circulaire (diamètre de 200 μm) de la paroi séparant les deux compartiments aqueux. Il se forme un film lipidique dont l'épaisseur diminue spontanément en fonction du temps. L'amincissement se poursuit jusqu'à la formation d'une bicouche lipidique. Les parties polaires étant en contact avec le milieu aqueux, les chaînes hydrocarbonées étant situées à l'intérieur de la bicouche.

Cette technique nous permet d'enregistrer les paramètres suivants :

- a) La probabilité d'ouverture du canal
- b) La durée d'ouverture du canal
- c) La durée de la fermeture de canal
- d) La fréquence d'ouverture

A la fin de l'expérience, rajouter de la ryanodine (5 μM) pour vérifier la spécificité du canal.

La ryanodine est un bloqueur du canal, il permet d'estomper son activité d'une manière irréversible.

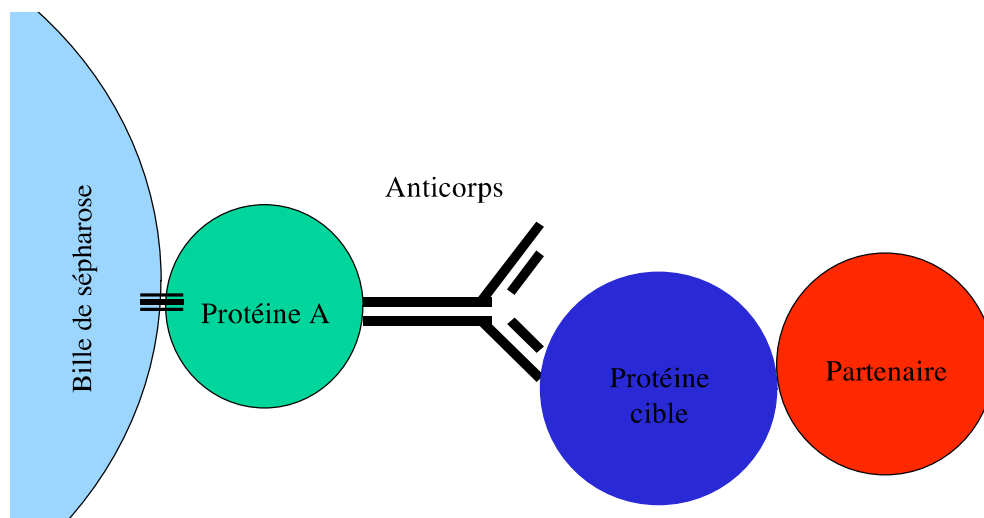
3.2. Immunoprécipitation du RyR1 et FKBP12

Principe de l'expérience :

La co-immunoprécipitation est une technique qui consiste à isoler un complexe protéique en utilisant un anticorps dirigé contre un des membres du complexe. Avec elle seront isolés ses partenaires protéiques. Ces protéines seront alors identifiées.

L'anticorps utilisé sera de préférence un anticorps polyclonal, afin d'éviter que l'épitope reconnu par l'anticorps ne soit masqué dans le complexe.

L'immunoprécipitation se fera en utilisant de la protéine A ou de la protéine G, couplée à des billes de sépharose. Le choix protéine A / protéine G dépend de l'anticorps que l'on va utiliser. Les protéines A et G sont des protéines d'origine microbienne qui présentent la capacité de fixer les molécules d'immunoglobuline de mammifère. Ces protéines sont couplées de façon covalente à des billes de sépharose. L'interaction entre ces protéines et les immunoglobulines n'est pas équivalente pour toutes les catégories d'anticorps.



➤ Préparer le tampon d'immunoprécipitation RIPA

	Concentration finale	stock	Pour 1 mL
Tris NaCl	10 mM	10 mM	1 mL
Triton X100	1%	10%	100 µL
NaF	5 mM	350 mM	14 µL
Na3VO4	1 mM	200 mM	5 µL
PMSF	0,5 mM		5 µL
E64	5 µM	10 mM	1 µL
leupeptine	50 µM	40 mM	1 µL

Dans des tubes eppendorf 1.5 mL (fond conique) :

- Mettre 250 µg de protéine et ajouter le tampon RIPA pour atteindre un volume final de 500 µl (max ¼ de protéines)
 - Ajouter 10µl d'anticorps anti RyR1
 - Laisser incuber **pendant 1 nuit** à 4°C sur la roue
- Faire le gel gradient 4-20%

	4%	20%
eau	3 mL	0.5 mL
glycérol 100%	0,25 mL	0,75 mL
acrylamide 49:1 (40%)	0,25 mL	2,5 mL
Tris 1.5M pH8.8	1.25 mL	1.25 mL
SDS 20%	25 µL	25 µL
APS 20%	20 µL	10 µL
temed	6 µL	4 µL

ETAPE DES BILLES

- Refaire du RIPA environ 1 mL / IP
- Pour chaque IP mettre 80 µL de billes dans un tube eppendorf 1.5 mL (à fond conique) avec un cône jaune coupé et ajouter la même quantité de RIPA (80 µL)
- Homogénéiser par retournement délicatement
- Centrifuger les billes 30s à 500 g et jeter le surnageant. Enlever le surnageant en laissant un peu de liquide. Laver les billes ainsi 2 fois avec 500 µL de RIPA chaque fois.
- Ajouter la préparation protéine-anticorps préparée la veille aux 80 µl de billes et laisser incuber **pendant 2h30** à 4°C sur la roue

• ***ETAPE DE DENATURATION DES BILLES***

- Préparer le tampon laemli urée (décongeler aliquote et ajouter frais PMSF, E64, leupeptine)
- Centrifuger les tubes 30s à 500 g à 4°C
- Jeter le surnageant (en laisser un peu)
- Laver les billes 2 fois avec le tampon RIPA en retirant le surnageant sans vortexer et répéter la centrifugation
- Après la dernière centrifugation, retirer tout le surnageant et reprendre les billes dans 50 µl de Laemmli urée
- vortexer
- Placer les tubes à 95 °C 5 min pour dénaturer les protéines
- vortexer
- centrifuger les échantillons 5 min à 10.000 g
- Western blot Classique
- Migration
- Transfert
- Anticorps primaire et secondaire.

3.3 Libération spontanée du Ca^{2+} par le RyR1 : Calcium Sparks

Principe de la technique

Cette expérience permet d'observer la libération spontanée du calcium à travers le récepteur à la ryanodine en ex-vivo. On isole une bande de fibre musculaire qu'on perméabilise et que l'on incube avec une sonde calcique. La préparation sera excitée par un faisceau laser permet de récupérer un signal lumineux quand la sonde se lie aux ions de calcium libérés par le RyR.

Étapes

- Placer la biopsie dans la solution de relaxation (voir composition)
- Fixer le tissu des deux côtés dans le sens de la longueur des fibres avec des micro-aiguilles
- Disséquer délicatement une fine bande de 4-7 fibres sous la loupe (respecter l'intégrité des fibres)
- Fixer la bande disséquée des deux côtés dans une cuve (voir photo) à deux clamps revêtus de silicone.
- Perméabiliser les fibres avec de la saponine 0.01% préparée dans un milieu intracellulaire pendant 30-40 second
- Laver 3 fois avec 250µl en utilisant la solution de relaxation
- Egoutter sur un papier absorbant
- Rajouter 250µl de la sonde calcique Fluo-4/potassium préalablement préparée dans le milieu intracellulaire.
- Observer au microscope confocal Carl Zeiss MicroImaging, Inc. LSM 510 NLO confocal system (63x oil immersion, NA 1.4)

Paramètres d'acquisition:

En Line Scan mode, LSM 510 NLO confocal system (63x oil immersion, NA 1.4) operated in line-scan mode (x vs. t, 1.9 ms/line).

Méthodologie : 3. Etude fonctionnelle biochimique et fonctionnelle du récepteur à la Ryanodine RyR1

Le fluo-4 est excité par un laser argon/Krypton à 488 nm, la fluorescence est émise à 525 nm et enregistrée. Les sparks émis sont identifiés en utilisant un algorithme d'auto-détection (Cheng et al., 1999).

Solution de relaxation.

Relaxing Solution:					
	mM	MW (g)	final (250 ml)	final (100 ml)	final (500 ml)
K-glutamate	140	203,2	7,1120	2,8448	14,224
HEPES	10	238,3	0,5958	0,2383	1,1915
MgCl ₂	10	95,21	0,2380	0,0952	0,47605
EGTA	0,1	380,4	0,0095	0,0038	0,01902

Milieu Intracellulaire pH=7.0

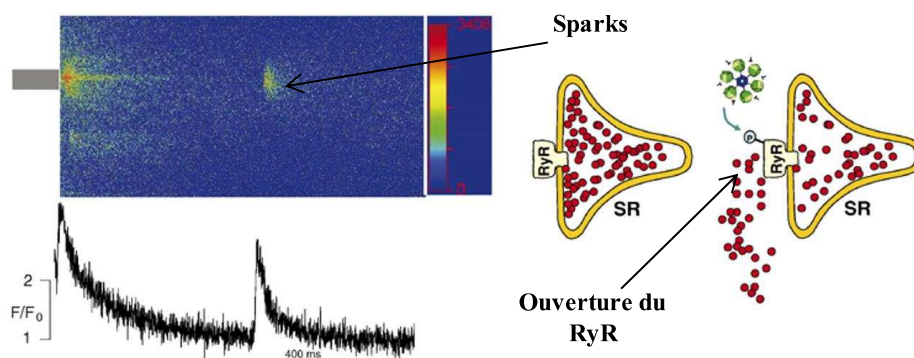
Solution interne					
	mM Total		mM libre	MW	M/250 ml
K-glutamate	140			203,23	2,8452
HEPES	10			238,3	0,2383
PCr	20			255,1	0,5102
Na ₂ ATP	5	15	0,904	551,1	0,2756
EGTA	1		0,702	380,4	0,0380
MgCl ₂	4,5	13,5	0,42	95,21	0,0428
CaCl ₂	0,25	0,75	144 nM	147,02	0,0037

Méthodologie : 3. Etude fonctionnelle biochimique et fonctionnelle du récepteur à la Ryanodine RyR1

Avant la manip:		
Fluo-3 /Fluo-4	50 μ M	Stock 1 mM
H2O	50 μ l	

Aliquoter à 900 μ l pour 1ml final le jour de la manip et congeler les aliquots à -20°C

Représentation schématique de l'expérience :



Etudes des voies signalétiques d'un point de vue protéique

Méthodologie 4

4.1. Dosage des protéines musculaires par Immunoblotting

Principe de l'expérience :

La technique consiste à séparer des protéines, préalablement dénaturées, selon leur taille en utilisant l'électrophorèse sur un gel de polyacrylamide. Ces protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. Elles sont par la suite incubées avec des anticorps spécifiques à la protéine d'intérêt. Cette technique permet de détecter la présence d'une protéine dans un tissu, d'évaluer sa taille, sa concentration ainsi que les modifications que la protéine peut subir.

Dosage de la concentration protéique des échantillons

Les dosages se réalisent sur 10 à 80 mg d'homogénat musculaire (morceau du muscle directement congelé dans l'azote liquide), préalablement choisi et coupé sur de la glace sèche. Toutes les manipulations doivent être réalisées sur la glace.

1^{ère} étape : Extraction des protéines

L'échantillon est dilué au 10^{ème} dans le tampon d'homogénéisation par rapport au poids du muscle :

Ex : Dia+30g → 30X10=300 300-30=270µl de Tpn

Homogénéiser au polytron (environ 10s) puis laisser les tubes sur une roue tournante pendant 45 min

Centrifuger à 4°C à 100g (rcf) pendant 10 min

Récupérer le surnageant puis réaliser un dosage de protéine avec le Kit BCA.

2^{ème} étape : Dénaturation et préparation des échantillons

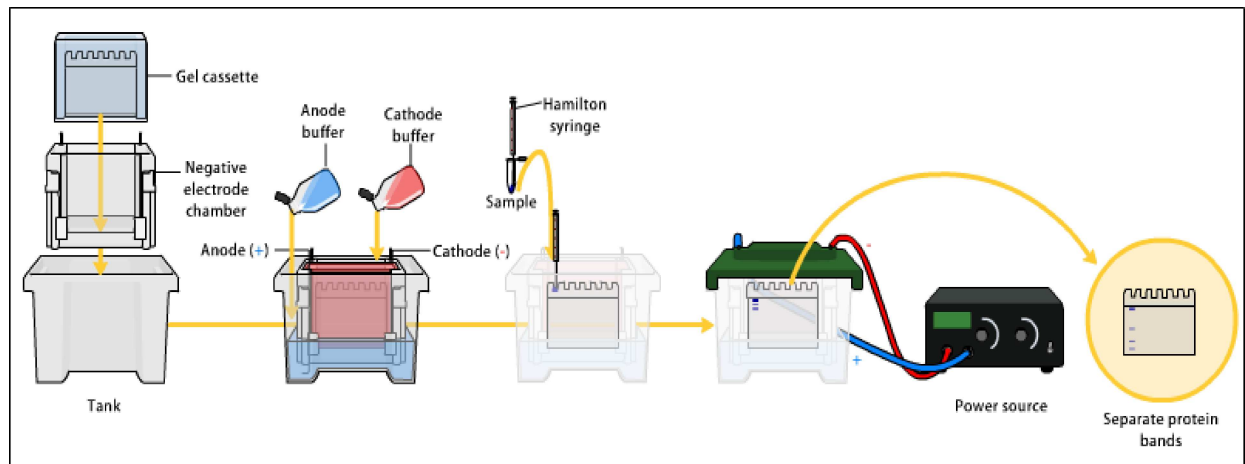
Dans un tube eppendorf, préparer les échantillons musculaires en fonction de la concentration des échantillons et rajouter du laemmli volume à volume.

3^{ème} étape : Séparation sur un gel SDS-Page : Migration

Les échantillons sont ensuite séparés sur un gel de polyacrylamide entre 4 et 20% (gradient ou fixe selon la taille et les propriétés de la protéine en question).

Méthodologie : 4. Etude des voies signalétiques d'un point de vue protéique

Charger délicatement les échantillons dans les puits du gel puis remplir la cuve de tampon de migration. Faire migrer entre 100 et 150 volts 1 à 2h30 : le temps de migration appliqué dépend des poids moléculaires des protéines à séparer.



4^{ème} étape : Transfert des protéines sur membrane

Utiliser des membranes de nitrocellulose de porosité 0,2 μm pour les protéines de poids moléculaire inférieur à 100 kDa. Sinon, utiliser les membranes 0,45 μm .

Mettre les membranes, le papier wattman et les éponges dans le tampon de transfert.

Pour le montage : Face noire de l'appareil, l'éponge, 2 papiers wattman, le gel, (le premier puits à droite), la membrane de nitrocellulose, 2 papiers wattman et l'éponge.

Le transfert se fait à 100 volts pendant 1 heure à froid (bac de glaçon dans le congélateur).

5^{ème} étape : Immunomarquage

Incuber la membrane dans :

-le tampon de blocage : 1 h sous agitation lente (20 cycles/min) à température ambiante

-Anticorps primaires : 1h 30 température ambiante ou overnight à 4°C sous agitation lente (20/min)

Méthodologie : 4. Etude des voies signalétiques d'un point de vue protéique

-Rincer dans du PBS : 3X5 min agitation rapide (35/min).

-Anticorps secondaires couplés à un fluorochromes : 1h à température sous agitation lente (20)

-Rincer dans du PBS : 3X5 min agitation rapide (35/min)

6^{ème} étape : Révélation

Sécher correctement les membranes à l'aide de papier absorbant, les abriter le maximum de la lumière.

Révéler les membranes à l'aide de l'Odyssey Infrared imaging system

Analyser la densité des bandes (l'Odyssey Infrared imaging system).

Références et utilisation des différents anticorps primaire et secondaire

a. Anticorps primaires utilisés au cours de la thèse.

AC	kda	Espèces	Fournisseur	WB Odyssey
Calpaine 1	80	mouse mono	Sigma	1/1000
Calpaine 2	76	Rabbit poly	Abcam	1/1000
Calpaine 3	94, 80, 60	Mouse mono	Leica	1/100
caspase 3	32/17/11	Rabbit poly	santacruz	1/1000
caspase 3	35,89473684	Rabbit poly	Cell Signal	1/1000
caspase-3	35, 19, 17	Rabbit mono	Cell signal	1/1000
caspase-3	82	Goat poly	R&D	1/1000
DRP1	24	Mouse poly	BD Transduction	1/1000
Phospho-DRP1 serine 616	78-82	Rabbit poly	Cell Signal	1/500
Phospho-DRP1 serine 637	78	Rabbit poly	Millipore	1/1000
FKBP12	12	Goat poly	santacruz	1/1000
GAPDH	37	Rabbit poly	santacruz	1/60000
GAPDH	37	Mouse mono	abcam	-
Mitofusin-2 (N-terminal)	86	Rabbit	Sigma	1/1000
OPA1	80-10	Mouse mono	BD biosciences	1/1000
OPA1	90, 80, 65	Mouse mono	thermo scientific	1/1000
RyR	565	Rabbit poly	Badrilla	1/1000
RyR	565	Rabbit poly	covalab	1/1000
RyR	565	Rabbit poly	Perbio	1/1000
β-Actin		Rabbit poly	Abcam	1/1000
β1-adrenerg	65	Rabbit poly	santacruz	1/1000
β2-adrenerg	50-80	Rabbit poly	santacruz	1/200
β3-adrenerg	50-80	Goat poly	santacruz	1/200

b. Anticorps secondaires

AC	IG	Espèces	Fournisseur	IF
anti goat	IRDye 680	donkey	odyssey	1/30000
anti goat	IRDye800Cw	donkey	odyssey	1/30000
anti rabbit	IRDye800Cw	donkey	odyssey	1/30000
anti rabbit	IRDye 680	donkey	odyssey	1/30000
anti mouse	IRDye 680	donkey	odyssey	1/30000
anti mouse	IRDye800CW	donkey	odyssey	1/30000

c. Anticorps d'immunofluorescence

AC	IG	Espèces	Fournisseur	IF
anti-mouse	IgG perox	goat	sigma	1000
anti-rabbit	alexa 488	goat	mol Prob	1000
anti-mouse	alexa 488	goat	mol Prob	1000
anti-mouse	alexa 488	chicken	mol Prob	1000
anti-rabbit	alexa 633	goat	mol Prob	1000
anti-mouse	alexa 633	goat	mol Prob	1000
anti-goat	alexa 555	donkey	mol Prob	1000
anti-chicken	alexa 555	goat	mol Prob	1000
anti-mouse	alexa 647	goat	mol Prob	1/500

Gel de migration fixe

Runing gel				
% du gel	7%	10%	12%	15
H ₂ O	5,55	4,8	4,3	3,59
Acrylamide 40%	1,75	2,5	3	3,75
Tris Hcl 1.5M Ph 8.7	2,5	2,5	2,5	2,5
SDS 20%	50µl	50µl	50µl	50µl
APS 10%	100µl	100µl	100µl	100µl
Temed	10µl	10µl	10µl	10µl

Le stacking gel

Stacking gel				
Nombre de Gel	X1	X2	X3	X4
H ₂ O	2,18	4,36	6,54	8,72
Acrylamide 40%	375µl	750µl	1,125	1,5
Tris HCl 1M Ph 6,8	380µl	760µl	1,14	1,52
SDS 20%	15µl	30µl	45µl	60µl
APS 10%	30µl	60µl	90µl	120µl
Temed	5µl	10µl	15µl	20µl

4.2. Analyses Statistiques des résultats

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm Standard Error of the Mean (SEM). Les statistiques et les figures ont été réalisées à partir du logiciel Graphprism. La normalité des échantillons est évaluée avec le test de Kolmogorov-Smirnov et les droites de Henry pour déterminer par la suite le choix du test statistique correspondant.

Des t de student ou le U de Mann-Whitney ont été utilisés pour la comparaison de deux groupes selon la normalité des données et des ANOVA à un ou deux facteurs lorsque l'analyse comportait plus que deux groupes (Ex : effet traitement / effet durée). Des ANOVA à deux facteurs pour mesures répétées ont été utilisées pour les mesures des propriétés contractiles. Les tests ANOVA ont été suivis de test post-hoc Bonferroni pour la comparaison des groupes à différentes fréquences de stimulation en cas de significativité.

Le seuil de probabilité d'erreur a été fixé pour un $p < 0.05$

Résultats

Etudes 1 : La dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique.

1.1. Objectif de l'étude.

Comme nous l'avons vu dans la revue de la littérature, de nombreux travaux ont montré très clairement que la ventilation, induisait au niveau du diaphragme un stress oxydant associé à une protéolyse, à la base de lésion des fibres musculaires, d'atrophie et d'atteinte de la fonction contractile.

Bien que ces voies de la protéolyse puissent être également stimulées lors d'une perturbation de l'homéostasie calcique, son existence n'a jamais été évaluée dans le contexte de la VIDD.

Un autre mécanisme, tout aussi mal connu dans le contexte de la VIDD pourrait être également impliqué dans cette pathologie. En effet, la mise en place d'une ventilation mécanique nécessite une anesthésie, une sédation et s'accompagne de stress et de phénomènes douloureux, qui tous peuvent induire une hyper-activation de la voie β -adrénergique dans un contexte de stress catécholaminergique (Reiken et al., 2003a; Ward et al., 2003). Cette hyper-activation, à la base de phénomène de phosphorylation PKA dépendante du RyR1 (Reiken et al., 2003a), peut être délétère pour la fonction musculaire (Andersson et al., 2011a; Bellinger et al., 2008a, 2009b; Reiken et al., 2003b), et a été corrélée à un taux élevé de mortalité en réanimation (Boldt et al., 1995).

Ainsi dans cette étude, nous avons émis comme première hypothèse, que la ventilation mécanique chez l'homme pouvait induire au niveau de son diaphragme des modifications post-traductionnelles du RyR1, associées à une atteinte fonctionnelle de ce canal.

Puis, afin de proposer des mécanismes physiopathologiques précoces de cette atteinte, nous avons voulu déterminer si 6 heures de ventilation mécanique chez la souris, pouvait induire au niveau du RyR1 du diaphragme une phosphorylation PKA-dépendante associée à des modifications redox (oxydation et S-nitrosylation). Nous avons également vérifié si ces

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

modifications post traductionnelles pouvaient induire une dissociation entre la FKBP12 et le complexe RyR1, résultant d'un trouble de l'homéostasie calcique, à la base de l'apparition d'une atteinte de la fonction contractile du diaphragme, d'une activation de la protéolyse dépendant du calcium et d'une atrophie.

De plus, afin d'observer la part seule du stress oxydant dans l'induction des anomalies fonctionnelles au niveau du RyR1 et de l'atteinte contractile du diaphragme, nous avons dans un premier temps évalué l'effet sur le diaphragme de souris ventilées mécaniquement pendant 6 heures, d'un traitement anti oxydant (Trolox). Afin de vérifier si ce stress oxydant était bien lié à l'inactivité et l'étirement du diaphragme induit par ventilation mécanique, nous avons évalué l'effet sur le diaphragme d'une ventilation en pression positive de 6 heures (CPAP), permettant à la souris anesthésiée suivant le même protocole, de ventiler spontanément.

Afin d'observer la part seule du stress catécholaminergique dans l'induction des anomalies fonctionnelles au niveau du RyR1 et de l'atteinte contractile du diaphragme, nous avons évalué l'effet de 2 beta bloquants, un non sélectif (propranolol) l'autre sélectif des récepteurs β_2 adrénergiques (ICI 118551) sur le diaphragme de souris ventilées mécaniquement pendant 6 heures.

Afin d'identifier si la dissociation du complexe RyR1 et la FKBP12 était bien impliquée dans la VIDD, nous avons évalué chez la souris ventilée mécaniquement pendant 6 heures et 12 heures l'effet d'un traitement pharmacologique préventif, limitant cette dissociation (molécule de type Rycal : S107). En effet, les Rycals sont des agents pharmacologiques solubles dans l'eau, dérivés des Benzodiazépines qui stabilisent la liaison entre la FKBP12 et le complexe RyR1, malgré la présence de modifications post-traductionnelles du canal (Andersson et al., 2011a; Bellinger et al., 2009b).

1.2. Protocol

L'étude chez l'homme était faite en accordance avec le World Medical Association Guidelines pour la recherche chez l'homme et approuvée par le comité d'éthique de Montpellier (Protocol #NCT00786526). Chez les modèles animaux, les expérimentations ont suivies les réglementations d'expérimentation animale établies par l'Institutional care committee et les recommandations de la déclaration d'Helsinki.

Modèle humain de VIDD :

Sur des biopsies diaphragmatiques de 2 groupes : 1) patients en mort cérébrale et donneurs d'organes (MV>24heures). 2) Patients anesthésiés pour chirurgie thoracique (MV<3 heures utilisés comme sujets témoins). Il a été réalisé sur ces biopsies des analyses biochimiques du RyR1 (méthodologies 3) et de l'activité du canal RyR1 en bilayer (méthodologie 3 et 4).

Modèle murin de VIDD :

53 souris sauvages ont été réparties en 7 groupes dont 5 ont été ventilés mécaniquement et un ventilé avec une pression positive continue. Le 7^{ème} groupe non ventilé servait de control.

La méthodologie des deux types de ventilation est précisée dans le chapitre méthodologie de cette thèse.

Traitement pharmacologique utilisé :

a) Trolox : c'est un antioxydant global capable de tamponner les ROS dans le cytoplasme. La molécule était administrée à 20mg/Kg par injection intraveineuse (IV) en dose de charge 5-20 minutes avant l'intubation. 4mg/kg/h était infusé en continue durant la ventilation. La molécule était solubilisée dans du Ringer lactate.

b) Propanolol à 10mg/Kg par injection intrapéritonéal (IP). La molécule était solubilisée dans du Ringer lactate et délivrée au début de la ventilation mécanique. C'est un β -bloquant non

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

sélectif des récepteurs β_1 et β_2 qui se fixe sur les récepteurs adrénergiques et inhibe le système sympathique.

c) ICI 118551) 10mg/Kg en dose de charge 15 min avant l'intubation et 3mg/kg injecté toute les heures durant la ventilation mécanique comme dose de maintien par injection intrapéritonéal (IP). La molécule était solubilisée dans du Ringer lactate et délivrée. C'est un bêta bloquant sélectif au récepteur β_2 -adrénergique.

d) S107: un dérivé des Benzodiazépines qui stabilisent la liaison entre la FKBP12 et le complexe RyR1. Les souris étaient traitées pendant 7 jours avant la ventilation. La molécule était solubilisée dans l'eau à une concentration de 0.25mg/ml. Les souris buvaient 3ml par jour ce qui équivaut à une dose de 37.5mg/kg/jour.

Mesure et évaluation

Sur le diaphragme des souris de tous les groupes nous avons évalué la fonction contractile (méthodologie 2), la biochimie du RyR1 (méthodologie 2-3), les sparks calciques (méthodologie 2), l'activité du canal RyR1 en Bilayer (méthodologie 2) et l'activité de la protéine kinase A (méthodologie 3).

1.3. Résultats

Il existe un remodelage et une dysfonction du canal RyR1 au niveau du diaphragme chez le patient de réanimation ventilé mécaniquement:

Pour évaluer le remodelage et les dysfonctions du RyR1 dans le diaphragme des patients ventilés, nous avons obtenu des biopsies des patients en mort cérébrale et donneurs d'organes ventilés (98±65 heures). Nous avons comparé ces spécimens aux biopsies diaphragmatiques des patients ventilés (2.3±04 heures), obtenues au cours d'une chirurgie thoracique dans le cadre de cancer pulmonaire.

Comme le montre la (fig.1A-B) de l'article 1, nous avons observé chez des sujets ventilés en moyenne (98±65 heures : short-term MV) la présence au niveau du RyR1 d'une oxydation, S-nitrosylation et de phosphorylation sur la Ser2844 avec une dissociation de la calstabin1 du RyR1. Ce remodelage biochimique, est associé à une augmentation de la probabilité d'ouverture (P₀) du canal en comparaison avec les contrôles (short-term MV) mesurée sur des canaux incorporés dans des couches lipidiques (Fig.1C-D) témoignant d'une fuite calcique.

La dysfonction du RyR1 est un mécanisme physiopathologique précoce impliqué dans la VIDD.

L'apport du modèle animal nous a permis d'évaluer la présence d'un remodelage du RyR1 au niveau du diaphragme, similaire à celui observé chez l'homme (Fig 2C-D ; article 1), associée à une diminution de force contractile du diaphragme (Figure 2A-2B ; article 1) après seulement 6 heures de MV, et ceci sans phénomènes d'atrophie.

De plus, comme le montre la figure (Fig.2E-F ; article 1), nous avons observé chez les souris ventilés, par la mesure des événements de libération spontanés du Ca²⁺ (i.e. Ca²⁺ Sparks), décrite dans le chapitre méthodologie (Page 111), une augmentation de la fréquence des Sparks calciques qui reflètent une fuite à travers le RyR1.

Le stress oxydant est impliqué dans la dysfonction précoce du RyR1 au cours de la ventilation mécanique.

Comme le montre la figure (2B-C-D-E-F) de l'article 1, l'ensemble des anomalies décrites au niveau du diaphragme est prévenu par un traitement au Trolox.

Le modèle de la souris ventilée en pression positive continue (CPAP) nous a permis d'évaluer l'implication seule de la mise en décharge du diaphragme par la ventilation mécanique, dans la genèse du stress oxydant et la dysfonction précoce du RyR1. Ainsi, 6 heures de CPAP induit au niveau du diaphragme de la souris, en terme modification post-traductionnelle du RyR1, une phosphorylation isolée mais comparable au groupe ventilé, sans fuite calcique ni dysfonction contractile (figure 3A-B-C-D).

Ainsi, le traitement par bêta-bloquants des souris mise en décharge diaphragmatique, induite par la ventilation mécanique entraîne une oxydation du RyR1, sans phénomène de phosphorylation, qui à elle seule est insuffisante pour induire un dysfonctionnement du canal RyR1 associée à une atteinte de la fonction contractile du Diaphragme. Nous avons donc fait l'hypothèse que cette phosphorylation associée à l'oxydation du RyR1, au niveau du diaphragme, pouvait être secondaire à l'activation de la PKA, dans le cadre d'une stimulation de la voie bêta-adrénergique. Nous avons donc voulu vérifier cette hypothèse à l'aide d'inhibiteur pharmacologique de cette voie.

Le stress catecholaminergique est un mécanisme majeur impliqué dans la VIDD.

Comme le montre la figure (4A), article 1, nous avons tout d'abord mis en évidence pour la première fois, au niveau du diaphragme de souris l'expression majoritaire de récepteurs β 2-adrénergiques. Afin de mettre en évidence l'activation de ces récepteurs au cours de la ventilation, nous avons dosé l'activité de la PKA dans le diaphragme de souris, après 1, 2, 3 et 6 heures de MV. Ainsi, nous avons mis en évidence (Figure 4-E, article 1) la présence d'une

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

activation de la voie PKA qui apparaît dès 2 heures de ventilation mécanique chez la souris, compatible avec la présence d'un stress catecholaminergique. En effet, après deux heures de ventilation (groupe MV-2h), le niveau d'activation de la PKA rejoint statistiquement celui obtenu chez un groupe de souris control, non ventilé mais ayant reçu 30 minutes avant une dose de 3mg/kg d'isoproterenol, constituant un modèle expérimental pharmacologique de stress catecholaminergique.

Dans cette étude, nous montrons clairement qu'au cours de la ventilation mécanique chez la souris, un traitement par bêtabloquant (propranolol ou ICI118551), prévient l'activation de la voie PKA Figure (4E, article 1), ainsi que la phosphorylation du RyR1 sans effet sur son oxydation qui est toujours présente Figure (4C-D, article 1). Ainsi comme le montre la figure (4B-D, article 1), au cours de la ventilation mécanique, la phosphorylation PKA dépendante sur la Ser2844, secondaire à un stress catecholaminergique est nécessaire chez la souris pour induire une dissociation de sa protéine stabilisatrice (FKBP12) associée à une atteinte de la fonction contractile du diaphragme.

La stabilisation de la liaison entre RyR1 et FKBP12 est une nouvelle cible thérapeutique dans la prévention de la VIDD.

Dans la figure (5A-B, article 1), nous montrons que le S107 prévient, au cours de la ventilation mécanique chez la souris, la dissociation entre la FKBP12 et le RyR1 malgré la présence d'une phosphorylation et d'une oxydation du canal. La figure (5C-D) montre qu'au cours de 6 heures de ventilation mécanique chez la souris, la stabilisation de la liaison entre la protéine FKBP12 et le complexe RyR1, est suffisant pour prévenir la fuite calcique à travers ce canal ainsi que l'altération de la fonction contractile du diaphragme.

Evaluation du diaphragme après 12 heures de MV

6 heures de ventilation mécanique chez la souris sont suffisantes pour induire une atteinte contractile du diaphragme sans atrophie ni phénomènes lésionnels (Mrozek et al., 2012b). Nous avons montré que cette atteinte contractile précoce est liée à des fuites de calcium entre le réticulum sarcoplasmique et le cytoplasme à travers le canal RyR1. Ainsi, ces troubles de l'homéostasie calcique pourraient induire une altération du couplage excitation-contraction permettant d'expliquer, du moins en partie l'atteinte fonctionnelle précoce, sans atteinte histologique.

Mais le marqueur le plus connu dans la VIDD chez l'homme ou dans des modèles animaux est l'atrophie, observée au bout de temps plus long de ventilation mécanique.

Ainsi pour valider notre modèle de VIDD chez la souris, nous avons vérifié, comme le montre la figure (6, article 1), que 12 heures de ventilations mécanique induisaient une atrophie, sans modification du phénotype musculaire, associée à une dysfonction contractile.

Nos résultats montrent que les deux traitements que nous avons utilisés, à savoir un bêta bloquant (ICI118551) ou une molécule de type Rycal (S107) préviennent l'atrophie et la dysfonction contractile induite par 12 heures de ventilation mécanique (figure 6). Nous avons également vérifié que les deux traitements utilisés n'avaient aucun effet sur la force ou l'atrophie des fibres chez des souris contrôles.

1.4. Discussion

Le résultat principal de cette étude montre, chez la souris, que la VIDD impliquait de façon très précoce, une dissociation entre le complexe RyR1 et sa protéine stabilisatrice FKBP12, à la base de trouble de l'homéostasie calcique et d'une dysfonction contractile.

Nous avons également mis en évidence la présence d'une phosphorylation PKA dépendante du complexe RyR1, sur la Ser 2844 nécessairement associée à une oxydation de ce même canal, pour induire la dissociation entre RyR1 et FKBP12.

En effet, le modèle de souris ventilé en CPAP, nous a permis d'induire une phosphorylation isolée du canal RyR1 sans oxydation, et le modèle de la souris ventilés mécaniquement mais traités avec un bêtabloquant nous a permis d'induire une oxydation isolée de canal RyR1 sans phosphorylation. Dans les deux cas, ces modifications post-traductionnelles isolées n'induisaient aucune des altérations précédemment décrites chez les souris ventilées mécaniquement à savoir, des phénomènes d'oxydation et de phosphorylation du RyR1, associés à une dissociation de la protéine FKBP12, une fuite calcique venant du réticulum et une atteinte de la fonction contractile.

Nous avons montré que l'ensemble de ces anomalies décrites chez la souris, était également présentes au niveau du diaphragme ventilé mécaniquement chez l'homme. Nos résultats mettent en avant l'intérêt de toute thérapeutique permettant de limiter au niveau du diaphragme les conséquences fonctionnelles des modifications post traductionnelles du RyR1 induit par le stress oxydant associées au stress catécholaminergique.

La première de ces thérapeutiques est l'utilisation d'un antioxydant. En effet, nous avons montré qu'un traitement par Trolox pouvait non seulement prévenir l'oxydation du RyR1 mais également sa phosphorylation. Bien que non exploré dans notre étude, il est probable que la PKA activée par la stimulation β -adrénergique au cours de la ventilation mécanique, le soit également par les stress oxydant (Brennan et al., 2006).

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

Malheureusement, et probablement du fait de l'absence de sélectivité dans les mécanismes d'action de la molécule utilisée, l'absence d'identification claire de la source principale de ROS stimulée lors de la ventilation mécanique (qui fait l'objet de mon deuxième article) et l'absence de courbe dose réponse testée, aucun essai thérapeutique à ce jour visant à évaluer l'efficacité d'un traitement antioxydant à large spectre, n'a montré une efficacité chez l'homme pour limiter la VIDD.

Etant donné que la phosphorylation et l'oxydation du RyR1 doivent être synergiques pour induire une dysfonction du RyR1, toute thérapeutique permettant de limiter l'une de ces deux modifications post traductionnelle semblent être prometteuse dans la prévention de la VIDD. Ainsi, la prévention d'un stress catécholaminergique permettant de limiter la phosphorylation du RyR1 au cours de la ventilation mécanique est une nouvelle cible thérapeutique non encore explorée à ce jour.

En effet, nous avons montré que la phosphorylation du RyR1 au niveau du diaphragme, chez la souris ventilée mécaniquement impliquait l'activation de la PKA. Cette activation, peut résulter d'un stress catécholaminergique qui est un phénomène fréquemment retrouvé au cours d'une ventilation mécanique chez l'homme en réanimation. En effet, les agents anesthésiques ont montré chez l'animal des effets inotropes négatifs et vasodilatateurs, responsables d'une augmentation brutale du tonus sympathique avec libération de catécholamines dans le sang, à la base d'un stress catécholaminergique. Des observations similaires ont été rapportées chez les patients anesthésiés et ventilés (Eu et al., 2000). Ainsi, notre première étude montre que l'utilisation d'un β_2 bloquant sélectif pourrait chez l'homme au cours de la ventilation mécanique limiter la stimulation de la voie β_2 -adrénergique suite au stress catécholaminergique, avec un effet bénéfique protecteur sur la fonction diaphragmatique.

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

Enfin, du point de vue des nouvelles cibles thérapeutiques, nous avons montré l'efficacité dans la prévention de la VIDD, chez la souris, de la molécule de type Rycal (S107). Cette molécule est particulièrement intéressante, car elle agit le plus en aval possible au niveau de la voie cellulaire que nous avons identifiée dans la genèse d'une VIDD. En limitant ainsi la dissociation entre le complexe RyR1 et sa molécule stabilisatrice FKBP12, cette molécule bloque à la fois les effets délétères du stress oxydant et de la stimulation β 2-adrénergique sur le complexe RyR1. Son efficacité chez la souris semble montrer que ce mécanisme initial est majeur dans la genèse de la VIDD.

Notre modèle de VIDD comporte cependant des limites pour affirmer que seul ce canal est impliqué. Les fibres musculaires sont pelées pour mesurer les sparks calciques. Cette procédure permet de garder le RyR1 dans son environnement naturel mais supprime les interactions fonctionnelles avec des canaux de voltage dépendant (L-type calcium channels, CaV1.1). Ainsi il est également probable que ce canal RyR1 défectueux régule également négativement d'autres structures impliquées dans le couplage excitation-contraction, non identifiées dans notre étude. Les événements précoces impliqués dans la VIDD chez la souris, pourraient être différents pour d'autres modèles animaux ou chez l'homme. Toutefois, des similitudes existent entre notre modèle murin de VIDD et l'homme. En effet, nous avons observé que 12 heures de ventilation mécanique chez la souris pouvaient induire une atrophie associée à une dysfonction contractile. C'est important car l'atrophie est un marqueur majeure de VIDD chez l'homme ventilé au bout de plus de 48 heures (Levine et al., 2008a).

Ainsi, il est probable que les troubles de l'homéostasie calcique, impliqués dans la dysfonction contractile précoce par le biais d'une altération possible du couplage excitation-contraction, puisse secondairement induire une protéolyse dépendante du calcium. C'est ce que nous avons voulu vérifier dans l'article 2.

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

La VIDD est un déterminant majeur dans la procédure de sevrage des patients vis-à-vis du ventilateur (Jaber et al., 2011c; Jung et al., 2016; Powers et al., 2013). La dysfonction diaphragmatique est corrélée à la sévérité de la maladie initiale en réanimation, et au pronostic vital du patient, devant considérer la VIDD une comorbidité à part entière chez le patient ventilé (Demoule et al., 2013). Ainsi toute thérapie préventive de la dysfonction diaphragmatique doit être activement explorée.

En conclusion, cette étude montre le rôle physiopathologique du RyR1 dans la VIDD et supporte fortement l'hypothèse basée sur le fait que la prévention des fuites calciques à travers le RyR1 pourrait être une approche thérapeutique dans la prévention de la VIDD.

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

1.5. Article 1: Leaky ryanodine receptors contribute to diaphragmatic weakness during mechanical ventilation

Sous presse à PNAS, En co 1^{er} auteur

Leaky ryanodine receptors contribute to diaphragmatic weakness during mechanical ventilation

Stefan Matecki^a, Haikel Dridi^a, Boris Jung^{a,d}, Nathalie Saint^a, Steven Reiken^b, Valérie Scheuermann^a, Ségolène Mrozek^a, Alisa Umanskaya^b, Basil J. Petrof^c, Samir Jaber^{a,d}, Andrew R. Marks^{b,1} & Alain Lacampagne^{a,*,1}

^a, InsermU1046, CNRS UMR91214, Université de Montpellier, CHRU de Montpellier, 34295 Montpellier, France. ^b, Department of Physiology and Cellular Biophysics, College of Physicians and Surgeons of Columbia University, The Clyde and Helen Wu Center for Molecular Cardiology, College of Physicians and Surgeons of Columbia University, Department of Medicine, College of Physicians and Surgeons of Columbia University, New York, NY 10032, USA ^c, Meakins-Christie Laboratories, McGill University and McGill University Hospital Research Institute, Montreal, Quebec H2X 2P2, Canada. ^d, Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, St Eloi teaching Hospital, 34295 Montpellier, France

Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction (VIDD) refers to the diaphragm muscle weakness that occurs following prolonged controlled mechanical ventilation (MV). The presence of VIDD impedes recovery from respiratory failure, but the pathophysiological mechanisms accounting for VIDD are still not fully understood. Here we show in human subjects and a mouse model of VIDD that MV is associated with rapid remodeling of the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺ release channel/ryanodine receptor (RyR1) in the diaphragm. The RyR1 macromolecular complex was oxidized, S-nitrosylated, Ser-2844 phosphorylated and depleted of the stabilizing subunit calstabin1, following MV. These post-translational modifications of RyR1 were mediated by both oxidative stress mediated by MV and stimulation of adrenergic signaling resulting from the anesthesia. We demonstrate in mouse model that these abnormal resting SR Ca²⁺ leak resulted in reduced contractile function and muscle fiber atrophy for longer duration of MV. Treatment with β -adrenergic antagonists or with S107, a small molecule drug that stabilizes the RyR1-calstabin1 interaction, prevented VIDD. Diaphragmatic dysfunction is common in MV patients and is a major cause of failure to wean patients from ventilator support. This study provides the first evidence of RyR1 alterations as a proximal mechanism underlying VIDD (i.e. loss of function, muscle atrophy), and identifies RyR1 as a potential target for therapeutic intervention.

skeletal muscle | VIDD | excitation-contraction coupling | calcium | β -adrenergic signaling

Introduction

The need for respiratory support by controlled mechanical ventilation (MV) is one of the main reasons for admission to the intensive care unit (ICU). Although it is life saving in the short term, human and animal studies have previously shown that MV results in a progressive reduction in diaphragmatic force-generating capacity, together with diaphragm muscle fiber injury and atrophy (1, 2). These findings comprise a condition termed Ventilator-Induced Diaphragmatic Dysfunction (VIDD) (3). VIDD, which is common in ICU setting (4), can interfere with the ability to discontinue MV (5), with a major negative impact on patient outcomes and increased health care costs (6).

The precise cellular pathways involved in MV-induced diaphragm weakness remain partially understood. Animal models strongly suggest that oxidative stress plays a major role in VIDD (7, 8) and recent studies have identified mitochondria as an essential source of reactive oxygen species (ROS) implicated in VIDD (9, 10). ROS production is linked to activation of proteolytic systems such as caspases and calpains (11), which play significant roles in degrading cytoskeletal proteins in muscle (6, 12, 13) directly involved in the development of MV-induced diaphragm muscle fiber atrophy and injury (7, 14, 15).

Although many of the processes implicated in VIDD have been associated with increased oxidative stress (16), others mech-

anism associated to oxidative stress could be involved. Indeed in ICU many situations such as anesthetics, MV, sepsis or pain may induce an over-stimulation of the adrenergic response with an up-regulated catecholamine synthesis (17, 18). Although elevated level of circulating endogenous catecholamine is associated in animal model to a generalized myopathy process (19), and higher mortality in ICU (18), whether or not catecholamine release during MV may impair diaphragm function is unknown.

Similarly, the potential role of Ca²⁺ homeostasis disruption in VIDD has never been addressed. Indeed, we recently observed a reduction of diaphragmatic force production after only 6 hours of MV in mice, in the absence of the muscle fiber atrophy or histological injury usually linked to VIDD (20). We hypothesized that this uncoupling between the functional and histological parameters of VIDD could be explained by defects in Ca²⁺ homeostasis and excitation-contraction coupling at a very early stage of VIDD, and if so might lend itself to early preventive intervention. Furthermore, to the extent that deregulated Ca²⁺ homeostasis can lead to activation of caspases and calpains (16), this could also help to account for the later development of diaphragm muscle atrophy and injury.

In skeletal muscle, normal excitation-contraction coupling entails activation of voltage-sensing Ca²⁺ channels in the trans-

Significance

Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction (VIDD) refers to the diaphragm muscle weakness that follows prolonged controlled mechanical ventilation. The presence of VIDD impedes recovery from respiratory failure, but the pathophysiological mechanisms accounting for VIDD are still not fully understood. We identify here using human samples and mice model of VIDD a new pathophysiological pathway involving structural and functional impairment of the ryanodine receptor (RyR1), the main sarcoplasmic reticulum (SR) calcium release channel controlling calcium signaling during excitation-contraction coupling. We demonstrated that RyR1 defects, which contribute to diaphragm muscle weakness, induced by controlled mechanical ventilation, is the result of oxidative stress associated to sympathetic nervous system activation. Thus, preventing RyR1-mediated SR Ca²⁺ leak, may provide a novel therapeutic approach in controlled mechanical ventilation.

Reserved for Publication Footnotes

137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204

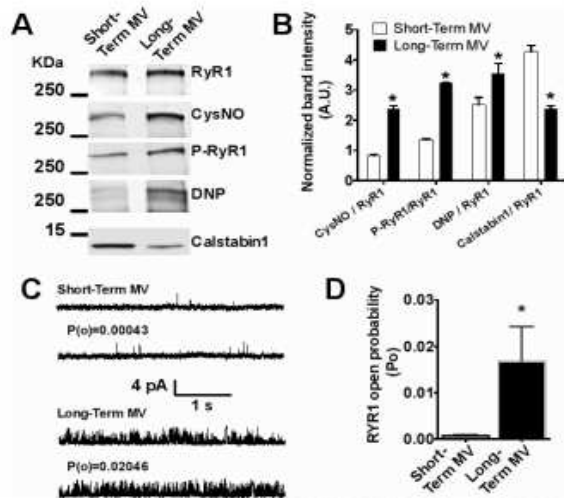


Fig. 1. VIDD is associated with defective RyR1 in human diaphragm muscle. Representative immunoblots (A) of immunoprecipitated RyR1 from human diaphragm samples collected after short-term (control) and long-term (MV) controlled mechanical ventilation in humans (see table S1). (Each blot corresponds to adjacent wells of the same gel). Bar graphs (B) show quantification of immunoblots, relative to total RyR1 (mean±SEM, n = 10 and 9 in control and MV respectively, * p<0.05, MV vs control). CysNO, thio-nitrosylation; DNP, 2,4- dinitrophenylhydrazone; P-RyR1, phosphorylated RyR1 (at serine 2844). C) Single channel traces of RyR1 incorporated in planar lipid bilayers with 150 nM Ca²⁺ in the cis chamber, corresponding to representative experiments performed with human diaphragm biopsies from short-term and long-term MV groups. D) Controlled mechanical ventilation increases RyR1 open probability (Po): mean Po was 0.0006±0.0003 in control (n=18), after MV, the Po increased to 0.0167±0.00754 (n=40).

verse tubules that in turn, activate the sarcoplasmic reticulum (SR) calcium release channel/ryanodine receptor (RyR1). The RyR1-dependent liberation of Ca²⁺ from the SR triggers actin-myosin cross-bridge formation and hence muscle contraction. RyR1 is a homotetrameric macromolecular protein complex that includes four RyR1 monomers (~565 kDa each), kinases, a phosphatase (PP1), a phosphodiesterase (PDE4D3), and calmodulin (21). In addition, the RyR1 channel-stabilizing subunit calstabin1 (CaI1 or FK506 binding protein 12, FKBP12) is critical to the proper function of the channel (22).

Maladaptive cAMP-dependent protein kinase A (PKA)-mediated phosphorylation and redox-dependent modifications (cysteine-nitrosylation and oxidation) of the RyR1 have been linked to a loss of the normal association between calstabin1 and the rest of the RyR1 complex (23, 24). This in turn results in impaired Ca²⁺ handling with abnormal Ca²⁺ leakage from the SR and associated contractile dysfunction in conditions as diverse as heart failure, chronic muscle fatigue, muscular dystrophy and aging (23, 25-27). In the present study, we postulated that early MV-induced oxidative stress and catecholamine release synergistically affect the diaphragm RyR1 complex and impair Ca²⁺ homeostasis, thereby leading to SR Ca²⁺ leak, reduced tetanic Ca²⁺ and the development of VIDD.

Results

Increased RyR1 open probability in diaphragm fibers correlate with VIDD. To evaluate the remodeling and functional abnormalities of RyR1 in the diaphragm of human patients subjected to MV we obtained diaphragm biopsies from brain-dead organ

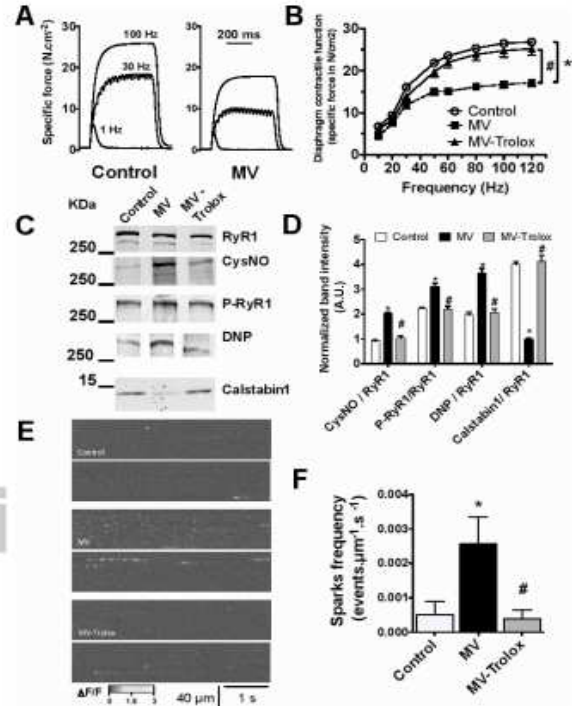


Fig. 2. RyR1 mediated SR Ca²⁺ leak in murine diaphragm muscle after 6 hours of MV. A) Representative records of diaphragmatic specific force production measured ex vivo at 1, 30 and 100Hz in muscle bundles under isometric conditions in control and under controlled mechanical ventilation during 6 hours(MV, 6 hours) mice. B) Average force-frequency relationships recorded in control (n=8), mechanically ventilated for 6h (MV, n=10), mechanically ventilated for 6 hours and treated with Trolox (MV-troxol, n=8) groups. Representative immunoblots (each blot corresponds to adjacent wells of the same gel) of immunoprecipitated RyR1 (C) and bar graphs (D) showing quantification of proteins relative to total RyR1 immunoprecipitated from murine diaphragm samples collected in control, MV, and MV-Troxol groups. CysNO, thio-nitrosylation ; DNP, 2,4-dinitrophenylhydrazone; P-RyR1, phosphorylated RyR1 (at serine 2844). Spontaneous SR Ca²⁺ release events were recorded in fluo-4-loaded permeabilized diaphragm fibers by laser scanning confocal microscopy. E) Representative ΔF/F line-scan images (1.54 ms per line) recorded in control, after MV and after MV with Trolox treatment. F) Mean Ca²⁺ sparks frequency was used as an index of resting SR Ca²⁺ leak. Results are expressed as mean±SEM (*, p<0.05, MV vs. control; #, p<0.05, MV-Troxol vs. MV).

donor patients who had undergone long term MV (98±65 hours,) immediately prior to organ harvest. We compared these specimens to diaphragm biopsies from short-term MV (2.3±0.4 hours) patients, obtained during thoracic surgery for removal of solitary lung nodules (see Table S1 for patients description). SR fractions were purified to analyze the biochemical properties of the RyR1 macromolecular complex (Fig. 1A-B). RyR1 immunoprecipitation after long-term MV revealed a significant increase in RyR1 oxidation, S-nitrosylation, and phosphorylation on Ser-2844, and calstabin1 dissociation from RyR1. This biochemical remodeling of the RyR1 channels is known as the "biochemical signature" of "leaky" RyR1 channels as previously described (21). It was associated with a significant increase in RyR1 open probability (Po) compared to controls short-term MV measured in channels incorporated in planar lipid bilayers under conditions such that

205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272

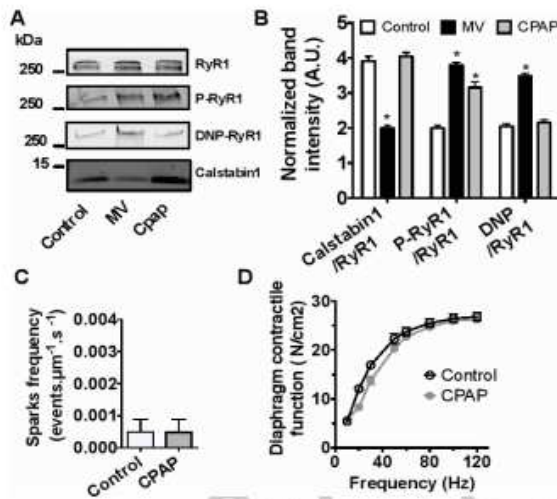


Fig. 3. Ventilation in Continuous Positive Airway Pressure (CPAP) mode does not affect RyR1 remodeling. Representative immunoblots (A) of immunoprecipitated RyR1 from mouse diaphragm samples collected in control condition (control) or after 6 hours of controlled mechanical ventilation or continuous positive pressure (MV or CPAP). (Each blot corresponds to adjacent wells of the same gel). Bar graphs (B) show quantification of immunoblots, relative to total RyR1. Results are expressed as mean \pm SEM, n = 10 in control and 5 in MV and CPAP (*, p<0.05 vs. control). C) Spontaneous SR Ca²⁺ release events were recorded in fluo-4-loaded permeabilized diaphragm fibers by laser scanning confocal microscopy in control and CPAP condition. Mean Ca²⁺ sparks frequency used, as an index of resting SR Ca²⁺ leak was not significantly different between CPAP and control mice. (control n=7, CPAP n=6). D) Average specific force–frequency relationships recorded in diaphragm muscle in control and after 6 hours of CPAP (control n=7, CPAP, n=6).

normal non-remodeled RyR1 channels are tightly closed ($P_o \sim 0$) (Fig. 1C-D). This elevated P_o is consistent with increased SR Ca²⁺ leak.

Defective RyR1 function: an early pathophysiological event in VIDD. MV contributes to structural and functional remodeling of RyR1 in human. However, one limitation of human patient samples is the potential influence of co-morbidities and confounding factors associated with critical illness. Moreover, histological damage to human muscle fibers is present (2), which could conceivably account for both the reduction in diaphragmatic force production and RyR1 remodeling. Therefore, to examine very early events in the course of VIDD, we took advantage of a mouse model that exhibits a significant loss of diaphragmatic force-generating capacity after only 6 hours of MV (Fig. 2A-B).

We evaluated RyR1 remodeling in the mechanically ventilated diaphragm prior to the onset of histological alterations associated with the later stages of VIDD (20). MV-induced diaphragm muscle weakness in mice was associated with significant RyR1 remodeling consisting of RyR1 S-nitrosylation, oxidation, Ser-2844 phosphorylation, and calstabin1 dissociation from RyR1 (Fig. 2C-D). RyR1 functional properties were next evaluated *in situ* by measuring spontaneous SR Ca²⁺ release events (i.e. Ca²⁺ sparks). A significant increase in spontaneous Ca²⁺ sparks frequency reflects increased RyR1 mediated SR Ca²⁺ leak (25, 27). After 6 hours of MV, Ca²⁺ sparks frequency was significantly increased in diaphragm fibers (Fig. 2E-F). Since MV induces oxidative stress in the diaphragm, and antioxidant treatment has been reported to prevent VIDD, a group of mice was continuously injected with Trolox, a permeable analog of vitamin E used as an antioxidant

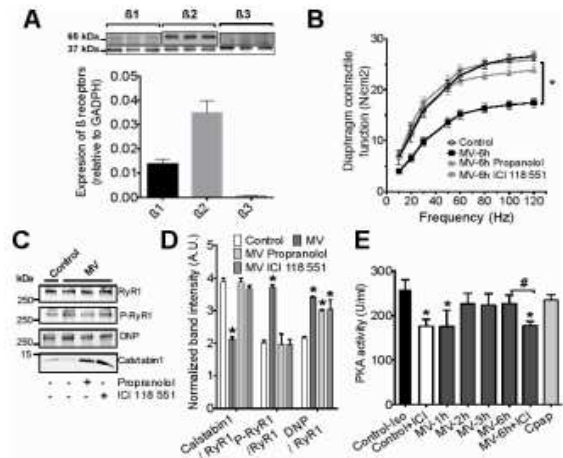


Fig. 4. β -adrenergic pathway is involved in VIDD A) Representative Western Blots and distribution of β -adrenergic receptors in control diaphragm (n=6, *p<0.05). B) Diaphragm muscle specific force–frequency relationships recorded in control (Control, n=10), under controlled mechanical ventilation during 6 h (MV, n=10) and MV and treated with non-specific β_1 - β_2 receptor antagonist propranolol (MV-propranolol, n=10), and ICI118551 a β_2 -adrenoceptor specific inhibitor (MV+ICI, n=10) (*, p<0.05, MV vs. control and MV-propranolol, and MV+ICI). C) Representative immunoblots and quantification of immunoprecipitated RyR1 from mouse diaphragm samples collected in control (n=5) after 6 hours of MV (n=5) and MV in the presence of propranolol (n=5) or ICI118551 (n=5). D) Protein kinase A (PKA) activity was measured in diaphragm muscle treated in mice treated for 30 min with isoproterenol (3mg/kg, Control+iso), with ICI118551 (10mg/kg), and after 1, 2, 3 and 6 hours of ventilation. In a series of experiments mice received a first injection of ICI118551 at the onset of anesthesia and 0.7 mg/kg/hr during the 6 hours of MV (MV+ICI). Data are expressed as PKA activity in unit/ml, quantified using a colorimetric assay. Data represent mean \pm SEM of 3–6 mice by group. *, p < 0.05 compared with Control+iso. #, p < 0.05 compared with MV6h (untreated ventilated mice).

scavenger (8, 28, 29). As previously reported in rats mechanically ventilated for 12 hours, Trolox treatment in mice ventilated for 6 hours prevented MV-induced diaphragm muscle weakness (Fig. 2B). In addition, we observed that Trolox prevented MV-induced RyR1 biochemical remodeling (Fig. 2C-D) and the associated increase in Ca²⁺ sparks frequency (Fig. 2E-F).

Interestingly, this RyR1 leak was due to MV only, since non-MV mice that were identically intubated, anesthetized and immobilized for 6 hours but maintained on a spontaneous breathing mode of respiration with 4 cmH₂O of Continuous Positive Airway Pressure (CPAP mode) did not demonstrate profound biochemical remodeling of diaphragm RyR1 (Fig. 3A-B). Indeed, compared to MV samples, CPAP samples did not exhibit Calstabin1 depletion or RyR1 oxidation. They were however similarly phosphorylated. No functional alteration of the channel complex, as indicated by a normal Ca²⁺ sparks frequency, was found in non-MV anesthetized mice (Fig. 3C) and no muscle weakness could be observed (Fig. 3D) as previously reported (20).

Role β -adrenergic signaling pathway in VIDD. As emphasize above, critical illness and anesthesia may result in an overstimulation of the adrenergic system. The expression pattern of β -adrenergic receptors was assessed by Western blot in diaphragm muscle (Fig. 4A). Diaphragm muscle, expresses predominantly β_2 isoform and β_1 in a lower proportion. To address the potential role of the β -adrenergic receptors in VIDD, mice were ventilated for 6 hours in the presence of the non-selective β_1 - β_2 receptors antagonist, propranolol, or with the selective β_2 antagonist,

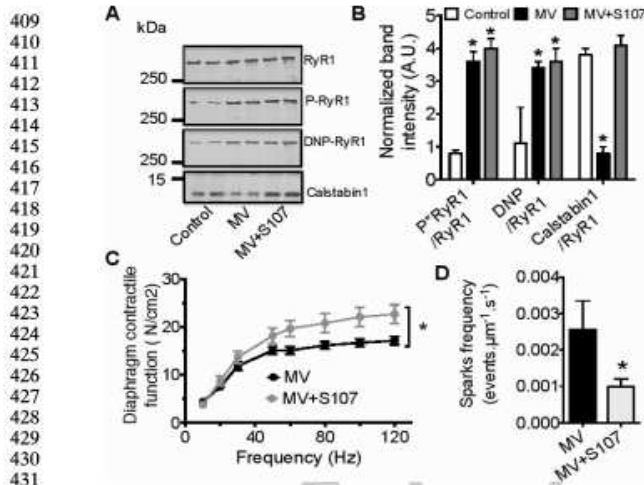


Fig. 5. Reducing RyR1 leak with the Rycal (S107) prevents VIDD after 6 hours of MV. Representative immunoblots (A) of immunoprecipitated RyR1 from mouse diaphragm samples collected after 6 hours of controlled mechanical ventilation with (MV+S107) or without (MV) S107 treatment (75mg/kg, drinking water). (Each blot corresponds to adjacent wells of the same gel). Bar graphs (B) show quantification of immunoblots, relative to total RyR1 immunoprecipitated. Results are expressed as mean±SEM, n=6 in control and 5 in MV and MV+S107 groups (*, p<0.05 vs. control). C) Diaphragm muscle specific force–frequency relationships recorded in MV (n=10) and in MV-S107 (n=5) groups. D) Comparison of mean Ca²⁺ sparks frequency between MV and MV-S107, groups used as an index of resting SR Ca²⁺ leak. Results are expressed as mean ± SEM (*, p<0.05, vs. MV and MV-S107).

ICI118 551 (30). Remarkably, both β blockers prevented the diaphragm weakness after 6 hours of MV (Fig. 4B). This effect was also accompanied by a lower remodeling of RyR1 complex. Both propranolol and ICI118551 prevented calstabin1 depletion and S2844-RYR1 while RyR1 oxidation persisted (Fig. 4C). To account for RyR1 phosphorylation, PKA activity was measured in diaphragm samples after 1h, 2h, 3h and 6 hours of ventilation and compared to a maximal level of PKA stimulation obtained by injecting isoproterenol (3 mg/kg) 30 min prior to euthanizing the mice (Fig. 4D). PKA activity increased after 1 hour of MV to reach a plateau between 2 and 6 hours that was not significantly different from the maximal level. When the animal were treated with ICI118 551 (10 mg/kg) during the MV, the level of PKA activity was significantly reduced and similar to the basal level obtained by treating control animals with ICI118 551 (10 mg/kg).

RyR1 as a novel therapeutic target in VIDD. To directly target RyR1 and thus assess its role as a major pathophysiological target in VIDD, we treated mechanically ventilated mice with the rycal S107. Rycals are small orally available agents known to prevent depletion of calstabin1 from the RyR1 complex despite PKA phosphorylation, S-nitrosylation and/or oxidation of RyR1 (25, 27). Consistently, in mice, S107 prevented depletion of calstabin1 from RyR1 macromolecular complex without protecting against RyR1 oxidation and phosphorylation (Fig. 5A-B). In addition, S107 prevented the loss of diaphragmatic force-generating capacity induced by MV (Fig. 5C) as well as the increase in Ca²⁺ spark frequency (Fig. 5D). These data suggest that reducing RyR1 mediated SR Ca²⁺ leak with S107 improves diaphragmatic muscle force production.

Evaluation of the Diaphragm after 12 hours of MV. The hallmark of VIDD commonly considered in the field, as the main

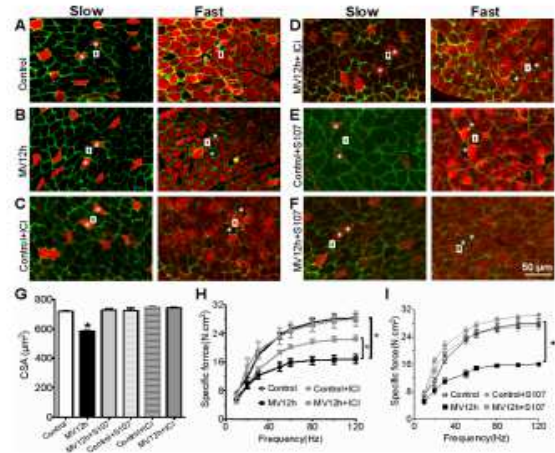


Fig. 6. RyR1 dysfunction contributes to muscle fiber atrophy after 12 hours of ventilation. Representative immunostaining of fast and slow diaphragm muscle fibers in mouse. Antibodies against fast- and slow-type myosin ATPase were employed to perform immunostaining on cryosections of mouse diaphragm. Muscle membrane was counterstained with dystrophin antibodies. White squares indicate fast fibers, whereas the asterisks show the slow fibers in consecutive sections. Staining was performed in control (control) (A), mice under controlled mechanical ventilation during 12 hours (MV12h) (B), control treated by ICI118551 (Control+ICI) (C), control mice treated by S107 (Control+S107) (D), mice ventilated during 12 hours and treated by ICI118551 (MV12h+ICI) (E) and mice ventilated during 12 hours and treated by S107 (MV12h+S107) (F). G) Quantification of cross section area in each condition (n= 192 to 852 fibers for each group, *, p>0.05). H) Diaphragm muscle specific force–frequency relationships recorded in control (n=7), control+ICI118551 (n=3), MV12h (n=10) and MV12h+ICI118551 (n=6) (*, p>0.05, MV vs control and MV12h+ICI). I) Diaphragm muscle specific force–frequency relationships recorded in control (n=6), control+S107 (n=3), MV12h (n=6) and MV12h+S107 (n=5) (*, p>0.05, MV vs control and MV12h+S107).

muscle damages are muscle atrophy and impaired contractility (2). With 6 hours of ventilation in mice, we are able to reproduce the loss force production without any histological damage (20). To further evaluate the implication of RyR1 in VIDD we further evaluated diaphragm histological characteristics (i.e. fiber cross-sectional area, fiber type distribution) and force production after 12 hours of MV. The mean cross-sectional area of all diaphragm fibers was significantly reduced compared to control animals (Fig.6 A,B,G). There was no significant alteration in the proportions of type I (slow-twitch) and type II (fast-twitch) (Fig. 6A,B, fig. S1). A significant reduction in force production (Fig. 6H and I) accompanied this atrophy after 12 hours of ventilation. Interestingly, treatments with the specific β2 antagonist ICI118-551 or S107 prevented both muscle fiber atrophy and loss of contractility. It is to note that none of the treatments had any effect on fiber size or force production in control condition.

Discussion

In the present study we report that patients under MV with VIDD, as well as mice subjected to MV, exhibit the biochemical signature of leaky RyR1 channels and evidence of intracellular Ca²⁺ leak. We also demonstrate that this RyR1 dysfunction is driven by β-adrenergic signaling pathway in synergy with MV-induced oxidative stress which has been extensively studied in VIDD (16). Indeed, RyRs are highly sensitive to oxidative/nitrosative stress in skeletal muscle as well as in the heart (21, 31, 32). This occurs in other chronic or inherited disease including heart failure (33), diabetes (34), and Duchenne muscular dystro-

545 phy (DMD) (25, 32). Posttranslational modification of RyR1 also
546 progresses with aging and partially accounts for age-dependent
547 muscle weakness (27).

548 In the mouse model, Ca^{2+} sparks frequency is commonly used
549 as an index of RyR1 mediated SR Ca^{2+} leak, and is complemen-
550 tary to the biochemical analyses and electrophysiological studies
551 used to demonstrate the contribution of leaky RyR1 in skeletal
552 muscle disorders (25, 27). Therefore, as previously reported (24,
553 25, 27), leaky RyR1 similar to that observed in the present study
554 may account for a reduction in the Ca^{2+} transient and force
555 production, i.e. impaired excitation-contraction coupling, with-
556 out the need to invoke other muscle pathology such as atrophy
557 or injury. Indeed, in the mouse model of VIDD we showed a
558 significant level of diaphragmatic muscle weakness without any
559 histological modifications of the muscle after 6 hours of MV,
560 supporting the idea that muscle damage or atrophy may not
561 be itself explain VIDD induced muscle weakness (20). These
562 data suggest that impaired RyR1 function is an early event that
563 precedes muscle damage. Furthermore, early RyR1-dependent
564 defects in intracellular Ca^{2+} homeostasis may be an important
565 mediator of subsequent diaphragmatic muscle remodeling in
566 VIDD as previously reported in Duchenne muscle dystrophy (25).

567 To date, oxidative stress was the most documented patho-
568 physiological mechanism accounting for VIDD. The anti-oxidant
569 Trolox was reported to prevent VIDD in a rat model (8). It was
570 also reported that oxidative stress is required for MV-induced
571 activation of calpain and caspase-3 in the diaphragm (29) but
572 the involvement of calcium homeostasis while hypothesized, had
573 never been demonstrated. Our data demonstrate that Trolox
574 also prevents RyR1 dysfunction induced by MV in mice. Thus
575 RyR1 oxidation appears as a prerequisite for RyR1 dysfunction
576 in VIDD.

577 This observation was further investigated using the Contin-
578 uous Positive Airway Pressure (CPAP) mode of ventilation to
579 keep the airways continuously open, even in a context of sedation,
580 allowing spontaneous breathing. Respiratory muscles remain ac-
581 tive and are not unloaded or passively stretched as they are in
582 MV, a situation that may explain why they are protected under
583 CPAP from VIDD development (26). Interestingly, our CPAP
584 data indicate that maintain diaphragm activity prevents RyR1
585 oxidation and VIDD development, even in presence of RyR1
586 PKA phosphorylated. The origin of ROS production remains
587 unclear during VIDD although recent studies rather consider that
588 mitochondria represent the main source of ROS (10). However,
589 MV initiates a first production of ROS that contributes to RyR1
590 oxidation from a source that remains to be identified. Recent
591 studies have identified a new transduction pathway in which the
592 microtubule network acts as a mechano-transduction element
593 that activates NADPH-oxidase2 (Nox2)-dependent ROS gener-
594 ation during mechanical stretch (35). Such pathway could there-
595 fore contribute to this primary ROS production. This hypothesis is
596 supported by the beneficial effect of apocynin on the diaphragm
597 during prolonged MV (36). However, we have previously demon-
598 strated that RyR1 dysfunction and SR mediated Ca^{2+} leak is also
599 a cause of mitochondrial ROS production (27). This supports the
600 hypothesis that there might be multiple sources or causes of ROS
601 production during VIDD, dependent and independent of RyR1
602 that may contribute to the pathophysiological process according
603 to a vicious cycle.

604 We also hypothesized that the phosphorylation status of
605 RyR1, secondary to PKA activation resulted from an increased
606 in sympathetic tone during the anesthesia. Indeed, anesthetic
607 agent such as pentobarbital are known to act as negative inotropic
608 agents, to inhibit diastolic function, cause arterial and venous
609 dilation, and to interfere with the function of the baroreceptor
610 reflexes in animal models (37). Similar observation have been
611 reported in patients anesthetized (38). These systemic effects

612 may therefore contribute to an elevation of endogenous circula-
613 ting catecholamine during anesthesia although this is so far
614 not clearly documented in ICU patients. It is nevertheless ad-
615 mitted that adrenergic system is over stimulated in patients with
616 critical illness (17, 18). Furthermore, exogenous catecholamines
617 are recommended as the first-line drugs to treat cardiovascular
618 instability in critically ill patients (39), amplifying the endogenous
619 catecholamine burst release. This would support the hypothe-
620 sis that such stress would be prolonged, become maladaptive
621 and exert adverse effects. The increased level of RyR1 PKA-
622 phosphorylation in our human diaphragms samples supports
623 this observation. Such increase in β -adrenergic pathway is in
624 accordance with the beneficial effect of β -adrenergic receptors
625 antagonist that we observed (i.e. prevention of muscle weakness
626 and atrophy) with propranolol and ICI118551 confirming the
627 main implication of β 2-adrenergic receptors. Interestingly, both
628 β -blockers prevented RyR1 phosphorylation and depletion of
629 calstabin1 without decreasing RyR1 oxidation.

630 These results combined with those obtained in the CPAP
631 model demonstrate that both RyR1 oxidation and phosphory-
632 lation are required to account for the RyR1 dysfunction and
633 VIDD. This may also suggest that in clinic the specific use of β 2-
634 adrenergic antagonists could be a potential future target to poten-
635 tially prevent VIDD. This observation is however in contrast with
636 a recent studies showing that low-dose theophylline treatment
637 can significantly improve diaphragmatic movements in patients
638 with VIDD without any significant improvement for weaning time
639 and total ventilation time (40). Theophylline is a methylxanthines
640 that inhibit phosphodiesterases and increase cAMP level as β -
641 adrenergic receptor. This could explain in part the positive in-
642 otropism that accounts for better diaphragm motion. However
643 since Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction is known to
644 be one of the major contributors to weaning difficulties we cannot
645 conclude that theophylline prevents VIDD. Nevertheless, the
646 beneficial effects of β -blockers may not be specifically due to
647 improved RyR1 function and may also have adverse effects.

648 To address this potential lack of specificity, we demonstrate
649 that "fixing" specifically this RyR1 mediated leak with S107, a
650 small molecule known to stabilize the RyR1-calstabin1 interac-
651 tion, can prevent muscle weakness induced by 6 and 12hours of
652 ventilation in mice. Fixing SR Ca^{2+} leak prevents also changes
653 in fibers cross-sectional area after 12hours of MV. SR Ca^{2+} leak
654 may contribute to the activation of Ca^{2+} -dependent proteolytic
655 enzymes (caspases and calpains) as well as Ca^{2+} -dependent reg-
656 ulation of gene expression involved in deleterious muscle injury
657 and wasting processes (41).

658 As mentioned above, the RyR complex is a converging target
659 in many pathophysiological conditions. This can be explained in
660 part by the ubiquitous function of Ca^{2+} in cellular processes and
661 by the enormous size of the RyR macromolecular complex and in
662 particular its cytoplasmic domain which serves as a redox sensor
663 (42). Therefore, the fact that RyR1 is a potential mediator of mus-
664 cle weakness in VIDD suggests that patients with co-morbidities
665 and/or confounding factors that may affect RyR1 function such as
666 heart failure or aging, may have a greater vulnerability to VIDD.

667 Our mouse model of VIDD has some limitations. First, we
668 used skinned fibers to evaluate Ca^{2+} sparks. This procedure
669 keeps the RyR1 channel in its natural environment but removes
670 the functional interaction with the voltage sensor (L-type cal-
671 cium channels, CaV1.1). Whether a defective RyR1 could nega-
672 tively regulate other structures involved in intact fibers during
673 excitation-contraction coupling such as CaV1.1 is an interesting
674 question that is beyond the scope of the present study. Second,
675 early events involved in VIDD, with 6 to 12-hour period of con-
676 trolled mode MV to induce diaphragm weakness in mice may not
677 be directly applicable to other animal models (20) or to patients
678 on long-term ventilation in the ICU. However, we have recently
679 (680

681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748

demonstrated the link between duration of controlled MV and diaphragmatic dysfunction in ICU patients and emphasized the rapid onset of VIDD during MV (2). It is likely that many of the same mechanisms of VIDD are involved across species although the time course appears to be more protracted in humans. In addition, assisted modes of ventilation, which permit a certain level of diaphragm activity, are likely to mitigate the development of VIDD (43). This may explain why CPAP on the basis of RyR1 remodeling does not decrease diaphragm contractile activity (44) and does not induce VIDD.

Nevertheless, it remains the case that many patients with acute respiratory distress syndrome or acute brain injury are in fact ventilated in controlled mode, either with or without associated neuromuscular blockade. In this regard, 3 days of controlled mode MV is not uncommon in the ICU and furthermore, additional comorbid factors such as sepsis (45), metabolic disorders, and drugs may even further shorten the latency to VIDD onset.

VIDD is a major determinant of the ability to successfully wean patients from the ventilator (16, 46). Moreover, we recently reported that diaphragmatic weakness correlates with disease severity and prognosis suggesting that diaphragmatic weakness

is a form of organ failure in ventilated patients (47). Indeed, diaphragmatic weakness normally appears in human after 3 to 4 days of MV (2). Therefore, any therapeutic strategy, which may prevent this negative evolution, should be considered with a level of great interest.

In conclusion, this study demonstrates the pathophysiological role of RyR1 in VIDD and strongly supports the hypothesis that preventing the RyR1-mediated SR Ca²⁺ leak induced by MV may provide a new therapeutic approach for preventing diaphragm muscle dysfunction in patients who require artificial respiratory support.

Materials and Methods

Detailed methods employed in the present study is presented in SI Materials and Methods.

Acknowledgements. This work was supported by Inserm, Region Languedoc-Roussillon, Association Française contre les myopathies (AFM), the Schaefer Foundation, Philippe Foundation, and the Canadian Institutes of Health Research.

Conflicts of interest. A.R.M. is on the scientific advisory board and the board of directors and owns shares in ARMGO Pharma, Inc., a start-up company developing RyR targeted drugs for clinical use in the treatment of cardiac and muscle dysfunction.

1. Levine S, et al. (2008) Rapid diaphragm atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N Engl J Med* 358(13):1327-1335.
2. Jaber S, et al. (2011) Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 183(3):364-371.
3. Vassilakopoulos T & Petrof BJ (2004) Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 169(3):336-341.
4. Chang AT, Boots RJ, Brown MG, Paratz J, & Hodges PW (2005) Reduced inspiratory muscle endurance following successful weaning from prolonged mechanical ventilation. *Chest* 128(2):553-559.
5. Tobin MJ, Laghi F, & Brochard L (2009) Role of the respiratory muscles in acute respiratory failure of COPD: lessons from weaning failure. *J Appl Physiol* 107(3):962-970.
6. Esteban A, et al. (2008) Evolution of mechanical ventilation in response to clinical research. *Am J Respir Crit Care Med* 177(2):170-177.
7. Shanely RA, et al. (2002) Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 166(10):1369-1374.
8. Betterts JL, et al. (2004) Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am J Respir Crit Care Med* 170(11):1179-1184.
9. Powers SK, et al. (2011) Mitochondria-targeted antioxidants protect against mechanical ventilation-induced diaphragm weakness. *Crit Care Med* 39(7):1749-1759.
10. Picard M, et al. (2012) Mitochondrial dysfunction and lipid accumulation in the human diaphragm during mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 186(11):1140-1149.
11. Chen M, Won DJ, Krajewski S, & Gottlieb RA (2002) Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J Biol Chem* 277(32):29181-29186.
12. Belcastro AN, Shewchuk LD, & Raj DA (1998) Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem* 179(1-2):135-145.
13. Jackman RW & Kandarian SC (2004) The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(4):C834-843.
14. Maes K, Testelmans D, Powers S, Decramer M, & Gayan-Ramirez G (2007) Leupeptin inhibits ventilator-induced diaphragm dysfunction in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 175(11):1134-1138.
15. McClung JM, et al. (2007) Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain during mechanical ventilation-induced atrophy. *Am J Respir Crit Care Med* 175(2):150-159.
16. Jaber S, Jung B, Matecki S, & Petrof BJ (2011) Clinical review: ventilator-induced diaphragmatic dysfunction—human studies confirm animal model findings! *Crit Care* 15(2):206.
17. Dunser MW & Hasibeder WR (2009) Sympathetic overstimulation during critical illness: adverse effects of adrenergic stress. *J Intensive Care Med* 24(5):293-316.
18. Boldt J, Menges T, Kuhn D, Diridj C, & Hempelmann G (1995) Alterations in circulating vasoactive substances in the critically ill—a comparison between survivors and non-survivors. *Intensive Care Med* 21(3):218-225.
19. Ng Y, et al. (2002) Characterisation of isoprenaline myotoxicity on slow-twitch skeletal versus cardiac muscle. *Int J Cardiol* 86(2-3):299-309.
20. Mrozek S, et al. (2012) Rapid onset of specific diaphragm weakness in a healthy murine model of ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Anesthesiology* 117(3):560-567.
21. Bellinger AM, Mongillo M, & Marks AR (2008) Stressed out: the skeletal muscle ryanodine receptor as a target of stress. *J Clin Invest* 118(2):445-453.
22. Brillantes AB, et al. (1994) Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 77(4):513-523.
23. Reiken S, et al. (2003) PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *The Journal of cell biology* 160(6):919-928.
24. Ward CW, et al. (2005) Defects in ryanodine receptor calcium release in skeletal muscle from post-myocardial infarct rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17(11):1517-1519.
25. Bellinger AM, et al. (2009) Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* 15(3):325-330.
26. Bellinger AM, et al. (2008) Remodeling of ryanodine receptor complex causes 'leaky' channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6):2198-2202.
27. Andersson DC, et al. (2011) Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell metabolism* 14(2):196-207.
28. McClung JM, et al. (2008) Redox regulation of diaphragm proteolysis during mechanical ventilation. *American journal of physiology: Regulatory, integrative and comparative physiology* 294(5):R1608-1617.
29. Whidden MA, et al. (2010) Oxidative stress is required for mechanical ventilation-induced protease activation in the diaphragm. *J Appl Physiol* 108(5):1376-1382.
30. O'Donnell SR & Wanstall JC (1980) Evidence that ICI 118, 551 is a potent, highly Beta 2-selective adrenoceptor antagonist and can be used to characterize Beta-adrenoceptor populations in tissues. *Life Sci* 27(8):671-677.
31. Donoso P, Sanchez G, Bull R, & Hidalgo C (2011) Modulation of cardiac ryanodine receptor activity by ROS and RNS. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 16:553-567.
32. Fauconnier J, et al. (2010) Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(4):1559-1564.
33. Shan J, et al. (2010) Role of chronic ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and beta-adrenergic receptor blockade in mice. *J Clin Invest* 120(12):4375-4387.
34. Turan B & Vassort G (2011) Ryanodine receptor: a new therapeutic target to control diabetic cardiomyopathy. *Antioxidants & redox signaling* 15(7):1847-1861.
35. Ward CW, Prosser BL, & Lederer WJ (2014) Mechanical stretch-induced activation of ROS/RNS signaling in striated muscle. *Antioxidants & redox signaling* 20(6):929-936.
36. McClung JM, et al. (2009) Apocynin attenuates diaphragm oxidative stress and protease activation during prolonged mechanical ventilation. *Crit Care Med* 37(4):1373-1379.
37. Manders WT & Vatner SF (1976) Effects of sodium pentobarbital anesthesia on left ventricular function and distribution of cardiac output in dogs, with particular reference to the mechanism for tachycardia. *Circ Res* 39(4):512-517.
38. Barker SJ, Gamel DM, & Tremper KK (1987) Cardiovascular effects of anesthesia and operation. *Crit Care Clin* 3(2):251-268.
39. Dellinger RP, et al. (2008) Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 36(1):296-327.
40. Kim WY, et al. (2016) Effect of theophylline on ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *J Crit Care*.
41. Petrof BJ, Jaber S, & Matecki S (2010) Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Current opinion in critical care* 16(1):19-25.
42. Eu JP, Sun J, Xu L, Stamler JS, & Meissner G (2000) The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell* 102(4):499-509.
43. Jung B, et al. (2010) Adaptive support ventilation prevents ventilator-induced diaphragmatic dysfunction in piglet: an in vivo and in vitro study. *Anesthesiology* 112(6):1435-1443.
44. Heulitt MJ, Holt SJ, Wilson S, & Hall RA (2003) Effects of continuous positive airway pressure/positive end-expiratory pressure and pressure-support ventilation on work of breathing, using an animal model. *Respir Care* 48(7):689-696.
45. Jung B, et al. (2014) Sepsis is associated with a preferential diaphragmatic atrophy: a critically ill patient study using tridimensional computed tomography. *Anesthesiology* 120(5):1182-1191.
46. Jung B, et al. (2015) Diaphragmatic dysfunction in patients with ICU-acquired weakness and its impact on extubation failure. *Intensive Care Med*.
47. Demoule A, et al. (2013) Diaphragm dysfunction on admission to the intensive care unit. Prevalence, risk factors, and prognostic impact—a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 188(2):213-219.

Leaky ryanodine receptors contribute to diaphragmatic weakness during mechanical ventilation

Stefan Matecki^{a*}, Haikel Dridi^{a*}, Boris Jung^a, Nathalie Saint^a, Steven Reiken^b, Valérie Scheuermann^a, Ségolène Mrozek^a, Alisa Umanskaya^b, Basil J. Petrof^c, Samir Jaber^a, Andrew R. Marks^b & Alain Lacampagne^{a,1}

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplemental Methods

Human model of VIDD. The study in humans was conducted in accordance with the World Medical Association Guidelines for research in humans, and approved by the institutional ethics board of the Montpellier University Hospital (protocol # NCT00786526). All subjects or their surrogates provided written informed consent to participate in the study. All animal experiments in our study followed the guidelines for animal experiments established by the recommendations of the institutional care committee and the recommendations of the Helsinki Declaration. The protocol has been approved by the Animal Care and Use Committee Languedoc-Roussillon and recorded under the reference #CEEA-LR-12078.

The study design, as previously used (1) included 2 groups of subjects: 1) - patients with brain death destined for organ donation, who had received MV for at least 24 hours prior to organ harvest (MV, n=9); and 2) patients anesthetized and supported with MV for 2-3 hours during thoracic surgery for localized lung nodules (Control, n=10). All subjects were required

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

to have undergone MV via an endotracheal tube in fully controlled mode, i.e., without significant spontaneous breathing efforts during the MV period, with a tidal volume (VT) in the average range of 7-8.5 ml/kg of the body weight, Respiratory Rate (RR) from 12 to 24 min, and positive end-expiratory pressure (PEEP) level at 2-5 cm H₂O (1). Diaphragm biopsies (approximately 1 cm³) were obtained from the zone of apposition of the costal diaphragm at the mid-axillary line. In the MV group, the biopsies were obtained before circulatory arrest and removal of other organs. Each biopsy was partitioned and quick frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C. Secondly tissue blocks were prepared as required for RyR biochemical and RyR1 functional analysis with single channel recordings in lipid bilayers as detailed in the last methodology paragraph.

Murine model of VIDD. The experimental design has been described in recent study (2) and has been reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee Languedoc-Roussillon*. This protocol is recorded under the reference: CEEA-LR-12078. In brief, 35 adult male mice (10 to 12 weeks old, 25 to 30g) C57/BL6 mice were separated into five groups. Three groups were intubated with a 22-gauge angio- catheter and mechanically ventilated for 6 consecutive hours using a volume-driven small-animal ventilator (Minivent®, Harvard Apparatus, Saint-Laurent, Canada). Tidal volume was established at 10µl/mg body weight with a respiratory rate of 150 breaths/min, a positive end-expiratory pressure (PEEP) level from 2 to 4 cmH₂O and a fraction of inspired oxygen of 0.21. Non-spontaneous ventilation was defined as a lack of diaphragm contractile activity attested by repetitive stereotypical deflections observed in the airway pressure curve.

The mice were divided into five groups. The first group (MV-Trolox) received a priming dose of trolox (0.125 ml of saline containing 5g/l trolox, corresponding to ~20 mg/kg) intravenously (IV) infused over a 5-minute period, 20 minutes before start of MV. During MV,

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

a constant IV infusion of trolox at a rate of 4 mg/kg per hours (~ 0.025 ml/h) was maintained. The second group of mice (MV-S107) was treated for 7–days before the start of MV, with S107 in their drinking water (final concentration, 0.25 mg.ml⁻¹) as previously reported (3,4) and received same volume of IV saline 20 minutes before starting and during MV. The mice drank about 3 ml per day (water consumption was variable, and we recorded water bottle and body weight to monitor consumption) for a daily dose of ~ 0.75 mg (~ 37.5 mg/kg/day). The third group (MV) received the same volume of IV saline 20 minutes before starting and during MV. The fourth group (CPAP) (n=7) was intubated and treated in an identical manner to the first three groups but breathed spontaneously with a constant positive airway pressure (CPAP) of 3-4 cmH₂O. For this purpose, the angio-catheter was connected to an air compressor to deliver a high inspiratory flow rate (1 l/min room air) while the expiratory port was placed under a water seal to obtain PEEP. The fifth group (Control, n=7 mice) did not receive any treatment and served as control.

To address the specificity of S107 on RyR1 dysfunction in VIDD, we similarly ventilated 12 muscle specific calstabin1 deficient mice (10-12 weeks-old), separated into two groups. Muscle-specific calstabin1 knock-out (cal1^{-/-}) mice were generously provided by Susan Hamilton (Baylor College of Medicine) (5). The first group (Cal1^{-/-}-MV-S017) received S107 treatment similarly to the C57BL6 mice, 5-7 days before the start of MV. The second group (Cal1^{-/-}-MV) received the same amount of water volume. All mice had similar body weights ($27 \pm 0,9$ g).

All groups mechanically ventilated or under CPAP received the same general care. Mice were anesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (50 mg/kg body weight) and orally intubated with a 22-gauge angiocatheter. General care applied during the experiments also included continuous reheating using a homeothermic blanket (Homeothermic

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

Blanket Control unit, Harvard Apparatus, Saint-Laurent, Canada, set at 35 °C), and hourly intraperitoneal injection of 0.05 ml of Ringers Lactate solution to maintain hemodynamic stability and compensate insensible losses, as well as bladder expression, eye lubrication and passive limb movements.

Contractile function in murine muscle samples. At the end of the protocol of MV, the entire diaphragm was surgically excised and mice were euthanized, by exsanguination. Isometric contractile properties were assessed as described previously in detail (2). The excised diaphragm strip was mounted into jacketed tissue bath chambers filled with equilibrated and oxygenated Krebs solution. The muscles were supra-maximally stimulated using square wave pulses (Model S48; Grass Instruments, West Warwick, RI). The force–frequency relationship was determined by sequentially stimulating the muscles for 600 ms at 10, 20, 30, 50, 60, 80, 100 and 120Hz with 1 minute between each stimulation train. After measurement of contractile properties, muscles were measured at L_0 (the length at which the muscle produced maximal isometric tension), dried and weighted. For comparative purposes, diaphragmatic force production was normalized for total muscle strip cross-sectional area and expressed in $N \cdot cm^{-2}$. The total muscle strip cross-sectional area was determined by dividing muscle weight by its length and tissue density (1.056 g/cm³).

The rest of the diaphragm was partitioned, one part was quick frozen in liquid nitrogen and secondarily used for biochemical analysis, and the other part was used freshly for Ca^{2+} spark measurements.

RyR1 biochemical analysis. Muscle biopsies were homogenized in 150 μ l of buffer containing 5% SDS, 10% glycerol, 10 mM EDTA and 50 mM Tris/HCl buffer (pH= 8.0). Each sample was immediately denatured at 90°C for 4 min. After centrifugation (5000 rpm) at 4°C,

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

supernatant protein concentrations were measured in duplicate using the BCA protein assay, equilibrated at the same concentration by dilution with loading buffer and aliquoted at 2 µg/µl. RyR1 was immunoprecipitated from 250 µg of homogenate using an anti-RyR antibody (4 µg RyR1-1327) in 0.5 ml of a modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.9% NaCl, 5.0 mM NaF, 1.0 mM Na₃VO₄, 1% Triton-X100, and protease inhibitors) for 1 hr at 4°C. The immune complexes were incubated with protein A Sepharose beads (Amersham Pharmacia) at 4°C for 1 hr and the beads were washed three times with buffer. Proteins were separated on SDS-PAGE gels (4-20% gradient) and transferred onto nitrocellulose membranes for 2 hr at 200 mA (SemiDry transfer blot, Bio-Rad). To prevent non-specific antibody binding, the membranes were incubated with blocking solution (LICOR Biosciences) and washed with Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20.

Blots were respectively incubated with primary antibody to RyR1 (RyR1-1327, an affinity-purified rabbit polyclonal antibody raised against a KLH-conjugated peptide with the amino acid sequence CAEPDTDYENLRRS, corresponding to residues 1327–1339 of mouse skeletal RyR1, with an additional cysteine residue added to the amino terminus), and affinity purified with the unconjugated peptide. We also used antibody to calstabin1 (1: 2500 in blocking buffer, LICOR Biosciences); phospho-epitope-specific antibody to human RyR2 phosphorylated on Ser-2808 (1:5,000), which detects PKA-phosphorylated mouse RyR1 (on Ser-2844) and RyR2 (on Ser-2808); antibody to S-nitrosylated cysteine residues (1:1000, Sigma). To determine RyR1 oxidation, the immunoprecipitate was treated with 2, 4-dinitrophenyl hydrazine, and the derivatized carbonyls were detected using an OxyBlot protein oxidation detection Kit (catalog S7150, Chemicon International Inc.). After three washes, membranes were incubated with infrared-labeled secondary antibodies. Control samples were analyzed on each gel for normalization and total levels of RyR1 were not different between groups.

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

Calcium sparks measurements. Diaphragm muscles samples were dissected and stored in a HEPES buffered physiological medium (in mM: 119 NaCl, 5 KCl, 1.25 CaCl₂, 1 MgSO₄, 10 glucose, 1.1 mannitol, 10 HEPES, pH 7.4). Muscles were then rapidly placed in a dissecting chamber and the solution exchanged with a relaxing solution (in mM: 140 K-glutamate, 10 HEPES, 10 MgCl₂, 0.1 EGTA, pH 7.0). Bundles of 5 to 10 EDL fibers were manually dissected, mounted as described previously (6-8) and permeabilized in a relaxing solution containing 0.01% saponin for 30 s. After washing with saponin free solution, the solution was changed to an internal medium for imaging: (in mM) 140 K-glutamate, 5 Na₂ATP, 10 glucose, 10 HEPES, 4.4 MgCl₂, 1.1 EGTA, 0.3 CaCl₂, Fluo-3 0.05 pentapotassium salt (Invitrogen), pH 7.0, for sparks acquisition as previously reported (8). Potential sparks were empirically identified using an autodetection algorithm (8). The mean fluorescence (F₀) value for the image was calculated by summing and averaging the temporal F at each spatial location, while ignoring potential spark areas. This F₀ value was then used to create a smoothing routine, potential spark locations were visualized and analyzed for spatiotemporal properties as described previously 9. Image analysis was performed using IDL (v5.5, Research System, Inc.). Statistical comparisons were performed using an ANOVA test with a significance level set at P<0.05 (Sigmastat v3.5).

Sarcoplasmic reticulum vesicle preparation. Diaphragms were homogenized on ice in 300 mM sucrose, 20 mM PIPES (pH 7.0) in the presence of protease inhibitors (Roche) and centrifuged at 8000 rpm (5900 g) for 20 min at 4°C. The following supernatant was ultracentrifuged at 32 000 rpm (100 000 g) for 1 h at 4°C. The final pellet containing microsomal fractions enriched in SR vesicles was resuspended and aliquoted in 300 mM sucrose, 5 mM PIPES (pH 7.0) containing protease inhibitors. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

Single channel data from planar lipid bilayer measurements. Planar lipid bilayers were formed from a 3:1 mixture of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) suspended (30 mg/ml) in decane by painting the lipid/decane solution across a 200- μ m aperture in a side of a polysulfonate cup (Warner Instruments) separating two chambers. The *trans* chamber (1 ml) representing the intra-SR (luminal) compartment was connected to the headstage input of a bilayer voltage clamp amplifier (BC-525D, Warner Instrument) and the *cis* chamber (1 ml), representing the cytoplasmic compartment, was held at virtual ground. Solutions in both chambers were as follows: 1 mM EGTA, 250/125 mM HEPES/Tris, 50 mM KCl, 0.64 mM CaCl₂, pH 7.35 as *cis* solution and 53 mM Ca(OH)₂, 50 mM KCl, 250 mM HEPES, pH 7.35 as *trans* solution. The concentration of free Ca²⁺ in the *cis* chamber was calculated with WinMaxC program (version 2.50; www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html). SR vesicles were added to the *cis* side and fusion with the lipid bilayer was induced by making the *cis* side hyperosmotic by the addition of 400-500 mM KCl. After the appearance of potassium and chloride channels, the *cis* compartment was perfused with the *cis* solution. Single-channel currents were recorded at 0 mV using a Bilayer Clamp BC-535 amplifier (Warner Instruments), filtered at 1 kHz and digitized at 4 kHz. All experiments were performed at room temperature. Data acquisition was performed by using Digidata 1440A and Axoscope 10.2 software and the recordings were analysed by using Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Open probability was identified by 50% threshold analysis using a least 2 min of continuous record. At the conclusion of each experiment, ryanodine (5 μ M) was added to the *cis* chamber to confirm channels as RyRs.

Protein kinase A activity assay

Samples were thawed on ice and PKA activity was determined using a colorimetric assay (Arbor assay) according to manufacturer's instructions. This assay utilizes an immobilized PKA substrate bound to a microtiter plate. Briefly samples containing PKA were, in the presence of the supplied ATP to phosphorylate the immobilized PKA substrate. A rabbit

Résultats : Etudes 1 : la dysfonction du récepteur à la ryanodine contribue à la dysfonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique

antibody specific for the phospho-PKA substrate binds to the modified immobilized substrate. A secondary antibody specific for rabbit IgG labeled with peroxidase is then added to the plate to bind to the primary rabbit anti-phospho-PKA substrate. After a short incubation and wash, substrate is added and the intensity of the color is directly proportional to the amount of PKA activated in the samples and standards. Samples in the flat-bottom 96-well plate were quantitated by measuring absorbance at 450 and 650 nm using a microplate reader. A standard curve was obtained using a cAMP-dependent protein kinase as control.

References

1. Jaber S, *et al.* (2011) Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 183(3):364-371.
2. Mrozek S, *et al.* (2012) Rapid onset of specific diaphragm weakness in a healthy murine model of ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Anesthesiology* 117(3):560-567.
3. Fauconnier J, *et al.* (2011) Ryanodine receptor leak mediated by caspase-8 activation leads to left ventricular injury after myocardial ischemia-reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(32):13258-13263.
4. Fauconnier J, *et al.* (2010) Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(4):1559-1564.
5. Tang W, *et al.* (2004) Altered excitation-contraction coupling with skeletal muscle specific FKBP12 deficiency. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18(13):1597-1599.
6. Bellinger AM, *et al.* (2009) Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* 15(3):325-330.
7. Reiken S, *et al.* (2003) PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *The Journal of cell biology* 160(6):919-928.
8. Ward CW, *et al.* (2003) Defects in ryanodine receptor calcium release in skeletal muscle from post-myocardial infarct rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17(11):1517-1519.

Supplemental table and figures

Supplementary Table 1: Clinical description of patients.

	Control	MV
	Short-Term MV	Long-Term MV
Duration of MV	2.3±0.4	98±65 **
Number of patients	10	9
Age (Years)	53±9	39±19 *
Sex (M/F)	9/1	3/6
Weight (kg)	72±15	74±14
Height (cm)	170±10	170±11
BMI (kg/cm²)	25±5	25±3
Reason for surgery/ cause of brain death	Stage 1A adenocarcinoma of the lung	Stroke (7), Motor vehicle accident (1), Cardiac arrest (1)

MV = mechanical ventilation. BMI = body mass index (defined as the weight in kilograms divided by the square of the height in meters). * p < 0.05; ** p < 0.01

Supplemental figures

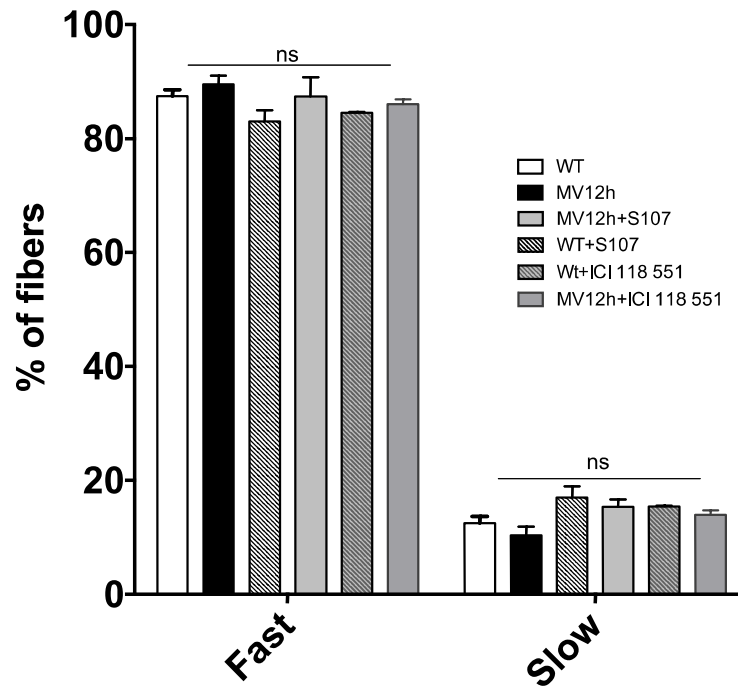


Fig. S1 : Fast and slow twitch fibers in diaphragm muscle in control, MV 12 hours, control+ICI118551, control+S107, MV12hours +ICI118551 and MV 12hours+S107. (n= 192 to 852 fibers for each group).

Etudes 2 : Impact du stress oxydant mitochondrial sur le RyR1 et activation de la protéolyse calcium dépendante au cours de la ventilation mécanique chez la souris

2.1. Objectif de l'étude

Comme nous l'avons bien décrit dans le chapitre mitochondrie et stress oxydant de ce manuscrit, la mitochondrie est une source potentielle de production d'espèces radicalaires qui sont impliquées dans la VIDD. La dysfonction mitochondriale semble être un évènement précoce dans cette pathologie. Picard et al, (Picard et al., 2015a) ont rapporté la présence d'une fission des mitochondries intramyofibrillaires dès 6 heures de MV chez la souris qui pourrait être liée, par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé, à l'augmentation de la production des ROS mitochondriaux.

Bien que le stress oxydant mitochondrial puisse induire une perturbation de l'homéostasie calcique et activer la protéolyse, ce lien qui peut exister entre production de ROS et régulation de l'homéostasie calcique n'a jamais été adressé dans le contexte de la VIDD.

Ainsi dans cette étude nous avons émis comme première hypothèse, que la perturbation de l'homéostasie calcique au cours de la ventilation mécanique décrite dans le premier article pourrait être induite par la production des ROS mitochondriales. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué dans un premier temps l'effet d'un antioxydant mitochondrial le SS31 sur le diaphragme de souris ventilée mécaniquement pendant 6 heures.

Le SS31 (D-Arginyl-2,6-dimethyl-L-tyrosyl-L-lysyl-L-phenylalaninamide) appartient à la classe des « SS-peptides ». C'est un antioxydant qui peut traverser facilement les membranes cellulaires. Il s'intercale préférentiellement dans la mitochondrie (espace inter-membranaire) et joue le rôle d'un chélateur de ROS mitochondrial à l'intérieur de la mitochondrie. Cette action prévient le gonflement de la mitochondrie et le relargage du cytochrome c dans des conditions de stress telles que l'ischémie reperfusion.

Puis dans un deuxième temps, afin d'identifier le lien entre les altérations mitochondriales et calciques d'une part et les atteintes histologiques largement décrites chez l'homme et les modèles animaux, nous avons secondairement émis l'hypothèse que, sur notre modèle de souris, une période de MV 12 heures pouvait entraîner des troubles de l'homéostasie calcique induite par les ROS mitochondriaux, déjà observés après 6 heures de MV et également induire une protéolyse dépendante du calcium, décrite dans le chapitre mécanismes physiopathologiques de cette thèse.

Ainsi l'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet d'un traitement par un antioxydant mitochondrial (SS31), sur l'homéostasie calcique, le remodelage du RyR1, le stress oxydant, la fonction contractile, la protéolyse et l'atrophie au niveau du diaphragme de souris ventilées mécaniquement pendant 6 ou 12 heures.

2.2. Protocole

Les expérimentations sont réalisées sur des souris de la lignée C57/BL6 âgées de 10 semaines et qui pèsent entre 25-30g. L'étude est en accord avec la réglementation de l'expérimentation animale établie par le comité de protection animale de Montpellier.

Modèle murin de VIDD :

36 souris wild type ont été réparties en 5 groupes dont 4 ont été ventilés mécaniquement :

Un groupe ventilé 6 heures sans traitement (VM-6h).

Un groupe ventilé 12 heures sans traitement (VM-12h).

Un groupe ventilé 6 heures et traité au SS31 (VM-6h+SS31).

Un groupe ventilé 12 heures et traité au SS31 (VM-12h+SS31).

Le 5^{ème} groupe non ventilé servait de control (CTRL).

La méthodologie de la ventilation mécanique est précisée dans le chapitre méthodologie de cette thèse.

Traitement pharmacologique utilisé :

SS31 : La molécule était solubilisée dans du Ringer lactate et injectée en intrapéritonéal.

Les souris ont reçu une dose de charge de 10 mg/kg une heure avant le début de la ventilation mécanique et une dose de maintien de 3 mg/kg/ heures durant le protocole de ventilation.

Mesure et évaluation

Sur le diaphragme des souris de tous les groupes il a été étudié la fonction contractile (méthodologie 2), la biochimie du RyR1 (méthodologie 3), les Sparks calciques (méthodologie 3), l'activité de la protéine kinase A (méthodologie 4), les modifications histologiques (méthodologie 2) et les voies signalétique de la protéolyse, protéosynthèse et du stress oxydant (méthodologie 4).

2.3. Résultats

6h de MV induisent un remodelage précoce du RyR1 et une dysfonction contractile liée au stress oxydant d'origine mitochondriale.

Comme le montre la figure (fig.1A-E, article 2), nous avons trouvé chez le groupe ventilé 6 heures, une augmentation de l'oxydation totale des protéines témoin d'un stress oxydant touchant l'ensemble des protéines, associée à la présence d'un remodelage du RyR1 similaire à celui décrit dans l'article 1 de cette thèse (oxydation, phosphorylation PKA dépendante sur la sérine Ser2844 ainsi qu'une dissociation de la protéine régulatrice calstabin1) (Fig. 1A-B, article 2). De même nous montrons également un dysfonctionnement du canal RyR1 marqué par une augmentation significative de la fréquence des événements de relargage spontanés du calcium (i.e. Ca²⁺ Sparks) (Fig. 1C, article 2), associé à une réduction de la contractilité du

diaphragme (Fig. 1D, article 2) et une diminution de l'endurance évaluée par l'imposition des stimulations électriques de 30 Hz répétées (Fig. 1E, article 2). Ces altérations biochimiques et fonctionnelles ne sont pas accompagnées d'atrophie.

Notre modèle de souris ventilée 6 heures ne présente pas d'atrophie ou d'altération histologique comme cela a précédemment été décrit par notre équipe (Mrozek et al., 2012).

Nos résultats suggèrent donc que les altérations précoces observées après 6 heures de ventilation en termes de stress oxydant, de dysfonctionnement du RyR1 et d'anomalie de la régulation de l'homéostasie calcique, pourraient être à l'origine d'une atteinte du couplage excitation-contraction, à la base de l'atteinte de la fonction contractile observée au niveau du diaphragme.

Concernant l'implication du stress oxydant d'origine mitochondriale, dans cette étude, nous montrons, comme indiqué dans la figure (fig.1A-E, article 2), qu'un traitement par antioxydant mitochondrial (SS31) prévient l'ensemble des altérations induites par 6 heures de ventilation mécanique et décrites en première partie de ce chapitre.

12h de MV induit un remodelage précoce du RyR1 et une dysfonction contractile du fait d'un stress oxydant d'origine mitochondriale, associée à une atrophie.

Comme le montre la figure 2 (fig.2A-E, article 2) 12 heures de ventilation mécanique chez la souris induit les mêmes anomalies précédemment décrites au bout de 6 heures, en terme de stress oxydant, de remodelage du RyR1, d'altération de l'homéostasie calcique et d'atteinte de la fonction contractile du diaphragme. Mais parallèlement nous avons observé cette fois-ci la présence d'une atrophie qui n'existait pas au bout de 6 heures de ventilation mécanique.

En effet, 12 heures de ventilation mécanique sur notre modèle murin de ventilation mécanique peuvent induire une atrophie (Fig.2F, article 2), sans modification du phénotype musculaire.

Concernant l'implication du stress oxydant d'origine mitochondrial, nos résultats montrent qu'un traitement par le SS31 prévient l'ensemble des modifications induites par 12 heures de MV, et décrite plus haut dans ce chapitre. Ces résultats sont présentés dans les figures (2C, 2D, 2E, 2F) de mon article 2.

Afin de proposer un mécanisme pour expliquer cette atrophie, nous avons évalué l'activation des différentes voies protéolytiques suite à 12 heures de ventilation mécanique ainsi que la protéosynthèse.

Ainsi 12 heures de ventilation mécanique dans notre modèle murin, on note une augmentation significative l'activité de la calpaïne 1 et de la calpaïne 2 (Fig. 3A-B) ainsi que la quantité des protéines ubiquitinées, témoin d'une activation du système ubiquitine protéasome (Fig. 3D). Ces anomalies induites par 12 heures de ventilation mécaniques sont prévenues par le traitement avec la molécule SS31.

Nous avons également évalué la présence d'autophagie au bout de 12 heures de ventilation dans notre modèle, qui est un processus catabolique qui a été impliqué dans l'atrophie musculaire induite par la ventilation chez l'homme (Hussain et al., 2010). Nous retrouvons les mêmes anomalies décrites chez l'homme à partir de biopsies diaphragmatiques, avec une augmentation significative du ratio LC3-II/LC3-I (Fig. 3E).

Nous avons observés que 12 heures de ventilation mécanique sur notre modèle animal diminuent le ratio phospho-Akt/Akt (Fig. 3F), témoin d'une altération de la voie de la synthèse protéique. L'effet négatif sur la synthèse protéique de la ventilation mécanique à déjà été décrit par des études antérieures (Powers et al., 2013).

Comme montré dans la figure 3F (article 2), nous avons observé qu'un traitement par le SS31 ne corrigeait pas la dérégulation de ces deux dernières voies, qui sembleraient donc être

mineures dans la genèse d'une dysfonction diaphragmatique au cours de 12 heures de ventilation mécanique dans notre modèle animal.

De plus, du fait de l'inefficacité du SS-31, le stress oxydant d'origine mitochondriale induit par la ventilation mécanique dans notre modèle, ne semble donc pas être impliquée dans l'induction de l'autophagie ou la diminution de la synthèse protéique observée.

2.4. Discussion

Bien que la mitochondrie ait été identifiée comme une source principale de la production de ROS au cours de la ventilation mécanique (Kavazis et al., 2009a; McClung et al., 2009; Picard et al., 2012; Van Gammeren et al., 2007; Whidden et al., 2009), les mécanismes spécifiques précoces par lesquels les ROS induisent une dysfonction diaphragmatique contractile étaient très peu connus. Le résultat principal de cette étude montre que 6 heures de ventilation mécanique chez la souris induit un stress oxydant d'origine mitochondrial qui est impliqué dans l'atteinte de l'homéostasie calcique au niveau du diaphragme.

Ainsi les ROS d'origine mitochondriale produits après 6 heures de ventilation mécanique, au niveau du diaphragme vont induire une oxydation et une phosphorylation du canal RyR1, à la base d'une dissociation entre le complexe RyR1 et sa protéine régulatrice FKBP12, responsable de fuites calciques.

Le mécanisme sous-jacent permettant de faire le lien entre troubles de l'homéostasie calcique et la dysfonction contractile dès 6 heures de ventilation mécanique, n'a pas été étudié dans mes travaux, mais nous faisons l'hypothèse que ce mécanisme passe par une atteinte précoce du couplage excitation-contraction. En effet, le sarcomère est l'unité fondamentale de production de force et la formation des ponts d'actine/myosine et largement dépendante de la concentration cytosolique en calcium (Yaniv et al., 2005a).

Toutefois, le stress oxydant peut également altérer la contractilité musculaire via l'activation des différents systèmes protéolytiques comme les calpaines et les caspases (Chen et al., 2002a; Goll et al., 2003b; Scarabelli et al., 2002a). Bien que ces deux voies impliquées dans les effets délétères de la ventilation mécanique, puissent être activées par le calcium cytosolique (Belcastro et al., 1998; Jayaraman and Marks, 2000), l'implication de ce dernier n'était pas connue dans le cadre de la VIDD.

Notre deuxième résultat principal montre que ce stress oxydant d'origine mitochondriale, décrit dès 6 heures de ventilation mécanique, induit, après 12 heures de ventilation mécanique des altérations de l'homéostasie calcique, d'une augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} , à la base d'une activation de la protéolyse calcium dépendante et d'une atrophie au niveau diaphragmatique.

Notre modèle murin de ventilation mécanique prolongée semble pertinent. En effet chez l'homme, l'atrophie est le premier paramètre qui a été décrit pour caractériser la VIDD.

Il a été reporté que la MV induit une atrophie au bout de 24 heures chez l'homme (Jaber et al., 2011c; Levine et al., 2008b, 2011b), au bout de 12 heures chez le rat et la souris (Betters et al., 2004b; Tang et al., 2013a). En accord avec ces études nous avons trouvé une réduction de la surface de section des fibres du diaphragme après 12h de MV sans modification du pourcentage des fibres rapides versus lentes. Pourtant dans notre étude, l'atrophie était prédominante sur les fibres rapides par rapport aux fibres lentes. Les études précédentes chez la souris montrent une atrophie des deux types de fibres après 18 heures de MV (Tang et al., 2013). Cela résultat pourrait être expliqué par une grande susceptibilité des fibres rapides à l'atrophie induite par la MV, qui sont donc atteintes plus précocement.

La raison de cette plus grande susceptibilité n'est pas connue. Elle pourrait être liée à une sensibilité accrue des fibres rapides au stress excentrique, augmentant ainsi dans ces fibres la production de ROS par méchanotransduction pouvant impliquer NOS2 (Hidalgo et al., 2006b).

Enfin, de point de vue thérapeutique, nous avons montré l'efficacité d'une molécule antioxydante mitochondriale (SS31) dans la prévention de la VIDD chez la souris. Cette approche est particulièrement intéressante parce qu'elle semble en amont des mécanismes cellulaires impliqués dans l'atteinte de l'homéostasie calcique, en bloquant la principale source de ROS impliquée dans l'oxydation du canal RyR1.

Il existe d'autres modifications biochimiques du RyR1 comme la nitrosylation, la glutathionylation susceptible d'impacter le fonctionnement de ce canal et présentés en première partie de ce manuscrit. Les mécanismes activateurs de telles modifications post-traductionnelles, et l'impact sur la fonction diaphragmatique au cours de la ventilation mécanique restent inconnus et devraient faire l'objet de futurs travaux.

Limite de l'étude

Dans cette étude nous proposons que la production de ROS par la mitochondrie induit une atteinte fonctionnelle du RyR1 avec altération du couplage excitation-contraction, à la base de la diminution précoce de force du diaphragme, avant même l'activation de la protéolyse calcium dépendante.

Mais ceci ne reste qu'une hypothèse. En effet, la principale limite de cette étude est que nous n'avons pas exploré les effets de la production de ROS sur la sensibilité des myofilaments au calcium qui peuvent également altérer la production de force du sarcomère impliquée dans la VIDD (Hooijman et al., 2014). Cette hypothèse devrait être explorée par de futures études.

Conclusion

Chez la souris, la ventilation mécanique est associée à un stress oxydant précoce dès 6 heures de MV. Nous avons trouvé que la production de ROS mitochondriaux altère rapidement (6h) le fonctionnement du RyR1 et entraîne une fuite calcique à travers ce canal vers le cytosol. Nous suggérons que ces événements précoces contribuent précocement à la VIDD par une altération du couplage excitation-contraction. Nous proposons aussi que cette perturbation de l'homéostasie calcique à long terme (12 heures), contribue à l'activation des protéases calcium dépendantes liées au désassemblage des complexes actine/myosine et en conséquence l'atrophie. Ces résultats montrent que le traitement SS31, antioxydant mitochondrial, prévient la plupart de ces altérations et met en évidence le rôle central de la mitochondrie dans la régulation de l'homéostasie calcique au cours de la MV.

2.5. Article 2: Mitochondrial-induced oxidative stress triggers RyR1 abnormalities and underlies Ca²⁺-dependent proteolysis in the diaphragm of mechanically ventilated mice.

Article en soumission à FASEB J

Mitochondria-induced oxidative stress triggers RyR1 abnormalities and underlies Ca²⁺-dependent proteolysis in the diaphragm of mechanically ventilated mice.

H. Dridi^a, R. Barsotti^b, Boris Jung^a, S. Levine^b, Samir Jaber^a, A. Lacampagne^{a1}, S. Matecki^{a1},

a, Inserm U1046, CNRS UMR91214, University of Montpellier, Montpellier Regional University Hospital (CHRU), Montpellier, France

b, University of Pennsylvania - Philadelphia, PA/USA

1: To whom correspondence should be addressed:

Stefan Matecki Inserm U1046, CNRS UMR9214 CHU Arnaud de Villeneuve F-34295 Montpellier Cedex 5 Phone: +33 467 415 228 Fax: +33 467 415 242 stephan.matecki@univ-montp1.fr	Alain Lacampagne Inserm U1046, CNRS UMR9214 CHU Arnaud de Villeneuve F-34295 Montpellier Cedex 5 Phone: +33 467 415 228 Fax: +33 467 415 242 alain.Lacampagne@inserm.fr
---	---

Abstract:

Rationale: In rodents, prolonged controlled mechanical ventilation (MV) and associated diaphragm inactivity elicits mitochondrial generation of reactive oxygen species (mROS) and activates protein degradation contributing to ventilator-induced diaphragm dysfunction (VIDD). We thus hypothesized that 1) mROS causes a redox modification of the ryanodine receptor (RyR1), the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel, contributing to altered Ca^{2+} homeostasis and proteolysis observed in VIDD and 2) By reducing the production of mROS, SS-31, a mitochondrial-targeted antioxidant may mitigate these abnormalities.

Method: The cross-sectional area, force, RyR1 structure and function and Ca^{2+} dependent proteolysis in muscle fibers isolated from the diaphragm of untreated mice subjected to MV for 6 or 12 hours were compared to mice treated with SS-31.

Measurements and Main Results: The specific force of fibers isolated from the diaphragm of mice subjected to 6 hours of MV decreased significantly by $40 \pm 2.9\%$, ($n=10$, $p<0.01$) compared to diaphragm fibers from unventilated control mice. These changes were associated with RyR1 macromolecular oxidation, phosphorylation and the depletion of the stabilizing subunit calstabin1, resulting in an increase in sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} leak assessed by Ca^{2+} -sparks frequency. Similar results were found in mice mechanically ventilated during 12 hours, along with a significant decrease in diaphragm cross-sectional area (574 ± 19 versus $673 \pm 21 \mu\text{m}^2$, $p<0.01$), a 300% and 23% increase in calpain 1, 2 activity and 42% increase in total protein ubiquitination, compared to unventilated controls. Fibers isolated from the diaphragm of mice pre-treated with SS-31 and mechanically ventilated either 6 or 12 hours were protected against all of these changes.

On the basis of these findings, we propose that mitochondria-induced oxidative stress causes SR Ca^{2+} leak via RyR1 and triggers Ca^{2+} -dependent proteolysis that underlie many of the tissue changes observed in VIDD. These results emphasize the need to develop therapeutic interventions that specifically target the upstream mediator of these changes: mitochondrial dysfunction, and thereby, reduce mechanical ventilation-induced diaphragmatic weakness.

Introduction

Mechanical ventilation (MV) is used clinically to achieve adequate pulmonary gas exchange in patients suffering from hypoxemia and in patients who are incapable of maintaining sufficient alveolar ventilation: surgery, respiratory and heart failure, drug overdose. However, prolonged MV results in significant diaphragmatic weakness due to both myofiber atrophy and contractile dysfunction(1). This entity, which has been termed ventilator-induced diaphragmatic dysfunction (VIDD) (2), is likely to play an important role in the difficulties frequently encountered in weaning critically ill patients from the ventilator(3).

Although the precise cellular pathways involved in (VIDD) remain poorly understood, oxidative stress seems to play a major role (4–6). Mitochondria are an important source of reactive oxygen species (mROS) implicated in VIDD. A recent study showed that SS-31 (D-Arg-2', 6'-dimethyl-Tyr- Lys-Phe-NH₂) a mitochondrial ROS scavenger protects the diaphragm from MV-induced diaphragmatic atrophy and contractile dysfunction (6). Moreover, mitochondrial dysfunction seems an early event on the path to VIDD. Indeed, Picard et al. reported in mice the presence of intramyofibrillar (IMF) mitochondrial fission after only 6 hours of MV (7) which may be linked, to an increase of ROS production (6,8–10). The mechanism, however, remains not well understood. In this study, we observed in mice after 6 hours of MV, the presence of diaphragmatic deficit force, without measurable atrophy or calcium-dependent proteolysis, which may primarily involve other cellular pathways such as impaired excitation contraction coupling (11).

Ryanodine receptors (RyRs) are located on the sarcoplasmic reticulum and are responsible for the release of Ca²⁺ from this intracellular store during excitation–contraction (EC) coupling. RyR1 calcium release is modulated by proteins that bind to its large cytoplasmic scaffold domain, including the FK506 binding protein (calstabin1) (12). Indeed, Protein Kinase A (PKA)-mediated phosphorylation and oxidation of the RyR1 have been linked to a loss of the normal association between calstabin1 and the rest of the RyR1 complex (13,14), which become leaky and in turn result in impaired Ca²⁺ handling and contractile dysfunction in conditions as diverse as heart failure, chronic muscle fatigue, muscular dystrophy and aging (13,15–17).

Thus, we first hypothesized that in these early events previously described after 6 hours of MV (7,11), mitochondrial ROS production may contribute to RyR1 dysfunction and Ca²⁺ homeostasis impairment, leading to contractile dysfunction.

Longer periods of MV have been associated with diaphragm fiber atrophy: at least 12 hours in animal models and 48 hours in humans, (1,5,18–20). This loss of muscle mass appears to be the result of both decreased protein synthesis (21,22) and increased protein breakdown (5,23,24). Muscle fiber injuries have also been reported, including disrupted myofibrils, increased numbers of vacuolar structures (2,23,25,26), abnormal mitochondria, autophagy (27,28) and muscle fiber remodeling (29).

We thus secondly hypothesized in our mice model that, after longer periods of MV (12 hours), dysregulated Ca²⁺ homeostasis induced by mitochondrial ROS production already observed after 6 hours may trigger calcium-dependent proteolysis and atrophy largely described in this pathology (5,30,31). To address our hypotheses, experiments were performed in mice treated by a mitochondria-targeted antioxidant SS-31 and compared to a group of untreated mice.

Methods

Experiments on animals and institutional approval

The study followed the guidelines for animal experiments established by the institutional committee for animal care (INSERM U 1046, Montpellier, France) and the recommendations of the World Medical Association. It was recorded under the reference **#CEEA-LR-12078**. Healthy male (10 weeks, 25–30 g) C57/BL6 mice were maintained in our animal facility for 1 week before initiation of the experiments.

Experimental Design

Mice were then randomly assigned to one of five experimental groups: (1) mice mechanically ventilated during 6 hours (MV-6h, n= 8), (2) mice mechanically ventilated during 6 hours and treated by SS-31 (loading dose 3mg/kg and maintaining dose 0.05mg/kg/h during MV) (MV-6h+SS-31, n= 8), (3) mice mechanically ventilated during 12 hours (MV-12h, n= 6), (4) mice mechanically ventilated during 12 hours and treated with SS-31 (loading dose 3mg/kg and maintaining dose 0.05mg/kg/h) (MV-12h+SS-31, n=6) and (5) control mice (CTRL, n= 8).

Mice in the MV-6h or MV-12h groups were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (50 mg/kg body weight) and orally intubated with a 22-gauge angio-catheter. No neuromuscular blocking agents were used. MV was performed with a small animal ventilator (Minivent, Harvard Apparatus, Saint-Laurent, Quebec, Canada) using the following ventilator settings: fraction of inspired oxygen 0.21 (room air), controlled volume mode with tidal volume 10 μ l/mg body weight, respiratory rate 150 breaths/min, and positive end-expiratory pressure 3–4 cm H₂O achieved by placing the expiratory port under a water seal. General care of the MV groups included continuous maintenance of body temperature using a homeothermic blanket (Homeothermic Blanket Control unit; Harvard Apparatus, Saint-Laurent, Quebec, Canada) and hourly intraperitoneal injections of 0.05 ml A ringer lactate solution was used to maintain hemodynamic stability and compensate insensible losses. Bladder expression, ocular lubrication, and passive limb movements were also performed.

Mitochondria-targeted antioxidant: chemical details and experimental delivery:

The mitochondria-targeted antioxidant designated as “SS-31” for use in the current experiments belongs to a family of small, water-soluble peptides that contain an alternating aromatic–cationic motif and selectively target the mitochondria. SS-31 was dissolved in saline and delivered in a bolus (loading) dose (3 mg/kg, subcutaneous injection) 15 minutes before initiation of MV. A constant subcutaneous injection (0.05 mg/kg/h) of SS-31 was maintained throughout MV.

At the end of protocol, the mice were euthanized by cervical dislocation for functional and biochemical evaluation.

Biochemical evaluation

Protein extraction

Proteins were extracted from frozen costal diaphragms (20 mg) homogenized with a manual polytron® instrument. Tissues were then lysed in 600- μ L extraction buffer (Tris maleate 10 mM, NaF 35 mM, Triton 1%, activated orthovanadate 20 mM, protease inhibitor cocktail, Roche, France) and agitated for 45 minutes by rotation. Membrane and cytosolic proteins were collected from the supernatant after 5 minutes of centrifugation at 10, 000 x g at 4°C.

RyR1 immunoprecipitation

Muscle samples were prepared as described (Bellinger et al., 2009). Immunoblots were developed with anti-RyR (Affinity Bioreagents, Bolder, CO 1:2,000), anti-phospho-RyR1-pSer2844 (1:5000), or an anti-calstabin antibody (1:2,500). To determine channel oxidation, the carbonyl groups in the protein side chains within the immunoprecipitate are derivatized to 2, 4-dinitrophenylhydrazone (DNP-hydrazone) by reaction with 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). The DNP signal associated with RyR is determined using an anti-DNP antibody.

Proteolysis and protein synthesis evaluated by Western blot

An immunoblot analysis was performed to evaluate the ratios of the active (cleaved) forms of

calpain 1, 2 and LC3/II to total levels of the calpain1 and 2 isoforms and LC3/I respectively. The total form of caspase 3, total proteins ubiquitination, total proteins oxidized normalized to the GAPDH were measured. The phosphorylated isoforms of AKT was normalized to the non-phosphorylated isoforms of AKT. Blots were incubated with specific antibodies for calpain 1(15C10, 1:1,000 dilution, Sigma), calpain 2 (ab39165 1:1000 dilution; Abcam), primary anti-caspase 3 (Sc7148, 1:500 dilution, Santa Cruz), LC3/2 and LC3/1 (Q9H492 1:1000 dilution, Cell Signaling), AKT (9272 cell signaling, 1:1000 dilution), phospho-AKT (Ser473, D9E, 1/2000 dilution Cell Signaling). Anti-ubiquitin (U5379 1:100 dilution, Sigma) was incubated overnight at 4°C. For total proteins, oxidation samples are derived to 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNP-hydrazone) by reaction with 2,4- dinitrophenylhydrazine (DNPH). The DNP signal associated with proteins is determined using an anti-DNP antibody (1:300 dilution). GAPDH (Ab8245 Abcam) was diluted at 1:60000. The membrane was then incubated with a secondary antibody (anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat 700 and 800 nm; 1:30,000) for 1 hour in the dark. After the final washes, the membrane was scanned using Odyssey™ Infrared Imager (LI-COR_ Biosciences, Lincoln, NE).

Measurement of diaphragm contractile properties

The mice were euthanized by cervical dislocation. The diaphragm was surgically removed to permit measurements of isometric contractile properties as previously described (11). The muscle was stretched at L_0 (the length at which the muscle produced maximal isometric tension) and then was supramaximally stimulated using square wave pulses (Model S48; Grass Instruments, West Warwick, RI). The force–frequency relationship was determined by sequential stimulation of the muscles for 600 minutes at 10, 20, 30, 50, 60, 80, 100, and 120 Hz with 1 minute interval between each stimulation train. After completion of the measurements of contractile properties, muscle length was measured, blotted quickly to remove the surface buffer, and weighed. The muscle cross-sectional area was determined by dividing muscle weight by its length and tissue density (1.056 g/cm^3). Diaphragmatic force production was then normalized to the muscle cross-sectional area to determine the specific force, expressed in newton per square centimeter.

Measurement of atrophy in diaphragm after 12 h MV

Muscle phenotype was determined on cryosections (10 μm) by myosin ATPase histochemical staining as previously described (32). The muscle-fiber cross-sectional area (CSA) was determined using the ImageJ analysis software and expressed in μm^2 .

Ca²⁺ sparks measurement

Bundles of 4–7 fibers were manually dissected from diaphragm muscle in a relaxing solution (in mM: K-glutamate 140, Hepes 10, MgCl₂ 10, EGTA 0.1, pH 7.0), mounted as previously described (33) and permeabilized in the relaxing solution containing 0.01% saponin for 30–40 seconds. The solution was changed to an internal medium (in mM: K-glutamate 140, Na₂ATP 5, glucose 10, Hepes 10, MgCl₂ 4.4, EGTA 1.1, CaCl₂ 0.3, Fluo-3 0.05 [pentapotassium salt; Tef-labs], pH 7.0) used for image recording. Fluorescence images were acquired with a Carl Zeiss MicroImaging, Inc. LSM 510 NLO confocal system (63x oil immersion, NA 1.4) operated in line-scan mode (x vs. t, 1.9 ms/line). Fluo-3 was excited with an argon/krypton laser at 488 nm, and emitted fluorescence was recorded at 525 nm.

Potential spark areas were empirically identified using an auto detection algorithm (34). Selection and analysis of Ca²⁺ sparks were performed essentially as previously described (35) and RyR behavior was assessed by measuring spontaneous SR Ca²⁺ release events (i.e, Ca²⁺ sparks) in permeabilized muscle diaphragm fibers using laser scanning confocal microscope (15,17).

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was defined as $p < 0.05$, using Student's unpaired t-test or analysis of variance (one-way or two-way), followed by a Bonferroni selected comparison test.

Results

6 hours of MV induces oxidative stress, RyR1 remodeling and contractile dysfunction of

the diaphragm

Total proteins oxidation, remodeling and functional abnormality of RyR1 was evaluated in the mice diaphragms of CTRL (n=8), MV-6h (n=8) and MV-6h+SS31 (n=8) groups. Total protein oxidation was increased in MV-6h group (Figure1A). MV caused a significant increase in the oxidation and phosphorylation on Ser-2844 and in the dissociation of calstabin1 from RyR1 (Figure1B). These biochemical abnormalities were associated with an increased frequency of SR Ca²⁺ release events, evaluated *in situ* by measuring spontaneous RyR1 Ca²⁺ sparks. (Figure 1C). Each of these effects were prevented by the mitochondria-targeted antioxidant SS31.

As previously described by our laboratory (11), 6 hours of MV resulted in a significant decrease of diaphragmatic force production at all stimulation frequencies, with a loss of 40% of force production at 120 Hz (P < 0.001). The decrease in force was prevented by SS31 (Figure 1D).

As previously reported (11), there were no measureable changes in the amount of proteolysis or diaphragm cross sectional area after 6 hours of MV (results not shown).

12 hours of MV in mice induces oxidative stress, RyR1 remodeling, diaphragm weakness, and muscle atrophy.

The mice were ventilated for 12 hours (Figure 2). Results were similar to those obtained after 6 hours of MV. Oxidative stress was increased in the same manner (Figure 2A). A similar remodeling of RyR1 was observed (i.e. oxidation, increased phosphorylation at ser2844 and dissociation of calstabin1 (Figure 2B).

To determine the effect of 12 hours of MV on the size of fibers, we stained the diaphragm muscle fibers with antibodies against slow and fast myosin heavy chains. As shown in Figure 2C, slow fibers (top panel) were distributed sporadically among the fast muscle fibers (lower panel). 12 hours of MV did not change the fiber distribution in the diaphragm. It was approximately 10% slow fibers and 90% fast muscle fibers in this strain of mice (C57BL/6), (Figure 2D, F). However, the

mean CSA was significantly reduced (Figure 2E) due mainly to a reduction of fast fibers (Figure 2G). Although CSA in slow muscle fibers was also reduced by 10 %, the difference was not statistically significant ($p = 0.13$). Treatment with SS-31 prevented all these changes observed after 12 hours of MV.

Contractile function indicated a muscle weakness prevented by SS31 as already observed after 6 hours of ventilation (Figure 3H).

12 hours of MV in mice promotes diaphragmatic protease activation and proteolysis.

Protease activation was analyzed by Western blotting cleaved calpain-1, cleaved calpain-2. 12 hours of MV resulted in a significant increase in active calpain-1 and calpain-2 in the diaphragm by (300% and 23% respectively, $p < 0.05$), as detected by measuring the cleaved (active) 76-kDa-calpain fragment (Fig 3A-C). The cleavage of procaspase-3 results in the activation of caspases-3. 12 hours of MV resulted also in a significant decrease in the 35-kDa (inactive) caspases-3 protein in the diaphragm by (40% $p < 0.05$) (Fig3D, F). Treatment with SS-31 protected the diaphragm against the MV-induced activation of both calpain 1 and 2 isoform and caspase-3 (Figure 3 A, B).

Several proteins demonstrated greater ubiquitination after 12 hours of MV (42% $p < 0,05$). This was also prevented by SS-31 treatment (Fig3D, E).

Previous reports have noted an increase in autophagy in VIDD (28). Autophagic activity was tested here by measuring the conversion between LC3-I and LC3-II. In contrast to the cytosolic distribution of LC3-I, LC3-II is membrane-bound enriched in the autophagic vacuole fraction. The detection of LC3-I to LC3-II conversion thus identifies autophagic activity in mammalian cells. The LC3-II/LC3-I ratio was increased significantly, by approximately 300% after 12 hours of MV. This effect was not blocked by treatment by SS-31 (see (Figure 3G, I)).

As an index of anabolic signaling, we measured the diaphragmatic levels of the ratio of phospho-AKT/AKT, previously reported to be involved in atrophy induced by MV(36,37). After 12 hours of MV, diaphragm levels of the ratio phospho-AKT/AKT were significantly reduced by 62% ($P < 0,001$). The SS-31 treatment did not prevent the down regulation of proteosynthesis (see

Figure 3G, H).

Discussion

Mitochondria are considered as the main site of ROS production during prolonged MV (8,38). Other sites of ROS production such as NADPH oxidase (9), Xanthine oxidase (10), NO Synthase (39) do not appear to be involved in VIDD. Moreover, a previous study emphasized the major role of oxidative stress induced by mitochondria in VIDD by observing that SS-31, a specific scavenger of mitochondrial ROS prevents lipid peroxidation and protein carbonylation as well as muscular weakness induced by MV (6). The specific mechanism responsible for this ROS-mediated muscular weakness is not well understood. Several potential mechanisms may be involved in the beneficial effect of reduced mitochondria-mediated oxidative stress on diaphragm contractile function. Indeed, oxidative stress has the potential to inhibit contractile mechanisms by triggering several proteolytic pathways such as calpain and caspase (40–42). This mechanism has been considered to explain the beneficial effect of antioxidant therapy during MV (6,43–46). Nevertheless, other associated cellular mechanisms for muscular weakness should be considered since VIDD may also occur without proteolysis or atrophy (11).

The sarcomere is the basic contractile unit that generates force production and highly depends on the relationship between cytosolic free Ca^{2+} , cross-bridge attachment/cross-bridge cycling rate, and sarcomere length (47). Any factor that influences one or more of these variables can impact diaphragm muscle force generation. In the present work, we provide evidence that mitochondrial ROS production induced by 6 hours of MV in mice impaired biochemical structure and function of diaphragmatic RyR1 resulting in Ca^{2+} leak from the sarcoplasmic reticulum which leads to early diaphragm contractile dysfunction.

Indeed, we observed that 6 hours of MV induces post-translational oxidation and phosphorylation at Ser-2844 of diaphragm RyR1. As previously described, this post-translational modification is associated with a loss in the interaction between RyR1 and a stabilizer protein called calstabin1

involved in the functional interaction between RyR1 and the voltage-sensing Ca^{2+} channel (DHRP) (48). When bound, calstabin1 prevents spontaneous SR Ca^{2+} leak from RyR1 and thus enhances the Ca^{2+} transient during the excitation-contraction coupling (ECC) (12,49). In turn, the loss of calstabin1 destabilizes the closed state of the channel which then becomes spontaneously leaky, resulting in impaired ECC with reduced maximal voltage-gated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release (50).

Thus, to ascertain whether MV caused an increase in RyR1-mediated SR calcium leak, we measured the frequency of spontaneous Ca^{2+} release events (i.e. Ca^{2+} sparks). Spark frequency increased in diaphragm fibers following 6 hours of MV, but not with SS31 treatment, a mitochondria-targeted antioxidant.

Thus, limiting mitochondrial ROS production mitigates the redox modification of RyR1 and its calstabin1 dissociation, resulting in a decreased Ca^{2+} leak from this SR channel. The RyR1 post-translational modification observed in our MV-6h group is part of a rapid onset of oxidative modifications, which have been previously observed within 6 hours of MV in the rat (4) and confirmed in the present study by the results indicating a higher level of carbonylated protein in the MV-6h group (see Figure 2a).

Associated with oxidation, excessive ROS production may also stimulate the PKA-mediated RyR1 phosphorylation on Ser-2844 (51) and exacerbate the loss of the normal association between calstabin1 and the rest of the RyR1 complex leading to increase SR Ca^{2+} leak (13,14) and presumably smaller Ca^{2+} transient upon activation. This Ca^{2+} homeostasis impairment may account for subsequent muscle weakness observed in our study after 6 hours of MV.

Our results are consistent with previous studies which, in a context of oxidative stress, found similar post-translational modifications associated with a leaky Ca^{2+} channel linked to muscular weakness, in several conditions such as diabetes (52), Duchene Muscular Dystrophy (17,53) or aging(15).

MV-induced atrophy has been reported following more than 24 hours in humans (1,54,55), and

12 hours in rats or mice (19,43). Consistent with these studies, we found a reduction of cross-sectional area (CSA) of diaphragm myofibers in our MV-12h group without modification in the distribution of fiber types.

Interestingly, we found that after 12 hours of MV in mice, only fast fibers exhibited a significant degree of atrophy, while the decrease in CSA of the slow type was not statistically significant. In a previous study, atrophy was reported in both mice diaphragm fiber types after 18 hours of MV (19). In general, these results suggest a higher susceptibility of diaphragm fast fibers to atrophy induced by MV. The reason is unclear but it could be related to a higher susceptibility of fast fiber types to atrophy when subjected to eccentric contractions (56–58). Although this is an interesting theory, further future studies are needed to ascertain whether mechanical stress induced by a passive shortening ventilation preferentially damages fast fibers.

As stated previously, we report activation of calpains, caspase, and protein ubiquitination in the diaphragm following 12–24 hours of MV.(1,5,20,43,59,60). All these studies have reported that these major proteolytic pathways are activated by MV and therefore probably induce diaphragm atrophy. The finding that SS-31 prevents activation of these pathways following 12 hours of MV is consistent with previous reports suggesting a regulatory role of mitochondrial ROS production in the stimulation of proteolytic systems, with a delay activation time between 6 and 12 hours of MV (6). The activation mechanisms involved are still unclear. Indeed, although ROS may directly activate these proteolytic systems (40,41,61,62), deregulation of intracellular Ca^{2+} homeostasis observed in our MV12h is also a possible key activator (63–65). Indeed, in our MV-12h group, we observed Ca^{2+} homeostasis impairment similar to that in our MV-6h group, which is also prevented by SS-31. Whether this oxidative stress-induced calcium leak triggers proteolysis as a predominant mechanism is an important question for future research.

Autophagy is another important proteolysis pathway. It is mediated by lysosomal proteases activation and has been reported to be induced by MV and associated with atrophy (19,27,28). Indeed, during autophagy, targeted cytosolic constituents are encapsulated into a double-membrane vacuole called the autophagosome which is induced by LC3/II, the conjugated

cytosolic form of LC3 (LC3/I) (66). We found in the MV-12h group, and in accordance with a previously mentioned study (27,28), an increase in LC3/II, a reliable marker of autophagy activation and related processes, which could be induced by oxidative stress (67).

A decrease in protein synthesis may also contribute to MV-induced atrophy (21,68,69), thus we evaluated the phosphorylation levels of AKT, a signal transduction pathway of cellular growth (47). As reported in a previous study (44,70) we found a significant decline of AKT phosphorylation level in our MV-12 h group.

Considering that SS31 has no effect either on the mice diaphragm level of LC3/II or on AKT phosphorylation, autophagy stimulation and inhibition of protein synthesis seem to be activated independently following an increased mitochondrial ROS production. They are not involved in diaphragm atrophy induced by 12 hours of MV.

Several of the mechanistic pathways described above and implicated in the development of VIDD are illustrated in Figure 4.

Limits of our findings

Although our findings and previous studies (7,8,38,71,72) implicated mitochondrial abnormalities in VIDD, the primary cellular stimulus that activates these multiple pathways is still unknown. We found that Ca²⁺-dependent activation proteolysis associated with alteration in RyR1 function and subsequent calcium SR-leak is linked to mitochondrial ROS production induced by MV in mice. Whether Ca²⁺ homeostasis impairment is a consequence or an upstream cellular pathway which leads to mitochondrial dysfunction and ROS production remains to be elucidated.

Moreover in this study, we did not explore the effect of mitochondrial ROS production which may decrease Ca²⁺ sensitivity and force the production of contractile protein (73–75). This mechanism has been previously involved in VIDD (76) and thus could account for the early muscular

weakness induced by MV observed in the absence of atrophy as described in our study. However, we do not believe it could be the case considering that decrease diaphragm fiber Ca^{2+} sensitivity is not involved in early pathophysiological events induced by MV in humans (77). Finally, we did not assay the Ca^{2+} leak from RyR1 (i.e, sparks) after 12 hours of MV since it was already observed after 6 hours of MV. In addition, we found similar markers of oxidative stress and structural modifications of diaphragm fibers RyR1 linked to Ca^{2+} leak after 6 hours of MV. Thus, we strongly expect that we would have found a similar increase in Ca^{2+} leak after 12 hours of MV.

Conclusion

In the mouse diaphragm, MV is associated with the rapid onset of oxidative modifications, occurring within 6 hours. We found that mitochondrial ROS production during this time induced altered RyR1 function, which results in a Ca^{2+} leak from the SR into the cytosol. We propose that this event can account for the early muscular weakness induced by MV through alterations of excitation-contraction coupling. We also propose that with a longer period of MV (12 hours) this impairment in Ca^{2+} homeostasis contributes to a secondary activation of the protease Ca^{2+} dependent system linked to disassembly of actomyosin complexes and atrophy. The results showing that treatment with SS31, a mitochondria-targeted antioxidant, prevented almost all of these changes, emphasize the central role of this organelle in mediating Ca^{2+} homeostasis impairment induced by MV.

References

1. Levine S, Nguyen T, Taylor N, Friscia ME, Budak MT, Rothenberg P, et al. Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N Engl J Med*. 2008 Mar 27;358(13):1327–35.
2. Vassilakopoulos T, Petrof BJ. Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Feb 1;169(3):336–41.
3. Schultz MJ. Weaning from mechanical ventilation: stay poised between load and strength. *Anesthesiology*. 2010 Aug;113(2):273–5.
4. Zergeroglu MA, McKenzie MJ, Shanely RA, Van Gammeren D, DeRuisseau KC, Powers SK. Mechanical ventilation-induced oxidative stress in the diaphragm. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2003 Sep;95(3):1116–24.
5. Shanely RA, Zergeroglu MA, Lennon SL, Sugiura T, Yimlamai T, Enns D, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Nov 15;166(10):1369–74.
6. Powers SK, Hudson MB, Nelson WB, Talbert EE, Min K, Szeto HH, et al. Mitochondria-targeted antioxidants protect against mechanical ventilation-induced diaphragm weakness. *Crit Care Med*. 2011 Jul;39(7):1749–59.
7. Picard M, Azuelos I, Jung B, Giordano C, Matecki S, Hussain S, et al. Mechanical ventilation triggers abnormal mitochondrial dynamics and morphology in the diaphragm. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2015 May 1;118(9):1161–71.
8. Kavazis AN, Talbert EE, Smuder AJ, Hudson MB, Nelson WB, Powers SK. Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free Radic Biol Med*. 2009 Mar 15;46(6):842–50.
9. McClung JM, Van Gammeren D, Whidden MA, Falk DJ, Kavazis AN, Hudson MB, et al. Apocynin attenuates diaphragm oxidative stress and protease activation during prolonged mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 2009 Apr;37(4):1373–9.
10. Whidden MA, McClung JM, Falk DJ, Hudson MB, Smuder AJ, Nelson WB, et al. Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2009 Feb;106(2):385–94.
11. Mrozek S, Jung B, Petrof BJ, Pauly M, Roberge S, Lacampagne A, et al. Rapid onset of specific diaphragm weakness in a healthy murine model of ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Anesthesiology*. 2012 Sep;117(3):560–7.
12. Brillantes AB, Ondrias K, Scott A, Kobrinisky E, Ondriasová E, Moschella MC, et al. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*. 1994 May 20;77(4):513–23.
13. Reiken S, Lacampagne A, Zhou H, Kherani A, Lehnart SE, Ward C, et al. PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J Cell Biol*. 2003 Mar 17;160(6):919–28.

14. Ward CW, Reiken S, Marks AR, Marty I, Vassort G, Lacampagne A. Defects in ryanodine receptor calcium release in skeletal muscle from post-myocardial infarct rats. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2003 Aug;17(11):1517–9.
15. Andersson DC, Betzenhauser MJ, Reiken S, Meli AC, Umanskaya A, Xie W, et al. Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab.* 2011 Aug 3;14(2):196–207.
16. Bellinger AM, Reiken S, Dura M, Murphy PW, Deng S-X, Landry DW, et al. Remodeling of ryanodine receptor complex causes “leaky” channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 12;105(6):2198–202.
17. Bellinger AM, Reiken S, Carlson C, Mongillo M, Liu X, Rothman L, et al. Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med.* 2009 Mar;15(3):325–30.
18. Yang L, Luo J, Bourdon J, Lin M-C, Gottfried SB, Petrof BJ. Controlled mechanical ventilation leads to remodeling of the rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Oct 15;166(8):1135–40.
19. Tang H, Lee M, Khuong A, Wright E, Shrager JB. Diaphragm muscle atrophy in the mouse after long-term mechanical ventilation. *Muscle Nerve.* 2013 Aug;48(2):272–8.
20. Jaber S, Petrof BJ, Jung B, Chanques G, Berthet J-P, Rabuel C, et al. Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Feb 1;183(3):364–71.
21. Shanely RA, Van Gammeren D, Deruisseau KC, Zergeroglu AM, McKenzie MJ, Yarasheski KE, et al. Mechanical ventilation depresses protein synthesis in the rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Nov 1;170(9):994–9.
22. McClung JM, Whidden MA, Kavazis AN, Falk DJ, Deruisseau KC, Powers SK. Redox regulation of diaphragm proteolysis during mechanical ventilation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008 May;294(5):R1608–17.
23. Zhu E, Sassoon CSH, Nelson R, Pham HT, Zhu L, Baker MJ, et al. Early effects of mechanical ventilation on isotonic contractile properties and MAF-box gene expression in the diaphragm. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* 2005 Aug;99(2):747–56.
24. Maes K, Testelmans D, Powers S, Decramer M, Gayan-Ramirez G. Leupeptin inhibits ventilator-induced diaphragm dysfunction in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Jun 1;175(11):1134–8.
25. Sassoon CSH, Caiozzo VJ, Manka A, Sieck GC. Altered diaphragm contractile properties with controlled mechanical ventilation. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* 2002 Jun;92(6):2585–95.
26. Radell P, Edström L, Stibler H, Eriksson LI, Ansved T. Changes in diaphragm structure following prolonged mechanical ventilation in piglets. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2004 Apr;48(4):430–7.
27. Azuelos I, Jung B, Picard M, Liang F, Li T, Lemaire C, et al. Relationship between Autophagy and Ventilator-induced Diaphragmatic Dysfunction. *Anesthesiology.* 2015 Jun;122(6):1349–61.
28. Hussain SNA, Mofarrahi M, Sigala I, Kim HC, Vassilakopoulos T, Maltais F, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragm disuse in humans triggers autophagy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Dec 1;182(11):1377–86.

29. DeRuisseau KC, Shanely RA, Akunuri N, Hamilton MT, Van Gammeren D, Zergeroglu AM, et al. Diaphragm unloading via controlled mechanical ventilation alters the gene expression profile. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Nov 15;172(10):1267–75.
30. McClung JM, Kavazis AN, DeRuisseau KC, Falk DJ, Deering MA, Lee Y, et al. Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain during mechanical ventilation-induced atrophy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Jan 15;175(2):150–9.
31. Wang null. Calpain and caspase: can you tell the difference?, by kevin K.W. Wang Vol. 23, pp. 20-26. *Trends Neurosci.* 2000 Feb;23(2):59.
32. Douillard A, Galbes O, Rossano B, Vernus B, Bonniou A, Candau R, et al. Time course in calpain activity and autolysis in slow and fast skeletal muscle during clenbuterol treatment. *Can J Physiol Pharmacol.* 2011 Feb;89(2):117–25.
33. Lacampagne A, Klein MG, Schneider MF. Modulation of the frequency of spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release events (Ca²⁺ sparks) by myoplasmic [Mg²⁺] in frog skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 1998 Feb;111(2):207–24.
34. Cheng H, Song LS, Shirokova N, González A, Lakatta EG, Ríos E, et al. Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: theory and studies with an automatic detection method. *Biophys J.* 1999 Feb;76(2):606–17.
35. Klein MG, Lacampagne A, Schneider MF. Voltage dependence of the pattern and frequency of discrete Ca²⁺ release events after brief repriming in frog skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 30;94(20):11061–6.
36. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Oct;287(4):C834–43.
37. McClung JM, Kavazis AN, Whidden MA, DeRuisseau KC, Falk DJ, Criswell DS, et al. Antioxidant administration attenuates mechanical ventilation-induced rat diaphragm muscle atrophy independent of protein kinase B (PKB Akt) signalling. *J Physiol.* 2007 Nov 15;585(Pt 1):203–15.
38. Picard M, Jung B, Liang F, Azuelos I, Hussain S, Goldberg P, et al. Mitochondrial dysfunction and lipid accumulation in the human diaphragm during mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Dec 1;186(11):1140–9.
39. Van Gammeren D, Falk DJ, Deering MA, DeRuisseau KC, Powers SK. Diaphragmatic nitric oxide synthase is not induced during mechanical ventilation. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2007 Jan;102(1):157–62.
40. Chen M, Won D-J, Krajewski S, Gottlieb RA. Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J Biol Chem.* 2002 Aug 9;277(32):29181–6.
41. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):731–801.
42. Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, Comini L, Raddino R, Knight RA, et al. Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 2002 Apr 5;90(6):745–8.
43. Betters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, DeRuisseau KC, et al. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Dec 1;170(11):1179–84.

44. McClung JM, Kavazis AN, Whidden MA, DeRuisseau KC, Falk DJ, Criswell DS, et al. Antioxidant administration attenuates mechanical ventilation-induced rat diaphragm muscle atrophy independent of protein kinase B (PKB Akt) signalling. *J Physiol*. 2007 Nov 15;585(Pt 1):203–15.
45. Agten A, Maes K, Smuder A, Powers SK, Decramer M, Gayan-Ramirez G. N-Acetylcysteine protects the rat diaphragm from the decreased contractility associated with controlled mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 2011 Apr;39(4):777–82.
46. Whidden MA, Smuder AJ, Wu M, Hudson MB, Nelson WB, Powers SK. Oxidative stress is required for mechanical ventilation-induced protease activation in the diaphragm. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2010 May;108(5):1376–82.
47. Yaniv Y, Sivan R, Landesberg A. Analysis of hystereses in force length and force calcium relations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Jan;288(1):H389–99.
48. O'Reilly FM, Robert M, Jona I, Szegedi C, Albrieux M, Geib S, et al. FKBP12 modulation of the binding of the skeletal ryanodine receptor onto the II-III loop of the dihydropyridine receptor. *Biophys J*. 2002 Jan;82(1 Pt 1):145–55.
49. Marx SO, Ondrias K, Marks AR. Coupled gating between individual skeletal muscle Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors). *Science*. 1998 Aug 7;281(5378):818–21.
50. Avila G, Lee EH, Perez CF, Allen PD, Dirksen RT. FKBP12 binding to RyR1 modulates excitation-contraction coupling in mouse skeletal myotubes. *J Biol Chem*. 2003 Jun 20;278(25):22600–8.
51. Brennan JP, Bardswell SC, Burgoyne JR, Fuller W, Schröder E, Wait R, et al. Oxidant-induced activation of type I protein kinase A is mediated by RI subunit interprotein disulfide bond formation. *J Biol Chem*. 2006 Aug 4;281(31):21827–36.
52. Turan B, Vassort G. Ryanodine receptor: a new therapeutic target to control diabetic cardiomyopathy. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Oct 1;15(7):1847–61.
53. Fauconnier J, Thireau J, Reiken S, Cassan C, Richard S, Matecki S, et al. Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 26;107(4):1559–64.
54. Levine S, Budak MT, Dierov J, Singhal S. Inactivity-induced diaphragm dysfunction and mitochondria-targeted antioxidants: new concepts in critical care medicine. *Crit Care Med*. 2011 Jul;39(7):1844–5.
55. Jaber S, Jung B, Matecki S, Petrof BJ. Clinical review: ventilator-induced diaphragmatic dysfunction--human studies confirm animal model findings! *Crit Care Lond Engl*. 2011;15(2):206.
56. Macpherson PC, Schork MA, Faulkner JA. Contraction-induced injury to single fiber segments from fast and slow muscles of rats by single stretches. *Am J Physiol*. 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1438–46.
57. Vijayan K, Thompson JL, Norenberg KM, Fitts RH, Riley DA. Fiber-type susceptibility to eccentric contraction-induced damage of hindlimb-unloaded rat AL muscles. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2001 Mar;90(3):770–6.
58. Lynch GS, Faulkner JA, Brooks SV. Force deficits and breakage rates after single lengthening contractions of single fast fibers from unconditioned and conditioned muscles of young and old rats. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Jul;295(1):C249–56.

59. DeRuisseau KC, Kavazis AN, Deering MA, Falk DJ, Van Gammeren D, Yimlamai T, et al. Mechanical ventilation induces alterations of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2005 Apr;98(4):1314–21.
60. Tang H, Lee M, Budak MT, Pietras N, Hittinger S, Vu M, et al. Intrinsic apoptosis in mechanically ventilated human diaphragm: linkage to a novel Fos/FoxO1/Stat3-Bim axis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2011 Sep;25(9):2921–36.
61. Li Y-P, Chen Y, Li AS, Reid MB. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Oct;285(4):C806–12.
62. Stephanou A, Scarabelli TM, Townsend PA, Bell R, Yellon D, Knight RA, et al. The carboxyl-terminal activation domain of the STAT-1 transcription factor enhances ischemia/reperfusion-induced apoptosis in cardiac myocytes. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2002 Nov;16(13):1841–3.
63. Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA. Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem*. 1998 Feb;179(1-2):135–45.
64. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, et al. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*. 1999 Apr 9;284(5412):339–43.
65. Jayaraman T, Marks AR. Calcineurin is downstream of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the apoptotic and cell growth pathways. *J Biol Chem*. 2000 Mar 3;275(9):6417–20.
66. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2008;445:77–88.
67. McClung JM, Judge AR, Powers SK, Yan Z. p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010 Mar;298(3):C542–9.
68. Futier E, Constantin J-M, Combaret L, Mosoni L, Roszyk L, Sapin V, et al. Pressure support ventilation attenuates ventilator-induced protein modifications in the diaphragm. *Crit Care Lond Engl*. 2008;12(5):R116.
69. Shanely RA, Coombes JS, Zergeroglu AM, Webb AI, Powers SK. Short-duration mechanical ventilation enhances diaphragmatic fatigue resistance but impairs force production. *Chest*. 2003 Jan;123(1):195–201.
70. Levine S, Biswas C, Dierov J, Barsotti R, Shrager JB, Nguyen T, et al. Increased proteolysis, myosin depletion, and atrophic AKT-FOXO signaling in human diaphragm disuse. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Feb 15;183(4):483–90.
71. Bernard N, Matecki S, Py G, Lopez S, Mercier J, Capdevila X. Effects of prolonged mechanical ventilation on respiratory muscle ultrastructure and mitochondrial respiration in rabbits. *Intensive Care Med*. 2003 Jan;29(1):111–8.
72. Tang H, Lee M, Budak MT, Pietras N, Hittinger S, Vu M, et al. Intrinsic apoptosis in mechanically ventilated human diaphragm: linkage to a novel Fos/FoxO1/Stat3-Bim axis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2011 Sep;25(9):2921–36.
73. Andrade FH, Reid MB, Allen DG, Westerblad H. Effect of nitric oxide on single skeletal muscle fibres from the mouse. *J Physiol*. 1998 Jun 1;509 (Pt 2):577–86.

74. Andrade FH, Reid MB, Westerblad H. Contractile response of skeletal muscle to low peroxide concentrations: myofibrillar calcium sensitivity as a likely target for redox-modulation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2001 Feb;15(2):309–11.
75. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008 Oct;88(4):1243–76.
76. Ochala J, Radell PJ, Eriksson LI, Larsson L. EMD 57033 partially reverses ventilator-induced diaphragm muscle fibre calcium desensitisation. *Pflüg Arch Eur J Physiol.* 2010 Feb;459(3):475–83.
77. Hooijman PE, Paul MA, Stienen GJM, Beishuizen A, Van Hees HWH, Singhal S, et al. Unaffected contractility of diaphragm muscle fibers in humans on mechanical ventilation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014 Sep 15;307(6):L460–70.

Figures and Legends

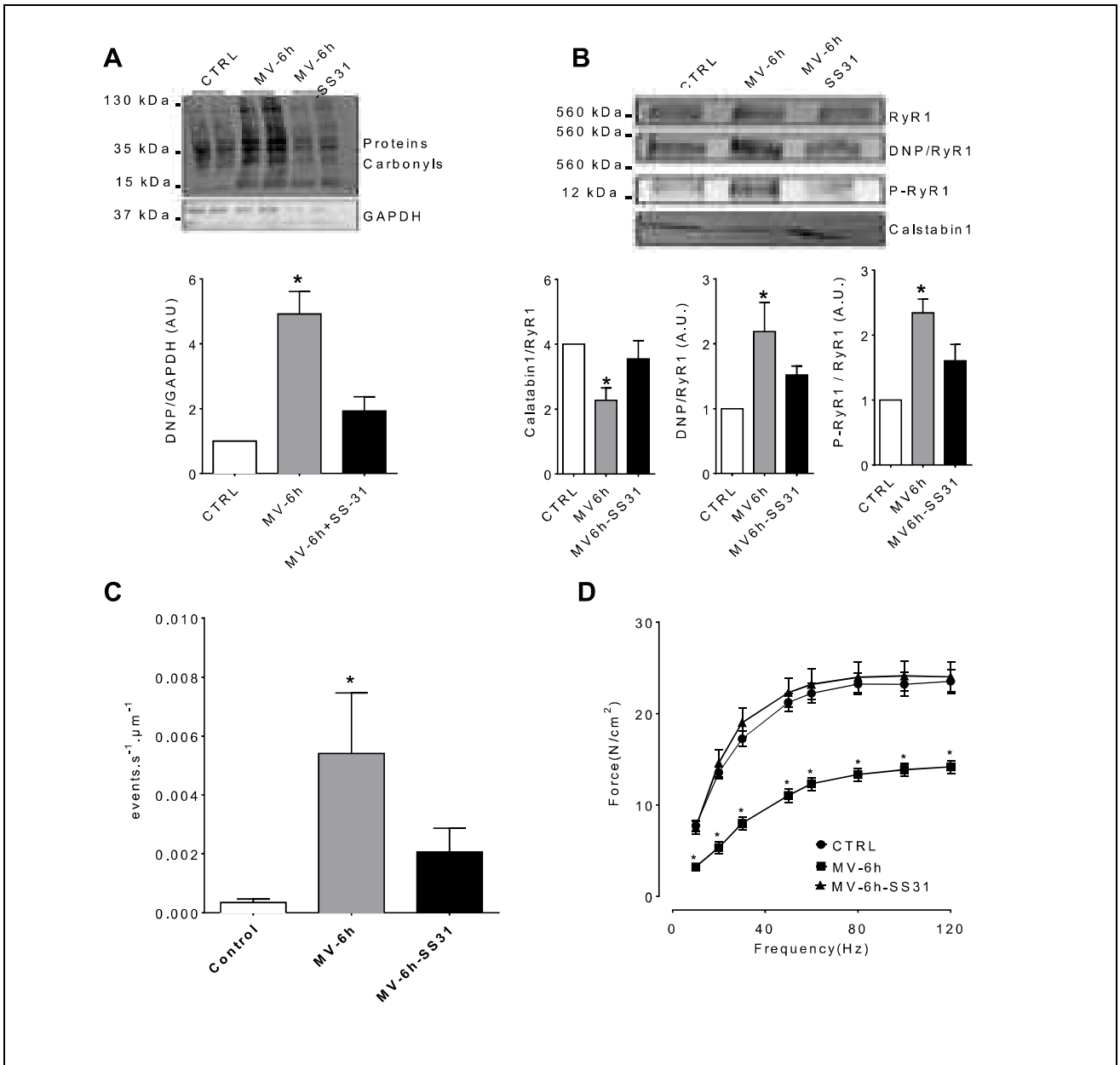


Figure 1

SS31 prevents RyR1 post-translational modifications, spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leaks and contractile dysfunction in mice diaphragm mechanically ventilated for 6 hours. **A**) Levels of protein carbonyls in the diaphragm of the three experimental groups (control CTRL, MV-6h, and MV6h-SS31). **B**) Representative immunoblots (each blot corresponds to adjacent wells of the same gel) of immunoprecipitated RyR1 and bar graphs showing the quantification of immunoblots relative to total immunoprecipitated RyR1 in murine diaphragm samples collected from control, MV-6h, and MV-6h-SS31 groups. DNP, 2, 4-dinitrophenylhydrazone; P-RyR1, phosphorylated RyR1 (at Serine 2844), FKBP12. **C**) Spontaneous SR Ca²⁺ release events were recorded in fluo-4-loaded permeabilized diaphragm fibers by laser scanning confocal microscopy. **D**) Averaged force – frequency relationships recorded in Diaphragm control (n=8), MV (n=10) and MV-6h treated with SS31 (n=8) groups. Data are expressed as mean ± SEM, * p<0.05.

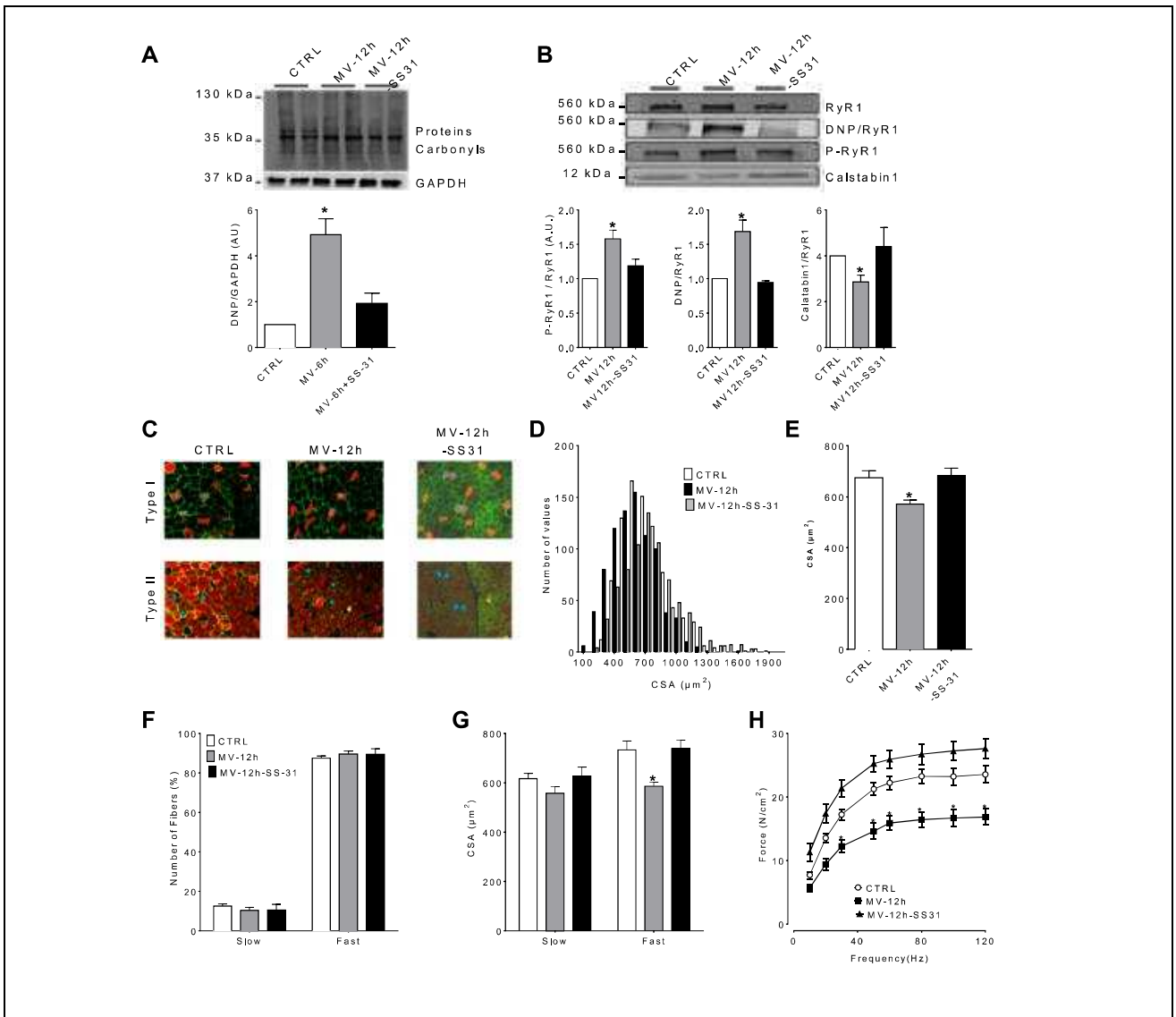


Figure 2

SS31 prevents protein oxidation, RyR1 post-translational modification, fibers atrophy, and decline in force production. **A)** Levels of protein carbonyls in the diaphragm of the three experimental groups **B)** Representative immunoblots (each blot corresponds to adjacent wells of the same gel) of immunoprecipitated RyR1 and bar graphs showing the quantification of immunoblots relative to total immunoprecipitated RyR1 of murine diaphragm samples collected from control, MV-12h, and MV-12h-SS31 groups. P-RyR1, phosphorylated RyR1 (at serine 2844), DNP, 2, 4-dinitrophenylhydrazine, Calstabin1. **C)** Representative image of cryosections of mouse diaphragm showing fast and slow muscle fibers by immunostaining with antibodies against fast (top panel, red) and slow (lower panel, red) myosin. **D)** Distribution histogram of muscle fiber cross-sectional area (CSA) from a sample of 150 fibers per control MV-12h and MV-12h-SS31 diaphragm sample. Mean CSA was measured by ImageJ. **D)** Percentage of slow and fast fibers in mouse diaphragm. **E)** Mean CSA in slow and fast fibers. **F).** Muscle membrane was counterstained with dystrophin antibodies. White squares indicate fast fibers, whereas the asterisks show the slow fibers in consecutive sections. **G)** Averaged force – frequency relationships recorded in diaphragm of control, MV-12h and MV-12h treated with SS31 groups. **H)** Loss of force production normalized to the initial value recorded in control, after MV12h and after MV-12h with SS31 treatment. *P < 0.05.

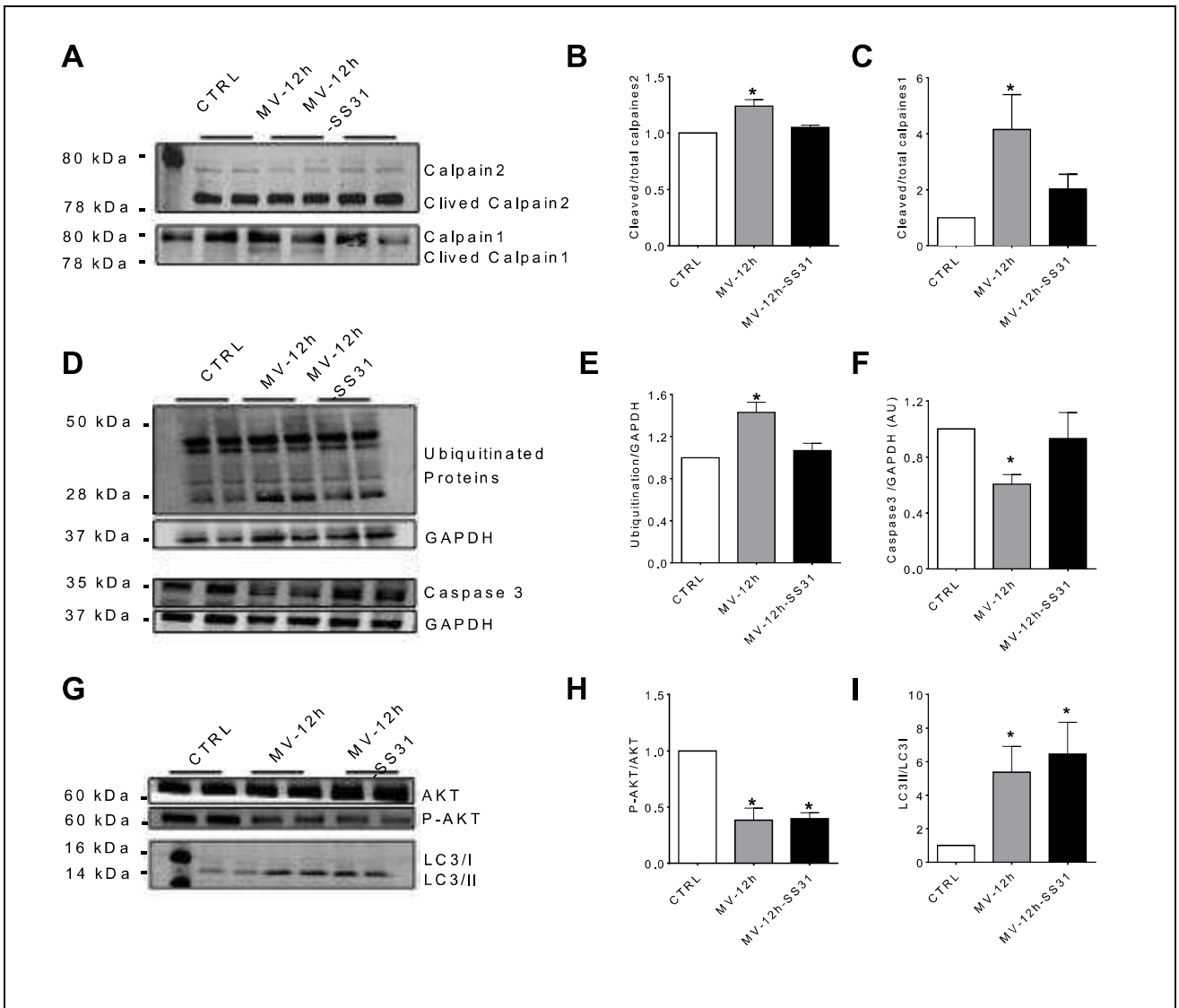


Figure 3

Atrophy markers in control (CTRL) mechanical ventilated mice during 12 hours with (MV-12h+SS-31) and without (MV-12h) SS31. **A)** The active form of calpain-1 in diaphragm muscle at the completion of 12 hours of MV. **B)** The active form of calpain-2 in diaphragm muscle at the completion of 12 hours of MV. **C)** The non-cleaved band of caspase-3 in diaphragm muscle at the completion of 12 hours of MV. **D)** The total ubiquitinated proteins in diaphragm muscle at the completion of 12 hours of MV. **E)** The cleaved and active band of LC3/2 in diaphragm muscle at the completion of 12 hours of MV. **F)** The phosphorylated band of AKT normalized to the non-phosphorylated band in diaphragm muscle at the completion of 12 hours of MV. The images at the right of the histograms are representative Western blots from the three experimental groups. Values are mean +/- SEM.*Indicates a statistically significant difference ($p < .05$) from control.

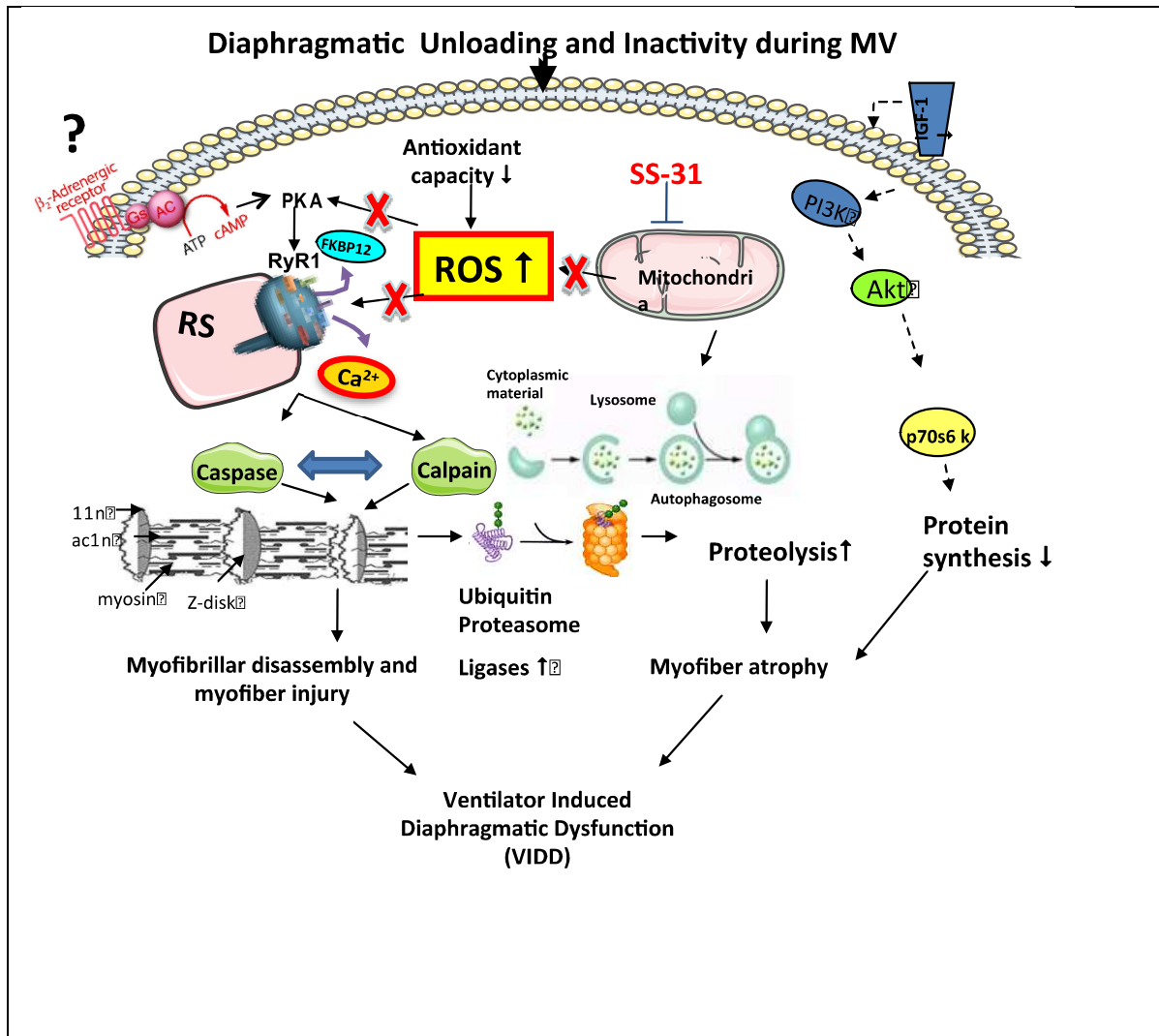


Figure 4

Several of the mechanistic pathways implicated in the development of VIDD are illustrated. Protein synthesis pathways are downregulated (indicated by dashed lines). In addition, ROS generated from several possible sources, in particular from mitochondria can oxidize ryanodine receptor leading to FKBP12 depletion induced calcium leak and can activate downstream proteolytic pathways involved in myofiber injury and atrophy, including the calpain and caspase systems; these have the potential to be mutually reinforcing and to drive further ROS production. Autophagy was activated independently of ROS. SS31 scavenge radicals species in the inner part of mitochondria and protect posttranslational modifications of RyR1 inducing calcium leak. IGF-1, insulin-like growth factor-1; MV, mechanical ventilation; PI3K, phosphoinositide-3 kinase; ROS, reactive oxygen species.

Etudes 3: Rôle de la dynamique mitochondriale dans la VIDD

Objectif de l'étude

Comme nous l'avons exposé dans la deuxième partie de la revue de littérature, la ventilation mécanique induit au niveau du diaphragme une augmentation de la production de ROS, à la base de lésions musculaires, d'atrophie, de dysfonction contractile qui caractérisent la VIDD. Mes deux premiers travaux montrent l'implication des ROS en provenance de la mitochondrie dans les phénomènes initiateurs de cette VIDD, centrés sur la perturbation précoce de l'homéostasie calcique.

Le muscle squelettique contient deux populations de mitochondrie : inter-myofibrillaire (IMF) et subsarcolémales (SS). Les mitochondries IMF sont des organelles branchées, réticulés qui entourent la myofibrille alors que les mitochondries SS possèdent une forme sphérique et localisées autour des noyaux ou en position subsarcolémales (Bakeeva et al., 1978; Picard et al., 2013a). Ces deux populations se remodelent en continu via des phénomènes de fission/fusion et interagissent entre elles. Ces phénomènes sont regroupés sous le nom de dynamique mitochondriale (Chan, 2012; van der Blik et al., 2013).

Ce remodelage mitochondriale est sous le contrôle de protéines qu'on appelle «shaping proteins» (Dimmer and Scorrano, 2006; Youle and Karbowski, 2005).

Ainsi, comme présenté au niveau de la revue de la littérature, la fusion est régulée par l'expression à la membrane mitochondriale de L-OPA1 (optic atrophy 1) et des mitofusines (Mfn) 1 et 2 alors que la fission par l'expression de Drp1 et S-OPA1.

Récemment Picard et ses collaborateurs (Picard et al., 2015a) ont montré chez la souris, après 6 heures de ventilation mécanique, au niveau du diaphragme une augmentation de l'activité de la protéine Drp1, associée à la présence de phénomènes de fission des mitochondries IMF. C'est

un phénomène que l'on peut considérer comme adaptatif suite à une nécessité de la mitochondrie à réduire drastiquement la production d'énergie suite à la mise au repos brutale de la fibre musculaire diaphragmatique. En effet, la fragmentation mitochondriale induite par la stimulation de Drp1 induit une diminution de la production de l'ATP (Jheng et al. 2012). Mais parallèlement cette fragmentation semble induire une dysfonction mitochondriale avec altération du potentiel de la membrane mitochondriale et surproduction de ROS (Lee et al. 2004; Ong et al. 2010; Yu et al. 2008).

Sur culture cellulaire, l'inhibition de Drp1, du fait de ses liens étroits à la membrane avec des protéines pro-apoptotique de type Bcl-2 inhibe le processus apoptotique (Lee et al., 2004; Ong et al., 2010; Wasilewski and Scorrano, 2009). De même la surexpression des protéines de fission mitochondriale est également liée à l'activation de l'AMPK qui stimule les voies de l'atrophie par l'intermédiaire d'une activation de Fox3 et de la protéolyse (Romanello et al., 2010).

L'ensemble de ces phénomènes physiopathologiques a été impliqué dans la VIDD. Ainsi nous avons émis l'hypothèse, que le déclenchement de la fission mitochondriale, du fait d'une rupture d'homéostasie énergétique initiée par la mise au repos soudaine et complète du diaphragme par la ventilation mécanique, initiait les mécanismes physiopathologiques précoces impliqués dans la VIDD, du fait d'une dysfonction mitochondriale associée à une surproduction de ROS.

Pour valider cette hypothèse, nous nous proposons d'évaluer l'efficacité d'un traitement pharmacologique bloquant la liaison entre Drp1 et son récepteur mitochondrial dans la prévention de la VIDD sur notre modèle murin de ventilation mécanique.

En effet, comme décrit dans notre revue de la littérature, Drp-1 (Dynamin related protein-1) est une «shaping proteins », inducteur de fission suite à sa translocation depuis le cytosol vers la

membrane mitochondriale externe ou il se lie à un de ses récepteurs identifié : Fis1 (Labbé et al., 2014). C'est à cet endroit où il s'oligomérisse dans des foyers des futures sites de division en formant une structure d'anneau (Friedman et al., 2011).

Ainsi nous nous attendons à observer que l'inhibition de l'interaction entre Drp1 et son récepteur mitochondrial Fis1 au cours de la ventilation mécanique, puisse prévenir la fragmentation des mitochondries du fait de phénomènes de fissions et ainsi limiter la dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation mécanique.

Nous nous attendons également à démontrer que l'inhibition de la fission mitochondriale au cours de la ventilation mécanique chez la souris, puisse prévenir le stress oxydant d'origine mitochondriale ainsi que l'altération précoce de l'homéostasie calcique observée au cours de mes deux précédentes études.

Protocol

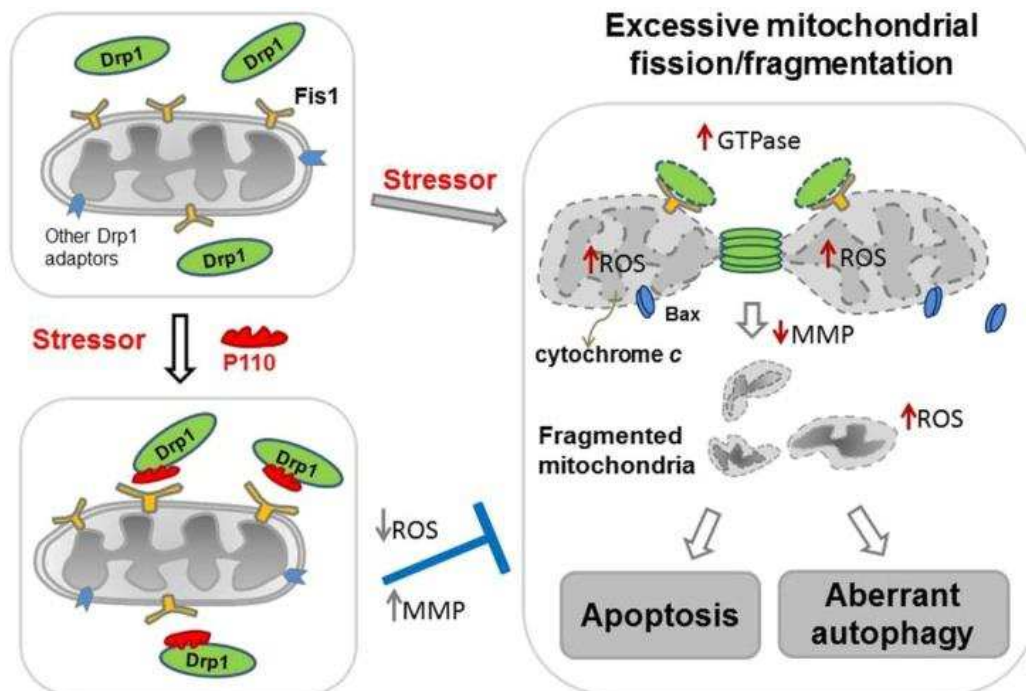
Les expérimentations sont réalisées sur des souris de la lignée C57/BL6 âgées de 10 semaines et qui pèsent entre 25-30g. L'étude est en accord avec la réglementation de l'expérimentation animale établie par le comité de protection animale de Montpellier.

Modèle murin de VIDD :

18 souris wild type ont été réparties en 3 groupes dont 2 ont été ventilés mécaniquement pendant 6 heures. Le 3^{ème} groupe non ventilé servait de contrôle (Voir méthodologie de la ventilation mécanique).

Traitement pharmacologique utilisé :

Le P110 est un peptide inhibiteur sélectif qui agit sur l'activité enzymatique de Drp1 pour bloquer l'interaction avec son récepteur mitochondrial fis1. Le peptide n'a pas d'effet sur l'interaction du Drp1 avec d'autres facteurs de fission mitochondriale. Voir figure ci-dessous.



Mécanisme d'action de P110 d'après Xin Qi et al. J Cell Sci 2013

Nous avons administré P110 à 3 mg/Kg par injection intrapéritonéal (IP). La molécule était solubilisée dans du Ringer lactate et délivrée 30 minutes avant le début de l'intubation. En se basant sur les études antérieures, cette dose avait montré des effets bénéfiques sur la morphologie et la fonction mitochondriale chez la souris avec neuropathie (Huntington's disease) et le rat dans le cadre d'un protocole d'ischémie reperfusion (Guo et al., 2013, 2014).

Mesure et évaluation

Sur le diaphragme des souris de tous les groupes il a été étudié la fonction contractile (méthodologie 2), la biochimie du RyR1 (méthodologie 3), les sparks calciques (méthodologie 3), Le remodelage du réseau mitochondrial (2) et les voies signalétiques impliquées dans la fusion/fission mitochondriale, la protéolyse et le stress oxydant (méthodologie 4).

3.3. Résultats

Le blocage pharmacologique de Drp1 avec son récepteur membranaire mitochondrial diminue les phénomènes de fission induite par la ventilation mécanique.

L'effet de la ventilation mécanique associé ou non à un traitement bloquant l'action de Drp1 sur la morphologie mitochondriale a été évalué au niveau des deux types de population de mitochondries.

Morphologie des mitochondries IMF

Comme le montre la figure 1C, les mitochondries IMF dans le diaphragme des souris contrôles sont relativement allongées avec une structure ondulée et tortueuse. Ce réseau mitochondrial s'étend le long des myofibrilles. Le niveau d'extension de ce réseau peut s'évaluer en microscopie électronique par le pourcentage de mitochondries qui enjambent une strie Z (Cf figure 1D). Ce réseau peut également s'étendre grâce à la mise en place de branchements entre les mitochondries, que l'on peut identifier et quantifier en microscopie électronique par des zones d'interactions plus denses (Figure 1D). Les résultats sont exprimés en pourcentage de mitochondries qui présentent ce genre d'interaction denses. De façon similaires à l'étude de Picard et coll (Picard et al., 2015c), nous avons observé que 6 heures de ventilation induisaient une réduction significative de leur périmètre (figure 1B), associée à une diminution du pourcentage de mitochondries qui enjambent une strie Z ou qui présentent une zone de contact électron dense (Figure 1D, 1 E). Parmi ces trois paramètres, seul le pourcentage de mitochondries qui présentent une interaction électron dense est normalisé par le traitement par un inhibiteur de la fission P110. Ces phénomènes sont illustrés par les figures 1 C et 1F.

Afin de mieux quantifier cette réduction de périmètre mitochondrial, la figure 1 B montre l'analyse de la fréquence de distribution de ce paramètre, pour les 3 groupes (contrôle, ventilé 6 heures, ventilés 6 heures et traité). Nous remarquons, en représentant graphiquement la valeur

médiane du périmètre des mitochondries dans le groupe contrôle, un pourcentage plus élevé de mitochondries présentant un petit diamètre, dans le groupe ventilé.

Ainsi ces données indiquent que la MV induit au niveau du diaphragme de souris, un remodelage du réseau mitochondriale IMF associé à une augmentation de la fréquence des mitochondries les plus petites, et une diminution de l'extension et de la complexité du réseau mitochondrial. Ces phénomènes sont compatibles avec la présence d'une fission mitochondriale, induite par la ventilation mécanique. Enfin, le traitement par P110, limitant l'interaction entre Drp1 et son récepteur au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, semblent améliorer, chez la souris ventilée mécaniquement pendant 6 heures, les contacts entre les mitochondries sans effets sur leurs morphologies.

Morphologie des mitochondries SS

Les mêmes analyses ont été faites sur les mitochondries SS. Comme le montre la figure 1C, dans des conditions normales les mitochondries SS au niveau du diaphragme de nos souris contrôles, sont sphériques et leur morphologie est moins complexes par rapport aux mitochondries IMF. De même elles sont également plus petites comme le montre le déplacement vers la gauche de la médiane sur l'analyse de la fréquence de distribution du périmètre (figure 1A).

Nous avons observé que 6 heures de ventilation induisaient une augmentation significative de leur périmètre (figure 1A), associée à une diminution du pourcentage de mitochondries qui présentent une zone de contact électron dense (Figure 1D, 1E). Ces deux paramètres sont normalisés suite à un traitement par P110 (Figure 1A et 1E). Ces phénomènes sont illustrés par les figures 1C et 1F.

La figure 1A montre l'analyse de la fréquence de distribution du périmètre, pour les 3 groupes (contrôle, ventilé 6 heures, ventilé 6 heures et traité). Nous remarquons, en représentant

graphiquement la valeur médiane dans le groupe contrôle, un pourcentage plus élevé de mitochondries présentant un gros diamètre dans le groupe ventilé, qui semble être corrigé par le traitement par P110.

Ainsi la VM entraîne des changements morphologiques différents entre les mitochondries SS et les mitochondries IMF.

Il existe toutefois un pattern commun aux deux types de mitochondries, qui est la présence d'une diminution du nombre de contacts entre les mitochondries induits par 6 heures de ventilation mécanique. Il est difficile au stade actuel de ce troisième travail, d'interpréter la présence d'un gonflement des mitochondries SS suite à la ventilation mécanique. Ce résultat a également été retrouvé par une étude récente utilisant le même modèle (Picard et al., 2015c).

Protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale

Nous avons évalué par Western blot l'expression des «shaping proteins» impliqués dans le changement morphologique et d'interaction que nous avons observés sur les mitochondries.

Nous avons observé une augmentation de la quantité totale de Drp1 induite par 6 heures de MV au niveau du diaphragme (Fig 2A).

Parallèlement, nous avons évalué le clivage protéolytique d'OPA1, protéine centrale dans la régulation de la dynamique mitochondriale et décrite dans la deuxième partie de cette revue de littérature. Nous avons observé, comme le montre la figure 2B une augmentation du clivage d'OPA1 (conversion de L-OPA1 vers S-OPA1) induite par la ventilation mécanique.

Ces résultats, similaires à ceux de Picard et coll (Picard et al., 2015c) sont compatibles avec une stimulation de la fission mitochondriales induite par la ventilation.

Parallèlement, nous avons évalué l'effet de la ventilation mécanique sur l'expression de la Mfn2, impliquée dans les phénomènes de fusion mitochondriales, sans observer aucune modification (Fig 3).

Enfin, nous montrons que le traitement par P110 prévient la surexpression de Drp1 induite par la ventilation mécanique, sans effet sur l'expression de S-OPA1 ni de Mfn2 (Figure 1A-C).

Modifications biochimiques du RyR1.

Ainsi nous confirmons, par une approche d'imagerie et de quantification protéique, les résultats antérieurs de Picard et coll (Picard et al., 2015c) qui a mis en évidence pour la première fois, la stimulation précoce des phénomènes de fission mitochondriale. Afin d'évaluer l'impact de ce remodelage mitochondrial induit par la ventilation mécanique, sur les phénomènes initiaux impliqués dans la VIDD que nous avons décrits dans les deux premiers travaux de ma thèse, nous avons quantifié l'effet d'un traitement par P110, sur les modifications post-traductionnelles du RyR1, chez des souris ventilées mécaniquement pendant 6 heures.

Les résultats sont encore très préliminaires et en cours de constitution. Le premier et seul résultat actuellement disponible sur cette partie de mon travail, concerne la phosphorylation du canal RyR1, que nous avons décrit comme augmenté suite à 6 heures de ventilation mécanique. La figure 1D montre qu'un traitement par P110 qui permet de limiter les phénomènes de fission mitochondriale, prévient la phosphorylation du RyR1 sur la Ser2844, induite par la ventilation mécanique.

Ainsi d'après ces premiers résultats, il semblerait que les phénomènes de fission mitochondriale induit précocement par la ventilation mécanique soient impliqués dans les modifications post-traductionnelles du RyR1 décrit dans mon premier travail de thèse. Ces résultats devront être confirmés par l'évaluation de l'oxydation du RyR1, le niveau de dissociation entre le canal RyR1 et sa protéine stabilisatrice calstabin1 ainsi que la quantité de fuite calcique à travers ce canal.

Fonctions contractile du diaphragme

Nous avons vu que la VIDD était associée à des phénomènes précoces de fission mitochondriale sans pour autant que le lien entre remodelage mitochondrial précoce et diminution de la force contractile soit clairement établi.

Ainsi, nous avons évalué l'efficacité d'un traitement par P110, limitant les phénomènes de fission mitochondriale sur la prévention de la VIDD. Nous avons pu observer qu'un traitement par P110 permet de restaurer la force contractile du diaphragme altérée par 6 heures de ventilation mécanique (Fig.4).

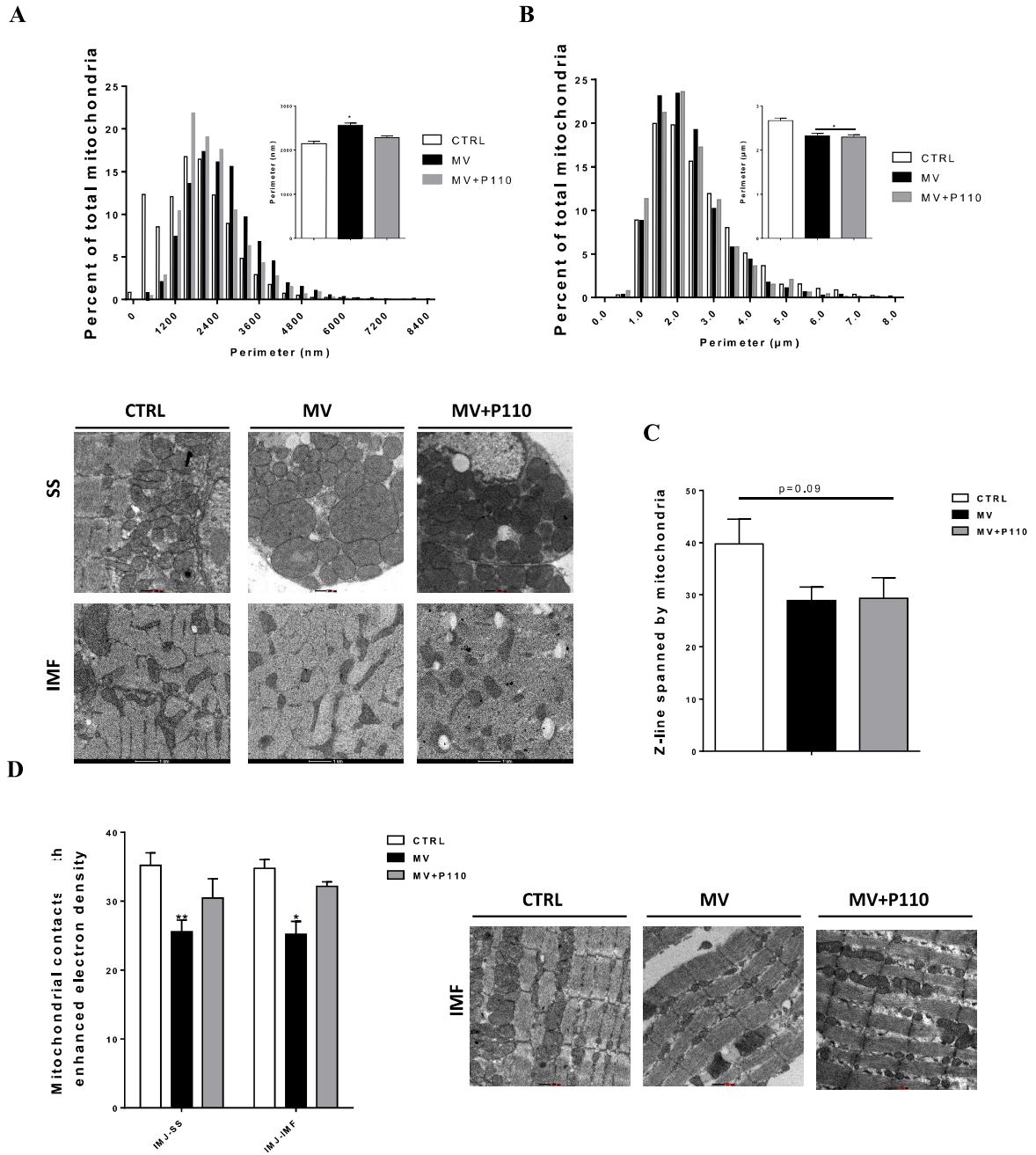


Figure 1: Effet de la ventilation mécanique sur la morphologie et les interactions mitochondriales.

A) Fréquence de distribution des mitochondries SS selon leurs périmètres dans le groupe contrôle comparé aux groupes ventilés avec et sans traitement (P110). B) Fréquence de distribution des mitochondries IMF selon leurs périmètres dans le groupe contrôle comparé aux groupes ventilés avec et sans traitement (P110). C) Proportion des mitochondries IMF qui enjambent les stries Z dans les 3 groupes expérimentales. D) Proportion des contacts mitochondriaux « électrons denses » subsarcolémmales et intramyofibrillaires dans les 3 groupes. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. * $P < 0.05$.

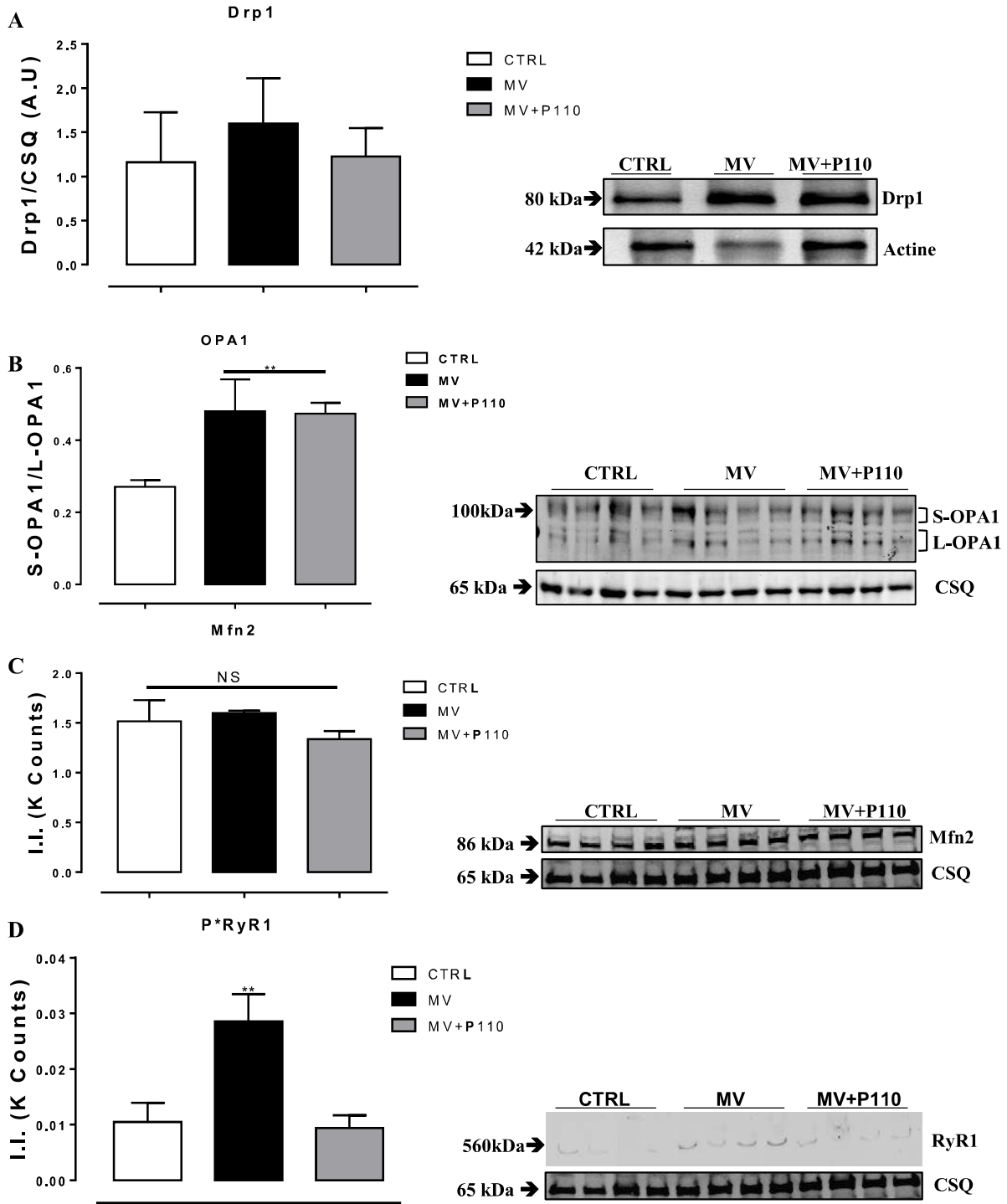


Figure 2: Effet de la ventilation mécanique sur les protéines de la fusion/fission mitochondriales.

A) Expression de Drp1 dans les 3 groupes expérimentaux, B) Clivage de la protéine OPA1 en forme longue (L-OPA1) et courte (S-OPA1) dans le groupe contrôle comparé aux groupes ventilés avec et sans traitement (P110). C) Expression de la mitofusine 2 dans le groupe contrôle comparé aux groupes ventilés avec et sans traitement (P110). D) Phosphorylation du récepteur à la ryanodine sur la Ser 2844 dans le groupe contrôle comparé aux groupes ventilés avec et sans traitement (P110). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. * $P < 0.05$.

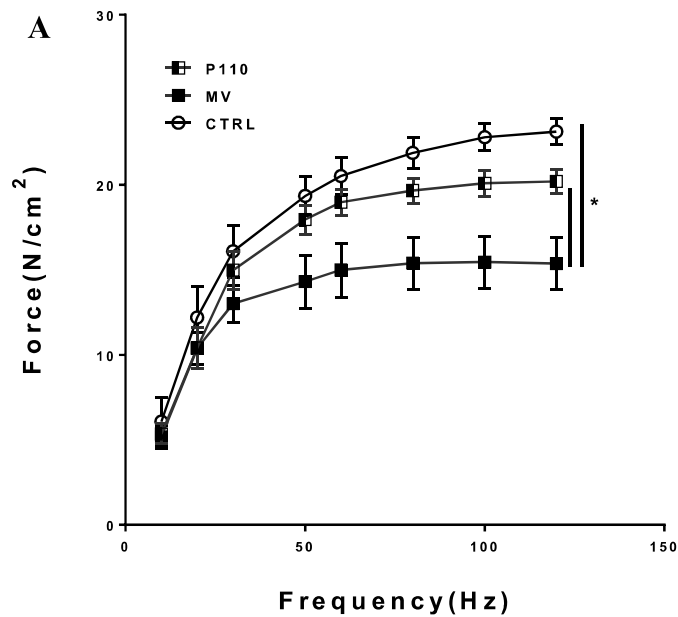


Figure 1: Effet de la ventilation mécanique sur la fonction contractile du diaphragme *ex-vivo*.

A) La production de force diaphragmatique à différentes fréquences de stimulation dans le groupe contrôle comparée aux groupes ventilés avec et sans traitement (P110). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. * P<0.05.

3.4. Discussion

Le résultat principal de cette étude encore préliminaire montre, chez la souris, que la VIDD implique de façon très précoce un remodelage du réseau mitochondrial avec la présence d'un phénomène de fission mitochondriale qui est accompagné par une diminution des interactions entre les mitochondries, témoin d'une diminution de la complexité du réseau mitochondrial.

Nous avons également observé après 6 heures de ventilation mécanique, que ces modifications sont associées à une réduction de calibre des mitochondries IMF ainsi qu'une diminution de leur extension le long des myofibrilles.

Dans cette étude nous avons utilisé une approche de microscopie électronique avec une approche biochimique pour mettre en évidence ces phénomènes de fission mitochondriale induite par la VIDD. Nous avons analysé séparément les deux populations de mitochondries dans le diaphragme IMF et SS qui sont connues par leurs différences de fonction et de forme (Adhihetty et al., 2005; Crescenzo et al., 2014; Krieger et al., 1980; Nielsen et al., 2010; Picard et al., 2013b). La maintenance d'un pool mitochondrial sain dépend largement de l'équilibre entre la fission et la fusion (Chan, 2012; van der Bliek et al., 2013).

La mise au repos brutale du diaphragme, induite par la ventilation mécanique va entraîner une rupture de l'homéostasie énergétique de la cellule, nécessitant une adaptation rapide de la mitochondrie afin de limiter sa production d'énergie. Ceci, par des mécanismes mal connus, va perturber cette balance fission/fusion, et engendrer une défaillance de la chaîne respiratoire (Chen et al., 2005; Jheng et al., 2012; Yu et al., 2008a) et une prédisposition aux phénomènes apoptotiques (Lee et al., 2004; Ong et al., 2010). Les mécanismes de cette perturbation d'équilibre sont complexes, et entraînent une activation de protéines effectrices qui sont impliqués dans le remodelage mitochondriale caractérisant les phénomènes de fission/fusion.

Parmi ces protéines, présentées dans la revue de la littérature, nous nous sommes intéressés à Drp1 et à l'isoforme courte d'OPA1 (S-OPA1) qui sont des protéines impliquées dans la fission mitochondriale ainsi que Mfn2 qui est une protéine impliquée dans la fusion.

L'augmentation concomitante de l'expression du Drp1 ainsi que de S-OPA1, sans modification de l'expression de Mfn2 induit par 6 heures de ventilation est en accord avec l'analyse en microscopie électronique qui met en évidence des phénomènes précoces de fission mitochondriale. Cette dernière est liée à une dysfonction mitochondriale, une résistance à l'insuline (Jheng et al., 2012) et une augmentation de la production de ROS mitochondriales ainsi qu'une augmentation de la probabilité d'ouverture du PTP (Picard et al., 2013a; Yu et al., 2008a).

Ces modifications de morphologie mitochondriale très précoces ont déjà été décrites pour la première fois par Picard et coll (Picard et al., 2015c), sans pour autant que le lien mécanistique soit établi avec la dysfonction contractile du diaphragme.

Dans le premier article de ma thèse, nous avons démontré l'implication précoce des troubles l'homéostasie calcique dans la VIDD. Dans l'article 2 nous avons mis en évidence que les modifications post-traductionnelles du RyR1 observées après 6 heures de ventilation sont médiées par une augmentation de la production de ROS mitochondriale. Dans ce dernier travail, encore en cours d'expérimentation, nous avons émis l'hypothèse que cette production de ROS, liée aux phénomènes de fission mitochondriale déclenchée par la mise au repos brutale du diaphragme, est à la base des troubles de l'homéostasie calcique précédemment observés.

En effet, les phénomènes de fusion/fission mitochondriale peuvent se produire au bout de quelques secondes à quelques minutes dans différents types de lignées cellulaires en culture et cette rapidité est aussi importante dans le muscle squelettique (Eisner et al., 2014; Liu et al., 2014). Ce phénomène est associé à la mise en décharge musculaire (Iqbal et al., 2013; Wagatsuma et al., 2011).

Ainsi pour confirmer cette hypothèse, nous avons évalué l'effet sur le diaphragme de souris ventilées d'un traitement par P110, inhibant l'activité d'une protéine impliquée dans la fission mitochondriales qui est Drp1.

Nous avons observé une amélioration de la force contractile du diaphragme ventilé et traité par P110. Cette amélioration est associée à une prévention de la phosphorylation du RyR1 sur la Ser2844 impliquée dans la VIDD. Ces résultats encore préliminaires doivent être complétés et confirmés. A l'heure actuelle il est encore trop tôt pour conclure.

Bien que le traitement par P110 prévienne l'augmentation de l'expression de Drp1, il n'a aucun effet sur l'expression de S-OPA1. Ainsi les mécanismes régulateurs de l'activité des protéines impliquées dans la fission mitochondriales (Drp1 et S-OPA1) ne semblent pas être liés, mais complémentaires. En effet, l'inhibition de la liaison entre Drp1 et son récepteur sur la membrane mitochondriale semble limiter de façon incomplète les phénomènes de fission induits par l'inactivité, avec une absence d'effet sur la progression de mitochondries de part et d'autre des stries Z et sur le diamètre des mitochondries intra-myofibrillaires.

Ainsi, la question qui a motivé notre étude était de comprendre comment l'altération de la dynamique mitochondriale induit une dysfonction contractile des myofilaments. Une réponse certaine n'est pas encore trouvée. L'influence de la morphologie et les interactions mitochondriales sur la régulation de la contractilité des myofilaments est encore inconnue. Mais nous suggérons que les phénomènes de fission observés très rapidement dans le diaphragme mis au repos au cours de la VM induit une augmentation de la production des ROS, qui peut par la suite altérer la structure et la fonction du RyR1 et induire une perturbation de l'homéostasie calcique qui a été impliquée dans les phénomènes précoces de la VIDD tout au long des travaux de ma thèse.

Conclusion

La ventilation mécanique de 6h chez la souris est associée à des phénomènes de fission en accord avec l'étude de Picard et al.(Picard et al., 2015a). Nous avons suggéré par des résultats encore préliminaires que ces changements au niveau du réseau mitochondriale sont corrélés à des modifications post-traductionnelles du RyR1 suggérant un lien étroit entre mitochondrie et calcium intracellulaire, dès les premières heures de ventilation mécanique.

Discussion générale et perspectives

Discussion générale et perspectives

La mise au repos du diaphragme sur un modèle murin, associé à un étirement passif est un modèle unique d'une rupture aigue d'homéostasie, stimulant très précocement des phénomènes de remodelage mitochondrial associés à des perturbations de l'homéostasie calcique.

Le diaphragme est le seul muscle que l'on peut considérer anatomiquement comme étant sur 2 dimensions, inséré entre le feuillet viscéral et pariétal, et donc non soumis à la pesanteur

Ainsi, son activité contractile permanente est la seule contrainte énergétique, qui va être rompue brutalement par la mise au repos induite par la ventilation mécanique.

Cette ventilation va brutalement induire une inadéquation entre l'influx de substrats énergétiques devant être pris en charge par la mitochondrie et la dépense énergétique réduite.

Les modifications de la morphologie mitochondriale observées dans le cadre d'une prévalence de la fission, associée à des phénomènes de mitophagie, peuvent être considérées comme des phénomènes adaptatifs, permettant de réduire le pool mitochondrial en adéquation avec la dépense énergétique. Mais parallèlement cette mise au repos s'accompagne d'un étirement passif chronique du diaphragme associé à la présence précoce d'un stress oxydant et de troubles de l'homéostasie calcique dont les mécanismes déclencheurs et le lien avec le remodelage mitochondrial sont mal connus.

Ainsi dans cette thèse nous nous sommes focalisés sur les mécanismes initiateurs pouvant être impliqués dans l'atteinte fonctionnelle diaphragmatique induite par sa mise en décharge au cours de la ventilation mécanique.

Nous avons donc évalué, au cours de la ventilation mécanique dans un modèle murin, le remodelage du récepteur de la ryanodine qui régule l'homéostasie calcique au cours du couplage excitation-contraction, ainsi que le remodelage mitochondriale et la présence d'un

stress oxydant. Afin de tenter d'évaluer la part respective de chacun de ces mécanismes dans la genèse des mécanismes initiateurs dans la VIDD, nous avons bloqué spécifiquement par voie pharmacologique chacune de ses 3 voies au cours de la ventilation mécanique. L'objectif global étant de mieux pouvoir décrire, les mécanismes initiateurs impliqués par la mise en décharge du diaphragme au cours de la ventilation mécanique.

Ainsi, dans ce dernier chapitre, nous nous proposons de discuter de nos résultats, de les intégrer à l'état de l'art actuel sur le sujet, afin de mettre en avant l'apport de mon travail, ses limites et les perspectives pour mes prochaines études.

Mécanismes initiateurs impliqués dans la VIDD

Les principaux résultats de la première étude montrent une dysfonction précoce du récepteur de la ryanodine à l'origine d'une perturbation importante de l'homéostasie calcique intracellulaire, que nous avons pu objectiver par la mesure au repos des sparks calciques sur fibre musculaire isolée. Les altérations précoces du RyR1 ont été déjà décrites dans la littérature dans le cadre de plusieurs pathologies musculaires impliquant un stress oxydant, et associées à une atteinte de la fonction contractile (Andersson et al., 2011a, 2012; Bellinger et al., 2008a, 2009b; Fauconnier et al., 2010a; Marx et al., 2001; Reiken et al., 2003a; Shan et al., 2010b). Dans ce premier résultat, nous confortons une première hypothèse sur le lien entre stress oxydant, remodelage du RyR et atteinte fonctionnelle en l'exportant à un autre modèle physiopathologique que représente la VIDD. Mais ce qui est novateur, c'est la mise en évidence d'autres voies cellulaires impliquées dans ce remodelage. En effet nous avons montré que ce canal RyR1, au cours de la ventilation mécanique est également susceptible, d'être phosphorylé, suite à l'activation de la voie adrénérgique, au niveau des sites dépendants de la protéine kinase A (Andersson et al., 2012; Reiken et al., 2003a).

Pour la première fois, nous montrons clairement, grâce au modèle de la ventilation mécanique, qui associe stress oxydant et stress adrénérgique, qu'une phosphorylation doit être associée à une oxydation du canal RyR1 pour induire une atteinte fonctionnelle avec des troubles de l'homéostasie calcique.

Ce premier article met en avant l'intérêt de toute thérapeutique permettant de limiter le stress catécholaminérgique pour prévenir l'apparition d'une VIDD en milieu de réanimation. C'est une voie thérapeutique novatrice, qui passe par une meilleure prise en charge du stress catécholaminérgique en réanimation pouvant associer une optimisation du traitement aigue de la douleur ainsi que l'utilisation d'antagonistes de la voie β_2 adrénérgique.

Nous montrons également sur model animal, que les antioxydants sont également efficaces au niveau des mécanismes initiateurs de la VIDD en limitant à la fois l'oxydation du RyR1, mais également sa phosphorylation, du fait de la sensibilité de la PKA au stress oxydant.

Ainsi par son double effet, cette thérapeutique semble également très prometteuse, d'autant plus que des molécules comme le Trolox ou la n-acétylcystéine qui sont des antioxydants d'action ubiquitaire sont facilement utilisable chez l'homme. Mais actuellement aucun essai thérapeutique n'a montré une quelconque efficacité sur la prévention de la VIDD. Une des raisons pourrait être la méconnaissance de la source initiale d'émission de ROS, à la base des mécanismes initiateurs impliqués dans la VIDD, suscitant ainsi l'utilisation de molécules antioxydantes peu spécifiques.

La mitochondrie a été récemment identifiée comme une source potentielle de ROS dans la VIDD (Falk et al., 2011; Powers et al., 2011b). Mais son implication aux niveaux des mécanismes initiateurs impliquant des troubles de l'homéostasie calcique n'était pas connue.

Ainsi, dans l'étude 2 nous avons démontré que la mitochondrie était très tôt impliquée dans la genèse d'un stress oxydant induit par la mise au repos du diaphragme au cours de la ventilation mécanique. Le stress oxydant qui est associé à un stress mécanique semble induire secondairement une atteinte de l'homéostasie calcique. Mes travaux m'ont permis de proposer pour la première fois une cinétique dans la genèse de la VIDD avec deux phases toutes deux liées à une atteinte de l'homéostasie calcique: une phase précoce avec atteinte du couplage excitation-contraction et une phase secondaire, plus tardive avec activation de la protéolyse calcium dépendante et apparition d'une atrophie. Ces données mettent en avant l'importance de développer une approche thérapeutique, le plus en amont possible, c'est à dire dès les premières heures de ventilation, voire de façon préventive, dans la prise en charge de la VIDD.

Bien que mes travaux relatés dans l'étude 2 semblent mettre en avant l'atteinte initiale de la fonction mitochondriale avec production de ROS dans la genèse de la VIDD, le mécanisme reste mal connu. En effet, la ventilation, s'accompagne également d'un phénomène de stress mécanique. Ce stress peut activer par méchanotransduction la NADPH oxydase (NOX2), génératrice d'une production de ROS, pouvant être à la base d'une dysfonction du canal RyR1 (Hidalgo et al., 2006b). La conséquence serait l'initiation de trouble de l'homéostasie calcique induisant secondairement une entrée plus importante de Ca^{2+} dans la mitochondrie via le port de transport, à la base d'une atteinte de la fonction mitochondriale et surproduction de radicaux libre. Les ROS mitochondriaux, pouvant, dans le cadre d'un phénomène de potentialisation accentuer le remodelage des protéines d'intérêts comme le canal RyR1 et amplifier les fuites calciques.

Mais lors d'une mise au repos du diaphragme, au cours de la ventilation mécanique, nous savons depuis peu, qu'il peut également exister de façon très précoce, un remodelage du réseau mitochondrial (Picard et al., 2015a). Nous savons, comme explicité dans ma revue de la littérature, que pour adapter la production d'énergie à la demande métabolique de la cellule, les

mitochondries changent de forme et interagissent entre elles par des phénomènes de fusion/fission (Chan, 2012; Chen et al., 2011). Ces phénomènes sont très rapides et ce remodelage est également corrélé à une augmentation de la production du ROS (Powers et al., 2012b; Yu et al., 2006b, 2008b). Cependant le lien de cause à effet n'est pas claire : est-ce que le remodelage mitochondrial qui est à l'origine de la production accrue de ROS ou est-ce que la production de ROS qui peut être secondaire à un stress mitochondrial comme une surcharge calcique, qui va induire un remodelage mitochondriaux avec activation de phénomènes de fissions ? Bien que la réponse ne soit pas aisée, j'ai essayé dans mon étude 3 d'y apporter un premier éclairage.

En effet, dans notre étude numéro 3, nous avons montré la présence précoce de phénomène de fission mitochondriale associée à une augmentation des taux de Drp1, et une augmentation du clivage de OPA1 en sa forme courte : deux protéines impliquées dans la fragmentation mitochondriale, sans pour autant que leur rôle respectif ni même leur interaction soit connue.

Dans l'article 3, en utilisant un bloqueur de Drp1 avec sa protéine réceptrice sur la membrane mitochondriale (Fis1), nous limitons au cours de la ventilation mécanique les phénomènes de fission et prévenons la VIDD sur notre modèle de souris.

Bien que les résultats soient encore préliminaires il semblerait donc que les phénomènes de remodelage mitochondriaux précèdent l'atteinte de l'homéostasie calcique. Pour confirmer cette hypothèse, il me faudra objectiver une diminution de la production de ROS mitochondriaux associés à une absence d'oxydation de RyR1 et une absence d'atteinte de l'homéostasie calcique.

De plus, la régulation entre les différentes protéines mitochondriales impliquées dans la fission mitochondriale n'est pas connue. Quel est l'impact de Drp1 sur l'expression de S-OPA1 au

cours d'une situation physiopathologique inductrice de fission mitochondriale comme la ventilation mécanique ?

Ainsi mon troisième article non encore finalisé au niveau des résultats, semble mettre en avant l'importance de la dynamique mitochondriale, et la nécessité de la mitochondrie à répondre au stress métabolique induit par la ventilation mécanique, objectivé par une rupture brutale entre production et utilisation de l'ATP par la fibre diaphragmatique.

Mon travail s'est donc centré sur les interactions qui pouvaient exister entre stress oxydant d'origine mitochondrial et altérations de l'homéostasie calcique à travers le remodelage du canal RyR1, au cours d'une mise en décharge du diaphragme par la ventilation mécanique.

L'originalité de ce travail réside sur l'identification des mécanismes initiaux dans cette pathologie, qui n'ont jamais été étudiées.

Cette approche m'a permis de proposer plusieurs nouvelles voies thérapeutiques dans la prévention de la VIDD, que je propose de détailler dans ce dernier chapitre :

Le RyR1 est une cible potentielle dans la prévention de la VIDD.

Un des messages majeurs de la première étude est l'identification du canal RyR1 comme nouvelle cible thérapeutique dans la prévention de la VIDD.

En effet nous avons montré que toute thérapeutique permettant de limiter la dissociation avec sa protéine stabilisatrice : calstabin1, limiterait les troubles de l'homéostasie calcique, à la base des mécanismes physiopathologiques initiaux impliqués dans la VIDD.

La première possibilité pour cela est l'utilisation des raycals (S107), molécule soluble dans l'eau qui permet de maintenir le lien entre le canal et sa protéine stabilisatrice calstabin1, malgré les modifications post-traductionnelles induites par la ventilation mécanique, pouvant déstabiliser cette liaison.

En effet, dans notre modèle animal de ventilation mécanique que l'on peut considérer comme un modèle de myopathie induite par l'inactivité et l'étirement passif, un traitement préventif par S107, nous a permis de limiter la fuite calcique à travers le RyR1 et les atteintes fonctionnelles induites.

Cette molécule, dans des modèles animaux d'autres pathologies musculaires impliquant les mêmes mécanismes déstabilisateurs sur le canal RyR1 (insuffisance cardiaque post ischémique, dystrophie musculaire) et détaillés dans ma revue de la littérature, a montré de façon similaire, son efficacité à prévenir les fuites de calcium à travers ce canal, avec un effet bénéfique sur la fonction musculaire.

Dans ces différentes myopathies, la déstabilisation du lien entre le RyR1 et sa protéine calstabin1 est due à la présence principale de modifications post-traductionnelles du RyR1 de (phosphorylation et oxydation).

Dans notre première étude, nous avons montré pour la première fois que ces deux types de modifications secondaires étaient nécessaires pour développer une atteinte fonctionnelle du RyR1. Ainsi toute thérapeutique permettant de limiter soit la phosphorylation soit l'oxydation doit être considérée comme d'intérêt dans la prévention de la VIDD. Pour cela dans mes travaux de thèse, je me suis attelé à identifier, au cours de la ventilation mécanique, l'origine de la phosphorylation et de l'oxydation du RyR1, afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques ciblant cette fois-ci en amont, les mécanismes impliqués dans la dissociation de la calstabin1 et du canal RyR1.

Dans mon premier travail j'ai montré que la phosphorylation du récepteur de la ryanodine était induite par la protéine kinase A secondaire à une stimulation adrénergique. Ainsi, l'utilisation préventive d'un antagoniste sélectif de la voie β 2-adrénergique (ICI118551) nous a permis de limiter la stimulation de la voie β -adrénergique et ainsi, de prévenir la phosphorylation du RyR1 et l'apparition de la VIDD. Ces données soulèvent donc un débat sur la pertinence d'utilisation de ce genre de molécule chez les patients ventilés, en considérant l'effet dépresseur potentiel sur la fonction cardio-vasculaire ainsi que celui de bronchoconstriction.

Sur notre modèle de souris, nous avons étudié les répercussions des β -bloquants sur ces deux fonctions cardiaque et respiratoires. Comme le montre la figure 1 (annexe), nous n'avons pas trouvé d'effet secondaire.

L'absence d'effet bradycardisant supplémentaire d'un β -bloquant même non sélectif a été probablement masquée par ceux de l'anesthésie au cours de la ventilation mécanique dans notre modèle animal. Nous avons également observé par pléthysmographie corps entier des souris contrôles, une absence d'augmentation de la résistance des voies aériennes chez les souris traitées par β bloquants sélectifs ou non sélectifs. Ainsi il semblerait que ces molécules sur un poumon sain n'ont aucun effet. Mais bien entendu nous ne pouvons extrapoler nos résultats sur

un poumon pathologique et encore plus chez l'homme. Ces effets devraient être évalués chez l'homme avant d'envisager tout essai thérapeutique centré sur l'utilisation de $\beta 2$ bloquant sélectifs dans la prévention de la VIDD.

Le stress oxydant est un acteur majeur dans la VIDD.

Les études antérieures ont rapporté une implication majeure de la mitochondrie dans la production des ROS mitochondriaux, sans que le lien avec les troubles de l'homéostasie calcique ne soit établi. Ainsi, nous avons observé dans la seconde étude l'effet d'un antioxydant spécifique de la mitochondrie (SS31) sur les modifications post-traductionnelles du RyR1 et ses conséquences sur l'homéostasie calcique.

Nous avons montré que cette molécule prévient l'oxydation du RyR1 mais également sa phosphorylation, limitant ainsi les troubles de l'homéostasie calcique à la base de l'apparition d'une VIDD. Il est probable que l'effet protecteur du SS31, vis à vis de la phosphorylation passe également par un phénomène PKA dépendant dont l'activité était réduite par le traitement SS31. Ainsi, mon étude met en avant tout l'intérêt de l'utilisation de type SS31 dans la prévention de la VIDD.

Afin de développer de nouvelle thérapeutique dans la prévention de la VIDD, l'identification des mécanismes initiateurs permettrait en les ciblant d'augmenter leur efficacité préventive. Ainsi, en accord avec les premiers travaux de Picard en 2015 (Picard et al., 2015a), nous avons mis en évidence une augmentation de la fragmentation mitochondriale associée à une augmentation de l'activité des protéines pro-fission. Parmi ces protéines, nous avons ciblé Drp1. En effet, comme explicité dans ma revue de la littérature, les phénomènes de fission pouvaient être médiés par le recrutement de Drp1 par son récepteur mitochondrial Fis1.

Nous sommes intervenus à ce niveau en bloquant l'interaction entre Drp1 et Fis1 grâce à un peptide (P110). Nos premiers résultats montrent une efficacité de ces molécules sur la limitation des phénomènes de fission induits par la ventilation mécanique et la prévention de la VIDD. Nous espérons également faire le lien entre ces deux résultats par la présence d'une diminution de la production de ROS mitochondriale associée à une diminution de l'oxydation du RyR1 et des troubles de l'homéostasie calcique.

Ainsi, les inhibiteurs de la fission mitochondriale pourraient être une future stratégie thérapeutique dans la prévention de la VIDD.

Cependant, nous prenons ces premiers résultats avec précautions car il existe très peu de données sur la spécificité du P110, le mode d'administration et la pharmacocinétique.

Dans l'avenir, il sera important d'évaluer les voies de signalisation impliquées dans les processus de fragmentation et d'établir un lien avec le stress oxydant induit par une dysfonction mitochondriale et l'atteinte musculaire. Pour cela l'apport des modèles de souris KO pour les différentes protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale sera très important.

Modes respiratoires et VIDD :

En marge des approches thérapeutiques médicamenteuses, mes résultats apportent un nouvel éclairage mécanistique sur l'intérêt des modes de ventilation partielle dans la prévention de la VIDD.

En effet, les évolutions techniques de ces dernières décennies ont conduit à la naissance de plusieurs types de respirateurs, proposant des modes ventilatoires basés sur le maintien au cours de la ventilation d'une activité contractile des muscles respiratoires. Ces nouveaux modes ventilatoires sont appelés ventilation partielle.

Parmi ces modèles, le plus simple est la CPAP (Continuous Positive Airway Pressure) qui est le maintien d'une pression positive continue dans les voies aériennes, tout au long du cycle respiratoire, permettant ainsi une activité contractile spontanée du diaphragme.

Des travaux préalables ont montré l'effet protecteur de ce type de ventilation vis à vis de l'apparition d'une VIDD (Jung et al., 2010), bien que les mécanismes ne soient pas clairement définis.

Nous proposons dans les travaux de ma thèse, que la persistance d'une activité contractile du diaphragme à minima, au cours de ce type de mode ventilatoire partiel, va permettre de limiter le déséquilibre entre production et utilisation d'ATP au niveau de la fibre musculaire diaphragmatique. La conséquence serait une diminution du remodelage mitochondrial associée à une diminution de la production de ROS, et donc une prévention des troubles de l'homéostasie calcique du fait d'une absence d'oxydation du canal RyR1.

Les indications de ces modes ventilatoires partiels se sont élargies et font partie aujourd'hui de l'arsenal thérapeutique dont dispose le clinicien pour la prise en charge des insuffisances respiratoires aiguës, du pré-hospitalier aux urgences, en passant par les secteurs aigus de réanimation ainsi qu'en post-opératoire (Chanques et al., 2003; Jaber et al., 2005, 2006). Mais la CPAP est le mode le plus simple de ventilation partielle où l'activité contractile du diaphragme est la plus importante. Tous les autres modes ventilatoires partiels, sur une base d'une pression constante maintenue dans les voies aériennes tout au long du cycle respiratoire, délivrent un certain niveau d'aide inspiratoire à chaque début d'inspiration déclenché par le patient. De plus, ces modes ventilatoires partiels avec aide inspiratoire, contrairement à la CPAP, nécessitent une synchronisation entre le patient et le respirateur. Celle-ci n'est jamais parfaite, on parle alors d'asynchronie, ce qui génère un stress mécanique excentrique, à chaque fois que le patient fait un effort inspiratoire sans pour autant que le ventilateur lui délivre un

volume courant. Pour ces nouveaux modes ventilatoires, nous ne savons pas si le niveau de stress mécanique plus important par rapport à une CPAP ou l'asynchronie n'existe pas, ne va pas générer par méchanotransduction une production de ROS plus importante, pouvant être à la base d'une oxydation du canal RyR, sans pour autant induire des phénomènes de remodelage au niveau mitochondriale du fait du maintien d'une activité contractile au niveau du diaphragme.

Ainsi, de futures études seront nécessaires pour évaluer l'effet au niveau cellulaire de ces nouveaux modes ventilatoires partiels caractérisés par un niveau d'aide inspiratoire à chaque inspiration déclenchée par le patient.

Afin de limiter le niveau d'asynchronie, il a été développé très récemment un nouveau mode, la NAVA (Neurally Adjusted Ventilatory Assist), dont le principe est d'adapter l'assistance respiratoire délivrée par le ventilateur à l'activité électromyographique (EMG) du diaphragme du patient ventilé (Sinderby et al., 1999). Grâce à une sonde œsophagien, l'activité électrique le long des nerfs phréniques, qui va stimuler le diaphragme est enregistrée et sert de signal qui va déclencher l'aide inspiratoire. Ce signal nerveux d'origine central, véhiculé sous forme de train de potentiel d'action, est le reflet de l'activité des différentes structures au niveau du tronc cérébral, impliqué dans le control de la ventilation. Ainsi en mode NAVA, le ventilateur est asservi à un signal électrique relativement proche de la commande respiratoire centrale, ce qui permet d'améliorer la synchronisation entre le patient et son ventilateur. En effet ce mode permet de remplacer le trigger inspiratoire classique, basé sur la pression négative ou débit inspiratoire générés par le patient et captés au niveau des voies aériennes, par un signal de l'activité électromyographique du diaphragme à l'aide d'une sonde œsophagienne (Sinderby et al., 1999). Les résultats cliniques préliminaires récents suggèrent une moindre asynchronie entre le patient-ventilateur, et une amélioration de l'oxygénation et de la variabilité des cycles respiratoires (Coisel et al., 2010; Colombo et al., 2008; Piquilloud et al., 2011; Terzi

et al., 2010). L'efficacité de ce nouveau mode de ventilation sur la prévention de la VIDD n'est à ce jour pas connue, ainsi que les conséquences au niveau cellulaires. De futures études, explorant les mêmes voies impliquées dans les phénomènes initiateurs de la VIDD seront nécessaires dans le développement de ses nouveaux modes ventilatoire très prometteuse du point de vue du concept.

Bibliographies

- Adhihetty, P.J., Ljubicic, V., Menzies, K.J., and Hood, D.A. (2005). Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, C994–C1001.
- Agten, A., Maes, K., Smuder, A., Powers, S.K., Decramer, M., and Gayan-Ramirez, G. (2011a). N-Acetylcysteine protects the rat diaphragm from the decreased contractility associated with controlled mechanical ventilation. *Crit. Care Med.* **39**, 777–782.
- Agten, A., Maes, K., Smuder, A., Powers, S.K., Decramer, M., and Gayan-Ramirez, G. (2011b). N-Acetylcysteine protects the rat diaphragm from the decreased contractility associated with controlled mechanical ventilation. *Crit. Care Med.* **39**, 777–782.
- Agten, A., Maes, K., Smuder, A., Powers, S.K., Decramer, M., and Gayan-Ramirez, G. (2011c). N-Acetylcysteine protects the rat diaphragm from the decreased contractility associated with controlled mechanical ventilation. *Crit. Care Med.* **39**, 777–782.
- Amiott, E.A., Cohen, M.M., Saint-Georges, Y., Weissman, A.M., and Shaw, J.M. (2009). A mutation associated with CMT2A neuropathy causes defects in Fzo1 GTP hydrolysis, ubiquitylation, and protein turnover. *Mol. Biol. Cell* **20**, 5026–5035.
- Anand, R., Langer, T., and Baker, M.J. (2013). Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 195–204.
- Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E., and Langer, T. (2014). The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J. Cell Biol.* **204**, 919–929.
- Andersson, D.C., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., Meli, A.C., Umanskaya, A., Xie, W., Shiomi, T., Zalk, R., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2011a). Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab.* **14**, 196–207.
- Andersson, D.C., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., Meli, A.C., Umanskaya, A., Xie, W., Shiomi, T., Zalk, R., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2011b). Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab.* **14**, 196–207.
- Andersson, D.C., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., Umanskaya, A., Shiomi, T., and Marks, A.R. (2012). Stress-induced increase in skeletal muscle force requires protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor. *J. Physiol.* **590**, 6381–6387.
- Andrade, F.H., Reid, M.B., Allen, D.G., and Westerblad, H. (1998). Effect of nitric oxide on single skeletal muscle fibres from the mouse. *J. Physiol.* **509** (Pt 2), 577–586.
- Andrade, F.H., Reid, M.B., and Westerblad, H. (2001). Contractile response of skeletal muscle to low peroxide concentrations: myofibrillar calcium sensitivity as a likely target for redox-modulation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **15**, 309–311.
- Anton, F., Fres, J.M., Schauss, A., Pinson, B., Praefcke, G.J.K., Langer, T., and Escobar-Henriques, M. (2011). Ugo1 and Mdm30 act sequentially during Fzo1-mediated mitochondrial outer membrane fusion. *J. Cell Sci.* **124**, 1126–1135.

- Anton, F., Dittmar, G., Langer, T., and Escobar-Henriques, M. (2013). Two deubiquitylases act on mitofusin and regulate mitochondrial fusion along independent pathways. *Mol. Cell* 49, 487–498.
- Anzueto, A., Peters, J.I., Tobin, M.J., de los Santos, R., Seidenfeld, J.J., Moore, G., Cox, W.J., and Coalson, J.J. (1997). Effects of prolonged controlled mechanical ventilation on diaphragmatic function in healthy adult baboons. *Crit. Care Med.* 25, 1187–1190.
- Aon, M.A., Cortassa, S., Marbán, E., and O’Rourke, B. (2003). Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 44735–44744.
- Avila, G., Lee, E.H., Perez, C.F., Allen, P.D., and Dirksen, R.T. (2003a). FKBP12 binding to RyR1 modulates excitation-contraction coupling in mouse skeletal myotubes. *J. Biol. Chem.* 278, 22600–22608.
- Avila, G., Lee, E.H., Perez, C.F., Allen, P.D., and Dirksen, R.T. (2003b). FKBP12 binding to RyR1 modulates excitation-contraction coupling in mouse skeletal myotubes. *J. Biol. Chem.* 278, 22600–22608.
- Azuelos, I., Jung, B., Picard, M., Liang, F., Li, T., Lemaire, C., Giordano, C., Hussain, S., and Petrof, B.J. (2015). Relationship between Autophagy and Ventilator-induced Diaphragmatic Dysfunction. *Anesthesiology* 122, 1349–1361.
- Bakeeva, L.E., Chentsov YuS, null, and Skulachev, V.P. (1978). Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 501, 349–369.
- Baker, M.J., Lampe, P.A., Stojanovski, D., Korwitz, A., Anand, R., Tatsuta, T., and Langer, T. (2014). Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics. *EMBO J.* 33, 578–593.
- Ban, T., Heymann, J.A.W., Song, Z., Hinshaw, J.E., and Chan, D.C. (2010). OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2113–2122.
- Barrera, G., Gentile, F., Pizzimenti, S., Canuto, R.A., Daga, M., Arcaro, A., Cetrangolo, G.P., Lepore, A., Ferretti, C., Dianzani, C., et al. (2016). Mitochondrial Dysfunction in Cancer and Neurodegenerative Diseases: Spotlight on Fatty Acid Oxidation and Lipoperoxidation Products. *Antioxidants* 5.
- Báthori, G., Csordás, G., Garcia-Perez, C., Davies, E., and Hajnóczky, G. (2006). Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *J. Biol. Chem.* 281, 17347–17358.
- Belcastro, A.N. (1993). Skeletal muscle calcium-activated neutral protease (calpain) with exercise. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 74, 1381–1386.
- Belcastro, A.N., Shewchuk, L.D., and Raj, D.A. (1998a). Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol. Cell. Biochem.* 179, 135–145.
- Belcastro, A.N., Shewchuk, L.D., and Raj, D.A. (1998b). Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol. Cell. Biochem.* 179, 135–145.
- Belevych, A.E., Terentyev, D., Terentyeva, R., Ho, H.-T., Gyorke, I., Bonilla, I.M., Carnes, C.A., Billman, G.E., and Györke, S. (2012). Shortened Ca²⁺ signaling refractoriness underlies cellular arrhythmogenesis in a postinfarction model of sudden cardiac death. *Circ. Res.* 110, 569–577.
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Dura, M., Murphy, P.W., Deng, S.-X., Landry, D.W., Nieman, D., Lehnart, S.E., Samaru, M., LaCampagne, A., et al. (2008a). Remodeling of ryanodine receptor complex causes “leaky”

channels: A molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 2198–2202.

Bellinger, A.M., Mongillo, M., and Marks, A.R. (2008b). Stressed out: the skeletal muscle ryanodine receptor as a target of stress. *J. Clin. Invest.* *118*, 445–453.

Bellinger, A.M., Mongillo, M., and Marks, A.R. (2008c). Stressed out: the skeletal muscle ryanodine receptor as a target of stress. *J. Clin. Invest.* *118*, 445–453.

Bellinger, A.M., Reiken, S., Dura, M., Murphy, P.W., Deng, S.-X., Landry, D.W., Nieman, D., Lehnart, S.E., Samaru, M., LaCampagne, A., et al. (2008d). Remodeling of ryanodine receptor complex causes “leaky” channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 2198–2202.

Bellinger, A.M., Reiken, S., Carlson, C., Mongillo, M., Liu, X., Rothman, L., Matecki, S., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2009a). Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat. Med.* *15*, 325–330.

Bellinger, A.M., Reiken, S., Carlson, C., Mongillo, M., Liu, X., Rothman, L., Matecki, S., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2009b). Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat. Med.* *15*, 325–330.

Bernard, N., Matecki, S., Py, G., Lopez, S., Mercier, J., and Capdevila, X. (2003a). Effects of prolonged mechanical ventilation on respiratory muscle ultrastructure and mitochondrial respiration in rabbits. *Intensive Care Med.* *29*, 111–118.

Bernard, N., Matecki, S., Py, G., Lopez, S., Mercier, J., and Capdevila, X. (2003b). Effects of prolonged mechanical ventilation on respiratory muscle ultrastructure and mitochondrial respiration in rabbits. *Intensive Care Med.* *29*, 111–118.

Bettters, J.L., Criswell, D.S., Shanely, R.A., Van Gammeren, D., Falk, D., Deruisseau, K.C., Deering, M., Yimlamai, T., and Powers, S.K. (2004a). Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *170*, 1179–1184.

Bettters, J.L., Criswell, D.S., Shanely, R.A., Van Gammeren, D., Falk, D., Deruisseau, K.C., Deering, M., Yimlamai, T., and Powers, S.K. (2004b). Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *170*, 1179–1184.

Bettters, J.L., Criswell, D.S., Shanely, R.A., Van Gammeren, D., Falk, D., Deruisseau, K.C., Deering, M., Yimlamai, T., and Powers, S.K. (2004c). Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *170*, 1179–1184.

Bhattacharya, A., Muller, F.L., Liu, Y., Sabia, M., Liang, H., Song, W., Jang, Y.C., Ran, Q., and Van Remmen, H. (2009). Denervation induces cytosolic phospholipase A2-mediated fatty acid hydroperoxide generation by muscle mitochondria. *J. Biol. Chem.* *284*, 46–55.

Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., and Shaw, J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* *1*, 298–304.

Bodine, S.C. (2006). mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* *38*, 1950–1957.

Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J., et al. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* *3*, 1014–1019.

- Bogeski, I., Kummerow, C., Al-Ansary, D., Schwarz, E.C., Koehler, R., Kozai, D., Takahashi, N., Peinelt, C., Griesemer, D., Bozem, M., et al. (2010). Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling. *Sci. Signal.* *3*, ra24.
- Bogeski, I., Kilch, T., and Niemeyer, B.A. (2012). ROS and SOCE: recent advances and controversies in the regulation of STIM and Orai. *J. Physiol.* *590*, 4193–4200.
- Boldt, J., Menges, T., Kuhn, D., Diridis, C., and Hempelmann, G. (1995). Alterations in circulating vasoactive substances in the critically ill—a comparison between survivors and non-survivors. *Intensive Care Med.* *21*, 218–225.
- Bréchar, S., Melchior, C., Plançon, S., Schenten, V., and Tschirhart, E.J. (2008). Store-operated Ca²⁺ channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes. *Cell Calcium* *44*, 492–506.
- Brennan, J.P., Bardswell, S.C., Burgoyne, J.R., Fuller, W., Schröder, E., Wait, R., Begum, S., Kentish, J.C., and Eaton, P. (2006). Oxidant-induced activation of type I protein kinase A is mediated by RI subunit interprotein disulfide bond formation. *J. Biol. Chem.* *281*, 21827–21836.
- Brillantes, A.B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriasová, E., Moschella, M.C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B.E., and Marks, A.R. (1994a). Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* *77*, 513–523.
- Brillantes, A.B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriasová, E., Moschella, M.C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B.E., and Marks, A.R. (1994b). Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* *77*, 513–523.
- Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., and Sheu, S.-S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *287*, C817–C833.
- Brown, G.L., Bülbring, E., and Burns, B.D. (1948). The action of adrenaline on mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* *107*, 115–128.
- Bruells, C.S., Bergs, I., Rossaint, R., Du, J., Bleilevens, C., Goetzenich, A., Weis, J., Wiggs, M.P., Powers, S.K., and Hein, M. (2014). Recovery of diaphragm function following mechanical ventilation in a rodent model. *PLoS One* *9*, e87460.
- Brustovetsky, N., Brustovetsky, T., Purl, K.J., Capano, M., Crompton, M., and Dubinsky, J.M. (2003). Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 4858–4867.
- Burd, N.A., Andrews, R.J., West, D.W.D., Little, J.P., Cochran, A.J.R., Hector, A.J., Cashaback, J.G.A., Gibala, M.J., Potvin, J.R., Baker, S.K., et al. (2012). Muscle time under tension during resistance exercise stimulates differential muscle protein sub-fractional synthetic responses in men. *J. Physiol.* *590*, 351–362.
- Burté, F., Carelli, V., Chinnery, P.F., and Yu-Wai-Man, P. (2015). Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* *11*, 11–24.
- Cader, S.A., Vale, R.G. de S., Castro, J.C., Bacelar, S.C., Biehl, C., Gomes, M.C.V., Cabrer, W.E., and Dantas, E.H.M. (2010). Inspiratory muscle training improves maximal inspiratory pressure and may assist weaning in older intubated patients: a randomised trial. *J. Physiother.* *56*, 171–177.
- Cairns, S.P., and Dulhunty, A.F. (1993). Beta-adrenergic potentiation of E-C coupling increases force in rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* *16*, 1317–1325.

- Capdevila, X., Lopez, S., Bernard, N., Rabischong, E., Ramonatxo, M., Martinazzo, G., and Prefaut, C. (2003). Effects of controlled mechanical ventilation on respiratory muscle contractile properties in rabbits. *Intensive Care Med.* *29*, 103–110.
- Chan, D.C. (2012). Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.* *46*, 265–287.
- Chan, N.C., Salazar, A.M., Pham, A.H., Sweredoski, M.J., Kolawa, N.J., Graham, R.L.J., Hess, S., and Chan, D.C. (2011). Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 1726–1737.
- Chang, C.-R., and Blackstone, C. (2007). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.* *282*, 21583–21587.
- Chanques, G., Jaber, S., Delay, J.M., Perrigault, P.F., Lefrant, J.Y., and Eledjam, J.J. (2003). [Phoning study about postoperative practice and application of non-invasive ventilation]. *Ann. Fr. Anesthésie Réanimation* *22*, 879–885.
- Chen, Y., and Dorn, G.W. (2013). PINK1- Phosphorylated Mitofusin 2 is a Parkin Receptor for Culling Damaged Mitochondria. *Science* *340*, 471–475.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* *160*, 189–200.
- Chen, H., Chomyn, A., and Chan, D.C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* *280*, 26185–26192.
- Chen, M., Won, D.-J., Krajewski, S., and Gottlieb, R.A. (2002a). Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* *277*, 29181–29186.
- Chen, M., Won, D.-J., Krajewski, S., and Gottlieb, R.A. (2002b). Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* *277*, 29181–29186.
- Chen, Y., Liu, Y., and Dorn, G.W. (2011). Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circ. Res.* *109*, 1327–1331.
- Choi, S.-Y., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J., and Frohman, M.A. (2006). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1255–1262.
- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15927–15932.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D’Adamo, L., et al. (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* *126*, 163–175.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., et al. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* *155*, 160–171.
- Cohen, M.M., Amiot, E.A., Day, A.R., Lebouche, G.P., Pryce, E.N., Glickman, M.H., McCaffery, J.M., Shaw, J.M., and Weissman, A.M. (2011). Sequential requirements for the GTPase domain of the mitofusin Fzo1 and the ubiquitin ligase SCFMdm30 in mitochondrial outer membrane fusion. *J. Cell Sci.* *124*, 1403–1410.

- Cohen, M.M.J., Leboucher, G.P., Livnat-Levanon, N., Glickman, M.H., and Weissman, A.M. (2008). Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2457–2464.
- Coisel, Y., Chanques, G., Jung, B., Constantin, J.-M., Capdevila, X., Matecki, S., Grasso, S., and Jaber, S. (2010). Neurally adjusted ventilatory assist in critically ill postoperative patients: a crossover randomized study. *Anesthesiology* *113*, 925–935.
- Colombo, S.L., and Moncada, S. (2009). AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells. *Biochem. J.* *421*, 163–169.
- Colombo, D., Cammarota, G., Bergamaschi, V., De Lucia, M., Corte, F.D., and Navalesi, P. (2008). Physiologic response to varying levels of pressure support and neurally adjusted ventilatory assist in patients with acute respiratory failure. *Intensive Care Med.* *34*, 2010–2018.
- Cook, N.L., Viola, H.M., Sharov, V.S., Hool, L.C., Schöneich, C., and Davies, M.J. (2012). Myeloperoxidase-derived oxidants inhibit sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity and perturb Ca²⁺ homeostasis in human coronary artery endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* *52*, 951–961.
- Cox, C.E., Carson, S.S., Lindquist, J.H., Olsen, M.K., Govert, J.A., Chelluri, L., and Quality of Life After Mechanical Ventilation in the Aged (QOL-MV) Investigators (2007). Differences in one-year health outcomes and resource utilization by definition of prolonged mechanical ventilation: a prospective cohort study. *Crit. Care Lond. Engl.* *11*, R9.
- Crescenzo, R., Bianco, F., Coppola, P., Mazzoli, A., Liverini, G., and Iossa, S. (2014). Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial responses to short-term high-fat feeding in rat skeletal muscle. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* *30*, 75–81.
- Cribbs, J.T., and Strack, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.* *8*, 939–944.
- Criswell, D.S., Shanely, R.A., Betters, J.J., McKenzie, M.J., Sellman, J.E., Van Gammeren, D.L., and Powers, S.K. (2003). Cumulative effects of aging and mechanical ventilation on in vitro diaphragm function. *Chest* *124*, 2302–2308.
- Cunningham, C.N., Baughman, J.M., Phu, L., Tea, J.S., Yu, C., Coons, M., Kirkpatrick, D.S., Bingol, B., and Corn, J.E. (2015). USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria. *Nat. Cell Biol.* *17*, 160–169.
- Daum, B., Walter, A., Horst, A., Osiewacz, H.D., and Kühlbrandt, W. (2013). Age-dependent dissociation of ATP synthase dimers and loss of inner-membrane cristae in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 15301–15306.
- Demoule, A., Jung, B., Prodanovic, H., Molinari, N., Chanques, G., Coirault, C., Matecki, S., Duguet, A., Similowski, T., and Jaber, S. (2013). Diaphragm dysfunction on admission to the intensive care unit. Prevalence, risk factors, and prognostic impact—a prospective study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *188*, 213–219.
- DeRuisseau, K.C., Shanely, R.A., Akunuri, N., Hamilton, M.T., Van Gammeren, D., Zergeroglu, A.M., McKenzie, M., and Powers, S.K. (2005a). Diaphragm unloading via controlled mechanical ventilation alters the gene expression profile. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *172*, 1267–1275.
- DeRuisseau, K.C., Kavazis, A.N., Deering, M.A., Falk, D.J., Van Gammeren, D., Yimlamai, T., Ordway, G.A., and Powers, S.K. (2005b). Mechanical ventilation induces alterations of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *98*, 1314–1321.

- Dietrich, A., Chubanov, V., Kalwa, H., Rost, B.R., and Gudermann, T. (2006). Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacol. Ther.* *112*, 744–760.
- Dimmer, K.S., and Scorrano, L. (2006). (De)constructing mitochondria: what for? *Physiol. Bethesda Md* *21*, 233–241.
- Donoso, P., Sanchez, G., Bull, R., and Hidalgo, C. (2011). Modulation of cardiac ryanodine receptor activity by ROS and RNS. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *16*, 553–567.
- Donoso, P., Finkelstein, J.P., Montecinos, L., Said, M., Sánchez, G., Vittone, L., and Bull, R. (2014). Stimulation of NOX2 in isolated hearts reversibly sensitizes RyR2 channels to activation by cytoplasmic calcium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *68*, 38–46.
- Dorn, G.W., and Kitsis, R.N. (2015). The mitochondrial dynamism-mitophagy-cell death interactome: multiple roles performed by members of a mitochondrial molecular ensemble. *Circ. Res.* *116*, 167–182.
- Douillard, A., Galbes, O., Rossano, B., Vernus, B., Bonnieu, A., Candau, R., and Py, G. (2011). Time course in calpain activity and autolysis in slow and fast skeletal muscle during clenbuterol treatment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *89*, 117–125.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* *82*, 47–95.
- Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, J.L., Debigare, R., Zheng, B., Price, S.R., and Mitch, W.E. (2004). Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J. Clin. Invest.* *113*, 115–123.
- Duan, Y., Gross, R.A., and Sheu, S.-S. (2007). Ca²⁺-dependent generation of mitochondrial reactive oxygen species serves as a signal for poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during glutamate excitotoxicity. *J. Physiol.* *585*, 741–758.
- Dykens, J.A. (1994). Isolated Cerebral and Cerebellar Mitochondria Produce Free Radicals when Exposed to Elevated Ca²⁺ and Na⁺: Implications for Neurodegeneration. *J. Neurochem.* *63*, 584–591.
- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* *331*, 456–461.
- Eisner, V., Lenaers, G., and Hajnóczky, G. (2014). Mitochondrial fusion is frequent in skeletal muscle and supports excitation-contraction coupling. *J. Cell Biol.* *205*, 179–195.
- Espinosa, A., Leiva, A., Peña, M., Müller, M., Debandi, A., Hidalgo, C., Carrasco, M.A., and Jaimovich, E. (2006). Myotube depolarization generates reactive oxygen species through NAD(P)H oxidase; ROS-elicited Ca²⁺ stimulates ERK, CREB, early genes. *J. Cell. Physiol.* *209*, 379–388.
- Esteban, A., Anzueto, A., Frutos, F., Alía, I., Brochard, L., Stewart, T.E., Benito, S., Epstein, S.K., Apezteguía, C., Nightingale, P., et al. (2002). Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study. *JAMA* *287*, 345–355.
- Eu, J.P., Sun, J., Xu, L., Stamler, J.S., and Meissner, G. (2000). The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell* *102*, 499–509.
- Evangelista, A.M., Thompson, M.D., Bolotina, V.M., Tong, X., and Cohen, R.A. (2012). Nox4- and Nox2-dependent oxidant production is required for VEGF-induced SERCA cysteine-674 S-glutathiolation and endothelial cell migration. *Free Radic. Biol. Med.* *53*, 2327–2334.

- Faccenda, D., Tan, C.H., Seraphim, A., Duchon, M.R., and Campanella, M. (2013). IF1 limits the apoptotic-signalling cascade by preventing mitochondrial remodelling. *Cell Death Differ.* *20*, 686–697.
- Falk, D.J., Deruisseau, K.C., Van Gammeren, D.L., Deering, M.A., Kavazis, A.N., and Powers, S.K. (2006). Mechanical ventilation promotes redox status alterations in the diaphragm. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *101*, 1017–1024.
- Falk, D.J., Kavazis, A.N., Whidden, M.A., Smuder, A.J., McClung, J.M., Hudson, M.B., and Powers, S.K. (2011). Mechanical ventilation-induced oxidative stress in the diaphragm: role of heme oxygenase-1. *Chest* *139*, 816–824.
- Fauconnier, J., Thireau, J., Reiken, S., Cassan, C., Richard, S., Matecki, S., Marks, A.R., and Lacampagne, A. (2010a). Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 1559–1564.
- Fauconnier, J., Thireau, J., Reiken, S., Cassan, C., Richard, S., Matecki, S., Marks, A.R., and Lacampagne, A. (2010b). Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 1559–1564.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., et al. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* *126*, 177–189.
- Friedman, J.R., and Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature* *505*, 335–343.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* *334*, 358–362.
- Futier, E., Constantin, J.-M., Combaret, L., Mosoni, L., Roszyk, L., Sapin, V., Attaix, D., Jung, B., Jaber, S., and Bazin, J.-E. (2008). Pressure support ventilation attenuates ventilator-induced protein modifications in the diaphragm. *Crit. Care Lond. Engl.* *12*, R116.
- Van Gammeren, D., Falk, D.J., Deering, M.A., Deruisseau, K.C., and Powers, S.K. (2007a). Diaphragmatic nitric oxide synthase is not induced during mechanical ventilation. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *102*, 157–162.
- Gandhirajan, R.K., Meng, S., Chandramoorthy, H.C., Mallilankaraman, K., Mancarella, S., Gao, H., Razmpour, R., Yang, X.-F., Houser, S.R., Chen, J., et al. (2013). Blockade of NOX2 and STIM1 signaling limits lipopolysaccharide-induced vascular inflammation. *J. Clin. Invest.* *123*, 887–902.
- Gandre-Babbe, S., and van der Blik, A.M. (2008). The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2402–2412.
- Gayan-Ramirez, G., de Paepe, K., Cadot, P., and Decramer, M. (2003a). Detrimental effects of short-term mechanical ventilation on diaphragm function and IGF-I mRNA in rats. *Intensive Care Med.* *29*, 825–833.
- Gayan-Ramirez, G., de Paepe, K., Cadot, P., and Decramer, M. (2003b). Detrimental effects of short-term mechanical ventilation on diaphragm function and IGF-I mRNA in rats. *Intensive Care Med.* *29*, 825–833.
- Gayan-Ramirez, G., Testelmans, D., Maes, K., Rácz, G.Z., Cadot, P., Zádor, E., Wuytack, F., and Decramer, M. (2005). Intermittent spontaneous breathing protects the rat diaphragm from mechanical ventilation effects. *Crit. Care Med.* *33*, 2804–2809.

- Geiger, P.C., Bailey, J.P., Zhan, W.-Z., Mantilla, C.B., and Sieck, G.C. (2003). Denervation-induced changes in myosin heavy chain expression in the rat diaphragm muscle. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 95, 611–619.
- Gilkerson, R.W., Selker, J.M.L., and Capaldi, R.A. (2003). The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 546, 355–358.
- Gill, J.S., McKenna, W.J., and Camm, A.J. (1995). Free radicals irreversibly decrease Ca²⁺ currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 292, 337–340.
- Gillis, J.M. (1997). Inhibition of mitochondrial calcium uptake slows down relaxation in mitochondria-rich skeletal muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 18, 473–483.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., and Cong, J. (2003a). The calpain system. *Physiol. Rev.* 83, 731–801.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., and Cong, J. (2003b). The calpain system. *Physiol. Rev.* 83, 731–801.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., and Cong, J. (2003c). The calpain system. *Physiol. Rev.* 83, 731–801.
- Gomes, L.C., and Scorrano, L. (2011). Mitochondrial elongation during autophagy: a stereotypical response to survive in difficult times. *Autophagy* 7, 1251–1253.
- Gordeeva, A.V., Zvyagilskaya, R.A., and Labas, Y.A. (2003). Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochem. Biokhimiia* 68, 1077–1080.
- Grune, T., and Davies, K.J.A. (2003). The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol. Aspects Med.* 24, 195–204.
- Grune, T., Merker, K., Sandig, G., and Davies, K.J.A. (2003). Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 709–718.
- Grupe, M., Myers, G., Penner, R., and Fleig, A. (2010). Activation of store-operated I(CRAC) by hydrogen peroxide. *Cell Calcium* 48, 1–9.
- Gunter, T.E., and Pfeiffer, D.R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* 258, C755–C786.
- Guo, X., Disatnik, M.-H., Monbureau, M., Shamloo, M., Mochly-Rosen, D., and Qi, X. (2013). Inhibition of mitochondrial fragmentation diminishes Huntington's disease-associated neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 123, 5371–5388.
- Guo, X., Sesaki, H., and Qi, X. (2014). Drp1 stabilizes p53 on the mitochondria to trigger necrosis under oxidative stress conditions in vitro and in vivo. *Biochem. J.* 461, 137–146.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226.
- Györke, S., and Carnes, C. (2008). Dysregulated sarcoplasmic reticulum calcium release: potential pharmacological target in cardiac disease. *Pharmacol. Ther.* 119, 340–354.

- Hackenbrock, C.R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J. Cell Biol.* *30*, 269–297.
- Hackenbrock, C.R. (1968). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. *J. Cell Biol.* *37*, 345–369.
- Hajnóczky, G., Csordás, G., Das, S., Garcia-Perez, C., Saotome, M., Sinha Roy, S., and Yi, M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium* *40*, 553–560.
- Hansford, R.G. (1994). Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* *26*, 495–508.
- Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., et al. (2002). LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell* *9*, 163–173.
- Harder, Z., Zunino, R., and McBride, H. (2004a). Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr. Biol. CB* *14*, 340–345.
- Harder, Z., Zunino, R., and McBride, H. (2004b). Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr. Biol. CB* *14*, 340–345.
- Hardin, B.J., Campbell, K.S., Smith, J.D., Arbogast, S., Smith, J., Moylan, J.S., and Reid, M.B. (2008). TNF- α acts via TNFR1 and muscle-derived oxidants to depress myofibrillar force in murine skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* *104*, 694–699.
- Hawkins, B.J., Irrinki, K.M., Mallilankaraman, K., Lien, Y.-C., Wang, Y., Bhanumathy, C.D., Subbiah, R., Ritchie, M.F., Soboloff, J., Baba, Y., et al. (2010). S-glutathionylation activates STIM1 and alters mitochondrial homeostasis. *J. Cell Biol.* *190*, 391–405.
- Hidalgo, C., Bull, R., Marengo, J.J., Perez, C.F., and Donoso, P. (2000). SH oxidation stimulates calcium release channels (ryanodine receptors) from excitable cells. *Biol. Res.* *33*, 113–124.
- Hidalgo, C., Sánchez, G., Barrientos, G., and Aracena-Parks, P. (2006a). A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S -glutathionylation. *J. Biol. Chem.* *281*, 26473–26482.
- Hidalgo, C., Sánchez, G., Barrientos, G., and Aracena-Parks, P. (2006b). A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S -glutathionylation. *J. Biol. Chem.* *281*, 26473–26482.
- Hooijman, P.E., Paul, M.A., Stienen, G.J.M., Beishuizen, A., Van Hees, H.W.H., Singhal, S., Bashir, M., Budak, M.T., Morgen, J., Barsotti, R.J., et al. (2014). Unaffected contractility of diaphragm muscle fibers in humans on mechanical ventilation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *307*, L460–L470.
- Huang, H., Gao, Q., Peng, X., Choi, S.-Y., Sarma, K., Ren, H., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (2011). piRNA-associated germline nuage formation and spermatogenesis require MitoPLD profusogenic mitochondrial-surface lipid signaling. *Dev. Cell* *20*, 376–387.
- Hudasek, K., Brown, S.T., and Fearon, I.M. (2004). H₂O₂ regulates recombinant Ca²⁺ channel α 1C subunits but does not mediate their sensitivity to acute hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *318*, 135–141.

- Hussain, S.N.A., Mofarrahi, M., Sigala, I., Kim, H.C., Vassilakopoulos, T., Maltais, F., Bellenis, I., Chaturvedi, R., Gottfried, S.B., Metrakos, P., et al. (2010). Mechanical ventilation-induced diaphragm disuse in humans triggers autophagy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *182*, 1377–1386.
- Ingalls, C.P., Warren, G.L., and Armstrong, R.B. (1999). Intracellular Ca²⁺ transients in mouse soleus muscle after hindlimb unloading and reloading. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *87*, 386–390.
- Iqbal, S., Ostojic, O., Singh, K., Joseph, A.-M., and Hood, D.A. (2013). Expression of mitochondrial fission and fusion regulatory proteins in skeletal muscle during chronic use and disuse. *Muscle Nerve* *48*, 963–970.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., and Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* *25*, 2966–2977.
- Jaber, S., Delay, J.-M., Chanques, G., Sebbane, M., Jacquet, E., Souche, B., Perrigault, P.-F., and Eledjam, J.-J. (2005). Outcomes of patients with acute respiratory failure after abdominal surgery treated with noninvasive positive pressure ventilation. *Chest* *128*, 2688–2695.
- Jaber, S., Chanques, G., Sebbane, M., Salhi, F., Delay, J.-M., Perrigault, P.-F., and Eledjam, J.-J. (2006). Noninvasive positive pressure ventilation in patients with respiratory failure due to severe acute pancreatitis. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* *73*, 166–172.
- Jaber, S., Petrof, B.J., Jung, B., Chanques, G., Berthet, J.-P., Rabuel, C., Bouyabrine, H., Courouble, P., Koechlin-Ramonatxo, C., Sebbane, M., et al. (2011a). Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *183*, 364–371.
- Jaber, S., Petrof, B.J., Jung, B., Chanques, G., Berthet, J.-P., Rabuel, C., Bouyabrine, H., Courouble, P., Koechlin-Ramonatxo, C., Sebbane, M., et al. (2011b). Rapidly progressive diaphragmatic weakness and injury during mechanical ventilation in humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *183*, 364–371.
- Jaber, S., Jung, B., Matecki, S., and Petrof, B.J. (2011c). Clinical review: ventilator-induced diaphragmatic dysfunction--human studies confirm animal model findings! *Crit. Care Lond. Engl.* *15*, 206.
- Jaber, S., Jung, B., Matecki, S., and Petrof, B.J. (2011d). Clinical review: ventilator-induced diaphragmatic dysfunction--human studies confirm animal model findings! *Crit. Care Lond. Engl.* *15*, 206.
- Jackman, R.W., and Kandarian, S.C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *287*, C834–C843.
- Jayaraman, T., and Marks, A.R. (2000a). Calcineurin is downstream of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the apoptotic and cell growth pathways. *J. Biol. Chem.* *275*, 6417–6420.
- Jayaraman, T., and Marks, A.R. (2000b). Calcineurin is downstream of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the apoptotic and cell growth pathways. *J. Biol. Chem.* *275*, 6417–6420.
- Jezek, P., and Plecítá-Hlavatá, L. (2009). Mitochondrial reticulum network dynamics in relation to oxidative stress, redox regulation, and hypoxia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1790–1804.
- Jheng, H.-F., Tsai, P.-J., Guo, S.-M., Kuo, L.-H., Chang, C.-S., Su, I.-J., Chang, C.-R., and Tsai, Y.-S. (2012). Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 309–319.
- Ji, L.L. (2001). Exercise at Old Age: Does It Increase or Alleviate Oxidative Stress? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *928*, 236–247.

- Jiang, Q., Fu, X., Tian, L., Chen, Y., Yang, K., Chen, X., Zhang, J., Lu, W., and Wang, J. (2014). NOX4 mediates BMP4-induced upregulation of TRPC1 and 6 protein expressions in distal pulmonary arterial smooth muscle cells. *PLoS One* 9, e107135.
- Joiner, M.-L.A., Koval, O.M., Li, J., He, B.J., Allamargot, C., Gao, Z., Luczak, E.D., Hall, D.D., Fink, B.D., Chen, B., et al. (2012). CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature* 491, 269–273.
- Jou, M.-J., Peng, T.-I., Hsu, L.-F., Jou, S.-B., Reiter, R.J., Yang, C.-M., Chiao, C.-C., Lin, Y.-F., and Chen, C.-C. (2010). Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca²⁺-mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. *J. Pineal Res.* 48, 20–38.
- Jung, B., Constantin, J.-M., Rossel, N., Le Goff, C., Sebbane, M., Coisel, Y., Chanques, G., Futier, E., Hugon, G., Capdevila, X., et al. (2010). Adaptive support ventilation prevents ventilator-induced diaphragmatic dysfunction in piglet: an in vivo and in vitro study. *Anesthesiology* 112, 1435–1443.
- Jung, B., Moury, P.H., Mahul, M., de Jong, A., Galia, F., Prades, A., Albaladejo, P., Chanques, G., Molinari, N., and Jaber, S. (2016). Diaphragmatic dysfunction in patients with ICU-acquired weakness and its impact on extubation failure. *Intensive Care Med.* 42, 853–861.
- Kanamaru, Y., Sekine, S., Ichijo, H., and Takeda, K. (2012). The phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial proteins in stress responses. *J. Signal Transduct.* 2012, 931215.
- Karbowski, M., Jeong, S.-Y., and Youle, R.J. (2004). Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J. Cell Biol.* 166, 1027–1039.
- Karbowski, M., Neutzner, A., and Youle, R.J. (2007). The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J. Cell Biol.* 178, 71–84.
- Kavazis, A.N., Talbert, E.E., Smuder, A.J., Hudson, M.B., Nelson, W.B., and Powers, S.K. (2009a). Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 842–850.
- Kavazis, A.N., Talbert, E.E., Smuder, A.J., Hudson, M.B., Nelson, W.B., and Powers, S.K. (2009b). Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 842–850.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141.
- Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2006). Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J. Nutr.* 136, 227S – 31S.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., and Clapham, D.E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427, 360–364.
- Knisely, A.S., Leal, S.M., and Singer, D.B. (1988). Abnormalities of diaphragmatic muscle in neonates with ventilated lungs. *J. Pediatr.* 113, 1074–1077.
- Kopek, B.G., Shtengel, G., Grimm, J.B., Clayton, D.A., and Hess, H.F. (2013). Correlative photoactivated localization and scanning electron microscopy. *PLoS One* 8, e77209.
- Kourie, J.I. (1998). Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am. J. Physiol.* 275, C1–C24.

- Kowaltowski, A.J., Naia-da-Silva, E.S., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E. (1998). Ca²⁺-Stimulated Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Permeability Transition Are Inhibited by Dibucaine or Mg²⁺. *Arch. Biochem. Biophys.* 359, 77–81.
- Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 333–343.
- Krieger, D.A., Tate, C.A., McMillin-Wood, J., and Booth, F.W. (1980). Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J. Appl. Physiol.* 48, 23–28.
- Kumar, V., Atherton, P.J., Selby, A., Rankin, D., Williams, J., Smith, K., Hiscock, N., and Rennie, M.J. (2012). Muscle protein synthetic responses to exercise: effects of age, volume, and intensity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 67, 1170–1177.
- Labbé, K., Murley, A., and Nunnari, J. (2014). Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 357–391.
- Lacampagne, A., Duittoz, A., Bolaños, P., Peineau, N., and Argibay, J.A. (1995). Effect of sulfhydryl oxidation on ionic and gating currents associated with L-type calcium channels in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 30, 799–806.
- Laghi, F., Cattapan, S.E., Jubran, A., Parthasarathy, S., Warshawsky, P., Choi, Y.-S.A., and Tobin, M.J. (2003). Is weaning failure caused by low-frequency fatigue of the diaphragm? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 120–127.
- Lamb, G.D., and Stephenson, D.G. (1996). Effects of FK506 and rapamycin on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of the rat. *J. Physiol.* 494 (Pt 2), 569–576.
- Leboucher, G.P., Tsai, Y.C., Yang, M., Shaw, K.C., Zhou, M., Veenstra, T.D., Glickman, M.H., and Weissman, A.M. (2012). Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis. *Mol. Cell* 47, 547–557.
- Le Bourdelles, G., Viires, N., Boczkowski, J., Seta, N., Pavlovic, D., and Aubier, M. (1994). Effects of mechanical ventilation on diaphragmatic contractile properties in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149, 1539–1544.
- Lee, Y., Jeong, S.-Y., Karbowski, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol. Cell* 15, 5001–5011.
- Levine, S., Nguyen, T., Taylor, N., Friscia, M.E., Budak, M.T., Rothenberg, P., Zhu, J., Sachdeva, R., Sonnad, S., Kaiser, L.R., et al. (2008a). Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N. Engl. J. Med.* 358, 1327–1335.
- Levine, S., Nguyen, T., Taylor, N., Friscia, M.E., Budak, M.T., Rothenberg, P., Zhu, J., Sachdeva, R., Sonnad, S., Kaiser, L.R., et al. (2008b). Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N. Engl. J. Med.* 358, 1327–1335.
- Levine, S., Nguyen, T., Taylor, N., Friscia, M.E., Budak, M.T., Rothenberg, P., Zhu, J., Sachdeva, R., Sonnad, S., Kaiser, L.R., et al. (2008c). Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N. Engl. J. Med.* 358, 1327–1335.
- Levine, S., Biswas, C., Dierov, J., Barsotti, R., Shrager, J.B., Nguyen, T., Sonnad, S., Kucharchzuk, J.C., Kaiser, L.R., Singhal, S., et al. (2011a). Increased proteolysis, myosin depletion, and atrophic AKT-FOXO signaling in human diaphragm disuse. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 483–490.

- Levine, S., Budak, M.T., Dierov, J., and Singhal, S. (2011b). Inactivity-induced diaphragm dysfunction and mitochondria-targeted antioxidants: new concepts in critical care medicine. *Crit. Care Med.* *39*, 1844–1845.
- Levine, S., Budak, M.T., Dierov, J., and Singhal, S. (2011c). Inactivity-induced diaphragm dysfunction and mitochondria-targeted antioxidants: new concepts in critical care medicine. *Crit. Care Med.* *39*, 1844–1845.
- Levine, S., Biswas, C., Dierov, J., Barsotti, R., Shrager, J.B., Nguyen, T., Sonnad, S., Kucharchzuk, J.C., Kaiser, L.R., Singhal, S., et al. (2011d). Increased proteolysis, myosin depletion, and atrophic AKT-FOXO signaling in human diaphragm disuse. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *183*, 483–490.
- Li, J., Li, Y., Jiao, J., Wang, J., Li, Y., Qin, D., and Li, P. (2014). Mitofusin 1 is negatively regulated by microRNA 140 in cardiomyocyte apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 1788–1799.
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y.-J., et al. (2011). AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* *13*, 376–388.
- Li, Y.-P., Chen, Y., Li, A.S., and Reid, M.B. (2003a). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *285*, C806–C812.
- Li, Y.-P., Chen, Y., Li, A.S., and Reid, M.B. (2003b). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *285*, C806–C812.
- Li, Y.-P., Chen, Y., Li, A.S., and Reid, M.B. (2003c). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *285*, C806–C812.
- Li, Y.-P., Chen, Y., John, J., Moylan, J., Jin, B., Mann, D.L., and Reid, M.B. (2005). TNF- α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 362–370.
- Liang, J.-R., Martinez, A., Lane, J.D., Mayor, U., Clague, M.J., and Urbé, S. (2015). USP30 deubiquitylates mitochondrial Parkin substrates and restricts apoptotic cell death. *EMBO Rep.* *16*, 618–627.
- Liesa, M., Borda-d'Agua, B., Medina-Gómez, G., Lelliott, C.J., Paz, J.C., Rojo, M., Palacín, M., Vidal-Puig, A., and Zorzano, A. (2008a). Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1 β . *PLoS One* *3*, e3613.
- Liesa, M., Borda-d'Agua, B., Medina-Gómez, G., Lelliott, C.J., Paz, J.C., Rojo, M., Palacín, M., Vidal-Puig, A., and Zorzano, A. (2008b). Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1 β . *PLoS One* *3*, e3613.
- Liu, R., Jin, P., Yu, L., LiqunYu, null, Wang, Y., Han, L., Shi, T., and Li, X. (2014). Impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics in diabetic skeletal muscle. *PLoS One* *9*, e92810.
- Losón, O.C., Song, Z., Chen, H., and Chan, D.C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* *24*, 659–667.
- Lynch, G.S., and Ryall, J.G. (2008). Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol. Rev.* *88*, 729–767.

- Lynch, G.S., Faulkner, J.A., and Brooks, S.V. (2008a). Force deficits and breakage rates after single lengthening contractions of single fast fibers from unconditioned and conditioned muscles of young and old rats. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *295*, C249–C256.
- Lynch, G.S., Faulkner, J.A., and Brooks, S.V. (2008b). Force deficits and breakage rates after single lengthening contractions of single fast fibers from unconditioned and conditioned muscles of young and old rats. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *295*, C249–C256.
- Maack, C., and O'Rourke, B. (2007). Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res. Cardiol.* *102*, 369–392.
- Maciel, E.N., Vercesi, A.E., and Castilho, R.F. (2001). Oxidative stress in Ca²⁺-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *J. Neurochem.* *79*, 1237–1245.
- Macpherson, P.C., Schork, M.A., and Faulkner, J.A. (1996a). Contraction-induced injury to single fiber segments from fast and slow muscles of rats by single stretches. *Am. J. Physiol.* *271*, C1438–C1446.
- Macpherson, P.C., Schork, M.A., and Faulkner, J.A. (1996b). Contraction-induced injury to single fiber segments from fast and slow muscles of rats by single stretches. *Am. J. Physiol.* *271*, C1438–C1446.
- Maes, K., Testelmans, D., Powers, S., Decramer, M., and Gayan-Ramirez, G. (2007). Leupeptin inhibits ventilator-induced diaphragm dysfunction in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *175*, 1134–1138.
- Mannella, C.A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta* *1763*, 542–548.
- Marx, S.O., Ondrias, K., and Marks, A.R. (1998a). Coupled gating between individual skeletal muscle Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors). *Science* *281*, 818–821.
- Marx, S.O., Ondrias, K., and Marks, A.R. (1998b). Coupled gating between individual skeletal muscle Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors). *Science* *281*, 818–821.
- Marx, S.O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Yang, Y.M., Rosemlit, N., and Marks, A.R. (2001). Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *J. Cell Biol.* *153*, 699–708.
- Marzo, I., Brenner, C., and Kroemer, G. (1998). The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* *52*, 248–251.
- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.-S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., et al. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* *189*, 211–221.
- Max, S.R. (1972). Disuse atrophy of skeletal muscle: loss of functional activity of mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *46*, 1394–1398.
- McClung, J.M., Kavazis, A.N., DeRuisseau, K.C., Falk, D.J., Deering, M.A., Lee, Y., Sugiura, T., and Powers, S.K. (2007a). Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain during mechanical ventilation-induced atrophy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *175*, 150–159.
- McClung, J.M., Kavazis, A.N., Whidden, M.A., DeRuisseau, K.C., Falk, D.J., Criswell, D.S., and Powers, S.K. (2007b). Antioxidant administration attenuates mechanical ventilation-induced rat diaphragm muscle atrophy independent of protein kinase B (PKB Akt) signalling. *J. Physiol.* *585*, 203–215.

- McClung, J.M., Kavazis, A.N., Whidden, M.A., DeRuisseau, K.C., Falk, D.J., Criswell, D.S., and Powers, S.K. (2007c). Antioxidant administration attenuates mechanical ventilation-induced rat diaphragm muscle atrophy independent of protein kinase B (PKB Akt) signalling. *J. Physiol.* *585*, 203–215.
- McClung, J.M., Kavazis, A.N., DeRuisseau, K.C., Falk, D.J., Deering, M.A., Lee, Y., Sugiura, T., and Powers, S.K. (2007d). Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain during mechanical ventilation-induced atrophy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *175*, 150–159.
- McClung, J.M., Kavazis, A.N., Whidden, M.A., DeRuisseau, K.C., Falk, D.J., Criswell, D.S., and Powers, S.K. (2007e). Antioxidant administration attenuates mechanical ventilation-induced rat diaphragm muscle atrophy independent of protein kinase B (PKB Akt) signalling. *J. Physiol.* *585*, 203–215.
- McClung, J.M., Kavazis, A.N., Whidden, M.A., DeRuisseau, K.C., Falk, D.J., Criswell, D.S., and Powers, S.K. (2007f). Antioxidant administration attenuates mechanical ventilation-induced rat diaphragm muscle atrophy independent of protein kinase B (PKB Akt) signalling. *J. Physiol.* *585*, 203–215.
- McClung, J.M., Whidden, M.A., Kavazis, A.N., Falk, D.J., Deruisseau, K.C., and Powers, S.K. (2008). Redox regulation of diaphragm proteolysis during mechanical ventilation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *294*, R1608–R1617.
- McClung, J.M., Van Gammeren, D., Whidden, M.A., Falk, D.J., Kavazis, A.N., Hudson, M.B., Gayan-Ramirez, G., Decramer, M., DeRuisseau, K.C., and Powers, S.K. (2009a). Apocynin attenuates diaphragm oxidative stress and protease activation during prolonged mechanical ventilation. *Crit. Care Med.* *37*, 1373–1379.
- McClung, J.M., Judge, A.R., Talbert, E.E., and Powers, S.K. (2009b). Calpain-1 is required for hydrogen peroxide-induced myotube atrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *296*, C363–C371.
- McClung, J.M., Van Gammeren, D., Whidden, M.A., Falk, D.J., Kavazis, A.N., Hudson, M.B., Gayan-Ramirez, G., Decramer, M., DeRuisseau, K.C., and Powers, S.K. (2009c). Apocynin attenuates diaphragm oxidative stress and protease activation during prolonged mechanical ventilation. *Crit. Care Med.* *37*, 1373–1379.
- McClung, J.M., Van Gammeren, D., Whidden, M.A., Falk, D.J., Kavazis, A.N., Hudson, M.B., Gayan-Ramirez, G., Decramer, M., DeRuisseau, K.C., and Powers, S.K. (2009d). Apocynin attenuates diaphragm oxidative stress and protease activation during prolonged mechanical ventilation. *Crit. Care Med.* *37*, 1373–1379.
- McClung, J.M., Judge, A.R., Powers, S.K., and Yan, Z. (2010). p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *298*, C542–C549.
- McCormack, J.G., Halestrap, A.P., and Denton, R.M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* *70*, 391–425.
- Mears, J.A., Lackner, L.L., Fang, S., Ingerman, E., Nunnari, J., and Hinshaw, J.E. (2011). Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 20–26.
- Medicare, the C. for, Boulevard, M.S.S., Baltimore, Baltimore, M. 21244 7500 S.B., and Usa, M. 21244 (2015). Home.
- Mendl, N., Occhipinti, A., Müller, M., Wild, P., Dikic, I., and Reichert, A.S. (2011). Mitophagy in yeast is independent of mitochondrial fission and requires the stress response gene WHI2. *J. Cell Sci.* *124*, 1339–1350.
- Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., and Winder, W.W. (1997). AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am. J. Physiol.* *273*, E1107–E1112.

- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., and Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* *340*, 230–233.
- Min, K., Smuder, A.J., Kwon, O.-S., Kavazis, A.N., Szeto, H.H., and Powers, S.K. (2011). Mitochondrial-targeted antioxidants protect skeletal muscle against immobilization-induced muscle atrophy. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *111*, 1459–1466.
- Mishra, P., and Chan, D.C. (2014a). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 634–646.
- Mishra, P., and Chan, D.C. (2014b). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 634–646.
- Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G., and Chan, D.C. (2014). Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* *19*, 630–641.
- Mrozek, S., Jung, B., Petrof, B.J., Pauly, M., Roberge, S., Lacampagne, A., Cassan, C., Thireau, J., Molinari, N., Futier, E., et al. (2012a). Rapid onset of specific diaphragm weakness in a healthy murine model of ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Anesthesiology* *117*, 560–567.
- Mrozek, S., Jung, B., Petrof, B.J., Pauly, M., Roberge, S., Lacampagne, A., Cassan, C., Thireau, J., Molinari, N., Futier, E., et al. (2012b). Rapid onset of specific diaphragm weakness in a healthy murine model of ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Anesthesiology* *117*, 560–567.
- Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S., and Hirose, S. (2006a). MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep.* *7*, 1019–1022.
- Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S., and Hirose, S. (2006b). MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep.* *7*, 1019–1022.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* *183*, 795–803.
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., and Youle, R.J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* *8*, e1000298.
- Nelson, J.E., Meier, D.E., Litke, A., Natale, D.A., Siegel, R.E., and Morrison, R.S. (2004). The symptom burden of chronic critical illness. *Crit. Care Med.* *32*, 1527–1534.
- Nelson, J.E., Mercado, A.F., Camhi, S.L., Tandon, N., Wallenstein, S., August, G.I., and Morrison, R.S. (2007). Communication About Chronic Critical Illness. *Arch. Intern. Med.* *167*, 2509–2515.
- Neutzner, A., and Youle, R.J. (2005). Instability of the mitofusin Fzo1 regulates mitochondrial morphology during the mating response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *280*, 18598–18603.
- Nielsen, J., Suetta, C., Hvid, L.G., Schrøder, H.D., Aagaard, P., and Ortenblad, N. (2010). Subcellular localization-dependent decrements in skeletal muscle glycogen and mitochondria content following short-term disuse in young and old men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *299*, E1053–E1060.
- Nowikovsky, K., Reipert, S., Devenish, R.J., and Schweyen, R.J. (2007). Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ.* *14*, 1647–1656.

- Ochala, J., Radell, P.J., Eriksson, L.I., and Larsson, L. (2010a). EMD 57033 partially reverses ventilator-induced diaphragm muscle fibre calcium desensitisation. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *459*, 475–483.
- Ochala, J., Radell, P.J., Eriksson, L.I., and Larsson, L. (2010b). EMD 57033 partially reverses ventilator-induced diaphragm muscle fibre calcium desensitisation. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *459*, 475–483.
- Ogata, T., and Yamasaki, Y. (1985). Scanning electron-microscopic studies on the three-dimensional structure of mitochondria in the mammalian red, white and intermediate muscle fibers. *Cell Tissue Res.* *241*, 251–256.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., and Ohsumi, Y. (2009). Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev. Cell* *17*, 87–97.
- Ong, S.-B., Subrayan, S., Lim, S.Y., Yellon, D.M., Davidson, S.M., and Hausenloy, D.J. (2010). Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* *121*, 2012–2022.
- O'Reilly, F.M., Robert, M., Jona, I., Szegedi, C., Albrieux, M., Geib, S., De Waard, M., Villaz, M., and Ronjat, M. (2002). FKBP12 modulation of the binding of the skeletal ryanodine receptor onto the II-III loop of the dihydropyridine receptor. *Biophys. J.* *82*, 145–155.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 552–565.
- Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., and Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *191*, 1141–1158.
- Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W., and Shaw, J.M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* *143*, 333–349.
- Ottenheijm, C.A.C., Heunks, L.M.A., Hafmans, T., van der Ven, P.F.M., Benoist, C., Zhou, H., Labeit, S., Granzier, H.L., and Dekhuijzen, P.N.R. (2006). Titin and diaphragm dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *173*, 527–534.
- Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Hemendinger, R., Greenamyre, J.T., and Rosenfeld, J. (2007). Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *292*, C708–C718.
- Patten, D.A., Wong, J., Khacho, M., Soubannier, V., Mailloux, R.J., Pilon-Larose, K., MacLaurin, J.G., Park, D.S., McBride, H.M., Trinkle-Mulcahy, L., et al. (2014). OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *EMBO J.* *33*, 2676–2691.
- Pellegrino, M.A., Desaphy, J.-F., Brocca, L., Pierno, S., Camerino, D.C., and Bottinelli, R. (2011). Redox homeostasis, oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J. Physiol.* *589*, 2147–2160.
- Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M., and Frey, T. (1997). Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J. Struct. Biol.* *119*, 260–272.
- Pernas, L., and Scorrano, L. (2016). Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu. Rev. Physiol.* *78*, 505–531.
- Perraud, A.-L., Takanishi, C.L., Shen, B., Kang, S., Smith, M.K., Schmitz, C., Knowles, H.M., Ferraris, D., Li, W., Zhang, J., et al. (2005). Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J. Biol. Chem.* *280*, 6138–6148.

- Petersén, Å., Castilho, R.F., Hansson, O., Wieloch, T., and Brundin, P. (2000). Oxidative stress, mitochondrial permeability transition and activation of caspases in calcium ionophore A23187-induced death of cultured striatal neurons. *Brain Res.* *857*, 20–29.
- Petrof, B.J., Jaber, S., and Matecki, S. (2010). Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Curr. Opin. Crit. Care* *16*, 19–25.
- Picard, M., Jung, B., Liang, F., Azuelos, I., Hussain, S., Goldberg, P., Godin, R., Danialou, G., Chaturvedi, R., Rygiel, K., et al. (2012a). Mitochondrial dysfunction and lipid accumulation in the human diaphragm during mechanical ventilation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *186*, 1140–1149.
- Picard, M., Jung, B., Liang, F., Azuelos, I., Hussain, S., Goldberg, P., Godin, R., Danialou, G., Chaturvedi, R., Rygiel, K., et al. (2012b). Mitochondrial dysfunction and lipid accumulation in the human diaphragm during mechanical ventilation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *186*, 1140–1149.
- Picard, M., White, K., and Turnbull, D.M. (2013a). Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *114*, 161–171.
- Picard, M., Gentil, B.J., McManus, M.J., White, K., St Louis, K., Gartside, S.E., Wallace, D.C., and Turnbull, D.M. (2013b). Acute exercise remodels mitochondrial membrane interactions in mouse skeletal muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *115*, 1562–1571.
- Picard, M., Azuelos, I., Jung, B., Giordano, C., Matecki, S., Hussain, S., White, K., Li, T., Liang, F., Benedetti, A., et al. (2015a). Mechanical ventilation triggers abnormal mitochondrial dynamics and morphology in the diaphragm. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *118*, 1161–1171.
- Picard, M., McManus, M.J., Csordás, G., Várnai, P., Dorn, G.W., Williams, D., Hajnóczky, G., and Wallace, D.C. (2015b). Trans-mitochondrial coordination of cristae at regulated membrane junctions. *Nat. Commun.* *6*, 6259.
- Picard, M., Azuelos, I., Jung, B., Giordano, C., Matecki, S., Hussain, S., White, K., Li, T., Liang, F., Benedetti, A., et al. (2015c). Mechanical ventilation triggers abnormal mitochondrial dynamics and morphology in the diaphragm. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *118*, 1161–1171.
- Piquilloud, L., Vignaux, L., Bialais, E., Roeseler, J., Sottiaux, T., Laterre, P.-F., Jolliet, P., and Tassaux, D. (2011). Neurally adjusted ventilatory assist improves patient-ventilator interaction. *Intensive Care Med.* *37*, 263–271.
- Poteser, M., Graziani, A., Rosker, C., Eder, P., Derler, I., Kahr, H., Zhu, M.X., Romanin, C., and Groschner, K. (2006). TRPC3 and TRPC4 associate to form a redox-sensitive cation channel. Evidence for expression of native TRPC3-TRPC4 heteromeric channels in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 13588–13595.
- Powers, S.K., and Jackson, M.J. (2008a). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* *88*, 1243–1276.
- Powers, S.K., and Jackson, M.J. (2008b). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* *88*, 1243–1276.
- Powers, S.K., Shanely, R.A., Coombes, J.S., Koesterer, T.J., McKenzie, M., Van Gammeren, D., Cicale, M., and Dodd, S.L. (2002). Mechanical ventilation results in progressive contractile dysfunction in the diaphragm. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *92*, 1851–1858.
- Powers, S.K., Kavazis, A.N., and McClung, J.M. (2007). Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *102*, 2389–2397.

- Powers, S.K., Smuder, A.J., and Criswell, D.S. (2011a). Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 2519–2528.
- Powers, S.K., Hudson, M.B., Nelson, W.B., Talbert, E.E., Min, K., Szeto, H.H., Kavazis, A.N., and Smuder, A.J. (2011b). Mitochondria-targeted antioxidants protect against mechanical ventilation-induced diaphragm weakness. *Crit. Care Med.* *39*, 1749–1759.
- Powers, S.K., Hudson, M.B., Nelson, W.B., Talbert, E.E., Min, K., Szeto, H.H., Kavazis, A.N., and Smuder, A.J. (2011c). Mitochondria-targeted antioxidants protect against mechanical ventilation-induced diaphragm weakness. *Crit. Care Med.* *39*, 1749–1759.
- Powers, S.K., Hudson, M.B., Nelson, W.B., Talbert, E.E., Min, K., Szeto, H.H., Kavazis, A.N., and Smuder, A.J. (2011d). Mitochondria-targeted antioxidants protect against mechanical ventilation-induced diaphragm weakness. *Crit. Care Med.* *39*, 1749–1759.
- Powers, S.K., Smuder, A.J., and Judge, A.R. (2012a). Oxidative stress and disuse muscle atrophy: cause or consequence? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *15*, 240–245.
- Powers, S.K., Wiggs, M.P., Duarte, J.A., Zergeroglu, A.M., and Demirel, H.A. (2012b). Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *303*, E31–E39.
- Powers, S.K., Wiggs, M.P., Sollanek, K.J., and Smuder, A.J. (2013). Ventilator-induced diaphragm dysfunction: cause and effect. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *305*, R464–R477.
- Przygodzki, T., Sokal, A., and Bryszewska, M. (2005). Calcium ionophore A23187 action on cardiac myocytes is accompanied by enhanced production of reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* *1740*, 481–488.
- Radell, P., Edström, L., Stibler, H., Eriksson, L.I., and Ansved, T. (2004). Changes in diaphragm structure following prolonged mechanical ventilation in piglets. *Acta Anaesthesiol. Scand.* *48*, 430–437.
- Radell, P.J., Remahl, S., Nichols, D.G., and Eriksson, L.I. (2002). Effects of prolonged mechanical ventilation and inactivity on piglet diaphragm function. *Intensive Care Med.* *28*, 358–364.
- Rakovic, A., Grünwald, A., Kottwitz, J., Brüggemann, N., Pramstaller, P.P., Lohmann, K., and Klein, C. (2011). Mutations in PINK1 and Parkin impair ubiquitination of Mitofusins in human fibroblasts. *PLoS One* *6*, e16746.
- Rana, A., Rera, M., and Walker, D.W. (2013). Parkin overexpression during aging reduces proteotoxicity, alters mitochondrial dynamics, and extends lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 8638–8643.
- Raza, H., John, A., Brown, E.M., Benedict, S., and Kambal, A. (2008). Alterations in mitochondrial respiratory functions, redox metabolism and apoptosis by oxidant 4-hydroxynonenal and antioxidants curcumin and melatonin in PC12 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *226*, 161–168.
- Reid, M.B., Lännergren, J., and Westerblad, H. (2002). Respiratory and Limb Muscle Weakness Induced by Tumor Necrosis Factor- α . *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *166*, 479–484.
- Reiken, S., Lacampagne, A., Zhou, H., Kherani, A., Lehnart, S.E., Ward, C., Huang, F., Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Rosemblyt, N., et al. (2003a). PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J. Cell Biol.* *160*, 919–928.
- Reiken, S., Lacampagne, A., Zhou, H., Kherani, A., Lehnart, S.E., Ward, C., Huang, F., Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Rosemblyt, N., et al. (2003b). PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J. Cell Biol.* *160*, 919–928.

- Rizzuto, R., Bernardi, P., and Pozzan, T. (2000). Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J. Physiol.* *529 Pt 1*, 37–47.
- Rockman, H.A., Koch, W.J., and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* *415*, 206–212.
- Romanello, V., Guadagnin, E., Gomes, L., Roder, I., Sandri, C., Petersen, Y., Milan, G., Masiero, E., Del Piccolo, P., Foretz, M., et al. (2010). Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J.* *29*, 1774–1785.
- Ruby, J.R., Dyer, R.F., and Skalko, R.G. (1969). Continuities between mitochondria and endoplasmic reticulum in the mammalian ovary. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria* *1948 97*, 30–37.
- Sacherer, M., Sedej, S., Wakuła, P., Wallner, M., Vos, M.A., Kockskämper, J., Stiegler, P., Sereinigg, M., von Lewinski, D., Antoons, G., et al. (2012). JTV519 (K201) reduces sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and improves diastolic function in vitro in murine and human non-failing myocardium. *Br. J. Pharmacol.* *167*, 493–504.
- Salt, I., Celler, J.W., Hawley, S.A., Prescott, A., Woods, A., Carling, D., and Hardie, D.G. (1998). AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem. J.* *334 (Pt 1)*, 177–187.
- Santel, A., and Frank, S. (2008). Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB Life* *60*, 448–455.
- Sassoon, C.S.H., Caiozzo, V.J., Manka, A., and Sieck, G.C. (2002a). Altered diaphragm contractile properties with controlled mechanical ventilation. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985 92*, 2585–2595.
- Sassoon, C.S.H., Caiozzo, V.J., Manka, A., and Sieck, G.C. (2002b). Altered diaphragm contractile properties with controlled mechanical ventilation. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985 92*, 2585–2595.
- Scarabelli, T.M., Stephanou, A., Pasini, E., Comini, L., Raddino, R., Knight, R.A., and Latchman, D.S. (2002a). Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* *90*, 745–748.
- Scarabelli, T.M., Stephanou, A., Pasini, E., Comini, L., Raddino, R., Knight, R.A., and Latchman, D.S. (2002b). Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* *90*, 745–748.
- Schuhmacher, S., Foretz, M., Knorr, M., Jansen, T., Hortmann, M., Wenzel, P., Oelze, M., Kleschyov, A.L., Daiber, A., Keaney, J.F., et al. (2011). α 1AMP-activated protein kinase preserves endothelial function during chronic angiotensin II treatment by limiting Nox2 upregulation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 560–566.
- Schultz, M.J. (2010). Weaning from mechanical ventilation: stay poised between load and strength. *Anesthesiology* *113*, 273–275.
- Sebastián, D., Hernández-Alvarez, M.I., Segalés, J., Sorianello, E., Muñoz, J.P., Sala, D., Waget, A., Liesa, M., Paz, J.C., Gopalacharyulu, P., et al. (2012). Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 5523–5528.
- Seidlmayer, L.K., Juettner, V.V., Kettlewell, S., Pavlov, E.V., Blatter, L.A., and Dedkova, E.N. (2015). Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia-reperfusion: contributions of Ca²⁺, ROS, pH, and inorganic polyphosphate. *Cardiovasc. Res.* *106*, 237–248.

- Sembrowich, W.L., Quintinskie, J.J., and Li, G. (1985). Calcium uptake in mitochondria from different skeletal muscle types. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 59, 137–141.
- Shan, J., Kushnir, A., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., Li, J., Lehnart, S.E., Lindegger, N., Mongillo, M., Mohler, P.J., and Marks, A.R. (2010a). Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 4388–4398.
- Shan, J., Betzenhauser, M.J., Kushnir, A., Reiken, S., Meli, A.C., Wronska, A., Dura, M., Chen, B.-X., and Marks, A.R. (2010b). Role of chronic ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and β -adrenergic receptor blockade in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 4375–4387.
- Shanely, R.A., Zergeroglu, M.A., Lennon, S.L., Sugiura, T., Yimlamai, T., Enns, D., Belcastro, A., and Powers, S.K. (2002a). Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1369–1374.
- Shanely, R.A., Zergeroglu, M.A., Lennon, S.L., Sugiura, T., Yimlamai, T., Enns, D., Belcastro, A., and Powers, S.K. (2002b). Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1369–1374.
- Shanely, R.A., Zergeroglu, M.A., Lennon, S.L., Sugiura, T., Yimlamai, T., Enns, D., Belcastro, A., and Powers, S.K. (2002c). Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1369–1374.
- Shanely, R.A., Coombes, J.S., Zergeroglu, A.M., Webb, A.I., and Powers, S.K. (2003a). Short-duration mechanical ventilation enhances diaphragmatic fatigue resistance but impairs force production. *Chest* 123, 195–201.
- Shanely, R.A., Coombes, J.S., Zergeroglu, A.M., Webb, A.I., and Powers, S.K. (2003b). Short-duration mechanical ventilation enhances diaphragmatic fatigue resistance but impairs force production. *Chest* 123, 195–201.
- Shanely, R.A., Van Gammeren, D., Deruisseau, K.C., Zergeroglu, A.M., McKenzie, M.J., Yarasheski, K.E., and Powers, S.K. (2004a). Mechanical ventilation depresses protein synthesis in the rat diaphragm. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 994–999.
- Shanely, R.A., Van Gammeren, D., Deruisseau, K.C., Zergeroglu, A.M., McKenzie, M.J., Yarasheski, K.E., and Powers, S.K. (2004b). Mechanical ventilation depresses protein synthesis in the rat diaphragm. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 994–999.
- Shen, W.-W., Frieden, M., and Demareux, N. (2011). Remodelling of the endoplasmic reticulum during store-operated calcium entry. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 103, 365–380.
- Sheng, Z.-H., and Cai, Q. (2012). Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 77–93.
- Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483–487.
- Shirwany, N.A., and Zou, M.-H. (2010). AMPK in cardiovascular health and disease. *Acta Pharmacol. Sin.* 31, 1075–1084.
- Sinderby, C., Navalesi, P., Beck, J., Skrobik, Y., Comtois, N., Friberg, S., Gottfried, S.B., and Lindström, L. (1999). Neural control of mechanical ventilation in respiratory failure. *Nat. Med.* 5, 1433–1436.

- Singh, K., and Hood, D.A. (2011). Effect of denervation-induced muscle disuse on mitochondrial protein import. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *300*, C138–C145.
- Smuder, A.J., Kavazis, A.N., Hudson, M.B., Nelson, W.B., and Powers, S.K. (2010). Oxidation enhances myofibrillar protein degradation via calpain and caspase-3. *Free Radic. Biol. Med.* *49*, 1152–1160.
- Steinberg, G.R., Macaulay, S.L., Febbraio, M.A., and Kemp, B.E. (2006). AMP-activated protein kinase--the fat controller of the energy railroad. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *84*, 655–665.
- Stephanou, A., Scarabelli, T.M., Townsend, P.A., Bell, R., Yellon, D., Knight, R.A., and Latchman, D.S. (2002a). The carboxyl-terminal activation domain of the STAT-1 transcription factor enhances ischemia/reperfusion-induced apoptosis in cardiac myocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *16*, 1841–1843.
- Stephanou, A., Scarabelli, T.M., Townsend, P.A., Bell, R., Yellon, D., Knight, R.A., and Latchman, D.S. (2002b). The carboxyl-terminal activation domain of the STAT-1 transcription factor enhances ischemia/reperfusion-induced apoptosis in cardiac myocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *16*, 1841–1843.
- Sukhanov, S., Semprun-Prieto, L., Yoshida, T., Michael Tabony, A., Higashi, Y., Galvez, S., and Delafontaine, P. (2011). Angiotensin II, oxidative stress and skeletal muscle wasting. *Am. J. Med. Sci.* *342*, 143–147.
- Supinski, G.S., and Callahan, L.A. (2006). Caspase activation contributes to endotoxin-induced diaphragm weakness. *J. Appl. Physiol.* *100*, 1770–1777.
- Susankova, K., Tousova, K., Vyklicky, L., Teisinger, J., and Vlachova, V. (2006). Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current. *Mol. Pharmacol.* *70*, 383–394.
- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., and Mihara, K. (2007). Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* *282*, 11521–11529.
- Takahashi, N., and Mori, Y. (2011). TRP Channels as Sensors and Signal Integrators of Redox Status Changes. *Front. Pharmacol.* *2*, 58.
- Tang, H., Lee, M., Budak, M.T., Pietras, N., Hittinger, S., Vu, M., Khuong, A., Hoang, C.D., Hussain, S.N.A., Levine, S., et al. (2011a). Intrinsic apoptosis in mechanically ventilated human diaphragm: linkage to a novel Fos/FoxO1/Stat3-Bim axis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *25*, 2921–2936.
- Tang, H., Lee, M., Budak, M.T., Pietras, N., Hittinger, S., Vu, M., Khuong, A., Hoang, C.D., Hussain, S.N.A., Levine, S., et al. (2011b). Intrinsic apoptosis in mechanically ventilated human diaphragm: linkage to a novel Fos/FoxO1/Stat3-Bim axis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *25*, 2921–2936.
- Tang, H., Lee, M., Budak, M.T., Pietras, N., Hittinger, S., Vu, M., Khuong, A., Hoang, C.D., Hussain, S.N.A., Levine, S., et al. (2011c). Intrinsic apoptosis in mechanically ventilated human diaphragm: linkage to a novel Fos/FoxO1/Stat3-Bim axis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *25*, 2921–2936.
- Tang, H., Lee, M., Khuong, A., Wright, E., and Shrager, J.B. (2013a). Diaphragm muscle atrophy in the mouse after long-term mechanical ventilation. *Muscle Nerve* *48*, 272–278.
- Tang, H., Lee, M., Khuong, A., Wright, E., and Shrager, J.B. (2013b). Diaphragm muscle atrophy in the mouse after long-term mechanical ventilation. *Muscle Nerve* *48*, 272–278.
- Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *445*, 77–88.

- Terentyev, D., Györke, I., Belevych, A.E., Terentyeva, R., Sridhar, A., Nishijima, Y., de Blanco, E.C., Khanna, S., Sen, C.K., Cardounel, A.J., et al. (2008). Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in chronic heart failure. *Circ. Res.* *103*, 1466–1472.
- Terzi, N., Pelieu, I., Guittet, L., Ramakers, M., Seguin, A., Daubin, C., Charbonneau, P., du Cheyron, D., and Lofaso, F. (2010). Neurally adjusted ventilatory assist in patients recovering spontaneous breathing after acute respiratory distress syndrome: physiological evaluation. *Crit. Care Med.* *38*, 1830–1837.
- Thomas, D., Maes, K., Agten, A., Heunks, L., Dekhuijzen, R., Decramer, M., Van Hees, H., and Gayan-Ramirez, G. (2013). Time course of diaphragm function recovery after controlled mechanical ventilation in rats. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* *115*, 775–784.
- Thomason, D.B., Biggs, R.B., and Booth, F.W. (1989). Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am. J. Physiol.* *257*, R300–R305.
- Tischler, M.E., Rosenberg, S., Satarug, S., Henriksen, E.J., Kirby, C.R., Tome, M., and Chase, P. (1990). Different mechanisms of increased proteolysis in atrophy induced by denervation or unweighting of rat soleus muscle. *Metabolism.* *39*, 756–763.
- Tisdale, M.J. (2007). Is there a common mechanism linking muscle wasting in various disease types? *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* *1*, 287–292.
- Tondera, D., Santel, A., Schwarzer, R., Dames, S., Giese, K., Klippel, A., and Kaufmann, J. (2004). Knockdown of MTP18, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent protein, affects mitochondrial morphology and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 31544–31555.
- Tondera, D., Czauderna, F., Paulick, K., Schwarzer, R., Kaufmann, J., and Santel, A. (2005). The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Sci.* *118*, 3049–3059.
- Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., et al. (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* *28*, 1589–1600.
- Toyama, E.Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T.L., Losón, O.C., Hellberg, K., Young, N.P., Chen, H., Polleux, F., Chan, D.C., et al. (2016). Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science* *351*, 275–281.
- Toyoda, T., Hayashi, T., Miyamoto, L., Yonemitsu, S., Nakano, M., Tanaka, S., Ebihara, K., Masuzaki, H., Hosoda, K., Inoue, G., et al. (2004). Possible involvement of the alpha1 isoform of 5'AMP-activated protein kinase in oxidative stress-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *287*, E166–E173.
- Trebak, M., Ginnan, R., Singer, H.A., and Jourd'heuil, D. (2010). Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. *Antioxid. Redox Signal.* *12*, 657–674.
- Turan, B., and Vassort, G. (2011a). Ryanodine receptor: a new therapeutic target to control diabetic cardiomyopathy. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 1847–1861.
- Turan, B., and Vassort, G. (2011b). Ryanodine receptor: a new therapeutic target to control diabetic cardiomyopathy. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 1847–1861.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* *27*, 433–446.

- Uchida, K., Dezaki, K., Damdindorj, B., Inada, H., Shiuchi, T., Mori, Y., Yada, T., Minokoshi, Y., and Tominaga, M. (2011). Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. *Diabetes* *60*, 119–126.
- Unroe, M., Kahn, J.M., Carson, S.S., Govert, J.A., Martinu, T., Sathy, S.J., Clay, A.S., Chia, J., Gray, A., Tulskey, J.A., et al. (2010). One-year trajectories of care and resource utilization for recipients of prolonged mechanical ventilation: a cohort study. *Ann. Intern. Med.* *153*, 167–175.
- van der Blik, A.M., Shen, Q., and Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.
- Van Gammeren, D., Falk, D.J., Deering, M.A., Deruisseau, K.C., and Powers, S.K. (2007b). Diaphragmatic nitric oxide synthase is not induced during mechanical ventilation. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *102*, 157–162.
- Van Gammeren, D., Falk, D.J., Deering, M.A., Deruisseau, K.C., and Powers, S.K. (2007c). Diaphragmatic nitric oxide synthase is not induced during mechanical ventilation. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *102*, 157–162.
- Vassilakopoulos, T., and Petrof, B.J. (2004). Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *169*, 336–341.
- Vazquez, G. (2012). TRPC channels as prospective targets in atherosclerosis: terra incognita. *Front. Biosci. Sch. Ed.* *4*, 157–166.
- Vijayan, K., Thompson, J.L., Norenberg, K.M., Fitts, R.H., and Riley, D.A. (2001a). Fiber-type susceptibility to eccentric contraction-induced damage of hindlimb-unloaded rat AL muscles. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *90*, 770–776.
- Vijayan, K., Thompson, J.L., Norenberg, K.M., Fitts, R.H., and Riley, D.A. (2001b). Fiber-type susceptibility to eccentric contraction-induced damage of hindlimb-unloaded rat AL muscles. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *90*, 770–776.
- Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* *175*, 237–247.
- Wagatsuma, A., Kotake, N., Mabuchi, K., and Yamada, S. (2011). Expression of nuclear-encoded genes involved in mitochondrial biogenesis and dynamics in experimentally denervated muscle. *J. Physiol. Biochem.* *67*, 359–370.
- Wang, null (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference?, by Kevin K.W. Wang. Vol. 23, pp. 20–26. *Trends Neurosci.* *23*, 59.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., and Reed, J.C. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* *284*, 339–343.
- Wang, S., Zhang, M., Liang, B., Xu, J., Xie, Z., Liu, C., Viollet, B., Yan, D., and Zou, M.-H. (2010a). AMPK α 2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes. *Circ. Res.* *106*, 1117–1128.
- Wang, S., Dale, G.L., Song, P., Viollet, B., and Zou, M.-H. (2010b). AMPK α 1 deletion shortens erythrocyte life span in mice: role of oxidative stress. *J. Biol. Chem.* *285*, 19976–19985.

- Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y.L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., LaVoie, M.J., and Schwarz, T.L. (2011). PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* 147, 893–906.
- Ward, C.W., Reiken, S., Marks, A.R., Marty, I., Vassort, G., and Lacampagne, A. (2003). Defects in ryanodine receptor calcium release in skeletal muscle from post-myocardial infarct rats. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17, 1517–1519.
- Wasiak, S., Zunino, R., and McBride, H.M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J. Cell Biol.* 177, 439–450.
- Wasilewski, M., and Scorrano, L. (2009). The changing shape of mitochondrial apoptosis. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 20, 287–294.
- Waterham, H.R., Koster, J., van Roermund, C.W.T., Mooyer, P.A.W., Wanders, R.J.A., and Leonard, J.V. (2007). A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N. Engl. J. Med.* 356, 1736–1741.
- Watson, A.C., Hughes, P.D., Louise Harris, M., Hart, N., Ware, R.J., Wendon, J., Green, M., and Moxham, J. (2001). Measurement of twitch transdiaphragmatic, esophageal, and endotracheal tube pressure with bilateral anterolateral magnetic phrenic nerve stimulation in patients in the intensive care unit. *Crit. Care Med.* 29, 1325–1331.
- Webster, K.A. (2012). Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. *Future Cardiol.* 8, 863–884.
- Weiss, N., Andrianjafiniony, T., Dupré-Aucouturier, S., Pouvreau, S., Desplanches, D., and Jacquemond, V. (2010). Altered myoplasmic Ca²⁺ handling in rat fast-twitch skeletal muscle fibres during disuse atrophy. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 459, 631–644.
- Whidden, M.A., McClung, J.M., Falk, D.J., Hudson, M.B., Smuder, A.J., Nelson, W.B., and Powers, S.K. (2009a). Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 106, 385–394.
- Whidden, M.A., McClung, J.M., Falk, D.J., Hudson, M.B., Smuder, A.J., Nelson, W.B., and Powers, S.K. (2009b). Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 106, 385–394.
- Whidden, M.A., McClung, J.M., Falk, D.J., Hudson, M.B., Smuder, A.J., Nelson, W.B., and Powers, S.K. (2009c). Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 106, 385–394.
- Whidden, M.A., Smuder, A.J., Wu, M., Hudson, M.B., Nelson, W.B., and Powers, S.K. (2010a). Oxidative stress is required for mechanical ventilation-induced protease activation in the diaphragm. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 108, 1376–1382.
- Whidden, M.A., Smuder, A.J., Wu, M., Hudson, M.B., Nelson, W.B., and Powers, S.K. (2010b). Oxidative stress is required for mechanical ventilation-induced protease activation in the diaphragm. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 108, 1376–1382.
- Whidden, M.A., Smuder, A.J., Wu, M., Hudson, M.B., Nelson, W.B., and Powers, S.K. (2010c). Oxidative stress is required for mechanical ventilation-induced protease activation in the diaphragm. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 108, 1376–1382.

- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M., and Nunnari, J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.* *151*, 341–352.
- Xu, S.-Z., Sukumar, P., Zeng, F., Li, J., Jairaman, A., English, A., Naylor, J., Ciurtin, C., Majeed, Y., Milligan, C.J., et al. (2008). TRPC channel activation by extracellular thioredoxin. *Nature* *451*, 69–72.
- Yamamoto, S., Shimizu, S., Kiyonaka, S., Takahashi, N., Wajima, T., Hara, Y., Negoro, T., Hiroi, T., Kiuchi, Y., Okada, T., et al. (2008). TRPM2-mediated Ca²⁺ influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat. Med.* *14*, 738–747.
- Yamano, K., and Youle, R.J. (2011). Coupling mitochondrial and cell division. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1026–1027.
- Yamano, K., and Youle, R.J. (2013). PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy* *9*, 1758–1769.
- Yan, Y., Wei, C., Zhang, W., Cheng, H., and Liu, J. (2006). Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol. Sin.* *27*, 821–826.
- Yang, L., Luo, J., Bourdon, J., Lin, M.-C., Gottfried, S.B., and Petrof, B.J. (2002a). Controlled mechanical ventilation leads to remodeling of the rat diaphragm. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *166*, 1135–1140.
- Yang, L., Luo, J., Bourdon, J., Lin, M.-C., Gottfried, S.B., and Petrof, B.J. (2002b). Controlled mechanical ventilation leads to remodeling of the rat diaphragm. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *166*, 1135–1140.
- Yaniv, Y., Sivan, R., and Landesberg, A. (2005a). Analysis of hystereses in force length and force calcium relations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *288*, H389–H399.
- Yaniv, Y., Sivan, R., and Landesberg, A. (2005b). Analysis of hystereses in force length and force calcium relations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *288*, H389–H399.
- Yonashiro, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H., et al. (2006a). A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J.* *25*, 3618–3626.
- Yonashiro, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H., et al. (2006b). A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J.* *25*, 3618–3626.
- Youle, R.J., and Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 657–663.
- Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* *337*, 1062–1065.
- Yu, T., Robotham, J.L., and Yoon, Y. (2006a). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2653–2658.
- Yu, T., Robotham, J.L., and Yoon, Y. (2006b). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2653–2658.
- Yu, T., Sheu, S.-S., Robotham, J.L., and Yoon, Y. (2008a). Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc. Res.* *79*, 341–351.

- Yu, T., Sheu, S.-S., Robotham, J.L., and Yoon, Y. (2008b). Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc. Res.* *79*, 341–351.
- Yu, T., Jhun, B.S., and Yoon, Y. (2011). High-glucose stimulation increases reactive oxygen species production through the calcium and mitogen-activated protein kinase-mediated activation of mitochondrial fission. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 425–437.
- Zergeroglu, M.A., McKenzie, M.J., Shanely, R.A., Van Gammeren, D., DeRuisseau, K.C., and Powers, S.K. (2003). Mechanical ventilation-induced oxidative stress in the diaphragm. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *95*, 1116–1124.
- Zhu, E., Sassoon, C.S.H., Nelson, R., Pham, H.T., Zhu, L., Baker, M.J., and Caiozzo, V.J. (2005a). Early effects of mechanical ventilation on isotonic contractile properties and MAF-box gene expression in the diaphragm. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *99*, 747–756.
- Zhu, E., Sassoon, C.S.H., Nelson, R., Pham, H.T., Zhu, L., Baker, M.J., and Caiozzo, V.J. (2005b). Early effects of mechanical ventilation on isotonic contractile properties and MAF-box gene expression in the diaphragm. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *99*, 747–756.
- Zick, M., Rabl, R., and Reichert, A.S. (2009). Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 5–19.
- Zima, A.V., and Blatter, L.A. (2006). Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc. Res.* *71*, 310–321.
- Ziviani, E., Tao, R.N., and Whitworth, A.J. (2010). Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 5018–5023.
- Zmijewski, J.W., Banerjee, S., Bae, H., Friggeri, A., Lazarowski, E.R., and Abraham, E. (2010). Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* *285*, 33154–33164.
- Zou, M.-H., Hou, X.-Y., Shi, C.-M., Kirkpatrick, S., Liu, F., Goldman, M.H., and Cohen, R.A. (2003). Activation of 5'-AMP-activated kinase is mediated through c-Src and phosphoinositide 3-kinase activity during hypoxia-reoxygenation of bovine aortic endothelial cells. Role of peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* *278*, 34003–34010.
- Zou, M.-H., Kirkpatrick, S.S., Davis, B.J., Nelson, J.S., Wiles, W.G., Schlattner, U., Neumann, D., Brownlee, M., Freeman, M.B., and Goldman, M.H. (2004). Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.* *279*, 43940–43951.
- Zunino, R., Schauss, A., Rippstein, P., Andrade-Navarro, M., and McBride, H.M. (2007). The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J. Cell Sci.* *120*, 1178–1188.
- The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. - PubMed - NCBI.

Résumé

La ventilation mécanique (VM) est le premier traitement en réanimation du syndrome de détresse respiratoire aiguë permettant de maintenir une oxygénation tissulaire suffisante. Mais elle induit une atteinte de la fonction contractile des muscles respiratoires, principalement le diaphragme, augmentant ainsi la dépendance du patient vis à vis de son ventilateur. Cette pathologie musculaire acquise est appelée dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation (VIDD). L'objectif de cette thèse est de proposer, à partir d'un modèle murin de ventilation mécanique, les mécanismes physiopathologiques précoces impliqués dans cette dysfonction, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans la prévention de cette pathologie musculaire.

Nous avons montré en effet la présence, après 6 heures de ventilation mécanique chez la souris, d'un stress oxydant d'origine mitochondrial à la base d'une oxydation du récepteur à la ryanodine (RyR1), principal canal calcique impliqué dans le couplage excitation-contraction (CEC). Nous avons également montré la présence au bout d'un temps de ventilation mécanique équivalent, d'une phosphorylation de ce même canal, du fait d'une activation de la voie des protéines kinases, secondaire à un stress adrénergique. Nous avons également démontré que ces deux modifications post-traductionnelles du RyR1 devaient être synergiques pour induire la perte de liaison avec sa protéine stabilisatrice calstabin1 et conséquemment une atteinte fonctionnelle du canal avec fuite calcique dans le cytosol. Dans ces travaux de thèse, nous montrons également, que ces anomalies de l'homéostasie calcique observées après 6 heures de ventilation mécanique, induisaient au bout de 12 heures de ventilation une activation secondaire de la protéolyse dépendante du calcium, associée à une atrophie. Ainsi, ces résultats montrent l'intérêt de toutes thérapeutiques permettant de stabiliser la liaison entre le canal RyR1 et sa protéine régulatrice calstabin1 dans la prévention de la VIDD. En effet, nous avons observé chez la souris, qu'un traitement anti-oxydant spécifique de la mitochondrie (SS-31) ou qu'un traitement β -bloquant spécifique de la voie β 2-adrénergique (ICI-118551) ou qu'un traitement qui stabilise directement la liaison RyR1-calstabin1 (S107) permettaient de prévenir les troubles précoces de l'homéostasie calcique et l'apparition secondaire d'une protéolyse et d'une atrophie induite par la ventilation mécanique. Enfin, dans le dernier travail de ma thèse, je propose que la production de ROS mitochondriale, puisse être associée à un remodelage du réseau mitochondrial avec prépondérance d'un phénomène de fission des mitochondries. Ce remodelage, pourrait être considéré comme une adaptation de la mitochondrie du fait d'une rupture brutale de l'équilibre entre production et consommation d'énergie par la fibre musculaire.

En effet, nous montrons qu'un inhibiteur de la fission mitochondriale (P110), qui bloque la liaison entre la protéine Drp1 et son récepteur, dans notre modèle animal de ventilation mécanique, pouvait prévenir l'apparition d'une VIDD. Ainsi dans la continuité de ses derniers travaux, afin de faire le lien entre fission mitochondriale et stress oxydant à la base des troubles de l'homéostasie calcique, j'espère montrer que ce traitement, au cours de la ventilation mécanique, limite la production de ROS mitochondriale, l'oxydation du canal RyR1, ainsi que la fuite calcique à travers le RyR1. Ces derniers travaux, mettraient en avant toute thérapeutique permettant de limiter les phénomènes de fission mitochondriale et ses conséquences dans la prévention de la VIDD.

Mots clés : RyR, mitochondrie, dysfonction contractile, VIDD, stress oxydant

Abstract

Mechanical ventilation (MV) is the first treatment in intensive care for acute respiratory distress syndrome to maintain adequate tissue oxygenation. However, it induces an impairment of the contractile function of the respiratory muscles, particularly the diaphragm, thereby increasing the patient's dependence on his ventilator. This acquired muscle disease has been termed ventilator induced diaphragmatic dysfunction (VIDD). The aim of this thesis is to identify, from a mouse model of mechanical ventilation, early pathophysiologic mechanisms involved in this dysfunction, and to identify new therapeutic targets in preventing VIDD.

We observed after 6 hours of mechanical ventilation, a mitochondrial oxidative stress that induces ryanodine receptor (RyR1) oxidation, the main calcium channel involved in the excitation-contraction coupling (ECC). We also showed the presence after an equivalent time of mechanical ventilation, phosphorylation of RyR1, due to protein kinase activation, secondary to an adrenergic stress. Then, we have demonstrated that these post-translational modifications of RyR1 should be necessarily associated to trigger a functional impairment of RyR1 with calcium leakage from the sarcoplasmic reticulum to the cytosol, due to the loss of connection between RyR1 and the stabilizing protein calstabin1. In his thesis, we also showed that these calcium homeostasis disorders, induced by 12 hours of ventilation, secondary activates the calcium-dependent proteolysis pathways and atrophy. Thus, these results show the benefit of all therapy stabilizing the connection between the RyR1 channel and the calstabin1 protein to prevent VIDD. Indeed, were observed in mice, that a specific mitochondrial anti-oxidant treatment (SS-31), or a specific β -blocker treatment of β 2 adrenergic pathway (ICI-118551) or a treatment that stabilizes directly calstabin1- binding RyR1 (S107) prevent early disorders of calcium homeostasis and secondary appearance of proteolysis and atrophy induced by mechanical ventilation. Finally, in the last part of my thesis work, I suggest that mitochondrial ROS production may be associated with remodeling of the mitochondrial network with a preponderance of mitochondrial fission phenomenon. This remodeling could be seen as an adaptation of the mitochondria due to a sudden mismatch between energy production and consumption.

Indeed, we showed that an inhibitor of the mitochondrial fission (P110), which blocks the connection between the DRP1 protein and its receptor in our animal model of mechanical ventilation, could prevent the appearance of VIDD. Thus the continuity of this last work of my thesis is to make the link between mitochondrial fission and oxidative stress underlying the disorders of calcium homeostasis. Indeed, I hope to show that this treatment during mechanical ventilation may decrease mitochondrial ROS production, oxidation of RyR1 channel and calcium leak through the RyR1. This last work will emphasis any therapeutic which limit mitochondrial fission and its consequences, to prevent VIDD.

Keywords: RyR1, mitochondria, contractile dysfunction, VIDD, oxidative stress