



HAL
open science

L'accumulation du cholestérol et des oxystérols mitochondriaux lors de la reperfusion du myocarde ischémique : mécanismes et implication dans la cardioprotection

Julien Musman

► To cite this version:

Julien Musman. L'accumulation du cholestérol et des oxystérols mitochondriaux lors de la reperfusion du myocarde ischémique : mécanismes et implication dans la cardioprotection. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2017. Français. NNT : 2017PESC0016 . tel-01761733

HAL Id: tel-01761733

<https://theses.hal.science/tel-01761733>

Submitted on 9 Apr 2018

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.

UNIVERSITE PARIS-EST

ECOLE DOCTORALE : ED402 Science de la Vie et de la Santé

Année 2017

Série Doctorat n° :

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de

Docteur de l'université PARIS-EST

par

Mr Julien Musman

**L'accumulation du cholestérol et des oxystérols mitochondriaux
lors de la reperfusion du myocarde ischémique : mécanismes et
implication dans la cardioprotection**

Soutenue le 7 novembre 2017

Thèse dirigée par Mr le Dr Didier Morin

Composition du jury :

<i>Président du jury :</i>	Mr le Pr Alain Berdeaux
<i>Rapporteurs :</i>	Mr le Dr Jean-Jacques Lacapere
	Mr le Dr Gérard Lizard
<i>Examineurs :</i>	Mme le Pr Catherine Marchand-Leroux
	Mme le Dr Sandrine Pons
	Mr le Pr Thierry Martens
	Mr le Dr Didier Morin

Remerciements

Je remercie tout d'abord le **Professeur Alain Berdeaux** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire afin que je puisse effectuer ce travail de thèse, pour sa grande gentillesse, ainsi que pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma soutenance de thèse.

Un grand merci également au **Professeur Bijan Ghaleh**, pour votre implication dans ce projet et pour les nombreux conseils que vous m'avez prodigué tout au long des réunions d'équipes régulières pour lesquelles vous avez mis un point d'honneur à être présent malgré un planning très chargé.

Je remercie aussi particulièrement le **Docteur Didier Morin** pour avoir dirigé ma thèse tout au long de ces quatre années, ainsi que pour la bienveillance et la patience sans faille dont vous avez fait preuve à mon égard.

Je remercie le **Docteur Jean-Jacques Lacapere** et le **Docteur Gérard Lizard** pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie aussi le **Docteur Sandrine Pons** pour son implication dans ce projet, ainsi que pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le **Professeur Catherine Marchand-Leroux** pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le **Professeur Thierry Martens** pour avoir accepté d'examiner ce travail, mais aussi pour m'avoir accueilli dans son laboratoire afin que je puisse y effectuer une partie de ce projet de thèse. Un travail qui a été effectué sous l'encadrement du **Docteur Michael Rivard** que je remercie à la fois pour son implication et son expertise en chimie organique qui ont été indispensables à la réalisation de ce projet. Je profite aussi de l'occasion pour remercier le **Docteur Isabelle Lachaise** pour l'important travail de mise au point qu'elle effectue au moment où j'écris ces mots.

Je remercie **Nicolas Eychenne** pour le temps qu'il a passé à me former à mon arrivée dans ce laboratoire aux différents protocoles qui m'ont été nécessaires pour ce projet.

Je remercie également le **Docteur Benjamin Haas**, **Jérémie Bornères** et **Mathieu Panel** avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler mais aussi à passer du temps en dehors du cadre professionnel notamment lors de soirées jeux de société palpitantes.

Je tiens aussi à m'excuser auprès du **Docteur Sarah Kobeissi** et du **Docteur Cindy Gueguen** pour toutes les remarques assez désobligeantes qui furent échangées durant le temps où nous avons travaillé ensemble, bien que cela ait toujours été sans la moindre once de méchanceté dans un sens comme dans l'autre. Je vous remercie pour avoir grandement animé la vie dans le laboratoire.

Je remercie le **Docteur Alexandra d'Anglemont de Tassigny** pour sa bonne humeur constante, ainsi que pour m'avoir permis d'effectuer une quatrième année de thèse qui m'a été indispensable et m'a donné l'occasion de découvrir l'enseignement, une expérience qui m'a été très précieuse.

Je remercie également le **Docteur Caroline Barau**, avec qui j'ai apprécié travailler, **Sandrine Bonizec** et **Marie-Jacqueline Chérubin**, pour leur aide durant les nombreuses occasions où celle-ci me fut nécessaire, mais aussi l'ensemble des autres membres qui ont fait ou font encore partie de l'équipe 3 que je n'ai pas cité mais que j'ai grandement apprécié côtoyer.

Bien que leur passage parmi nous fût bref, je remercie **Yassin Massoudi** et **Shirin Leick** pour leur contribution dans ce projet dans le cadre de leur formation.

Pour l'important travail qu'il a rendu possible dans son laboratoire et qui a été indispensable dans le contrôle du notre, je remercie le **Docteur Valerio Leoni**.

Enfin je remercie tous les membres de ma famille et l'ensemble de mes amis qui m'ont grandement soutenu moralement tout au long de ce travail de thèse et qui ont su se montrer patient avec moi durant le temps où je fus peu disponible pour eux.

Sommaire

LISTE DES FIGURES :	7
GLOSSAIRE	10
PARTIE I – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	12
CHAPITRE I.I. L’INFARCTUS DU MYOCARDE	13
1. Définition de l’infarctus du myocarde.....	13
2. Physiopathologie	15
2.1. Cause de la pathologie.....	15
2.2. Effet de l’ischémie sur le myocarde	18
2.3. Effets de la reperfusion sur le myocarde	21
3. Stratégies cardioprotectrices.....	23
3.1. Inhibition de l’ouverture du mPTP.....	24
3.2. Exercice physique.....	24
3.3. Traitement anti-inflammatoire.....	25
3.4. Monoxyde d’azote.....	26
3.5. Paradoxe du pH	26
3.6. Hypothermie corporelle.....	26
3.7. Pré- et post-conditionnement ischémique.....	27
3.8. Effet de facteurs de comorbidité sur l’effet des stratégies cardioprotectrices	28
3.8.1. Le vieillissement.....	29
3.8.2. Le diabète	30
3.8.3. L’obésité.....	30
3.8.4. L’hypercholestérolémie.....	31
CHAPITRE I.II LE CHOLESTEROL	33
1. Définition du cholestérol	33
2. Synthèse du cholestérol.....	35
3. Absorption du cholestérol.....	37
4. Transport du cholestérol dans l’organisme.....	40
5. Régulation du cholestérol dans l’organisme.....	41
5.1. Régulation de l’anabolisme du cholestérol.....	42
5.2. Régulation du catabolisme du cholestérol.....	42
6. Transport du cholestérol à la mitochondrie	44
6.1. La protéine translocatrice (TSPO).....	44
6.2. La protéine TSPO dans le cœur.....	47
6.3. La “Steroidogenic Acute Regulatory protein” (StAR).....	49
6.4. La protéine StAR dans le cœur.....	52
6.5. Un complexe multiprotéique incluant les protéines TSPO et StAR ?.....	52

CHAPITRE I.III LES DERIVES OXYDES DU CHOLESTEROL : LES OXYSTEROLS.....	55
1. Synthèse des oxystérols.....	55
2. Rôle des oxystérols.....	57
2.1. Implication dans la régulation du cholestérol.....	57
2.1.1. Elimination du cholestérol.....	57
2.1.2. Synthèse du cholestérol.....	58
2.2. Toxicité des oxystérols.....	59
2.2.1. Effet pro-apoptotique des oxystérols.....	59
2.2.2. Les récepteur aux œstrogènes.....	60
2.2.3. Implication des oxystérols dans différentes pathologies.....	61
OBJECTIFS.....	63
PARTIE II – ETUDE EXPERIMENTALE	67
CHAPITRE II.I. METHODOLOGIE ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.....	68
1. Modèles animaux utilisés.....	68
2. Ischémie-reperfusion myocardique chez le rat et la souris.....	70
2.1. Préparation des animaux.....	70
2.2. Procédure chirurgicale.....	70
2.3. Traitement des animaux.....	71
2.3.1. Administration du 4 ^e -chlorodiazépam.....	71
2.3.2. Administration de pravastatine.....	72
2.4. Protocole d'exercice physique chez la souris.....	72
3. Isolement de plasmas.....	73
4. Préparation des extraits mitochondriaux et cytosoliques à partir de tissu.....	73
4.1. Isolement des mitochondries et purification des cytosols.....	73
4.2. Dosage des protéines mitochondriales et cytosoliques.....	74
5. Mesure de l'activité mitochondriale.....	75
5.1. Respiration mitochondriale.....	75
5.2. Mesure de la capacité de rétention calcique.....	76
5.3. Effet des oxystérols sur les fonctions mitochondriales.....	77
6. Amplification en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) en temps réel.....	78
6.1. Extraction d'ARN.....	78
6.2. Reverse transcription (RT) en ADN complémentaire.....	78
6.3. qPCR en temps réel.....	79
7. Quantification d'expression protéique par Western-blot.....	80
8. Evaluation de l'activité du cytochrome 11A1.....	81
8.1. Synthèse de la sonde : cholestérol-résorufine.....	82
8.2. Observation de l'activité du cytochrome.....	84
9. Dosage des stérols par spectrométrie de masse.....	84
10. Isolement de cardiomyocytes de rat.....	85
11. Evaluation de la viabilité des cardiomyocytes.....	86

11.1.	Mise en culture des cellules.....	86
11.2.	Coloration au bleu de trypan	86
12.	Tests statistiques.....	87
CHAPITRE II.II. RESULTATS EXPERIMENTAUX.....		88
Résultats 1 : Le 4'-chlorodiazépam inhibe les dysfonctions mitochondriales et l'accumulation de stérols dans les mitochondries au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique chez les rats hypercholestérolémiques.....		
		88
1.	Objectif de l'étude	88
2.	Protocoles expérimentaux	89
3.	Résultats obtenus.....	89
3.1.	Effet de l'hypercholestérolémie sur les stérols au niveau des cellules cardiaques.....	89
3.2.	Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique chez les rats ZDF fa/fa.....	90
3.3.	Effet du 4'-chlorodiazépam au cours de l'ischémie-reperfusion du myocarde chez les rats ZDF fa/fa.....	90
4.	Conclusion.....	90
Résultats 2 : Implication des oxystérols dans les lésions myocardiques liées à la reperfusion ainsi que dans les stratégies cardioprotectrices.....		
		92
1.	Objectif de l'étude	92
2.	Protocoles expérimentaux	93
2.1.	Observation de l'effet des oxystérols sur les cellules cardiaques.....	93
2.2.	Protocoles de protection du myocarde ischémiq.....	93
3.	Résultats obtenus.....	94
3.1.	Effet du cholestérol et des oxystérols sur les cellules cardiaques	94
3.1.1.	Effet des oxystérols au niveau des mitochondries cardiaques.....	94
3.1.2.	Effet du cholestérol et des oxystérols sur la survie cellulaire.....	95
3.2.	Effet de la diminution du stress oxydant chez des souris témoins et obèses.....	97
3.2.1.	Effet de l'hypercholestérolémie sur les concentrations en stérols mitochondriaux cardiaques chez la souris	97
3.2.2.	L'ischémie-reperfusion est responsable d'une augmentation des stérols et des oxystérols mitochondriaux à la fois chez les souris témoins et obèses	97
3.2.3.	L'exercice physique limite l'accumulation des stérols et oxystérols mitochondriaux causée par l'ischémie-reperfusion.....	98
3.2.4.	Conclusions	98
3.3.	Effet de la diminution de la synthèse de cholestérol au moyen d'une statine	100
3.3.1.	Effet sur les fonctions mitochondriales	100
3.3.2.	Effet sur les stérols cardiaques aux niveaux cytosolique et mitochondrial	101
4.	Conclusion.....	103
Résultats 3 : Identification des mécanismes intervenants dans l'accumulation du cholestérol mitochondrial à la suite d'une ischémie-reperfusion myocardique.....		
		104
1.	Objectif de l'étude	104
2.	Protocoles expérimentaux	105
3.	Résultats obtenus.....	106

3.1. Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur la dégradation enzymatique du cholestérol mitochondrial	106
3.2. Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie.....	108
3.3. Effet de stratégies cardioprotectrices sur l'expression de la protéine StAR.....	113
4. Conclusion.....	115
CHAPITRE II.III. DISCUSSION GENERALE :.....	116
1. Implication des oxystérols dans les lésions de reperfusion du myocarde ischémiq.....	116
2. Mécanismes à l'origine de l'accumulation du cholestérol mitochondrial lors de la reperfusion du myocarde ischémiq.....	121
CONCLUSION ET PERSPECTIVES :	125
COMMUNICATIONS ET CONGRES	127
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	128

Liste des figures :

Figure 1 : Evolution des lésions ischémiques cardiaques en fonction du temps.....	14
Figure 2 : Etapes de la formation d'une plaque d'athérosclérose jusqu'à sa rupture.....	17
Figure 3 : Schéma illustrant la phosphorylation oxydative mitochondrial	19
Figure 4 : Evolution des lésions myocardiques au cours d'un épisode d'ischémie-reperfusion.....	21
Figure 5 : Schéma explicatif des conséquences de l'ischémie-reperfusion cardiaque au niveau cellulaire.....	22
Figure 6 : Chronogrammes illustrant les protocoles de pré et post-conditionnements ischémiques cardiaques	27
Figure 7 : Structure du cholestérol	33
Figure 8 : Schéma de la structure des lipoprotéines et tableau récapitulatif des différentes lipoprotéines et de leur composition	34
Figure 9 : Voie de synthèse du squalène par condensation de molécules dérivées du mévalonate	36
Figure 10 : Voies de synthèse du cholestérol à partir de squalène	37
Figure 11 : Schéma récapitulatif de l'absorption par les entérocytes du cholestérol présent au sein des micelles dans la lumière de l'intestin	39
Figure 12 : Voies de synthèse hépatique des deux principaux acides biliaires	43
Figure 13 : Transport de la protéine TSPO au niveau de la membrane mitochondriale externe.....	45
Figure 14 : Schéma illustrant les modifications post-traductionnelles de la protéine StAR régulant son activité	51
Figure 15 : Schéma du transfert du cholestérol cytosolique jusqu'au CYP11A1 grâce au transducéosome	53

Figure 16 : Schéma présentant la synthèse des principaux oxystérols étudiés dans ce travail à partir du cholestérol.....	56
Tableau 1 : Enzymes impliquées dans la synthèse des oxystérols.....	57
Figure 17 : Effet d'un ligand du TSPO, le 4'-chlorodiazepam, sur le cholestérol mitochondrial au cours de l'ischémie-reperfusion du myocarde.....	64
Figure 18 : Effet d'un ligand du TSPO, le 4'-chlorodiazepam, sur les oxystérols mitochondriaux au cours de l'ischémie-reperfusion du myocarde	65
Figure 19 : Modèles animaux utilisés dans le cadre de cette étude.....	69
Figure 20 : Photographie d'un cœur de rat avec ou sans occlusion de l'artère coronaire gauche.....	71
Figure 21 : Consommation en oxygène par la respiration mitochondriale en fonction du temps	76
Figure 22 : Courbe de mesure de la capacité de rétention calcique mitochondriale par spectrofluorimétrie	77
Tableau 2 : Liste des numéros d'identifiants des amorces et sondes « Taqman® » utilisées lors de cette étude.....	79
Figure 23 : Etapes de la synthèse de la sonde de cholestérol-résorufine à partir d'acide 3β-acétoxy-22,23,bisnor-5-cholénique.....	82
Figure 24 : Effet de la présence d'oxystérols sur le coefficient respiratoire des mitochondries cardiaques.....	94
Figure 25 : Effet de la présence d'oxystérols sur la capacité de rétention calcique des mitochondries cardiaques.....	95
Figure 26 : Effet du cholestérol et des oxystérols sur la viabilité des cardiomyocytes.....	96
Figure 27 : Evaluation de la protection des fonctions mitochondriales au cours de l'ischémie-reperfusion par la pravastatine	100
Figure 28 : Effet de la pravastatine sur le cholestérol et plusieurs oxystérols cytosoliques au cours de l'ischémie-reperfusion du myocarde.....	101

Figure 29 : Effet de la pravastatine sur la concentration en cholestérol et en oxystérols mitochondriaux au cours de l'ischémie-reperfusion du myocarde	102
Figure 30 : Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'expression protéique du CYP11A1 et du CYP27A1.....	106
Figure 31 : Expression dans le cœur et dans respectivement le testicule et le foie de CYP11A1 et de CYP27A1.....	107
Figure 32 : Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'activité du CYP11A1.....	108
Figure 33 : Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'expression protéique de TSPO et de l'isoforme de 27 kDa de StAR dans la mitochondrie.....	109
Figure 34 : Effet d'une ischémie prolongée du myocarde sur l'expression protéique de l'isoforme de 27 kDa de StAR dans la mitochondrie.....	110
Figure 35 : Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'expression en ARNm de protéines impliquées dans la régulation du cholestérol mitochondrial	111
Figure 36 : Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'expression des différentes isoformes de StAR au niveau du cytosol	112
Figure 37 : Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'expression de l'isoforme de 32 kDa de StAR au niveau de la mitochondrie	112
Figure 38 : Effet du 4'-chlorodiazépam sur l'accumulation de l'isoforme de 27 kDa de la protéine StAR au niveau mitochondrial lors de l'ischémie-reperfusion myocardique	113
Figure 39 : Effet de la pravastatine sur l'accumulation de l'isoforme de 27kDa de la protéine StAR au niveau mitochondrial lors de l'ischémie-reperfusion myocardique	114

Glossaire

11 β -HSD1 :	11 β -Hydroxystéroïde déshydrogénase 1
AAR :	Aire à risque
ABCG :	ATP-binding cassette sub-family G member
ACAT2 :	Acyl-CoA cholesterol acyltransferase 2
ACSL4 :	Acyl-CoA synthétase 4
ADNc :	ADN complémentaire
ADP :	Adénosine diphosphate
AMPc :	AMP cyclique
ANT :	Adenine nucleotide translocator
ATAD3A :	ATPase family AAA domain-containing protein 3
ATP :	Adénosine triphosphate
Bax :	Protéine « Bcl-2-associated X »
BSEP :	Bile-salt excretion pump
COX-IV :	Cytochrome c oxydase
CRAC :	Cholesterol recognition amino acid consensus
CYP11A1 :	Cytochrome P450 scc (side chain clivage)
CYP27A1 :	Cholestérol 27-hydroxylase
CYP7A1 :	Cholestérol 7 α -hydrolase
CYP7B1 :	Oxystérol 7 α -oxydase
DCM :	Dichlorométhane
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
eq :	Equivalent
EROs :	Espèces réactives de l'oxygène
FAM :	6-carboxyfluorescéine
GC-MS :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HMG-CoA :	Hydroxyméthylglutaryl-CoA
IDL :	Intermediary density lipoprotein
mPTP :	Pore de Transition de Perméabilité mitochondrial
LI :	Lésions ischémiques
LDL :	Low density lipoprotein
LXR :	Liver X receptor

K-ATP :	Canaux potassium ATP dépendants
MME :	Membrane mitochondriale externe
MMI :	Membrane mitochondriale interne
MTTP :	Microsomal triglyceride transfer protein
Mtx1 :	Métaxine 1
NO :	Monoxyde d'azote
NOS :	Oxyde nitrique synthase
NPC1L1 :	Niemann–Pick C1-like 1
PBR :	Récepteur périphérique aux benzodiazépines
PIC :	Cocktail d'inhibiteurs de protéases
PKA :	Protéine kinase A
PKC :	Protéine kinase C
qPCR :	Amplification en chaîne par polymérase quantitative
RMB :	Résonance magnétique nucléaire
rpm :	Rotations pas minute
RT :	Reverse transcription
RXR :	Retinoid X Receptor
SCAP :	Protéine d'activation du clivage de SREBP
SDS :	Sodium dodecyl sulfate
SF-1 :	Facteur stéroïdogénique 1
SOD :	Superoxyde dismutase
SRE :	Elément de régulation des stérols
SREBPs :	Protéines de liaison des éléments de réponse aux stérols
StAR :	Steroidogenic Acute Regulatory protein
THF :	Tétrahydrofurane
TLR :	Récepteurs de type Toll
Tom70 :	Translocase de la membrane externe 70
TP :	Tampon de perfusion
TSPO :	Protéine translocatrice
VDAC :	Voltage dependent anion channel
VG :	Ventricule gauche
VLDL :	Very low density lipoproteins
ZDF :	Zucker Diabetic Fatty

Partie I – Etude bibliographique

Chapitre I.I. L'infarctus du myocarde

1. Définition de l'infarctus du myocarde

Les cardiopathies ischémiques représentent aujourd'hui un problème de santé majeure. En 2015, elles ont été responsables d'environ 15% de la mortalité mondiale (dossier de l'Organisation Mondiale de la Santé, 2017). L'une de ces pathologies est l'infarctus du myocarde qui est fréquent dans les pays développés notamment en Europe où il est responsable d'environ 1,8 million de morts chaque année, soit près de 20% de la mortalité totale sur le continent (Nichols et al., 2014).

Cette pathologie se manifeste sous la forme de lésions au niveau du tissu cardiaque qui s'accompagnent d'une diminution de sa fonction, pouvant aboutir au décès de la personne atteinte. D'après les chiffres avancés dans un dossier de l'INSERM de 2013, l'infarctus du myocarde présente un taux de mortalité de 10% dans l'heure et de 15% dans l'année qui suit. Ces chiffres ont connu de fortes baisses au cours des dernières années grâce aux progrès thérapeutiques réalisés et à l'augmentation de la vitesse d'intervention des secours qui ont permis de diminuer la mortalité 30 jours post-infarctus d'environ 68% en 15 ans (Gabriel, 2013).

L'infarctus du myocarde est causé par un déséquilibre entre les besoins et l'apport en oxygène au niveau du tissu cardiaque. Cette ischémie est le plus généralement causée par l'apparition d'un thrombus réduisant la lumière de l'artère coronaire et qui s'ensuit d'une diminution, voir de l'arrêt du flux sanguin alimentant le tissu myocardique.

Cette obstruction aboutit finalement à l'apparition de lésions au niveau du myocarde suite à la nécrose des cellules ischémisées et à la forte réaction inflammatoire que celle-ci provoque. La sévérité de ces lésions est dépendante de différents facteurs (Benhabbouche et al., 2011) :

- la taille de la zone à risque qui correspond à la portion du myocarde qui n'est plus approvisionnée par la circulation sanguine.
- la durée de l'ischémie dont le prolongement est responsable d'une augmentation de la taille de l'infarctus au sein de la zone à risque (Figure 1).
- la circulation collatérale dans le myocarde permettant au flux sanguin de persister de manière faible dans la région ischémisée. Ces vaisseaux collatéraux ne permettent en temps normal qu'un passage minimal du sang, mais en cas d'obstruction de l'artère coronaire,

l'augmentation de la pression au niveau de cette artère va provoquer une augmentation du diamètre des vaisseaux, ainsi que du flux sanguin. Toutefois, l'importance de cette circulation secondaire varie en fonction des individus (Charney et Cohen, 1993).

- la température corporelle, dont la diminution rapide et cela même de manière modérée (entre 32 et 34°C) permet une cardioprotection importante (Tissier et al., 2012).

- l'espèce animale considérée qui sera plus ou moins résistante aux lésions résultantes de l'ischémie myocardique.

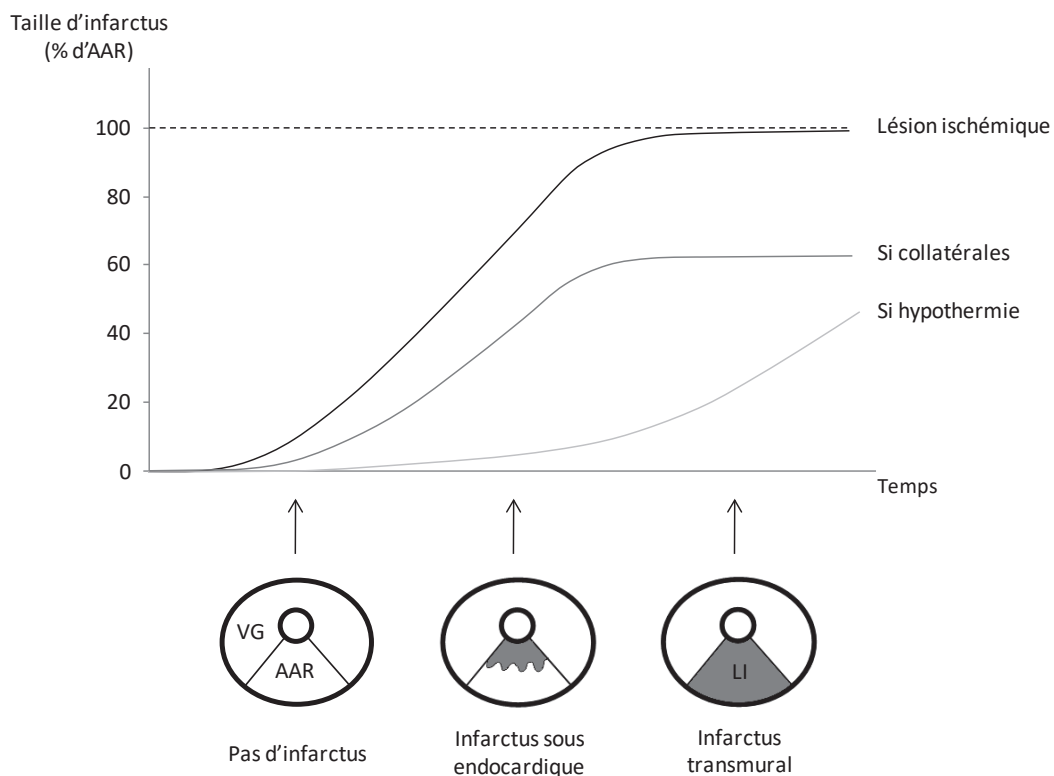


Figure 1 : Evolution des lésions ischémiques (LI) cardiaques en fonction du temps. Les courbes sont données en pourcentage d'aire infarctée par rapport à l'aire ischémisée totale ou aire à risque (AAR). Les lésions apparaissent dans un premier temps au niveau sous-endocardique du ventricule gauche (VG) et s'étendent ensuite vers l'autre extrémité du tissu jusqu'à ce qu'elles deviennent transmuraux (d'après une figure de Benhabbouche et al., 2011).

Les cellules cardiaques nécessitent beaucoup d'énergie sous forme de molécules d'adénosine triphosphate (ATP) afin d'assurer leur fonction contractile et n'ont que très peu de réserves. En condition d'ischémie, l'absence d'oxygène et de substrat au niveau du cœur ne permet plus une production efficace en ATP, ce qui provoque un épuisement des réserves

en l'espace de 2 à 3 minutes. On assiste alors à un arrêt de la contraction cardiaque et, en cas de prolongement de l'ischémie, à la mort des cellules principalement par nécrose (Benhabbouche et al., 2011). Ce mécanisme est responsable d'une perte d'intégrité de la membrane plasmique et ainsi de la libération de facteurs pro-inflammatoires contribuant aux dommages au niveau du myocarde (Frangogiannis et al., 2014).

L'ischémie prolongée du myocarde est responsable de l'apparition d'une aire dite « infarctée » au niveau sous endothélial qui s'étend ensuite en direction de l'épicarde et devient transmurale lorsque la totalité de l'aire à risque est nécrotique (Figure 1). Toutefois, la mort de ces cellules ne se fait pas exclusivement par nécrose, mais aussi par l'apoptose de cellules moins impactées par l'ischémie, notamment en périphérie de l'aire à risque (Zhao et al., 2002). Au cours de l'apoptose, la cellule se divise en différents corps apoptotiques évitant le relargage de son contenu diminuant la réponse inflammatoire.

Il est donc primordial dans ces conditions de permettre au cœur d'être de nouveau approvisionné en oxygène. Ainsi, le premier traitement pour empêcher les dommages engendrés par cette ischémie d'apport est d'assurer le retour d'une irrigation sanguine suffisante au niveau du myocarde par des moyens chirurgicaux. Les procédures les plus couramment mises en œuvre dans ce but sont l'angioplastie qui permet d'élargir physiquement la lumière de l'artère et la thrombolyse qui dissout le thrombus sanguin à l'origine de l'ischémie (Keeley et al., 2003).

Toutefois, la reperfusion du tissu ne permet pas un arrêt immédiat des dommages survenant au niveau du myocarde et, paradoxalement, celle-ci est responsable de l'apparition de lésions supplémentaires dites « lésions de reperfusion ». Ce phénomène a été décrit en 1960 grâce à des modèles animaux et peut être responsable de plus de 50% de la taille finale de l'aire infarctée (Yellon et Hausenloy, 2007).

2. Physiopathologie

2.1. Cause de la pathologie

Dans la majorité des infarctus du myocarde, l'occlusion de l'artère coronaire et ainsi l'ischémie myocardique observée s'expliquent par la présence de plaques d'athérosclérose au niveau de la lumière artérielle. L'un des principaux facteurs responsables de l'athérogenèse est l'excès de cholestérol sanguin, un facteur qui seul peut suffire à expliquer l'apparition de ces plaques d'athérome. Ce phénomène résulte d'une perméabilisation de l'intima, une

couche interne du vaisseau composée notamment de cellules endothéliales en contact avec la circulation (Badimon et Vilahur, 2012). Cette perméabilisation induit l'accumulation de LDL (Low Density Lipoprotein) contenant des apolipoprotéines B à travers l'intima de la paroi artérielle (Figure 2). Le rôle de ces LDL est de transporter le cholestérol du foie vers les autres organes périphériques car cette molécule est très hydrophobe et ne peut donc pas circuler seule dans le sang. Le passage de ces LDL à travers l'endothélium aboutit à la formation d'un agrégat lipidique dans lequel les lipoprotéines accumulées sont modifiées, notamment par oxydation du fait de la présence d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) ou d'enzymes telles que les lipoxygénases ou la myéloperoxydase (Parthasarathy et al., 1989 ; Daugherty et al., 1994). Ces LDL oxydés ont alors un effet pro-inflammatoire responsable du recrutement de monocytes qui se différencient en macrophages et donnent des cellules spumeuses après absorption des lipides déposés. Ces cellules sont responsables de la formation d'un core nécrotique constitué d'une accumulation de lipides et de débris cellulaires. Ce core est recouvert par une capsule fibreuse composée de cellules musculaires lisses ainsi que de protéines extracellulaires, principalement de la famille du collagène, et permet d'éviter tout contact entre la circulation sanguine et le core nécrotique (Nadkarni et al., 2009).

Malgré l'augmentation de la taille de la plaque d'athérosclérose avec le temps, celle-ci n'est que rarement responsable de l'obstruction de l'artère. En effet, on assiste lors de ce phénomène à un remodelage du segment du vaisseau concerné qui permet un maintien de sa lumière. La plaque d'athérosclérose est toutefois le siège de l'expression de facteurs pro-apoptotiques et de protéases qui causent une perte de cellules au niveau de la capsule fibreuse, ainsi qu'une dégradation de sa matrice riche en collagène causée par les macrophages. Ainsi l'occlusion artérielle est majoritairement due à la rupture de la capsule fibreuse de la plaque fragilisée. Cette rupture peut être provoquée par un stress émotionnel ou physique important ou peut simplement découler de l'amincissement trop important de la capsule induit par le cœur lipidique nécrotique (Bentzon et al., 2014).

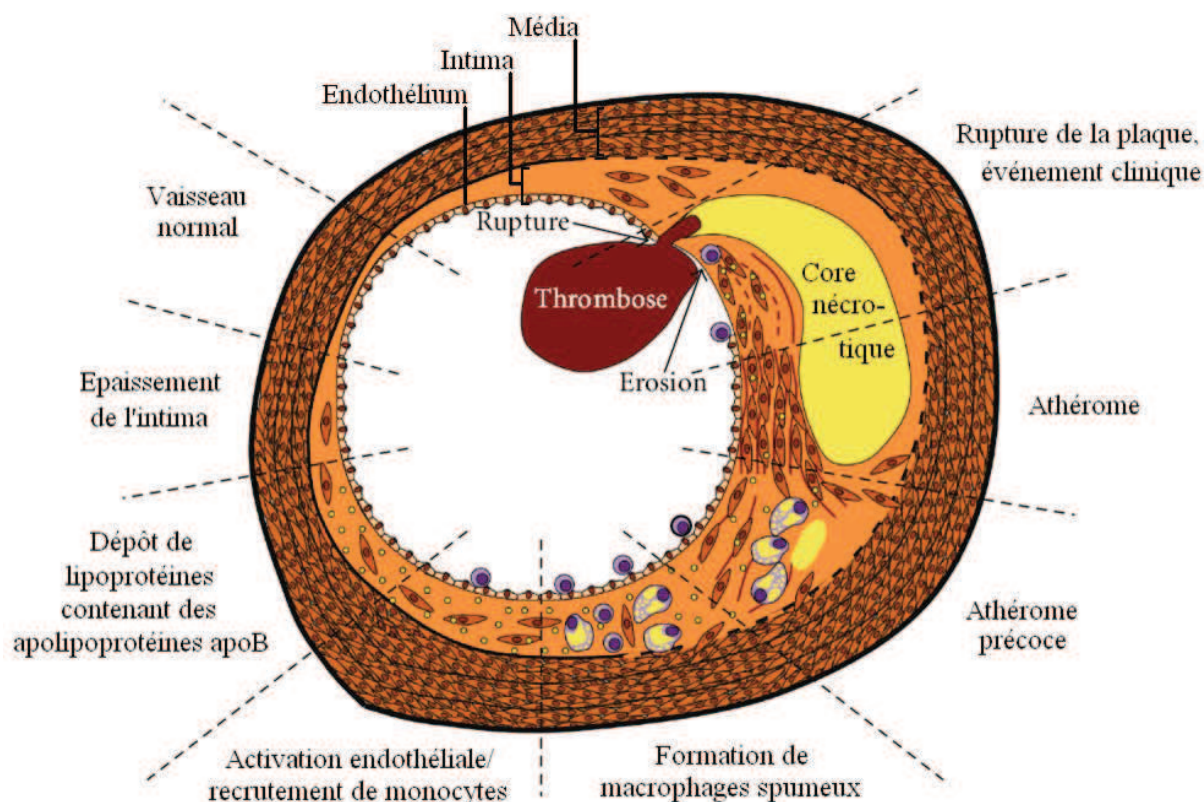


Figure 2 : Etapes de la formation d'une plaque d'athérosclérose jusqu'à sa rupture. L'accumulation de LDL dans l'intima du vaisseau aboutie à la formation d'un core nécrotique responsable de la fragilisation de la capsule qui l'isole de la circulation sanguine. Ce mécanisme peut aboutir à la rupture de cette capsule et à la libération de facteurs pro-thrombotiques dans le sang (traduit de Funk et al., 2012).

Cette rupture entraîne la rencontre des éléments pro-thrombotiques du core nécrotique et de la circulation sanguine. La libération de ces éléments pro-thrombotiques a un effet pro-coagulant important et est responsable de la formation d'un thrombus constitué principalement de filaments de fibrine, de cellules sanguines et de plaquettes (Kyrle et Eichinger, 2005). La formation de ce thrombus provoque une perturbation de la circulation sanguine qui aboutit à une sténose de la coronaire, c'est-à-dire à une diminution de sa lumière (Figure 2). Toutefois, l'ampleur de cette thrombose présente une variabilité importante qui dépend de la thrombogénicité du matériel de la plaque exposée, de la perturbation du flux sanguin au niveau local et de la prédisposition à la thrombose de la personne atteinte, celle-ci pouvant être augmentée par des facteurs extérieurs modifiables tels que la cigarette, l'alimentation et l'exercice physique (Bentzon et al., 2014). Ainsi la rupture de la plaque

d'athérosclérose peut se traduire par un amincissement de la lumière aortique de manière presque asymptomatique mais aussi par une obstruction complète de l'artère.

De ce fait, les patients présentant de multiples plaques d'athéroscléroses au niveau des artères coronaires sont davantage enclins à subir des ischémies du myocarde (Goldstein et al., 2000). De plus, le risque de faire un infarctus est augmenté suite à la survenue d'un premier. En effet, cette pathologie augmente l'athérosclérose et provoque l'épaississement d'autres plaques, ailleurs dans l'organisme, ainsi qu'une augmentation de l'activité protéase qui peut favoriser leur rupture (Dutta et al., 2012).

Il existe toutefois des cas d'infarctus qui ne sont pas dus à l'athérosclérose et qui représentent autour de 10% des cas observés (Niccoli et al., 2015). Ils peuvent avoir différentes causes telles que par exemple un spasme coronarien prolongé, une embolie coronarienne ou une anomalie congénitale des artères coronaires.

2.2. Effet de l'ischémie sur le myocarde

Les cardiomyocytes sont des cellules nécessitant une disponibilité continue d'énergie sous la forme de molécules d'ATP afin de pouvoir assurer leur fonction contractile. En effet, la réserve d'ATP dans les cardiomyocytes est faible et en cas d'arrêt de synthèse, elle ne permet de maintenir une activité contractile cardiaque que durant quelques secondes. Ces cellules doivent ainsi synthétiser l'ATP de manière à la fois importante et continue. Cette synthèse est étroitement régulée pour correspondre au besoin cardiaque sans l'excéder (Kassiotis et al., 2008). Le métabolisme cardiaque est principalement aérobique et nécessite beaucoup d'oxygène. En condition normoxique, la synthèse d'ATP se fait par phosphorylation oxydative au niveau mitochondrial (Figure 3). Ce besoin important des cardiomyocytes en ATP est assuré grâce à la forte densité mitochondriale dans ces cellules, puisque, chez l'homme, la fraction mitochondriale représente environ 23% de la masse cardiaque (Schaper et al., 1985).

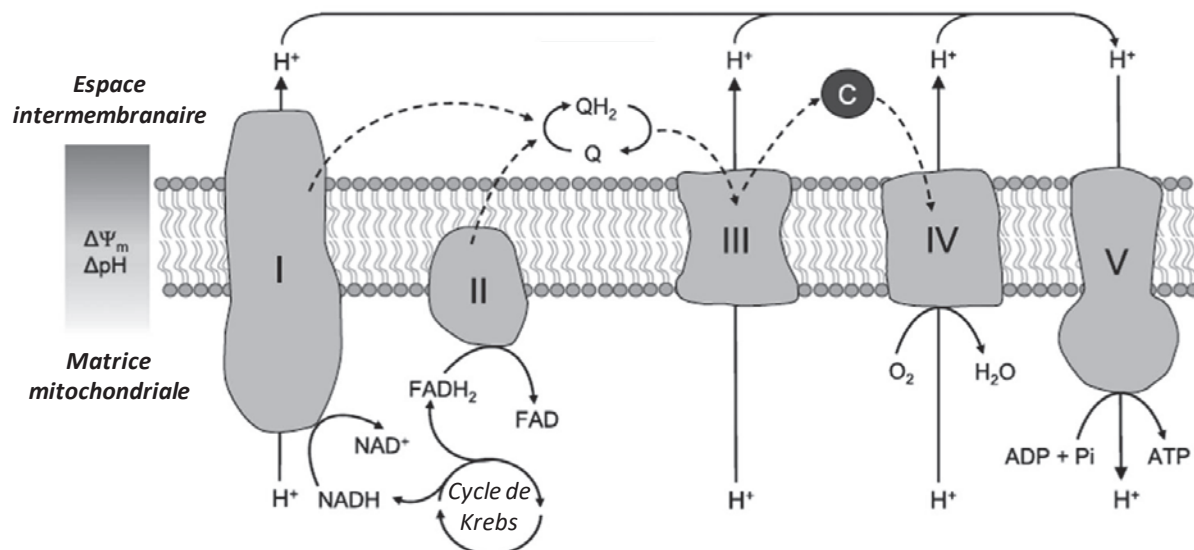


Figure 3 : Schéma illustrant la phosphorylation oxydative mitochondriale. La chaîne de transport des électrons (fléchée en pointillée) fait intervenir 4 complexes protéiques transmembranaires (I, II, III et IV) qui permettent le maintien d'un potentiel de membrane grâce au transfert de protons (H^+) à travers la membrane mitochondriale interne vers l'espace intermembranaire. Le gradient électrochimique ainsi créé est utilisé par l'ATP synthase (V) pour produire de l'ATP grâce à un transfert de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale (Pell et al., 2016).

C : cytochrome C ; Q : coenzyme Q.

La phosphorylation oxydative fait intervenir 4 complexes dits de la « chaîne respiratoire » qui transfèrent les électrons fournis par les composés réducteurs produits par le cycle de Krebs ($NADH$ et $FADH_2$) jusqu'au complexe IV où les molécules d'oxygène sont réduites en molécules d'eau. Le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire est responsable d'un transfert d'ions H^+ de la matrice vers l'espace intermembranaire de la mitochondrie, générant un gradient de protons au niveau de la membrane mitochondriale interne. Le potentiel énergétique de ce gradient est ensuite utilisé par l'ATP synthase (complexe V), le reflux de protons dans la matrice mitochondriale permettant la synthèse d'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) (Cooper, 2000). En condition de normoxie, ce mécanisme est à l'origine de la synthèse d'une faible quantité d'EROs causée par une fuite d'électrons lors de leur cheminement dans la chaîne respiratoire, fuite qui aboutit à une réduction de l'oxygène et à la formation d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ces molécules possèdent un rôle fonctionnel dans la cellule mais peuvent devenir toxiques en cas d'accumulation. Cependant, ces EROs sont rapidement éliminées par l'action d'un système enzymatique

composé de la superoxyde dismutase (SOD), qui catalyse la dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 , et de la glutathion peroxydase, qui assure la réduction de l' H_2O_2 en H_2O au cours de l'oxydation du glutathion (Auten et al., 2009).

Dans les premières minutes de l'ischémie, l'absence d'oxygène inhibe la phosphorylation oxydative mais celle-ci est alors compensée par une voie anaérobie de synthèse d'ATP, la glycolyse acide. Cette voie présente un rendement bien plus faible et n'est pas en mesure de maintenir le battement cardiaque. De plus, elle est responsable de l'accumulation de lactate et de protons qui diminuent le pH intracellulaire (passant en 30 minutes d'ischémie d'un pH de 7,1 à 5,5-6,0) et contribuent à la baisse de l'activité contractile (Solaini et Harris, 2005). Cette diminution du pH intracellulaire est aussi due à l'ATP synthase qui fonctionne à l'envers pour tenter de rétablir le potentiel de membrane mitochondrial et qui hydrolyse de l'ATP, libérant un proton par molécule hydrolysée (Grover et al., 2003). Toutefois, la diminution de pH protège le cœur dans un premier temps en limitant la perméabilisation de la membrane mitochondriale et ainsi la mort des cellules pendant l'ischémie (Qian et al., 1997).

L'ischémie est aussi responsable d'une perturbation de l'homéostasie ionique. En effet l'augmentation de la concentration en H^+ induit l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ qui entraîne l'accumulation de Na^+ intracellulaire. La concentration d'ATP étant trop faible, la Na^+/K^+ ATPase ne peut plus expulser le Na^+ intracellulaire et celui-ci active l'échangeur Na^+/Ca^{2+} provoquant une accumulation de Ca^{2+} dans la cellule (Allen et Xiao, 2003 ; Gracia-Dorado et al., 2012). Ce mécanisme peut aboutir à une surcharge calcique dans la cellule qui s'accompagne d'une déplétion en ATP et de dommages mitochondriaux menant là encore à la diminution de l'activité contractile du myocarde. Si l'ischémie perdure, des enzymes dépendantes du calcium telles que les phospholipases et des protéines telles que les calpaïnes sont activées et dégradent les composants cellulaires, ce qui aboutit à la formation de lésions myocardiques irréversibles causées par la mort des cellules, principalement par nécrose (Williams et Gottlieb, 2002 ; Neuhof et Neuhof, 2014). De plus, celle-ci est responsable de la rupture de la membrane plasmique provoquant la libération de composés cytosoliques à l'origine d'une réponse inflammatoire. L'ampleur des lésions causées dépend de la durée et de l'intensité de l'ischémie. Il est donc important de permettre une revascularisation dans le délai de temps aussi court que possible afin de limiter ces dommages.

2.3. Effets de la reperfusion sur le myocarde

La reperfusion rapide du tissu ischémié par thérapie thrombolytique ou angioplastie coronaire représente la stratégie la plus efficace pour limiter la taille d'infarctus engendrée, améliorer l'état clinique du patient et prévenir les complications. Elle permet de fournir de nouveau des substrats et de l'oxygène au tissu resté un certain temps en condition d'hypoxie. Toutefois, bien que cette reperfusion soit nécessaire, elle est aussi paradoxalement responsable de dommages pouvant amplifier ceux déjà survenus au cours de l'ischémie (Figure 4) (Yellon et Hausenloy, 2007).

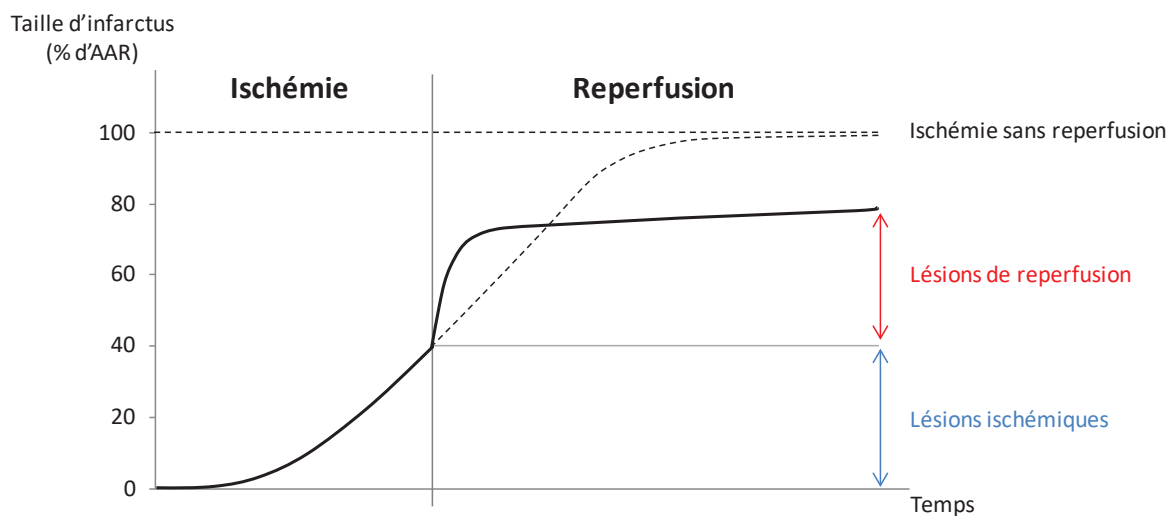


Figure 4 : Evolution des lésions myocardiques au cours d'un épisode d'ischémie-reperfusion. La reperfusion, bien que permettant de limiter les dommages causés par une ischémie permanente, est responsable de lésions supplémentaires dans les premiers instants suivant le réapprovisionnement soudain du tissu en oxygène (AAR : aire à risque) (d'après une figure de Thibault et al., 2007).

La reperfusion ne garantit pas le retour de l'activité contractile cardiaque, celle-ci peut s'accompagner d'une sidération du tissu cardiaque se traduisant par le maintien de l'arrêt de l'activité contractile du tissu malgré le retour de la circulation et l'absence de lésions irréversibles. Ce symptôme peut persister durant plusieurs jours voire semaines après le début de la reperfusion. De plus, malgré la reprise de la contraction, celle-ci peut s'accompagner d'une arythmie potentiellement néfaste et responsable d'une insuffisance cardiaque chez le patient.

Le retour soudain d'O₂ au niveau cardiaque provoque une production importante d'EROs, notamment au niveau mitochondrial, induisant une forte augmentation du stress oxydant. Il occasionne une perturbation supplémentaire de l'homéostasie ionique. En effet, le Ca²⁺ intracellulaire accumulé dans la cellule pendant la phase ischémique diffuse dans la mitochondrie lors de la reperfusion du fait de la restauration du potentiel de membrane mitochondrial (Ohtsuka et al., 2004 ; Garcia-Dorado et al., 2012). Ainsi, cette surcharge calcique mitochondriale, l'augmentation soudaine du stress oxydant par formation massive d'EROs et le retour à un pH physiologique sont responsables d'une hypercontraction des cellules cardiaques et de l'ouverture du mPTP (Halestrap et Pasdois, 2009 ; Kalogeris et al., 2014) (Figure 5).

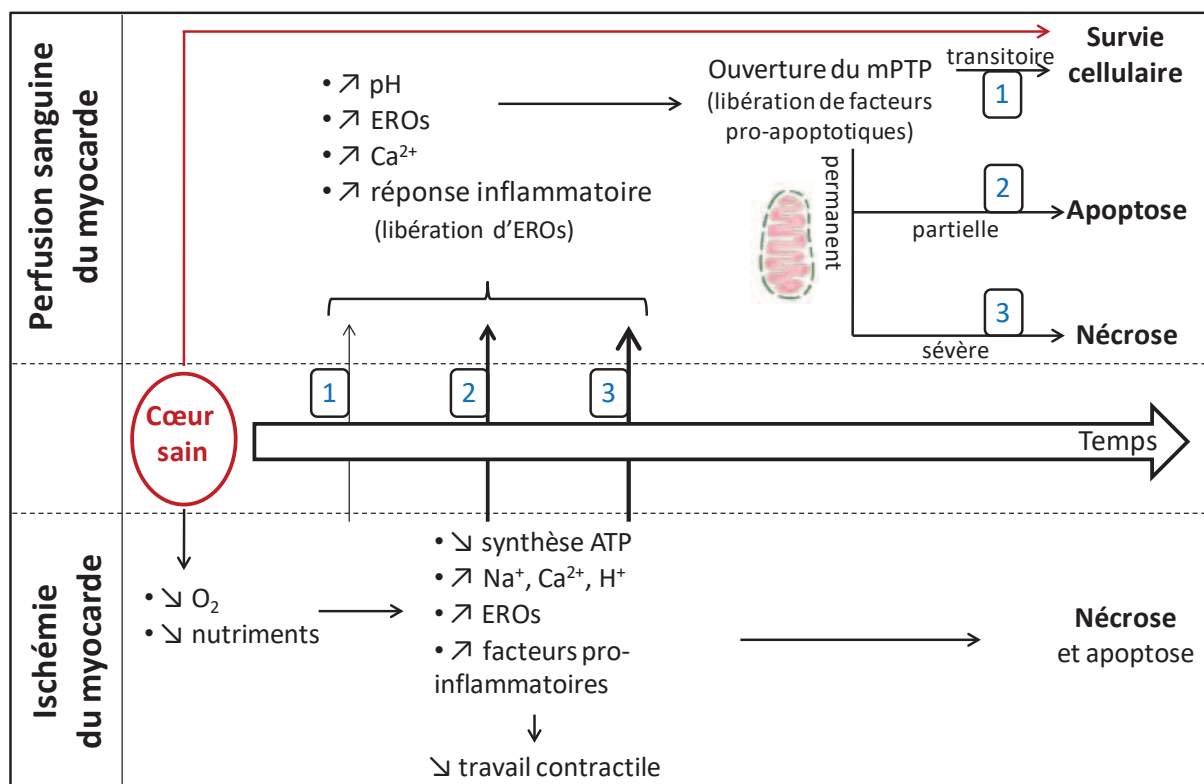


Figure 5 : Schéma explicatif des conséquences de l'ischémie-reperfusion cardiaque au niveau cellulaire. Au cours de l'ischémie myocardique, la chute de la synthèse d'ATP et l'accumulation d'ions Ca²⁺ et H⁺ ainsi que des EROs dans les cellules aboutissent à leur mort principalement par nécrose. La reperfusion du tissu ischémié bien que nécessaire, provoque l'ouverture du mPTP suite au rétablissement du pH physiologique et à une augmentation massive en Ca²⁺ et en EROs. La perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques qui s'en suivent causent de nouvelles lésions dites « de reperfusion » dont l'importance croît en fonction du temps d'ischémie (1, 2 et 3 correspondant respectivement à des reperfusions précoce, intermédiaire et tardive).

De nombreuses hypothèses concernant la structure de ce pore se sont succédées mais, à ce jour, celle-ci reste une énigme. Plusieurs études ont tout d'abord considérées « l'adénine nucleotide translocator » (ANT), le « voltage-dependent anion channel » (VDAC), la protéine translocatrice (TSPO) et la cyclophiline D comme des composants du mPTP (McEneaney et al., 1992 ; Zamzami et Kroemer, 2001). Toutefois l'usage de modèles animaux n'exprimant pas ANT, VDAC ou TSPO ont montré que ces protéines ne sont pas des composants essentiels et ne joueraient qu'un rôle de régulateur dans l'ouverture de ce pore (Kokoszka et al., 2004 ; Krauskopf et al., 2006 ; Sileikyte et al., 2014). En revanche, il existe un consensus pour considérer la cyclophiline D comme le principal régulateur de l'ouverture du pore (Di Lisa et al., 2011 ; Gutiérrez-Aguilar et Baines, 2015). Le rôle clé de cette protéine a été montré par des expériences de délétion chez la souris (Basso et al., 2005). Le modèle le plus récent considère que l'ATP synthase serait le constituant majeur du mPTP bien que ce modèle soit encore controversé (Bernardi et al., 2015).

L'ouverture du mPTP à la reperfusion est responsable d'un gonflement important de la mitochondrie. Si l'ouverture n'est que transitoire et permet le maintien de la bonne intégrité des mitochondries la cellule peut survivre à l'épisode d'ischémie-reperfusion (Kerr et al., 1999). A l'inverse, si l'ouverture du mPTP perdure au point d'induire le déchirement des membranes mitochondriales externes, diverses molécules pro-apoptotiques contenues dans l'espace intermembranaire sont libérées telles que le cytochrome C et provoquent la mort de la cellule par apoptose ou nécrose suivant la sévérité des lésions mitochondriales (Halestrap et Pasdois, 2009). Ainsi, le mPTP représente une cible potentielle afin de limiter les dommages liés à la reperfusion myocardique en bloquant son ouverture.

3. Stratégies cardioprotectrices

Il existe un grand nombre de stratégies ayant montré un fort potentiel cardioprotecteur contre les lésions de reperfusion chez l'animal, même si pour l'heure bien peu ont montré un véritable effet chez l'homme (Vander Heide et Steenbergen, 2013). Parmi ces traitements cardioprotecteurs, nous n'en évoquerons qu'une partie parmi les plus décrits dans le but de donner un aperçu des moyens à disposition dans la lutte contre les dommages causés par l'infarctus du myocarde.

3.1. Inhibition de l'ouverture du mPTP

Le mPTP mitochondrial joue donc un rôle important dans l'apparition des lésions liées à la reperfusion. Il a ainsi été montré que cibler la cyclophiline D, principal régulateur de l'ouverture du mPTP, au moyen d'un ligand tel que la cyclosporine A permet d'améliorer les fonctions mitochondriales de cardiomyocytes isolés à partir d'un cœur insuffisant cardiaque (Sharov et al., 2007). Elle permet aussi de limiter la taille d'infarctus engendré après une ischémie-reperfusion myocardique qu'elle soit administrée avant ou après le début de l'ischémie (Weinbrenner et al., 1998). La sangliféhrine A, un autre ligand de la cyclophiline D, permet elle aussi la protection du cœur contre les lésions d'ischémie-reperfusion en bloquant le mPTP (Clarke et al., 2002 ; Shanmuganathan et al., 2005).

Comme mentionné précédemment, l'ouverture du mPTP est facilitée par une surcharge en Ca^{2+} intracellulaire. L'un des principaux régulateur de la concentration en Ca^{2+} dans la cellule est l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, capable d'assurer le transport du Ca^{2+} à travers la membrane plasmique dans les deux sens. La perturbation de l'homéostasie ionique au cours de l'ischémie-reperfusion induit une augmentation de l'activité de ce transporteur à l'origine de cette surcharge calcique. Son knock-out hétérozygote permet la protection du myocarde en condition pathologique (Ohtsuka et al., 2004 ; Imahashi et al., 2005). A l'inverse la surexpression de cet échangeur provoque une sensibilité plus importante face aux lésions liées à l'ischémie-reperfusion (Cross et al., 1998). Limiter la surcharge calcique à l'origine de l'ouverture du mPTP représente donc une stratégie valide dans la protection de ces lésions.

Ces résultats confirment l'implication du mPTP dans la survenue des lésions après ischémie-reperfusion. Mais les mécanismes aboutissant à son ouverture sont multiples, ce qui se traduit par de nombreuses cibles stratégiques qui permettent d'assurer la protection du tissu cardiaque.

3.2. Exercice physique

Il est clairement établi que la pratique d'une activité physique régulière permet de se prémunir contre les risques de développer un infarctus du myocarde. De plus, l'action bénéfique de l'exercice augmente en fonction de l'intensité de celui-ci (Sesso et al., 2000 ; Tanasescu et al., 2002). Cette protection myocardique peut s'expliquer par la diminution du taux de cholestérol LDL sanguin qui s'accompagne de l'augmentation des HDL (high density lipoprotein), ceci étant associé à une diminution du risque d'infarctus (Warburton et al., 2006). L'exercice physique est aussi à l'origine de modifications structurelles au niveau de la

circulation coronaire sur le long terme. Celles-ci se manifestent par une augmentation du diamètre de la lumière de l'artère coronaire et des artérioles, ainsi que par l'augmentation de la densité de ces dernières (Laughlin et al., 2012). Ces modifications s'accompagnent aussi d'un accroissement de l'activité vasodilatatrice dépendante de l'endothélium.

L'exercice permet aussi de limiter les dommages occasionnés par la survenue d'une ischémie-reperfusion cardiaque (Brown et al., 2003). Cette protection des lésions myocardiques se manifeste par le maintien d'une meilleure intégrité des mitochondries. Comme indiqué précédemment, l'ischémie induit une chute de la synthèse d'ATP causée par une inhibition de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Celle-ci est partiellement compensée par une accélération de la glycolyse acide, responsable paradoxalement de la synthèse de produits délétères pour la cellule tels que le lactate. Burrelle et al. (2004) ont montré que l'exercice physique provoque une adaptation du métabolisme énergétique avec une diminution de la glycolyse acide au profit d'une amélioration de la reprise des voies aérobiques à la reperfusion, permettant une meilleure synthèse d'ATP et la protection de la cellule. Cependant le principal effet bénéfique de l'exercice est la diminution du stress oxydant induite grâce à l'augmentation de l'expression de SOD-1 et 2, deux isoformes situées respectivement au niveau de la membrane et de la matrice mitochondriale (Lee et al., 2012 ; Powers et al., 2014). Celles-ci constituent la principale voie d'élimination des ions superoxydes fortement produits au cours de l'ischémie-reperfusion et impliqués dans l'ouverture du mPTP. Il est d'ailleurs à noter que la surexpression de SOD-2 est suffisante pour inhiber les lésions cardiaques liées à l'ischémie-reperfusion (Chen et al., 1998).

3.3. Traitement anti-inflammatoire

Des études ont aussi montré que les récepteurs de type Toll, qui jouent un rôle dans l'induction de l'immunité innée liée à la reconnaissance de pathogènes exogènes, sont impliqués dans les lésions liées à la reperfusion. En effet, des souris n'exprimant pas le gène codant ce récepteur présentent une diminution de la taille de l'infarctus engendré après ischémie-reperfusion myocardique (Hua et al., 2007).

L'usage de certains traitements anti-inflammatoires a confirmé l'implication de l'inflammation dans ces lésions puisqu'ils ont permis de réduire la taille de l'infarctus engendré après l'ischémie-reperfusion myocardique (De Meyer et al., 2012 ; Wei et al., 2013).

3.4. Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est produit par la plupart des cellules, il assure une régulation de diverses voies métaboliques et permet notamment une vasorelaxation artérielle qui est dépendante de l'endothélium (Bauer et Sotnikova, 2010). Des études ont aussi montré que le NO influence la sévérité des lésions occasionnées par l'ischémie-reperfusion myocardique. Différentes stratégies ont été utilisées afin de moduler sa disponibilité au niveau cardiaque, tel qu'en stimulant l'activité de l'oxyde nitrique synthase (NOS) endogène ou en utilisant des donneurs de NO. L'augmentation de la disponibilité de NO grâce à ces deux stratégies a montré un effet cardioprotecteur après ischémie-reperfusion (Csont et al., 1999 ; Kanno et al., 2000).

3.5. Paradoxe du pH

Au cours de l'ischémie, la glycolyse anaérobie est responsable de la synthèse de lactate et de proton qui cause une diminution du pH intracellulaire. Ce pH est ensuite restauré à une valeur physiologique lors de la reperfusion (Yellon et Hausenloy, 2009). Cette restauration rapide du pH physiologique est impliquée dans les dommages liés à la reperfusion (paradoxe du pH). En effet, maintenir le pH à une valeur inférieure à 7 après le début de la reperfusion montre un effet cardioprotecteur (Qian et al., 1997 ; Fukita et al., 2007 ; Inserte et al., 2008). Cette protection s'explique par le fait que le maintien d'un pH acide retarde l'ouverture du mPTP et ainsi bloque la libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol (Qiao et al., 2013).

3.6. Hypothermie corporelle

L'hypothermie est depuis longtemps connue pour protéger les organes et notamment le cœur en condition d'ischémie. Ainsi, les organes en attente de transplantation sont pour cette raison conservés en atmosphère froide. De la même manière, une diminution modérée de la température corporelle (32°C) au cours de l'ischémie cardiaque permet de limiter l'apparition de lésions ischémiques (Yang et al., 2011).

En ce qui concerne les lésions de reperfusion, les travaux étudiant les effets d'une diminution de la température corporelle au début de la reperfusion du tissu cardiaque ont montré des résultats contradictoires, provoquant un débat quant à l'efficacité cardioprotectrice d'une telle stratégie (Tissier et al., 2011). Des résultats récents ont tout de même montré que

l'instauration d'une hypothermie modérée (32 - 35°C), diminue la taille d'infarctus observée après ischémie-reperfusion du myocarde mais préserve aussi les fonctions contractiles. Il est toutefois important de permettre une diminution rapide de la température corporelle et cela le plus tôt possible après le début de la reperfusion pour assurer l'efficacité de cette protection (Tissier et al., 2012). Le caractère non spécifique de cette stratégie rend difficile l'identification de cibles responsables de cet effet mais cette protection pourrait être liée à l'inhibition de l'ouverture du mPTP.

3.7. Pré- et post-conditionnement ischémique

Une autre stratégie cardioprotectrice consiste à réaliser plusieurs cycles d'ischémie-reperfusion du muscle cardiaque de courtes durées avant le déclenchement de son ischémie prolongée. L'efficacité de cette méthode a tout d'abord été observée en 1986 quand une équipe a montré que quelques cycles de 5 minutes d'ischémie suivie de 5 minutes de reperfusion permettent de réduire de manière significative la taille de l'infarctus provoqué par une ischémie de 40 minutes (Murry et al., 1986). On parle alors de pré-conditionnement ischémique (Figure 6) qui permet de retarder la nécrose ischémique.

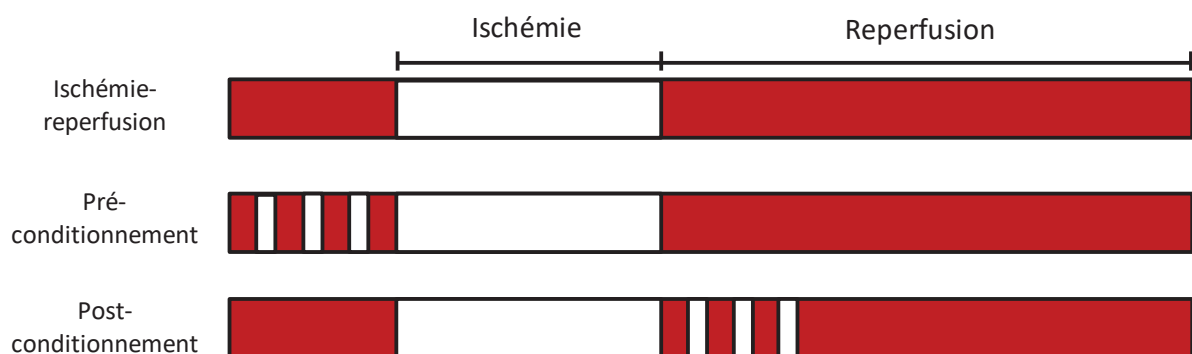


Figure 6 : Chronogrammes illustrant les protocoles de pré et post-conditionnements ischémiques cardiaques. La couleur blanche illustre l'ischémie du tissu cardiaque en opposition à la couleur rouge correspondant à sa perfusion.

Cette protection du pré-conditionnement est transitoire et ne persiste, après son initiation, qu'entre une à deux heures (phase précoce). Toutefois une seconde fenêtre de protection plus longue est observée 24 heures plus tard (phase tardive) pouvant perdurer autour de 72 heures (Iliodromitis et al., 2007). Les mécanismes de cette protection ne sont pas pleinement établis mais celle-ci implique l'activation de kinases telles que la protéine kinase

C et plusieurs tyrosines kinases (Armstrong, 2004). De plus une voie impliquant d'autres protéines kinases de survie, comme Akt (protéine kinase B) et Erk1/2 (« Extracellular signal-regulated kinases »), joue un rôle important dans cette protection contre les lésions liées à la reperfusion (Hausenloy et Yellon, 2007). Cette voie est appelée voie RISK (pour « Reperfusion Injury Salvage Kinase ») et son inhibition est responsable d'une perte d'effet du pré-conditionnement ischémique (Hausenloy et al., 2005).

Il a par la suite été montré que le recours à de courts cycles d'ischémie-reperfusion myocardique non plus avant mais après une phase d'ischémie prolongée (Figure 6) permet une protection du tissu cardiaque avec une efficacité de même ampleur que celle observée avec le pré-conditionnement (Zhao et al., 2003). Les mécanismes d'actions de ce post-conditionnement ischémique semblent similaires à ceux décrits pour le pré-conditionnement et impliquent la voie RISK.

Une autre stratégie consistant cette fois à effectuer ces mêmes cycles d'ischémie-reperfusion myocardiques sur un organe différent du cœur permet là encore de diminuer la taille de l'infarctus au niveau du myocarde. Cette stratégie de conditionnement à distance a tout d'abord été montrée par pré-conditionnement en occluant à répétition une artère circonflexe cardiaque avant d'effectuer une occlusion de plus longue durée de l'artère coronaire gauche (Przyklenk et al., 1993). Ce résultat montre que le pré-conditionnement résulte de la synthèse et du transport de facteurs cardioprotecteurs dans le tissu traité. D'autres résultats ont ensuite montré que ce conditionnement à distance permet d'obtenir un effet cardioprotecteur même lorsqu'il est effectué au niveau d'autres organes tels que le rein ou la patte chez le rat (Weinbrenner et al., 2002 ; Hausenloy et Yellon, 2008 ; Li et al., 2010a). Il permet de plus d'assurer une protection aussi efficace et même supérieure au post-conditionnement local (Gritsopoulos et al., 2009). Tamareille et al. (2011) ont montré que l'association du post-conditionnement local et d'un conditionnement ischémique à distance durant la fin de l'ischémie cardiaque permet une protection encore supplémentaire.

3.8. Effet de facteurs de comorbidité sur l'effet des stratégies cardioprotectrices

Comme nous venons de le voir, les études réalisées chez l'animal ont mis en évidence plusieurs stratégies capables de protéger le myocarde contre les dommages liés à l'ischémie-reperfusion myocardique. Toutefois, les résultats obtenus chez l'homme se sont révélés décevants et aucun concept expérimental, transposé en clinique, n'a permis de démontrer un effet cardioprotecteur chez l'homme. L'un des exemples les plus récents est l'essai clinique

de phase III CIRCUS qui a cherché à vérifier l'effet cardioprotecteur de la cyclosporine injectée avant l'angioplastie coronaire de patients présentant un infarctus du myocarde (Cung et al., 2015). Malgré de bons résultats chez l'animal et un essai de phase II encourageant, l'essai clinique CIRCUS n'a montré aucun effet bénéfique après un an sur les patients traités par rapport au groupe ayant reçu le placebo. Cette difficulté de transposition de résultats chez l'homme peut être due à des différences entre espèces mais aussi à la présence chez l'homme de facteurs de comorbidité qui sont souvent associés à l'infarctus du myocarde. Ceux-ci peuvent interférer avec l'efficacité de ces stratégies et ne sont pas pris en compte dans les modèles expérimentaux. Les principaux facteurs de comorbidité sont le vieillissement, l'hypercholestérolémie, le diabète et l'obésité.

3.8.1. Le vieillissement

La majorité des patients susceptibles de bénéficier d'une stratégie cardioprotectrice complémentaire appartient à une tranche d'âge avancée ; aux USA par exemple, les maladies coronariennes affectent 50% des plus de 65 ans et plus de 80% de la mortalité associée à ces pathologies apparaît dans ce groupe d'âge (Jahangir et al., 2007). Le vieillissement est ainsi un facteur de comorbidité associé à une augmentation des risques d'infarctus et du taux de mortalité.

De plus, le vieillissement s'accompagne d'une diminution de l'efficacité de différentes stratégies cardioprotectrices telles que le pré-conditionnement ischémique. Ebrahim et al. (2007) ont montré une diminution de l'effet de ce conditionnement sur des cœurs de rats d'âge moyen (12-13 mois). Toutefois, d'autres études ont montré que l'augmentation de l'intensité du stimulus de pré-conditionnement permet de restaurer la cardioprotection mais que l'effet protecteur est définitivement perdu sur les cœurs de rats d'âge plus élevé (18-20 mois) (Schulman et al., 2001). La perte d'efficacité due au vieillissement a également été décrite pour le pré-conditionnement pharmacologique (Sniecinski et Liu, 2004 ; Nguyen et al., 2008), le post-conditionnement (Przyklenk et al., 2008) et le conditionnement à distance (Hu et al., 2002).

Des résultats cliniques ont montré l'inefficacité d'un protocole de pré-conditionnement ischémique (pré-occlusion de 120 secondes) sur des patients âgés (moyenne de 71 ans) alors que les cœurs de patients adultes (45 ans en moyenne) sont préservés des lésions d'ischémie reperfusion par ce stimulus (Lee et al., 2002). On retrouve toutefois une protection des cœurs de patients âgés en prolongeant la durée de pré-occlusion (passage à 180

secondes). Cette étude montre que l'effet du vieillissement est associé à une atténuation de l'activation des canaux potassium ATP dépendants mitochondriaux (K-ATP), connus pour être impliqués dans l'effet du pré-conditionnement ischémique (Gross et Auchampach, 1992).

3.8.2. Le diabète

Le diabète est un facteur de comorbidité important de l'infarctus du myocarde. Il est responsable d'un doublement des risques de la fréquence de cette pathologie et limite la récupération des patients après sa survenue (Zairis et al., 2004 ; Emerging Risk Factors Collaboration et al., 2010). De plus, la mortalité à la suite de l'infarctus du myocarde est supérieure chez les patients diabétiques, ce qui peut s'expliquer au moins partiellement par une augmentation de la taille de l'aire infarctée (Orchard et al., 2006 ; Alegria et al., 2007).

Des études ont de plus montré chez le rat, qu'un phénotype diabétique induit une diminution de sensibilité de l'effet bénéfique du pré-conditionnement ischémique et nécessite l'augmentation de l'intensité du protocole utilisé pour que soit observée une cardioprotection (Bouchard et Lamontagne, 1998). Ce résultat pouvait aussi s'expliquer par une diminution de la sensibilité de l'activation des canaux K-ATP chez les animaux diabétiques (Kerstern et al., 2001 ; Tsang et al., 2005).

Cet effet du diabète sur la sensibilité au pré-conditionnement ischémique a été confirmé chez l'homme (Lee et Chou, 2003), ceci peut s'expliquer par un dysfonctionnement mitochondrial associé à une augmentation d'EROs. Ce stress oxydant accru induit le découplage de la NO synthase, qui provoque une diminution de la concentration du NO et une synthèse accrue d'EROs (Wang et al., 2000 ; Hassouna et al., 2006). Une dysfonction de la régulation calcique au niveau du réticulum sarcoplasmique a également été rapportée chez les souris diabétiques db/db (Stolen et al., 2009).

3.8.3. L'obésité

L'obésité correspond à un excès de graisse important pouvant entraîner de sévères problèmes de santé et touche aujourd'hui un grand nombre d'individus. En 2012, la proportion des français atteints d'obésité a été évaluée à 15%, sachant que 32,3% des français restant étaient en surpoids (enquête ObEpi-Roche 2012).

L'accumulation du tissu adipeux est responsable d'une augmentation de la demande métabolique en oxygène et s'accompagne d'une augmentation de la tension artérielle

aboutissant à une hypertrophie cardiaque notamment au niveau du ventricule gauche (Vasan, 2003 ; Avelar et al., 2006). Des études ont aussi montré que l'obésité est à l'origine d'une diminution du couplage entre la consommation en oxygène et la production d'ATP dans la mitochondrie (Boudina et al., 2005). De plus les acides gras sont aussi responsables d'une diminution de la fonction cardiaque en provoquant la diminution de la synthèse d'ATP (Yu et al., 2014). Il a ainsi été observé une relation linéaire entre la sévérité de l'obésité et le risque de survenue de l'infarctus du myocarde (Yusuf et al., 2005 ; Zhu et al., 2014). Ce résultat est corrélé au fait que l'obésité est associée à un syndrome inflammatoire systémique pouvant aider au développement du diabète et de l'athérosclérose (Lumeng et al., 2011).

Comme les autres facteurs de comorbidité, l'obésité provoque une diminution de l'effet protecteur de stratégies de conditionnement ischémique (pré et post) dans les modèles animaux (Katakam et al., 2007 ; Wagner et al., 2008). Les mécanismes évoqués sont une augmentation du stress oxydant, ainsi qu'un défaut d'activation des K-ATP et de la glycogène synthase kinase 3 impliquées dans la cardioprotection.

3.8.4. L'hypercholestérolémie

L'hypercholestérolémie est un facteur qui favorise la survenue de l'infarctus du myocarde, mais elle est aussi responsable d'une augmentation des lésions causées par cette pathologie et du retard du rétablissement de la fonction contractile myocardique à la reperfusion (Golino et al., 1987 ; Wang et al., 2003 ; Ungi et al., 2005). Le fait que des molécules qui permettent de diminuer la synthèse de cholestérol dans l'organisme telles que les statines possèdent un effet cardioprotecteur confirme le rôle délétère de son accumulation (Osborne et al., 1989 ; Stenestrand et al., 2001). Cette famille de molécules inhibe l'activité de la hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase), une enzyme qui assure la synthèse d'acide mévalonique, l'étape limitante de la formation de cholestérol.

Comme d'autres facteurs de comorbidité, l'hypercholestérolémie perturbe l'effet des stratégies cardioprotectrices telles que l'utilisation de donneurs de NO (Tang et al., 2004) ou les post- et pré-conditionnements ischémiques (Szilvassy et al., 1995 ; Kupai et al., 2009). Ce résultat se confirmerait aussi chez l'homme puisqu'une perte de l'effet cardioprotecteur du post-conditionnement a été observée chez des patients hyperlipidémiques (Kyriakides et al., 2002).

Il faut cependant noter que certaines études ont montré que le pré-conditionnement conserve sa fonction cardioprotectrice en cas d'hypercholestérolémie chez l'animal (Iliodromitis et al., 2006). De plus, d'autres stratégies cardioprotectrices restent efficaces en condition d'hypercholestérolémie telles que l'exercice physique (Pons et al., 2013) ou le traitement au moyen de certaines statines (Wee et al., 2008), cela sans nécessairement provoquer de diminution de la concentration du cholestérol sanguin (Andreadou et al., 2012).

Chapitre I.II Le cholestérol

1. Définition du cholestérol

Le cholestérol est un composant majeur des bicouches lipidiques constituant les membranes cellulaires chez les eucaryotes supérieurs. Connue depuis le 18^{ième} siècle, son implication dans de nombreuses fonctions cellulaires, ainsi que dans diverses pathologies en ont fait, depuis lors, un sujet d'étude important (Ikonen, 2008).

Le cholestérol est une molécule lipophile constituée de quatre cycles carbonés rigides, comprenant trois cycles de type cyclohexane (A, B, C) et un cycle de type cyclopentane (D) (Figure 7A). L'ensemble des jonctions reliant ces cycles présentent une isomérisation de type trans, ce qui se traduit par un enchaînement de ces différents cycles de manière plane (Figure 7B). Deux groupements méthyles, reliés aux carbones 10 et 13, sont orientés de manière orthogonale par rapport à ce plan et du même côté de celui-ci. A l'une des fins du système cyclique de ce stérol se trouve un groupement hydroxyle (sur le carbone 3), ce groupe forme la tête polaire du cholestérol correspondant à sa partie hydrophile. Enfin à l'opposé, se trouve la chaîne latérale du cholestérol, une chaîne iso-octyle flexible (sur le carbone 17) (Grouleff, 2015).

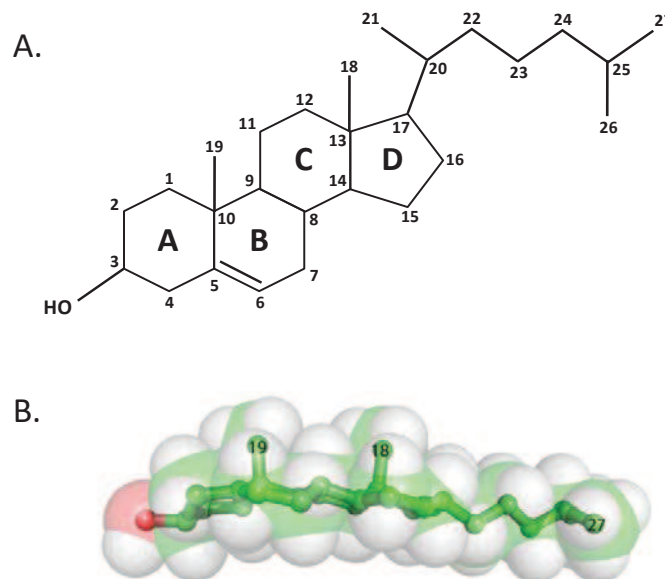
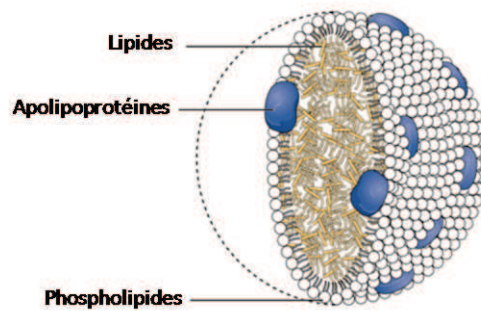


Figure 7 : Structure du cholestérol : (A) représentation de Cram du cholestérol ; (B) modèles de remplissage de l'espace et en bâtons de la molécule (Song et al., 2013).

La structure du cholestérol lui permet de s'insérer dans les bicouches lipidiques constituant les membranes cellulaires. Il peut ainsi s'aligner avec les autres lipides en orientant sa chaîne isooctyle vers l'intérieur de la bicouche lipidique et son groupement hydroxyle à l'interface entre la membrane et la phase aqueuse. Cependant sa tête polaire reste basse dans la membrane en comparaison à celle des phospholipides, qui est plus chargée et plus exposée vers l'extérieur de la membrane (Song et al., 2013).

De part sa propriété hydrophobe, le cholestérol n'est pas soluble dans le sang et requiert donc l'intervention de lipoprotéines pour son transport via la circulation sanguine à travers l'organisme. Son transport du foie vers les autres organes périphériques est assuré par les LDL alors que le transport inverse des organes périphériques vers le foie, où le cholestérol est éliminé afin d'éviter son accumulation, s'effectue sous la forme de HDL.



Lipoprotéines	Densité (g/ml)	Taille (nm)	Lipides majeurs	Apolipoprotéines majeures
Chylomicrons	<0,930	75-1200	Triglycérides	Apo B-48, Apo C, Apo E, Apo A-I, A-II, A-IV
Résidus de chylomicrons	0,930- 1,006	30-80	Triglycérides Cholestérol	Apo B-48, Apo E
Very low density lipoproteins (VLDL)	0,930- 1,006	30-80	Triglycérides	Apo B-100, Apo E, Apo C
Intermediary density lipoproteins (IDL)	1,006- 1,019	25-35	Triglycérides Cholestérol	Apo B-100, Apo E, Apo C
Low density lipoproteins (LDL)	1,019- 1,063	18- 25	Cholestérol	Apo B-100
High density lipoproteins (HDL)	1,063- 1,210	05-12	Cholestérol Phospholipides	Apo A-I, Apo A-II, Apo C, Apo E

Figure 8 : Schéma de la structure des lipoprotéines et tableau récapitulatif des différentes lipoprotéines et de leur composition. Les lipoprotéines sont rangées en ordre croissant de densité, celle-ci augmente à mesure que la quantité de triglycérides contenue dans le cœur lipidique diminue (données extraites de Feingold et Grunfeld., 2015).

Les lipoprotéines sont des particules complexes comprenant un noyau hydrophobe central composé de lipides non polaires tels que des esters de cholestérol et des triglycérides. Ce noyau est entouré d'une membrane hydrophile composée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines. Ces apolipoprotéines permettent la cohésion et la solubilisation de ces lipoprotéines dans le sang. La nature des apolipoprotéines détermine la nature de la lipoprotéine formée (Figure 8) et constitue un site de reconnaissance des lipoprotéines par les cellules.

2. Synthèse du cholestérol

Le cholestérol est synthétisé dans l'organisme, mais il peut aussi être absorbé par le biais de l'alimentation. Le rapport synthèse de cholestérol dans l'organisme / absorption à partir de nourriture a été estimée à environ 70/30 (Ikonen, 2008), bien que ce chiffre varie d'un individu à l'autre et en fonction du régime alimentaire de la personne. En cas d'absorption trop importante, le corps compense cette absorption de cholestérol en réduisant la quantité synthétisée et inversement.

Le foie est le principal organe synthétisant le cholestérol, mais le cholestérol est aussi synthétisé en une plus faible quantité dans d'autres organes tels que les glandes surrénales et les organes reproducteurs. Cette synthèse est réalisée par diverses enzymes réparties entre le cytosol et le réticulum endoplasmique (Krisans et al., 1996).

Le premier substrat de cette synthèse est l'acétyl-CoA qui peut être produit dans la mitochondrie par glycolyse ou par β -oxydation des acides gras. Deux molécules d'acétyl-CoA sont ainsi condensées dans le cytosol pour former une molécule d'acétoacétyl-CoA grâce à l'acétoacétyl thiolase. A cette molécule est ensuite ajoutée une troisième molécule d'acétyl-CoA grâce à la HMG-CoA synthase pour former une molécule de HMG-CoA. Cette molécule est ensuite réduite en mévalonate par la HMG-CoA reductase qui est située exclusivement au niveau du réticulum endoplasmique et dont l'activité représente l'étape limitante de la synthèse du cholestérol (Krisans et al., 1996 ; McFarland et al., 2014). Elle peut ainsi être ciblée pour diminuer la synthèse du cholestérol dans l'organisme grâce à des statines, une famille de molécules qui diminue son activité.

Le mévalonate est ensuite converti, grâce à trois réactions nécessitant l'ATP, en isopentényl pyrophosphate, un composé capable d'être isomérisé en diméthylallyl pyrophosphate. La condensation successive de deux molécules d'isopentényl pyrophosphate à ce dernier composé aboutit à la synthèse d'une molécule de farnésyl pyrophosphate, qui en

réagissant avec une autre molécule de farnésyl pyrophosphate, forme le squalène (Figure 9) (Berg et al., 2002).

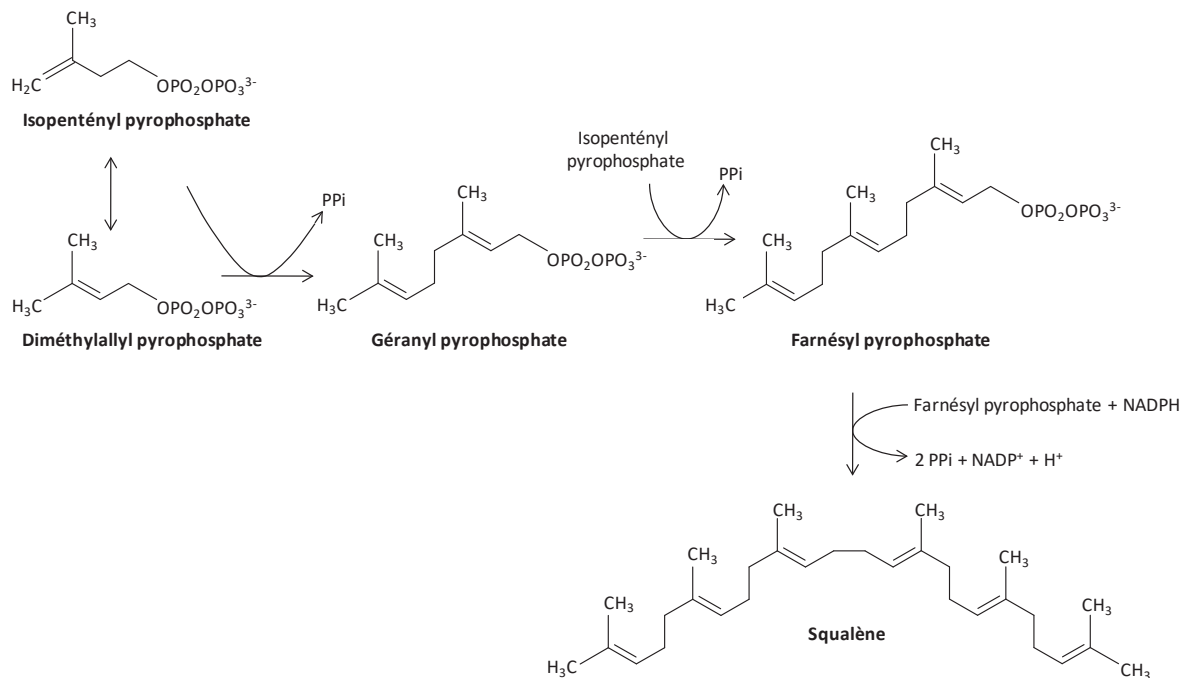


Figure 9 : Voie de synthèse du squalène par condensation de molécules dérivées du mévalonate. PPi : anion pyrophosphate.

La cyclisation du squalène conduit finalement à la synthèse du premier stérol de cette voie, le lanostérol. Il existe ensuite deux voies capables de métaboliser le lanostérol en cholestérol, d'un côté la voie Bloch (Bloch, 1965) et de l'autre, la voie Kandutsch-Russell (Kandutsch et Russell, 1960) (Figure 10). La première de ces deux voies comprend différentes réactions s'achevant par la synthèse de desmostérol qui donne le cholestérol par réduction par la 24-déhydrocholestérol réductase de la double liaison présente au niveau du carbone 24 de la molécule. L'autre voie a été observée par Kandutsch et Russell dans des glandes prépucciales de souris, celle-ci débute par la réduction de la double liaison du carbone 24 du lanostérol. Cependant, malgré la nature différente des molécules impliquées dans cette voie, avec notamment la présence du lathostérol, les enzymes intervenant restent les mêmes que dans la voie Bloch (Cerqueira et al., 2016). Ainsi, deux voies dont l'importance varie suivant les organes permettent la synthèse du cholestérol à partir de lanostérol, la voie Bloch étant toutefois globalement prédominante.

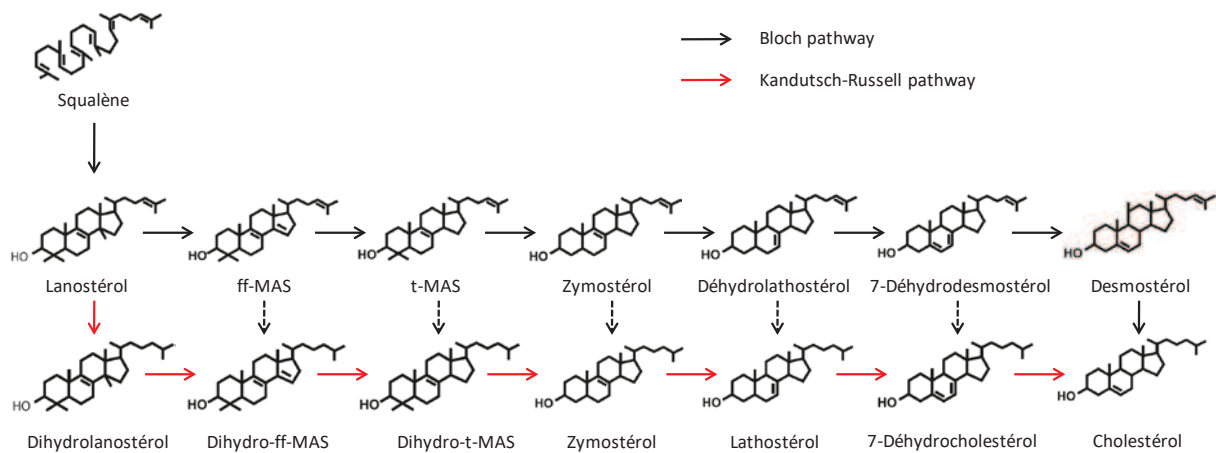


Figure 10 : Voies de synthèse du cholestérol à partir de squalène. Les flèches pleines en noir montrent la voie Bloch, celles en rouge montrent la voie Kandutsch-Russell et celles en pointillées noires représentent les réactions permettant le passage de la première à la seconde.

Des travaux plus récents ont montré la possibilité de voies hybrides aboutissant à la synthèse du cholestérol (Bae et al., 1997 ; Mitsche et al., 2015). En effet la réduction de la liaison du carbone 24 pourrait aussi se faire entre les étapes du lanostérol et du desmostérol, se traduisant par une voie Bloch bifurquant en cours de route vers la voie Kandutsch-Russell (Figure 10).

3. Absorption du cholestérol

Comme mentionné précédemment, malgré notre capacité à le synthétiser, une partie importante du cholestérol disponible dans notre organisme provient de l'alimentation suite à son absorption au niveau de l'intestin (Ikonen, 2008). L'équilibre entre ces deux phénomènes est étroitement régulé afin d'assurer le maintien d'une cholestérolémie contrôlée. Le rendement de la synthèse du cholestérol par l'organisme est en effet modulé en fonction de la quantité de cholestérol absorbé dans le but de limiter les risques d'hypercholestérolémie. L'augmentation de l'ingestion de cholestérol est à l'origine de l'inactivation de protéines de liaison des éléments de réponse aux stérols (SREBP) qui restent alors fixées au niveau du réticulum endoplasmique. Une diminution du cholestérol, quant à elle, provoque l'activation de SREBP qui permet d'augmenter l'expression de gènes nécessaires à sa synthèse (Horton et al., 2002 ; Radhakrishnan et al., 2007).

Outre le cholestérol, l'absorption d'autres nutriments présents dans l'alimentation induisent une augmentation de la cholestérolémie, tels que les acides gras insaturés et trans, ou les fibres alimentaires solubles (Grundy et al., 2016). Chacun de ces nutriments

individuellement n'a que peu d'impact sur le taux de cholestérol sanguin, mais le cumul de leur effet peut induire une augmentation plus significative pouvant aller jusqu'à une hausse d'environ 25%.

Le cholestérol ne peut pas circuler librement dans la lumière de l'intestin pour être absorbé, d'autres molécules telles que les acides biliaires sont nécessaires à ce mécanisme. Ce sont des molécules amphiphiles alors que le cholestérol est une molécule très insoluble dans l'eau. Cette propriété permet aux acides biliaires d'aider au transport du cholestérol dans le système digestif en formant des micelles au contact de la membrane plasmique des entérocytes. Les micelles sont généralement de forme sphérique ou parfois en forme plus allongées en fonction du rapport lipide/bile qui les compose. Ils sont constitués de lipides polaires arrangés de manière ordonnée et orientés de sorte à diriger leur tête polaire en direction de la phase aqueuse. Les acides biliaires, eux, sont arrangés perpendiculairement entre leur tête polaire. Ils proviennent de la vésicule biliaire qui se contracte lors de la digestion pour libérer son contenu dans l'intestin et aider à digérer les graisses (Cohen, 2008).

A l'intérieur de l'intestin, le cholestérol hydrophobe, est solubilisé dans ces micelles, ce qui permet de faciliter son transport à travers la barrière de diffusion des cellules responsables de l'absorption du cholestérol, les entérocytes (Ikonen, 2008). Bien que cela puisse varier d'un individu à l'autre, environ 50% du cholestérol ingéré y est absorbé (Sudhop et al., 2009). Le médiateur clé de cette absorption est la protéine NPC1L1 (Niemann–Pick C1-like 1) (Altmann et al., 2004). Le rôle de cette protéine dans l'absorption intestinale du cholestérol a été établi après l'avoir identifié comme étant la cible d'une molécule servant à traiter des patients atteints d'hypercholestérolémie, l'ézétimibe (Davis et al., 2004). NPC1L1 est ainsi capable de lier le cholestérol à la surface des entérocytes et le complexe résultant est ensuite internalisé sous forme de lysosome via une endocytose dépendante de la clathrine (Yu et al., 2005) (Figure 11). NPC1L1 ne serait toutefois pas uniquement responsable de l'internalisation du cholestérol dans les entérocytes, mais aussi d'autres stérols, notamment d'origine végétale, tel que le phytostérol. En effet, des souris n'exprimant pas NPC1L1 montrent une réduction de l'absorption de ces stérols, ainsi qu'une résistance à l'accumulation de cholestérol dans l'organisme induite par un régime riche en stérols (Altmann et al., 2012).

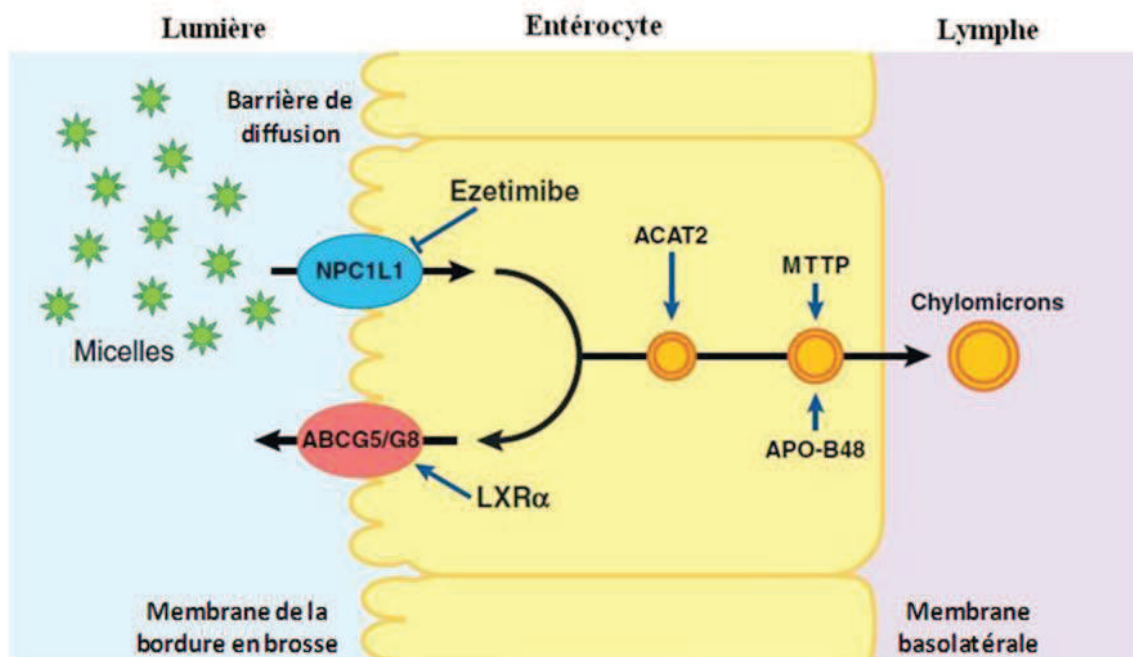


Figure 11 : Schéma récapitulatif de l'absorption par les entérocytes du cholestérol présent au sein des micelles dans la lumière de l'intestin (Wang, 2007). Le cholestérol, présent dans les micelles au niveau de la lumière intestinale, passe la membrane des entérocytes grâce à l'action de la protéine NPC1L1. Il peut alors soit être transféré dans la lymphe grâce aux protéines ACAT2 et MTTP et transporté par les chylomicrons, soit être rejeté dans l'intestin par ABCG5 et ABCG8.

NPC1L1 : Niemann–Pick C1-like 1 ; ACAT2 : Acyl-CoA cholesterol acyltransferase 2 ; MTTP : Microsomal triglyceride transfer protein ; ABCG : ATP-binding cassette sub-family G member.

Une partie du cholestérol absorbé, mais surtout les autres stérols impropres à l'organisme sont ensuite redirigés dans la lumière de l'intestin grâce au couple ABCG5/ABCG8 (ATP-binding cassette sub-family G member), qui permet leur élimination de l'organisme et donc prévient l'accumulation des stérols alimentaires (Wang et al., 2014). L'acyl-CoA cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) transforme le cholestérol absorbé en ester de cholestérol.

Le cholestérol est ensuite stocké sous la forme de chylomicrons afin de permettre son transport dans la circulation. Cette organisation du cholestérol fait intervenir la protéine MTTP (Microsomal triglyceride transfer protein). Le chylomicron est une lipoprotéine dont la surface est couverte d'une monocouche de phospholipides contenant du cholestérol libre et qui est entourée l'apolipoprotéine B48 (apoB48). Ces chylomicrons sont ensuite libérés dans

la lymphe au niveau du conduit thoracique qui prend en charge la circulation du cholestérol (Hussain, 2014).

Les chylomicrons interagissent au niveau des tissus adipeux et du muscle squelettique avec des lipoprotéines lipases qui causent l'hydrolyse des triglycérides des noyaux et la libération d'acides gras libres. Ces acides gras passent à travers les capillaires des cellules endothéliales et atteignent les adipocytes et les cellules des muscles squelettiques pour être stockés et oxydés. Après élimination du noyau des triglycérides, se forment des résidus de chylomicrons plus riches en esters de cholestérol et caractérisés par la présence d'apolipoprotéines B, CIII et E. Ces résidus sont ôtés de la circulation grâce à la fixation des apolipoprotéines E sur des récepteurs présents au niveau des cellules hépatiques qui permettent l'entrée de ces résidus dans la cellule par endocytose et leur catabolisme par les lysosomes. Le cholestérol est alors libéré pour être soit converti en acides biliaires et excrété dans la bile, soit stocké dans des lipoprotéines formées dans le foie, les VLDL (Cooper et al., 1997).

4. Transport du cholestérol dans l'organisme

Le cholestérol étant une molécule hydrophobe, son transport dans le plasma nécessite une liaison à différentes lipoprotéines (Figure 8) telles que les chylomicrons qui permettent son stockage dans le foie. Chaque famille de lipoprotéines est composée d'apolipoprotéines spécifiques qui aident à maintenir leur stabilité, les fixent au niveau de récepteurs sur leurs cellules cibles et permettent un échange de lipides entre lipoprotéines.

Les VLDL sont des lipoprotéines riches en triglycérides formées dans le foie à partir d'acides gras et de carbohydrates. Elles sont ensuite libérées dans la circulation sanguine, interagissent avec les capillaires des tissus, ce qui conduit à l'hydrolyse de leur noyau de triglycérides, formant des résidus de VLDL riches en esters de cholestérol. Une partie de ces résidus qui n'est pas réabsorbée par les cellules hépatiques est modifiée par substitution des triglycérides restant par des esters de cholestérol et retrait de toutes les apolipoprotéines à l'exception de l'apolipoprotéine B. Ce processus permet la synthèse de LDL riches en cholestérol. Leur fonction est d'approvisionner en cholestérol les tissus présentant des récepteurs aux LDL, comme les glandes surrénales, le muscle squelettique, les lymphocytes, les gonades et les reins. L'apport de cholestérol par ce processus est étroitement régulé par sa synthèse dans les cellules cibles. En effet, l'augmentation des LDL au niveau de ces cellules provoque une diminution de la synthèse de HMG CoA réductase et une augmentation du

stockage de cholestérol par les cellules. A l'inverse, une augmentation du cholestérol dans les cellules est responsable d'une diminution de l'expression en récepteurs des LDL permettant la régulation de cet approvisionnement (Feingold et Grunfeld, 2000).

Contrairement aux LDL, les HDL sont chargées de transporter le cholestérol des organes périphériques vers le foie, on parle alors de voie de transport inverse du cholestérol. Cette voie permet d'éviter l'accumulation du cholestérol dans l'organisme pour le stocker dans le foie où il peut être réabsorbé par les LDL pour alimenter d'autres organes.

Les HDL sont les plus petites et les plus denses des lipoprotéines, les protéines représentant environ 50% de leur masse et l'apolipoprotéine A-I correspondant à environ 70% de cette masse protéique. Cette apolipoprotéine est synthétisée à la fois dans le foie et l'intestin et est sécrétée dans le sérum. Ces protéines s'associent entre elles, avec des membranes phospholipidiques et le cholestérol pour former des pré-HDL pauvres en lipides. Ces pré-HDL sont capables de capter le cholestérol des macrophages des parois artérielles via le récepteur de l'ATP-binding cassette A-1 (ABCA-1). Le cholestérol est ensuite transféré dans les HDL pauvres en lipides où il est estérifié par la lécithine-cholestérol acyltransférase. A mesure que le cholestérol est estérifié, il est stocké dans le noyau des HDL pour former des lipoprotéines matures (Rosenson et al., 2012).

Les HDL possèdent deux mécanismes pour se décharger de leur cholestérol. Elles peuvent (1) le transférer au niveau du foie de manière facilitée par l'intermédiaire d'une protéine scavenger receptor-B1 (SR-B1) et ainsi mener à la formation de bile et à sa sécrétion au niveau de l'intestin ; (2) le transmettre aux LDL, un processus dépendant de la cholesteryl ester transfer protein (CETP).

5. Régulation du cholestérol dans l'organisme.

Le cholestérol joue un rôle important dans de nombreuses voies cellulaires et celui-ci est de ce fait fortement régulé afin d'assurer leur bon fonctionnement. Par ailleurs, l'accumulation de cholestérol dans l'organisme est responsable d'une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires ainsi que de l'aggravation des lésions qui y sont liées. Le contrôle de la concentration du cholestérol se fait à la fois par la régulation de son anabolisme et de son catabolisme.

5.1. Régulation de l'anabolisme du cholestérol

L'étape limitante de l'anabolisme du cholestérol est la synthèse de mévalonate à partir de la HMG-CoA, assurée par la HMG-CoA réductase qui est une cible pharmacologique pour la prévention de l'hypercholestérolémie (McFarland et al., 2014). L'activité de cette enzyme est de plus régulée par le cholestérol lui-même. Cette protéine contient un domaine cytoplasmique, ainsi qu'un domaine membranaire qui lui permet de détecter le cholestérol. En cas d'excès (ou d'autres stérols), il se produit un changement structurel dans ce domaine qui le rend plus susceptible à la destruction par le protéasome. La synthèse de cholestérol peut aussi être diminuée par l'activation de la « AMP-activated protein kinase » ou AMPK. Cet effet implique aussi la HMG-CoA réductase qui est alors phosphorylée par cette enzyme, ce qui provoque une réduction de son activité (Clark et Hardie, 1990 ; Zhang et al., 2015).

L'expression d'autres gènes impliqués dans l'absorption du cholestérol alimentaire est aussi influencée par l'ingestion d'une quantité trop importante de cholestérol. Ainsi, NPC1L1, le couple ABCG5/ABCG8 et MTPP présentent un élément de réponse au cholestérol au niveau de leur promoteur qui provoque une diminution de leur transcription en ARNm en condition d'hypercholestérolémie (Lin et al., 1995 ; Davis et al., 2004 ; Field et al., 2004).

5.2. Régulation du catabolisme du cholestérol

Le catabolisme du cholestérol a lieu dans le foie, où il est stocké et est assuré principalement par la voie de synthèse des acides biliaires. Bien que plusieurs des enzymes impliquées dans cette voie soient actives dans d'autres tissus, le foie est le seul organe capable de cette synthèse. La voie principale ou « classique » de synthèse des acides biliaires est initiée par l'hydroxylation du cholestérol en position 7 via l'action de la cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), une enzyme de la famille des cytochromes P450 localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Il existe une voie alternative de synthèse des acides biliaires qui implique l'hydroxylation du cholestérol en position 27 par une enzyme mitochondriale, la cholestérol 27-hydroxylase (CYP27A1). Cette autre voie est appelée voie acide de synthèse des acides biliaires. Les intermédiaires formés par cette voie sont ensuite hydroxylés en position 7 par l'oxystérol 7 α -hydroxylase (CYP7B1) (Lorbek et al., 2012) (Figure 12).

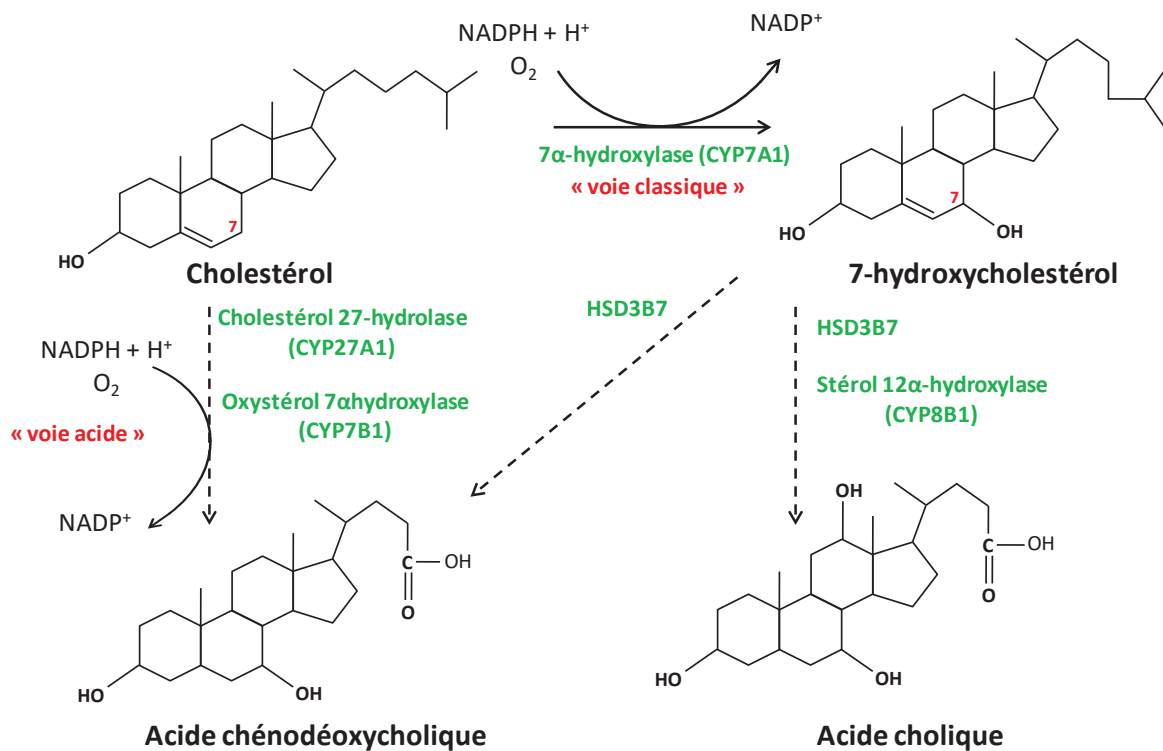


Figure 12 : Voies de synthèse hépatique des deux principaux acides biliaires. Au niveau hépatique, le cholestérol est dégradé pour former des acides biliaires. Les deux principaux sont l'acide chénodéoxycholique et l'acide cholique dont la synthèse à partir de cholestérol est initiée respectivement par le CYP27A1 et le CYP7A1.

Les récepteurs LXR (Liver X Receptor) ou récepteurs nucléaires aux oxystérols agissent comme récepteurs du cholestérol et de ses dérivés oxydés qui s'accumulent quand le taux de cholestérol devient trop élevé. Les LXR sont exprimés au niveau nucléaire dans le foie et dans le système digestif inférieur afin d'assurer cette fonction (Zhao et Wright., 2010). LXR-β a pour rôle d'activer le transport inverse du cholestérol des organes périphériques vers le foie. LXR-α quant à lui se trouve au niveau du foie et aide au catabolisme du cholestérol en acide biliaire.

Les acides biliaires sont ensuite stockés au niveau de la vésicule biliaire. Leur transport à travers les membranes canaliculaires du foie est un processus ATP-dépendant géré par la bile-salt excretion pump (BSEP). La conjugaison de ces acides améliore leur solubilité et empêche leur diffusion à travers les membranes cellulaires de l'intestin. Les acides biliaires étant incapables de quitter la lumière de l'intestin, leur concentration augmente jusqu'à induire la formation de micelles permettant l'émulsification et ainsi l'absorption des lipides.

Comme vu précédemment, parmi les enzymes qui interviennent dans la dégradation du cholestérol à l'intérieur des cellules, plusieurs appartiennent à la famille des cytochromes P450 comme le CYP27A1, fortement exprimé dans le foie (Barau et al., 2015). Ces enzymes sont des oxygénases, ayant pour rôle de permettre l'oxygénation de différents substrats, tel que le cholestérol. Un autre cytochrome participant à la régulation du catabolisme du cholestérol est le cytochrome P450 scc (side chain cliving) ou CYP11A1. Cette enzyme est principalement présente au niveau des organes stéroïdogéniques tels que les gonades, les glandes surrénales ou le cerveau. Elle est située au niveau de la membrane interne mitochondriale et permet de cataboliser le cholestérol en prégnénolone, un précurseur de l'ensemble des hormones stéroïdiennes. Toutefois, ce cytochrome est aussi présent dans de nombreux organes tels que le cœur, malgré leur absence de fonction stéroïdogénique (Kayes-Wandover et White., 2000).

Cette synthèse de prégnénolone représente l'étape limitante de la synthèse des hormones stéroïdiennes et l'activité de CYP11A1 est dépendante du transfert du cholestérol à travers la membrane mitochondriale car celui-ci est peu présent dans l'organite. Le transfert du cholestérol vers la mitochondrie influence donc la stéroïdogénèse et nécessite à ce titre une régulation importante.

6. Transport du cholestérol à la mitochondrie

6.1. La protéine translocatrice (TSPO)

La protéine translocatrice (TSPO) a tout d'abord été identifiée en 1977 dans les organes périphériques tels que les reins, le foie ou les poumons au moyen de ligands se fixant aux récepteurs aux benzodiazépines. De ce fait, lui a tout d'abord été attribué le nom de récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR) en opposition à leur récepteur central (Braestrup et Squires., 1977 ; Griffin et al., 2013). Ce récepteur a ensuite été renommé protéine translocatrice en 2006 pour être plus en adéquation avec la fonction physiologique alors décrite (Papadopoulos et al., 2006).

La protéine TSPO est exprimée de manière quasi-ubiquitaire dans l'organisme mais est principalement présente dans les organes ayant une fonction stéroïdogénique tels que les glandes surrénales et les gonades (Wang et al., 2012). La structure de cette protéine consiste en 5 hélices alpha transmembranaires (Rone et al., 2009a) et présente un site de fixation pour le cholestérol en C-terminal au niveau cytosolique. Cette séquence de la protéine TSPO fixe le

cholestérol avec une affinité de l'ordre du nanomolaire et est appelée « domaine CRAC » (cholesterol recognition amino acid consensus). Elle présente un motif d'acides aminés très conservé : L/V-X(1-5)-YX(1-5)-R/K (Lacapère et al., 2001 ; Jamin et al., 2005). La protéine TSPO est aussi capable de lier d'autres ligands endogènes tels les endozépinines (Papadopoulos, 1993 ; Tsukagoshi et al., 2011) et les porphyrines (Li et al., 2015).

Bien que la protéine TSPO soit synthétisée dans le cytosol, elle est transportée vers une translocase de la membrane externe, Tom70, par deux molécules chaperonnes Hsc70 et Hsp90 dont elle est ensuite libérée de manière ATP dépendant. L'insertion au niveau transmembranaire de TSPO est ensuite facilitée par la métaxine 1 (Mtx1) et accélérée par l'AMP cyclique (Figure 13) (Rone et al., 2009a). La protéine TSPO est de plus susceptible de former des homopolymères (de deux ou trois protéines principalement) (Delavoie et al., 2003).

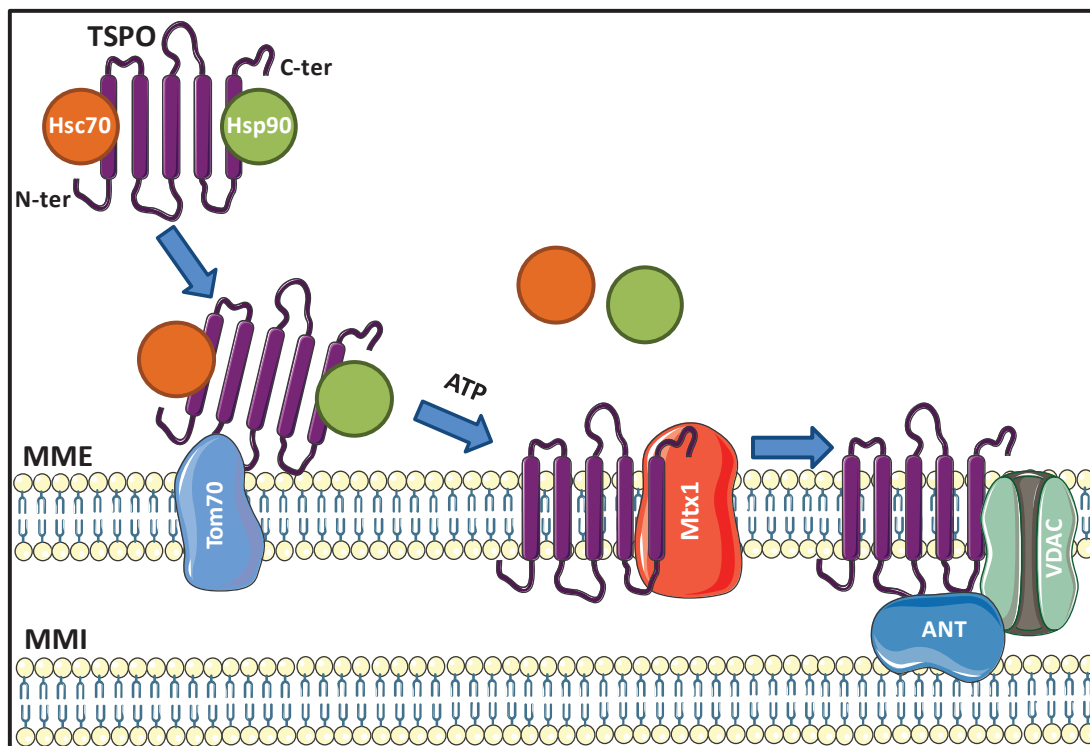


Figure 13 : Transport de la protéine TSPO au niveau de la membrane mitochondriale externe (d'après Rone et al., 2009a). TSPO est synthétisé dans le cytosol et s'intègre ensuite, grâce à différentes protéines, dans la membrane externe de la mitochondrie pour former un complexe avec d'autres protéines telles que VDAC et ANT.

MMI et MME : respectivement membranes mitochondriales interne et externe.

Malgré de nombreuses études sur le rôle de la protéine TSPO depuis son identification dans les années 1970, celle-ci reste aujourd'hui assez méconnue. Les premiers travaux étudiant la délétion de ce gène chez l'animal ont montré que ce récepteur est vital puisque celle-ci engendrait la mort des animaux à l'état embryonnaire (Papadopoulos et al., 1997).

La principale fonction décrite de TSPO est de permettre le transfert du cholestérol de la membrane mitochondriale externe à la membrane interne pour qu'il soit transformé par le CYP11A1 en prégnénolone, le précurseur de l'ensemble des hormones stéroïdiennes (Papadopoulos et al., 2015). La protéine TSPO jouerait ainsi un rôle important dans la stéroïdogénèse en permettant l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie, l'étape limitante de la synthèse d'hormones stéroïdiennes (Miller et Bose, 2011).

Toutefois des études plus récentes ont remis en question ces conclusions : 1) l'élaboration d'une lignée de souris viable n'exprimant pas TSPO ne présente pas de modification de la stéroïdogénèse (Morohaku et al., 2013 ; Tu et al., 2014). 2) l'effet pro-stéroïdogénique d'un ligand de la protéine TSPO, le PK11195, garde une efficacité comparable sur des cellules n'exprimant pas TSPO, suggérant une autre cible de la molécule dans ce phénomène (Tu et al., 2015).

TSPO interagit avec d'autres protéines au niveau de la membrane mitochondriale comme VDAC et ANT (McEnery et al., 1992). Cette dernière protéine est située au niveau de la membrane interne et le complexe protéique impliquant TSPO, ainsi formé, représenterait un site de contact entre les membranes interne et externe de la mitochondrie qui pourrait aider au passage de molécules lipophiles telles que le cholestérol à travers cette membrane (Rupprecht et al., 2010). La protéine TSPO a aussi été décrite comme faisant partie du complexe protéique constituant le mPTP (McEnery et al., 1992). Cependant comme pour VDAC et ANT, l'implication de la protéine TSPO dans le mPTP a été remise en cause par des travaux récents montrant que l'effet de 2 ligands de la TSPO, PK11195 et 4'-chlorodiazépam, sur l'ouverture du mPTP reste inchangé dans des mitochondries n'exprimant pas TSPO (Sileikyte et al., 2014). Ces résultats suggèrent que les ligands de la protéine TSPO pourraient influencer le mPTP en se fixant sur une autre cible. Cette cible pourrait être l'ATP synthase puisqu'elle est aujourd'hui décrite comme un constituant potentiel du mPTP (Bernardi et al., 2015), de plus des benzodiazépines et le PK11195 sont capables de se fixer à cette enzyme (Johnson et al., 2005 ; Cleary et al., 2007). La protéine TSPO pourrait aussi indirectement moduler l'ouverture du mPTP en agissant sur la production d'EROs. Schaller et al. (2010) ont montré que TRO40303, un ligand de la TSPO, permet la réduction du stress oxydant avec

une diminution de la production d'EROs dans des cardiomyocytes de rat traités avec H₂O₂. Il inhibe aussi la production d'EROs mitochondriaux dans les cardiomyocytes après hypoxie-réoxygénation, ce qui retarde l'ouverture du mPTP et améliore la survie cellulaire (Hanson et al., 2015). Ces résultats confirment ceux obtenus grâce au ligand de la protéine TSPO SSR180575 qui prévient les dommages causés par le stress oxydant au niveau de cardiomyoblastes, ainsi que les lésions cardiaques induites par l'ischémie-reperfusion chez le rongeur (Leducq et al., 2003).

En résumé, les principales fonctions décrites de TSPO, dans le transport du cholestérol et la stéroïdogénèse, sont aujourd'hui remises en question (Papadopoulos, 2014 ; Selvaraj et al., 2015). De nombreux travaux montrent que la protéine TSPO joue un rôle dans le transport du cholestérol dans la mitochondrie, mais contrairement à ce qui était admis jusqu'à très récemment cette protéine est probablement le composant d'une machinerie métabolique multiprotéique et n'est pas responsable, à elle seule, de ce transport.

Toutefois, outre cette implication dans le transport du cholestérol, la protéine TSPO semble impliquée dans d'autres processus cellulaires puisqu'elle peut influencer la respiration mitochondriale, le potentiel transmembranaire mitochondrial ou l'apoptose (Casellas et al., 2002). La protéine TSPO joue aussi un rôle dans l'activation des astrocytes et microglies dans le cerveau ou dans la synthèse de l'hème dans le foie (Surinkaew et al., 2011).

6.2. La protéine TSPO dans le cœur

Bien que principalement exprimé dans les organes stéroïdogéniques, la protéine TSPO est présente dans la majorité des tissus et notamment dans le cœur (Veenman et Gavish, 2006) où elle a été mise en évidence par Davies et Huston (1981) chez le rat et le cobaye au moyen de diazépam radiomarqué. La distribution de la protéine TSPO dans le cœur est toutefois compartimentée, celle-ci étant significativement plus élevée dans le ventricule que les oreillettes (Gehlert et al., 1985).

La fonction de TSPO dans cet organe n'est pas connue mais elle a été impliquée dans l'apparition des fibrillations cardiaques, celles-ci pouvant être inhibées au moyen d'un ligand de cette protéine, le 4'-chlorodiazépam (Li et al., 2010b). De plus, des ligands de la protéine TSPO possèdent des effets inotropiques qui peuvent être positifs ou négatifs en fonction du modèle, de l'espèce et/ou de la concentration utilisée (Surinkaew et al., 2011).

Ces ligands présentent aussi des propriétés cardioprotectrices (Morin et al., 2016), comme par exemple le 4'-chlorodiazépam, qui est capable de diminuer significativement la taille d'infarctus après une ischémie-reperfusion et permet de protéger les fonctions mitochondriales. L'expression de la protéine TSPO n'est toutefois pas modifiée en condition d'ischémie-reperfusion dans la mitochondrie. Les mécanismes de cette protection impliquent une inhibition de l'ouverture du mPTP assurant un maintien du potentiel de membrane mitochondrial. Ceci s'accompagne d'une redistribution de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au niveau de la mitochondrie (Obame et al., 2007). Cet effet cardioprotecteur du 4'-chlorodiazépam est également associée à une diminution du stress oxydant contribuant ainsi à l'inhibition de l'ouverture du mPTP (Paradis et al., 2013).

Un effet cardioprotecteur similaire a toutefois été observé avec un autre ligand de la protéine TSPO, spécifique d'un autre site de la protéine, le TRO40303. Alors que le 4'-chlorodiazépam reconnaît le site de fixation des benzodiazépines sur la protéine, ce ligand fixe celui du cholestérol et permet dans des modèles de rats et de souris une meilleure récupération cardiaque après ischémie-reperfusion ainsi qu'une réduction du stress oxydant. TRO40303 permet aussi de limiter l'ouverture du mPTP dans des cardiomyocytes malgré une absence d'effet sur des mitochondries isolées, pouvant signifier un effet indirect de ce ligand sur le mPTP (Schaller et al., 2010).

6.3. La “Steroidogenic Acute Regulatory protein” (StAR)

Une autre protéine concourt pour permettre le transfert du cholestérol dans la mitochondrie : la « steroidogenic acute regulatory protein » (StAR). Comme la protéine TSPO, elle est majoritairement exprimée dans les organes stéroïdogéniques tels que les glandes surrénales ou les gonades mais est aussi présente dans de nombreux autres organes tels que le cœur (Anuka et al., 2013a).

L'implication de cette protéine dans la stéroïdogénèse a été établie après avoir observé que l'usage d'hormones trophiques, qui stimulent la synthèse d'hormones stéroïdiennes, provoque l'augmentation d'une famille de protéines d'environ 30-37kDa, qui ont ensuite été identifiées comme des isoformes de la protéine StAR (Pon et al., 1986). La délétion de cette protéine est responsable d'une mortalité rapide après la naissance chez la souris (de l'ordre d'une semaine). Pour assurer leur viabilité, un régime particulier fournissant un apport important en corticostéroïdes est nécessaire, afin de compenser la diminution de leur synthèse (Caron et al., 1997).

L'analyse de patients présentant une hyperplasie congénitale lipoïde des surrénales, causée par une diminution de la stéroïdogénèse, a montré que l'origine de cette pathologie pouvait être une déficience en protéine StAR (Bose et al., 2000). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de la StAR sans stimulation hormonale est suffisante pour augmenter la stéroïdogénèse (Clark et al., 1994). Petrescu et al. (2001) ont confirmé le rôle de la protéine StAR dans la synthèse des hormones stéroïdiennes grâce à l'utilisation de stérol marqué au moyen d'une sonde fluorescente. Ils ont observé une interaction moléculaire étroite entre le cholestérol et la protéine StAR, de plus cette dernière permet une augmentation importante du transfert de ce stérol à travers la membrane mitochondriale, qui est l'étape limitante de la stéroïdogénèse.

Cette protéine est rapidement synthétisée dans le cytosol afin de permettre l'augmentation de la stéroïdogénèse en cas de nécessité. Cette synthèse protéique rapide est indispensable à la régulation de la stéroïdogénèse, car le blocage de la synthèse globale des protéines inhibe l'effet pro-stéroïdogénique des hormones trophiques (Ferguson, 1963).

L'expression de la protéine StAR est aussi modulée par d'autres protéines telles que le facteur stéroïdogénique 1 (SF-1), qui est capable de se fixer sur le promoteur du gène codant StAR afin d'augmenter sa transcription (Hatano et al., 2016). Cette activité de SF-1 nécessite

toutefois sa phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) qui est dépendante de l'AMP cyclique (AMPC) (Sugawara et al., 2000). L'activation de PKA augmente l'expression protéique de SF-1 en assurant une meilleure stabilité de la protéine (Aesøy et al., 2002).

Une autre protéine module l'expression de la StAR, il s'agit de DAX-1 qui est responsable d'une diminution de l'expression de la protéine StAR au niveau transcriptionnel par fixation sur le promoteur du gène codant la protéine (Zazopoulos et al., 1997). La mutation de DAX-1, à l'inverse de celle de StAR, est d'ailleurs responsable d'une hypoplasie congénitale lipoïde des surrénales du fait d'une stéroïdogénèse trop importante. Cette activité anti-stéroïdogénique de DAX-1 est responsable d'une inhibition de l'activité de SF-1 sur le promoteur de StAR (Babu et al., 2002).

L'activité de la protéine StAR peut être aussi modulée, notamment par PKA grâce à deux sites de phosphorylation au niveau des sérines en position 57 et 195. Cette phosphorylation joue un rôle important dans son activité puisqu'une modification au niveau de ces sérines diminue la stéroïdogénèse. La mutation de la sérine en position 195 en alanine notamment induit une diminution d'environ 50% de la synthèse d'hormones stéroïdiennes (Arakane et al., 1997). La protéine StAR est aussi susceptible d'être phosphorylée par la protéine kinase Ca^{2+} -calmoduline dépendantes et la protéine kinase C (PKC). La phosphorylation de la protéine StAR par PKC permet une augmentation de l'expression de la StAR par stabilisation de la protéine. Toutefois, celle-ci reste inactive tant qu'elle n'est pas phosphorylée par PKA (Jo et al., 2005).

La protéine StAR est capable de s'ancrer à la mitochondrie grâce à un site de fixation situé du côté N-terminal et le temps de fixation de la protéine sur la membrane mitochondriale est proportionnel à son efficacité à faire passer le cholestérol à travers celle-ci (Bose et al., 2002). Toutefois, Arakane et ses collègues ont montré qu'une protéine StAR tronquée du côté N-terminal, ne possédant donc pas de site de fixation à la mitochondrie, conserve son aptitude à faire entrer le cholestérol dans l'organite, alors qu'à l'inverse, la troncature du côté C-terminal de la protéine induit une chute de son efficacité (Arakane et al., 1996). Ainsi la StAR serait activable et permettrait la stéroïdogénèse en absence de fixation de la protéine à l'organite. Cette fixation à la membrane mitochondriale possède à l'inverse un rôle de régulation de l'activité de la protéine StAR en permettant son incorporation dans la mitochondrie pour mettre fin à l'entrée du cholestérol dans l'organite (Arakane et al., 1996).

Après fixation à la membrane mitochondriale externe, la protéine StAR est clivée du côté N-terminal et phosphorylée par PKA pour donner une protéine de 32kDa alors active

(Figure 14). C'est cette protéine de 32 kDa qui provoquerait l'entrée de cholestérol. Cette troncature de la protéine StAR phosphorylée au niveau de la membrane mitochondriale externe est facilitée par VDAC1 (Bose et al., 2008). Artemenko et al. (2001) ont quantifié dans des cellules de glandes surrénales une entrée de cholestérol dans la mitochondrie dépassant 400 molécules par minute par protéine StAR active.

Une fois entré, le cholestérol est utilisé par le CYP11A1 et la protéine StAR est clivée de nouveau afin de donner une protéine de 27kDa. Ce transfert de la protéine StAR dans la mitochondrie est dépendant du potentiel électrique de la membrane et abouti à une forme de la protéine dénuée d'activité pro-stéroïdogénique (Stocco et Sodeman, 1991). Cette dernière modification post-traductionnelle de la protéine StAR de 32kDa permet de stopper l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie, évitant une accumulation trop importante susceptible de provoquer une augmentation incontrôlée de la stéroïdogénèse à l'origine d'effets néfastes.

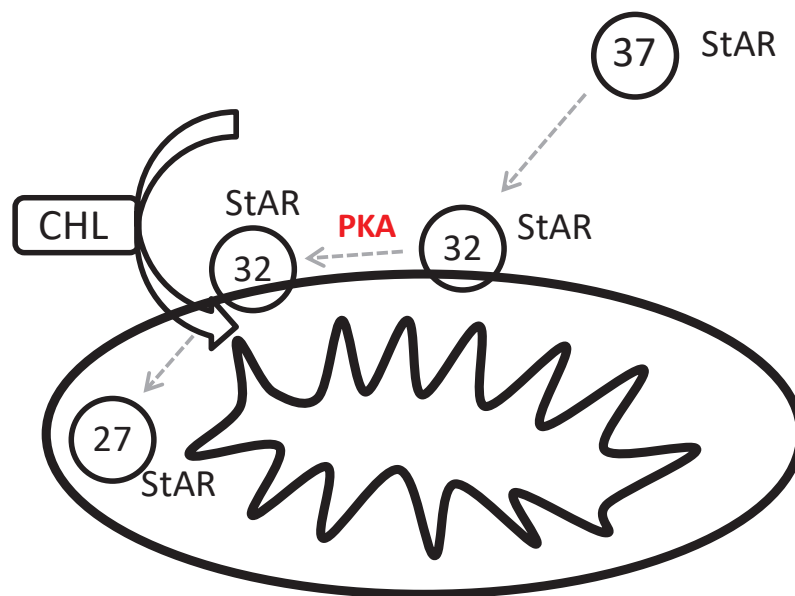


Figure 14 : Schéma illustrant les modifications post-traductionnelles de la protéine StAR régulant son activité. La protéine StAR est synthétisée dans le cytosol sous la forme d'une protéine de 37kDa et grâce à un site de reconnaissance de la mitochondrie, elle est capable de se fixer au niveau de la membrane mitochondriale externe. StAR y est ensuite clivée et phosphorylée par PKA pour donner une protéine fonctionnelle de 32kDa permettant le transfert du cholestérol à travers la membrane mitochondriale. Enfin, elle est de nouveau clivée et internalisée dans la mitochondrie donnant une protéine inactive de 27kDa.

6.4. La protéine StAR dans le cœur

Comme la TSPO, la protéine StAR est principalement exprimée dans les organes stéroïdogéniques, mais est aussi présente dans d'autres organes tels que le cœur, son rôle n'étant cependant pas clairement défini (Anuka et al., 2013a). Cette protéine est toutefois impliquée dans les mécanismes consécutifs à un phénotype cardiaque pathologique. L'expression en ARNm codant la protéine StAR est notamment augmentée dans le cœur de patients insuffisants cardiaques (Youngs et al., 2001a). De plus, une occlusion prolongée de la coronaire au niveau du myocarde s'accompagne d'un accroissement de ces ARNm et donc de la protéine StAR (Casal et al., 2002 ; Anuka et al., 2013b). Cette activation de la stéroïdogénèse induite par la StAR au cours de l'infarctus du myocarde provoque une augmentation de la synthèse de minéralocorticoïdes tels que l'aldostérone, qui peut être responsable de fibrose contribuant aux lésions induites lors d'un infarctus (Silvestre et al., 1999 ; Messaoudi et al., 2012). Il est toutefois à noter que cette synthèse d'aldostérone est régulée par un rétrocontrôle négatif de l'expression de la protéine StAR (Casal et al., 2002).

Paradoxalement, la surexpression de la protéine StAR dans les fibroblastes suite à une ischémie myocardique prolongée est bénéfique pour ces cellules. En effet, la délétion de la protéine StAR induit une sensibilité accrue de ces cellules à l'apoptose, liée à une augmentation de l'activation de la protéine pro-apoptotique Bcl-2-associated X (Bax) (Anuka et al., 2013b).

6.5. Un complexe multiprotéique incluant les protéines TSPO et StAR ?

Les protéines TSPO et StAR ont donc été décrites successivement comme les principaux médiateurs du passage du cholestérol à travers la membrane mitochondriale. Une interaction entre ces deux protéines a d'ailleurs été montrée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (West et al., 2001), bien que celle-ci ait été sujet à débat (Bogan et al., 2007). De plus, la diminution de l'expression de la protéine TSPO dans des cellules de Leydig cause une augmentation de l'isoforme de 37kDa de la protéine StAR et s'accompagne d'une diminution de sa forme de 27kDa, signe d'une diminution de son activité (Hauet et al., 2005). Par ailleurs, ces deux protéines sont capables d'interagir avec VDAC (Bose et al., 2008 ; Rone et al., 2009) qui semble jouer un rôle dans la stéroïdogénèse puisqu'elle est fortement diminuée lorsque VDAC est délété (Rone et al., 2012).

Le modèle actuel décrivant le transfert du cholestérol cellulaire vers la membrane mitochondriale interne fait finalement intervenir un complexe protéique appelé « transducéosome » comprenant StAR, TSPO et VDAC (Figure 15) (Rone et al., 2012). Ce transducéosome est aussi composé de la protéine ATAD3A (ATPase family AAA Domain-containing protein 3) faisant la liaison entre les deux membranes mitochondriales et dont le knock-out est létal au stade embryonnaire (Goller et al., 2013 ; Papadopoulos et al., 2016). La phosphorylation de la protéine StAR et sa liaison avec le reste de ce complexe permet à celui-ci de fixer le cholestérol pour assurer son transfert jusqu'à la membrane mitochondriale interne où il interagit avec le CYP11A1 afin de former la prégnénolone nécessaire à la stéroïdogénèse (Rone et al., 2012).

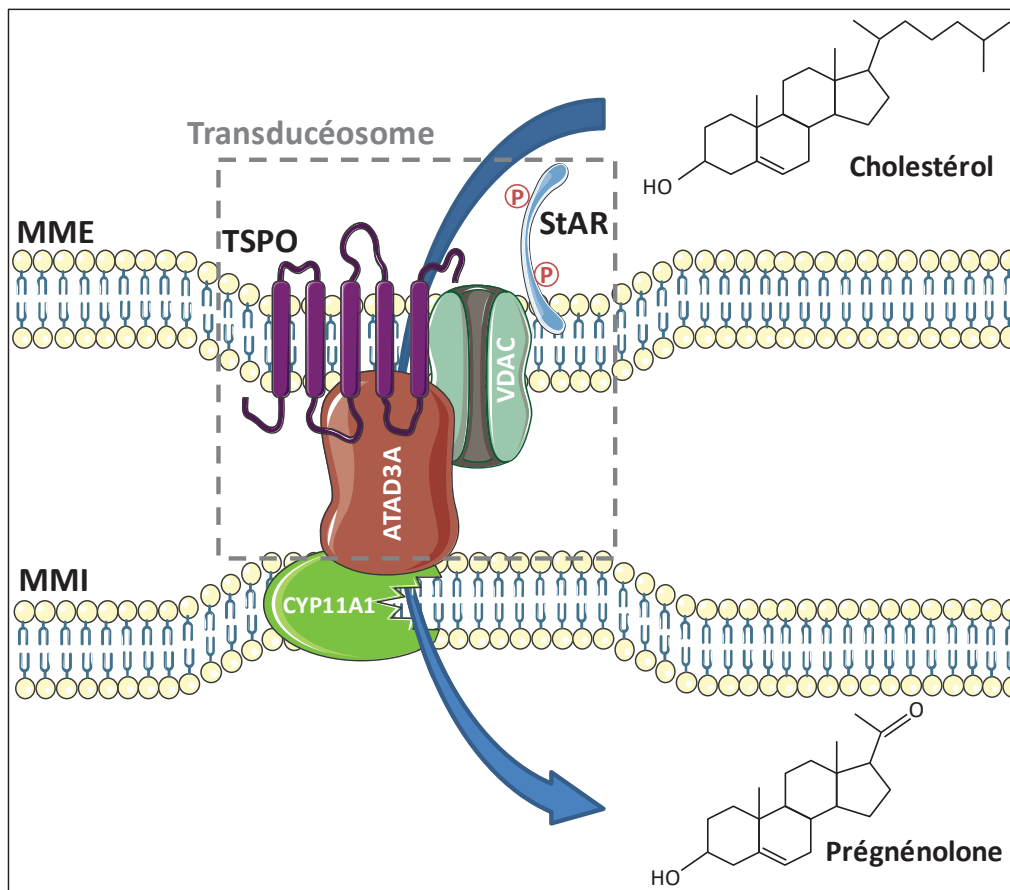


Figure 15 : Schéma du transfert du cholestérol cytosolique jusqu'au CYP11A1 grâce au transducéosome (d'après Papadopoulos et al., 2015). Ce complexe, présent au niveau de sites de liaison entre les membranes mitochondriales interne et externe (MMI et MME), est composé des protéines StAR, TSPO, VDAC et ATAD3A qui assurent ensemble l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie. Celui-ci peut alors être utilisé par le CYP11A1 pour former la prégnénolone nécessaire à la synthèse des hormones stéroïdiennes.

Le côté C-terminal de ATAD3A est aussi susceptible de s'étendre jusqu'au réticulum endoplasmique et de créer un pont entre celui-ci et la mitochondrie (Issop et al., 2015). Cet espace de rapprochement entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique est appelé MAM (mitochondrial-associated membrane) et représente un site de transfert de Ca^{2+} entre les deux organelles. Ces MAMs sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie mitochondriale ainsi que l'apoptose (Vance, 2014). Elles peuvent de plus jouer un rôle important dans le transport du cholestérol jusqu'à la mitochondrie et la stéroïdogenèse, cette région présentant une forte concentration en cholestérol sous forme de radeaux (ou « rafts ») lipidiques au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Hayashi et Su, 2010). L'implication des MAMs dans la stéroïdogenèse est aussi supportée par le fait que l'acyl-CoA synthétase 4 (ACSL4), un marqueur fréquemment utilisé dans la caractérisation des MAMs, est impliquée dans la synthèse des hormones stéroïdiennes (Maloberti et al., 2005).

Chapitre I.III Les dérivés oxydés du cholestérol : les oxystérols

Les oxystérols constituent une vaste famille de composés impliqués dans de nombreux processus physiologiques. Historiquement, les oxystérols ont été considérés comme de simples métabolites du cholestérol rendus polaires pour favoriser son élimination. Ce n'est que plus tard qu'on s'est aperçu qu'ils pouvaient être des intermédiaires dans la synthèse de hormones stéroïdiennes et interagir avec des récepteurs (Björkhem et Diczfalusy, 2002 ; Mutemberezi et al., 2016). Il existe une très vaste littérature sur ces molécules dont nous ne ferons qu'une brève présentation de celles étudiées.

1. Synthèse des oxystérols

Les oxystérols résultent d'une oxydation du cholestérol qui peut se faire soit de manière chimique, soit de manière enzymatique (Olkkonen et al., 2012). Ces molécules sont présentes dans l'organisme sous forme de traces, la quantité d'oxystérols totaux ne représentant qu'environ un millième de la quantité de cholestérol présent dans l'organisme.

La synthèse chimique des oxystérols se fait par auto-oxydation du cholestérol en présence d'EROs. Cette oxydation s'effectue préférentiellement au niveau du cycle carboné B du cholestérol, grâce à la présence d'une liaison insaturée (Figure 16). Elle est le plus souvent localisée sur le carbone 7, formant un intermédiaire peroxyde, le 7- α/β -hydroxypéroxycholestérol qui donne à son tour les 7 α - et 7 β -hydroxycholestérols, ainsi que le 7-cétocholestérol (Brown et al., 1997). Le 7 β -hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol sont les oxystérols les plus concentrés dans l'organisme. Par ailleurs, le 7-cétocholestérol peut être converti de manière réversible en 7 β -hydroxycholestérol par la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase 1 (Larsson et al., 2007 ; Mitić et al., 2013). L'oxydation du cycle carboné B du cholestérol peut se faire sur d'autres carbones, notamment pour la synthèse des dérivés 5,6-époxycholestérols. Ces produits nécessitent la formation de dérivés lipidiques hydroperoxy et sont les oxystérols formés non enzymatiquement les plus abondants dans les macrophages (Murphy et Johnson, 2008). L'oxydation du cholestérol est également possible au niveau de sa chaîne latérale en position 24, 25 ou 27. Outre la synthèse *in vivo*, cette grande diversité d'oxystérols peut aussi provenir de la nourriture dans laquelle le cholestérol

est susceptible d'être oxydé de manière non-enzymatique tout au long de sa conservation (Brzeska et al., 2016).

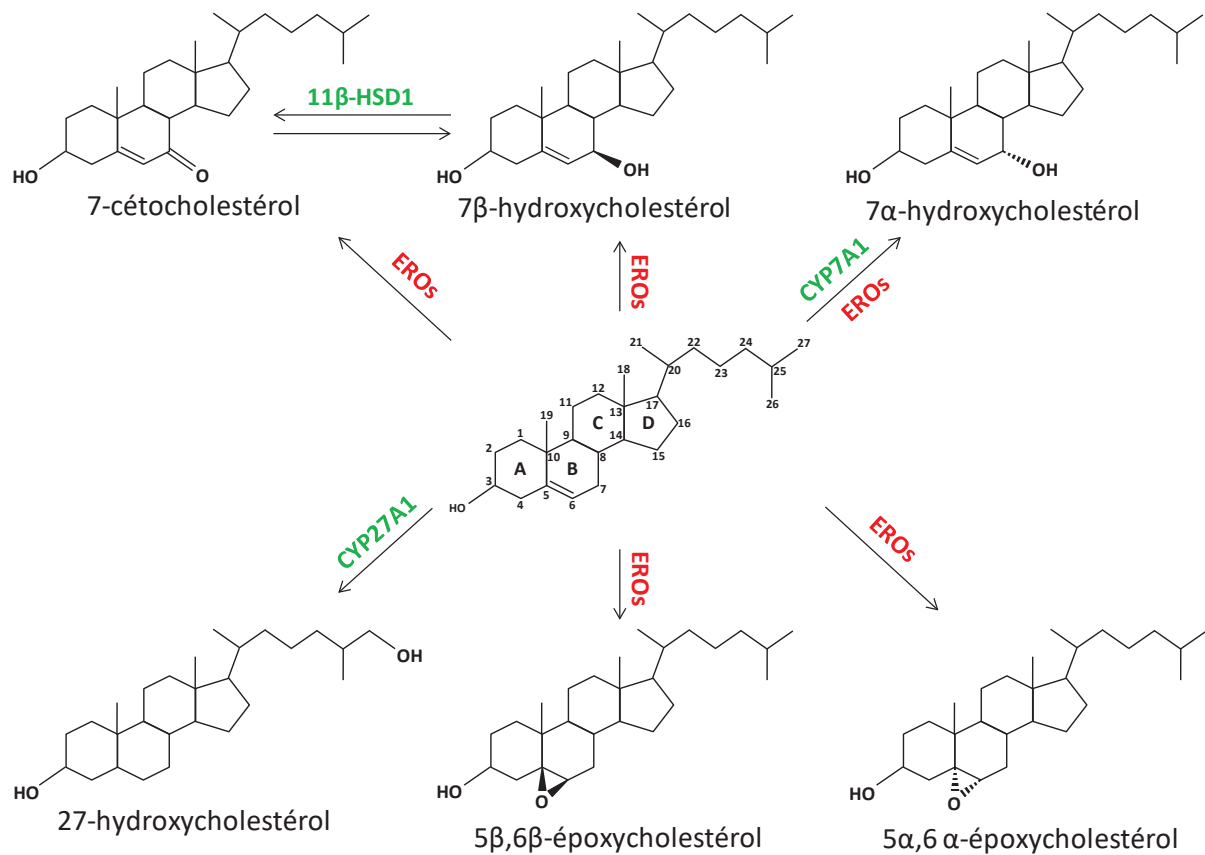


Figure 16 : Schéma présentant la synthèse des principaux oxystérols étudiés dans ce travail à partir du cholestérol. Le cholestérol peut être oxydé soit de manière chimique grâce aux espèces réactives de l'oxygène (EROs), soit de manière enzymatique grâce à des cytochromes P450 tels que le CYP27A1 ou le CYP7A1.

11β-HSD1 : 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase 1.

L'autre voie de synthèse des oxystérols fait intervenir différentes enzymes dont le rôle est d'oxyder le cholestérol. Celles-ci sont des cholestérol hydroxylases appartenant majoritairement à la famille des cytochromes P450 et se situent surtout au niveau du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie (Vejud et al, 2008). Le tableau 1 présente les cholestérol hydroxylases et les oxystérols synthétisés par ces enzymes. Parmi celles-ci, le CYP27A1 mitochondrial permet la synthèse du 27-hydroxycholestérol, un intermédiaire dans l'anabolisme des acides biliaires. Le CYP7A1, situé quant à lui dans le réticulum endoplasmique, est responsable de la synthèse du 7α-hydroxycholestérol, qui peut être aussi

formé chimiquement et qui, comme le 27-hydroxycholestérol, est impliqué dans la synthèse des acides biliaires.

Enzymes	Distribution	Localisation subcellulaire	oxystérols
24-hydroxylase (CYP46A1)	Neurones, rétine neurale, hépatocytes	Réticulum endoplasmique	24S-hydroxycholestérol
25-hydroxylase	Hépatocytes	Réticulum endoplasmique, appareil de Golgi	25-hydroxycholestérol
27-hydroxylase (CYP27A1)	Hépatocytes, macrophages, cellules endothéliales	Mitochondrie	27-hydroxycholestérol
7 α -hydroxylase (CYP7A1)	Hépatocytes, cellules ovariennes	Réticulum endoplasmique	7 α -hydroxycholestérol
CYP3A4	Hépatocytes	Microsomes	4 β -hydroxycholestérol
11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1	Hépatocytes	Microsomes	Interconversion 7-cétocholestérol/7 β -hydroxycholestérol

Tableau 1 : Enzymes impliquées dans la synthèse des oxystérols. Indication de la distribution cellulaire, ainsi que de la localisation subcellulaire de ces enzymes et des oxystérols produits. (traduit de Vejux et al., 2008).

CYP : cytochrome P450

2. Rôle des oxystérols

2.1. Implication dans la régulation du cholestérol

2.1.1. Elimination du cholestérol

L'oxydation du cholestérol en oxystérols permet de réduire sa demi-vie de manière importante. De plus, les oxystérols sont plus hydrophiles et peuvent circuler plus facilement à travers les membranes lipophiles et vers le foie pour être éliminés, ce qui permet de limiter l'accumulation du cholestérol (Meaney et al., 2002).

Les oxystérols sont aussi responsables de la modification de l'expression de la protéine StAR, impliquée dans le transport du cholestérol à travers la membrane mitochondriale externe grâce au transducosome. Différents oxystérols, dont principalement le 20 α -hydroxycholestérol, permettent la surexpression de cette protéine (King et al., 2004). Ce mécanisme assure le catabolisme du cholestérol en excès dans les cellules par le CYP11A1 et le CYP27A1, qui forment respectivement la prégnénolone et le 27-hydroxycholestérol dans la mitochondrie. Le CYP27A1 est notamment fortement exprimé au niveau des macrophages dans lesquelles il permet l'élimination du cholestérol (Björkhem et al., 1994). De plus, la capacité de cette enzyme à hydroxyler le 7-cétocholestérol au niveau du

carbone 27 augmente sa solubilité dans l'eau et facilite son élimination dans le foie en le rejetant dans la lumière de l'intestin (Lyons et Bown, 2001 ; Young et al., 2001b).

2.1.2. Synthèse du cholestérol

Bien que le cholestérol soit capable d'un rétrocontrôle sur sa synthèse dans les cellules, l'ajout de cholestérol purifié sur des cultures cellulaires ne modifie que peu cette synthèse. Les oxystérols jouent un rôle important dans la régulation de l'anabolisme du cholestérol et les principaux inhibiteurs de cette synthèse observés sont le 25-hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol (Kandutsch et al., 1978 ; Tamasawa et al., 1994). Ces oxystérols sont capables de modifier l'expression de différents gènes comme ceux codant pour la lanostérol 14 α -déméthylase ou la squalène synthase, impliquées dans la synthèse du cholestérol, permettant sa régulation (Wang et al., 2008).

Deux principaux mécanismes de régulation de synthèse du cholestérol faisant intervenir les oxystérols ont été mis en évidence. Le premier implique les SREBP (Horton et al., 2002). Une déplétion en oxystérols active les SREBP par clivage et libération de ces protéines, tandis qu'une augmentation inhibe leur maturation (Radhakrishnan et al., 2007). Ainsi, la diminution en oxystérols intracellulaires entraîne le transport de SREBP du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi par la SCAP (protéine d'activation du clivage de SREBP). Après détection du cholestérol, la SCAP présente dans la membrane du réticulum endoplasmique se lie à SREBP qui est ensuite clivée par la protéase S1P (Site-1 protéase). Une seconde enzyme (S2P) clive ensuite la partie N-terminale de la SREBP entraînant sa libération dans le cytosol et sa migration rapide dans le noyau. La partie N-terminale s'homodimérise grâce à la présence de motifs HLH (helix-loop-helix) basiques et se fixe sur l'ADN au niveau de séquences SRE (Elément de régulation des stérols) dans le promoteur de gènes impliqués dans la synthèse de cholestérol tels que la HMG-CoA réductase (Horton et al., 2002).

Un autre mécanisme de régulation de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol par les oxystérols implique les facteurs de transcription de la famille des LXRs. Ces protéines, principalement exprimées dans le foie, se retrouvent dans de nombreux organes et modulent l'expression de différents gènes impliqués dans le transport, le stockage et le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires (Repa et Mangelsdorf, 2000). Les récepteurs LXRs sont des récepteurs nucléaires activés par différents oxystérols (Korach-André et Gustafsson, 2011). En absence de ligand, ils sont fixés sur l'ADN sous forme

d'hétérodimères avec le récepteur nucléaire RXR (Retinoid X Receptor). La liaison d'un oxystérol induit la libération des co-répresseurs de l'expression du gène et le recrutement de co-activateurs spécifiques (Jakobsson et al., 2012). Les gènes ciblés par ces récepteurs sont principalement ceux impliqués dans le transport inverse du cholestérol jusqu'au foie et son élimination tels que le CYP7A1 (Hong et Tontonoz, 2014).

2.2. Toxicité des oxystérols

Les oxystérols présentent une activité physiologique importante dans l'organisme et sont impliqués dans différentes voies de signalisation comme par exemple la voie Hedgehog qui participe au développement embryonnaire et à l'orientation de la différenciation cellulaire (Choudhry et al., 2014). L'inhibition de la synthèse de stérols est responsable d'une diminution de l'activité de cette voie qui peut toutefois être prévenue par ajout de manière exogène de cholestérol et de certains oxystérols tels le 25-hydroxycholestérol (Corcoran et Scott, 2006). L'effet des oxystérols sur cette voie passe aussi par une autre voie, Notch, impliquée dans la différenciation et la prolifération des cellules (Kim et al., 2010). Mais malgré leur implication dans la signalisation cellulaire, les oxystérols peuvent également être responsables d'effets délétères sur les cellules

2.2.1. Effet pro-apoptotique des oxystérols

La toxicité des oxystérols varie fortement en fonction des composés et est principalement importante pour le 7-cétocholestérol, le 7 β -hydroxycholestérol et le 5 β ,6 β -époxycholestérol (Lemaire-Ewing et al., 2006). Les oxystérols sont notamment susceptibles de s'accumuler au niveau de membranes lipidiques et de provoquer des modifications de leurs propriétés biophysiques et biochimiques pouvant être néfastes (Olkkonen et Hynynen, 2009). Toutefois, la cytotoxicité des oxystérols provient principalement de leur capacité à promouvoir l'apoptose des cellules.

Il existe différentes voies qui aboutissent à l'activation de caspases par les oxystérols menant à des modifications cellulaires biochimiques et morphologiques qui sont propres aux mécanismes apoptotiques (Elmore, 2007). Ryan et al. (2005) ont montré un effet pro-apoptotique du 5 β ,6 β -époxycholestérol et du 7 β -hydroxycholestérol. Toutefois, alors que l'effet du 7 β -hydroxycholestérol s'accompagne d'une diminution du potentiel de membrane mitochondrial, il n'en est rien pour le 5 β ,6 β -époxycholestérol. De plus, bloquer l'ouverture du mPTP n'a permis dans cette étude que de protéger les cellules de l'effet du 7 β -

hydroxycholestérol. Le 5 β ,6 β -époxycholestérol induit donc un effet pro-apoptotique mPTP-indépendant mais implique une augmentation de l'expression de caspase 8 intervenant dans la voie d'activation en cascade des caspases qui mène à l'apoptose des cellules telles que les cardiomyocytes (Logue et Martin., 2008 ; Zhang et al., 2017). Le 7-cétocholestérol est responsable d'un ralentissement du cycle de Krebs causé par une diminution de ses substrats, qui s'accompagne d'une diminution de la synthèse d'ATP, du dysfonctionnement des mitochondries et d'une surproduction d'EROs à l'origine de l'apoptose de la cellule (Leoni et al., 2017). De plus le 7-cétocholestérol est susceptible d'induire des dommages au niveau mitochondrial par dégradation de l'ADN de l'organite (Gramajo et al., 2010). Le 25-hydroxycholestérol augmente aussi l'apoptose, notamment dans les cellules musculaires lisses, ainsi que dans des cardiomyocytes par un mécanisme faisant intervenir une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax (Perales et al., 2009 ; Rosca et al., 2012).

Cependant, bien que les oxystérols présentent des propriétés pro-apoptotiques, la combinaison d'oxystérols peut provoquer une cytotoxicité inférieure à celle d'un des oxystérols qui la compose individuellement. Notamment, l'effet pro-apoptotique du 7-cétocholestérol et du 7 β -hydroxycholestérol à une concentration donnée peut être inhibé par la présence d'autres oxystérols (Aupeix et al., 1995 ; Biasi et al., 2004). Ces deux oxystérols sont chacun capables d'induire la synthèse d'EROs par activation du complexe NADPH oxydase qui représente une source importante d'anions superoxydes (Griendling et al., 2000 ; Rosenblat et Aviram, 2002). En présence d'autres oxystérols possédant une capacité moindre à activer ce complexe, il y aurait compétition entre ces oxystérols au niveau de la NADPH oxydase, réduisant ainsi le stress oxydant induit, à l'origine d'une cascade d'évènements aboutissant à l'apoptose des cellules (Leonarduzzi et al., 2004).

2.2.2. Les récepteur aux œstrogènes

Les oxystérols sont également capables de fixer les récepteurs nucléaires aux œstrogènes qui assurent la régulation de la synthèse des œstrogènes. Ceux-ci jouent un rôle important dans la reproduction, ainsi qu'un rôle protecteur contre les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires (Deroo et Korach, 2006). Cette cardioprotection est associée à une modification du profil lipidique, ainsi qu'à une vasorelaxation de l'aorte en ciblant les cellules endothéliales. Certains oxystérols tels que le 27-hydroxycholestérol et le 25-hydroxycholestérol peuvent donc reconnaître ces récepteurs et influencer leur activité bien

que les conséquences de cette interaction reste assez méconnues (DuSell et McDonnell, 2008 ; Lappano et al., 2011). Toutefois le 27-hydroxycholestérol inhibe la production de NO grâce aux œstrogènes au niveau des cellules vasculaires, provoquant une diminution de la vasorelaxation artérielle pouvant se révéler délétère (Umetani et al., 2007). Il stimule aussi l'athérosclérose, via un effet pro-inflammatoire dépendant du récepteur aux œstrogènes α , en atténuant l'athéroprotection liée aux œstrogènes (Umetani et al., 2014).

2.2.3. Implication des oxystérols dans différentes pathologies

L'accumulation d'oxystérols est responsable de la synthèse de cytokines à l'origine d'une réaction inflammatoire impliquée dans le développement de diverses maladies chroniques (Vejud et Lizard, 2009). Cette inflammation cause une augmentation du stress oxydant qui lui-même amplifie cette réaction inflammatoire, causant un cercle vicieux.

Les oxystérols comme le 7-cétocholestérol, le 27-hydroxycholestérol, le 7 α -hydroxycholestérol et le 7 β -hydroxycholestérol contribuent au dysfonctionnement endothéliale qui caractérise l'initiation de l'athérosclérose (Poli et al., 2009). Les plaques d'athérome formées par l'accumulation de LDL oxydés, présentent une forte concentration en oxystérols qui sont responsables d'une réaction inflammatoire au niveau de l'endothélium, ainsi que de la formation de cellules spumeuses (Lemaire et al., 1998 ; Hayden et al., 2002). Le 7-cétocholestérol est l'oxystérol le plus présent au niveau des plaques d'athérome à l'origine de maladies cardiovasculaires tels que l'infarctus du myocarde (Chalubinski et al., 2013). La réponse inflammatoire induite par les oxystérols est de plus impliquée dans l'expansion des lésions liées à l'ischémie-reperfusion myocardique.

Les oxystérols sont aussi impliqués dans différentes maladies neurodégénératives à cause de leur capacité à passer la barrière hémato-encéphalique, contrairement au cholestérol (Lütjohann et al., 1996 ; Poli et al., 2013). Cette propriété permet l'élimination d'excès de cholestérol au niveau cérébral mais peut aussi, à l'inverse, y provoquer l'accumulation d'oxystérols susceptibles d'induire des lésions. En effet, la maladie d'Alzheimer est associée à une augmentation du 27-hydroxycholestérol qui pourrait participer à l'accélération du développement de la maladie (Heverin et al., 2003 ; Shafaati et al., 2011). Les patients atteints de la maladie de Parkinson présentent eux aussi une augmentation de 27-hydroxycholestérol, de 7 α/β -hydroxycholestérol, de 7-cétocholestérol, de 5 β ,6 β -époxycholestérol et de 24-hydroxycholestérol qui sont deux fois plus élevés que dans des cerveaux témoins (Cheng et al., 2011). Les effets pro-inflammatoires et pro-apoptotiques des oxystérols sont associés à

d'autres pathologies chroniques telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou le cancer colorectal (Rodríguez et Larrayoz, 2010 ; Jusakul et al., 2011).

Objectifs

Comme expliqué dans les chapitres précédents, le cholestérol joue un rôle important dans la survenue de l'infarctus du myocarde (Nelson, 2013). L'excès de cholestérol sanguin est aussi responsable d'une aggravation des lésions consécutives à l'ischémie-reperfusion myocardique et d'une diminution de l'efficacité de différentes stratégies cardioprotectrices (Görbe et al., 2010 ; Pons et al., 2013). A l'inverse, la diminution du cholestérol au moyen d'une statine assure une protection du tissu contre l'ischémie-reperfusion (Stenstrand et al., 2001).

Il est établi depuis longtemps que la mitochondrie est largement impliquée dans l'apparition de lésions de reperfusion (Walters et al., 2012 ; Muntean et al., 2016). Nombre de stratégies visant à limiter la perméabilité de sa membrane permettent de limiter ces dommages. De plus, la protéine TSPO, décrite comme impliquée dans le transport du cholestérol dans la mitochondrie et dans la régulation de l'ouverture du mPTP, joue un rôle dans l'apparition de ces lésions. En effet, l'utilisation de certains de ses ligands a permis de réduire l'arythmie consécutive à l'ischémie-reperfusion (Mestre et al., 1985 ; Akar et al., 2005), ainsi que de diminuer de manière significative la taille de l'infarctus en protégeant les fonctions mitochondriales dans des modèles expérimentaux chez l'animal. Cet effet cardioprotecteur a été observé avec différents ligands de la protéine TSPO reconnaissant différents sites de fixation sur la protéine, tels que le TRO40303 qui reconnaît le site de fixation du cholestérol, ou le 4'chlorodiazépam et le SSR180575 qui se lient à celui des benzodiazépines (Leducq et al., 2003 ; Obame et al., 2007 ; Schaller et al., 2010 ; Paradis et al., 2013).

Martínez-Abundis et al. (2009) ont observé dans un modèle de cœur isolé-perfusé une augmentation du cholestérol dans les mitochondries cardiaques après ischémie-reperfusion associée à une augmentation de l'activité de Bax, responsable de l'apoptose des cellules. Cette accumulation de cholestérol mitochondrial induite après ischémie-reperfusion a été démontrée *in vivo* par notre laboratoire, elle est localisée plus précisément dans la matrice de la mitochondrie et non au niveau de sa membrane (Figure 17). Il faut noter que cette augmentation du cholestérol mitochondrial n'est pas due à l'ischémie myocardique et nécessite la reperfusion du tissu (Paradis et al., 2013).

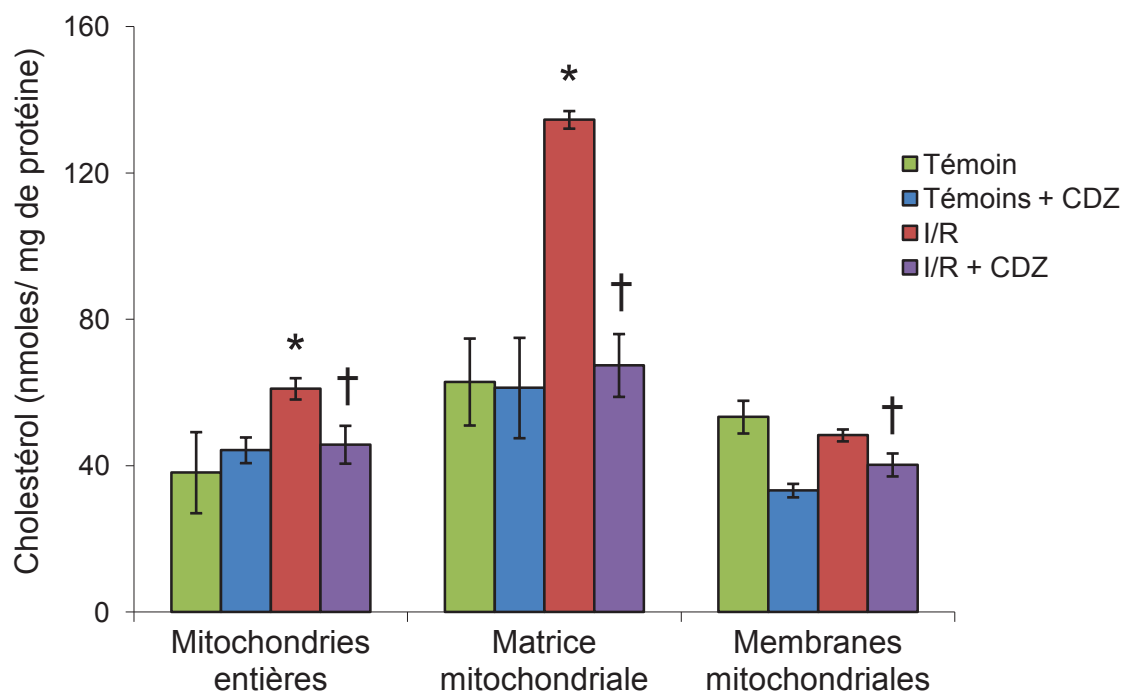


Figure 17 : Effet d'un ligand du TSPO, le 4'-chlorodiazepam, sur le cholestérol mitochondrial au cours de l'ischémie-reperfusion du myocarde. Le protocole d'ischémie-reperfusion (I/R) utilisé dans le cadre de ce travail a consisté en 30 minutes d'ischémie suivi de 15 minutes de reperfusion. Le 4'chlorodiazepam (CDZ) ou son solvant ont été injectés 10 minutes avant le début de l'ischémie ou 25 minutes avant le prélèvement cardiaque dans le groupe témoin (Paradis et al., 2013). * : $p < 0,05$ vs témoin ; † : $p < 0,05$ vs I/R

Le cholestérol est susceptible d'être oxydé pour former des oxystérols dont une grande partie résulte de l'auto-oxydation du cholestérol en présence d'EROs (Murphy et Johnson, 2008 ; Raedschelders et al., 2012). Or, l'ischémie-reperfusion du myocarde est à l'origine d'une forte augmentation en EROs (Raedschelders et al., 2012). Par conséquent, l'accumulation du cholestérol dans l'organite après ischémie-reperfusion myocardique s'accompagne aussi d'une augmentation des oxystérols (Figure 18) dont la présence en concentration importante peut être délétère pour la cellule et notamment au niveau mitochondrial (Elmore, 2007 ; Vejux et al., 2008). En effet, ils pourraient participer à une augmentation importante du stress oxydant jusqu'à ouverture du mPTP à l'origine de la libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol (Vejux et Lizard, 2009).

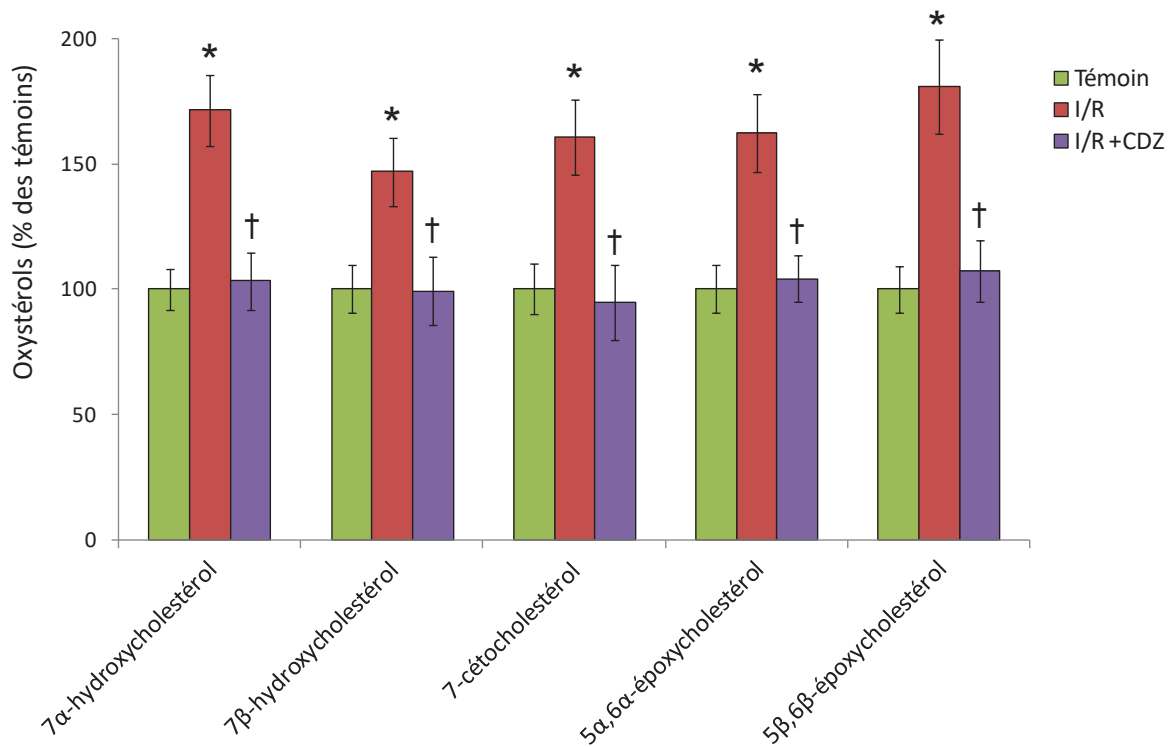


Figure 18 : Effet d'un ligand du TSPO, le 4'-chlorodiazépan, sur les oxystérols mitochondriaux au cours de l'ischémie-reperfusion du myocarde. L'ischémie-reperfusion (I/R) effectuée dans le cadre de ce travail a consisté en 30 minutes d'ischémie suivies par 15 de reperfusion. Le 4'-chlorodiazépan (CDZ) a été injecté 10 minutes avant le début de la reperfusion (Paradis et al., 2013). * : $p < 0,05$ vs témoin ; † : $p < 0,05$ vs I/R

L'effet cardioprotecteur du 4'-chlorodiazépan s'accompagne d'une inhibition importante de cette accumulation en stérols (Figures 17 et 18), ce qui suggère une implication de la concentration de cholestérol mitochondrial dans la protection du myocarde par ce ligand de la protéine TSPO. Cette hypothèse est appuyée par le fait que la surcharge en cholestérol au niveau mitochondrial est susceptible d'altérer la fluidité et la transition de perméabilité membranaire mitochondriales (Collel et al., 2003). Cet effet s'accompagne aussi d'une inhibition de l'accumulation d'oxystérols mitochondriaux qui est susceptible de jouer un rôle important dans ses propriétés cardioprotectrices (Paradis et al., 2013). Cependant l'implication des oxystérols dans les lésions de reperfusion myocardique reste à démontrer.

Suite à ces résultats, les objectifs de ce travail ont donc été :

1. de déterminer l'effet d'un phénotype d'hypercholestérolémie sur l'évolution du cholestérol et des oxystérols mitochondriaux lors de l'ischémie-reperfusion myocardique et d'observer si le 4'-chlorodiazépam conserve sa propriété cardioprotectrice dans ces conditions.
2. de confirmer l'effet délétère des oxystérols sur les cellules cardiaques, ainsi que la relation entre la protection du myocarde et l'inhibition de l'accumulation de ces stérols mitochondriaux à la reperfusion. Pour ce faire, nous avons eu recours à deux stratégies cardioprotectrices que sont la réduction de la synthèse de cholestérol au moyen d'une statine et la diminution du stress oxydant par la pratique d'un exercice physique régulier.
3. d'identifier les acteurs responsables de l'augmentation du cholestérol dans la mitochondrie lors de la reperfusion du myocarde ischémique. Nous avons ainsi cherché à déterminer si cette accumulation est le résultat d'une diminution du catabolisme du cholestérol, d'une augmentation de son entrée ou d'une association de ces deux phénomènes au niveau de l'organite.

Partie II – Etude expérimentale

Chapitre II.I. Méthodologie et protocoles expérimentaux

1. Modèles animaux utilisés

Toutes les procédures effectuées sur les animaux dans le cadre de ces travaux ont été réalisées en accord avec les Directives du Parlement Européen (2010/63/EU-848 EEC) et ont été approuvées par le comité d'éthique animal Afssa/ENVA/Université Paris Est-Créteil (numéros d'agrément : 11/12/12-7, 08/03/11-05 et 10/12/13-13).

Une grande partie des expériences effectuées sur modèles animaux ont été réalisées sur des rats Wistar (Figure 19 A) mâles de 6 à 8 semaines (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Ceux-ci ont été hébergés après réception (3 rats par cage) dans l'animalerie conventionnelle de type A1 de la Faculté de Médecine de Créteil commune aux équipes de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale. Cette animalerie dispose d'une atmosphère thermostatée à environ 22°C et d'un degré d'hygrométrie autour de 55%. Les animaux sont restés dans l'animalerie un minimum de 24 heures après leur arrivée avant d'être utilisés dans le cadre d'expérimentations. Les animaux ont été soumis à un rythme nyctéméral de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité avec libre accès à l'alimentation (SAFE A03 ; composition nutritionnelle par les lipides de 5,1% et ne contenant pas de cholestérol) et à l'eau à volonté.

Un autre modèle de rats a été utilisé dans le but d'étudier l'influence d'une hypercholestérolémie. Il s'agit de rats Zucker Diabetic Fatty (ZDF) lean (témoins non obèses et non diabétiques) ou fa/fa (rats obèses et diabétiques) mâles (Charles River, L'arbresle, France) (Figure 19 B-C). Les animaux ZDF fa/fa sont porteurs d'une mutation sur le récepteur de la leptine responsable d'une diminution de la fixation de la leptine sur celui-ci qui bloque la sensation de satiété. Ces animaux ont été nourris avec une alimentation PURINA 5008 (composition nutritionnelle en lipides de 16,71% et contenant 280 mg/kg de cholestérol) qui contribue au développement d'une hypercholestérolémie ainsi que d'un diabète de type 2. Les rats ZDF lean ont quant à eux été nourris avec l'alimentation habituelle de l'animalerie. Tous les rats ZDF ont été reçus à l'âge de 10 semaines, placés 3 rats par cage et gardés en animalerie conventionnelle durant 3 semaines en disposant d'aliments et d'eau à volonté jusqu'à l'expérimentation.

Pour étudier l'effet de l'exercice physique sur l'hypercholestérolémie, nous avons utilisé un modèle de souris obèses (ob/ob) mâles de 5 à 10 semaines (Janvier Labs, Le Genest St Isle, France) (Figure 19 D-E). Ces souris ob/ob présentent une mutation du gène codant la leptine sur un fond génétique C57BL/6J. Des souris C57BL/6J ont donc servies de témoins normocholestérolémiques. Toutes ces souris ont été commandées à l'âge de 5 semaines et conservées dans l'animalerie conventionnelle durant les 4 semaines du protocole d'exercice physique avant expérimentation. Ces animaux ont reçu les granules habituelles de l'animalerie, ainsi que de l'eau à volonté. Toutefois, ceux ayant effectués le protocole d'exercice physique ont de plus reçu un morceau de pomme après chaque course.

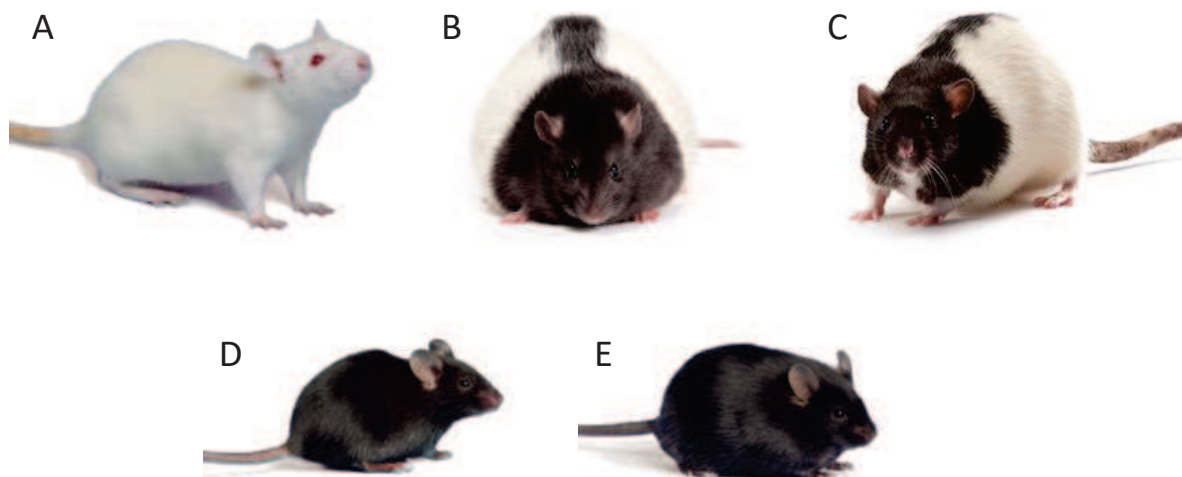


Figure 19 : Modèles animaux utilisés dans le cadre de cette étude. A : rat Wistar, modèle de rat de référence dans le laboratoire. B : rat ZDF fa/fa, modèle présentant une hypercholestérolémie ainsi qu'un diabète de type 2 suite à la mutation du gène codant le récepteur à la leptine. C : rat ZDF lean, modèle témoin des rats ZDF fa/fa non obèse et non diabétique. D : souris C57BL/6J, modèle de souris de référence dans le laboratoire. E : souris ob/ob, modèle obèse possédant un fond génétique de souris C57BL/6J muté au niveau du gène codant la leptine.

2. Ischémie-reperfusion myocardique chez le rat et la souris

2.1. Préparation des animaux

Les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (CEVA Santé animale) à la dose de 60mg/kg chez le rat et de 80mg/kg chez la souris. Une fois endormis, les animaux sont tondus et désinfectés à la vétédine® (Vétoquinol) au niveau de la gorge et du thorax. Une incision est effectuée au niveau de la gorge afin de permettre une visibilité par transparence lors de l'insertion d'une sonde d'intubation dans la trachée de l'animal (Ø 2.0 mm, 73-2853 pour le rat ; Ø 1,2 mm, 73-2844 pour la souris, Harvard Apparatus Inc, les Ulis, France), ceci afin de le placer sous assistance respiratoire le temps du protocole. La respiration artificielle a été assurée par un ventilateur modèle 683 pour les rats et modèle 845 pour les souris (Harvard Apparatus Inc) avec un air enrichi en oxygène (95% O₂ et 5% CO₂). La température corporelle des animaux a été suivie grâce à une sonde rectale et maintenue à 37°C au moyen d'un tapis chauffant (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard Apparatus Inc). Ils ont ensuite reçu une injection d'héparine (2,5UI pour la souris ; 30UI pour le rat ; Sanofi) en sous cutanée après avoir été posé en position décubitus dorsal.

2.2. Procédure chirurgicale

La procédure chirurgicale a été effectuée sous loupe binoculaire (Leica Microsystems, Rueil Malmaison, France). Une thoracotomie médiane gauche a été réalisée au niveau du quatrième espace intercostal, suivie d'une péricardectomie afin d'exposer le myocarde. Après localisation de l'artère coronaire descendante gauche (Figure 20), un fil de ligature (prolène 5-0 pour le rat ; 7-0 pour la souris, Ethicon®, Issy Les Moulineaux, France) a été passé sous celle-ci. Les extrémités de ce fil ont ensuite été introduites dans un cathéter en polyéthylène pour former une boucle permettant de réaliser l'occlusion de l'artère en serrant et maintenant le fil dans la surface épicaudique à l'aide d'une pince clamp. L'occlusion coronaire a alors été contrôlée grâce à un blanchissement et une hypokinésie du tissu cardiaque en aval de la ligature. L'ischémie cardiaque a été maintenue pendant 30 minutes puis stoppée en desserrant le clamp retenant la boucle autour de la coronaire. La reperfusion a été contrôlée par observation d'un regain de couleur de la région ischémisée et maintenue pendant 15 minutes avant mise à mort de l'animal par cardiectomie. Ce temps de reperfusion de 15 minutes a été sélectionné suite à des études ayant montré que l'ouverture du mPTP se

produit au cours des premières minutes suivant le début de cette reperfusion (Halestrap, 2010).

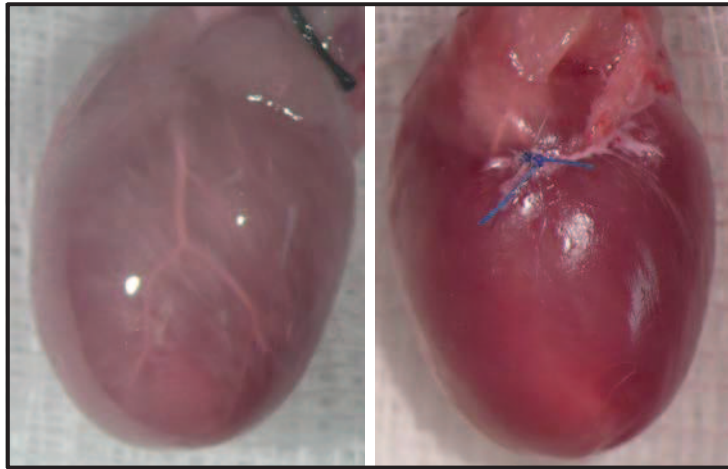


Figure 20 : Photographie d'un cœur de rat avec (droite) ou sans (gauche) occlusion de l'artère coronaire gauche. L'artère coronaire a été mise en évidence par injection de latex coloré par la lumière de l'aorte. La ligature de la coronaire a bien permis de bloquer la circulation en aval de celle-ci.

2.3. Traitement des animaux

2.3.1. Administration du 4'-chlorodiazépam

En cas de pré-conditionnement de l'animal par traitement au 4'-chlorodiazépam (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), celui-ci a préalablement été dissout dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à la concentration de 10 mg/mL. Après intubation du rat, la jugulaire gauche a été isolée puis légèrement incisée pour permettre l'introduction d'un cathéter nécessaire à l'injection de la molécule. Après avoir bloqué le cathéter dans la veine grâce à un fil prolène 6-0, le 4'-chlorodiazépam a été injecté pendant 5 minutes, 10 minutes avant le début de l'ischémie cardiaque, à la dose de 10 mg/kg. Cette dose a déjà été utilisée préalablement dans notre laboratoire et a permis d'induire un effet cardioprotecteur chez le rat Wistar (Obame et al., 2007). La même procédure a été réalisée sur des animaux témoins non traités avec injection de DMSO.

2.3.2. Administration de pravastatine

Le traitement de rats Wistar à la pravastatine été effectué par gavage des animaux pendant 3 jours. La molécule a été dissoute dans l'eau de boisson des animaux à la concentration de 10 mg/mL et administrée par voie orale à la dose de 10 mg/kg de pravastatine par jour. Les animaux ont été mis à mort dans le cadre de nos expérimentations 24 heures après la dernière administration de la molécule.

2.4. Protocole d'exercice physique chez la souris

Des souris C57BL/6J et ob/ob ont été soumises à un exercice physique régulier au moyen d'un tapis roulant (inclinaison maintenue à 4°). Ces animaux ont été sélectionnés de manière aléatoire, et comparés à des animaux témoins laissés en condition sédentaire. Les animaux ont couru durant 4 semaines à la fréquence de 5 séances de course par semaine. Le protocole a été adapté en fonction de la lignée de souris, compte tenu de la différence de masse des animaux, afin que la charge de travail fournie par les deux groupes reste similaire. La première semaine de course était une période d'habitation des animaux durant laquelle ils ont couru une demi-heure par jour (successivement à 10, 14, 18, 22, 26, et 30 cm/s, durant 5 minutes pour chaque vitesse pour les C57BL/6J et à 8, 8, 10, 14, 18, et 20 cm/s, durant 5 minutes par vitesse pour les souris ob/ob). Au cours des 3 semaines suivantes, les souris ont couru pendant 1 heure par jour à 30 cm/s pour les C57BL/6J et 20 cm/s pour les souris ob/ob. Tout au long de ce protocole, les souris en été récompensées à la fin de chaque séance de course par un morceau de pomme. Les distances courues par les souris témoins ou les souris qui ont ensuite été ischémiées-reperfusées ont été similaires (souris C57BL/6J témoins et I/R, $18.818 \pm 3,48$ et $18.766 \pm 28,5$ m, respectivement; souris ob/ob témoins et I/R, $12.477 \pm 0,33$ et $11.717 \pm 1,60$ m, respectivement). Le protocole d'exercice physique a été débuté par les souris à l'âge de 6 semaines et les études effectuées sur ces animaux ont été menées 24 heures après le dernier exercice physique. Les souris témoins et celles ayant effectuées le protocole d'exercice physique ont donc été étudiées à l'âge de 10 semaines.

3. Isolement de plasmas

Au cours des différents protocoles expérimentaux, des échantillons sanguins ont été prélevés juste avant le sacrifice des animaux par ponction cardiaque au niveau de l'apex et ceux-ci ont été déposés lentement dans des tubes héparinés. Ils ont ensuite été centrifugés à 800 g (3000 rotations par minute (rpm), Centrifugeuse 5415R, Eppendorf) pendant 7 minutes à 4°C. Les surnageants correspondant aux plasmas ont été congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

4. Préparation des extraits mitochondriaux et cytosoliques à partir de tissu

Les animaux ont été anesthésiés profondément par injection intrapéritonéale de pentobarbital (80 mg/kg chez le rat et 100 mg/kg chez la souris) puis mis à mort par prélèvement du cœur encore battant. Celui-ci a été découpé pour isoler le ventricule gauche dont ont été extraites et purifiées les fractions mitochondriales et cytosoliques. Dans le cas d'animaux ayant subi une ischémie-reperfusion cardiaque, le cœur a été extrait au bout des 15 minutes de reperfusion et découpé pour isoler l'aire à risque correspondant à la portion cardiaque ayant subi l'ischémie. Cette aire à risque a été déterminée en fonction de la position du fil ayant servi à occlure la coronaire, la région ischémisée correspondant à l'aire en aval de celui-ci. Chez le rat, l'aire à risque a pu aussi être identifiée grâce à un éclaircissement du tissu ayant subi l'ischémie-reperfusion, l'aire non ischémisée a aussi été conservée pour servir de témoin non-ischémié par la suite. Des mitochondries hépatiques et testiculaires ont également été extraites selon le même protocole pour mesurer l'expression des cytochromes 11A1 et 27A1.

4.1. Isolement des mitochondries et purification des cytosols

Le tissu extrait a été rincé dans du NaCl à 0,9% avant d'être découpé en petits morceaux. Dans le cas des tissus cardiaques, ceux-ci ont tout d'abord été découpés en petits morceaux à l'aide d'un scalpel sur une plaque métallique maintenue dans la glace puis repris dans une cupule contenant du tampon d'homogénéisation (mannitol 220 mM, saccharose 70 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7,4 à 4°C) pour être coupé plus finement grâce à 150 coups de ciseaux. Ils ont ensuite été homogénéisés durant 5 secondes à l'aide d'un Ultra-Turrax® T25 pour le tissu cardiaque de rat et d'un Ultra-Turrax® T10 pour celui de souris

(IKA Labortechnik position 6). Dans le cas du tissu hépatique, il n'a été effectué qu'une découpe rapide en morceaux au moyen d'une paire de ciseaux. Chacun de ces tissus, une fois découpé et repris dans le tampon d'homogénéisation, a été broyé au Potter grâce à deux séries de 5 allers-retours (EUROSTAR digital, IKA Labortechnik, 1500 rpm). L'homogénat a ensuite été centrifugé à 1000g (3000 rpm, rotor SM-24, Sorvall RC 5C plus) pendant 5 minutes à 4°C pour éliminer dans le culot les morceaux de tissus et débris cellulaires restants. Le surnageant a ensuite été centrifugé à une vitesse de 10000g (9000 rpm, rotor SM-24, Sorvall RC 5C plus) pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été prélevé et le culot correspondant à l'extrait mitochondrial a été repris dans un tampon « de reprise » (mannitol 220 mM, saccharose 70 mM, HEPES 10 mM, EGTA 0,01 mM, pH 7,4 à 4°C). Le surnageant a ensuite été centrifugé à 100 000 g (35000 rpm, rotor 50 Ti, Beckman Optima L-80 XP Ultracentrifuge) pendant 1H à 4°C afin d'éliminer les membranes des dernières organites et obtenir la fraction cytosolique purifiée.

Dans le cas d'extractions dans le but d'effectuer par la suite une quantification protéique par Western-blot, celles-ci ont été réalisées dans des tampons d'homogénéisation et de reprise supplémentés avec du DL-Dithiothreitol (10mM), du fluorure de phénylméthylsulfonyl (1mM) et un cocktail d'inhibiteurs de protéines (P8340 ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) pour prévenir la dégradation des protéines.

4.2. Dosage des protéines mitochondriales et cytosoliques

Les concentrations protéiques ont été déterminées grâce au réactif « Advanced Protein Assay » de Sigma-Aldrich (57697). Les plasmas, les mitochondries et les cytosols ont été respectivement dilués au 1/50ème, au 1/10ème et au 1/2 dans du NaCl à 0,9%. Chaque mélange a ensuite été dilué au 1/100ème dans 3 tubes différents avec le réactif commercial puis incubé 5 minutes à l'abri de la lumière après agitation. Finalement, la densité optique du mélange a été mesurée à une longueur d'onde de 600 nm grâce à un spectrophotomètre (Ultrospec 500 pro, Biochrom Ltd, Cambridge, Royaume-Uni) contre un blanc traité dans les mêmes conditions et la moyenne des 3 mesures effectuées a été utilisée pour calculer la concentration en protéines.

5. Mesure de l'activité mitochondriale

5.1. Respiration mitochondriale

L'évaluation de la respiration mitochondriale a été effectuée grâce à une électrode de Clark (Oxygraph, Hansatech EUROSEP Instruments / logiciel Oxyg32) afin de mesurer la concentration en oxygène présente dans le milieu contenant les mitochondries. L'électrode a tout d'abord été calibrée d'une part avec une solution d'eau distillée laissée à l'air ambiant, correspondant à notre concentration maximum en oxygène, et d'autre part au moyen d'une solution d'eau distillée bullée à l'azote pour éliminer l'oxygène présent, correspondant ainsi à notre valeur 0. L'extrait de mitochondries est alors introduit à la concentration de 0,4 mg de protéines par mL, dans une cuve thermostatée à 30°C sous agitation, dans un tampon dit de « respiration » (saccharose 50mM, HEPES 10mM, KCl 100mM, KH₂PO₄ 5mM, pH 7,4 à 30°C) pour atteindre un volume final de 500 µL. La mesure de la consommation d'oxygène est ensuite déclenchée (stade 1) (Figure 21). L'ajout des substrats du cycle de Krebs, pyruvate et malate (2,5 mM) permet d'initier la respiration mitochondriale par l'activation de la chaîne respiratoire (stade 2). La consommation d'oxygène par les mitochondries est ensuite fortement accélérée par ajout d'ADP (1 mM) qui provoque la synthèse d'ATP (stade 3). Après quelques minutes, l'activité de l'ATP synthase est inhibée par l'ajout de carboxyatractyloside (4 µM), qui bloque le transporteur ADP/ATP, l'entrée d'ADP et la synthèse d'ATP, ce qui conduit à une réduction de la vitesse de consommation d'oxygène qui devient équivalente à celle du stade 2 (stade 4). Le coefficient respiratoire, correspondant au couplage entre la consommation en oxygène par la mitochondrie et la synthèse d'ATP, est ensuite calculé (stade 3/stade 4). Une valeur importante de ce coefficient permet de témoigner d'un bon état de fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

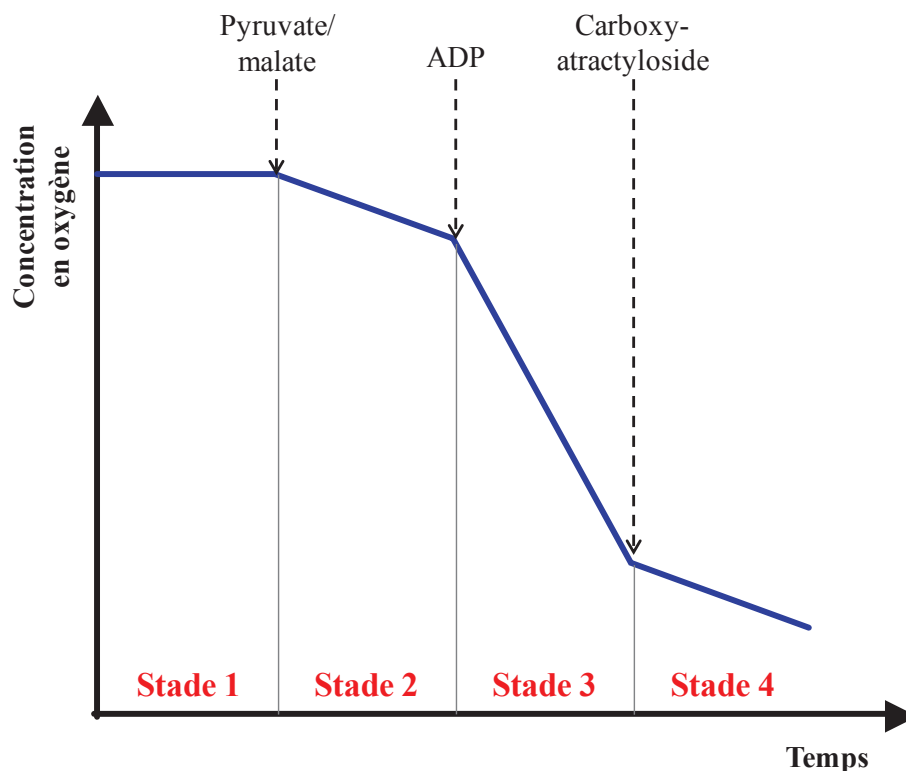


Figure 21 : Consommation en oxygène par la respiration mitochondriale en fonction du temps. L'ajout de pyruvate/malate aux mitochondries permet l'initiation de la respiration mitochondriale (passage de stade 1 à 2) qui est ensuite accélérée par l'ajout d'ADP permettant la synthèse d'ATP (stade 3). Cette synthèse est ensuite stoppée par l'ajout de carboxyatractyloside ralentissant la consommation en oxygène par les mitochondries (stade 4). Le coefficient respiratoire correspond au rapport de la consommation mitochondriale en oxygène lors du stade 3 sur celle lors du stade 4.

5.2. Mesure de la capacité de rétention calcique

La mesure de la capacité de rétention calcique des mitochondries permet d'évaluer la sensibilité d'ouverture du mPTP face à une surcharge calcique. L'expérience consiste à ajouter de faibles quantités de calcium à des mitochondries jusqu'au déclenchement de l'ouverture du mPTP qui perméabilise la membrane mitochondriale et provoque la libération du calcium préalablement absorbé. Les mitochondries ont été incubées dans 300 mL de tampon de respiration à une concentration de 1 mg de protéine/mL sous agitation lente dans une cuve de quartz à 30°C et en présence de 2,5 mM de pyruvate/malate. La concentration calcique dans le tampon de respiration a été évaluée grâce à une sonde fluorescente réagissant avec le calcium, le calcium green 5N à 3 μ M (C3737, Molecular Probes, Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, USA). La concentration extramitochondriale de calcium a été mesurée par spectrofluorimétrie (Luminescence Spectrometer, Perkin Elmer LS50B ; Ex 506 nm / Em 532 nm) et visualisée au moyen du logiciel FL WinLab. Une quantité fixe de calcium (10 μM) est ajoutée de manière régulière dans la cuve provoquant une augmentation soudaine de fluorescence, suivi d'une diminution à mesure que celui-ci est absorbé par les mitochondries, se traduisant par un pic à chaque ajout de calcium (Figure 22). Une fois le seuil de sensibilité d'ouverture du mPTP atteint, celui-ci provoque la libération du calcium absorbé, visualisé par une importante augmentation de la fluorescence. Le calcul de la quantité de calcium ajouté au milieu avant ouverture du pore permet de calculer la capacité de rétention calcique mitochondriale.

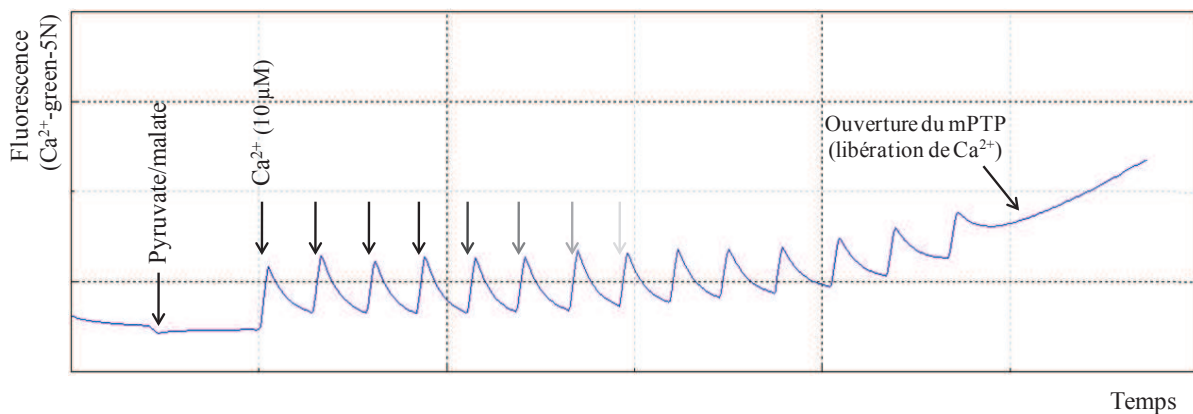


Figure 22 : Courbe de mesure de la capacité de rétention calcique mitochondriale par spectrofluorimétrie. La fluorescence induite par l'interaction entre le calcium et le calcium-green-5N permet de visualiser la concentration de calcium dans le milieu extramitochondrial. Les mitochondries en présence de pyruvate-malate absorbent le calcium ajouté au milieu de manière successive jusqu'à l'ouverture du mPTP qui est visualisée par une augmentation importante de la fluorescence.

5.3. Effet des oxystérols sur les fonctions mitochondriales

Pour observer l'incidence d'une surcharge en oxystérols sur la respiration et la capacité de rétention calcique mitochondriales, nous avons incubé les mitochondries en présence de différents oxystérols avant évaluation de leurs fonctions. Les oxystérols ont été dissous dans du DMSO à la concentration de 1 mM pour le 7-cétocholestérol et le 25-hydroxycholestérol et de 2 mM pour le 7 β -hydroxycholestérol, l'époxy-5 α ,6 α -cholestérol et l'époxy-5 β ,6 β -cholestérol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ces concentrations ont été sélectionnées afin d'atteindre dans le milieu d'incubation les concentrations en oxystérols

souhaitées suivant leur solubilité, c'est-à-dire de 50 μM pour le 7-cétocholestérol et le 25-hydroxycholestérol et de 100 μM pour le 7 β -hydroxycholestérol, l'époxy-5 α ,6 α -cholestérol et l'époxy-5 β ,6 β -cholestérol. Les oxystérols ou leur solvant ont donc été dilués au 1/20 dans l'extrait mitochondrial pendant 20 minutes à 4°C. Les fonctions mitochondriales ont ensuite été mesurées comme expliqué en parties 5.1 et 5.2 de ce chapitre.

6. Amplification en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) en temps réel

6.1. Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN totaux à partir d'échantillons de tissus cardiaques témoins ou ischémiés-reperfusés a été effectuée avec le kit « Maxwell 16 LEV simplyRNA Tissue » (Promega, Madison, WI, USA). Le tissu cardiaque a d'abord été homogénéisé dans la solution d'homogénéisation fournie par agitation rapide dans un tube en présence d'une bille métallique. L'homogénat a ensuite été chauffé à 70°C pendant 2 minutes avant d'être remis dans la glace puis dilué au 1/2 dans le tampon de lyse du kit. Le mélange a ensuite été déposé dans une cassette (Maxwell® 16 LEV Cartridge) contenant de la DNase I. Les ARNs totaux ont alors été extraits par la « Maxwell® 16 Instrument » correspondant au kit, dosés au moyen d'un spectrophotomètre (NanoDrop™ 2000, Qiagen, Hilden, Allemagne), puis conservés à -80°C jusqu'à réalisation de la qPCR.

6.2. Reverse transcription (RT) en ADN complémentaire

La reverse transcription des ARN messagers extraits en ADN complémentaires (ADNc) a été effectuée avec le « AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit » (Agilent, Santa Clara, CA, USA). 100ng d'ARN totaux a été ajouté au Master Mix du kit en présence de reverse transcriptase, chargée de la synthèse de l'ADNc, et de sondes oligo(dT), pour ne sélectionner que les ARNm. Le mélange réactionnel est alors laissé dans un thermocycleur réglé sur le cycle suivant :

- 5 minutes à 25°C pour fixer les sondes oligo(dT),
- 15 minutes à 42°C pour synthétiser les brins d'ADNc,
- 5 minutes à 95°C pour stopper la synthèse des brins d'ADNc,
- 4°C jusqu'à réalisation de la qPCR.

6.3. qPCR en temps réel

Les ADNc obtenus sont ensuite dilués au 20^{ème} dans un Master Mix adapté à la qPCR et contenant les amorces et sondes « TaqMan[®] » spécifiques de nos gènes d'intérêts (Tableau 2).

Gène	Assay ID	Fluorophore
TSPO	Rn00560892_m1	FAM
StAR	Rn00580695_m1	FAM
CYP7A1	Rn00564065_m1	FAM
CYP11A1	Rn00568733_m1	FAM
CYP27A1	Rn00710297_m1	FAM
Rplp0	Rn03302271_gH	FAM

Tableau 2 : Liste des numéros d'identifiants des amorces et sondes « Taqman[®] » utilisées lors de cette étude. Ces produits destinés à la mesure de l'expression génique ont été fournis par la société Thermo Fisher Scientific (référence : 4331182 ; Waltham, MA, USA).

Les amorces permettent l'initiation de la synthèse de brins d'ADNc correspondant au gène d'intérêt. La sonde « TaqMan[®] » se fixe sur une séquence d'ADN proche de celle reconnue par les amorces. Cette sonde est constituée d'un enchaînement de nucléotides spécifique du gène d'intérêt et comprend une sonde fluorescente, la 6-carboxyfluorescéine (FAM), ainsi qu'un « extincteur » servant à bloquer la fluorescence de la FAM. La polymérase qui permet la synthèse du brin d'ADNc en arrivant au niveau de la sonde « TaqMan[®] » provoque alors sa dégradation. Celle-ci assure la libération de la FAM qui est ensuite observable par spectrofluorimétrie et permet la quantification de la synthèse des brins d'ADNc. Le nombre de cycles d'hybridation sonde/ADN puis synthèse d'ADNc nécessaire pour atteindre un seuil de fluorescence fixé détermine la quantité d'ADN d'intérêt de départ, celle-ci étant d'autant plus importante que le nombre de cycles est faible.

La quantification de l'expression génique a été effectuée au moyen d'un « Applied Biosystem 7000 Real-Time PCR system ». Le protocole de succession de températures appliquées au milieu réactionnel est le suivant : 95°C pendant 10 minutes, afin de dénaturer complètement les brins d'ADN, suivi de 40 cycles de :

- 15 secondes à 95°C pour dénaturer de nouveau les brins d'ADN,
- 1 minute à 60°C pour fixer les sondes ainsi que les amorces et synthétiser de nouveaux brins d'ADNc.

L'ARNm codant le gène ubiquitaire RPLP0 a été utilisé pour normaliser les résultats entre les différentes mesures. Chaque mesure a été effectuée en double.

7. Quantification d'expression protéique par Western-blot

La quantification des protéines intervenant dans le métabolisme du cholestérol mitochondrial a été effectuée sur les extraits mitochondriaux et cytosoliques issus de tissus cardiaques (voir Chapitre II.I.4).

Les échantillons protéiques ont été dilués dans le tampon ayant servi à leur reprise afin d'uniformiser les concentrations de chacun d'entre eux, puis ont été dilués au demi dans du bleu Laemmli (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ces protéines ont ensuite été dénaturées par chauffage à 90°C pendant 10 minutes et déposées sur des gels de polyacrylamide à 12,5% en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS), préalablement préparés. Une quantité fixe de protéines totales (entre 20 et 30 µg), ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (14208, Cell-Signaling, Leyde, Pays-Bas) ont été déposés dans les puits des gels. Les protéines ont alors été séparées par électrophorèse à température ambiante pendant 1 heure et demie à 100 V dans un tampon de migration (Tris 10 mM, Glycine 76 mM, EDTA 0,744 g/l, SDS 0,02%). Les protéines ont ensuite été transférées par électrophorèse à température ambiante sur des membranes de difluorure de polyvinylidène (PVDF) (Amersham Hybond™-P, GE Healthcare) pendant 1 heure à 100V dans un tampon de transfert (Tris 4,8 mM, Glycine 3,9 mM, Ethanol 20%).

Les membranes contenant les protéines ont été saturées par incubation dans un tampon Tris (Tris 1 mM, NaCl 10 mM, pH 7,5 à 4°C) comprenant 0,1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (TBS-T) et 5% de lait écrémé pendant 1 heure à température ambiante sous agitation lente. La fixation au niveau de la membrane des protéines présent dans le lait a pour but de limiter les liaisons non spécifiques des anticorps utilisés par la suite. Après un lavage de 10 minutes dans le TBS-T sous agitation rapide à température ambiante, les membranes ont été incubées sous agitation lente en présence d'anticorps primaires spécifiques de nos protéines d'intérêt, dilués dans du TBS-T contenant 5% de lait écrémé, à la dilution sélectionnée suivant les indications du fournisseur et l'intensité de la révélation obtenue après usage. Les membranes ont été laissées dans l'anticorps primaire soit durant la nuit à 4°C soit 1 heure et demie à température ambiante sous agitation lente. Elles ont après cela été lavées trois fois 5 minutes dans le TBS-T à température ambiante sous agitation

rapide puis incubées dans du TBS-T contenant du lait à 5% et un anticorps secondaire dilué au 1/5000^e pendant 1 heure à température ambiante sous agitation lente. Les membranes ont de nouveau été rincées trois fois 5 minutes dans le TBS-T, puis ont été révélées au moyen d'un kit ECL RevelBIOt[®] Plus ou Intense (OZYB001-5000 ou OZYB002-1000, Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) suivant l'intensité du signal.

Pour ce faire, les membranes ont été recouvertes avec un tampon de révélation fourni par le kit et laissées à l'obscurité pendant 5 minutes, puis, après retrait de l'excédent de tampon sur la membrane, la révélation des bandes a été effectuée grâce à une « G:BOX Chemi XT4 » (Syngène, Cambridge, Royaume-Uni). L'intensité des bandes révélées a été quantifiée à l'aide du logiciel Image J (1.40g) pour déterminer la quantité relative de nos protéines d'intérêt dans nos extraits protéiques totaux déposés. Pour normaliser les résultats obtenus, chaque membrane a été déshybridée (Western Blot Strip-it Buffer, R-03722-D50, Advansta, Menlo Park, CA, USA) puis réhybridée avec un anticorps reconnaissant l'actine pour les protéines cytosoliques ou reconnaissant la cytochrome c oxydase (COX-IV) pour les protéines mitochondriales.

8. Evaluation de l'activité du cytochrome 11A1

Afin d'observer l'activité du CYP11A1, nous avons utilisé une sonde constituée d'un dérivé du cholestérol greffé à une molécule de résorufine au niveau de sa chaîne latérale. Le CYP11A1 est une enzyme mitochondriale responsable du clivage de cette chaîne latérale du cholestérol afin synthétiser la prégnénolone, un précurseur de l'ensemble des hormones stéroïdiennes. L'activité de cette enzyme permet de libérer la résorufine sur notre sonde qui devient alors observable par spectrofluorimétrie.

8.1. Synthèse de la sonde : cholestérol-résorufine

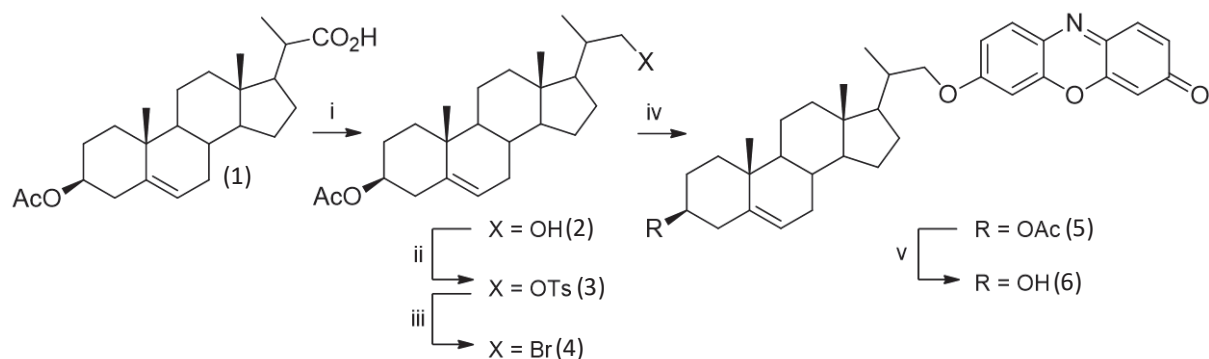


Figure 23 : Etapes de la synthèse de la sonde de cholestérol-résorufine (6) à partir d'acide 3β-acétoxy-22,23,bisnor-5-cholénique (1).

Le cholestérol-résorufine (6) a été préparé à partir de l'acide 3β-acétoxy-22,23-bisnor-5-cholénique (1), suivant un protocole inspiré de celui proposé par Simpson et son équipe (1991). Les modifications apportées au protocole initial ont permis d'améliorer le rendement global de la synthèse (Figure 23).

i: A une solution de dérivé acide du cholestérol (1) (1 g ; 2,57 mmol) dans le dichlorométhane (DCM) anhydre préalablement refroidie à 0°C, a été ajouté goutte à goutte et sous agitation le (COCl)₂ (1,5 équivalent (eq) ; 325 μL). Après addition, le mélange a été laissé 2 heures à température ambiante sous agitation. Le mélange réactionnel a ensuite été concentré sous vide et le solide obtenu dissous dans le tétrahydrofurane (THF) anhydre, sous argon. Après refroidissement à -60°C, une solution de LiAlH(O*t*Bu)₃ dans le THF anhydre (2,7 eq), préalablement préparée à partir de LiAlH₄ (624 mg ; 7 mmol) et de *t*BuOH (1,54 g ; 20,8 mmol), a été ajoutée goutte à goutte sous agitation. Le mélange fut maintenu à -60°C pendant 2,5 heures. Après dilution avec Et₂O, une solution de NaOH a été ajoutée goutte à goutte afin de faire précipiter les sels d'aluminium. Après filtration sur célite du mélange hétérogène, la phase organique a été lavée par HCl (1 N) puis NaCl saturé et enfin, séchée sur MgSO₄. Le produit brut a été obtenu après concentration sous vide. L'analyse RMN (résonance magnétique nucléaire) ¹H a permis de constater la conversion complète de l'acide (1) en son alcool (2) qui a été engagé dans la suite de la synthèse sans purification supplémentaire. L'alcool (2) a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche (950 mg ; quantitatif).

ii : L'alcool (2) (893 mg ; 2,38 mmol) a été dissous dans 4 mL de DCM anhydre. A cette solution ont été successivement ajouté le TsCl (2 eq ; 910 mg), la NEt₃ (4,2 eq ; 1,39 mL) puis la 4-(diméthylamino)pyridine (5%, 14 mg) servant de catalyseur. Le mélange est porté une nuit au reflux sous agitation. Après dilution du milieu réactionnel, celui-ci a été lavé par HCl (1 N). La phase organique a ensuite été séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le produit brut a été chromatographié sur gel de silice (CyH/AcOEt : 90/10). Le dérivé tosylé (3) a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche (629 mg, 50%).

iii : Cette étape consiste en la substitution du groupement tosyle par un atome de brome, meilleur nucléofuge. Elle a été ajoutée au protocole initial afin de faciliter la connexion ultérieure de la résorufine au stéroïde (étape iv). Pour ce faire, le dérivé tosylé (3) (629 mg ; 1,19 mmol) a été dissous dans du DMF (3,2 mL) en présence de LiBr (3 eq ; 310 mg). Le mélange a ensuite été placé à 60 °C pendant une nuit sous agitation. Après addition d'eau, la phase aqueuse a été extraite par CyH. Le dérivé bromé (4) a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche (515 mg ; quantitatif).

iv : Le dérivé bromé (4) (160 mg ; 0,36 mmol), la résorufine (1,3 eq ; 101 mg) et K₂CO₃ (2 eq ; 100 mg) ont été dissous dans le N,N-diméthylformamide (3 mL). Le mélange, placé sous argon, a ensuite été chauffé à 50 °C pendant 6 jours sous agitation. Après retour à température ambiante, le mélange a été dilué par un mélange H₂O/DCM puis filtré sur célite. Après décantation, la phase aqueuse a été extraite au DCM et les phases organiques réunies, lavées par K₂CO₃ saturé puis séchées sur MgSO₄. Après concentration sous vide, le produit a été chromatographié sur gel de silice (CyH/AcOEt : 70/30). Le composé attendu (5) a été obtenu sous la forme d'un solide orangé (135 mg ; 65%).

v : Dans sa version initiale, la dernière étape de la synthèse du cholestérol-résorufine (6) consistait en une réaction de saponification de la fonction ester. En appliquant les conditions décrites, nous avons constaté le déplacement de la résorufine par les ions hydroxyde en même temps que la réaction attendue. Ceci nous a conduit à opter pour un accès vers le composé final (6) par réduction de la fonction ester en présence de LiAlH₄. Pour ce faire, à une solution refroidie à 0°C du dérivé (5) (101 mg ; 0,18 mmol) dans le THF, a été additionné par portion LiAlH₄ (1,5 eq ; 10 mg). Après addition, le mélange est maintenu à 0°C pendant 15 minutes. Après hydrolyse du milieu réactionnel par HCl (1 N), le mélange est extrait au DCM. Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous vide. Le résidu obtenu après concentration sous vide a ensuite été chromatographié sur gel de silice

(CyH/AcOEt/NEt₃ : 80/20/1%). Le produit attendu a été obtenu sous la forme d'un solide rouge (42 mg ; 44%).

8.2. Observation de l'activité du cytochrome

L'activité du CYP11A1 a été observée par spectrofluorimétrie afin de suivre la libération de résorufine au fur et à mesure de la synthèse de prégnénolone par l'enzyme ; d'après les travaux de Rone et al. (2012).

Les mitochondries cardiaques ou testiculaires, cassées par 3 cycles de congélation-décongélation successifs, ont été reprises dans un 1mL de tampon (saccharose 250mM, potassium phosphate buffer 10 mM, triethanolamine-HCl 15 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, trilostane 5µM, pH 7,0 à 30°C) à la concentration protéique de 0,5 ou 1 mg/mL. Le cholestérol-résorufine a ensuite été ajouté pour initier l'évaluation de l'activité du CYP11A1 par mesure de la fluorescence (530 ex / 595 em) de la résorufine libérée

La vitesse d'augmentation de la fluorescence est alors proportionnelle à l'activité de cette enzyme. À cette vitesse est soustraite celle obtenue dans les mêmes conditions mais avec ajout préalable de kétoconazole (20 µM), un inhibiteur de l'activité de CYP11A1, afin de ne prendre en compte que la libération de la résorufine spécifique à l'activité de l'enzyme.

9. Dosage des stérols par spectrométrie de masse

Nous avons envoyé des échantillons mitochondriaux, cytosoliques et plasmatiques au Laboratoire de Pathologie Clinique et de Génétique Médicale de l'institut Carlo Besta (Milan, Italie), afin de faire doser le cholestérol, ainsi que ses précurseurs et les oxystérols présents. Ces échantillons ont été préparés de la même manière que décrit en chapitre II.I.3&4 à la différence que la reprise du culot mitochondrial a été effectuée dans un tampon phosphate salin (PBS, H15-002, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) avant d'être congelés à -80°C jusqu'à envoi pour dosage. Le dosage a été réalisé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Dans un tube scellé avec un septum en téflon, 150 µL d'échantillon a été ajouté avec 20 ng de D7-7α-hydroxycholestérol, de D7-7β-hydroxycholestérol, de D7-7cétocholestérol, de D6-5α,6α-époxycholestérol, de D6-5β,6β-époxycholestérol et de D6-27-hydroxycholestérol (CDN Isotopes Inc., Pointe-Claire, Canada) pour servir de contrôles

internes. 50 µL de hydroxytoluène butylé (5 g/L) et 50 µL de K3-EDTA (10 g/L) ont ensuite été déposés afin de prévenir les réactions d'auto-oxydation. Chaque tube a été mélangé en présence d'argon pendant 20 minutes pour retirer l'air présent. Une hydrolyse alcaline a été effectuée à température ambiante (22°C) sous agitation magnétique pendant 30 minutes en présence d'une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique à 1 M. Après hydrolyse, les stérols ont été extraits deux fois avec 5 mL de cyclohexane et les oxystérols ont été élués par extraction en phase solide dans une cartouche avec un mélange isopropanol : hexane (30 : 70).

La fraction organique a été évaporée sous un flux d'argon léger et convertie en ester de triméthylsilyle avec du N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse a été effectuée sur une colonne Elite équipée GC (30 m×0.32 mm ; id : 0.25 mm; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) avec injection en mode « splitless » et en utilisant l'hélium (1mL/minute) comme gaz de transport. La température initiale du programme de 180°C a été maintenue pendant 1 minute et suivis d'une augmentation linéaire de 20°C par minute jusqu'à atteindre 270°C. La température a ensuite été augmentée de 5°C par minutes jusqu'à 290°C et maintenue pendant 10 minutes.

Le spectromètre de masse opère en mode SIM (selected ion-monitoring). L'intégration des pics est effectuée manuellement et les stérols sont quantifiés à partir de l'analyse SIM contre les standards internes utilisés (Dzeletovic et al., 1995 ; Leoni et al., 2012).

10. Isolement de cardiomyocytes de rat

L'isolement de cardiomyocytes a été effectué à partir de cœurs de rats Wistar d'environ 6 semaines. Ceux-ci ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (70 mg/kg) avant l'injection de 500 UI d'héparine. Après thoracotomie, le cœur a été soigneusement excisé encore battant et déposé dans un tampon de perfusion (TP) froid (NaCl 113 mM ; KCl 4,7 mM ; KH₂PO₄ 0,6 mM ; Na₂HPO₄ 0,6 mM ; HEPES 10 mM ; MgSO₄ 1,2 mM ; NaHCO₃ 12 mM ; KHCO₃ 10 mM ; taurine 30 mM ; 2,3-butanedione monoxime 10 mM ; glucose 5,5 mM ; pH 7,46). Ce tampon, ainsi que les autres utilisés dans ce protocole ont préalablement été bullés avec du carbogène (95% O₂ et 5% CO₂). Le cœur a ensuite été canulé au niveau de l'aorte sur un appareil de type Langendorff et perfusé de manière rétrograde à pression constante avec le TP à 37°C pendant 2 minutes. Une fois le cœur lavé du sang, le TP est remplacé par un tampon de digestion à 37°C (TP + CaCl₂ 12,5

μM ; pH 7,46) contenant des enzymes permettant de digérer le cœur (0,2 mg/ml de libérase type et 0,028 mg/ml de trypsine). Le cœur est perfusé jusqu'à sa dissociation complète, identifiable par son aspect gélatineux, puis détaché et déposé dans une boîte de pétri.

Le cœur est alors disséqué afin d'éliminer les oreillettes et le ventricule droit. Le ventricule gauche est conservé et dilacéré aux ciseaux. La boîte de pétri est ensuite remplie de TP (+ CaCl_2 à 12,5 μM) contenant 10% de sérum de veau fœtal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) afin de stopper l'action des enzymes de digestion. Les morceaux de ventricules sont ensuite agités au moyen d'une pipette pasteur afin de dissocier au maximum les cardiomyocytes. La suspension cellulaire a alors été filtrée puis laissée à sédimenter pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot cellulaire repris dans 10 mL de TP contenant 5% de sérum de veau fœtal et 12,5 μM de CaCl_2 puis laissé à sédimenter. Le culot cellulaire est de nouveau repris puis laissé à sédimenter plusieurs fois en le reprenant avec le même tampon que précédemment en augmentant graduellement la concentration en calcium (0,062 ; 0,112 ; 0,212 ; 0,5 ; 1 mM).

11. Evaluation de la viabilité des cardiomyocytes

11.1. Mise en culture des cellules

Avant l'ensemencement des cardiomyocytes dans des boîtes de pétri (10 cm^2), celles-ci ont été recouvertes de laminine ($\approx 0,2 \mu\text{g}$ par cm^2 ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et laissées sécher durant une heure. 50000 cardiomyocytes sont ensuite déposés dans chaque boîte dans un volume final de 2mL de milieu de culture M199 (Dominique Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France) supplémenté d'ITS (insuline-transferrine-sélénium 1X ; Thermo Fisher Scientific). Les boîtes sont maintenues 1 heure à 37°C dans un incubateur (atmosphère supplémentée en CO_2 à 5%) pour permettre la fixation des cardiomyocytes sur le revêtement de laminine. Après deux changements de milieu de culture pour laver les boîtes des cellules n'ayant pas adhérees, les cardiomyocytes ont été remis dans l'incubateur et conservés durant 20 heures.

11.2. Coloration au bleu de trypan

La viabilité des cardiomyocytes sur 20 heures a été évaluée par coloration des cellules au bleu de trypan (0,4% ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). 150 μL de colorant a été déposé dans les 2 mL de milieu de culture contenus dans chaque boîte de pétri. Les cellules

ont ensuite été comptées au microscope en distinguant les cellules incolores (vivantes) des cellules colorées en bleu (mortes).

Dans le cadre de l'étude de l'impact des oxystérols sur la viabilité des cardiomyocytes, le cholestérol ou les oxystérols (25-hydroxycholestérol ; 7 β -hydroxycholestérol ; 7-cétocholestérol ; 5 α ,6 α -époxycholestérol ; 5 β ,6 β -époxycholestérol) ont été ajoutés aux cardiomyocytes à différentes concentrations (0 μ M, 2 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M final) dans 10 μ L d'éthanol dans le milieu M199.

12. Tests statistiques

Les résultats ont été exprimés comme la moyenne \pm SEM des valeurs individuelles obtenues pour chaque protocole. La comparaison des différents paramètres a été réalisée soit à l'aide d'un test de Student dans le cadre de comparaisons de groupes deux à deux, soit à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) à une ou deux voies suivie d'un test de Scheffé. Dans le cas de comparaison de groupes présentant des effectifs faibles, comme lors des western-blot (autour de n=4), nous avons eu recours à un test de Mann Whitney précédé en cas de comparaison de plus de 2 groupes entre eux par un Kruskal Wallis. Les résultats ont été jugés significativement différents dans le cas de valeurs de $p < 0,05$.

Chapitre II.II. Résultats expérimentaux

Résultats 1 : Le 4'-chlorodiazépam inhibe les dysfonctions mitochondriales et l'accumulation de stérols dans les mitochondries au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique chez les rats hypercholestérolémiques.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal Biochemical Pharmacology :

Musman J, Paradis S, Panel M, Pons S, Barau C, Caccia C, Leoni V, Ghaleh B, Morin D. A TSPO ligand prevents mitochondrial sterol accumulation and dysfunction during myocardial ischemia-reperfusion in hypercholesterolemic rats. Biochemical Pharmacology 2017; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2017.06.125>.

1. Objectif de l'étude

L'hypercholestérolémie est responsable d'une augmentation du risque de développer un infarctus du myocarde, mais s'accompagne aussi d'une aggravation des lésions causées par celui-ci, notamment lors de la reperfusion du tissu (Hoshida et al., 1996 ; Osipov et al., 2009). Ceci témoigne d'un rôle important que pourrait jouer le cholestérol dans les mécanismes liés aux lésions de reperfusion, ce qui est en accord avec les résultats de notre laboratoire ayant montré que cette molécule s'accumule au niveau mitochondrial et que cette accumulation s'accompagne d'une production d'oxystérols chez des rats normocholestérolémiques (Paradis et al., 2013). Les oxystérols, à fortes concentrations, sont délétères pour les cellules puisqu'ils sont capables d'induire une augmentation de perméabilité membranaire mitochondriale par ouverture du mPTP et la libération de facteurs pro-apoptotiques dans la cellule (Vejux et al., 2008 ; Leoni et al., 2016).

L'objectif de cette étude a donc été d'observer l'effet de l'hypercholestérolémie sur la concentration des stérols mitochondriaux cardiaques et l'impact d'une ischémie-reperfusion du tissu dans ces conditions. Sachant que l'hypercholestérolémie est caractérisée par une perte d'efficacité de différentes stratégies cardioprotectrices telles que le pré-conditionnement ischémique, nous avons étudié son influence sur l'effet du 4'-chlorodiazépam, un ligand du TSPO dont nous avons montré qu'il était cardioprotecteur et qu'il permettait de réduire

l'accumulation de stérols et d'oxystérols mitochondriaux chez des rats normocholestérolémiques lors de la reperfusion du myocarde ischémié (Paradis et al., 2013).

2. Protocoles expérimentaux

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé un modèle de rat ZDF fa/fa, hypercholestérolémique que nous avons traité ou non avec 10mg/kg de 4'-chlorodiazépam avant d'induire une ischémie-reperfusion cardiaque. Nous avons de plus utilisé des rats ZDF lean comme contrôles normocholestérolémiques.

L'ensemble des ischémies-reperfusions effectuées dans ce travail ont consistées en 30 minutes d'ischémie suivie de 15 minutes de reperfusion. Le 4'-chlorodiazépam ou son solvant (DMSO) ont été injectés pendant 5 minutes dans la veine jugulaire 10 minutes avant d'initier l'ischémie du myocarde (Cf. II.I.2).

Les mitochondries et les cytosols cardiaques ont été isolés à la fin de la reperfusion afin de doser les stérols contenus par GC-MS (Cf. II.I.9). Par ailleurs, les effets de l'ischémie-reperfusion et l'effet cardioprotecteur du 4'-chlorodiazépam ont été évalués dans chacun de nos groupes en analysant les fonctions des mitochondries cardiaques par mesure du couplage entre la consommation en oxygène mitochondriale et la synthèse d'ATP (coefficient respiratoire) et de la capacité de l'organite à retenir le calcium qui évalue la sensibilité d'ouverture du mPTP (Cf. II.I.5).

3. Résultats obtenus

3.1. Effet de l'hypercholestérolémie sur les stérols au niveau des cellules cardiaques

En plus d'une hypercholestérolémie, le modèle de rat ZDF fa/fa présente au niveau plasmatique par rapport aux rats ZDF lean une augmentation des oxystérols et de chacun des précurseurs du cholestérol que nous avons dosés. Le 7 β -hydroxycholestérol présente la plus forte augmentation plasmatique parmi les oxystérols issues de l'auto-oxydation du cholestérol et l'hypercholestérolémie est aussi responsable d'une augmentation du 27-hydroxycholestérol, qui est synthétisé de manière enzymatique par le CYP27A1.

L'accroissement de la concentration plasmatique de ces stérols se retrouve au sein des cellules cardiaques, que ce soit au niveau cytosolique ou mitochondrial ; seule exception, le 27-hydroxycholestérol dont la concentration reste constante. Cette augmentation s'accompagne

d'une altération des fonctions mitochondriales dans les cellules cardiaques des rats ZDF fa/fa avec une réduction du coefficient respiratoire (-10,4%), ainsi que de la capacité des mitochondries à retenir le calcium (-23,7%).

3.2. Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique chez les rats ZDF fa/fa

L'ischémie prolongée du myocarde suivie par 15 minutes de reperfusion augmente le cholestérol, ses précurseurs, ainsi que la majorité des oxystérols dosés dans les cytosols et mitochondries cardiaques. Cet effet est visible à la fois chez les rats ZDF lean et fa/fa mais est proportionnellement plus important chez les animaux hypercholestérolémiques malgré des niveaux de stérols déjà supérieurs à l'état de base. De plus, l'ischémie-reperfusion du myocarde chez les rats ZDF fa/fa s'accompagne d'une diminution supplémentaire de la capacité de rétention calcique et du coefficient respiratoire mitochondriaux (\approx -24%).

3.3. Effet du 4'-chlorodiazépam au cours de l'ischémie-reperfusion du myocarde chez les rats ZDF fa/fa

Le 4'-chlorodiazépam inhibe l'altération des fonctions mitochondriales au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique chez les rats ZDF fa/fa en préservant le coefficient respiratoire des mitochondries, ainsi que leur capacité à retenir le calcium. L'administration de 4'-chlorodiazépam chez ces rats hypercholestérolémiques permet aussi d'inhiber l'accumulation des stérols et des oxystérols dans la mitochondrie suite à l'ischémie-reperfusion du myocarde. Cet effet reste toutefois limité à l'organite, les stérols cytosoliques n'étant pas modifiés par ce traitement, tout comme dans le plasma.

4. Conclusion

L'hypercholestérolémie dans notre modèle de rats ZDF fa/fa s'accompagne d'une augmentation en stérols et en oxystérols dans les cellules cardiaques à la fois dans le cytosol et les mitochondries. Comme nous l'avons observé chez des rats normocholestérolémiques (Paradis et al. 2013), l'ischémie-reperfusion myocardique provoque chez les rats ZDF fa/fa une augmentation supplémentaire de ces composés aux niveaux cytosolique et mitochondrial. Cela s'accompagne de dysfonctions de l'organite s'additionnant à ceux induits par l'hypercholestérolémie.

Le 4'-chlorodiazépam conserve sa capacité à protéger les fonctions mitochondriales au cours de l'ischémie-reperfusion chez des animaux hypercholestérolémiques. Cette protection s'accompagne d'une inhibition de l'accumulation des stérols et oxystérols au niveau des mitochondries. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'accumulation de cholestérol mitochondrial peut représenter une stratégie valide dans la protection du cœur contre les lésions liées à l'ischémie-reperfusion et cela même en condition d'hypercholestérolémie.

Résultats 2 : Implication des oxystérols dans les lésions myocardiques liées à la reperfusion ainsi que dans les stratégies cardioprotectrices.

1. Objectif de l'étude

Nos résultats suggèrent que l'accumulation du cholestérol et des oxystérols mitochondriaux pourrait être impliquée dans les lésions liées à la reperfusion du myocarde ischémique. En effet, il est maintenant bien établi que le dérèglement de la concentration en oxystérols peut induire des effets néfastes sur les cellules, notamment au niveau mitochondrial, pouvant conduire à l'initiation d'un processus apoptotique (Ryan et al., 2005 ; Vejux et al., 2008).

Par ailleurs, un traitement des animaux par le 4'-chlorodiazépam, un ligand du TSPO, permet de les protéger contre les lésions de reperfusion et ceci s'accompagne d'une inhibition de l'accumulation des stérols à la fois chez des animaux normo et hypercholestérolémiques (Paradis et al., 2013 ; Musman et al., 2017).

Dans cette partie, nous avons cherché à confirmer l'implication d'une surcharge en cholestérol et en oxystérols dans les lésions liées à la reperfusion du myocarde. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de ces composés sur des mitochondries et des cardiomyocytes isolés.

Parallèlement, nous avons examiné la relation entre l'inhibition de l'accumulation des stérols mitochondriaux et la protection du myocarde contre les lésions liées à l'ischémie-reperfusion. Pour ce faire, nous avons eu recours à deux stratégies connues pour être cardioprotectrices et susceptibles de modifier la production d'oxystérols en jouant sur deux paramètres : le cholestérol et le stress oxydant. Nous avons pour cela utilisé une statine, la pravastatine, qui réduit la synthèse de cholestérol (Ludman et al., 2009) et la pratique d'un exercice physique régulier qui diminue le stress oxydant (Pons et al., 2013).

2. Protocoles expérimentaux

2.1. Observation de l'effet des oxystérols sur les cellules cardiaques

Nous avons tout d'abord observé l'effet d'une surcharge en oxystérols au niveau de mitochondries et de cardiomyocytes fraîchement isolés. Les mitochondries ont été extraites à partir de ventricules cardiaques gauches de rats Wistar âgés d'environ 8 semaines. Pour observer l'influence d'une surcharge en oxystérols sur les fonctions mitochondriales, nous avons incubé ces mitochondries en présence d'oxystérols à la concentration la plus élevée que le permet leur solubilité durant 20 minutes à 4°C (50 µM pour le 7-cétocholestérol et le 25-hydroxycholestérol ; 100 µM pour le 7β-hydroxycholestérol et pour les 5α,6α- et 5β,6β-époxycholestérols). Nous avons ensuite mesuré leur capacité à retenir le calcium, témoin de la sensibilité d'ouverture du mPTP, ainsi que leur consommation en oxygène pour déterminer leur coefficient respiratoire (Cf. II.I.5).

Dans une seconde étape, nous avons mesuré la viabilité de cardiomyocytes adultes fraîchement isolés de cœur de rats Wistar d'environ 6 semaines et mis en culture pendant 20 heures en présence de différentes concentrations (0 ; 2 ; 10 ; 25 ; 50 µM) des cinq même oxystérols étudiés sur les mitochondries. La mesure de viabilité a été effectuée par coloration des cellules au bleu de trypan (Cf. II.I.11).

2.2. Protocoles de protection du myocarde ischémique

Afin de déterminer l'implication de l'inhibition de l'accumulation des stérols mitochondriaux dans la cardioprotection, nous avons fait courir des souris C57BL/6J et des souris ob/ob durant 4 semaines, avec une première semaine d'adaptation à rythme réduit puis 3 semaines à un rythme plus soutenu (1 heure par jour à une vitesse de 30 cm.s⁻¹ pour les C57BL/6J et de 20 cm.s⁻¹ pour les souris ob/ob). L'intensité de l'exercice a été diminuée pour le groupe de souris obèses afin d'uniformiser la dépense énergétique fournie par les animaux au cours de la course malgré leur différence de poids. Nous avons ensuite observé l'effet d'un protocole de 30 minutes d'ischémie suivies de 15 minutes de reperfusion myocardique sur la concentration des stérols et des oxystérols mitochondriaux chez ces animaux et comparé ces résultats à ceux obtenus chez des animaux sédentaires (Cf. II.I.2).

De la même manière, nous avons observé l'effet de la diminution de la synthèse de cholestérol chez des rats Wistar grâce à un traitement à la pravastatine (10 mg/kg/jour durant 3 jours) sur l'accumulation des stérols mitochondriaux après ischémie-reperfusion du

myocarde. La cardioprotection induite par cette molécule a été confirmée par contrôle des fonctions des mitochondries cardiaques. Dans l'étude de chacune de ces deux stratégies cardioprotectrices, le dosage des stérols et oxystérols a été effectué par GC-MS (Cf. II.1.9).

3. Résultats obtenus

3.1. Effet du cholestérol et des oxystérols sur les cellules cardiaques

3.1.1. Effet des oxystérols au niveau des mitochondries cardiaques

Des mitochondries cardiaques issues de rats Wistar ont été extraites et mises en présence d'oxystérols, ou de leur solvant (DMSO), dans le but d'évaluer leur effet sur les fonctions mitochondriales.

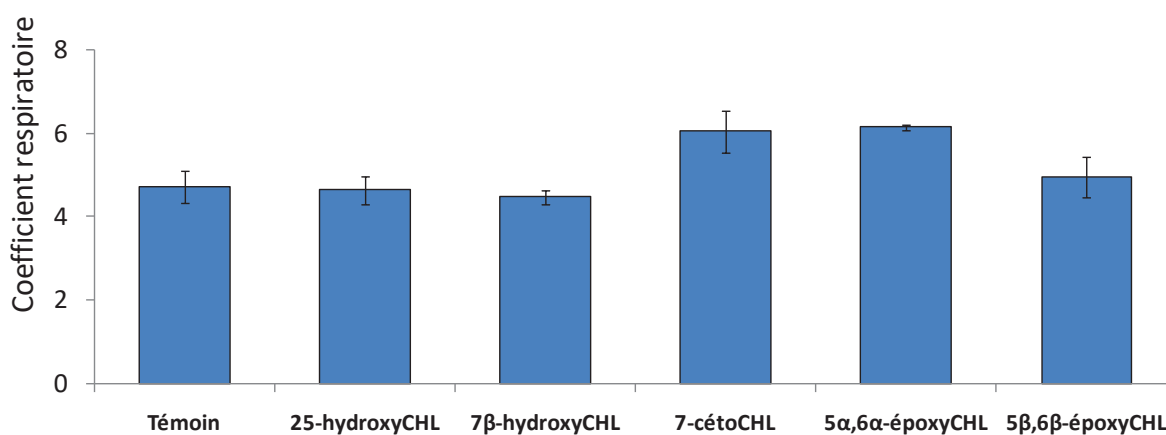


Figure 24 : Effet de la présence d'oxystérols sur le coefficient respiratoire des mitochondries cardiaques. Des mitochondries extraites de ventricules cardiaques gauches de rats Wistar ont été mis en présence de différents oxystérols (25-hydroxyCHL et 7-cétoCHL à 50µM ; 7β-hydroxyCHL, α-époxyCHL et β-époxyCHL à 100µM) ou de leur solvant (DMSO) servant de témoin, cela durant 20 minutes à 4°C avant mesure de la respiration mitochondriale. Chaque valeur représente la moyenne ±SEM de 3 à 4 extraits mitochondriaux.

CHL : cholestérol.

Le coefficient respiratoire des mitochondries cardiaques extraites n'a pas montré de changement en présence des oxystérols utilisés dans cet étude (Figure 24). Le 7-cétocholestérol et l'α-époxycholestérol montrent une tendance à l'amélioration de ce coefficient qui ne ressort toutefois pas significativement.

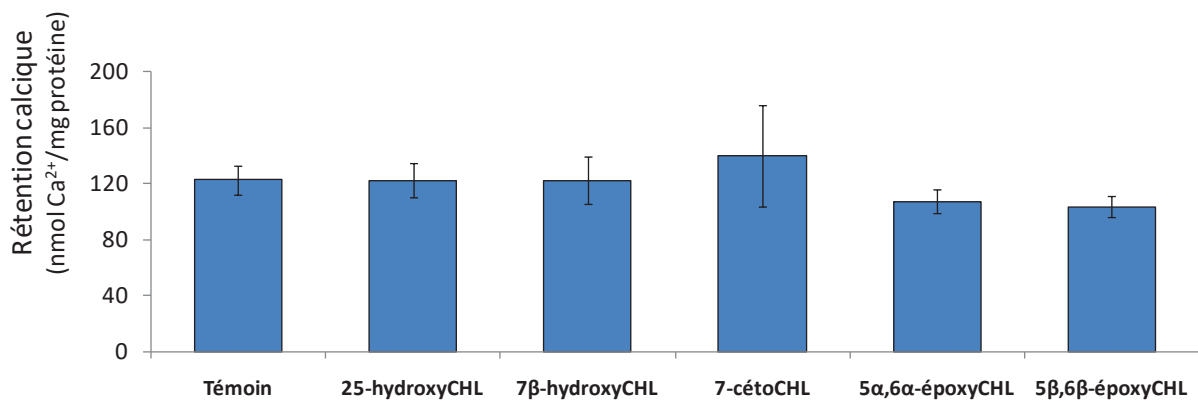


Figure 25 : Effet de la présence d'oxystérols sur la capacité de rétention calcique des mitochondries cardiaques. Le même protocole d'incubation a été utilisé que pour la mesure du coefficient respiratoire (Figure 24) avant de quantifier la quantité de calcium requise pour induire l'ouverture du mPTP. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 3 à 4 extraits mitochondriaux.

CHL : cholestérol.

De la même manière, aucun des oxystérols incubés avec les mitochondries cardiaques n'a induit de modification de leur capacité à retenir le calcium (Figure 25). La sensibilité d'ouverture du mPTP reste donc inchangée en présence de ces dérivés oxydés du cholestérol dans le milieu d'incubation.

3.1.2. Effet du cholestérol et des oxystérols sur la survie cellulaire

Des cardiomyocytes ont été mis en présence de cholestérol, d'oxystérols ou de leur solvant (éthanol) durant 20 heures à 37°C dans l'atmosphère ambiante incluant 5% de CO₂. Nous avons ensuite observé l'impact de ces composés sur la viabilité de ces cellules.

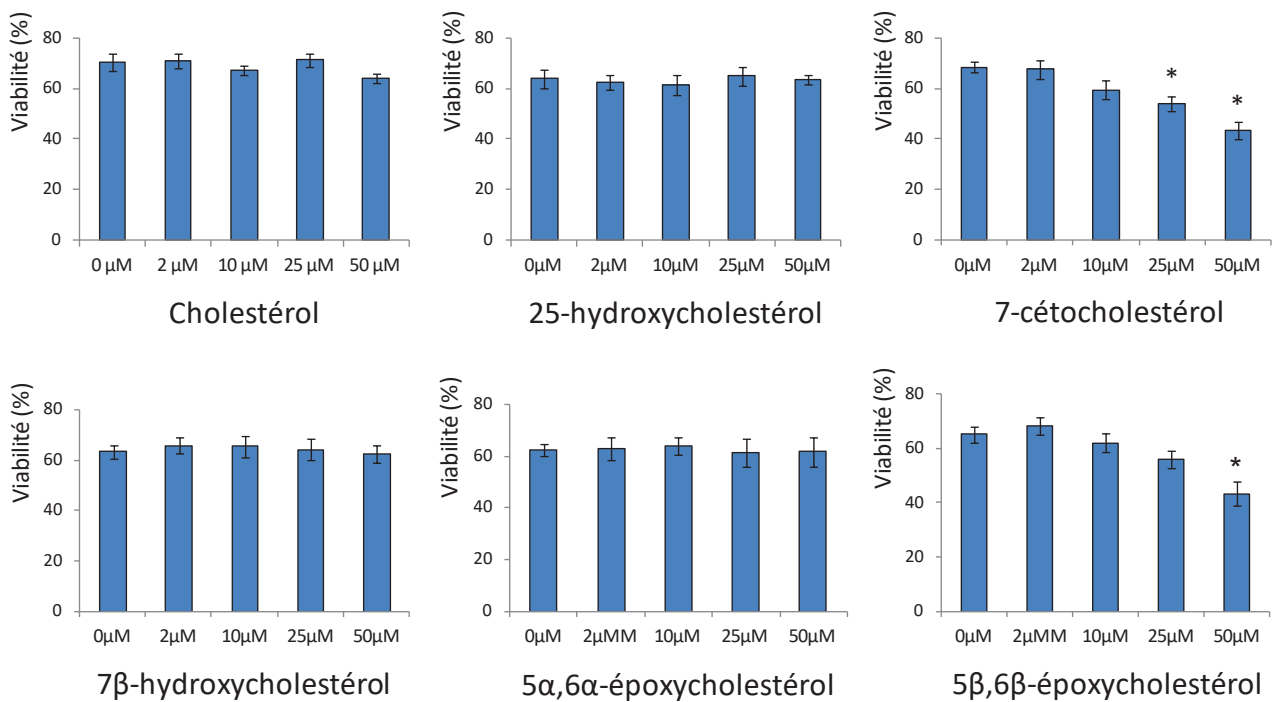


Figure 26 : Effet du cholestérol et des oxystérols sur la viabilité des cardiomyocytes. Des cardiomyocytes de rats Wistar fraîchement isolés ont été mis en culture dans un milieu M199 en présence d'oxystérols à différentes concentrations (2 ; 10 ; 25 ; 50 μM) ou leur solvant (éthanol : 0 μM) pendant 20 heures. La viabilité cellulaire a ensuite été évaluée par coloration au bleu de trypan et comptage manuel de la proportion de cellules colorées (mortes). Chaque valeur représente la moyenne ±SEM de 4 extraits cellulaires. * : $p < 0,05$ vs 0μM.

Le cholestérol incubé pendant 20 heures ne provoque pas de modification de la viabilité des cardiomyocytes quelle que soit la concentration utilisée (Figure 26). Un résultat similaire a été observé avec le 25-hydroxycholestérol, le 7β-hydroxycholestérol et le 5α,6α-époxycholestérol. En revanche, à la concentration de 50 μM, le 7-cétocholestérol et le 5β,6β-époxycholestérol diminuent la viabilité des cardiomyocytes de 36,7 et de 40,1%.

3.2. Effet de la diminution du stress oxydant chez des souris témoins et obèses

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal Free Radical Biology and Medicine :

Musman J, Pons S, Barau C, Caccia C, Leoni V, Berdeaux A, Ghaleh B, Morin D. Regular treadmill exercise inhibits mitochondrial accumulation of cholesterol and oxysterols during myocardial ischemia-reperfusion in wild-type and ob/ob mice. Free Radic Biol Med 2016;101:317-24.

Cette étude avait pour objectif de déterminer si la pratique de l'exercice physique, qui est cardioprotectrice et réduit le stress oxydant, limite l'accumulation de cholestérol et d'oxystérols dans la mitochondrie lors de la reperfusion du myocarde ischémié.

3.2.1. Effet de l'hypercholestérolémie sur les concentrations en stérols mitochondriaux cardiaques chez la souris

La mutation du gène codant la leptine chez les souris ob/ob est responsable d'une augmentation du cholestérol et de l'ensemble des oxystérols dans le plasma. L'accumulation de ces différents stérols ne se retrouve toutefois pas au niveau mitochondrial où leurs concentrations restent comparables chez les souris C57BL/6J et ob/ob, à l'exception du 27-hydroxycholestérol qui est augmenté chez les animaux obèses. Il est à noter que cet oxystérol est le seul formé de manière enzymatique parmi ceux dosés dans cette étude. Cette augmentation n'est pas due à une surexpression du CYP27A1, qui est à l'origine de sa formation dans la mitochondrie puisqu'au contraire, l'obésité chez ces souris s'accompagne d'une diminution de l'expression du CYP27A1 cardiaque (-71%).

3.2.2. L'ischémie-reperfusion est responsable d'une augmentation des stérols et des oxystérols mitochondriaux à la fois chez les souris témoins et obèses

Les souris C57BL/6J et ob/ob ont été soumises à une ischémie myocardique de 30 minutes suivie d'une reperfusion de 15 minutes. Le cholestérol mitochondrial s'accumule de manière similaire chez les souris C57BL/6J et ob/ob après ischémie-reperfusion (respectivement +19,2 et +16,2%) et ceci est associé à une augmentation des oxystérols dans l'organite, à l'exception du 7 α -hydroxycholestérol chez les souris C57BL/6J. Il est à noter que cet oxystérol ainsi que le 7-cétocholestérol sont très augmentés chez les souris ob/ob. Ceci peut être mis en relation avec une augmentation du stress oxydant chez ces souris puisque

nous avons observé une importante diminution au niveau cardiaque de deux protéines anti-oxydantes, la SOD1 et la catalase.

3.2.3. L'exercice physique limite l'accumulation des stérols et oxystérols mitochondriaux causée par l'ischémie-reperfusion.

Nous avons précédemment montré dans le laboratoire, par la mesure de tailles d'infarctus, le caractère cardioprotecteur du protocole de course utilisé dans ce projet (Pons et al. 2013). La mesure des stérols dans le cœur étant incompatible avec la mesure de la taille d'infarctus, nous avons utilisé l'évaluation de la phosphorylation oxydative des mitochondries isolées comme critère de lésions myocardiques causées par l'ischémie-reperfusion et de cardioprotection chez la souris. L'exercice physique permet une augmentation du coefficient respiratoire mitochondrial après ischémie-reperfusion cardiaque à la fois chez les souris C57BL/6J et ob/ob (+20,6% et +23,6%). Cet effet de l'exercice physique pourrait en partie s'expliquer par l'augmentation de l'expression des protéines anti-oxydantes SOD1 et catalase et donc par la diminution du stress oxydant en normo et hypercholestérolémie.

Cette protection au niveau du myocarde induite par l'exercice physique s'accompagne d'une inhibition importante de l'accumulation du cholestérol et des oxystérols mitochondriaux. Cet effet a été observé sur l'ensemble des oxystérols issus de l'auto-oxydation du cholestérol, que ce soit en condition de normo- ou d'hypercholestérolémie.

3.2.4. Conclusions

Cette étude a montré que les stérols et les oxystérols s'accumulent dans les mitochondries cardiaques de souris après ischémie-reperfusion, confirmant les résultats obtenus chez le rat. Cette accumulation est plus prononcée en condition d'hypercholestérolémie où l'on observe une forte augmentation des oxystérols produits par auto-oxydation, ce qui est à mettre en relation avec l'augmentation du stress oxydant décrit chez ces animaux et la diminution des protéines anti-oxydantes SOD1 et catalase que nous avons observée.

L'exercice-physique permet une protection des fonctions mitochondriales après ischémie-reperfusion myocardique qui s'accompagne d'une inhibition de l'accumulation du cholestérol et de la plupart des oxystérols mitochondriaux détectés. Cette inhibition est particulièrement marquée chez les souris ob/ob où l'accumulation du cholestérol est

totallement abolie. Cet effet de l'exercice physique est attribuable notamment à l'augmentation de l'expression de protéines anti-oxydantes telles que la SOD1 et la catalase que nous avons observée dans cette étude et qui permettrait de limiter l'auto-oxydation du cholestérol.

3.3. Effet de la diminution de la synthèse de cholestérol au moyen d'une statine

3.3.1. Effet sur les fonctions mitochondriales

L'effet cardioprotecteur de la pravastatine a plusieurs fois été décrit et cela même en absence d'effet sur la concentration de cholestérol sanguin (Thuc et al., 2010 ; Andreadou et al., 2012). Nous avons confirmé cet effet protecteur dans notre protocole expérimental en évaluant la respiration et la capacité des mitochondries à retenir le calcium dans les tissus cardiaques sains et ischémiés-reperfusés (Figure 27).

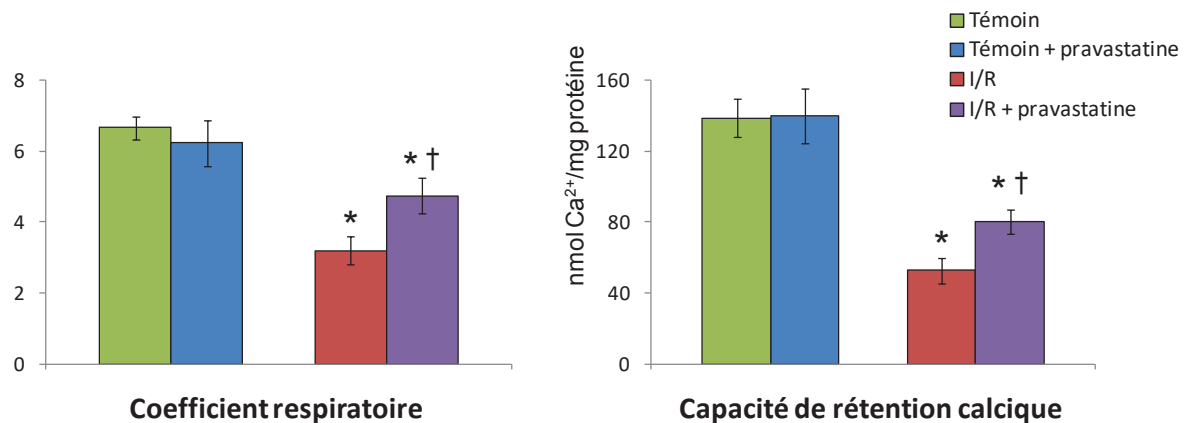


Figure 27 : Evaluation de la protection des fonctions mitochondriales au cours de l'ischémie-reperfusion par la pravastatine. Des rats Wistar ont reçu 10 mg/kg de pravastatine par jour par voie orale durant 3 jours avant extraction des mitochondries du ventricule cardiaque gauche ayant subi ou non une ischémie-reperfusion (I/R). Le coefficient respiratoire et la capacité de rétention calcique des mitochondries ont été évalués et comparés à ceux de mitochondries issues de rats non traités. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 7 à 10 extraits mitochondriaux. * : $p < 0,05$ vs témoins ; † : $p < 0,05$ vs I/R.

Le traitement des animaux témoins avec la pravastatine ne modifie pas les fonctions des mitochondries cardiaques. A l'inverse, l'ischémie-reperfusion du tissu provoque une chute importante du coefficient respiratoire mitochondriale (-52%). Celle-ci s'accompagne également d'une diminution de la capacité des mitochondries à retenir le calcium (-62%), témoignant d'un accroissement de sensibilité de l'ouverture du mPTP. Ces deux paramètres sont partiellement restaurés par la pravastatine qui augmente le coefficient respiratoire de 48% et la capacité de rétention calcique de 52% après ischémie-reperfusion.

3.3.2. Effet sur les stérols cardiaques aux niveaux cytosolique et mitochondrial

Nous avons ensuite déterminé l'effet du traitement par la pravastatine sur la concentration du cholestérol et des oxystérols au niveau des cellules cardiaques sur des animaux témoins et après ischémie-reperfusion, malgré l'absence d'effet sur leur concentration au niveau plasmatique. La pravastatine n'a pas eu d'effet sur le cholestérol cytosolique dans le cœur des animaux témoins. Un résultat similaire a été observé avec le 7 α -hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol, alors que le 7 β -hydroxycholestérol est augmenté (Figure 28). Comme nous l'avons vu précédemment, l'ischémie-reperfusion myocardique provoque une accumulation du cholestérol et des oxystérols dans le cytosol des cellules cardiaques. Le traitement par la pravastatine inhibe partiellement l'accumulation du cholestérol dans le cytosol. A l'inverse, il majore l'accumulation du 7 α -hydroxycholestérol alors qu'il n'a pas d'effet sur le 7 β -hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol (Figure 28).

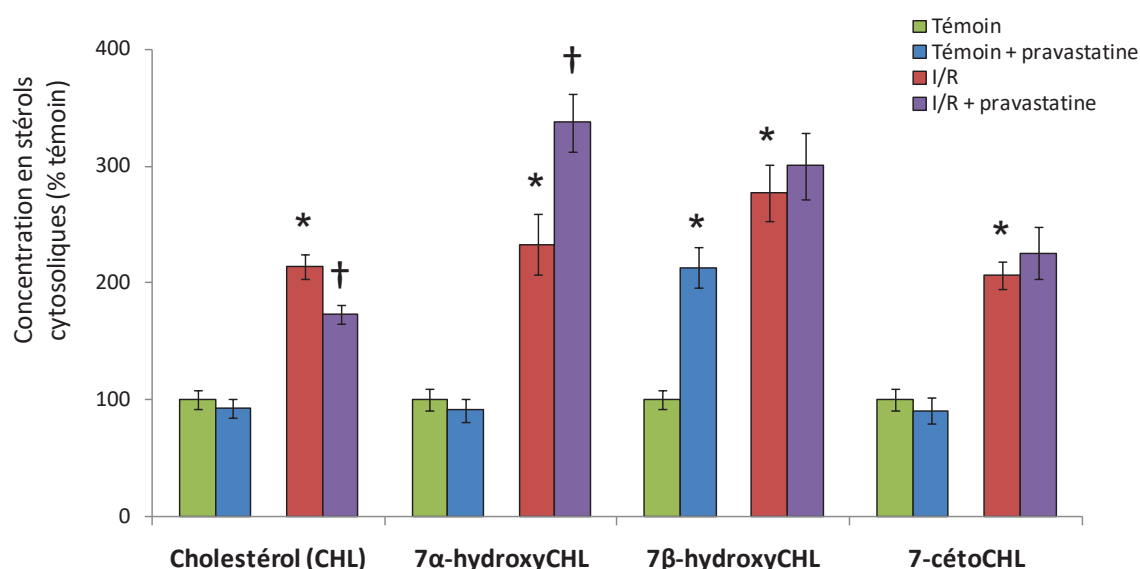


Figure 28 : Effet de la pravastatine sur le cholestérol et plusieurs oxystérols cytosoliques au cours de l'ischémie-reperfusion du myocarde. Des extraits cytosoliques ont été purifiés à partir de ventricules cardiaques gauches de rats Wistar ayant subi ou non une ischémie-reperfusion (I/R) du myocarde et traités ou non à la pravastatine. Le cholestérol (CHL) et les oxystérols ont ensuite été dosés par GC-MS. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 11 à 14 extraits cytosoliques. * : $p < 0,05$ vs témoins ; † : $p < 0,05$ vs I/R.

Au niveau mitochondrial, comme dans le cytosol, la pravastatine ne modifie pas la concentration en cholestérol et en oxystérols chez les animaux témoins (Figure 29). Par

ailleurs, cette étude confirme que l'ischémie-reperfusion du myocarde provoque l'accumulation au niveau mitochondrial du cholestérol et des oxystérols, que ceux-ci résultent d'une auto-oxydation du cholestérol ou bien d'une synthèse enzymatique comme le 27-hydroxycholestérol. Le traitement à la pravastatine inhibe totalement ces augmentations contrairement aux résultats observés dans le cytosol.

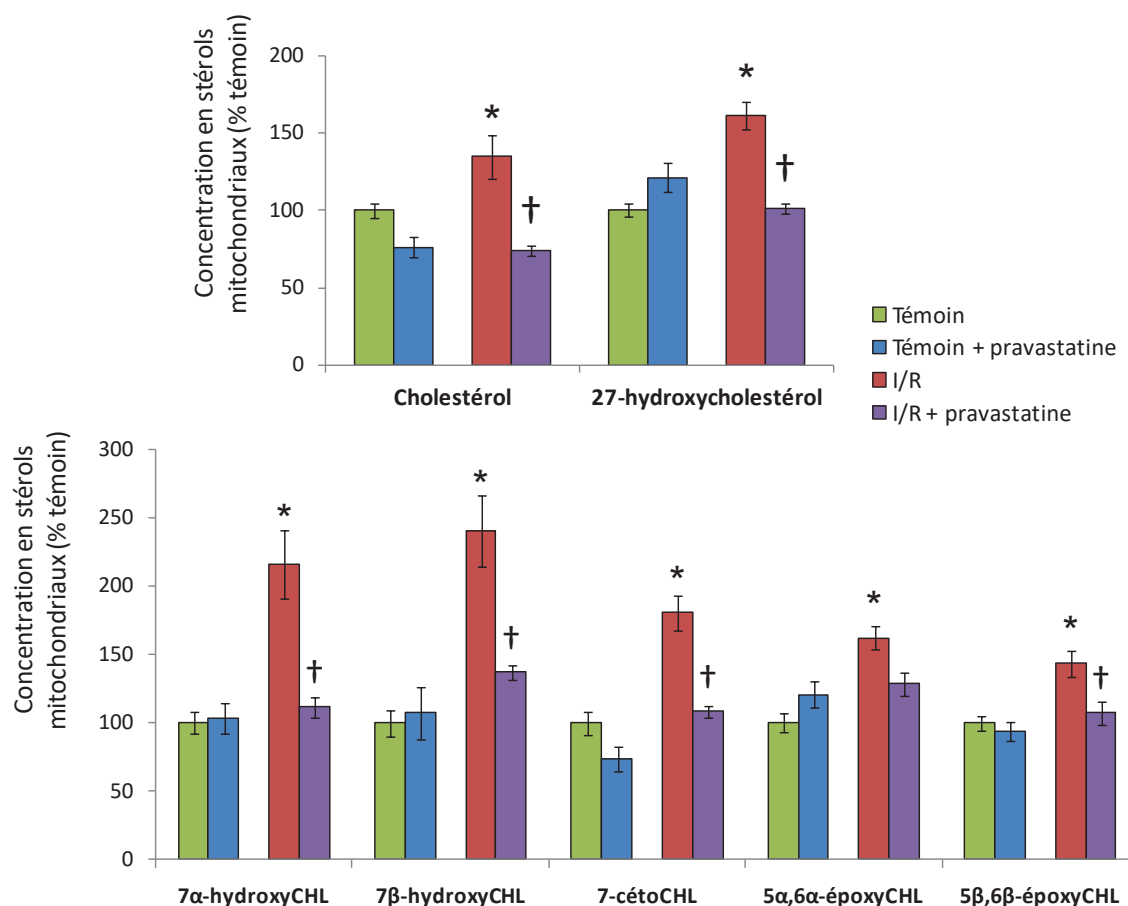


Figure 29 : Effet de la pravastatine sur la concentration en cholestérol et en oxystérols mitochondriaux au cours de l'ischémie-reperfusion du myocarde. Des mitochondries ont été extraites de ventricules cardiaques gauche de rats Wistar ayant subi ou non une ischémie-reperfusion (I/R) du myocarde et traités ou non à la pravastatine. Le cholestérol (CHL) et les oxystérols ont ensuite été dosés par GC-MS. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 9 à 15 extraits mitochondriaux. * : $p < 0,05$ vs témoins ; † : $p < 0,05$ vs I/R.

4. Conclusion

Bien que les oxystérols n'aient pas montré d'effets délétères sur les fonctions mitochondriales en cas d'incubation avec ces organites, le 7-cétocholestérol et le 7 β -hydroxycholestérol induisent un accroissement de la mortalité des cardiomyocytes à forte concentration (respectivement à partir de 25 et 50 μ M). Ces résultats confirment l'effet délétère pour une cellule de l'accumulation de certains oxystérols. L'absence d'effet de ces mêmes oxystérols sur des mitochondries isolées peut résulter de l'absence de passage de ces composés à travers la membrane mitochondriale qui pourrait nécessiter un temps d'incubation plus important et/ou certains facteurs cytosoliques pour ce transfert, dont les mécanismes restent aujourd'hui méconnus.

Comme observé précédemment dans notre laboratoire, l'ischémie-reperfusion est responsable d'une augmentation importante du cholestérol à la fois aux niveaux cytosolique et mitochondrial chez le rat mais aussi chez la souris. L'accumulation en oxystérols qui l'accompagne est susceptible de jouer un rôle dans l'apparition des lésions de reperfusion. Grâce à deux stratégies permettant de moduler la synthèse des oxystérols, que sont la diminution du stress oxydant par l'exercice physique, ainsi que de la synthèse de cholestérol par la pravastatine, nous avons observé une inhibition de l'accumulation du cholestérol et des oxystérols mitochondriaux après ischémie-reperfusion. De la même manière que pour le traitement par le ligand du TSPO, 4'-chlorodiazépam, cet effet sur les stérols mitochondriaux à la reperfusion du myocarde s'accompagne d'un maintien des fonctions mitochondriales, qui est un signe de cardioprotection. De plus, l'effet de chacune de ces deux stratégies sur l'accumulation de stérols dans les mitochondries et sur leurs fonctions à la reperfusion persiste en condition d'hypercholestérolémie. Cibler les mécanismes à l'origine de l'accumulation de cholestérol et d'oxystérols mitochondriaux représente donc une stratégie intéressante dans la prévention des lésions de reperfusion myocardiques.

Résultats 3 : Identification des mécanismes intervenants dans l'accumulation du cholestérol mitochondrial à la suite d'une ischémie-reperfusion myocardique.

1. Objectif de l'étude

Comme nous l'avons montré précédemment, l'ischémie-reperfusion du myocarde est responsable d'une accumulation du cholestérol au niveau mitochondrial. Celle-ci s'accompagne d'une augmentation incontrôlée de la concentration en oxystérols, qui sont aujourd'hui impliqués dans le développement de diverses pathologies (Doria et al., 2016 ; Gargiulo et al., 2017), de part, notamment, leur capacité à induire l'apoptose cellulaire (Rosca et al., 2012).

Les oxystérols pourraient donc jouer un rôle important dans la formation des lésions liées à la reperfusion. Les travaux effectués dans notre laboratoire démontrent que plusieurs stratégies cardioprotectrices inhibent l'accumulation mitochondriale en cholestérol et oxystérols (Paradis et al., 2013 ; Musman et al., 2016). Les mécanismes à l'origine de cette accumulation pourrait représenter une cible intéressante dans la prévention des lésions de reperfusion, mais ceux-ci restent aujourd'hui méconnus.

L'objectif de cette étude a donc été d'identifier les mécanismes intervenants dans l'accumulation de cholestérol mitochondrial liée à la reperfusion. Pour ce faire, nous avons cherché à déterminer si celle-ci résulte d'une diminution du catabolisme du cholestérol au cours de l'ischémie-reperfusion ou d'une augmentation de son transfert depuis le cytosol à travers la membrane mitochondriale, sans exclure l'association des deux. Dans ce but, nous nous sommes tout d'abord intéressés au CYP11A1 et au CYP27A1, deux enzymes mitochondriales dont la fonction est de dégrader le cholestérol. Nous avons ensuite étudié l'influence de l'ischémie-reperfusion myocardique sur les deux principales protéines décrites comme responsables de son entrée dans la mitochondrie, TSPO et StAR.

2. Protocoles expérimentaux

L'étude a consisté à observer l'évolution au cours d'une ischémie-reperfusion myocardique de l'expression des protéines impliquées dans la régulation du cholestérol mitochondrial chez des rats témoins et des rats traités par le 4'-chlorodiazépam ou la pravastatine. Le protocole réalisé sur des rats Wistar d'environ 8 semaines a consisté en 30 minutes d'ischémie suivi de 15 minutes de reperfusion (Cf. II.I.2). Nous avons ensuite isolé les protéines et les ARN totaux à partir de cœurs ischémiés-reperfusés et de cœurs témoins sains.

L'analyse de l'expression protéique a été effectuée par Western-blot et celles des ARNm par qPCR (Cf. II.I.6-7). Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la protection du myocarde ischémique, des protéines ont également été extraites de tissus cardiaques d'animaux ayant été traités au 4'-chlorodiazépam ou à la pravastatine, deux molécules capables de limiter l'accumulation de cholestérol mitochondrial à la reperfusion.

Nous avons de plus cherché à mesurer l'activité des deux cytochromes mitochondriaux impliqués dans la dégradation du cholestérol. Dans le cas du CYP11A1, nous avons synthétisé en collaboration avec l'équipe « Electrochimie et Synthèse Organique » de l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est une sonde fluorescente consistant en une molécule de cholestérol couplée au niveau de sa chaîne latérale à une molécule de résorufine, un fluorochrome inactif en l'état. Cette sonde nous a permis d'observer en fonction du temps, par spectrofluorimétrie (530ex/595em), le catabolisme du cholestérol correspondant à la libération de la résorufine suite au clivage de la chaîne latérale du cholestérol par le CYP11A1 (Cf. II.I.8).

Un protocole de mesure de l'activité du CYP27A1 est en cours de mise au point, en association avec l'équipe « Electrochimie et Synthèse Organique », consistant à doser le 27-hydroxycholestérol produit par cette enzyme contenue dans des extraits mitochondriaux, d'après les travaux de Li et al. (2006).

3. Résultats obtenus

3.1. Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur la dégradation enzymatique du cholestérol mitochondrial

Dans la mitochondrie, le cholestérol peut être dégradé de manière enzymatique par le CYP11A1 et le CYP27A1, qui sont responsables respectivement de la synthèse de prégnénolone et de 27-hydroxycholestérol. Une diminution de l'activité de ces enzymes au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique pourrait expliquer l'accumulation de cholestérol mitochondrial. Afin d'analyser cette hypothèse, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'expression protéique de ces enzymes. La figure 30 montre que ces enzymes sont présentes dans le cœur mais que leur expression n'est pas modifiée suite à la reperfusion du myocarde.

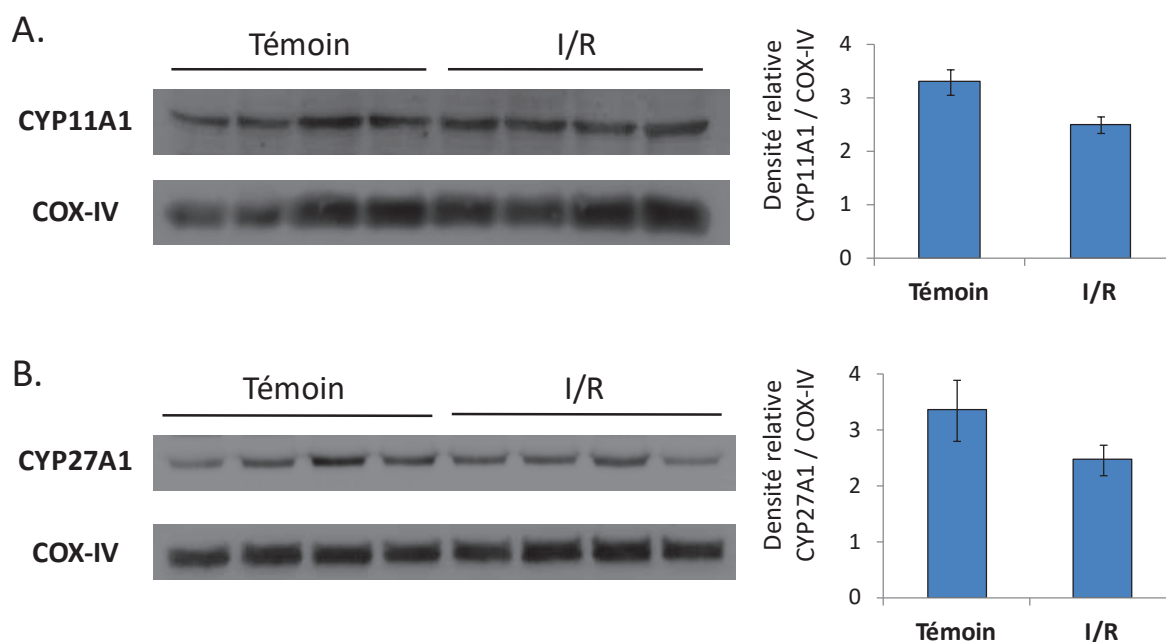


Figure 30 : Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'expression protéique du CYP11A1 (A) et du CYP27A1 (B). Les protéines mitochondriales ont été extraites à partir de cœurs de rats témoins ou ayant subi une ischémie-reperfusion (I/R). L'expression protéique de chacun de ces cytochromes a été comparée entre ces deux groupes par Western-blot et les résultats obtenus ont été normalisés en fonction de la protéine COX-IV. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 4 extraits protéiques.

Il faut noter que ces protéines sont très peu concentrées dans le cœur. La comparaison de leur expression cardiaque par rapport à celle observée dans des organes de référence, tels que le foie pour le CYP27A1 ou le testicule pour le CYP11A1, présente un différentiel tellement important qu'il rend difficile leur visualisation dans le cœur sur le même Western-blot (Figure 31).

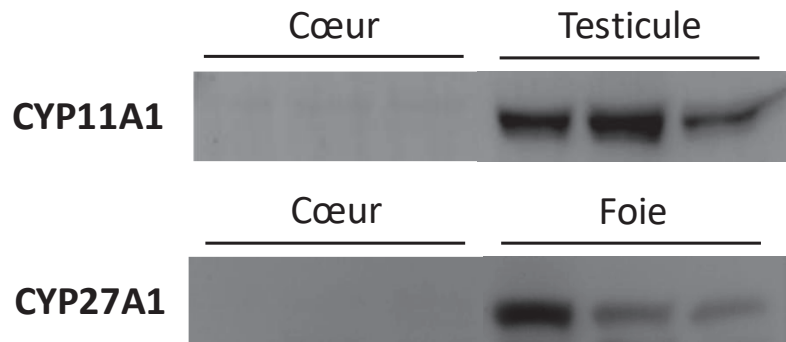


Figure 31 : Expression dans le cœur et dans respectivement le testicule et le foie de CYP11A1 et de CYP27A1. Les protéines mitochondriales ont été extraites à partir de tissus de rats Wistar. L'expression protéique de ces cytochromes a été comparée entre le cœur et le testicule pour le CYP11A1 et entre le cœur et le foie pour le CYP27A1 par Western-blot. Chaque bande correspond à un extrait protéique différent.

L'activité du CYP11A1 a ensuite été évaluée à la fois dans des mitochondries cardiaques et testiculaires, dans lesquelles l'expression du CYP11A1 est importante en raison de leur forte implication dans la stéroïdogénèse (Figure 32). Dans le cadre de ces expériences, nous avons travaillé à une concentration en protéines mitochondriales de 0,5 mg/mL, sélectionnée d'après les travaux de Rone et al. (2012). Nous avons observé une activité importante du CYP11A1 dans les mitochondries testiculaires, visualisée par une augmentation rapide de fluorescence (530 ex / 595 em) correspondant à la libération de résorufine. Toutefois, aucune activité de la protéine n'a pu être observée dans les mitochondries cardiaques à cette concentration. Le doublement de la concentration (1 mg/mL) nous a permis de mesurer l'activité du CYP11A1 dans le cœur mais celle-ci est très faible, ce qui est cohérent avec la faible expression observée et l'impossibilité de détecter de la prégnénolone dans les mitochondries cardiaques. Cependant lorsque cette activité est comparée à celle de mitochondries issues de cœur ayant subi une ischémie-reperfusion, aucune modification n'a été mise en évidence.

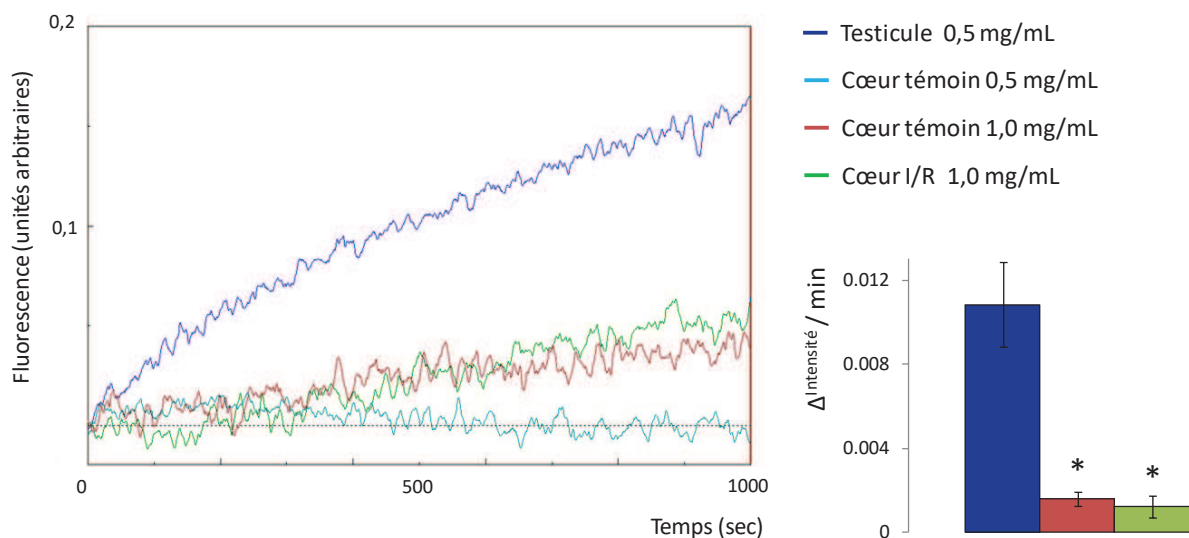


Figure 32 : Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'activité du CYP11A1. L'activité du CYP11A1 a été observée en incubant les mitochondries, issues de tissus cardiaques témoins ou ischémiés-reperfusés (I/R), en présence de cholestérol couplé à une molécule de résorufine au niveau de la chaîne latérale. Celle-ci est clivée par le CYP11A1, qui provoque une libération de la résorufine et donc une augmentation de fluorescence observable en fonction du temps (figure de gauche). Cette activité a été quantifiée par mesure de la vitesse d'augmentation de la fluorescence (figure de droite). Des mitochondries testiculaires ont été utilisées comme contrôle positif. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 4 à 6 extraits mitochondriaux. * : $p < 0,05$ vs testicule.

Outre l'activité du CYP11A1, il est important d'étudier celle du CYP27A1, qui participe aussi à la dégradation du cholestérol dans la mitochondrie, pour évaluer l'effet de l'ischémie-reperfusion sur le catabolisme du cholestérol dans l'organite. Ce travail est encore au stade de la mise au point et permettra de compléter ces résultats, ultérieurement à ce travail de thèse.

3.2. Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie

Afin de déterminer si l'accumulation de cholestérol mitochondrial lors de l'ischémie-reperfusion du myocarde résulte de l'augmentation de son entrée dans l'organite, nous avons évalué l'expression protéique des deux principaux médiateurs décrits dans ce mécanisme, les protéines TSPO et StAR.

Nous n'avons pas observé de modification de l'expression protéique de TSPO suite à la reperfusion du myocarde ischémié. Toutefois, l'isoforme 27kDa de la protéine StAR est fortement augmentée au niveau mitochondrial (Figure 33).

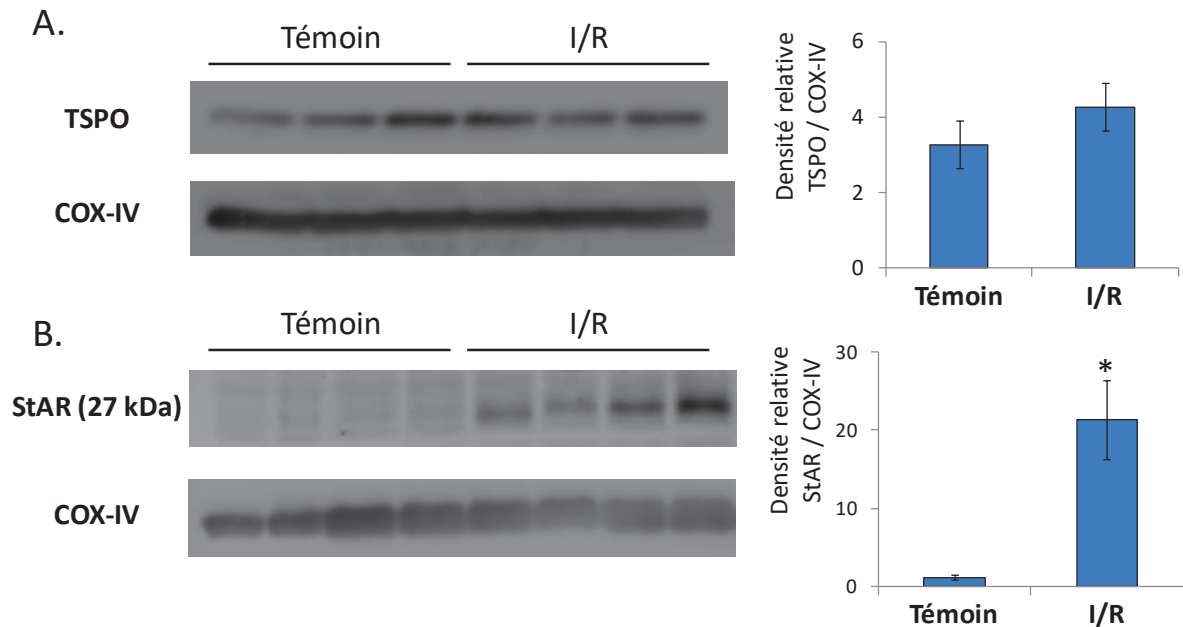


Figure 33 : Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'expression protéique de TSPO (A) et de l'isoforme de 27 kDa de StAR (B) dans la mitochondrie. Les protéines mitochondriales ont été extraites à partir de cœurs de rats ayant subi ou non une ischémie-reperfusion (I/R). L'expression de chacune de ces protéines a été comparée entre ces deux groupes par Western-blot et les résultats obtenus ont été normalisés en fonction de la protéine COX-IV. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 4 extraits protéiques. * : $p < 0,05$ vs témoin.

Cet effet de l'ischémie-reperfusion sur l'expression de la protéine StAR mitochondriale résulte spécifiquement de la reperfusion du myocarde. En effet, une ischémie de 30 minutes sans reperfusion n'induit pas de modification de cette protéine au niveau de la mitochondrie (Figure 34).

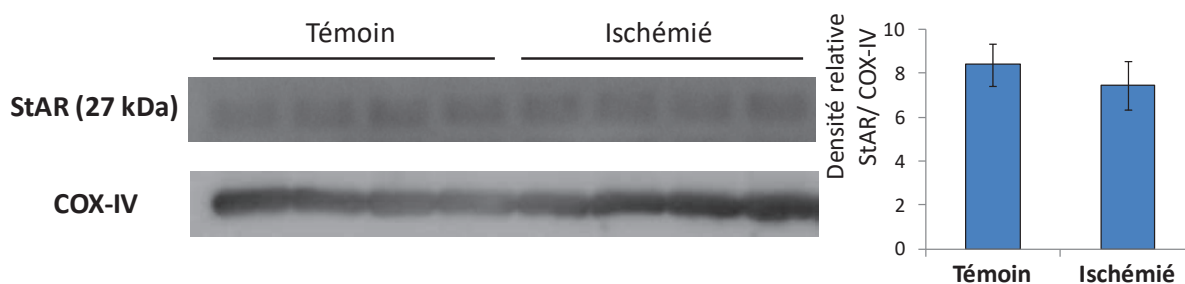


Figure 34 : Effet d'une ischémie du myocarde de 30 minutes sur l'expression protéique de l'isoforme de 27 kDa de StAR dans la mitochondrie. Les protéines mitochondriales ont été extraites à partir de cœurs de rats au terme d'une ischémie du tissu de 30 minutes. L'expression de la protéine a été comparée avec celle correspondant à des cœurs témoins par Western-blot et les résultats obtenus ont été normalisés en fonction de la protéine COX-IV. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 4 extraits protéiques.

Ainsi parmi les protéines impliquées dans la régulation du cholestérol mitochondrial auxquelles nous nous sommes intéressés, seule la protéine StAR est altérée dans la mitochondrie par l'ischémie-reperfusion. Nous avons cherché à confirmer ces résultats par l'étude de l'expression des ARNm codant chacune de ces protéines (Figure 35). Comme pour les protéines, nous n'avons pas constaté de modification de l'expression en ARNm codant le CYP11A1, le CYP27A1 et la protéine TSPO après l'ischémie-reperfusion du myocarde. Toutefois, l'ischémie-reperfusion provoque une diminution importante des ARNm codant la protéine StAR d'environ 80%.

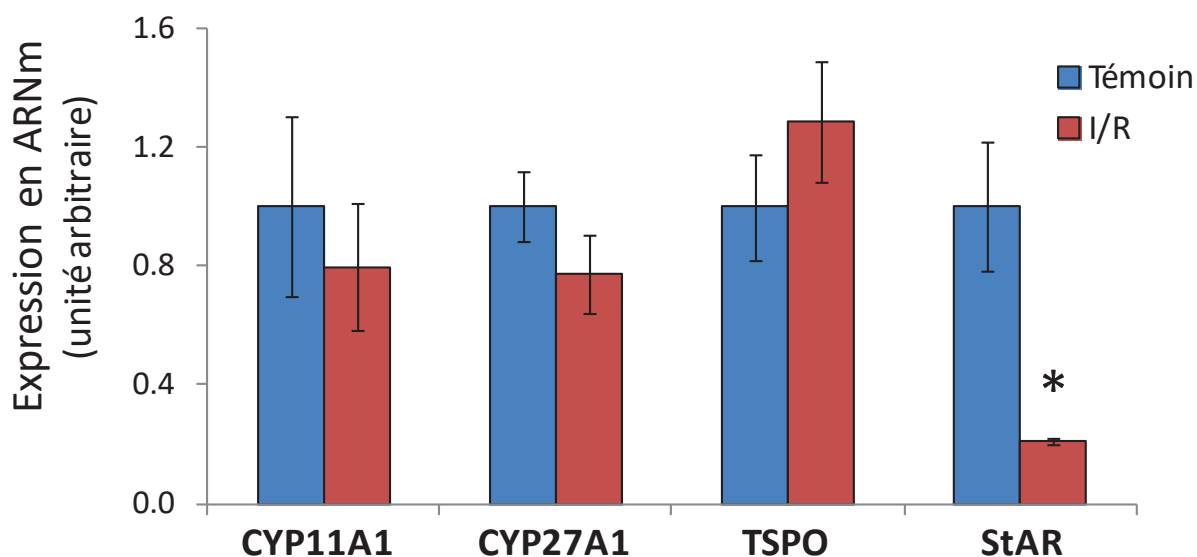


Figure 35 : Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'expression en ARNm de protéines impliquées dans la régulation du cholestérol mitochondrial. Les ARN totaux ont été extraits à partir de cœurs de rats témoins ou après ischémie-reperfusion (I/R). Nous avons ensuite quantifié les ARNm codant les protéines CYP11A1, CYP27A1, TSPO et StAR par qPCR. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 4 à 5 extraits d'ARN totaux. * : $p < 0,05$ vs témoin.

StAR étant la seule protéine altérée par l'ischémie-reperfusion du myocarde, nous sommes plus particulièrement intéressés à son comportement, c'est-à-dire à la répartition de ses différentes isoformes entre les compartiments cytosolique et mitochondrial de la cellule.

Au niveau cytosolique, nous observons une diminution de l'isoforme de 37 kDa de la protéine StAR suite à l'ischémie-reperfusion myocardique (Figure 36). Celle-ci s'accompagne d'une augmentation de l'isoforme de 27 kDa de manière similaire à celle observée au niveau mitochondrial.

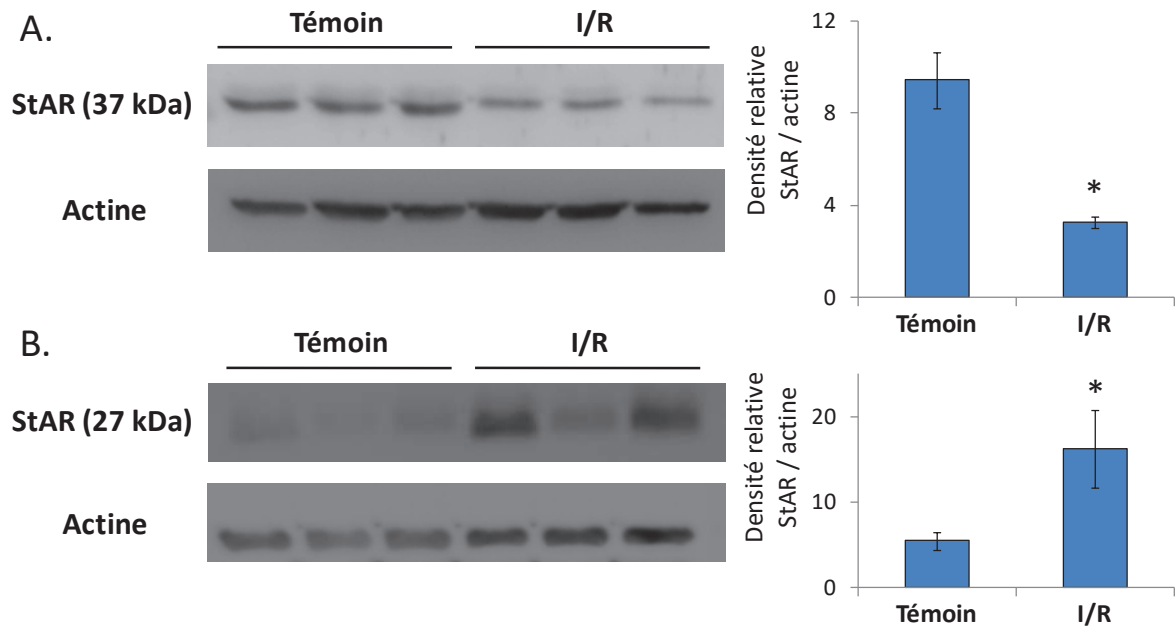


Figure 36 : Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'expression des différentes isoformes de StAR au niveau du cytosol. Les protéines cytosoliques ont été extraites à partir de cœurs de rats ayant subi ou non une ischémie-reperfusion (I/R). Les expressions des isoformes de 37 kDa (A) et de 27 kDa (B) de la protéine StAR ont été comparées entre ces deux groupes par Western-blot et les résultats obtenus ont été normalisés en fonction de la protéine d'actine. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 3 extraits protéiques. * : $p < 0,05$ vs témoin.

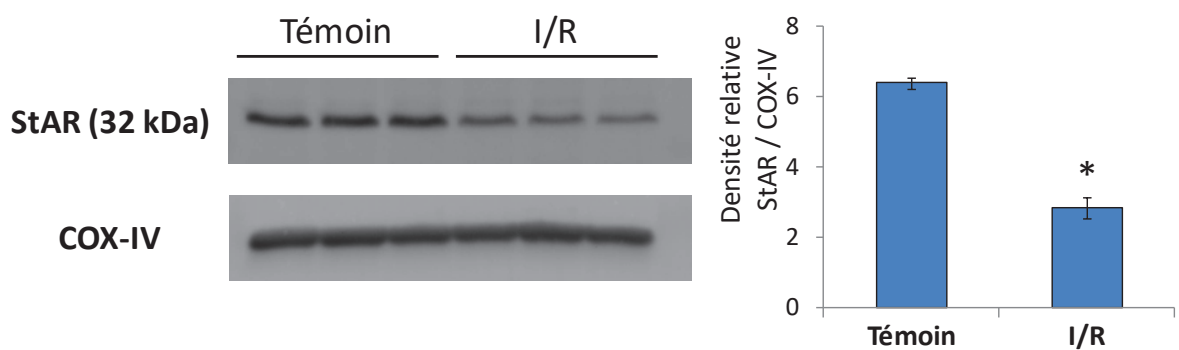


Figure 37 : Effet de l'ischémie-reperfusion myocardique sur l'expression de l'isoforme de 32 kDa de StAR au niveau de la mitochondrie. Les protéines mitochondriales ont été extraites à partir de cœurs de rats ayant subi ou non une ischémie-reperfusion (I/R). L'expression de l'isoforme de 32 kDa de la protéine StAR au niveau mitochondrial a été comparée entre ces deux groupes par Western-blot et les résultats obtenus ont été normalisés en fonction de la protéine COX-IV. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 3 extraits protéiques. * : $p < 0,05$ vs témoin.

Au niveau mitochondrial, l'ischémie-reperfusion du myocarde est aussi responsable d'une diminution de l'isoforme de 32 kDa de la protéine StAR (Figure 37).

3.3. Effet de stratégies cardioprotectrices sur l'expression de la protéine StAR

La translocation de la protéine StAR et sa maturation pour donner l'isoforme de 27 kDa sont donc impliquées dans les mécanismes liés à l'ischémie-reperfusion du myocarde. L'activité accrue de cette protéine pourrait expliquer l'augmentation importante en cholestérol mitochondrial constatée au cours de la reperfusion. Pour confirmer l'implication de la protéine StAR dans ce phénomène, nous avons observé l'effet de deux traitements cardioprotecteurs sur cette protéine : la pravastatine qui inhibe la synthèse de cholestérol, et le 4'-chlorodiazépam qui est un ligand de la protéine TSPO.

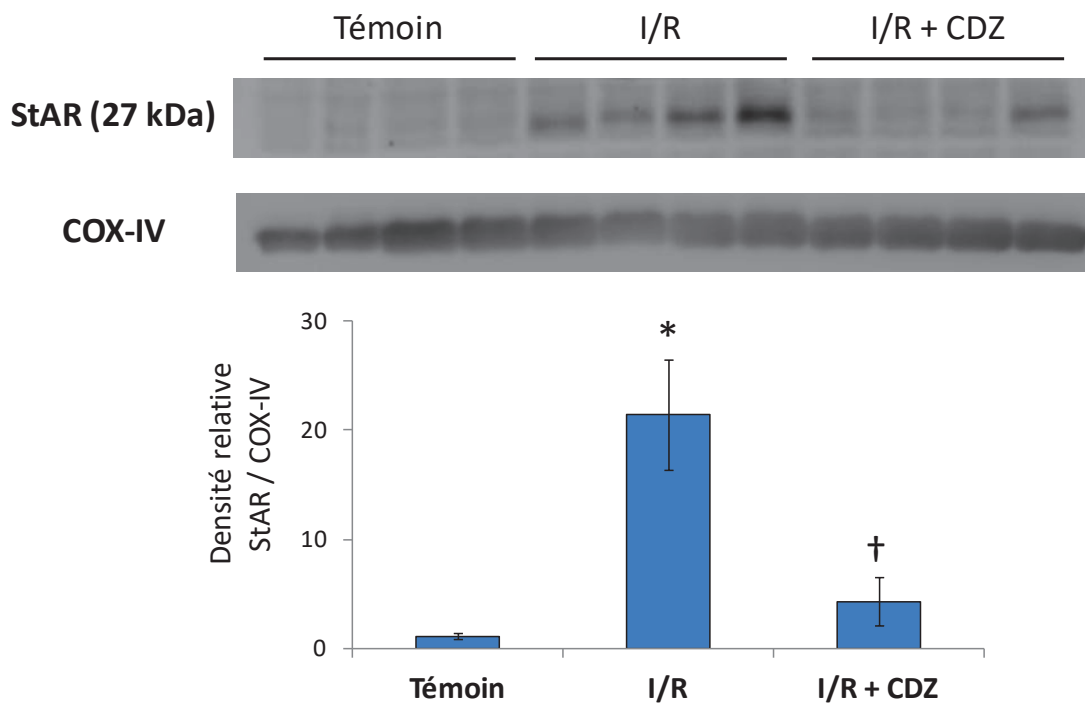


Figure 38 : Effet du 4'-chlorodiazépam sur l'accumulation de l'isoforme de 27 kDa de la protéine StAR au niveau mitochondrial lors de l'ischémie-reperfusion myocardique. Les protéines mitochondriales ont été extraites à partir de cœurs de rats traités ou non par le 4'-chlorodiazépam (CDZ) à la dose de 10 mg/kg et ayant subi une ischémie-reperfusion (I/R). L'expression de l'isoforme de 27 kDa de la protéine StAR dans ces deux groupes a été comparée à celle observée dans des échantillons cardiaques témoins par Western-blot et les résultats obtenus ont été normalisés en fonction de la protéine COX-IV. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 4 extraits protéiques. * : $p < 0,05$ vs témoin ; † : $p < 0,05$ vs I/R.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'effet du 4'-chlorodiazépam sur la translocation de la protéine StAR au niveau mitochondrial au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique (Figure 38). Nous avons observé que cette stratégie cardioprotectrice s'accompagne d'une inhibition importante de l'augmentation de l'isoforme de 27 kDa de la protéine StAR dans la mitochondrie.

Nous avons ensuite réalisé les mêmes expériences suite au traitement des animaux à la pravastatine (Figure 39). Nous avons là encore observé une inhibition de l'augmentation de l'isoforme de 27 kDa dans la mitochondrie après ischémie-reperfusion du myocarde. Il est à noter que la pravastatine provoque aussi une diminution de cette isoforme après traitement des animaux témoins.

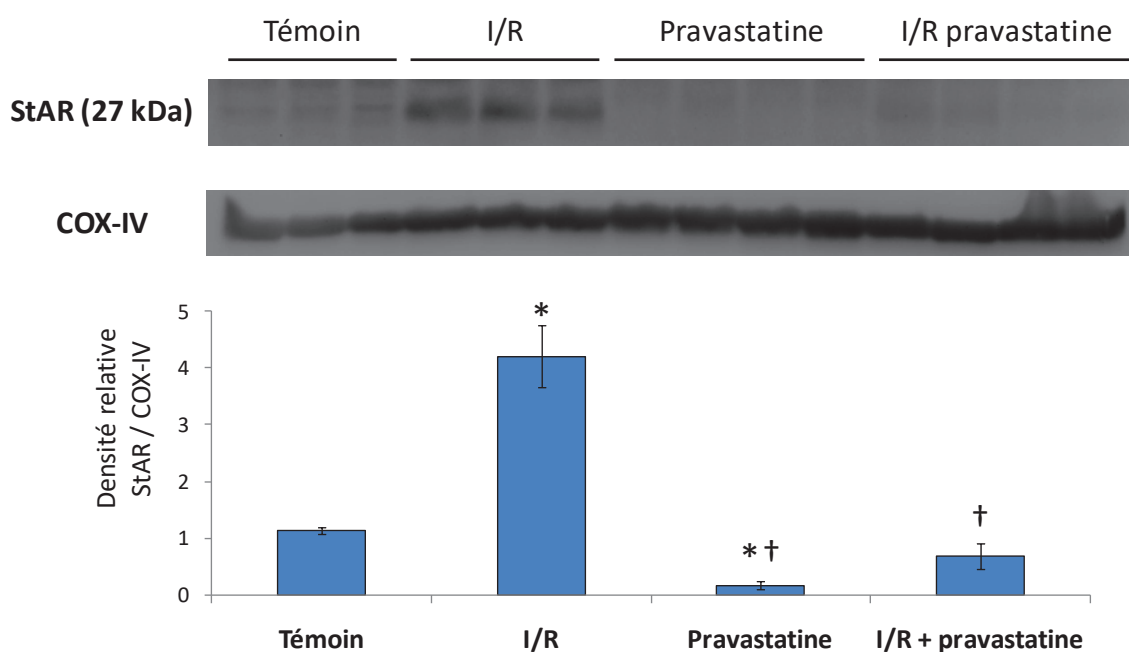


Figure 39 : Effet de la pravastatine sur l'accumulation de l'isoforme de 27kDa de la protéine StAR au niveau mitochondrial lors de l'ischémie-reperfusion myocardique. Les protéines mitochondriales ont été extraites à partir de cœurs de rats traités ou non à la pravastatine à la dose de 10 mg/kg par jour durant 3 jours et ayant subi une ischémie-reperfusion (I/R). L'expression de l'isoforme de 27 kDa de la protéine StAR dans ces deux groupes a été comparée à celle observée dans des échantillons cardiaques non ischémiés-reperfusés par Western-blot et les résultats obtenus ont été normalisés en fonction de la protéine COX-IV. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM de 3 à 4 extraits protéiques. * : $p < 0,05$ vs témoin ; † : $p < 0,05$ vs I/R.

4. Conclusion

L'ensemble de ces résultats montrent que l'accumulation du cholestérol mitochondrial après ischémie-reperfusion ne serait pas la conséquence d'une diminution du catabolisme du cholestérol, mais plutôt d'une entrée massive de cette molécule dans l'organite.

En effet, l'expression du CYP11A1 et du CYP27A1, dont la fonction est de dégrader le cholestérol dans la mitochondrie, n'est pas altérée par l'ischémie-reperfusion du myocarde. De même, l'activité du CYP11A1, qui est faible dans le cœur, demeure inchangée. Par ailleurs, alors que l'accumulation du cholestérol mitochondrial ne s'accompagne pas de modification de l'expression de la protéine TSPO, on observe une diminution importante de l'isoforme cytosolique de 37 kDa de la protéine StAR au profit de l'expression mitochondriale l'isoforme de 27 kDa. Ce résultat attesterait d'une activité importante de la protéine StAR au cours de la reperfusion du myocarde, qui semble parallèlement régulée par une chute de son expression en ARNm. Ce mécanisme de translocation de la protéine StAR jouerait donc un rôle important dans l'accumulation du cholestérol mitochondrial au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique et son inhibition pourrait participer à la protection du myocarde ischémique. C'est ce que suggèrent les résultats obtenus avec les traitements par la pravastatine et le 4'-chlorodiazépam, ce dernier montrant qu'il existe une action conjointe des protéines TSPO et StAR pour induire l'entrée de cholestérol dans la mitochondrie.

Chapitre II.III. Discussion générale :

La reperfusion du myocarde ischémique est primordiale pour limiter les lésions du tissu, mais paradoxalement, celle-ci est aussi à l'origine de lésions supplémentaires. Notre laboratoire a montré *in vivo* chez le rat que la reperfusion myocardique provoque une accumulation importante du cholestérol au niveau de la matrice mitochondriale (Paradis et al., 2013). En parallèle de cette accumulation, nous avons observé une augmentation des oxystérols mitochondriaux lors de la reperfusion du myocarde ischémique. Ces composés sont notamment issus de l'auto-oxydation du cholestérol par les EROs qui sont produites en quantité importante au cours de l'ischémie-reperfusion et sont susceptibles de provoquer des effets néfastes sur les cellules.

Les oxystérols sont à l'origine d'une majoration du stress oxydant et peuvent mener à l'initiation d'un processus apoptotique par des voies faisant intervenir la mitochondrie (Lordan et al. 2009). Il est aussi bien établi que le stress oxydant et la mitochondrie jouent un rôle important dans les dommages liés à l'ischémie-reperfusion du tissu cardiaque, suggérant une possible implication des oxystérols dans ces lésions. Cibler les mécanismes à l'origine de cette accumulation de stérols mitochondriaux pourrait ainsi permettre de prévenir les lésions causées par l'ischémie-reperfusion du myocarde. En effet l'utilisation du 4'-chlorodiazépam, un ligand de la protéine TSPO, permet la prévention de ces lésions et s'accompagne d'une limitation du cholestérol et des oxystérols dans la mitochondrie (Paradis et al., 2013).

1. Implication des oxystérols dans les lésions de reperfusion du myocarde ischémique

L'absence d'effet délétère direct de l'accumulation de cholestérol mitochondrial sur les cellules cardiaques suite à un épisode d'ischémie-reperfusion a été confortée par nos résultats montrant que la présence de fortes concentrations de cholestérol n'altère pas la viabilité de cardiomyocytes adultes dans les 20 heures après leur isolement. De plus, des travaux de Montero (2008) et de Lucken-Ardjomande (2008) ont montré que l'accumulation du cholestérol au niveau mitochondrial est associée à une augmentation de la résistance des cellules. Il est toutefois à noter que ces résultats ont été obtenus dans un contexte de surcharge en cholestérol *in vitro* dans lequel l'accumulation de cholestérol se trouve localisée dans la membrane mitochondriale et sans association à une augmentation du stress oxydant liée à

l'ischémie-reperfusion. Ces modèles ne sont donc pas associés à une augmentation des oxystérols, bien plus enclins à jouer un rôle dans l'induction des « lésions de reperfusion » du myocarde.

Dans le but de confirmer l'effet délétère des oxystérols sur des mitochondries cardiaques fraîchement extraites, nous les avons incubées en présence de différents oxystérols. Nous n'avons observé aucune altération des fonctions mitochondriales en présence de ces composés. Toutefois, l'incubation prolongée de cardiomyocytes adultes en présence de 7-cétocholestérol et de 5 β ,6 β -époxycholestérol à la concentration testée la plus élevée possible (50 μ M) provoque une hausse de la mortalité de ces cellules sur 20 heures. Ces résultats montrent l'effet délétère que peuvent avoir des oxystérols sur des cellules cardiaques à forte dose bien que les concentrations utilisées dans notre étude de cytotoxicité *in vitro* (de l'ordre du μ M) pourraient paraître bien supérieures à celles des oxystérols mitochondriaux mesurées *in vivo* après ischémie-reperfusion (de l'ordre du pmol/mg de protéines) et rendre irréaliste cette comparaison. Cependant, deux paramètres sont à considérer : (1) le volume des mitochondries contenues dans 1 mg de protéines est évalué à environ 1 μ L ramenant la concentration mesurée de l'ordre du μ M dans l'organite (Vinnakota et Bassingthwaite, 2003) et (2) une accumulation non homogène des oxystérols au sein de la mitochondrie peut augmenter leur concentration localement. Par ailleurs, l'absence d'effet des oxystérols sur les mitochondries isolées pourrait s'expliquer par une lente cinétique de transfert à travers la membrane mitochondriale ou/et de facteurs cytosoliques nécessaires à leur entrée active dans la mitochondrie.

L'effet cytotoxique du 7-cétocholestérol a aussi été observé sur différentes lignées cellulaires dont des cellules endothéliales aortiques humaines, dans lesquelles il s'accompagne d'une augmentation en EROs et d'une diminution de l'activité mitochondriale. D'autres oxystérols sont capables d'induire un effet toxique sur des cellules tels que le 5 β ,6 β -époxycholestérol et le 7 β -hydroxycholestérol, bien que ce dernier n'ai pas montré d'effet sur la viabilité cardiomyocytaire dans notre travail. L'effet délétère de ces oxystérols serait donc dépendant de la lignée cellulaire étudiée. A l'inverse, comme nous l'avons observé dans ces cellules, bon nombre d'oxystérols tels que le 25-hydroxycholestérol n'influent pas sur la viabilité cellulaire (Lemaire-Ewing et al., 2005 ; Dugas et al., 2010 ; Chalubinski et al., 2013).

Il faut noter que la présence des oxystérols les moins délétères permet de limiter la cytotoxicité des plus néfastes. En effet, la présence de 25-hydroxycholestérol et/ou de 27-hydroxycholestérol en proportion physiologique permet de protéger les cellules de l'effet pro-

apoptotique ou nécrotique de certains oxystérols, tels que le 7-cétocholestérol et le 7 β -hydroxycholestérol (Larsson et al., 2006). Ainsi l'augmentation observée du 27-hydroxycholestérol et d'autres oxystérols décrits comme non délétères pourraient prévenir une partie des dommages induits par les plus toxiques. Cependant, aux fortes concentrations observées dans les mitochondries cardiaques après ischémie reperfusion, il est possible que ces oxystérols « non toxiques » ne puissent plus inhiber la cytotoxicité des oxystérols, telle que celle observée avec le 7-cétocholestérol, et pourraient même se révéler néfastes pour l'organite.

Les oxystérols sont aussi impliqués dans différentes pathologies et sont fortement augmentés au niveau plasmatique chez des individus hypercholestérolémiques (Arca et al., 2007). Nous avons confirmé ces résultats dans un modèle de rats hypercholestérolémiques (ZDF fa/fa) et montré que cette augmentation plasmatique de dérivés du cholestérol s'accompagne d'un accroissement de leur concentration dans les cellules cardiaques à la fois dans le cytosol et les mitochondries. A l'inverse, nous n'avons observé chez les souris obèses ob/ob aucune modification de la concentration de ces composés dans les mitochondries cardiaques bien que ceux-ci soient augmentés au niveau plasmatique de manière similaire. Cette différence d'effet de l'hypercholestérolémie sur les stérols mitochondriaux peut expliquer que la diminution du coefficient respiratoire mitochondrial observée chez les rats ZDF fa/fa par rapport aux rats ZDF lean ne soit pas retrouvée chez les souris ob/ob par rapport aux C57BL/6J. Cet effet délétère du phénotype d'obésité au niveau mitochondrial est pourtant aujourd'hui bien établi et est lié à l'augmentation du stress oxydant (Boudina et al., 2005).

L'ischémie-reperfusion myocardique provoque une importante accumulation du cholestérol et des oxystérols mitochondriaux chez ces deux modèles animaux hypercholestérolémiques. Cette augmentation est globalement supérieure à celle observée chez les animaux normocholestérolémiques. Ce résultat peut s'expliquer par la présence de davantage de cholestérol disponible transférable vers la mitochondrie et par l'importance du stress oxydant en condition d'hypercholestérolémie qui peut augmenter l'auto-oxydation du cholestérol présent. Le stress oxydant induit provoque une diminution des fonctions mitochondriales et peut provoquer une perméabilisation membranaire mitochondriale responsable d'une production supplémentaire d'EROs par activation importante de la chaîne de transfert d'électrons (Zorov et al., 2006).

Cette forte concentration en oxystérols mitochondriaux pourrait participer à l'augmentation des lésions provoquées par l'ischémie-reperfusion myocardique en condition d'hypercholestérolémie (Pons et al., 2013). Nous avons donc fait l'hypothèse qu'inhiber cette accumulation du cholestérol mitochondrial à la reperfusion représenterait une stratégie intéressante dans la protection du myocarde à la reperfusion et notamment chez des patients souffrant d'hypercholestérolémie. En effet, on sait que chez ces patients, l'augmentation du taux de cholestérol s'accompagne d'une diminution de l'efficacité de la plupart des stratégies cardioprotectrices et notamment d'une des plus efficaces, le préconditionnement ischémique.

Les résultats obtenus avec le 4'-chlorodiazépam tendent à valider cette hypothèse puisque ce ligand du TSPO rétabli les fonctions mitochondriales après ischémie-reperfusion myocardique chez les rats hypercholestérolémiques ZDF fa/fa. Cette inhibition des lésions de reperfusion s'accompagne là encore d'une limitation importante de l'accumulation du cholestérol et des oxystérols mitochondriaux. Cependant, le 4'-chlorodiazépam n'induit pas de modification de la concentration du cholestérol et des oxystérols dans le cytosol. Ceci atteste de l'effet direct de ce composé au niveau mitochondrial où est exprimée la protéine TSPO.

Afin de tenter de confirmer que la réduction de la production des dérivés oxydés du cholestérol à la reperfusion joue un rôle important dans la protection des fonctions mitochondriales et du myocarde, l'étape suivante de notre travail a consisté à agir sur les deux principaux facteurs influençant la formation des oxystérols, le cholestérol et le stress oxydant. Nous avons pour cela utilisé deux stratégies connues pour protéger le myocarde au cours d'un épisode d'ischémie-reperfusion (Brown et al., 2003 ; Bao et al., 2007) et dont l'efficacité est conservée malgré la présence de facteurs de comorbidité tels que l'hypercholestérolémie (Shepherd et al., 1995 ; Pons et al., 2013). La première a consisté à limiter le stress oxydant au moyen d'un exercice physique régulier, la seconde à diminuer la concentration de cholestérol au moyen d'une statine, la pravastatine.

Nos résultats montrent que l'exercice physique et le traitement par la pravastatine restaurent les fonctions des mitochondries cardiaques chez des rongeurs normocholestérolémiques après l'ischémie-reperfusion du myocarde. De plus, la cardioprotection assurée par ces deux stratégies, comme avec le traitement au 4'-chlorodiazépam, s'accompagne de l'inhibition de l'accumulation de stérols et d'oxystérols mitochondriaux.

De la même manière que chez les souris C57BL/6J normocholestérolémiques, la pratique d'exercices physiques réguliers permet de protéger les mitochondries tout en inhibant l'accumulation de stérols et d'oxystérols dans ces organites chez les souris ob/ob. Cette inhibition induite au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique est globalement plus importante que chez les souris C57BL/6J, ce qui peut s'expliquer par leur stress oxydant supérieur permettant un effet plus important de l'exercice physique chez ces animaux. En effet, il est à signaler que l'effet bénéfique de l'exercice physique s'accompagne d'une faible production d'EROs qui participent à l'activation d'enzymes anti-oxydantes qui préviennent l'important pic d'EROs délétère à la reperfusion. L'action bénéfique associée à l'exercice vient d'une meilleure adaptation face au stress oxydant par l'augmentation de l'activité de divers enzymes anti-oxydantes telles que la SOD1 et la catalase (Powers et Jackson, 2008 ; He et al., 2016). Or nous avons montré que ces deux enzymes sont réduites chez ces deux lignées hypercholestérolémiques, cet effet se retrouvant d'ailleurs chez l'homme présentant un phénotype d'obésité (Aghamohammadzadeh et al., 2015). Notre protocole d'exercice physique a permis d'augmenter l'expression de la SOD1 et de la catalase chez les souris C57BL/6J et ob/ob. Cette augmentation a ainsi permis un rétablissement de l'expression de ces enzymes chez les souris hypercholestérolémiques à un niveau proche de celui observé chez les animaux témoins.

Le traitement à la pravastatine, n'a pas permis de réduire le taux de cholestérol que ce soit dans le plasma ou dans les cellules cardiaques. Toutefois, le caractère cardioprotecteur de cette molécule a déjà été démontré en absence d'effet sur la cholestérolémie et ne serait que partiellement causé par son action au niveau lipidique (Chen et al., 2003). Ainsi la régulation du cholestérol dans la mitochondrie par la pravastatine au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique passerait par un effet direct sur la mitochondrie. Maheshwari et al. (2013) ont montré que différentes statines sont capables d'induire une diminution du stress oxydant associée à la restauration de l'activité d'enzymes anti-oxydantes comme la SOD1 et la catalase. L'inhibition de l'accumulation d'oxystérols mitochondriaux lors de la reperfusion du myocarde causée par la pravastatine pourrait ainsi être liée à cette diminution du stress oxydant et faire intervenir des mécanismes similaires au protocole d'exercice physique régulier.

Ces résultats confirment que cibler les mécanismes à l'origine de l'accumulation de cholestérol mitochondrial, et ainsi d'oxystérols, lors de la reperfusion du myocarde ischémique représente une stratégie cardioprotectrice intéressante et ce notamment en cas

d'hypercholestérolémie. Ces mécanismes sont toutefois méconnus et la suite de notre travail a consisté à les étudier.

2. Mécanismes à l'origine de l'accumulation du cholestérol mitochondrial lors de la reperfusion du myocarde ischémique

La régulation du cholestérol mitochondrial est le résultat de la balance entre l'entrée et le catabolisme du cholestérol dans la mitochondrie. La dégradation du cholestérol dans la mitochondrie est principalement causée par deux cytochromes présents au niveau de sa membrane interne, le CYP11A1 et le CYP27A1 (Midzak et Papadopoulos, 2016). Nos résultats montrent clairement que ces deux enzymes sont très faiblement exprimées dans le cœur, et que l'ischémie-reperfusion du myocarde n'influe pas sur leur expression à la fois protéique et en ARNm. Nous avons aussi mesuré l'activité du CYP11A1 qui, de manière cohérente avec l'expression de l'enzyme, est bien plus importante dans le testicule que dans le cœur. Cette activité du CYP11A1 dans le cœur n'est pas non plus modifiée par l'ischémie-reperfusion. Ces résultats permettent de justifier l'absence de prégnénone observée lors du dosage des stérols dans la mitochondrie cardiaque.

L'évaluation de l'implication du catabolisme du cholestérol mitochondrial sur son accumulation lors de la reperfusion du myocarde nécessite de mesurer l'activité du CYP27A1, cela par un protocole en cours de mise au point avec l'équipe « Electrochimie et Synthèse Organique » de l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est. La très faible expression du CYP27A1 dans le cœur suggère toutefois qu'une altération de son activité ne devrait avoir que peu d'impact sur la concentration de cholestérol mitochondrial. Nous avons cependant observé la présence de 27-hydroxycholestérol dans les mitochondries cardiaques. Celui-ci pourrait ne pas résulter d'une synthèse au sein de la mitochondrie mais plutôt d'une diffusion du composé depuis la circulation sanguine, la polarité des oxystérols leur permettant un transfert plus rapide à travers les membranes que celui du cholestérol (Olkkonen et Hynynen, 2009).

L'accumulation du cholestérol ne semblant pas découler d'une détérioration de son catabolisme, nous nous sommes intéressés aux principales protéines impliquées dans son transfert à travers la membrane mitochondriale, TSPO et StAR. Nos résultats montrent que les expressions protéique et en ARNm de TSPO ne sont pas altérés au cours de l'ischémie-reperfusion du myocarde ce qui confirme des résultats antérieurs du laboratoire (Obame et al.,

2007). En revanche, la reperfusion provoque une augmentation importante de l'isoforme de 27 kDa de la protéine StAR dans l'organite. Cette augmentation n'est pas observée après l'ischémie du myocarde, mais est causée par la reperfusion. Ceci est cohérent avec le comportement du cholestérol qui n'augmente dans la mitochondrie qu'après reperfusion et est même diminué par l'ischémie (Paradis et al., 2013). Cette baisse du cholestérol peut s'expliquer par le besoin en oxygène de différentes étapes de sa synthèse dans la cellule (DeBose-Boyd, 2008), qui ne peuvent reprendre qu'à la reperfusion du tissu.

L'ischémie-reperfusion myocardique est aussi responsable d'une augmentation du cholestérol cytosolique qui pourrait induire l'activation de la protéine StAR pour permettre leur translocation dans la mitochondrie (Roostae et al., 2008). Cette augmentation de la protéine StAR dans la mitochondrie s'accompagne d'une diminution importante de l'expression des ARNm de la protéine. Ceci corrobore les résultats des travaux de Diemer et al. (2009) qui ont montré dans des cellules de Leydig que l'expression protéique de StAR, toutes isoformes confondues, et de ses ARNm est inhibée par les EROs qui sont produits en grande quantité au cours de l'ischémie reperfusion myocardique.

Nous nous sommes donc intéressés à la protéine StAR, dont la régulation de l'activité est un processus rapide qui assure un contrôle de la stéroïdogénèse (Bose et al., 2002), et à l'évolution de la répartition de ses différentes isoformes (de 37, 32 et 27 kDa) entre le cytosol et la mitochondrie, un processus non décrit dans le cœur à ce jour. Nous avons mis en évidence que l'ischémie-reperfusion myocardique provoque une diminution de l'isoforme de 37 kDa de la protéine dans le cytosol. Celle-ci correspond à la protéine native avant les modifications post-traductionnelles nécessaires à son activité. En effet, afin de permettre l'entrée de cholestérol dans la mitochondrie, la protéine StAR est transloquée au niveau de la membrane mitochondriale où elle est clivée et phosphorylée par PKA, formant une protéine de 32 kDa active assurant le transfert du cholestérol dans la mitochondrie. C'est tout du moins le mécanisme décrit dans les cellules stéroïdogéniques (Anuka et al., 2013a). L'augmentation du cholestérol mitochondrial suggère une activation de la protéine et une augmentation de cette isoforme de la protéine au niveau de la mitochondrie. De façon surprenante, celle-ci diminue dans les mitochondries après 15 minutes de reperfusion du myocarde. Ce résultat peut s'expliquer par une activité rapide de la protéine qui est internalisée dans la mitochondrie après clivage en une isoforme inactive (27 kDa), ainsi que par la diminution de la forme native de la protéine qui n'est pas renouvelée suite à la diminution de la production de ses ARNm.

Enfin, nous avons observé une augmentation dans le cytosol de l'isoforme de 27 kDa à la suite de l'ischémie-reperfusion du myocarde, bien que celle-ci soit formée et stockée dans la mitochondrie. Ce transfert de la protéine dans le cytosol pourrait résulter de la perméabilisation mitochondriale induite par la reperfusion du myocarde, qui libère alors la protéine dans la cellule.

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que la protéine StAR pourrait jouer un rôle central dans l'accumulation du cholestérol mitochondrial à la reperfusion du myocarde ischémique. De plus, outre le cholestérol, la protéine StAR permet le transfert d'hydroperoxyde de cholestérol qui a des propriétés pro-oxydantes et est un précurseur de certains oxystérols (Korytowski et al., 2014). L'activité de la protéine peut donc aussi participer à l'accumulation des oxystérols au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique.

L'étude de l'effet des traitements pharmacologiques cardioprotecteurs, par le 4'-chlorodiazépam et la pravastatine, avec lesquels nous avons montré une inhibition de l'accumulation des stérols dans la mitochondrie, nous a permis de conforter cette hypothèse. En effet, le traitement des animaux avec ces deux composés provoque une inhibition de l'apparition de l'isoforme de 27 kDa de la protéine StAR dans la mitochondrie à la reperfusion du myocarde. Il y a donc corrélation entre l'effet cardioprotecteur assuré par ces deux composés et l'inhibition de l'expression de la protéine StAR au niveau mitochondrial conduisant à l'inhibition de l'accumulation de cholestérol mitochondrial, ainsi qu'à celle des oxystérols. L'effet du 4'-chlorodiazépam suggère par ailleurs qu'il existe une action combinée des protéines TSPO et StAR pour véhiculer le cholestérol dans la mitochondrie cardiaque lors de la reperfusion. Ce mécanisme est cohérent avec le modèle hypothétique actuel du transfert du cholestérol à travers la membrane mitochondriale qui est décrit dans d'autres cellules et qui fait intervenir un complexe protéique appelé « transducéosome » comprenant notamment ces deux protéines (Papadopoulos et al., 2015).

La diminution de l'expression mitochondriale de la protéine StAR sous l'effet de la pravastatine pourrait expliquer la diminution des stérols et oxystérols mitochondriaux qu'elle provoque à la reperfusion. Le cholestérol accumulé dans la cellule ne pourrait alors pas entrer dans la mitochondrie faute de translocation de StAR. En revanche, le mécanisme par lequel le traitement par la pravastatine limite l'expression mitochondriale de l'isoforme de 27 kDa de la protéine StAR est inconnu. La dose de pravastatine utilisée et la durée du traitement ne modifient pas la concentration cytosolique du cholestérol en condition basale, mais elle induit une diminution partielle mais significative de la concentration du cholestérol dans le cytosol à

la reperfusion. On peut imaginer que cette diminution est suffisante pour entraîner une réduction de la translocation de la protéine StAR bien que cette réduction apparaisse proportionnellement plus importante que celle du cholestérol.

Comme évoqué précédemment, si l'effet inhibiteur de la pravastatine sur l'accumulation mitochondriale de cholestérol et d'oxystérols peut contribuer à son effet cardioprotecteur, d'autres mécanismes ont été évoqués. Thuc et al. (2010) ont montré que la pravastatine provoque une faible production d'EROs qui active la catalase et inhibe le pic de stress oxydant lors de l'ischémie-reperfusion cardiaque. Ce mécanisme passe par une activation NO-dépendante de la PKC (Bao et al., 2007). Dans les cellules de Leydig, l'activation de la PKC induit une augmentation de l'expression de la protéine StAR (Manna et al., 2010) alors que nos résultats indiquent que le traitement des rats par la pravastatine, au contraire, provoque une diminution de l'isoforme de 27kDa de la protéine StAR dans les mitochondries issues de cœurs témoins mais aussi après ischémie-reperfusion. Il est à noter que l'étude de la régulation de la protéine StAR a principalement été effectuée dans des organes stéroïdogéniques du fait de son rôle dans la régulation des hormones stéroïdiennes. Les mécanismes régulant la protéine StAR dans d'autres organes, tels que le cœur, pourraient différer de ceux décrits jusqu'ici. Par ailleurs, ces études s'intéressent à l'expression globale de StAR dans la cellule et non pas à la localisation de ses isoformes dans les différents compartiments cellulaires.

A l'inverse de nos résultats, Anuka et al. (2013b) ont montré qu'une ischémie cardiaque prolongée (3 jours) chez la souris augmente fortement l'expression de StAR dans le cœur ce qui protège les fibroblastes du phénomène d'apoptose. Ces résultats sont cohérents avec ceux d'une étude antérieure montrant que l'expression en ARNm codant StAR est fortement augmentée chez l'homme suite à une insuffisance cardiaque prolongée (Young et al., 2001). Cependant le contexte expérimental (ischémie prolongée sans reperfusion) est bien différent du notre, ce qui laisse entrevoir deux rôles différents de la protéine StAR en fonction du stress appliqué et de sa durée : délétère dans les premières minutes de la reperfusion d'un myocarde ayant subi une ischémie de courte durée mais bénéfique à plus long terme.

Conclusion et perspectives :

Lors d'une ischémie myocardique, une reperfusion aussi rapide que possible du tissu ischémié est primordiale à sa survie, mais provoque paradoxalement l'apparition de lésions supplémentaires. Les mécanismes à l'origine de ces « lésions de reperfusion » restent méconnus mais impliquent clairement la mitochondrie dont on sait qu'elle subit une perméabilisation de sa membrane causée par l'ouverture du mPTP, libérant des facteurs pro-apoptotiques dans la cellule.

Au cours de ce projet de thèse, nous avons tout d'abord confirmé que la reperfusion du myocarde ischémié provoque une accumulation de cholestérol et d'oxystérols dans la mitochondrie. Cette accumulation en oxystérols mitochondriaux pourrait être impliquée dans les lésions de reperfusion comme l'indique l'effet toxique de certains de ces composés observé à fortes concentrations en présence de cardiomyocytes isolés. Par ailleurs, nos travaux montrent qu'il existe une relation entre la capacité de stratégies (statines, exercice physique, ligand de la protéine TSPO) visant à inhiber l'accumulation de cholestérol et d'oxystérols, et l'effet cardioprotecteur qu'elles provoquent sans que nous ayons pu démontrer une relation de « cause à effet » entre les deux processus, ce qui représente une limite de notre étude.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes responsables de cette accumulation. Celle-ci n'est pas causée par la diminution du catabolisme du cholestérol mitochondrial mais par une augmentation importante de son entrée dans l'organite. Ce transfert du cholestérol est assuré par la protéine StAR suite à sa translocation du cytosol à la mitochondrie. L'activation de cette protéine est un processus rapide qui provoque une diminution importante de son isoforme active de 32 kDa, ainsi que de son précurseur de 37 kDa, dans les minutes qui suivent le début de la reperfusion. La diminution de ces isoformes de la protéine StAR au cours de la reperfusion découle de l'internalisation de la protéine dans la mitochondrie associée à la chute des ARNm codant pour celle-ci, ce qui limiterait alors le transfert du cholestérol dans l'organite et donc la genèse d'oxystérols.

Inhiber l'activité de la protéine StAR dans les premiers instants de la reperfusion pourrait donc représenter une stratégie encourageante dans la protection du myocarde ischémié. Elle serait notamment intéressante en cas d'association à des facteurs de comorbidité tels que l'hypercholestérolémie qui s'accompagne d'une diminution de

l'efficacité de nombreuses stratégies cardioprotectrices et d'une augmentation des oxystérols plasmatiques et cellulaires liées à un stress oxydant plus important. En effet, nous avons observé que l'utilisation de stratégies qui limitent la production des oxystérols permet de protéger les mitochondries cardiaques au cours de la reperfusion dans des modèles animaux hypercholestérolémiques.

Dans la suite de ce travail, il sera important de confirmer l'implication de la protéine StAR dans l'accumulation des stérols mitochondriaux, ainsi que dans le développement des lésions de reperfusion. Il sera intéressant en particulier d'observer l'effet de l'inhibition de l'expression de la protéine StAR au niveau du myocarde au cours d'un épisode d'ischémie-reperfusion, notamment grâce à de petits ARN interférents spécifiques des ARNm codant pour cette protéine. Une diminution de l'expression de StAR devrait engendrer une moindre accumulation du cholestérol, une réduction de la production d'oxystérols et permettre une protection du tissu ischémié.

Par ailleurs l'inhibition de la translocation de la protéine StAR par le 4'-chlorodiazépam est un résultat intéressant qui suggère que la protéine TSPO contrôle cette translocation au cours de la reperfusion du myocarde ischémié. L'entrée massive du cholestérol dans l'organite se ferait donc par l'action conjointe des protéines StAR et TSPO au niveau du transducéosome. Il sera donc important de déterminer si la délétion de la protéine TSPO induit un effet sur l'activité de la protéine StAR. Pour ce faire, le laboratoire dispose d'animaux n'exprimant pas la protéine TSPO et qui permettront d'observer l'expression des différentes isoformes de la protéine StAR dans la mitochondrie et le cytosol au cours de la reperfusion du myocarde dans ce modèle. D'autre part, l'effet inhibiteur du 4'-chlorodiazépam sur l'augmentation du cholestérol et des oxystérols mitochondriaux lors de la reperfusion pourrait ne pas se limiter à son action sur la translocation de la protéine StAR vers la mitochondrie, aussi serait-il intéressant de vérifier si la cardioprotection assurée par cette molécule ne fait pas intervenir un autre effet, notamment un effet antioxydant.

Communications et congrès

Ces travaux ont fait l'objet de présentations lors de différents congrès :

- The TSPO ligand 4'chlorodiazepam inhibits mitochondrial sterol accumulation and protects mitochondrial function in hypercholesterolemic ZDF rats during myocardial ischemia-reperfusion.

Musman J, Paradis S, Pons S, Panel M, Caccia C, Leoni V, Berdeaux A, Ghaleh B, Morin D.
Poster commenté pour le congrès du printemps de la cardiologie, Nantes, avril 2017.
Prix poster.

- The inhibition of HMG-CoA reductase protects mitochondria against myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing mitochondrial cholesterol accumulation.

Musman J, Pons S, Eychenne N, Barau C, Leoni V, Caccia C, Berdeaux A, Ghaleh B, Morin D.

Poster commenté pour le congrès annuel de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Nancy, avril 2016.

- L'accumulation de cholestérol dans la mitochondrie après ischémie-reperfusion myocardique est associée à la translocation de StAR au niveau mitochondrial.

Musman J, Pons S, Barau C, Caccia C, Leoni V, Berdeaux A, Ghaleh B, Morin D.

Communication orale pour le congrès du printemps de la cardiologie, Dijon, avril 2016.

- The accumulation of cholesterol in the mitochondria after myocardial ischemia-reperfusion is associated with a mitochondrial translocation of StAR.

Musman J, Pons S, Barau C, Caccia C, Leoni V, Berdeaux A, Ghaleh B, Morin D.

Poster commenté pour le congrès du printemps de la cardiologie, Dijon, avril 2016.

- Reduction of mitochondrial cholesterol accumulation by HMG-CoA reductase inhibition protects mitochondria against myocardial ischemia-reperfusion injury.

Musman J, Eychenne N, Barau C, Leoni V, Caccia C, Pons S, Berdeaux A, Ghaleh B, Morin D.

Poster commenté pour le congrès du printemps de la cardiologie, Toulouse, avril 2015.

Références bibliographiques

Aesøy R, Mellgren G, Morohashi K, Lund J. Activation of cAMP-dependent protein kinase increases the protein level of steroidogenic factor-1. *Endocrinology* 2002;143:295-303.

Aghamohammadzadeh R, Unwin RD, Greenstein AS, Heagerty AM. Effects of Obesity on Perivascular Adipose Tissue Vasorelaxant Function: Nitric Oxide, Inflammation and Elevated Systemic Blood Pressure. *J Vasc Res* 2015;52:299-305.

Akar FG, Aon MA, Tomaselli GF, O'Rourke B. The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *J Clin Invest* 2005 115:3527-35.

Alegria JR, Miller TD, Gibbons RJ, Yi QL, Yusuf S; Collaborative Organization of RheothRx Evaluation (CORE) Trial Investigators. Infarct size, ejection fraction, and mortality in diabetic patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy. *Am Heart J* 2007;154:743-50.

Allen DG, Xiao XH. Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 2003;57:934-41.

Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004;303:1201-4.

Andreadou I, Farmakis D, Prokavas E, Sigala F, Zoga A, Spyridaki K, Papalois A, Papapetropoulos A, Anastasiou-Nana M, Kremastinos DT, Iliodromitis EK. Short-term statin administration in hypercholesterolaemic rabbits resistant to postconditioning: effects on infarct size, endothelial nitric oxide synthase, and nitro-oxidative stress. *Cardiovasc Res* 2012;94:501-9.

Anuka E, Gal M, Stocco DM, Orly J. Expression and roles of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in 'non-classical', extra-adrenal and extra-gonadal cells and tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2013a;371:47-61.

Anuka E, Yivgi-Ohana N, Eimerl S, Garfinkel B, Melamed-Book N, Chepurkol E, Aravot D, Zinman T, Shainberg A, Hochhauser E, Orly J. Infarct-induced steroidogenic acute regulatory protein: a survival role in cardiac fibroblasts. *Mol Endocrinol* 2013b;27:1502-17.

Arakane F, Sugawara T, Nishino H, Liu Z, Holt JA, Pain D, Stocco DM, Miller WL, Strauss JF 3rd. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: implications for the mechanism of StAR action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13731-6.

Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, Stocco DM, Strauss JF 3rd. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem* 1997;272:32656-62.

Arca M, Natoli S, Micheletta F, Riggi S, Di Angelantonio E, Montali A, Antonini TM, Antonini R, Diczfalusy U, Iuliano L. Increased plasma levels of oxysterols, in vivo markers of oxidative stress, in patients with familial combined hyperlipidemia: reduction during atorvastatin and fenofibrate therapy. *Free Radic Biol Med* 2007;42:698-705.

Armstrong SC. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004;61:427-36.

Artemenko IP, Zhao D, Hales DB, Hales KH, Jefcoate CR. Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. *J Biol Chem* 2001;276:46583-96.

Aupeix K, Weltin D, Mejia JE, Christ M, Marchal J, Freyssinet JM, Bischoff P. Oxysterol-induced apoptosis in human monocytic cell lines. *Immunobiology* 1995;194:415-28.

Auten RL, Davis JM. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr Res* 2009;66:121-7.

Avelar E, Cloward TV, Walker JM, Farney RJ, Strong M, Pendleton RC, Segerson N, Adams TD, Gress RE, Hunt SC, Litwin SE. Left ventricular hypertrophy in severe obesity: interactions among blood pressure, nocturnal hypoxemia, and body mass. *Hypertension* 2007;49:34-9.

Babu PS, Bavers DL, Beuschlein F, Shah S, Jeffs B, Jameson JL, Hammer GD. Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. *Endocrinology* 2002;143:665-73.

Bae SH, Paik YK. Cholesterol biosynthesis from lanosterol: development of a novel assay method and characterization of rat liver microsomal lanosterol delta 24-reductase. *Biochem J* 1997;326:609-16.

Badimon L, Vilahur G. LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1254:18-32.

Bao N, Minatoguchi S, Kobayashi H, Yasuda S, Kawamura I, Iwasa M, Yamaki T, Sumi S, Misao Y, Arai M, Nishigaki K, Takemura G, Fujiwara T, Fujiwara H. Pravastatin reduces myocardial infarct size via increasing protein kinase C-dependent nitric oxide, decreasing oxyradicals and opening the mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in rabbits. *Circ J* 2007;71:1622-8.

Barau C, Ghaleh B, Berdeaux A, Morin D. Cytochrome P450 and myocardial ischemia: potential pharmacological implication for cardioprotection. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015;29:1-9.

Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 2005;280:18558-61.

Bauer V, Sotníková R. Nitric oxide--the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *Gen Physiol Biophys* 2010;29:319-40.

Benhabbouche S, Crola da Silva C, Abrial M, Ferrera R. The basis of ischemia-reperfusion and myocardial protection. *Ann Fr Anesth Reanim* 2011;30:S2-16.

Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* 2014;114:1852-66.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Section 26.2, Cholesterol Is Synthesized from Acetyl Coenzyme A in Three Stages. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22350/>

Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2015;78:100-6.

Bernardi P, Rasola A, Forte M, Lippe G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol Rev* 2015;95:1111-55.

Biasi F, Leonarduzzi G, Vizio B, Zanetti D, Sevanian A, Sottero B, Verde V, Zingaro B, Chiarotto E, Poli G. Oxysterol mixtures prevent proapoptotic effects of 7-ketocholesterol in macrophages: implications for proatherogenic gene modulation. *FASEB J*. 2004;18:693-5.

Björkhem I, Diczfalusy U. Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:734-42.

Bloch K. The biological synthesis of cholesterol. *Science* 1965;150:19-28.

Bogan RL, Davis TL, Niswender GD. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) aggregation and absence of steroidogenic acute regulatory protein (StAR)/PBR association in the mitochondrial membrane as determined by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;104:61-7.

Bose HS, Sato S, Aisenberg J, Shalev SA, Matsuo N, Miller WL. Mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in six patients with congenital lipid adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3636-9.

Bose HS, Lingappa VR, Miller WL. Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import. *Nature* 2002;417:87-91.

Bose M, Whittal RM, Miller WL, Bose HS. Steroidogenic activity of StAR requires contact with mitochondrial VDAC1 and phosphate carrier protein. *J Biol Chem* 2008;283:8837-45.

Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME, Abel ED. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* 2005;112:2686-95.

Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:3805-9.

Brown AJ, Leong SL, Dean RT, Jessup W. 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J Lipid Res* 1997;38:1730-45.

Brown DA, Jew KN, Sparagna GC, Musch TI, Moore RL. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *J Appl Physiol* 2003;95:2510-8.

Brzeska M, Szymczyk K, Szterk A. Current Knowledge about Oxysterols: A Review. *J Food Sci* 2016;81:R2299-R2308.

Brown DA, Jew KN, Sparagna GC, Musch TI, Moore RL. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *J Appl Physiol* 2003;95:2510-8.

Burelle Y, Wambolt RB, Grist M, Parsons HL, Chow JC, Antler C, Bonen A, Keller A, Dunaway GA, Popov KM, Hochachka PW, Allard MF. Regular exercise is associated with a protective metabolic phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H1055-63.

Caron KM, Soo SC, Wetsel WC, Stocco DM, Clark BJ, Parker KL. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11540-5.

Casal AJ, Silvestre JS, Delcayre C, Capponi AM. Expression and modulation of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in rat cardiocytes and after myocardial infarction. *Endocrinology*. 2003;144:1861-8.

Casellas P, Galiegue S, Basile AS. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int* 2002;40:475-86.

Cerqueira NM, Oliveira EF, Gesto DS, Santos-Martins D, Moreira C, Moorthy HN, Ramos MJ, Fernandes PA. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry* 2016;55:5483-5506.

- Charney R, Cohen M. The role of the coronary collateral circulation in limiting myocardial ischemia and infarct size. *Am Heart J* 1993;126:937-45.
- Chalubinski M, Zemanek K, Skowron W, Wojdan K, Gorzelak P, Broncel M. The effect of 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol on the integrity of the human aortic endothelial and intestinal epithelial barriers. *Inflamm Res* 2013;62:1015-23.
- Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:2281-9.
- Chen J, Nagasawa Y, Zhu BM, Ohmori M, Harada K, Fujimura A, Hashimoto K. Pravastatin prevents arrhythmias induced by coronary artery ischemia/reperfusion in anesthetized normocholesterolemic rats. *J Pharmacol Sci* 2003;93:87-94.
- Cheng D, Jenner AM, Shui G, Cheong WF, Mitchell TW, Nealon JR, Kim WS, McCann H, Wenk MR, Halliday GM, Garner B. Lipid pathway alterations in Parkinson's disease primary visual cortex. *PLoS One* 2011;6:e17299.
- Choudhry Z, Rikani AA, Choudhry AM, Tariq S, Zakaria F, Asghar MW, Sarfraz MK, Haider K, Shafiq AA, Mobassarrah NJ. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Ann Neurosci*. 2014;21:28-31.
- Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 1994;269:28314-22.
- Clarke PR, Hardie DG. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver 1990;9:2439-46.
- Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sangliferin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* 2002;277:34793-9.
- Cleary J, Johnson KM, Opiari AW Jr, Glick GD. Inhibition of the mitochondrial F1F0-ATPase by ligands of the peripheral benzodiazepine receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17:1667-70.
- Cohen DE. Balancing cholesterol synthesis and absorption in the gastrointestinal tract. *J Clin Lipidol*. 2008;2:S1-3.
- Colell A, García-Ruiz C, Lluís JM, Coll O, Mari M, Fernández-Checa JC. Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. *J Biol Chem* 2003;278:33928-35.

Conley KE. Mitochondria to motion: optimizing oxidative phosphorylation to improve exercise performance. *J Exp Biol*. 2016;219:243-9.

Cooper AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 1997;38:2173-92.

Cooper GM. *The Cell: The Mechanism of Oxidative Phosphorylation. A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9885/>

Corcoran RB, Scott MP. Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8408-13.

Crompton M, Costi A, Hayat L. Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J* 1987;245:915-8.

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999;341:233-49.

Cross HR, Lu L, Steenbergen C, Philipson KD, Murphy E. Overexpression of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger increases susceptibility to ischemia/reperfusion injury in male, but not female, transgenic mice. *Circ Res* 1998;83:1215-23.

Csont T, Szilvássy Z, Fülöp F, Nedeianu S, Páli T, Tosaki A, Dux L, Ferdinandy P. Direct myocardial anti-ischaemic effect of GTN in both nitrate-tolerant and nontolerant rats: a cyclic GMP-independent activation of KATP. *Br J Pharmacol* 1999;128:1427-34.

Cung TT, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, Bonnefoy-Cudraz E, Guérin P, Elbaz M, Delarche N, Coste P, Vanzetto G, Metge M, Aupetit JF, Jouve B, Motreff P, Tron C, Labeque JN, Steg PG, Cottin Y, Range G, Clerc J, Claeys MJ, Coussement P, Prunier F, Moulin F, Roth O, Belle L, Dubois P, Barragan P, Gilard M, Piot C, Colin P, De Poli F, Morice MC, Ider O, Dubois-Randé JL, Untersee T, Le Breton H, Béard T, Blanchard D, Grollier G, Malquarti V, Staat P, Sudre A, Elmer E, Hansson MJ, Bergerot C, Boussaha I, Jossan C, Derumeaux G, Mewton N, Ovize M. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2015;373:1021-31.

Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1994;94:437-44.

Davies LP, Huston V. Peripheral benzodiazepine binding sites in heart and their interaction with dipyridamole. *Eur J Pharmacol* 1981;73:209-11.

Davis HR Jr, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 2004;279:33586-92.

- De Meyer SF, Saychenko AS, Haas MS, Schatzberg D, Carroll MC, Schiviz A, Dietrich B, Rottensteiner H, Scheiflinger F, Wagner DD. Protective anti-inflammatory effect of ADAMTS13 on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood*. 2012;120:5217-23.
- DeBose-Boyd RA. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res* 2008;18:609-21.
- Delavoie F, Li H, Hardwick M, Robert JC, Giatzakis C, Péranski G, Yao ZX, Maccario J, Lacapère JJ, Papadopoulos V. In vivo and in vitro peripheral-type benzodiazepine receptor polymerization: functional significance in drug ligand and cholesterol binding. *Biochemistry* 2003;42:4506-19.
- Delewi R, Zijlstra F, Piek JJ. Left ventricular thrombus formation after acute myocardial infarction. *Heart* 2012;98:1743-9.
- Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*. 2006;116:561-70.
- Di Lisa F, Carpi A, Giorgio V, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:1316-22.
- Diemer T, Allen JA, Hales KH, Hales DB. Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and steroidogenesis. *Endocrinology* 2003;144:2882-91.
- Doria M, Maugest L, Moreau T, Lizard G, Vejux A. Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 2016;101:393-400.
- Dugas B, Charbonnier S, Baarine M, Ragot K, Delmas D, Ménétrier F, Lherminier J, Malvitte L, Khalfaoui T, Bron A, Creuzot-Garcher C, Latruffe N, Lizard G. Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. *Eur J Nutr* 2010;49:435-46.
- DuSell CD, McDonnell DP. 27-Hydroxycholesterol: a potential endogenous regulator of estrogen receptor signaling. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:510-4.
- Dutta P, Courties G, Wei Y, Leuschner F, Gorbатов R, Robbins CS, Iwamoto Y, Thompson B, Carlson AL, Heidt T, Majmudar MD, Lasitschka F, Eitzrodt M, Waterman P, Waring MT, Chicoine AT, van der Laan AM, Niessen HW, Piek JJ, Rubin BB, Butany J, Stone JR, Katus HA, Murphy SA, Morrow DA, Sabatine MS, Vinegoni C, Moskowitz MA, Pittet MJ, Libby P, Lin CP, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* 2012;487:325-9.
- Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusy U. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1995;225:73-80.

Ebrahim Z, Yellon DM, Baxter GF. Ischemic preconditioning is lost in aging hypertensive rat heart: independent effects of aging and longstanding hypertension. *Exp Gerontol* 2007;42:807-14.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495-516.

Elustondo P, Martin LA, Karten B. Mitochondrial cholesterol import. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1862:90-101.

Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 2010;375:2215-22.

Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. [Updated 2015 Jun 10]. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>

Ferguson JJ. Protein synthesis and adrenocorticotropin responsiveness. *J Biol Chem* 1963;238:2754-9.

Field FJ, Born E, Mathur SN. Stanol esters decrease plasma cholesterol independently of intestinal ABC sterol transporters and Niemann-Pick C1-like 1 protein gene expression. *J Lipid Res* 2004;45:2252-9.

Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol* 2014;11:255-65.

Fransson E, De Faire U, Ahlbom A, Reuterwall C, Hallqvist J, Alfredsson L. The risk of acute myocardial infarction: interactions of types of physical activity. *Epidemiology* 2004;15:573-82.

Fujita M, Asanuma H, Hirata A, Wakeno M, Takahama H, Sasaki H, Kim J, Takashima S, Tsukamoto O, Minamino T, Shinozaki Y, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H2004-8.

Funk SD, Yurdagul A Jr, Orr AW. Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: lessons from type 1 diabetes. *Int J Vasc Med* 2012;2012:569654.

Gabriel P. Infarctus du myocarde. Dossier INSERM U-698 mai 2013.

Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inseste J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res* 2012;94:168-80.

- Gargiulo S, Testa G, Gamba P, Staurengi E, Poli G, Leonarduzzi G. Oxysterols and 4-hydroxy-2-nonenal contribute to atherosclerotic plaque destabilization. *Free Radic Biol Med* 2017. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.037.
- Gehlert DR, Yamamura HI, Wamsley JK. Autoradiographic localization of "peripheral-type" benzodiazepine binding sites in the rat brain, heart and kidney. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1985;328:454-60.
- Goldstein JA, Demetriou D, Grines CL, Pica M, Shoukfeh M, O'Neill WW. Multiple complex coronary plaques in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2000;343:915-22.
- Golino P, Maroko PR, Carew TE. The effect of acute hypercholesterolemia on myocardial infarct size and the no-reflow phenomenon during coronary occlusion-reperfusion. *Circulation* 1987;75:292-8.
- Goller T, Seibold UK, Kremmer E, Voos W, Kolanus W. Atad3 function is essential for early post-implantation development in the mouse. *PLoS One* 2013;8:e54799.
- Görbe A, Varga ZV, Kupai K, Bencsik P, Kocsis GF, Csont T, Boengler K, Schulz R, Ferdinandy P. Cholesterol diet leads to attenuation of ischemic preconditioning-induced cardiac protection: the role of connexin 43. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300:H1907-13.
- Gutiérrez-Aguilar M, Baines CP. Structural mechanisms of cyclophilin D-dependent control of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta* 2015;1850:2041-7.
- Gramajo AL, Zacharias LC, Neekhara A, Luthra S, Atilano SR, Chwa M, Brown DJ, Kuppermann BD, Kenney MC. Mitochondrial DNA damage induced by 7-ketocholesterol in human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:1164-70.
- Greevenbroek MMJ, Bruin TWA. Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 1998;141:S9-S16.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000;86:494-501.
- Griffin CE, Kaye AM, Bueno FR, Kaye AD. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner J* 2013;13:214-23.
- Gritsopoulos G, Iliodromitis EK, Zoga A, Farmakis D, Demerouti E, Papalois A, Paraskevaidis IA, Kremastinos DT. Remote postconditioning is more potent than classic postconditioning in reducing the infarct size in anesthetized rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23:193-8.

Grouleff J, Irudayam SJ, Skeby KK, Schiott B. The influence of cholesterol on membrane protein structure, function, and dynamics studied by molecular dynamics simulations. *Biochim Biophys Acta* 2015;1848:1783-95.

Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 1992;70:223-33.

Grover GJ, Atwal KS, Sleph PG, Wang FL, Monshizadegan H, Monticello T, Green DW. Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F1F0-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1747-55.

Grundey SM. Does dietary cholesterol matter? *Curr Atheroscler Rep* 2016;18:68.

Halestrap AP, Pasdois P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1787:1402-15.

Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans* 2010;38:841-60.

Hansson MJ, Llwyd O, Morin D, de Paulis D, Arnoux T, Gouarné C, Koul S, Engblom H, Bordet T, Tissier R, Arheden H, Erlinge D, Halestrap AP, Berdeaux A, Pruss RM, Schaller S. Differences in the profile of protection afforded by TRO40303 and mild hypothermia in models of cardiac ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2015;760:7-19.

Hasegawa T, Zhao L, Caron KM, Majdic G, Suzuki T, Shizawa S, Sasano H, Parker KL. Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knock-out mice. *Mol Endocrinol* 2000;14:1462-71.

Hassouna A, Loubani M, Matata BM, Fowler A, Standen NB, Galiñanes M. Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocardium. *Cardiovasc Res* 2006;69:450-8.

Hatano M, Migita T, Ohishi T, Shima Y, Ogawa Y, Morohashi KI, Hasegawa Y, Shibasaki F. SF-1 deficiency causes lipid accumulation in Leydig cells via suppression of STAR and CYP11A1. *Endocrine* 2016;54:484-496.

Hauet T, Yao ZX, Bose HS, Wall CT, Han Z, Li W, Hales DB, Miller WL, Culty M, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. *Mol Endocrinol* 2005;19:540-54.

Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H971-6.

Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev* 2007;12:217-34.

Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* 2008;79:377-86.

Hayashi T, Su TP. Cholesterol at the endoplasmic reticulum: roles of the sigma-1 receptor chaperone and implications thereof in human diseases. *Subcell Biochem.* 2010;51:381-98.

Hayden JM, Brachova L, Higgins K, Obermiller L, Sevanian A, Khandrika S, Reaven PD. Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol. *J Lipid Res* 2002;43:26-35.

He F, Li J, Liu Z, Chuang CC, Yang W, Zuo L. Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Exercise. *Front Physiol* 2016;7:486.

Heverin M, Bogdanovic N, Lütjohann D, Bayer T, Pikuleva I, Bretillon L, Diczfalusy U, Winblad B, Björkhem I. Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 2004;45:186-93.

Hong C, Tontonoz P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:433-44.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109:1125–1131.

Hoshida S, Nishida M, Yamashita N, Igarashi J, Hori M, Kamada T, Kuzuya T, Tada M. Amelioration of severity of myocardial injury by a nitric oxide donor in rabbits fed a cholesterol-rich diet. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:902-9.

Hu CP, Peng J, Xiao L, Ye F, Deng HW, Li YJ. Effect of age on alpha-calcitonin gene-related peptide-mediated delayed cardioprotection induced by intestinal preconditioning in rats. *Regul Pept* 2002;107:137-43.

Hua F, Ha T, Ma J, Li Y, Kelley J, Gao X, Browder IW, Kao RL, Williams DL, Li C. Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in TLR4-deficient mice is mediated through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J Immunol* 2007;178:7317-24.

Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol* 2014;25:200-6.

Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:125-38.

Iliodromitis EK, Zoga A, Vrettou A, Andreadou I, Paraskevaïdis IA, Kaklamanis L, Kremastinos DT. The effectiveness of postconditioning and preconditioning on infarct size in hypercholesterolemic and normal anesthetized rabbits. *Atherosclerosis* 2006;188:356-62.

- Iliodromitis EK, Lazou A, Kremastinos DT. Ischemic preconditioning: protection against myocardial necrosis and apoptosis. *Vasc Health Risk Manag* 2007;3:629-37.
- Imahashi K, Pott C, Goldhaber JI, Steenbergen C, Philipson KD, Murphy E. Cardiac-specific ablation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 2005;97:916-21.
- Inserte J, Barba I, Hernando V, Abellán A, Ruiz-Meana M, Rodríguez-Sinovas A, Garcia-Dorado D. Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage. *Cardiovasc Res* 2008;77:782-90.
- Issop L, Fan J, Lee S, Rone MB, Basu K, Mui J, Papadopoulos V. Mitochondria-associated membrane formation in hormone-stimulated Leydig cell steroidogenesis: role of ATAD3. *Endocrinology*. 2015;156:334-45.
- Jahangir A, Sagar S, Terzic A. Aging and cardioprotection. *J Appl Physiol* 2007;103:2120-8.
- Jakobsson T, Treuter E, Gustafsson JÅ, Steffensen KR. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol Sci* 2012;33:394-404.
- Jamin N, Neumann JM, Ostuni MA, Vu TK, Yao ZX, Murail S, Robert JC, Giatzakis C, Papadopoulos V, Lacapère JJ. Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol Endocrinol* 2005;19:588-94.
- Jo Y, King SR, Khan SA, Stocco DM. Involvement of protein kinase C and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent kinase in steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid biosynthesis in Leydig cells. *Biol Reprod*. 2005;73:244-55.
- Johnson KM, Chen X, Boitano A, Swenson L, Opiari AW Jr, Glick GD. Identification and validation of the mitochondrial F1F0-ATPase as the molecular target of the immunomodulatory benzodiazepine Bz-423. *Chem Biol* 2005;12:485-96.
- Jusakul A, Yongvanit P, Loilome W, Namwat N, Kuver R. Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis. *Lipids Health Dis* 2011;10:44.
- Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol* 2014;2:702-14.
- Kandutsch AA, Russell AE. Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol. *J Biol Chem* 1960;235:2256-61.
- Kandutsch AA, Chen HW. Inhibition of cholesterol synthesis by oxygenated sterols. *Lipids* 1978;13:704-7.

Kanno S, Lee PC, Zhang Y, Ho C, Griffith BP, Shears LL 2nd, Billiar TR. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. *Circulation* 2000;101:2742-8.

Kassiotis C, Rajabi M, Taegtmeyer H. Metabolic reserve of the heart: the forgotten link between contraction and coronary flow. *Prog Cardiovasc Dis* 2008;51:74-88.

Katakam PV, Jordan JE, Snipes JA, Tulbert CD, Miller AW, Busija DW. Myocardial preconditioning against ischemia-reperfusion injury is abolished in Zucker obese rats with insulin resistance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292:R920-6.

Kayes-Wandover KM, White PC. Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2519-25.

Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* 2003;361:13-20.

Kersten JR, Montgomery MW, Ghassemi T, Gross ER, Toller WG, Pagel PS, Warltier DC. Diabetes and hyperglycemia impair activation of mitochondrial K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1744-50.

Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 2004;427:461-5.

Korach-André M, Gustafsson JÅ. Liver X receptors as regulators of metabolism. *Biomol Concepts*. 2015;6:177-90.

Korytowski W, Wawak K, Pabisz P, Schmitt JC, Girotti AW. Macrophage mitochondrial damage from StAR transport of 7-hydroperoxycholesterol: implications for oxidative stress-impaired reverse cholesterol transport. *FEBS Lett* 2014;588:65-70.

Krauskopf A, Eriksson O, Craigen WJ, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:590-5.

Krisans SK. Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci* 1996;804:142-64.

Kupai K, Csonka C, Fekete V, Odendaal L, van Rooyen J, Marais de W, Csont T, Ferdinandy P. Cholesterol diet-induced hyperlipidemia impairs the cardioprotective effect of postconditioning: role of peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H1729-35.

Kyriakides ZS, Psychari S, Iliodromitis EK, Kolettis TM, Sbarouni E, Kremastinos DT. Hyperlipidemia prevents the expected reduction of myocardial ischemia on repeated balloon inflations during angioplasty. *Chest* 2002;121:1211-5.

- Kyrle PA, Eichinger S. Deep vein thrombosis. *Lancet* 2005;365:1163-74.
- Lacapère JJ, Delavoie F, Li H, Péranzi G, Maccario J, Papadopoulos V, Vidic B. Structural and functional study of reconstituted peripheral benzodiazepine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:536-41.
- Lappano R, Recchia AG, De Francesco EM, Angelone T, Cerra MC, Picard D, Maggiolini M. The cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol activates estrogen receptor α -mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes. *PLoS One* 2011;6:e16631.
- Larsson DA, Baird S, Nyhalah JD, Yuan XM, Li W. Oxysterol mixtures, in atheroma-relevant proportions, display synergistic and proapoptotic effects. *Free Radic Biol Med* 2006;41:902-10.
- Larsson H, Böttiger Y, Iuliano L, Diczfalusy U. In vivo interconversion of 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol, potential surrogate markers for oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2007;43:695-701.
- Laughlin MH, Bowles DK, Duncker DJ. The coronary circulation in exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302:H10-23.
- Leducq N, Bono F, Sulpice T, Vin V, Janiak P, Fur GL, O'Connor SE, Herbert JM. Role of peripheral benzodiazepine receptors in mitochondrial, cellular, and cardiac damage induced by oxidative stress and ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:828-37.
- Lee TM, Su SF, Chou TF, Lee YT, Tsai CH. Loss of preconditioning by attenuated activation of myocardial ATP-sensitive potassium channels in elderly patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 2002;105:334-40.
- Lee TM, Chou TF. Impairment of myocardial protection in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:531-7.
- Lee Y, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, Smuder AJ, Willis WT, Powers SK. Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia-reperfusion injury. *Med Sci Sports Exerc* 2012;44:397-405.
- Lemaire S, Lizard G, Monier S, Miguet C, Gueldry S, Volot F, Gambert P, Néel D. Different patterns of IL-1 β secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7 α -, 7 β -hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. *FEBS Lett* 1998;440:434-9.
- Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, Corcos L, Gambert P, Néel D, Lizard G. Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol* 2005;21:97-114.
- Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E, Poli G. Trojan horse-like behavior of a biologically representative mixture of oxysterols. *Mol Aspects Med* 2004;25:155-67.

Leoni V, Strittmatter L, Zorzi G, Zibordi F, Dusi S, Garavaglia B, Venco P, Caccia C, Souza AL, Deik A, Clish CB, Rimoldi M, Ciusani E, Bertini E, Nardocci N, Mootha VK, Tiranti V. Metabolic consequences of mitochondrial coenzyme A deficiency in patients with PANK2 mutations. *Mol Genet Metab* 2012;105:463-71.

Leoni V, Nury T, Vejux A, Zarrouk A, Caccia C, Debbabi M, Fromont A, Sghaier R, Moreau T, Lizard G. Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α -tocopherol: Impacts on the cellular profil of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, cholesterol and cholesterol precursors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017;169:96-110.

Li H, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology* 1998;139:4991-7.

Li X, Hylemon P, Pandak WM, Ren S. Enzyme activity assay for cholesterol 27-hydroxylase in mitochondria. *J Lipid Res* 2006;47:1507-12.

Li SJ, Wu YN, Kang Y, Yin YQ, Gao WZ, Liu YX, Lou JS. Noninvasive limb ischemic preconditioning protects against myocardial I/R injury in rats. *J Surg Res* 2010a;164:162-8.

Li J, Xiao J, Liang D, Zhang H, Zhang G, Liu Y, Zhang Y, Liu Y, Yu Z, Yan B, Jiang B, Li F, Peng L, Zhou ZN, Chen YH. Inhibition of mitochondrial translocator protein prevents atrial fibrillation. *Eur J Pharmacol* 2010b;632:60-4.

Li F, Liu J, Zheng Y, Garavito RM, Ferguson-Miller S. Protein structure. Crystal structures of translocator protein (TSPO) and mutant mimic of a human polymorphism. *Science* 2015;347:555-8.

Lin MC, Gordon D, Wetterau JR. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: insulin negatively regulates MTP gene expression. *J Lipid Res*. 1995;36:1073-81.

Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2008;36:1-9.

Lorbek G, Lewinska M, Rozman D. Cytochrome P450s in the synthesis of cholesterol and bile acids--from mouse models to human diseases. *FEBS J* 2012 May;279:1516-33.

Lordan S, Mackrill JJ, O'Brien NM. Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. *J Nutr Biochem* 2009;20:321-36.

Lucken-Ardjomande S, Montessuit S, Martinou JC. Bax activation and stress-induced apoptosis delayed by the accumulation of cholesterol in mitochondrial membranes. *Cell Death Differ* 2008;15:484-93.

Ludman A, Venugopal V, Yellon DM, Hausenloy DJ. Statins and cardioprotection--more than just lipid lowering? *Pharmacol Ther* 2009;122:30-43.

Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2011;121:2111-7.

Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Sidén A, Diczfalusy U, Björkhem I. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9799-804.

Lyons MA, Brown AJ. Metabolism of an oxysterol, 7-ketocholesterol, by sterol 27-hydroxylase in HepG2 cells. *Lipids* 2001;36:701-11.

Maheshwari RA, Sailor GU, Patel L, Balaraman R. Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity by statins. *Indian J Pharmacol* 2013;45:354-8.

Maloberti P, Castilla R, Castillo F, Cornejo Maciel F, Mendez CF, Paz C, Podestá EJ. Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis. *FEBS J* 2005;272:1804-14.

Manna PR, Soh JW, Stocco DM. The involvement of specific PKC isoenzymes in phorbol ester-mediated regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid synthesis in mouse Leydig cells. *Endocrinology* 2011;152:313-25.

Martínez-Abundis E, Correa F, Pavón N, Zazueta C. Bax distribution into mitochondrial detergent-resistant microdomains is related to ceramide and cholesterol content in postischemic hearts. *FEBS J* 2009;276:5579-88.

McConkey DJ. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett.* 1998 Nov 12;99(3):157-68.

McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3170-4.

McFarland AJ, Anoopkumar-Dukie S, Arora DS, Grant GD, McDermott CM, Perkins AV, Davey AK. Molecular mechanisms underlying the effects of statins in the central nervous system. *Int J Mol Sci* 2014;15:20607-37.

Meaney S, Bodin K, Diczfalusy U, Björkhem I. On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation: critical importance of the position of the oxygen function. *J Lipid Res* 2002;43:2130-5.

Messaoudi S, Azibani F, Delcayre C, Jaisser F. Aldosterone, mineralocorticoid receptor, and heart failure. *Mol Cell Endocrinol* 2012;350:266-72.

Mestre M, Bouetard G, Uzan A, Gueremy C, Renault C, Dubroeuq MC, Le Fur G. PK 11195, an antagonist of peripheral benzodiazepine receptors, reduces ventricular arrhythmias during myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Eur J Pharmacol* 1985;112:257-60.

Midzak A, Papadopoulos V. Adrenal Mitochondria and Steroidogenesis: From Individual Proteins to Functional Protein Assemblies. *Front Endocrinol* 2016;7:106.

Miller WL, Bose HS. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J Lipid Res* 2011;52:2111-35.

Mitić T, Shave S, Semjonous N, McNae I, Cobice DF, Lavery GG, Webster SP, Hadoke PW, Walker BR, Andrew R. 11β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 contributes to the balance between 7-keto- and 7-hydroxy-oxysterols in vivo. *Biochem Pharmacol* 2013;86:146-53.

Mitsche MA, McDonald JG, Hobbs HH, Cohen JC. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. *Elife* 2015;4:e07999.

Montero J, Morales A, Llacuna L, Lluís JM, Terrones O, Basañez G, Antonsson B, Prieto J, García-Ruiz C, Colell A, Fernández-Checa JC. Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:5246-56.

Morohaku K, Pelton SH, Daugherty DJ, Butler WR, Deng W, Selvaraj V. Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis. *Endocrinology* 2014;155:89-97.

Muntean DM, Sturza A, Dănilă MD, Borza C, Duicu OM, Mornoș C. The Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Injury and Protective Strategies. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:8254942.

Murphy RC, Johnson KM. Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators. *J Biol Chem* 2008;283:15521-5.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.

Musman J, Paradis S, Panel M, Pons S, Barau C, Caccia C, Leoni V, Ghaleh B, Morin D. A TSPO ligand prevents mitochondrial sterol accumulation and dysfunction during myocardial ischemia-reperfusion in hypercholesterolemic rats. *Biochemical Pharmacology* 2017; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2017.06.125>.

Mutemberezi V, Guillemot-Legris O, Muccioli GG. Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators. *Prog Lipid Res* 2016;64:152-169.

Nadkarni SK, Bouma BE, de Boer J, Tearney GJ. Evaluation of collagen in atherosclerotic plaques: the use of two coherent laser-based imaging methods. *Lasers Med Sci* 2009;24:439-45.

Nelson RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Prim Care* 2013;40:195-211.

Nguyen LT, Rebecchi MJ, Moore LC, Glass PS, Brink PR, Liu L. Attenuation of isoflurane-induced preconditioning and reactive oxygen species production in the senescent rat heart. *Anesth Analg* 2008;107:776-82.

Niccoli G, Scalone G, Crea F. Acute myocardial infarction with no obstructive coronary atherosclerosis: mechanisms and management. *Eur Heart J*. 2015;36:475-81.

Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J* 2014;35:2950-9.

Obame FN, Zini R, Souktani R, Berdeaux A, Morin D. Peripheral benzodiazepine receptor-induced myocardial protection is mediated by inhibition of mitochondrial membrane permeabilization. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;323:336-45.

Ohtsuka M, Takano H, Suzuki M, Zou Y, Akazawa H, Tamagawa M, Wakimoto K, Nakaya H, Komuro I. Role of Na⁺-Ca²⁺ exchanger in myocardial ischemia/reperfusion injury: evaluation using a heterozygous Na⁺-Ca²⁺ exchanger knockout mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:849-53.

Olkkonen VM, Hynynen R. Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Mol Aspects Med* 2009;30:123-33.

Orchard TJ, Costacou T, Kretowski A, Nesto RW. Type 1 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes Care* 2006;29:2528-38.

Osborne JA, Lento PH, Siegfried MR, Stahl GL, Fusman B, Lefer AM. Cardiovascular effects of acute hypercholesterolemia in rabbits. Reversal with lovastatin treatment. *Clin Invest* 1989;83:465-73.

Osipov RM, Bianchi C, Feng J, Clements RT, Liu Y, Robich MP, Glazer HP, Sodha NR, Sellke FW. Effect of hypercholesterolemia on myocardial necrosis and apoptosis in the setting of ischemia-reperfusion. *Circulation* 2009;120:S22-30.

Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr Rev* 1993;14:222-40.

Papadopoulos V, Amri H, Boujrad N, Cascio C, Culty M, Garnier M, Hardwick M, Li H, Vidic B, Brown AS, Reversa JL, Bernassau JM, Drieu K. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids* 1997;62:21-8.

Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapère JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:402-9.

Papadopoulos V. On the role of the translocator protein (18-kDa) TSPO in steroid hormone biosynthesis. *Endocrinology* 2014;155:15-20.

Papadopoulos V, Aghazadeh Y, Fan J, Campioli E, Zirkin B, Midzak A. Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2015;408:90-8.

Paradis S, Leoni V, Caccia C, Berdeaux A, Morin D. Cardioprotection by the TSPO ligand 4'-chlorodiazepam is associated with inhibition of mitochondrial accumulation of cholesterol at reperfusion. *Cardiovasc Res* 2013;98:420-7.

Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D. A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:1046-50.

Pell VR, Chouchani ET, Murphy MP, Brookes PS, Krieg T. Moving Forwards by Blocking Back-Flow: The Yin and Yang of MI Therapy. *Circ Res* 2016;118:898-906.

Perales S, Alejandre MJ, Palomino-Morales R, Torres C, Iglesias J, Linares A. Effect of oxysterol-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells on experimental hypercholesterolemia. *J Biomed Biotechnol* 2009;2009:456208.

Petrescu AD, Gallegos AM, Okamura Y, Strauss JF 3rd, Schroeder F. Steroidogenic acute regulatory protein binds cholesterol and modulates mitochondrial membrane sterol domain dynamics. *J Biol Chem* 2001;276:36970-82.

Poli G, Sottero B, Gargiulo S, Leonarduzzi G. Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. *Mol Aspects Med* 2009;30:180-9.

Poli G, Biasi F, Leonarduzzi G. Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biol* 2013;1:125-30.

Pons S, Martin V, Portal L, Zini R, Morin D, Berdeaux A, Ghaleh B. Regular treadmill exercise restores cardioprotective signaling pathways in obese mice independently from improvement in associated co-morbidities. *J Mol Cell Cardiol* 2013;54:82-9.

Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 2008;88:1243-76.

Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Quindry JC. Mechanisms of exercise-induced cardioprotection. *Physiology (Bethesda)* 2014;29:27-38.

Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993;87:893-9.

Przyklenk K, Maynard M, Darling CE, Whittaker P. Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with post-conditioning. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1393-8.

- Qian T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997;273:C1783-92.
- Qiao X, Xu J, Yang QJ, Du Y, Lei S, Liu ZH, Liu X, Liu H. Transient acidosis during early reperfusion attenuates myocardium ischemia reperfusion injury via PI3k-Akt-eNOS signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:126083.
- Radhakrishnan A, Ikeda Y, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6511-8.
- Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther* 2012;133:230-55.
- Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:459-81.
- Ribichini F, Ferrero V, Wijns W. Reperfusion treatment of ST-elevation acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis*. 2004 Sep-Oct;47(2):131-57.
- Rodríguez IR, Larrayoz IM. Cholesterol oxidation in the retina: implications of 7KCh formation in chronic inflammation and age-related macular degeneration. *J Lipid Res* 2010;51:2847-62.
- Rone MB, Liu J, Blonder J, Ye X, Veenstra TD, Young JC, Papadopoulos V. Targeting and insertion of the cholesterol-binding translocator protein into the outer mitochondrial membrane. *Biochemistry*. 2009a;48:6909-20.
- Rone MB, Fan J, Papadopoulos V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta* 2009b;1791:646-58.
- Rone MB, Midzak AS, Issop L, Rammouz G, Jagannathan S, Fan J, Ye X, Blonder J, Veenstra T, Papadopoulos V. Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. *Mol Endocrinol* 2012;26:1868-82.
- Roostae A, Barbar E, Lehoux JG, Lavigne P. Cholesterol binding is a prerequisite for the activity of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *Biochem J* 2008;412:553-62.
- Rosca AM, Matei C, Dragan E, Burlacu A. Cardiomyocyte apoptosis in ischaemia-reperfusion due to the exogenous oxidants at the time of reperfusion. *Cell Biol Int* 2012;36:1207-15.

Rosenblat M, Aviram M. Oxysterol-induced activation of macrophage NADPH-oxidase enhances cell-mediated oxidation of LDL in the atherosclerotic apolipoprotein E deficient mouse: inhibitory role for vitamin E. *Atherosclerosis* 2002;160:69-80.

Rosenson RS, Brewer HB Jr, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, Hellerstein M, Jiang XC, Phillips MC, Rader DJ, Remaley AT, Rothblat GH, Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*. 2012;125:1905-19.

Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G, Baghai TC, Fan J, Akula N, Groyer G, Adams D, Schumacher M. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2010:971-88.

Ryan L, O'Callaghan YC, O'Brien NM. The role of the mitochondria in apoptosis induced by 7beta-hydroxycholesterol and cholesterol-5beta,6beta-epoxide. *Br J Nutr* 2005;94:519-25.

Schaller S, Paradis S, Ngoh GA, Assaly R, Buisson B, Drouot C, Ostuni MA, Lacapere JJ, Bassissi F, Bordet T, Berdeaux A, Jones SP, Morin D, Pruss RM. TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;333:696-706.

Schaper J, Meiser E, Stämmler G. Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. *Circ Res* 1985;56:377-91.

Schulman D, Latchman DS, Yellon DM. Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1630-6.

Selvaraj V, Stocco DM, Tu LN. Minireview: translocator protein (TSPO) and steroidogenesis: a reappraisal. *Mol Endocrinol* 2015;29:490-501.

Sesso HD, Paffenbarger RS Jr, Lee IM. Physical activity and coronary heart disease in men: The Harvard Alumni Health Study. *Circulation* 2000;102:975-80.

Shanmuganathan S, Hausenloy DJ, Duchen MR, Yellon DM. Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H237-42.

Sharov VG, Todor A, Khanal S, Imai M, Sabbah HN. Cyclosporine A attenuates mitochondrial permeability transition and improves mitochondrial respiratory function in cardiomyocytes isolated from dogs with heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:150-8.

Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301-7.

Šileikytė J, Blachly-Dyson E, Sewell R, Carpi A, Menabò R, Di Lisa F, Ricchelli F, Bernardi P, Forte M. Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by the outer membrane does not involve the peripheral benzodiazepine receptor (Translocator Protein of 18 kDa (TSPO)). *J Biol Chem* 2014;289:13769-81.

Silvestre JS, Heymes C, Oubénaïssa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, Swynghedauw B, Delcayre C. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation* 1999;99:2694-701.

Simpson D, Unkefer C, Whaley T, Marrone B. A mechanism-based fluorogenic probe for the cytochrome P-450 cholesterol side chain cleavage enzyme. *J Org Chem* 1991;56:5391-6.

Shafaati M, Marutle A, Pettersson H, Lövgren-Sandblom A, Olin M, Pikuleva I, Winblad B, Nordberg A, Björkhem I. Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in the brains of Alzheimer's patients with the Swedish APP 670/671 mutation. *J Lipid Res* 2011;52:1004-10.

Sniecinski R, Liu H. Reduced efficacy of volatile anesthetic preconditioning with advanced age in isolated rat myocardium. *Anesthesiology* 2004;100:589-97.

Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J* 2005;390:377-94.

Song Y, Kenworthy AK, Sanders CR. Cholesterol as a co-solvent and a ligand for membrane proteins. *Protein Sci* 2013;23:1-22.

Stenstrand U, Wallentin L; Swedish Register of Cardiac Intensive Care (RIKS-HIA). Early statin treatment following acute myocardial infarction and 1-year survival. *JAMA* 2001;285:430-6.

Stocco DM, Sodeman TC. The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *J Biol Chem* 1991;266:19731-8.

Stølen TO, Høydal MA, Kemi OJ, Catalucci D, Ceci M, Aasum E, Larsen T, Rolim N, Condorelli G, Smith GL, Wisløff U. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Circ Res* 2009;105:527-36.

Sudhop T, Reber M, Tribble D, Sapre A, Taggart W, Gibbons P, et al. Changes in cholesterol absorption and cholesterol synthesis caused by ezetimibe and/or simvastatin in men. *J Lipid Res* 2009;50:2117-23.

Sugawara T, Saito M, Fujimoto S. Sp1 and SF-1 interact and cooperate in the regulation of human steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *Endocrinology* 2000;141:2895-903.

Surinkaew S, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Roles of mitochondrial benzodiazepine receptor in the heart. *Can J Cardiol* 2011;262:e3-13.

Szilvassy Z, Ferdinandy P, Szilvassy J, Nagy I, Karcsu S, Lonovics J, Dux L, Koltai M. The loss of pacing-induced preconditioning in atherosclerotic rabbits: role of hypercholesterolaemia. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:2559-69.

Tamareille S, Mateus V, Ghaboura N, Jeanneteau J, Croué A, Henrion D, Furber A, Prunier F. RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res Cardiol* 2011;106:1329-39.

Tamasawa N, Tamasawa A, Takebe K, Hayakari M. The effect of dietary 7-ketocholesterol, inhibitor of sterol synthesis, on hepatic microsomal cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity in rat. *Biochim Biophys Acta* 1994;1214:20-6.

Tanasescu M, Leitzmann MF, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. Exercise type and intensity in relation to coronary heart disease in men. *JAMA* 2002;288:1994-2000.

Tang XL, Stein AB, Shirk G, Bolli R. Hypercholesterolemia blunts NO donor-induced late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Basic Res Cardiol* 2004;99:395-403.

Thibault H, Piot C, Ovize M. Postconditioning in man. *Heart Fail Rev.* 2007;12:245-8.

Thuc LC, Teshima Y, Takahashi N, Nagano-Torigoe Y, Ezaki K, Yufu K, Nakagawa M, Hara M, Saikawa T. Mitochondrial K(ATP) channels-derived reactive oxygen species activate pro-survival pathway in pravastatin-induced cardioprotection. *Apoptosis* 2010;15:669-78.

Tissier R, Cohen MV, Downey JM. Does mild hypothermia protect against reperfusion injury? The debate continues. *Basic Res Cardiol* 2011;106:691-5.

Tissier R, Ghaleh B, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A. Myocardial protection with mild hypothermia. *Cardiovasc Res* 2012;94:217-25.

Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Carr RD, Yellon DM. Preconditioning the diabetic heart: the importance of Akt phosphorylation. *Diabetes* 2005;54:2360-4.

Tsukagoshi E, Kawaguchi M, Shinomiya T, Yoshikawa M, Kawano T, Okubo M, Sawaki K. Diazepam enhances production of diazepam-binding inhibitor (DBI), a negative saliva secretion regulator, localized in rat salivary gland. *J Pharmacol Sci* 2011;115:221-9.

Tu LN, Morohaku K, Manna PR, Pelton SH, Butler WR, Stocco DM, Selvaraj V. Peripheral benzodiazepine receptor/translocator protein global knock-out mice are viable with no effects on steroid hormone biosynthesis. *J Biol Chem.* 2014;289:27444-54.

Tu LN, Zhao AH, Stocco DM, Selvaraj V. PK11195 effect on steroidogenesis is not mediated through the translocator protein (TSPO). *Endocrinology* 2015;156:1033-9.

Umetani M, Domoto H, Gormley AK, Yuhanna IS, Cummins CL, Javitt NB, Korach KS, Shaul PW, Mangelsdorf DJ. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nat Med* 2007;13:1185-92.

Umetani M, Ghosh P, Ishikawa T, Umetani J, Ahmed M, Mineo C, Shaul PW. The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol promotes atherosclerosis via proinflammatory processes mediated by estrogen receptor alpha. *Cell Metab* 2014;20:172-82.

Ungi I, Ungi T, Ruzsa Z, Nagy E, Zimmermann Z, Csont T, Ferdinandy P. Hypercholesterolemia attenuates the anti-ischemic effect of preconditioning during coronary angioplasty. *Chest* 2005;128:1623-8.

Vance JE. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta* 2014;1841:595-609.

Vander Heide RS, Steenbergen C. Cardioprotection and myocardial reperfusion: pitfalls to clinical application. *Circ Res* 2013;113:464-77.

Vasan RS. Cardiac function and obesity. *Heart* 2003;89:1127-9.

Veenman L, Gavish M. The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implications for drug development. *Pharmacol Ther*. 2006 Jun;110:503-24.

Vejux A, Malvitte L, Lizard G. Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Braz J Med Biol Res* 2008;41:545-56.

Vejux A, Lizard G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol Aspects Med* 2009;30:153-70.

Vinnakota KC, Bassingthwaighe JB. Myocardial density and composition: a basis for calculating intracellular metabolite concentrations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1742-9.

Wagner C, Kloeting I, Strasser RH, Weinbrenner C. Cardioprotection by postconditioning is lost in WOKW rats with metabolic syndrome: role of glycogen synthase kinase 3beta. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;52:430-7.

Walters AM1, Porter GA Jr, Brookes PS. Mitochondria as a drug target in ischemic heart disease and cardiomyopathy. *Circ Res*. 2012 12;111:1222-36.

Wang W, Wang S, Yan L, Madara P, Del Pilar Cintron A, Wesley RA, Danner RL. Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2000;275:16899-903.

Wang DQ. Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol* 2007;69:221-48.

Wang Y, Rogers PM, Su C, Varga G, Stayrook KR, Burris TP. Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. *J Biol Chem* 2008;283:26332-9.

Wang HJ, Fan J, Papadopoulos V. Translocator protein (Tspo) gene promoter-driven green fluorescent protein synthesis in transgenic mice: an in vivo model to study Tspo transcription. *Cell Tissue Res* 2012;350:261-75.

Wang J, Mitsche MA, Lütjohann D, Cohen JC, Xie XS, Hobbs HH. Relative roles of ABCG5/ABCG8 in liver and intestine. *J Lipid Res* 2015;56 :319-30.

Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ* 2006;174:801-9.

Wee CC, Girotra S, Weinstein AR, Mittleman MA, Mukamal KJ. The relationship between obesity and atherosclerotic progression and prognosis among patients with coronary artery bypass grafts the effect of aggressive statin therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:620-5.

Wei G, Guan Y, Yin Y, Duan J, Zhou D, Zhu Y, Quan W, Xi M, Wen A. Anti-inflammatory effect of protocatechuic aldehyde on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro. *Inflammation* 2013;36:592-602.

Weinbrenner C, Liu GS, Downey JM, Cohen MV. Cyclosporine A limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Cardiovasc Res* 1998;38:676-84.

Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sárváry L, Strasser RH. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovasc Res* 2002;55:590-601.

West LA, Horvat RD, Roess DA, Barisas BG, Juengel JL, Niswender GD. Steroidogenic acute regulatory protein and peripheral-type benzodiazepine receptor associate at the mitochondrial membrane. *Endocrinology* 2001;142:502-5.

White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction. *Lancet* 2008;372:570-84.

Yang X, Liu Y, Yang XM, Hu F, Cui L, Swingle MR, Honkanen RE, Soltani P, Tissier R, Cohen MV, Downey JM. Cardioprotection by mild hypothermia during ischemia involves preservation of ERK activity. *Basic Res Cardiol* 2011;106:421-30.

Yaniv Y, Juhaszova M, Nuss HB, Wang S, Zorov DB, Lakatta EG, Sollott SJ. Matching ATP supply and demand in mammalian heart: in vivo, in vitro, and in silico perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1188:133-42.

Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007;357:1121-35.

Young MJ, Clyne CD, Cole TJ, Funder JW. Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001a;86:5121-6.

- Young MJ, Lyons MA, Brown AJ. Metabolism of an oxysterol, 7-ketocholesterol, by sterol 27-hydroxylase in HepG2 cells. *Lipids* 2001b;36:701-11.
- Yu L, Bharadwaj S, Brown JM, Ma Y, Du W, Davis MA, et al. Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J Biol Chem* 2006;281:6616-24.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, Lang CC, Rumboldt Z, Onen CL, Lisheng L, Tanomsup S, Wangai P Jr, Razak F, Sharma AM, Anand SS; INTERHEART Study Investigators. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 2005;366:1640-9.
- Zairis MN, Lyras AG, Makrygiannis SS, Psarogianni PK, Adamopoulou EN, Handanis SM, Papantonakos A, Argyrakis SK, Prekates AA, Foussas SG. Type 2 diabetes and intravenous thrombolysis outcome in the setting of ST elevation myocardial infarction. *Diabetes Care* 2004;27:967-71.
- Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:67-71.
- Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature* 1997;390:311-5.
- Zhang X, Song Y, Feng M, Zhou X, Lu Y, Gao L, Yu C, Jiang X, Zhao J. Thyroid-stimulating hormone decreases HMG-CoA reductase phosphorylation via AMP-activated protein kinase in the liver. *J Lipid Res* 2015;56:963-71.
- Zhang ZW, Li H, Chen SS, Li Y, Cui ZY, Ma J. MicroRNA-122 regulates caspase-8 and promotes the apoptosis of mouse cardiomyocytes. *Braz J Med Biol Res* 2017;50:e5760.
- Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2002 Aug 15;55(3):438-55.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Aug;285(2):H579-88.
- Zhao C, Dahlman-Wright K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol* 2010;204:233-40.
- Zhu J, Su X, Li G, Chen J, Tang B, Yang Y. The incidence of acute myocardial infarction in relation to overweight and obesity: a meta-analysis. *Arch Med Sci* 2014;10:855-62.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:509-17.

L'accumulation du cholestérol et des oxystérols mitochondriaux lors de la reperfusion du myocarde ischémié : mécanismes et implication dans la cardioprotection

Résumé

L'infarctus du myocarde représente un problème de santé publique dont le traitement de choix consiste à restaurer le flux sanguin (reperfusion) à travers le tissu ischémié dans les plus brefs délais, cependant cette procédure s'accompagne de lésions supplémentaires dont les mécanismes ne sont pas totalement connus. Notre laboratoire a observé que la reperfusion du myocarde s'accompagne d'une accumulation de cholestérol et d'oxystérols dans les mitochondries qui sont impliquées dans l'apparition de ces lésions. L'objectif de ce projet de thèse a donc été d'identifier les mécanismes responsables de cette accumulation. L'utilisation de stratégies cardioprotectrices (statines, exercice physique, ligand de la protéine translocatrice (TSPO)), visant à réduire la concentration cellulaire ou mitochondriale de cholestérol ou le stress oxydant, a tout d'abord permis de mettre en évidence une relation entre l'effet cardioprotecteur et l'inhibition de l'accumulation des stérols mitochondriaux. Cette relation persiste en présence d'une hypercholestérolémie. Par ailleurs, nous avons montré que l'accumulation mitochondriale de cholestérol et d'oxystérols est due à la translocation de la protéine StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*) du cytosol à la mitochondrie dans les premières minutes de la reperfusion et que ce phénomène est modulé par le TSPO. L'inhibition de l'expression mitochondriale de la protéine StAR pourrait représenter une stratégie intéressante afin de protéger le myocarde ischémié de la reperfusion et ce notamment en cas d'hypercholestérolémie.

Abstract

Myocardial infarction represents a serious public health issue which requires the restoration of the blood flow (reperfusion) in the ischemic tissue as soon as possible; however cardiac reperfusion also induces additional injuries whose mechanisms are not completely established. Our laboratory showed that myocardial infarction induces the accumulation of cholesterol and oxysterols in the mitochondria which are involved in the induction of reperfusion injury. The objective of this thesis project was to identify the mechanisms responsible for this accumulation. The use of cardioprotective strategies (statin, physical exercise, translocator protein (TSPO) ligand), aiming at reducing the cellular and mitochondrial cholesterol concentrations or the oxidative stress, showed the relation between the cardioprotective effect and the inhibition of the mitochondrial sterol accumulation. This relation persists in hypercholesterolemic animals. Furthermore, we showed that the mitochondrial cholesterol and oxysterol accumulation is caused by the translocation of StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) from cytosol to mitochondria during the first minutes of the reperfusion and this phenomenon is regulated by the TSPO. The inhibition of the mitochondrial expression of StAR could be an interesting approach in order to protect the ischemic myocardium from reperfusion injury, especially in a hypercholesterolemic context.

Mots clés :

Cardioprotection, mitochondrie, cholestérol, oxystérols, Steroidogenic Acute Regulatory protein, protéine translocatrice.

Laboratoire de rattachement :

Institut Mondor de Recherche Biomédicale
INSERM U 955, Equipe 03
Faculté de Médecine de Créteil
Université Paris-Est Créteil
8 Rue du Général Sarrail
94010 Créteil

Spécialité :

Biologie cellulaire et moléculaire

**UNIVERSITE PARIS-EST
61 Avenue du Général de Gaulle
94010 Créteil**