



HAL
open science

Étude de l'effet de nouveaux ligands de la cyclophiline D sur le pore de transition de perméabilité mitochondrial et de leur effet protecteur

Mathieu Panel

► To cite this version:

Mathieu Panel. Étude de l'effet de nouveaux ligands de la cyclophiline D sur le pore de transition de perméabilité mitochondrial et de leur effet protecteur. Pharmacologie. Université Paris-Saclay, 2018. Français. NNT : 2018SACLS490 . tel-02387678

HAL Id: tel-02387678

<https://theses.hal.science/tel-02387678v1>

Submitted on 30 Nov 2019

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.

Etude de l'effet de nouveaux ligands de la cyclophiline D sur le pore de transition de perméabilité mitochondrial et de leur effet protecteur.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique : du fondamental à
l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat: Sciences Pharmacologiques

Thèse présentée et soutenue à Créteil, le 21 novembre 2018, par

Mathieu Panel

Composition du Jury :

Alain Berdeaux Professeur émérite, Université Paris-Est, Créteil	Président
Catherine Vergely Professeur, Université de Bourgogne, Dijon	Rapporteur
Denis Angoulvant Professeur, Université François Rabelais, Tours	Rapporteur
Véronique Leblais Professeur, Université Paris-Saclay, Chatenay-Malabry	Examineur
Catherine Brenner Directeur de recherche CNRS, Université Paris-Saclay, Chatenay-Malabry	Examineur
Didier Morin Directeur de recherche CNRS, Université Paris-Est, Créteil	Directeur de thèse

*A mon père,
dont le cœur n'aura pas subi les lésions de reperfusion.*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le **Professeur Alain Berdeaux**, qui m'a accueilli dans son équipe lors de mes premiers stages en laboratoire et qui m'a fait confiance dès le début de ce projet.

Je tiens également à remercier le **Professeur Bijan Ghaleh** dont la rigueur scientifique, les précieux conseils et les encouragements réguliers m'ont permis d'avancer dans ce projet de thèse et dans mon projet professionnel.

Pour sa participation à mon comité de suivi de thèse et pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, je remercie vivement le **Professeur Catherine Vergely**.

Pour avoir accepté de juger ce travail, je remercie le **Professeur Denis Angoultant**.

Je remercie le **Professeur Véronique Leblais** et le **Docteur Catherine Brenner** pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le **Docteur Hakim Ahmed-Belkacem** qui m'a fourni les précieux inhibiteurs de cyclophilines, qui a accepté d'examiner ce travail et avec qui ce fut un plaisir de travailler tout au long de cette thèse.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux au **Docteur Didier Morin** dont la disponibilité, l'écoute, la constance et la bienveillance m'ont permis de travailler chaque jour dans les meilleures conditions.

Pour m'avoir permis de réaliser cette dernière année de thèse en temps qu'ATER à l'ISBS mais aussi pour son agréable compagnie lors des dissociations de cardiomyocytes, je tiens à remercier le **Docteur Alexandra d'Anglemont de Tassigny**.

Merci également au **Docteur Leeyah Issop-Merlen** pour son énergie et sa bonne humeur communicatives, au **Docteur Sandrine Pons** pour sa bienveillance et aux autres membres de l'équipe 3, notamment ceux de l'Ecole Vétérinaire, que j'ai vus moins souvent mais dont la compagnie est toujours sympathique.

Je remercie les anciens membres de l'équipe 3, le **Docteur Julien Musman**, **Jérémie Borneres**, le **Docteur Cindy Gueguen** et le **Docteur Benjamin Hass** pour les bons moments passés dans le cadre professionnel mais aussi extra-professionnel. Mes remerciements tous particuliers à Jérémie pour le temps qu'il a consacré à me transmettre les techniques de chirurgie (et de brassage).

Pour ces longues mais passionnantes heures passées ensemble sur le modèle chirurgical d'ischémie-reperfusion hépatique, je tiens à remercier le **Docteur Isaac Ruiz**.

Je remercie également les stagiaires ayant participé à ce projet et plus particulièrement **Juliette Bréhat** pour avoir réalisé les expériences ingrates d'hypoxie-réoxygénation et pour sa mauvaise foi légendaire. C'est également l'occasion de remercier les autres étudiants qui sont

passés parmi nous, notamment cette année : **Shirin, Laura, Fatou** et **Adrien** qui ont contribué à la bonne ambiance du bureau des étudiants durant ces derniers mois.

Je remercie également les agents des plateformes de l'IMRB et plus particulièrement **Virginie Fournier** pour s'être occupé de mes animaux. Pour leur gentillesse et leur efficacité, je souhaite remercier **Sandrine Bonizec** et **Julia Di Donato**.

Pour les moments de détente salvateurs que nous avons pu partager, je remercie mes amis rencontrés au cours de mes études de Pharmacie : les anciens du LaboPhoto Pharma Paris V et les autres, Victorien, Pierre, Guillaume, Maxime, Thomas, Smail et Simon.

Enfin, je remercie toute ma famille, mes grands parents, oncles, tante et cousines pour leur soutien indéfectible tout au long de ce travail. A ma mère, qui m'a transmis le goût de l'effort et de la persévérance. A mon frère Nicolas et ma petite sœur Camille avec qui je peux discuter de science sans limite. A ma sœur Marion grâce à qui je garde un pied dans le monde médical au rythme de ses anecdotes. A leurs conjoints respectifs, Ariane et Alexandre, avec qui je passe de bons moments, en rando ou autour d'un plateau.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	8
GLOSSAIRE.....	10
INTRODUCTION GÉNÉRALE	14
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	16
CHAPITRE I : LE PORE DE TRANSITION DE PERMÉABILITÉ MITOCHONDRIAL.....	17
1. HISTORIQUE	17
2. MODULATEURS DU MPTP.....	18
2.1. Le calcium.....	18
2.2. Le potentiel de membrane.....	18
2.3. Le pH matriciel	19
2.4. Le phosphate inorganique (Pi) et les nucléotides adényliques	19
2.5. Le stress oxydant	20
3. STRUCTURE DU MPTP.....	20
3.1. La cyclophiline D, un acteur majeur.....	20
3.2. Hypothèse initiale : association ANT/PiC/VDAC.....	22
3.3. Hypothèse : formation d'agrégats protéiques	24
3.4. Hypothèse actuelle : implication de la FoF ₁ -ATP Synthase.....	25
3.5. Autres protéines impliquées dans la régulation du mPTP	28
4. RÔLES PHYSIOLOGIQUES POTENTIELS	30
5. RÔLES PATHOLOGIQUES ET MORT CELLULAIRE	31
5.1. Implications pathologiques	32
5.2. Exemple de l'ischémie-reperfusion cardiaque et cardioprotection.....	33
5.2.1. Physiopathologie de l'infarctus du myocarde	34
5.2.1.1. Déclenchement de l'infarctus du myocarde	34
5.2.1.2. Conséquences de l'épisode d'ischémie-reperfusion	34
5.2.1.2.1. Perturbations homéostasiques liées à l'ischémie	34
5.2.1.2.2. Perturbations homéostasiques liées à la reperfusion	38
5.2.1.2.2.1. Surcharge calcique	39
5.2.1.2.2.2. Stress oxydant	40
5.2.1.2.2.3. Ouverture du mPTP	42
5.2.1.3. Prise en charge actuelle de l'infarctus	42
5.2.1.4. Stratégies cardioprotectrices expérimentales spécifiques à la reperfusion	43
5.2.1.4.1. Pré/post-conditionnements ischémiques	44
5.2.1.4.1.1. Concept de conditionnement ischémique	44
5.2.1.4.1.2. Mécanismes d'action du conditionnement	45
5.2.1.4.1.3. Effets métaboliques et homéostasiques	46
5.2.1.4.1.4. Stimulation des voies de survie cellulaire	46
5.2.1.4.1.4.1. Activation de la voie RISK	46

5.2.1.4.1.4.2. Activation de la voie SAFE	47
5.2.1.4.1.5. Inhibition du mPTP	47
5.2.1.4.2. Post-conditionnement pharmacologique	48
5.2.1.4.2.1. Agents pharmacologiques limitant la surcharge calcique	48
5.2.1.4.2.2. Agents limitant le stress oxydant	49
5.2.1.4.2.3. Agents pharmacologiques activant la voie RISK	50
5.2.1.4.2.4. Agents ciblant la mitochondrie	50
5.2.1.4.2.5. Perspectives du post-conditionnement pharmacologique	51
CHAPITRE II : LA CYCLOPHILINE D	52
1. GÉNÉRALITÉS SUR LES CYCLOPHILINES	52
1.1. Structure	52
1.2. Fonctions	54
1.3. Localisation subcellulaire	55
1.4. Cyclophiline D	55
2. LA CYCLOPHILINE D – HISTORIQUE	56
2.1. Rôles de la CypD	56
2.1.1. Mort cellulaire, nécrose et apoptose	56
2.1.2. Rôles physiologiques	58
2.1.2.1. Homéostasie calcique	59
2.1.2.2. Adaptation métabolique	61
2.1.2.3. Mitophagie	62
2.1.3. Régulation de la CypD et implications pathologiques	62
2.1.3.1. S-Nitrosylation	62
2.1.3.2. Phosphorylation	63
2.1.3.3. Acétylation	63
2.1.3.4. Oxydation	64
2.1.3.5. Régulation par interaction avec les protéines	64
3. INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA CYPD ET DU MPTP	66
3.1. La cyclosporine A	66
3.2. Les dérivés de la cyclosporine A	69
3.3. Petits inhibiteurs de CypD	71
3.4. Les Small-molecules cyclophilin inhibitors (SmCypI)	71
3.4.1. Indication initiale : vers de nouveaux antiviraux	72
3.4.2. Rationnel de développement : <i>Fragment Based Drug Discovery</i>	72
3.4.3. Première caractérisation	75
OBJECTIFS DU TRAVAIL	77
PARTIE EXPÉRIMENTALE	78
MATÉRIELS ET MÉTHODES	79
1. MODÈLES ANIMAUX	79
2. RÉACTIFS	79

3. ÉTUDE DES FONCTIONS MITOCHONDRIALES.....	79
3.1. Isolement des mitochondries de foie et de cœur de rat.....	79
3.2. Étude du gonflement mitochondrial	81
3.3. Évaluation de la capacité de rétention calcique mitochondriale.....	82
3.4. Évaluation du potentiel de membrane mitochondrial	84
3.5. Mesure de la phosphorylation oxydative	85
4. MESURE DE L'ACTIVITE PEPTIDYLPROLYL <i>CIS-TRANS</i> ISOMERASE DES EXTRAITS CYTOSOLIQUES ET MITOCHONDRIAUX DE CŒUR ET DE FOIE DE SOURIS.....	86
4.1. Préparation des extraits protéiques	86
4.2. Mesure de l'activité PPIase.....	87
5. EXPERIENCES DE MICROSCOPIE A FLUORESCENCE SUR CELLULES.....	88
5.1. Acquisition et analyse des résultats	88
5.2. Ouverture du mPTP dans les hépatocytes primaires	88
5.2.1. Modèle cellulaire	88
5.2.2. Marquage des cellules	89
5.2.3. Ouverture du mPTP	89
5.3. Etudes sur cardiomyocytes adultes isolés de souris.....	90
5.3.1. Isolement de cardiomyocytes de souris adultes	90
5.3.1.1. Prélèvement du cœur	90
5.3.1.2. Perfusion de type Langendorff et digestion enzymatique	90
5.3.1.3. Réintroduction du calcium	92
5.3.1.4. Evaluation de la viabilité cellulaire	92
5.3.1.5. Ensemencement des cardiomyocytes isolés	92
5.3.2. Marquage des cellules	93
5.4. Effet des ionophores calciques	94
5.5. Hypoxie-réoxygénation	94
6. ÉTUDE DE L'EFFET DU COMPOSÉ C31 <i>IN VIVO</i>	96
6.1. Administration intraveineuse chez les animaux sains	96
6.2. Modèle d'ischémie-reperfusion hépatique chez la souris.....	96
7. ÉTUDE DU COMPOSÉ C31 <i>EX VIVO</i> , DANS UN MODÈLE DE CŒUR ISOLÉ- PERFUSÉ.....	98
8. ANALYSE STATISTIQUE.....	99
RÉSULTATS	100
RÉSULTATS 1 : LES NOUVEAUX LIGANDS DES CYCLOPHILINES INHIBENT L'OUVERTURE DU PORE DE TRANSITION DE PERMÉABILITÉ MITOCHONDRIAL ET POSSÈDENT DES PROPRIÉTÉS HÉPATOPROTECTRICES.	101
1. OBJECTIF DU TRAVAIL.....	101
2. MODÈLES EXPÉRIMENTAUX	101
3. RÉSULTATS.....	102

3.1. Les nouveaux ligands de la CypD inhibent l'ouverture du mPTP de mitochondries hépatiques isolées.	102
3.2. Le composé C31 inhibe l'ouverture du mPTP par un mécanisme d'action original. ...	102
3.3. Le composé C31 inhibe l'ouverture du mPTP dans les hépatocytes primaires.....	103
3.4. L'administration <i>in vivo</i> de C31 protège les mitochondries au cours de l'ischémie-reperfusion hépatique.....	103
4. CONCLUSIONS	104
5. RÉSULTATS COMPLEMENTAIRES	104
RÉSULTATS 2 : LES IONOPHORES CALCIQUES NE SONT PAS UTILISABLES POUR ÉTUDIER L'OUVERTURE DU MPTP DANS DES CARDIOMYOCYTES ADULTES ISOLÉS MURINS.	107
1. OBJECTIF DE L'ÉTUDE.....	107
2. PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX	107
3. RÉSULTATS.....	108
3.1. Effets des ionophores électroneutres : A23187 et ionomycine.....	108
3.2. L'ETH129 induit l'entrée de calcium dans la mitochondrie et provoque l'hypercontracture cellulaire suivie de la mort des cardiomyocytes.....	109
3.3. Le modèle d'hypoxie-réoxygénation induit une ouverture du mPTP dépendante de la CypD.....	109
4. CONCLUSION	110
RÉSULTATS 3 : LE NOUVEAU LIGAND DE LA CYPD, C31, INHIBE L'OUVERTURE DU MPTP DANS DES MITOCHONDRIES CARDIAQUES.	111
1. OBJECTIF DU TRAVAIL.....	111
2. PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX	111
3. RÉSULTATS.....	112
3.1. Le C31 atteint les mitochondries hépatiques mais pas les mitochondries cardiaques <i>in vivo</i>	112
3.2. Le C31 inhibe l'ouverture du mPTP de mitochondries cardiaques isolées.	113
3.3. Le C31 inhibe l'ouverture du mPTP dans les cardiomyocytes isolés et retarde la mort cellulaire induite par l'hypoxie-reoxygénation.....	115
3.4. De fortes concentrations d'inhibiteurs de CypD sont nécessaires pour inhiber l'ouverture du mPTP dans un modèle de cœur isolé-perfusé.	116
3.5. Les cyclophilines cytosoliques ne sont pas responsables de l'absence d'effet de la CsA et du C31 <i>in vivo</i>	117
4. CONCLUSION	118
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	119
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	131

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Schéma récapitulatif des événements aboutissant à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP).	20
Figure 2 : Hypothèse structurale initiale	24
Figure 3 : Formation du mPTP par des dimères d'ATP synthase.....	25
Figure 4 : Formation du mPTP par libération de la sous unité "c"	26
Figure 5 : Structure hypothétique du mPTP impliquant la "p density"	27
Figure 6 : Structure schématique de l'ATP synthasome.....	28
Figure 7 : Perturbations homéostasiques liées à l'ischémie.....	36
Figure 8 : Lésions de reperfusion et cardioprotection	39
Figure 9 : Mécanismes aboutissant à la surcharge calcique lors de la reperfusion	40
Figure 10 : Représentation schématique de la production d'O ₂ ⁻ par retour électronique.....	41
Figure 11 : Schéma récapitulatif des différents conditionnements ischémiques et de leur moment d'application	45
Figure 12 : Schéma simplifié des principales voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection.....	46
Figure 13 : Structure générale des cyclophilines, exemple de la CypD.....	53
Figure 14 : Fonction d'isomérisation des cyclophilines	54
Figure 15 : Représentation schématique des membranes associées à la mitochondrie (MAM) impliquées dans les échanges calciques	60
Figure 16 : Inhibiteurs de CypD de type polypeptidique	70
Figure 17 : Principe schématique du <i>Fragment Based Drug Discovery</i>	73
Figure 18 : Mode de liaison de la CsA (A) et du C31 (B) dans le site actif de la CypD	74
Figure 19 : Modifications chimiques majeures apportées au cours de l'amélioration des nouveaux inhibiteurs de CypD	75
Figure 20 : Expérience représentative de gonflement mitochondrial induit par le calcium.....	82
Figure 21 : Expérience représentative de mesure de la rétention calcique	83

Figure 22 : Mesure du potentiel de membrane mitochondrial	84
Figure 23 : Mesure de la consommation d'oxygène par les mitochondries isolées.....	86
Figure 24 : Mesure de l'activité peptidylprolyl <i>cis-trans</i> isomérase	87
Figure 25 : Expérience représentative du suivi de l'ouverture du mPTP par le marquage calcéine/CoCl ₂	90
Figure 26 : Système de type Langendorff utilisé pour la dissociation de cardiomyocytes de souris.	91
Figure 27 : Suspension de cardiomyocytes à la fin de la réintroduction de calcium.	92
Figure 28 : Microscope Olympus IX-81 utilisé pour les expériences d'hypoxie-réoxygénation	95
Figure 29 : Procédure d'ischémie-reperfusion hépatique chez la souris.	97
Figure 30 : Schéma du montage d'un cœur isolé-perfusé à pression élevée.....	98
Figure 31 : Effet du C31 sur la nécrose observée à la phase tardive de la reperfusion.....	105
Figure 32 : Capacité de rétention calcique mitochondriale mesurée 30 min après injection de C31 ou de CsA.	106
Figure 33 : Rétention calcique mitochondriale après injection <i>in vivo</i> du C31 et de la CsA.	112
Figure 34 : Expérience représentative de mesure du gonflement mitochondrial.	113
Figure 35 : Effet du C31 et de la CsA dans des mitochondries cardiaques de souris sauvages et CypD ^{-/-}	114
Figure 36 : Modèle d'hypoxie-réoxygénation sur cardiomyocytes adultes isolés de souris. .	115
Figure 37 : Capacité de rétention calcique mitochondriale après perfusion des inhibiteurs de CypD dans le modèle de coeur isolé-perfusé	116
Figure 38 : Activité peptidylprolyl isomérase des extraits cytosoliques et mitochondriaux de foie et de cœur de souris.....	117

Tableaux

Tableau 1 : Modifications chimiques de la CypD et effet sur l'ouverture du mPTP	64
Tableau 2 : Interactions protéiques de la CypD en dehors des constituants hypothétiques du mPTP.....	66

Glossaire

ABT	1-aminobenzotriazole
Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
Akt	<i>Activated protein kinase</i>
AMP	Adénosine monophosphate
ANT	<i>Adenine Nucleotide Translocase</i>
ATP	Adénosine triphosphate
A β	Peptide amyloïde β
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xl	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BDM	Butanedione monoxime
C1qBP	<i>Complement C1q binding protein</i>
CAT	Carboxyatractyloside
CIRCUS	<i>Cyclosporine and Prognosis in Acute Myocardial Infarction Patients</i>
CK	Créatine kinase
CLD	<i>Cyclophilin-Like Domain</i>
CRC	Capacité de rétention calcique
CsA	Cyclosporine A
CYCLE	<i>CYCLOsporinE A in Reperfused Acute Myocardial Infarction</i>
CyP-157	Cyclophiline 157 kDa
CyP-358	Cyclophiline 358 kDa
CyP-58	Cyclophiline 58 kDa
CypA	Cyclophiline A
CypB	Cyclophiline B
CypC	Cyclophiline C
CypD	Cyclophiline D
DIABLO	<i>Direct IAP Binding protein with low pI</i>

DMSO	Diméthylsulfoxyde
DnaJC15	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15</i>
Drp1	<i>Dynamin-related protein 1</i>
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
EGTA	Ethylène glycol tetraacétique
eNOS	NO synthase endothéliale
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ESCAMI	<i>Evaluation of the Safety and Cardioprotective effect of eniporide in Acute Myocardial Infarction</i>
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide réduite
FBDD	<i>Fragment Based Drug Discovery</i>
FCCP	<i>Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone</i>
FKBP	<i>FK501-binding proteins</i>
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
Grp75	<i>Glucose-regulated protein 75</i>
GSK-3β	<i>Glycogen synthase kinase 3 β</i>
H ₂ O ₂	Péroxyde d'hydrogène
HEK293	<i>Human embryonic kidney cells 293</i>
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HK2	Hexokinase II
Hsp60	<i>60 kDa Heat shock protein</i>
Hsp90	<i>90 kDa Heat shock protein</i>
IC ₅₀	Concentration inhibitrice 50
IMRB	Institut Mondor de Recherche Biomédicale
IP3R1	Récepteur de type I à l'Inositol 1,4,5-trisphosphate
JAK	Janus kinase
M199	Milieu 199
MAM	Membranes associées à la mitochondrie
MCU	Uniporteur calcique mitochondrial
MIAMI	<i>Morphine in Acute Myocardial Infarction</i>
mKATP	Canaux potassiques mitochondriaux dépendant de l'ATP
mPTP	Pore de transition de perméabilité mitochondrial
MST1	<i>Macrophage Stimulating 1</i>

NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduite
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBC	Cotransporteur Na ⁺ /HCO ₃ ⁻
NCX	Echangeur Na ⁺ / Ca ²⁺
NHE	Echangeur Na ⁺ /H ⁺
NO	Monoxyde d'azote
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OSCP	<i>Oligomycin Sensitivity Conferral Protein</i>
p53	<i>Tumor protein 53</i>
pHi	pH intracellulaire
Pi	Phosphate inorganique
PI	Iodure de propidium
PI3K	Phosphoinositol 3-kinase
PiC	<i>Phosphate Carrier</i>
PKC	Protéine kinase C
PKC-ε	Protéine kinase C epsilon
PKG	Protéine kinase G
PPIase	Peptidylprolyl <i>cis-trans</i> isomérase
<i>Ppif</i> ^{-/-}	Souris délétées pour le gène de la CypD
RE	Réticulum endoplasmique
RISK	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAFE	<i>Survival Activation Factor Enhancement</i>
SERCA	<i>Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase</i>
SIRT3	Sirtuin 3
SMAC	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases</i>
SMCypI	<i>Small-Molecule Cyclophilin Inhibitors</i>
SOD	Superoxyde dismutase
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
t _{mPTP50}	Temps nécessaire à l'ouverture de 50% du mPTP
TMRM	Tétraméthylrhodamineméthylester
TNFR2	<i>Tumor necrosis factor receptor 2</i>

TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TRAP1	<i>TNF receptor associated protein 1</i>
TSPO	Protéine translocatrice de 18kDa
TTC	Chlorure de triphényltétrazolium
UA	Unités arbitraires
UI	Unités internationales
VDAC	<i>Voltage-Dependent Anion Channel</i>
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
V _m	Vitesse maximale
$\Delta\Psi_m$	Potentiel de membrane mitochondrial

Introduction générale

La mitochondrie est l'organite majeur en charge de la production d'énergie au niveau cellulaire. Cette énergie, produite grâce à la phosphorylation oxydative, permet de maintenir la cellule en vie. Néanmoins, la mitochondrie peut également orienter le destin de la cellule vers la nécrose ou l'apoptose *via* l'ouverture d'un pore de haute conductance : le pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP). De ce fait, la mitochondrie joue un rôle clé dans un grand nombre de pathologies. L'ouverture de ce pore perméabilise la membrane interne mitochondriale ce qui a pour conséquences une dissipation du potentiel de membrane, un arrêt de la synthèse d'ATP et un gonflement de la matrice qui peut aboutir à la rupture de la membrane externe et au relargage de médiateurs pro-apoptotiques. Cette ouverture est provoquée par la surcharge calcique et est favorisée par le stress oxydant, le phosphate et la déplétion en nucléotides adényliques. La structure exacte du mPTP n'est toujours pas élucidée. En revanche, une protéine matricielle, la cyclophiline D (CypD), est un modulateur majeur de l'ouverture du mPTP. L'inhibition de la CypD par la cyclosporine A (CsA) ou sa délétion permettent de diminuer la sensibilité du mPTP à ses inducteurs (Halestrap et Richardson, 2015).

L'ouverture du mPTP est impliquée dans un grand nombre de pathologies lorsque celles-ci s'accompagnent de modifications de l'homéostasie ionique cellulaire ou de la production de stress oxydant. L'exemple le plus décrit concerne les phénomènes d'ischémie-reperfusion qui peuvent être rencontrés dans différents organes tels que le cœur (Griffiths et Halestrap, 1993), le cerveau (Korde *et al.*, 2007) ou le foie (Hirakawa *et al.*, 2003) et même au niveau de l'organisme entier lors d'un arrêt cardiaque (Cour *et al.*, 2011). Au cours de ces épisodes, l'alternance d'une phase ischémique, qui abolit la respiration mitochondriale et perturbe l'homéostasie ionique, et d'une phase de reperfusion, qui constitue un apport massif d'oxygène à l'origine de la production de stress oxydant et d'une surcharge calcique, aboutit à l'ouverture du mPTP et à un accroissement de la mortalité cellulaire.

Ces lésions observées lors de la restauration de la circulation sanguine sont appelées « lésions de reperfusion » (Yellon et Hausenloy, 2007) et représentent une cible majeure pour protéger les organes soumis aux phénomènes d'ischémie-reperfusion. L'administration de substances protectrices au moment de la reperfusion, appelée post-conditionnement pharmacologique, est une stratégie qui vise à limiter les lésions de reperfusion. Cette stratégie a plus particulièrement été employée pour limiter les lésions causées par l'infarctus du myocarde et a

donné lieu à un grand nombre d'essais cliniques qui n'ont majoritairement pas permis de diminuer la taille d'infarctus. Un essai de phase II au cours duquel des patients coronariens ont reçu un *bolus* de CsA juste avant la reperfusion a cependant permis de montrer que l'inhibition de la CypD pouvait permettre de réduire la taille d'infarctus et le remodelage ventriculaire (Piot *et al.*, 2008 ; Mewton *et al.*, 2010). Néanmoins, deux essais de phase III (Cung *et al.*, 20156 ; Ottani *et al.*, 2016) n'ont pas permis de confirmer ces résultats. Les conclusions de ces essais ont été largement commentées et tendent à montrer que la CsA n'est pas la molécule idéale pour ce type de post-conditionnement pharmacologique.

Dans ce contexte, nous avons eu l'opportunité d'étudier de nouveaux inhibiteurs de cyclophilines développés au sein de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2016). Ces petites molécules, de structure radicalement différente de la CsA ne présentent pas de propriétés immunosuppressives et pourraient donc représenter une alternative aux inhibiteurs de CypD disponibles actuellement, qui sont majoritairement des peptides cycliques.

Dans ce travail de thèse, nous avons caractérisé les effets de ces nouveaux ligands de la CypD sur l'ouverture du mPTP de mitochondries cardiaques et hépatiques. Nous avons d'abord vérifié l'effet mPTP-inhibiteur de ces molécules dans des mitochondries isolées puis le composé le plus efficace a été évalué dans des modèles cellulaires et *in vivo*, dans un modèle d'ischémie-reperfusion hépatique chez la souris.

Le présent manuscrit est composé de deux parties :

- La première est une synthèse des données de la littérature qui replace le sujet dans son contexte scientifique en deux chapitres :
 - o Le pore de transition de perméabilité mitochondrial, sa structure et son rôle physiopathologique, plus particulièrement dans l'ischémie-reperfusion cardiaque.
 - o La cyclophiline D, modulateur essentiel de l'ouverture du mPTP et cible pharmacologique pour la prévention des lésions de reperfusion.
- La seconde correspond au travail expérimental réalisé au cours de cette thèse. Elle présente les protocoles expérimentaux utilisés, les principaux résultats obtenus et leur discussion.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Le pore de transition de perméabilité mitochondrial

1. Historique

La transition de perméabilité mitochondriale, mise en évidence pour la première fois il y a plus de cinquante ans, correspond à un gonflement de la mitochondrie associé à un découplage de la chaîne respiratoire et à la perte de l'imperméabilité des membranes mitochondriales. Ce gonflement peut être induit par différents stimuli, tous présents lors des phénomènes d'ischémie-reperfusion.

À la fin des années 1970, Haworth et Hunter ont montré que cette transition de perméabilité est liée à l'ouverture d'un canal hydrophile non spécifique, perméable à tous les solutés de masse moléculaire inférieure à 1,5 kDa (Haworth et Hunter, 1979 ; Hunter et Haworth, 1979a, 1979b). L'ouverture de ce pore entraîne un afflux massif d'eau et d'ions dans la mitochondrie causant, par l'effet de la pression oncotique, un gonflement de la matrice mitochondriale qui peut aller jusqu'à la rupture de la membrane externe mitochondriale. Par la suite, des études réalisées par Crompton et Costi (1988) ont montré que ce pore a un diamètre d'environ 2,3 nm et l'existence de ce pore dit « géant » a été confirmée plus tard par des expériences d'électrophysiologie (Zoratti *et al.*, 1994). Les résultats des expériences de patch-clamp réalisées par Ichas et Mazat (1998) ont suggéré que le mPTP pouvait présenter différents degrés d'ouverture, avec un état intermédiaire qui ne laisserait passer que les protons ou le calcium. Cependant, ces résultats sont controversés car obtenus dans les conditions artificielles du patch-clamp et sont difficiles à observer avec des mitochondries intactes. Selon l'hypothèse qui prévaut actuellement, le mPTP ne pourrait exister que sous deux états, ouvert ou fermé, avec la possibilité de passer rapidement et réversiblement d'un état à l'autre (Bernardi *et al.*, 1999). Ces ouvertures transitoires pourraient permettre un efflux rapide de protons et de calcium sans causer de gonflement mitochondrial. En revanche, des ouvertures définitives entraînent une dissipation du potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$) mitochondrial nécessaire à la production d'ATP par la F_0F_1 -ATP synthase. Cette chute du $\Delta\Psi_m$ entraîne non seulement un arrêt de la synthèse d'ATP mais aussi une inversion du fonctionnement de l'ATP synthase qui hydrolyse alors l'ATP pour tenter de rétablir un gradient électrochimique.

2. Modulateurs du mPTP

Un grand nombre de substances peuvent influencer sur l'ouverture du mPTP en augmentant ou en diminuant sa probabilité d'ouverture avec des effets qui peuvent être synergiques ou tout au moins additifs lorsqu'ils sont associés (Figure 1).

2.1. Le calcium

Le calcium est l'un des premiers inducteurs du mPTP identifié et reste à ce jour l'inducteur de référence dans de nombreux modèles expérimentaux (Hunter *et al.*, 1976). Il existe de nombreux autres modulateurs du mPTP mais ces agents agissent généralement en modifiant la sensibilité du mPTP à la surcharge calcique. En effet, c'est la concentration matricielle de calcium qui, lorsqu'elle atteint un seuil, déclenche l'ouverture du mPTP. À l'inverse, le calcium cytosolique possède des propriétés inhibitrices en diminuant la probabilité d'ouverture du pore. Les ions calciques pénètrent dans la matrice mitochondriale ou s'en échappent en empruntant l'uniporteur calcique mitochondrial (MCU). L'utilisation d'un inhibiteur du MCU, le rouge de ruthénium, ou d'EGTA, un chélateur du calcium, permet de prévenir l'ouverture du mPTP induite par le calcium. Cependant, dans les conditions expérimentales comme celles des études dites de « *swelling* » ou celles visant à évaluer la capacité de rétention calcique mitochondriale, la concentration de calcium nécessaire à l'ouverture du mPTP est beaucoup plus élevée que celles qu'il est possible de rencontrer dans les situations physiologiques ou physiopathologiques. Ces observations conduisent à penser qu'*in vivo* la susceptibilité du mPTP est liée à l'association d'une surcharge calcique avec d'autres facteurs (Juhaszova *et al.*, 2008).

D'autres cations divalents comme le Mg^{2+} , Sr^{2+} , le Mn^{2+} ou le Ba^{2+} inhibent l'ouverture du mPTP en entrant en compétition avec le calcium au niveau de ses sites de fixation matriciels (Bernardi *et al.*, 1992, 1993).

2.2. Le potentiel de membrane

Si l'ouverture du mPTP est à l'origine de l'effondrement du $\Delta\Psi_m$, une dissipation du $\Delta\Psi_m$ peut induire l'ouverture du mPTP (Bernardi *et al.*, 1992). Cette situation nécessite cependant que la dissipation du gradient protonique ne soit pas associée à une diminution du pH matriciel puisque cette dernière empêche l'ouverture du mPTP. De la même façon le MCU doit être inhibé pour ne pas effluer le calcium vers le cytosol.

Le transporteur des nucléotides adényliques (*adenine nucleotide translocase*, ANT), l'un des composants putatifs du mPTP, pourrait quant à lui jouer un rôle de senseur électrique. En effet, une baisse du $\Delta\Psi_m$ modifie la conformation de l'ANT qui passe d'une conformation cytosolique « c » à une conformation matricielle « m » et ce changement pourrait moduler l'état d'ouverture du mPTP (Halestrap *et al.*, 1997a).

2.3. Le pH matriciel

Le pH matriciel influe également sur la vulnérabilité du mPTP. Une légère acidose possède des propriétés inhibitrices, probablement liées à la compétition des protons et des ions calcium au niveau des sites de fixation, tandis que l'alcalose augmente la probabilité d'ouverture du mPTP (Halestrap, 1991 ; Bernardi *et al.*, 1992). D'autre part, lors d'une surcharge calcique, l'entrée de calcium à travers le MCU s'accompagne d'une diminution du $\Delta\Psi_m$ rapidement compensée par une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire. L'excrétion de protons vers l'espace intermembranaire qui s'ensuit fait augmenter le pH matriciel et sensibilise d'autant plus le mPTP.

2.4. Le phosphate inorganique (Pi) et les nucléotides adényliques

Lors des phénomènes d'ischémie, l'accumulation de Pi et la déplétion du stock de nucléotides adényliques (ATP et ADP) sensibilisent le mPTP. Le Pi est un modulateur très particulier de l'ouverture du mPTP puisqu'il peut être inducteur ou inhibiteur en fonction des conditions expérimentales ou des espèces étudiées. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ces rôles contradictoires du Pi. Celui-ci possède un pouvoir tampon qui limiterait la chute du pH matriciel et donc les effets protecteurs de l'acidose. Le Pi peut également stimuler l'absorption de calcium par la mitochondrie (Crompton et Costi, 1988). De fortes concentrations de Pi peuvent également conduire à la formation de polyphosphates qui sensibilisent le mPTP (Abramov *et al.*, 2007) bien que ces polyphosphates permettent de diminuer la concentration matricielle de calcium libre (Zoccarato et Nicholls, 1982).

A l'inverse, Basso *et al.* (2008) ont décrit un effet désensibilisant du Pi mais uniquement en présence de CsA ou en absence de CypD. Selon cette hypothèse, corroborée par les travaux de Li *et al.*, (2012) la présence de Pi serait indispensable pour permettre une inhibition du mPTP par la cyclosporine A (CsA).

2.5. Le stress oxydant

Le stress oxydant est un élément clé des processus d'ischémie-reperfusion. Lors de la reperfusion, la reprise de la respiration mitochondriale s'accompagne d'une production très importante d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui participent à l'induction du mPTP (Nohl *et al.*, 1993). Expérimentalement, des réactifs pro-oxydants tels que le *t*-butylhydroperoxyde, la phénylarsine oxyde ou le diamide sensibilisent fortement le mPTP à la surcharge calcique (Beatrice *et al.*, 1984 ; Lenartowicz *et al.*, 1991). Ces ERO peuvent modifier les protéines notamment par des réactions de cross-linking. C'est par exemple le cas pour l'ANT dont certaines cystéines situées sur la face matricielle peuvent réagir avec la phénylarsine oxyde, ce qui favorise l'ouverture du mPTP (Mc Stay *et al.*, 2002).

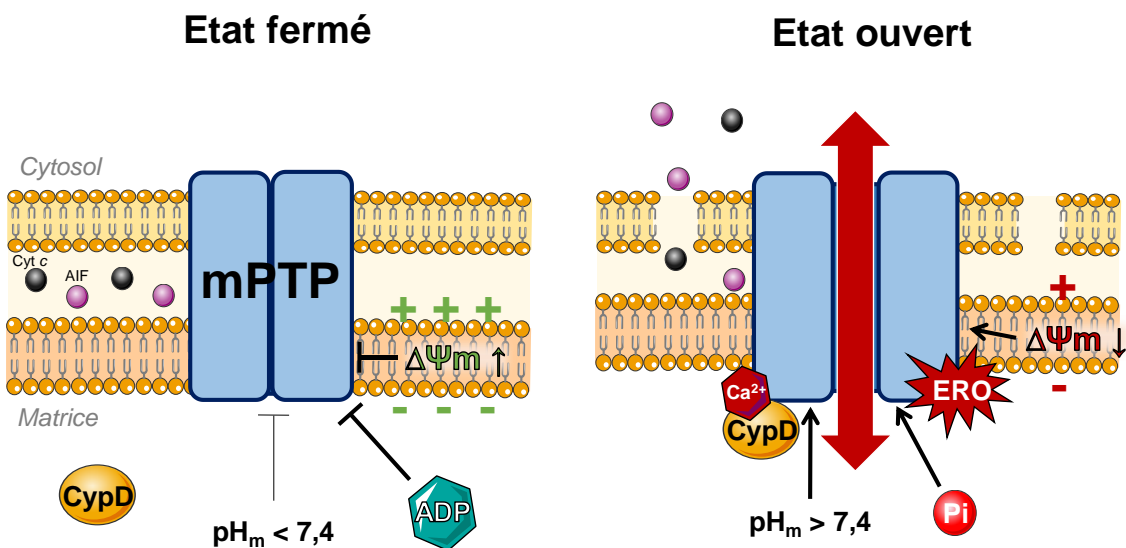


Figure 1 : Schéma récapitulatif des événements aboutissant à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP). CypD : cyclophiline D ; $\Delta\Psi_m$: potentiel de membrane mitochondriale ; Pi : phosphate inorganique ; ERO : espèces réactives de l'oxygène ; Cyt *c* : cytochrome *c* ; AIF : *Apoptosis Inducing Factor*. ⊥ inhibition ; → stimulation.

3. Structure du mPTP

3.1. La cyclophiline D, un acteur majeur

La cyclophiline D est une protéine chaperonne ubiquitaire à activité peptidyl-proline *cis trans* isomérase (PPIase) située dans la matrice mitochondriale et dont le rôle physiologique exact n'est pas connu. Elle est, parmi les 17 cyclophilines identifiées chez l'Homme à ce jour, la seule à être adressée spécifiquement à la mitochondrie après sa synthèse. Toutes les

cyclophilines présentent une activité enzymatique de repliement protéique liée à leur fonction PPIase mais elles se distinguent les unes des autres par une fonction propre qui dépend de déterminants structuraux (Galat, 1993).

Le rôle primordial joué par la CypD dans l'ouverture du mPTP a été démontré par l'utilisation de la CsA (Fournier *et al.*, 1987 ; Crompton *et al.*, 1988). La CsA est un inhibiteur non sélectif des cyclophilines. Surtout connue pour ses effets immunosuppresseurs dus à l'inhibition de la prolifération lymphocytaire via l'inhibition de l'interaction entre la cyclophiline A cytosolique et la calcineurine (voie du facteur nucléaire des lymphocytes T activés), la CsA est également un puissant inhibiteur de l'ouverture du mPTP par son action sur la CypD mitochondriale dont elle inhibe l'activité enzymatique et la liaison aux membranes. L'utilisation de la CsA permet d'inhiber l'ouverture du mPTP de mitochondries isolées à partir de différents tissus chez de nombreux animaux en augmentant fortement la quantité de calcium nécessaire à son ouverture. Pour s'affranchir des contraintes liées au pouvoir immunosuppresseur de la CsA, des dérivés non immunosuppresseurs de la CsA comme le NIM-811 et le Debio-025 ont été synthétisés et conservent leur effet inhibiteur du mPTP. La Sangliferhin A, un immunosuppresseur de structure très différente de la CsA s'est révélée être également un puissant inhibiteur du mPTP. Comme la CsA, la Sangliferhin A inhibe la fonction PPIase de la CypD. En revanche, elle n'empêche pas sa fixation aux composants putatifs du mPTP, ce qui indique que l'activité enzymatique de la CypD est essentielle pour moduler l'ouverture du mPTP (Clarke *et al.*, 2002).

En 2005, la démonstration définitive de la participation de la CypD à l'ouverture du mPTP non pas en tant qu'élément structural mais surtout comme agent modulateur a été apportée par l'utilisation de souris délétées pour le gène de la CypD (*Ppif*^{-/-}). Chez ces souris, l'ouverture du mPTP requiert une quantité beaucoup plus élevée de calcium et ceci se traduit par une importante cardioprotection dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion (Baines *et al.*, 2005 ; Nakagawa *et al.*, 2005).

Les événements à l'origine de l'activation de la CypD et de sa migration vers les composants de la membrane interne ne sont toujours pas clairement identifiés. Récemment, il a été montré que la protéine p53 interagit directement avec la CypD indépendamment de son interaction avec le protooncogène Bcl-2. Cette interaction augmente la probabilité d'ouverture du mPTP et pourrait contrôler la nécrose (Vaseva *et al.*, 2012).

Des modifications chimiques de la CypD pourraient également être à l'origine de son activation ou de son inhibition. En effet, *in vitro*, la CypD peut être phosphorylée directement par la glycogène synthase kinase 3 β (GSK-3 β ; Rasola *et al.*, 2010). Cette kinase cytosolique, dont l'inhibition confère un effet protecteur dans le pré-conditionnement ischémique, est capable de transloquer vers la matrice mitochondriale mais sa capacité à phosphoryler la CypD *in vivo* n'est toujours pas démontrée (Xi *et al.*, 2009). Parmi les autres modifications post-traductionnelles, la CypD peut également subir des dé-acétylations par la sirtuin 3 (SIRT3). Cette enzyme localisée dans la matrice mitochondriale peut dé-acétyler une lysine très proche du site catalytique de la CypD et en inhiber la fonction PPIase (Shulga *et al.*, 2010). Les effets directs de cette modification sont difficiles à interpréter car la SIRT3 intervient à de nombreux niveaux du métabolisme mitochondrial et notamment dans la régulation de la production d'ATP (Lombard *et al.*, 2007). Enfin, la CypD peut être nitrosylée sur ses résidus cystéines. Il est admis que le NO possède des propriétés cardioprotectrices notamment par sa capacité à se fixer de façon covalente sur les résidus cystéines de nombreuses cibles (Sun et Murphy, 2010). Parmi ces cibles, plusieurs composants/modulateurs du mPTP ont été recensés comme la F₀F₁-ATP synthase, le canal anionique voltage dépendant (*Voltage-dependent anion channel*, VDAC) et la créatine kinase (Sun, 2007 ; Kohr *et al.*, 2011).

3.2. Hypothèse initiale : association ANT/PiC/VDAC

Rapidement après la naissance du concept de pore « géant » mitochondrial, des expériences montrant sa sensibilité aux nucléotides adényliques, ADP et ATP, et au carboxy-atractyloside (CAT), un inhibiteur de l'ANT, ont conduit à émettre l'hypothèse que l'ANT pourrait jouer un rôle structural dans la formation du mPTP (Figure 2). L'ANT est une protéine abondante de la membrane interne mitochondriale dont le rôle physiologique est d'échanger sélectivement et réversiblement l'ADP cytosolique contre l'ATP matriciel. L'idée de la participation de l'ANT a été corroborée par le fait que la CypD interagit avec l'ANT et que cette interaction peut être empêchée par la CsA (Woodfield *et al.*, 1998 ; Halestrap, 2006). D'autre part, ce transporteur est très sensible au stress oxydant et peut former des agrégats (Halestrap *et al.*, 1997a). Par la suite, d'autres substances ciblant l'ANT telles que l'acide bongkreique et le palmitoyl-CoA ont montré un effet inhibiteur du mPTP sous certaines conditions. Brustovetsky *et al.* (2002) ont de plus observé que l'ANT isolé, purifié et introduit dans des liposomes est capable de former un pore non spécifique de haute conductance lorsqu'il est exposé à de fortes concentrations de calcium. Cependant, des études ultérieures

utilisant des souris délétées pour les gènes des isoformes de l'ANT (isoformes ANT1 et 2) ont montré que les mitochondries isolées des tissus de ces animaux étaient encore capable de former un mPTP sensible à la CsA. Chez ces animaux, le pore ainsi formé perd néanmoins sa sensibilité à l'ADP et aux inhibiteurs de l'ANT et requiert de plus fortes concentrations de calcium pour s'ouvrir (Kokoszka *et al.*, 2004). Ces résultats laissent penser que si l'ANT ne joue pas de rôle structural à proprement parler, il pourrait avoir un rôle régulateur. Selon une autre hypothèse, l'ANT serait bien un composant du mPTP mais en son absence, d'autres protéines pourraient former un pore.

La sensibilité du mPTP au Pi a permis d'envisager une implication du transporteur du phosphate inorganique (*Phosphate carrier* ou PiC). Cette idée est étayée par le fait que ce transporteur peut s'associer étroitement avec l'ANT en présence de cardiolipine (Claypool *et al.*, 2008). Le PiC est un transporteur du Pi localisé dans la membrane interne. Il catalyse le transport du Pi cytosolique vers la matrice où il est utilisé pour la synthèse d'ATP. La capacité du PiC à fixer le Pi pourrait expliquer l'aptitude de cet élément à déclencher l'ouverture du pore. Sa présence en tant qu'élément structural du mPTP est corroborée par le fait que la CypD se lie au PiC de façon « CsA dépendante » et que la modification des groupements thiols du PiC par le stress oxydant est corrélée à l'ouverture du mPTP (Leung *et al.*, 2008). Son introduction dans des liposomes permet également de former un pore non spécifique (Schroers *et al.*, 1997). Cependant, des études génétiques récentes ont exclu l'hypothèse d'une participation structurale du PiC. En effet, la délétion ou la surexpression du PiC n'affecte pas l'ouverture du mPTP (Gutiérrez-Aguilar *et al.*, 2014) bien que d'autres résultats obtenus avec le même modèle tendent à montrer que l'inactivation du gène du PiC permet d'augmenter la capacité de rétention calcique et de protéger les cellules contre les stimuli à l'origine de l'ouverture du mPTP (Kwong *et al.*, 2014). Toutefois, la délétion du PiC dans un modèle cellulaire est rendue difficile par son caractère essentiel. En effet, au-delà de 80% de délétion, les cellules ne survivent pas et il est impossible de savoir si les 20 à 30% de transporteurs restants ne seraient pas suffisants pour constituer un pore parfaitement fonctionnel (Varanyuwatana et Halestrap, 2012). L'ensemble de ces résultats contradictoires laisse penser que le PiC ne joue pas de rôle structural mais qu'il pourrait être un modulateur mineur de l'ouverture du mPTP (Figure 2).

Le VDAC a longtemps été considéré comme étant le principal composant du mPTP au niveau de la membrane externe (Figure 2). Cette hypothèse a été étayée par le fait que le VDAC agit comme un transporteur ionique non sélectif ainsi que par ses propriétés électrophysiologiques

proches du mPTP (Szabó *et al.*, 1993 ; Szabó and Zoratti, 1993). De plus, son association avec l'ANT et la CypD dans des liposomes permet de produire des pores dont l'ouverture peut être inhibée par la CsA (Crompton *et al.*, 2008). Néanmoins, des expériences réalisées sur des mitoplastes (des mitochondries dépourvues de membrane externe) semblent indiquer que la membrane externe n'est pas essentielle à la formation du mPTP (de Macedo *et al.*, 1997). Enfin, la délétion de toutes les isoformes du VDAC n'entrave nullement la transition de perméabilité (Krauskopf *et al.*, 2006 ; Baines *et al.*, 2007), invalidant l'hypothèse selon laquelle le mPTP serait formé par l'association de l'ANT au niveau de la membrane interne et du VDAC au niveau de la membrane externe.

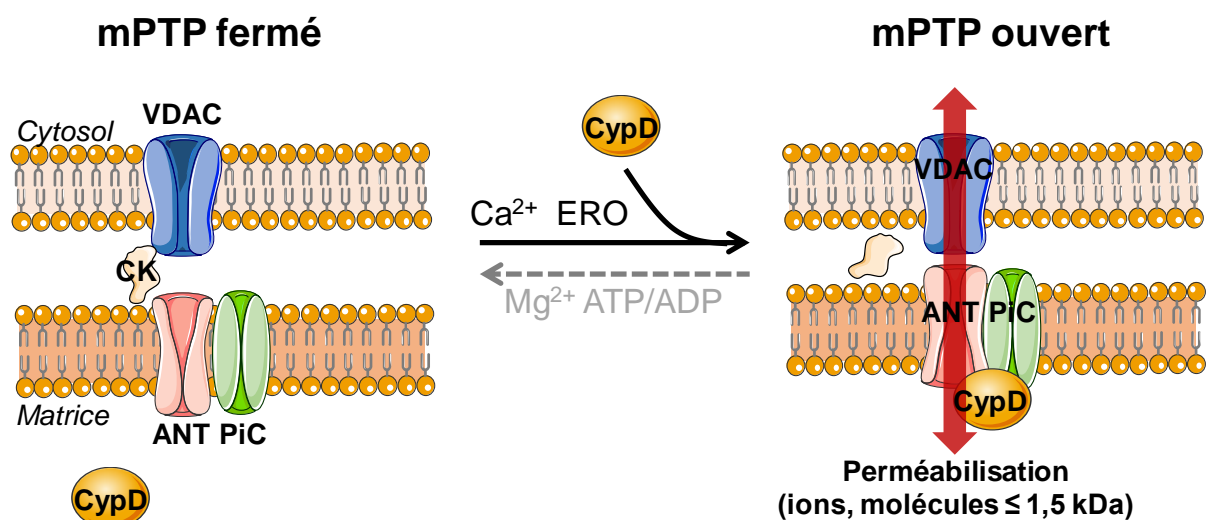


Figure 2 : Hypothèse structurale initiale. Selon cette hypothèse, le mPTP se forme au niveau de site de contacts entre les membranes mitochondriales et l'ouverture est déclenchée par la migration de la cyclophiline D (CypD) vers l'ANT sous l'effet du calcium et du stress oxydant (ERO). ANT : Adenine Nucleotide Translocase ; CK : Créatine kinase ; PiC : Phosphate Carrier ; VDAC : Voltage-dependent Anion Channel.

3.3. Hypothèse : formation d'agrégats protéiques

Une autre hypothèse, plus éloignée du schéma classique qui fait intervenir un assemblage très organisé de protéines, a été proposée par He et Lemasters (2002). Selon cette hypothèse, le mPTP serait formé par des « clusters » de protéines mal repliées. Le stress oxydant pourrait être à l'origine des déformations subies par les protéines. Ces changements de conformation exposeraient des groupements chargés au sein de la membrane lipidique, ce qui causerait un réarrangement des protéines qui s'orienteraient pour former un canal hydrophile. Ce canal serait obstrué par un complexe comprenant la CypD et une ou plusieurs protéines chaperones.

Plusieurs protéines chaperones peuvent inhiber l'apoptose en empêchant la libération de cytochrome *c* en agissant au niveau mitochondrial (Mosser *et al.*, 2000 ; Lin *et al.*, 2001). Selon cette même hypothèse, l'existence de deux formes du mPTP, régulé ou non par la CsA, pourrait être expliquée par la proportion d'agrégats pouvant former des pores qui peut, en cas de stress important, dépasser les capacités des systèmes de chaperons. Néanmoins, il paraît surprenant qu'avec un tel mécanisme d'agrégation, probablement aléatoire, le diamètre du mPTP régulé par la CypD soit constant. Par ailleurs, cette hypothèse n'explique pas les mécanismes à l'origine de la sensibilité du mPTP au pH et au voltage, bien que les auteurs suggèrent que d'autres protéines associées au complexe CypD-chaperones puissent assurer ce rôle de senseur.

3.4. Hypothèse actuelle : implication de la FoF₁-ATP Synthase

En 2013, l'équipe de Paolo Bernardi a montré dans un modèle électrophysiologique, que des dimères de F_oF₁-ATP synthase, ou complexe V, sont capables de former un canal de conductivité indiscernable de celle du mPTP (Figure 3 ; Giorgio *et al.*, 2013). Cette équipe avait auparavant montré que la CypD est capable d'interagir avec la chaîne latérale de la protéine via une sous-unité du complexe V appelée *Oligomycin Sensitivity Conferral Protein* (OSCP) et qu'elle module l'activité du complexe (Giorgio *et al.*, 2009).

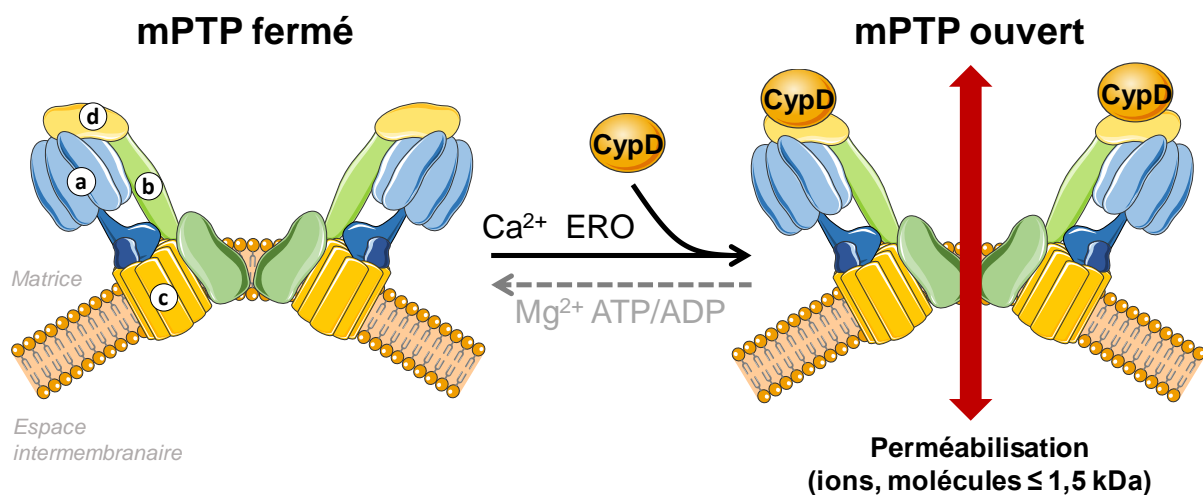


Figure 3 : Formation du mPTP par des dimères d'ATP synthase. Selon cette hypothèse, l'interaction de la CypD avec la tige latérale de l'ATP synthase au niveau de l'OSCP entraîne la formation du canal du mPTP à l'interface des dimères d'ATP synthase. a : F₁, b : tige latérale, c : F₀ et sous-unité « c », d : OSCP.

Récemment, d'autres études ont étayé cette hypothèse en impliquant une autre sous-unités du complexe V, la sous-unité c. Au sein de l'ATP synthase, la sous-unité c forme un anneau qui, lorsqu'il est libéré, peut former un pore (Alavian *et al.*, 2014). La délétion de cette sous-unité dans un modèle cellulaire diminue la sensibilité du mPTP tandis que sa surexpression l'augmente (Bonora *et al.*, 2014). En revanche, la sous-unité c isolée n'est sensible ni aux fortes concentrations de calcium, ni à la CsA. Ces résultats conduisent à penser que d'autres sous-unités de la F₀F₁-ATP synthase sont nécessaires pour moduler cette activité et conférer à ce pore sa sensibilité au calcium et à la CypD (Figure 4).

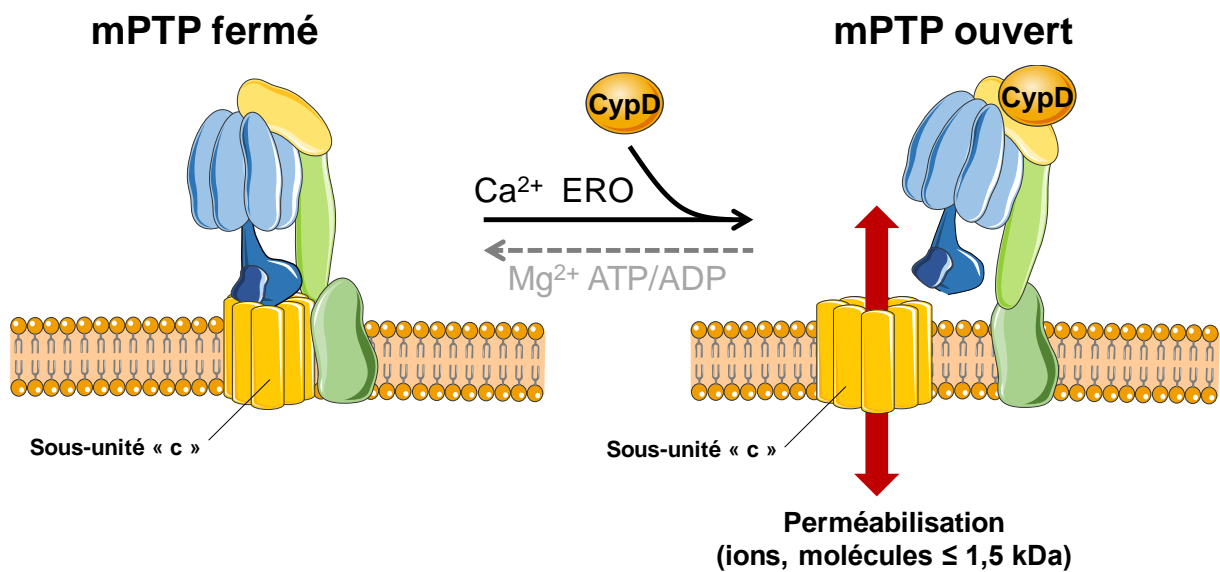


Figure 4 : Formation du mPTP par libération de la sous-unité "c". Sous l'effet de la surcharge calcique et du stress oxydant, l'interaction de la CypD avec la tige latérale de l'ATP synthase libère l'anneau, formé par les sous-unités « c », qui devient perméable aux solutés.

Cependant, le caractère indispensable de la F₀F₁-ATP synthase pour la vie, quelle que soit sa forme rend impossible sa délétion totale dans des modèles expérimentaux, et donc la confirmation de son rôle dans la formation du mPTP. D'autre part, des conditions expérimentales qui viseraient à modifier l'activité de ce complexe entraîneraient nécessairement un biais puisqu'elles influeraient directement sur l'état énergétique des mitochondries en modifiant le potentiel de membrane mitochondrial, la synthèse d'ATP et les concentrations de phosphate. Ces modifications auraient un retentissement inévitable sur la sensibilité des mitochondries à la transition de perméabilité.

Une dernière hypothèse structurale et mécanistique a récemment été suggérée (Gerle, 2016). Celle-ci rassemble dans le même modèle l'ensemble des sous-unités de l'ATP synthase et la CypD. Elle introduit également un nouvel acteur situé au niveau de l'espace intermembranaire, la *p-density*, qui pourrait être une sous-unité passée inaperçue jusqu'à présent car facilement perdue lors des étapes de purification de l'ATP Synthase destinées à des études de microscopie électronique. Bien que mal définie sur les images, cette *p-density* serait associée à la base de la tige latérale et s'ancrerait dans le bouchon lipidique qui obstrue le canal formé par les sous-unités c (Zhou *et al.*, 2015). Selon cette hypothèse, l'interaction de la CypD avec l'OSCP déclencherait une cascade de réarrangements conformationnels se propageant le long de la tige latérale via les sous-unités b, d et F6 sur une distance de 200Å. Ceci aboutirait au déplacement de la *p-density* entraînant le retrait du bouchon lipidique qui obstrue le canal formé par la sous-unité c (Figure 5). Cette hypothèse rendrait possible une modulation fine et réversible de la perméabilité membranaire. De plus, l'interaction de la tige latérale avec la sous unité catalytique ($\alpha\beta$)₃, qui confère à l'ATP synthase sa sensibilité au calcium (Nathanson et Gromet-Elhanan, 2000), permet de faire le lien entre CypD, calcium et mPTP.

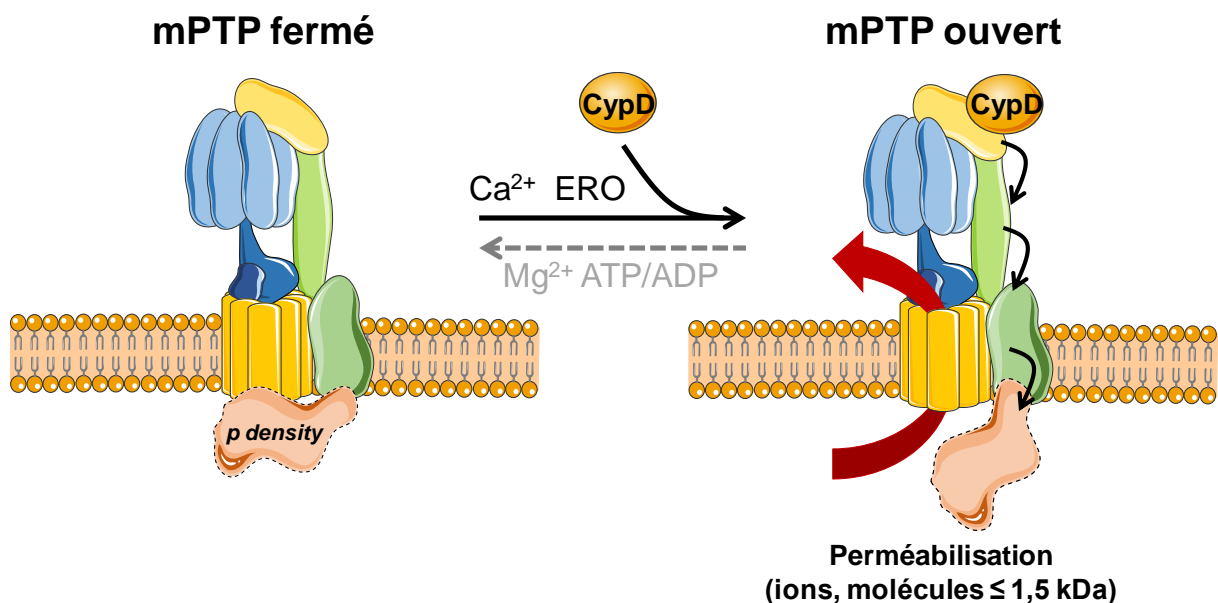


Figure 5 : Structure hypothétique du mPTP impliquant la "p density". Selon cette hypothèse, la liaison de la CypD entraînerait la propagation de modifications conformationnelles de la tige latérale aboutissant à la perméabilisation du complexe par retrait de la «p density».

Cette théorie, bien qu'élégante, a cependant été remise en question par les travaux de He *et al.* (2017a, 2017b) qui montrent dans une lignée cellulaire que l'absence de sous unités c ou des sous unités composant la chaîne latérale de l'ATP synthase ne modifie pas les caractéristiques biochimiques du mPTP comme la résistance au calcium, la dépolarisation et le diamètre du pore.

Enfin, cette hypothèse n'exclue pas totalement l'implication de l'ANT et du PiC puisque ces protéines sont naturellement associées et interagissent au sein de ce que l'on appelle l'ATP synthasome (Ko *et al.*, 2003 ; Figure 6).

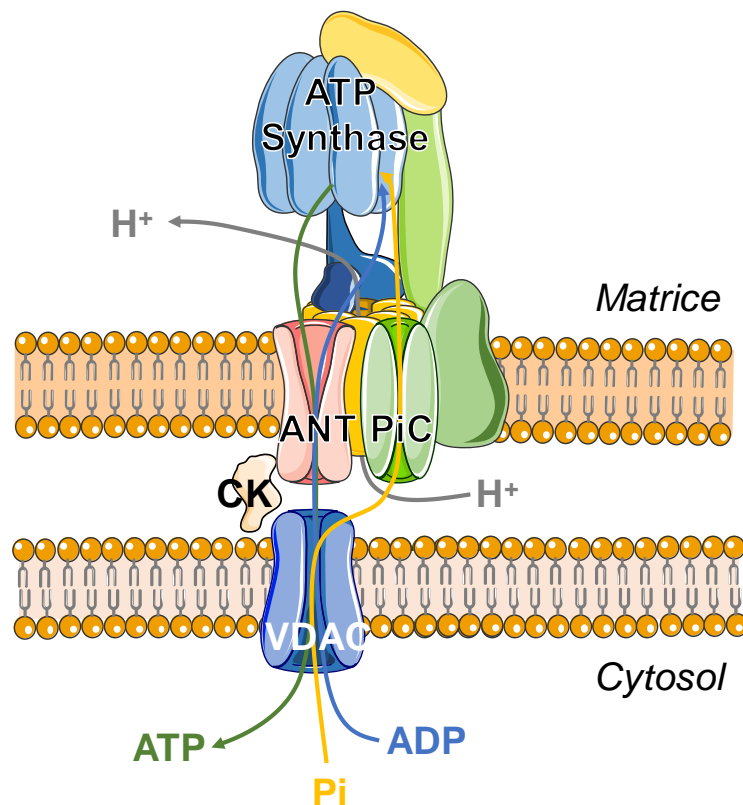


Figure 6 : Structure schématique de l'ATP synthasome. Au niveau des crêtes mitochondriales, un complexe protéique associant étroitement l'ATP synthase, l'ANT et le PiC permet d'optimiser la production d'énergie en favorisant les échanges de substrats. Ces complexes sont eux-mêmes regroupés sous forme d'oligomères.

3.5. Autres protéines impliquées dans la régulation du mPTP

Faute d'identifier les composants structuraux du mPTP, de nombreux travaux ont contribué à l'identification de plusieurs protéines impliquées dans la régulation de l'ouverture du mPTP.

La TSPO (*18 kDa Translocator Protein*), anciennement appelée récepteur périphérique aux benzodiazépines en raison de sa capacité à lier ces molécules, est une protéine de 18 kDa en charge du transport du cholestérol et localisée au niveau de la membrane externe mitochondriale. C'est sa capacité à co-précipiter avec l'ANT et le VDAC (McEnery *et al.*, 1992) mais aussi le fait que des ligands naturels ou synthétiques de la TSPO sont capables d'inhiber l'ouverture du mPTP (Chelli *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2007 ; Pastorino *et al.*, 1994) qui ont impliqué cette protéine dans la structure du mPTP. Cependant, des travaux récents ont montré que la délétion de la TSPO au niveau cardiaque et hépatique chez des souris ne modifie pas la sensibilité du mPTP aux inducteurs classiques et mettent également en évidence un manque de spécificité des agents ciblant la TSPO (Sileikyte *et al.*, 2014).

Les membres de la famille de Bcl-2 sont également capables de moduler l'ouverture du mPTP. En effet, si la protéine anti apoptotique Bcl-2 n'inhibe pas l'ouverture du mPTP (Yang *et al.*, 2000), Bax et Bak semblent la favoriser puisque la délétion de ces protéines pro-apoptotiques inhibe le gonflement mitochondrial et la mort cellulaire liés au mPTP (Karch *et al.*, 2013). D'autre part, chez ces animaux délétés, la réintégration d'une forme de Bax déficiente pour l'oligomérisation restaure la sensibilité du mPTP ce qui laisse penser que Bax peut en moduler l'ouverture indépendamment de son activité d'oligomérisation et de perméabilisation de la membrane externe.

Dans l'espace inter-membranaire, au niveau des sites de contact entre les membranes interne et externe, l'association VDAC/ANT est stabilisée par la créatine kinase-1 (CK). La délétion de cette CK entraîne une dissociation des sites de contact et sensibilise les mitochondries à l'ouverture du mPTP ce qui augmente la taille des lésions de reperfusion (Datler *et al.*, 2014). Ces sites de contact, qui semblent jouer un rôle important dans la vulnérabilité du mPTP, sont également modulés par l'hexokinase II (HK2). En effet, l'HK2 est liée à la membrane externe probablement via le VDAC et s'oppose à la libération de cytochrome *c* par deux mécanismes : la stabilisation des sites de contacts et l'inhibition de l'activité de Bax et Bak. Par ailleurs, le détachement de l'HK2 lors des phénomènes d'ischémie/reperfusion est associé à une perte de l'intégrité des sites de contact ainsi qu'au relargage de cytochrome *c* et cette dissociation peut être inhibée par le pré-conditionnement ischémique (Pasdois *et al.*, 2012).

Le complexe I de la chaîne respiratoire est également considéré comme un modulateur de l'ouverture du mPTP. Ce complexe est une des premières cibles de l'ischémie et son inhibition par la roténone, qui agit au niveau du site ubiquinone, permet de limiter l'ouverture

du mPTP en amplifiant l'effet de la CsA (Teixerra *et al.*, 2013). Cette régulation de l'ouverture du mPTP a également été montrée avec d'autres inhibiteurs du complexe I tels que la piericidine (Chauvin *et al.*, 2001) ou la metformine (Detaillé *et al.*, 2005 ; Guigas *et al.*, 2004). Cette activité est toutefois limitée aux tissus exprimant faiblement la CypD dans lesquels le complexe I masquerait un site de fixation du Pi sur le pore lui-même. Dans ces conditions, l'inhibition du complexe I par la roténone permettrait d'exposer ce site afin que le Pi puisse inhiber l'ouverture du mPTP (Li *et al.*, 2012).

La protéine GSK-3 β régule aussi l'ouverture du mPTP puisque cette sérine/thréonine kinase interagit avec l'ANT et le VDAC lors des phénomènes d'ischémie-reperfusion (Nishihara *et al.*, 2007) et que sa délétion diminue la sensibilité du mPTP à la surcharge calcique (Juhaszova *et al.*, 2004).

4. Rôles physiologiques potentiels

L'impact de l'ouverture du mPTP sur le destin d'une cellule dépend avant tout de la proportion de mitochondries dont les pores sont ouverts et de la durée de cette ouverture.

Dans un contexte physiologique, des ouvertures transitoires et non coordonnées du mPTP pourraient permettre à la mitochondrie de libérer du calcium mais également d'autres agents tels que des ERO (Zorov *et al.*, 2000). La mitochondrie est en effet le siège principal de la formation d'ERO au sein de la cellule. Une présence trop importante de ces ERO dans la mitochondrie, à proximité des complexes de la chaîne respiratoires et de lipides très sensibles à l'oxydation, peut contribuer à l'altération des fonctions respiratoires et participer activement au vieillissement cellulaire. Les ouvertures transitoires du mPTP permettraient donc d'éliminer ces produits de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le relargage des ERO pourraient également jouer un rôle dans la signalisation cellulaire mais aussi dans la stimulation de canaux ioniques ou l'expression génique.

Bien que le calcium accumulé dans la matrice mitochondrial soit normalement efflué via les échangeurs Na⁺/Ca²⁺ et H⁺/Ca²⁺ mitochondriaux, le mPTP pourrait également servir de voie d'efflux additionnelle en cas de surcharge calcique prolongée (Bernardi et von Stockum, 2012; Ichas et Mazat, 1998). Cette hypothèse est supportée par la démonstration que l'inhibition prolongée du mPTP entraîne une accumulation de calcium au sein de la mitochondrie et est à l'origine de dysfonctions cardiaques (Elrod et Molkentin, 2013). Ainsi, l'ouverture transitoire du mPTP apparaît comme un moyen de vidanger le calcium

intramitochondrial excédentaire. Lu *et al.* (2016) ont ainsi montré que les mitochondries cardiaques peuvent régulièrement et de manière individuelle et transitoire se dépolariser et libérer du calcium selon un mécanisme CypD dépendant. Comme la proportion de mitochondries dépolarisées dans un cardiomyocyte est faible à un instant donné (de 0,02% à l'état basal à 0,5% lors d'une exposition à l'isoprénaline) cela n'influence pas la production générale d'ATP. Ces travaux ont également démontré que le diamètre du mPTP physiologique serait sensiblement plus faible que lors des ouvertures pathologiques.

Ce rôle du mPTP fait cependant l'objet d'une controverse car d'autres études ont montré que l'inhibition du mPTP dans des cellules HeLa ne modifie pas l'efflux du calcium. De la même façon, le relargage d'ERO par la mitochondrie ne semble pas être lié à des ouvertures transitoires du mPTP puisque la délétion de la CypD n'altère pas la fréquence de ces « bursts » (Wei *et al.*, 2011). Il semble donc que ce mode d'élimination du calcium et des ERO par la mitochondrie ne soit pas général mais puisse intervenir dans certains tissus ou du moins dans certaines conditions.

5. Rôles pathologiques et mort cellulaire

L'ouverture du mPTP entraîne la perméabilisation de la membrane interne. Le premier effet de cette perméabilisation est l'abolition du gradient électrochimique et la dépolarisation de la membrane mitochondriale. Cette dépolarisation a pour conséquence d'arrêter le fonctionnement de l'ATP synthase et donc la production d'ATP. Pour tenter de rétablir le potentiel, l'ATP synthase fonctionne en sens inverse, en hydrolysant l'ATP, accélérant ainsi la déplétion énergétique. Un autre effet de l'ouverture du mPTP est lié à la pression oncotique importante qui règne dans la matrice mitochondriale. Du fait de cette pression oncotique, la perméabilisation entraîne un afflux d'eau et d'ions dans la mitochondrie à l'origine d'un gonflement mitochondrial. S'il est suffisamment important, ce gonflement peut aboutir à la rupture de la membrane externe et au relargage de médiateurs proapoptotiques tels que le cytochrome *c*, l'*Apoptosis Inducing Factor* (AIF) et le *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases* ou *Direct IAP Binding protein with low pI* (SMAC/DIABLO). Bien que les protéines présentes dans le cytosol des cellules puissent tempérer l'effet de la différence de pression colloïdale et que le gonflement mitochondrial soit ainsi plus modéré que dans les conditions *in vitro*, il est admis que ce gonflement peut être suffisamment intense pour provoquer la rupture de la membrane externe (Martinou et Green, 2001). Des études sur mitochondries de foie de rat ont montré que le cytochrome *c* est majoritairement séquestré

dans les crêtes mitochondriales et ne peut donc être libéré qu'à condition que les crêtes s'élargissent, phénomène observé lors du gonflement mitochondrial (Frey et Manella, 2000 ; Scorrano *et al.*, 2002).

L'orientation de la cellule vers la nécrose ou l'apoptose pourrait être liée à la proportion de mitochondries perméabilisées. En effet, si le mPTP s'ouvre dans une majorité de mitochondries, la déplétion rapide des stocks d'ATP dirigerait la cellule vers la nécrose. En revanche, si un nombre significatif de mitochondries libèrent leurs médiateurs pro-apoptotiques et qu'il reste une proportion suffisante de mitochondries pour produire l'ATP nécessaire, la cellule pourrait entrer dans un processus apoptotique. Cette hypothèse introduit l'idée qu'il existe une hétérogénéité au sein de la population mitochondriale d'une cellule. Cette hétérogénéité peut être le reflet d'une différence de potentiel de membrane entre les mitochondries, ce qui leur conférerait une sensibilité différente aux différents inducteurs. Dans ces conditions, l'ouverture du mPTP des mitochondries les plus fragiles dissiperait le potentiel de membrane et entraînerait le relargage de calcium. Ce calcium pourrait ensuite être capté par les mitochondries encore polarisées, propageant ainsi l'ouverture du mPTP au sein de la population mitochondriale (Bernardi, 1999).

5.1. Implications pathologiques

L'ouverture du mPTP est impliquée dans un grand nombre de pathologies lorsque celles-ci s'accompagnent de modifications de l'homéostasie ionique cellulaire ou de la production de stress oxydant. L'exemple le plus décrit concerne les phénomènes d'ischémie-reperfusion qui peuvent être rencontrés dans différents organes tels que le cœur (Griffiths et Halestrap, 1993), le cerveau (Korde *et al.*, 2007) ou le foie (Hirakawa *et al.*, 2003) et même au niveau de l'organisme entier lors d'un arrêt cardiaque (Cour *et al.*, 2011). Au cours de ces épisodes, l'alternance d'une phase ischémique, qui abolit la respiration mitochondriale et perturbe l'homéostasie ionique, et d'une phase de reperfusion, qui représente un apport massif d'oxygène à l'origine de la production de stress oxydant et d'une surcharge calcique, aboutit à l'ouverture du mPTP et à un accroissement de la mortalité cellulaire. Dans ce chapitre, nous détaillerons ces mécanismes au niveau cardiaque mais des processus similaires peuvent être observés dans tous les types de tissus soumis à l'ischémie-reperfusion.

D'autres pathologies ont également une origine mitochondriale, liée à l'ouverture du mPTP. C'est le cas notamment de certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Des travaux ont en effet montré que le peptide amyloïde β , qui s'accumule au

niveau cérébral au cours de la maladie, est capable de favoriser l'ouverture du mPTP. Des modèles animaux de maladies de Huntington (Quintanilla *et al.*, 2013 ; Kumar et Kumar 2009), de Parkinson (Gandhi *et al.*, 2009) ou de sclérose amyotrophique latérale (Keep *et al.*, 2001 ; Martin *et al.*, 2014) ont montré un effet bénéfique de l'inhibition du mPTP dans la progression de la pathologie en limitant la mort neuronale. Le mPTP pourrait être, de façon plus générale, à l'origine du vieillissement que ce soit par une augmentation de sa sensibilité ou des facteurs favorisant son ouverture au cours du temps (Panel *et al.*, 2018).

L'ouverture du mPTP est aussi à l'origine de dysfonctions hépatiques dans des modèles d'hépatite fulminante (Crouser *et al.*, 2004) et son inhibition par la CsA a donné des résultats encourageants chez des patients présentant une hépatite fulminante virale (Yoshida *et al.*, 2013). Le mPTP est également impliqué dans l'hépatotoxicité de certains médicaments tels que le diclofénac (Masubuchi *et al.*, 2002) et le paracétamol (Masubuchi *et al.*, 2005) dont les métabolites sont responsables de la production d'un stress oxydant qui favorise son ouverture.

Enfin, des données récentes laissent envisager une participation du mPTP dans la progression du diabète, tant au niveau des îlots β pancréatiques (Fujimoto *et al.*, 2010a et 2010b ; Lablanche *et al.*, 2011) que des complications vasculaires qu'il induit (Malaguti *et al.*, 2014 ; Taddeo *et al.*, 2013).

5.2. Exemple de l'ischémie-reperfusion cardiaque et cardioprotection

Le fonctionnement du myocarde repose sur une adéquation parfaite entre l'apport et la consommation d'oxygène du muscle cardiaque. Les cardiopathies ischémiques correspondent à une perturbation de cette balance et se traduisent par une souffrance myocardique. On distingue deux mécanismes physiopathologiques principaux qui définissent deux types d'ischémies : l'ischémie « d'apport » et l'ischémie « de besoin ». L'ischémie d'apport est la conséquence d'une diminution voire d'un arrêt du flux sanguin coronaire généralement consécutif à la rupture d'une plaque d'athérome et à la formation d'un thrombus. Dans cette situation, l'apport en oxygène devient insuffisant pour satisfaire les besoins du cœur au repos ; c'est le cas des syndromes coronariens aigus, angor instable et infarctus du myocarde. L'ischémie « de besoin » rencontrée dans le cas de l'angor d'effort ou angor stable est liée à une augmentation des besoins en oxygène mal compensée par une augmentation insuffisante du débit coronaire.

Les effets délétères de l'ischémie reposent sur son intensité (diminution ou arrêt total du flux coronaire) et sa durée. Dans tous les cas, l'ischémie entraîne un certain nombre de désordres biochimiques, de perturbations cellulaires et des complications rythmiques qui peuvent conduire à une nécrose du tissu myocardique caractérisant l'infarctus du myocarde.

5.2.1. Physiopathologie de l'infarctus du myocarde

5.2.1.1. Déclenchement de l'infarctus du myocarde

Dans la majeure partie des cas, le déclenchement de l'infarctus est dû à la fissuration ou à la rupture d'une plaque d'athérome entraînant localement une agrégation plaquettaire et la formation d'une thrombose occlusive qui peut être accompagnée d'un vasospasme. Bien souvent, cette rupture a lieu au repos, quelques heures après le lever (Muller *et al.*, 1985) mais certaines situations peuvent en favoriser le déclenchement. C'est notamment le cas de l'activité physique chez le patient athéromateux qui, en augmentant la pression sanguine et le rythme cardiaque accroît le stress pariétal coronaire et peut fragiliser la plaque d'athérome. Le stress émotionnel, par la stimulation du système nerveux sympathique, peut également être à l'origine d'infarctus. L'infarctus du myocarde étant principalement dû à l'athérosclérose coronaire, tous les facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'âge, le sexe, l'hérédité, le tabagisme, l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, le diabète, l'obésité et la sédentarité sont impliqués dans l'étiopathologie de l'infarctus.

5.2.1.2. Conséquences de l'épisode d'ischémie-reperfusion

5.2.1.2.1. Perturbations homéostasiques liées à l'ischémie

L'un des premiers effets de l'ischémie est l'arrêt de l'apport d'oxygène au niveau des cardiomyocytes situés en aval de l'occlusion. Sans oxygène le muscle cardiaque dispose de réserves énergétiques, sous forme d'ATP et de phosphocréatine, ne lui permettant de fonctionner que pendant 2 à 3 minutes (Benhabbouche *et al.*, 2011). En effet, 94% des apports énergétiques du muscle cardiaque proviennent de la chaîne respiratoire mitochondriale. La production d'ATP par la F_0F_1 -ATP synthase repose sur l'existence du $\Delta\Psi_m$ correspondant gradient protonique entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. La maintenance de ce potentiel est assurée par l'activité de quatre complexes qui, par le biais de transferts d'électrons successifs, excrètent des protons vers l'espace intermembranaire, créant ainsi une force protomotrice. Le retour de ces protons vers la matrice se fait exclusivement à travers la F_0F_1 -ATP synthase, ce qui permet la phosphorylation de l'ADP en ATP. L'arrêt du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale lors de l'ischémie s'accompagne

d'une dissipation du $\Delta\Psi_m$ que l'ATP synthase va paradoxalement tenter de corriger en hydrolysant l'ATP. Cette consommation d'énergie n'est pas négligeable puisqu'elle peut représenter jusqu'à 35% de la consommation d'ATP durant les 90 premières minutes d'ischémie (Jennings *et al.*, 1991).

Pour compenser l'arrêt de la chaîne respiratoire mitochondriale, les cardiomyocytes vont tenter de maintenir une production d'ATP en activant la voie de la glycolyse anaérobie via l'activation de la phosphofructokinase. Cependant, cette voie est très peu rentable d'un point de vue énergétique et n'est pas suffisamment efficace pour maintenir une activité contractile. De plus, elle s'accompagne de la production d'acide lactique qui, faute de flux veineux, s'accumule et entraîne une acidification du pH intracellulaire (pHi) ainsi qu'une inhibition de la phosphofructokinase. Une autre voie de synthèse d'énergie, la β -oxydation des acides gras, est également stimulée par la libération de catécholamines endogènes. Cependant, le rendement de cette voie est négatif et conduit, en plus de la consommation d'énergie, à une production supplémentaire de protons qui contribuent à l'acidose intracellulaire.

Les cellules vont alors essayer de corriger cette acidose à l'aide de bicarbonates via l'activation du symporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. En parallèle, l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ (NHE - *Na⁺/H⁺ Exchanger*) permet d'effluer les protons excédentaires mais l'activation de ces deux transporteurs s'accompagne d'une accumulation de Na^+ dans la cellule. En temps normal, le Na^+ est excrété de la cellule par la pompe Na^+/K^+ ATPase mais, au cours de l'ischémie, la chute des taux d'ATP entraîne l'inhibition de ce transporteur (Kupriyanov *et al.*, 1996). La modification du gradient ionique du Na^+ active alors l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX - *Na⁺/Ca²⁺ Exchanger*). Dans ces conditions, le NCX fonctionne en mode inverse et, bien qu'il permette de corriger la surcharge sodique, il est à l'origine d'une surcharge calcique cytosolique (Chen et Li, 2012) (Figure 7).

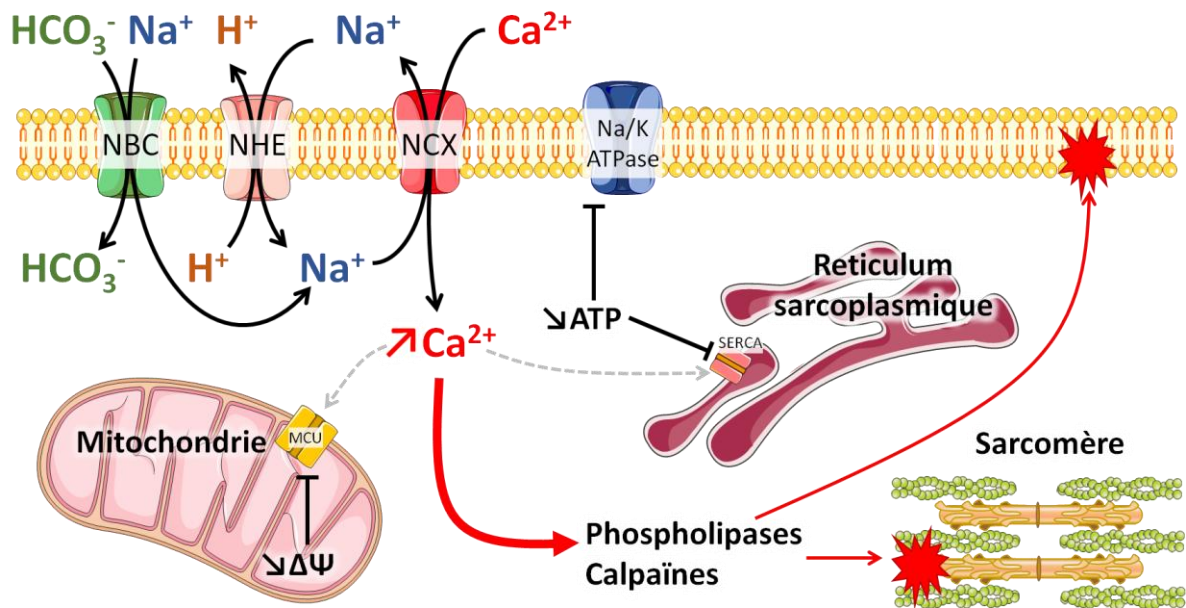


Figure 7 : Perturbations homéostatiques liées à l'ischémie. La compensation de l'arrêt de la respiration aérobie mitochondriale par la glycolyse anaérobie s'accompagne d'une acidose intracellulaire. Cette acidose est partiellement corrigée par le NBC et le NHE mais ces transporteurs entraînent une accumulation de sodium qui ne peut être éflué par la pompe Na⁺/K⁺-ATPase en raison de la déplétion énergétique. Le sodium est alors éliminé par l'échangeur (NCX) qui fonctionne en mode inverse, aboutissant à une surcharge calcique. Sans ATP, le calcium n'est pas recapté par le réticulum via la pompe SERCA, ni par la mitochondrie qui ne possède plus de potentiel de membrane. L'accumulation de calcium dans le cytosol stimule l'activité de protéases qui induisent la mort cardiomyocytaire en dégradant le cytosquelette et la membrane sarcolemmale.

Au début de l'ischémie, la recapture du calcium par la pompe SERCA (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase*) du réticulum sarcoplasmique permet de limiter cette surcharge calcique cytosolique en stockant le calcium dans le réticulum sarcoplasmique. De la même façon, la pompe Ca²⁺-ATPase sarcolemmale peut excréter le calcium vers l'espace extracellulaire en utilisant les faibles quantités d'ATP encore présentes. Cependant, si l'ischémie perdure, ces pompes sont inhibées par la chute des concentrations d'ATP et la concentration de calcium cytosolique augmente rapidement (Steenbergen *et al.*, 1987). Une fraction du calcium cytosolique peut également être captée par les mitochondries grâce au MCU mais cette captation est limitée par la dissipation du ΔΨ_m (Miyata *et al.*, 1992). Ces fortes quantités de calcium cytosolique peuvent induire l'activation de différentes enzymes telles que les phospholipases, les protéases et les endonucléases. Les phospholipases Ca²⁺-dépendantes dégradent les phospholipides membranaires et fragilisent les membranes cellulaires, aboutissant à la mort cellulaire par rupture du sarcolemme. En parallèle, les

calpaïnes clivent les protéines du cytosquelette et les myofibrilles ce qui conduit à une perturbation de l'activité contractile. Cette atteinte de l'appareil contractile est en partie responsable des arythmies observées dans la zone ischémique (Figure 7).

La stimulation d'enzymes Ca^{2+} -dépendantes permet également la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase qui, en utilisant les faibles quantités d'oxygène résiduelles, peut produire des anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Si cette activité enzymatique reste faible et qu'elle n'est pas directement corrélée à la taille des lésions (Nishino, 2006), cette production de stress oxydant s'ajoute toutefois à celle due à l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, de la NO synthase et de la NADPH oxydase. En effet, bien que les réserves d'oxygène soient faibles lors de l'ischémie, les cellules cardiaques sont paradoxalement soumises à un important stress oxydant. En effet, de faibles concentrations d'oxygène sont associées à un état fortement réduit du NADH et du FADH_2 mitochondriaux et ces conditions favorisent la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Misra et Fridovich, 1972). L' $\text{O}_2^{\cdot-}$ peut être transformé en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase (SOD) ou en radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton. Les espèces réactives de l'oxygène ainsi formées sont responsables de la peroxydation des lipides membranaires et de la carbonylation des protéines mitochondriales (Murphy, 2009). Cette atteinte des lipides membranaires, associée à l'activité des phospholipases peut aboutir à la mort cardiomyocytaire par rupture du sarcolemme. De plus, l'intensité de ce stress oxydant influe directement sur la sensibilité des mitochondries à la surcharge calcique et sur l'importance des dommages lors de la reperfusion (Kevin *et al.*, 2003).

En raison de l'interruption de la phosphorylation oxydative, la consommation de l'ATP résiduel entraîne une élévation des concentrations cellulaires d'AMP et de phosphate. L'AMP est ensuite dégradée en adénosine, inosine et xanthine qui sont évacuées de la cellule, entraînant une déplétion tissulaire en nucléotides adényliques qui aggrave le déficit énergétique.

L'ensemble de ces stress va également entraîner la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. En effet, l'ischémie peut aboutir à la dissociation des complexes cytosoliques Bcl-2/Bax, ce qui permet la translocation de Bax vers la mitochondrie. L'oligomérisation de Bax au niveau mitochondrial aboutit à la perméabilisation de la membrane externe et à la libération de cytochrome *c* qui stimule la voie intrinsèque des caspases et déclenche l'apoptose.

Entre 20 et 30 minutes après le début de l'ischémie, les premières lésions irréversibles apparaissent dans le subendocarde de la région ischémiée et progressent, sous la forme d'une « vague de nécrose », vers le subépicarde.

5.2.1.2.2. Perturbations homéostatiques liées à la reperfusion

Si la reperfusion rapide des territoires ischémiés est nécessaire pour arrêter la progression de la nécrose myocardique, elle est également à l'origine d'effets délétères qui lui sont propres. Pour un certain nombre de cellules situées dans l'aire à risque, les mécanismes décrits ci-dessus n'aboutissent pas à la mort cellulaire et restent réversibles (Matsumara *et al.*, 1998). Pour ces cellules, l'apport brutal d'oxygène possède un effet délétère dès les premières minutes de la reperfusion. En effet, l'association de la normalisation du pHi, d'un important stress oxydant et de la surcharge calcique mitochondriale va être à l'origine de l'ouverture du mPTP qui peut entraîner la mort cellulaire. L'existence de lésions directement liées à la reperfusion a longtemps fait débat dans la communauté scientifique. Dans les années 60-70, Jennings *et al.* (1960) ont montré pour la première fois chez le chien que la reperfusion pouvait être à l'origine de lésions particulières, qui s'additionnent à celles causées par l'ischémie et qui sont appelées « lésions de reperfusion » (Yellon et Hausenloy, 2007). En effet, rapidement après la reperfusion, certains cardiomyocytes subissent d'importantes modifications histologiques. Ces cellules présentent de larges bandes d'hypercontracture associées à un gonflement des mitochondries dont certaines ont perdu leur membrane externe (Herdson *et al.*, 1969). L'étendue de ces lésions est directement corrélée à la durée de l'ischémie ainsi qu'à l'intensité du stress oxydant et de la concentration de calcium cytosolique qui en découlent. Un autre argument en faveur de l'existence de telles lésions repose sur la possibilité de les atténuer par l'administration d'un traitement spécifique à la reperfusion (Figure 8).

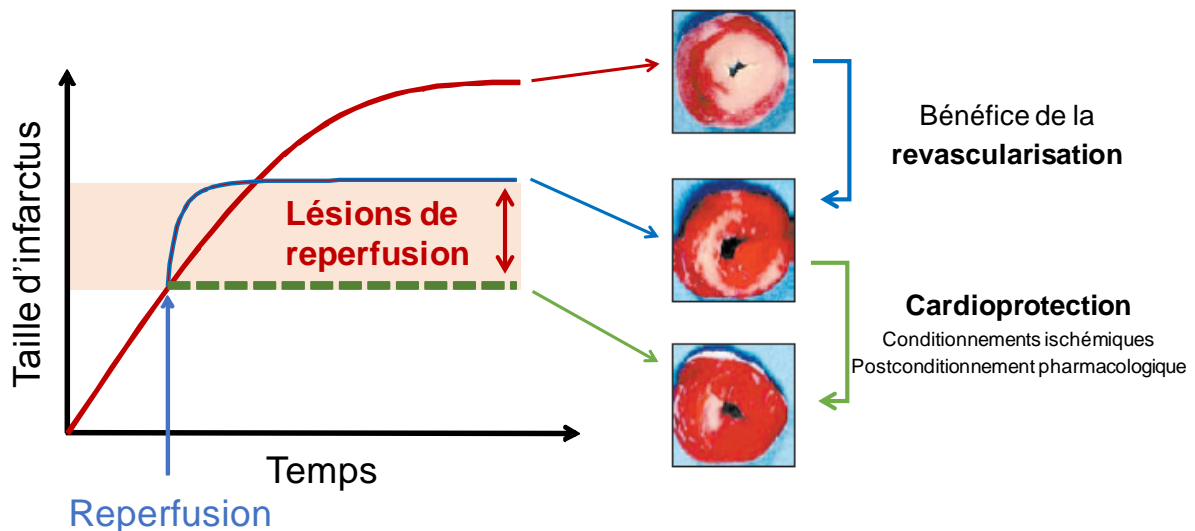


Figure 8 : Lésions de reperfusion et cardioprotection. L'ischémie prolongée du tissu cardiaque aboutit à la nécrose du myocarde (en blanc sur les photos). La reperfusion est nécessaire pour arrêter la progression de la nécrose mais elle s'accompagne d'une augmentation paradoxale des lésions. Idéalement, l'application d'une stratégie cardioprotectrice au moment de la reperfusion permettrait d'interrompre totalement la progression de la nécrose du tissu cardiaque.

5.2.1.2.2.1. Surcharge calcique

Le rétablissement du flux sanguin permet l'élimination des produits de la glycolyse anaérobie et la formation d'un gradient protonique entre le cytosol et l'espace extracellulaire. Ce gradient stimule l'excrétion de protons par le NHE dont l'action est complétée par l'activation de transporteurs du bicarbonate. L'activation de ces transporteurs permet un retour aux valeurs normales du pHi en quelques minutes. Cependant, la normalisation du pHi via le NHE s'accompagne une fois de plus d'une entrée massive de Na^+ dont l'efflux par le NCX fonctionnant en mode inverse, entraîne une surcharge calcique. Cette surcharge calcique peut être corrigée dans un premier par les pompes SERCA dont l'activité est restaurée par le rétablissement de la production d'ATP mitochondriale. Ce calcium peut également stimuler la libération du calcium réticulaire par le biais du récepteur à la ryanodine. L'association de ces deux phénomènes crée des oscillations des concentrations calciques (Benhabbouche *et al.*, 2011). Cependant, une ischémie prolongée peut endommager les pompes SERCA et, dans ce cas, la capacité du réticulum à capter le calcium est rapidement dépassée. Si la production d'ATP permet une reprise de l'activité contractile, les fortes concentrations de calcium cytosoliques peuvent être à l'origine d'une contraction excessive et durable des fibres

musculaires. L'hypercontracture qui en résulte peut aboutir à la rupture du sarcolemme et à la mort cardiomyocytaire. Un autre mécanisme de recapture du calcium repose sur le pouvoir tampon des mitochondries. En effet, la reprise du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale permet de restaurer le potentiel de membrane mitochondrial (Di Lisa *et al.*, 1995). Cette restauration stimule la captation massive du calcium qui s'est accumulé dans le cytosol, aboutissant à une surcharge calcique mitochondriale (Ferrari *et al.*, 1993) (Figure 9).

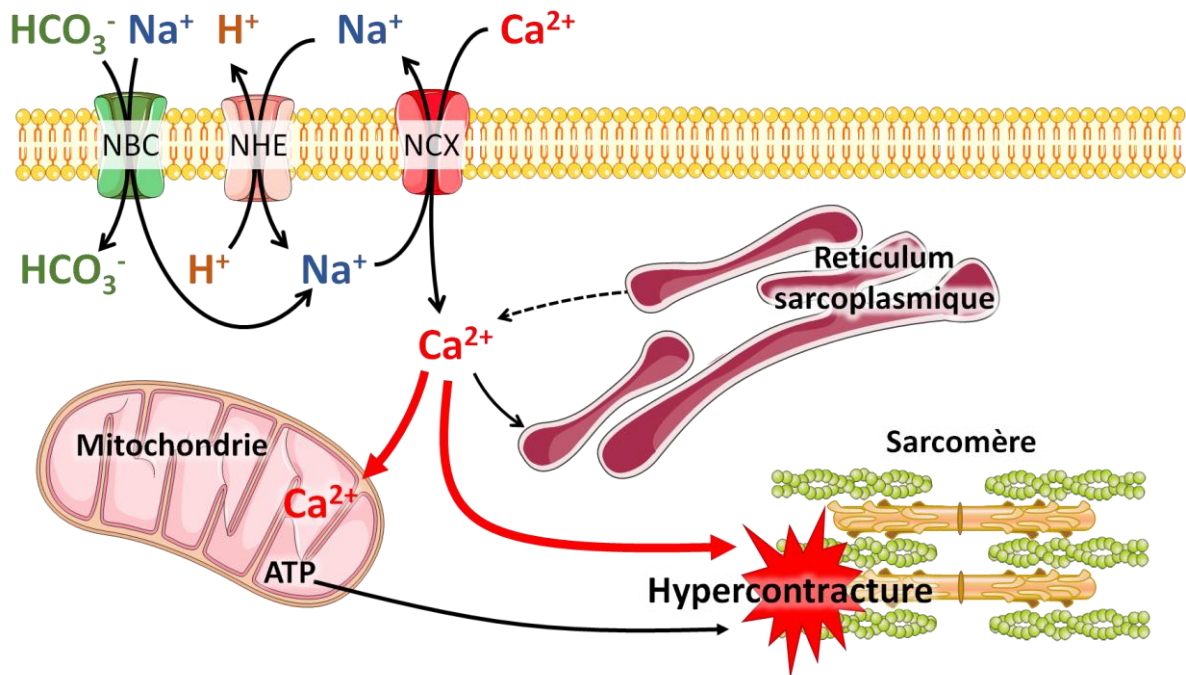


Figure 9 : Mécanismes aboutissant à la surcharge calcique lors de la reperfusion. Au niveau membranaire, les mécanismes mis en jeu pour la correction du pH intracellulaire sont les mêmes que ceux observés lors de l'ischémie et aboutissent à une surcharge calcique. La reprise de la respiration mitochondriale permet la restauration d'un potentiel de membrane et la synthèse d'ATP. Néanmoins, ce potentiel permet une entrée massive de calcium dans la matrice mitochondriale. De plus, la surcharge calcique cytosolique, les oscillations calciques dues aux défaillances des pompes du réticulum et la production d'ATP stimulent la contraction et aboutissent à l'hypercontracture cellulaire.

5.2.1.2.2.2. Stress oxydant

La reprise de la respiration par la chaîne respiratoire mitochondriale s'accompagne d'une production très importante d'ERO. Au début de la reperfusion, les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et leurs intermédiaires sont fortement réduits et l'oxygène réagit alors en formant une importante quantité d'O₂⁻. Ce « burst oxydatif » appelé « paradoxe de l'oxygène » ne peut pas être corrigé par les défenses antioxydantes puisque celles-ci ont été

consommées durant l'ischémie. Le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale est fortement impliqué dans cette production d'ERO (Jastroch *et al.*, 2010). En effet, ce complexe possède au moins deux sites susceptibles de permettre la fuite d'électrons et la formation d' $O_2^{\bullet-}$: l'un est situé au niveau de la flavoprotéine responsable de l'activité NADH deshydrogénase (site IF) tandis que l'autre est localisé au niveau du site de réduction de l'ubiquinone (site IQ ; Liu *et al.*, 2002). Lors de la reperfusion, l'utilisation par le complexe II du succinate accumulé pendant l'ischémie entraîne la production d' $O_2^{\bullet-}$ au niveau du site IQ via un phénomène appelé « retour électronique ». Une partie des électrons transportés par l'ubiquinone ne sont pas dirigés vers le complexe III (sens normal) mais reviennent vers le complexe I où ils réagissent avec l'oxygène pour former $O_2^{\bullet-}$ (Andrienko *et al.*, 2017) (Figure 10).

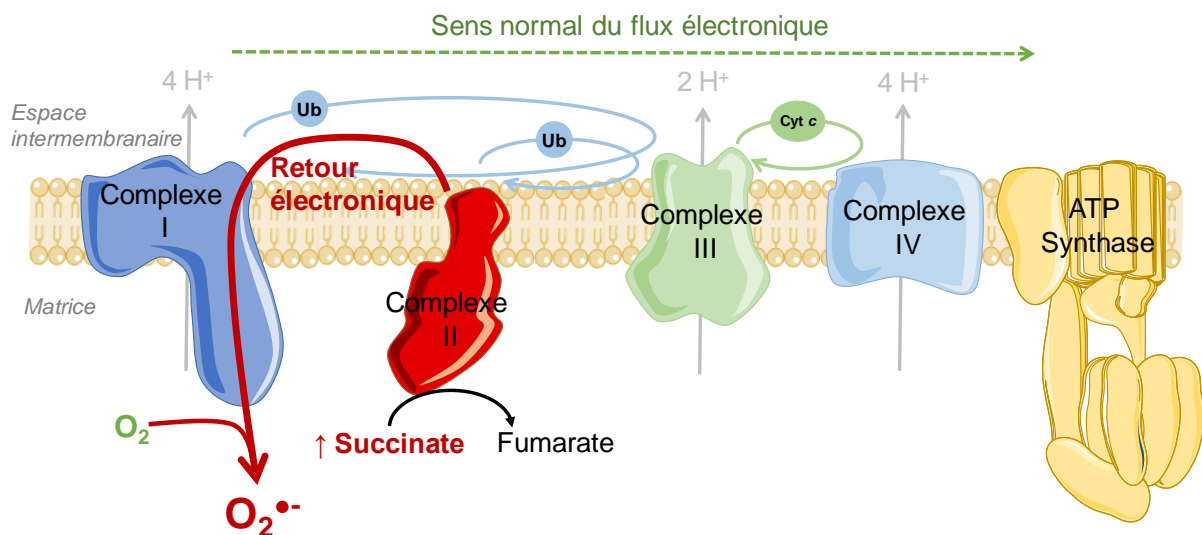


Figure 10 : Représentation schématique de la production d' $O_2^{\bullet-}$ par retour électronique. L'accumulation de succinate au cours de l'ischémie accroît le transfert d'électrons par le complexe II à l'ubiquinone (Ub) lors de la reperfusion. Ces électrons sont ensuite transférés vers les autres complexes pour atteindre l'ATP synthase. Une partie de ces électrons est néanmoins dirigée vers le complexe I dont elle s'échappe et réagit avec l'oxygène pour former l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$).

Les premières cibles de ces ERO sont les protéines hémiques de la machinerie énergétique mitochondriale, telles que les complexes I et III ou l'ATP synthase, ce qui a pour effet de compromettre la production d'ATP. La peroxydation des acides gras insaturés et en particulier de la cardiolipine conduit à l'inhibition de la synthèse d'ATP. Le stress oxydant peut également altérer les pompes ioniques, exacerbant ainsi les effets de la déplétion énergétique sur l'homéostasie ionique. De plus, l' $O_2^{\bullet-}$ peut réagir avec les grandes quantités de NO

produites par la NO synthase endothéliale (eNOS) lors des phénomènes d'ischémie-reperfusion pour former l'anion peroxy-nitrite et entraîner la nitrosylation des protéines. Enfin, la peroxydation lipidique fragilise les membranes cellulaires et conduit au relargage d'aldéhydes réactifs, tels que le 4-hydroxynonénale, qui peuvent modifier les protéines membranaires mitochondriales et causer leur agrégation.

Le stress oxydant généré lors de la reperfusion, en modifiant les protéines mitochondriales, augmente la sensibilité des mitochondries à la surcharge calcique et favorise l'ouverture du mPTP et la mort cardiomyocytaire.

5.2.1.2.2.3. Ouverture du mPTP

L'ouverture du mPTP est un processus clé dans l'apparition des lésions de reperfusion et est considérée à bien des égards comme un « point de non-retour ». La surcharge calcique mitochondriale, le stress oxydant, les fortes concentrations de Pi et la déplétion en nucléotides adényliques sont des inducteurs essentiels pour l'ouverture du mPTP (Crompton *et al.*, 1999). Bien que ces éléments soient déjà présents à la fin de l'ischémie, ce n'est que lors de la reperfusion que l'ouverture du mPTP est observée (Griffiths et Halestrap, 1995). En effet, si la surcharge calcique mitochondriale et le stress oxydant sont exacerbés dès les premières minutes de la reperfusion, c'est surtout la correction de l'acidose qui permet l'ouverture du mPTP. Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre I.I.3), le mPTP est un pore géant, constitué vraisemblablement de plusieurs protéines différentes mais la CypD est actuellement le seul composant clairement identifié comme modulateur de l'ouverture de ce pore.

L'ouverture du mPTP induit la mort cellulaire par nécrose ou apoptose en fonction de l'état énergétique des cellules et de l'atteinte mitochondriale. Si l'atteinte mitochondriale est trop importante et que la production d'ATP est insuffisante, les cellules s'engagent rapidement dans un processus de nécrose. L'orientation vers un processus apoptotique a lieu si une proportion plus modeste de mitochondries devient perméable ou si le mPTP s'ouvre de façon transitoire et que les cardiomyocytes conservent une production d'ATP suffisante. Par ailleurs, l'ouverture du mPTP peut également être à l'origine de l'hypercontracture (Ruiz-Meana *et al.*, 2007)

5.2.1.3. Prise en charge actuelle de l'infarctus

Actuellement, la seule stratégie thérapeutique reconnue pour la prise en charge de l'infarctus du myocarde consiste à reperfusionner le plus rapidement possible les territoires ischémiés en

levant l'obstruction coronaire. Cette reperméabilisation peut être réalisée par thrombolyse intraveineuse ou angioplastie coronaire et doit être réalisée le plus précocement possible, idéalement dans les six premières heures de l'épisode ischémique afin d'améliorer le pronostic du patient et de diminuer la taille de la nécrose cardiaque et le risque de complications telles que les arythmies. D'autre part, la reperfusion doit permettre de maintenir une perméabilité durable de l'artère coronaire. Le choix de la technique de reperfusion dépend du patient, de son âge, de ses caractéristiques hémodynamiques et des complications associées mais également de la proximité et de la disponibilité d'un centre de cardiologie interventionnelle.

A ces techniques de reperfusion ont été adjoints plusieurs traitements médicamenteux afin de diminuer la mortalité des patients en per-infarctus. L'angioplastie percutanée représente un acte hautement thrombogénique et nécessite donc l'adjonction d'un traitement antiagrégant plaquettaire (bithérapie thiéno-pyridine et aspirine, éventuellement associée à un inhibiteur du récepteur GP IIb/IIIa du fibrinogène), complété par une anti-coagulation par héparinothérapie. Le traitement par β -bloquant et inhibiteur de l'enzyme de conversion permet une protection cardiaque lors de la phase aigüe de l'infarctus. L'administration de dérivés nitrés favorise la vasodilatation des artères coronaires collatérales. Enfin, l'angoisse et la douleur sont prises en charge pour limiter une hyperadrénergisme néfaste.

Si l'ensemble de ces traitements et leur maintien dans les jours ou mois qui suivent le syndrome coronarien ont permis de limiter la mortalité liée à l'infarctus, ils ne ciblent pas spécifiquement les lésions de reperfusion et, ce faisant, ne réduisent pas la survenue de l'insuffisance cardiaque liée directement à la taille d'infarctus.

5.2.1.4. Stratégies cardioprotectrices expérimentales spécifiques à la reperfusion

Au cours des dernières décennies, le développement des techniques de reperfusion et leur association à diverses classes pharmacologiques a permis de fortement diminuer la mortalité de l'infarctus du myocarde. Toutefois, l'existence des lésions de reperfusion limite encore les bénéfices de la reperméabilisation. La cardioprotection se définit comme une stratégie dont le but est de protéger le myocarde en diminuant les lésions de reperfusion. La découverte de l'existence de voies de survie cardioprotectrices a donné lieu à de nombreuses études pré-cliniques ainsi qu'à des essais cliniques de phase II et III.

5.2.1.4.1. Pré/post-conditionnements ischémiques

5.2.1.4.1.1. Concept de conditionnement ischémique

La notion de « conditionnement » est apparue avec la découverte de l'existence de mécanismes endogènes qui permettent de diminuer la taille de l'infarctus. Elle consiste en un « entraînement » du myocarde qui lui permet de mieux supporter les périodes d'ischémie et la reperfusion. En 1986, Murry *et al.* ont montré, chez le chien, que 4 occlusions transitoires de 5 minutes juste avant une occlusion prolongée conduisaient à une diminution significative de la taille d'infarctus après reperfusion (Murry *et al.*, 1986). La protection apportée par ce conditionnement ne cible que les lésions de reperfusion puisqu'il n'affecte pas la propagation de la zone infarctée lors de l'occlusion mais empêche la mort cardiomyocytaire liée à la reperfusion (Hausken *et al.*, 2004). La limite principale du pré-conditionnement repose sur le fait qu'il doit avoir lieu avant l'occlusion prolongée de l'artère coronaire, ce qui le rend donc difficilement applicable en clinique chez des patients à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde. Cette notion de pré-conditionnement explique cependant pourquoi des patients qui ont subi plusieurs épisodes d'angor avant l'occlusion coronaire présentent souvent un meilleur pronostic.

Devant les espoirs suscités par la découverte du pré-conditionnement ischémique, l'idée est venue de transposer ces épisodes ischémiques transitoires aux tous premiers instants de la reperfusion. Ainsi, en 2004, Zhao *et al.* ont montré que de brèves périodes de reperfusion entrecoupées de courts périodes de réocclusion permettent de diminuer la taille d'infarctus de 44% chez le chien anesthésié. Cette réduction s'accompagne de la diminution de l'œdème tissulaire, de l'accumulation des polynucléaires neutrophiles, du stress oxydant et de la dysfonction endothéliale (Zhao *et al.*, 2004). Ces résultats ont rapidement été confirmés chez l'Homme au cours d'un essai clinique réalisé chez 33 patients. Quatre brèves réocclusions d'une minute espacées par des périodes de reperfusion d'une minute ont permis de diminuer de 36% le relargage de créatine kinase (Staat *et al.*, 2005). Ces résultats sont en accord avec des travaux qui soulignaient déjà l'importance de la vitesse de reperfusion sur la taille d'infarctus, démontrant qu'une reperfusion graduelle plutôt que brutale est préférable pour le pronostic du patient (Okamoto *et al.*, 1986 ; Sato *et al.*, 1997). A la différence du pré-conditionnement, le post-conditionnement n'agit que sur les événements liés à la reperfusion mais son efficacité démontre que les premiers instants de la reperfusion représentent une fenêtre thérapeutique clé pour la cardioprotection. La difficulté majeure rencontrée avec cette stratégie est liée au choix de l'algorithme de reperfusion (nombre et durée des cycles

d'ischémie-reperfusion). En effet, si plusieurs études ont démontré un net effet cardioprotecteur du post-conditionnement chez différentes espèces animales, le choix de l'algorithme est bien souvent arbitraire et diffère d'une espèce à l'autre.

Enfin, des travaux ont montré que des ischémies périphériques, appliquées à des organes ou des membres, permettent également de conditionner le myocarde. Cette technique, appelée « conditionnement à distance » ou « *remote ischemic preconditioning* » pourrait permettre la libération de médiateurs humoraux ou neuronaux qui stimuleraient les voies de signalisation impliquées lors du pré-conditionnement ischémique (Walsh *et al.*, 2007) (Figure 11).

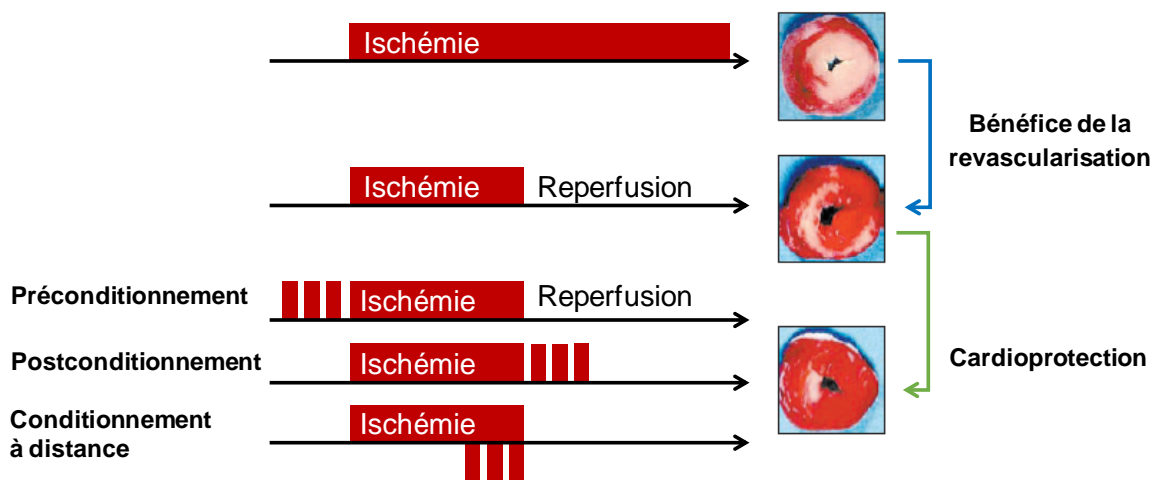


Figure 11 : Schéma récapitulatif des différents conditionnements ischémiques et de leur moment d'application. Les cycles d'ischémie-reperfusion transitoires correspondant aux stratégies de conditionnements ischémiques sont représentés par les séries de trois rectangles.

5.2.1.4.1.2. Mécanismes d'action du conditionnement

Les mécanismes exacts par lesquels les conditionnements ischémiques exercent leur protection ne sont toujours pas entièrement élucidés. Pour l'heure, plusieurs travaux ont montré qu'ils reposent sur une diminution de la production de stress oxydant, un retard de la normalisation du pH ainsi que sur l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires entremêlées : la voie de la protéine kinase C (PKC), la voie RISK (*Reperfusion Injury Salvage Kinase*) et la voie SAFE (*Survival Activation Factor Enhancement*). Ces voies de signalisation sont impliquées dans la survie cellulaire et convergent majoritairement vers un effecteur final, la mitochondrie, pour inhiber l'ouverture du mPTP (Figure 12).

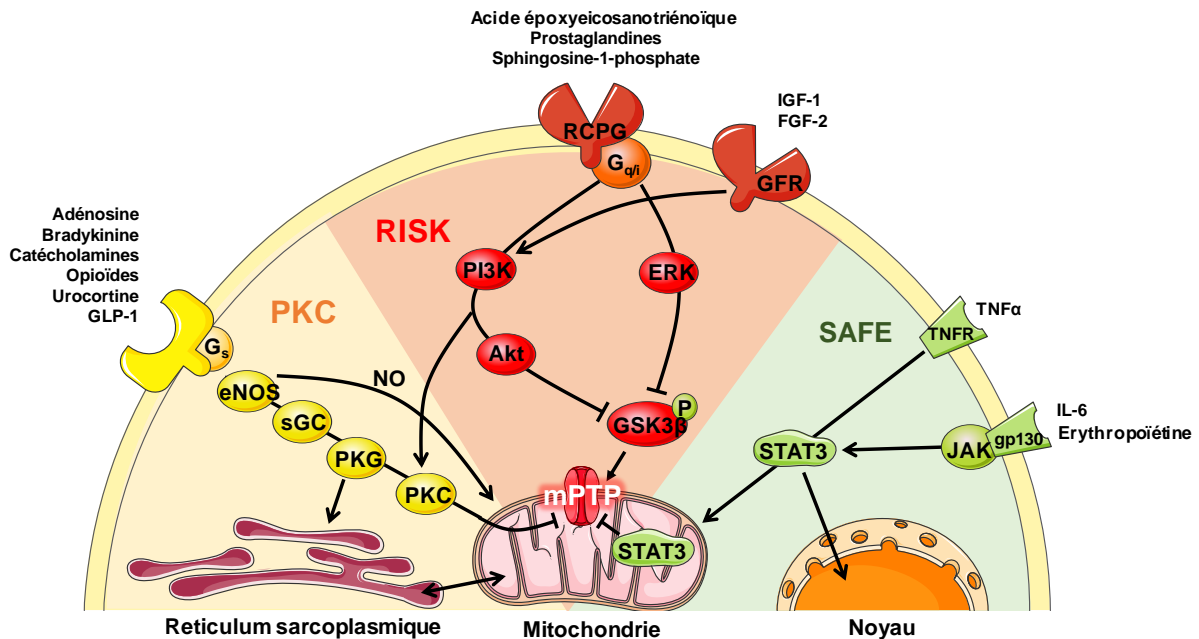


Figure 12 : Schéma simplifié des principales voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection. La cardioprotection repose sur l'existence de trois voies de signalisation : la voie de la protéine kinase C (PKC), la voie RISK (Reperfusion Induced Salvage Kinase) et la voie SAFE (Survival Activation Factor Enhancement).

5.2.1.4.1.3. Effets métaboliques et homéostasiques

Lors du post-conditionnement, la reperfusion graduelle permet de diminuer la production de stress oxydant en limitant l'apport brutal d'oxygène qui peut être délétère pour les cardiomyocytes et l'endothélium (Zhao *et al.*, 2003). En plus de cet effet sur la production d'ERO, le post-conditionnement permet également de limiter la surcharge calcique consécutive à l'activation des transporteurs NHE et NCX (Sun *et al.*, 2005).

5.2.1.4.1.4. Stimulation des voies de survie cellulaire

5.2.1.4.1.4.1. Activation de la voie RISK

Les trois stratégies de conditionnement ischémiques stimulent la voie RISK via l'action de différents ligands sur des récepteurs couplés aux protéines G. Cette voie de signalisation regroupe plusieurs kinases dont la PI3K, Akt et ERK1/2. Certaines cibles des kinases de cette voie, la protéine kinase G (PKG), GSK-3 β et l'hexokinase II ont un effet direct sur la mitochondrie. Le recrutement d'Akt permet la phosphorylation de l'eNOS et, par l'intermédiaire du GMPc, la stimulation de l'axe PKG-PKC. L'action de la PKG sur la PKC- ϵ mitochondriale entraîne l'ouverture des canaux mKATP. L'ouverture de ces canaux possède

un pouvoir cardioprotecteur grâce à deux effets distincts. Tout d'abord, l'ouverture des canaux mKATP entraîne une légère dissipation du $\Delta\Psi_m$ qui permet de limiter l'entrée de calcium dans la matrice mitochondriale. De plus, l'ouverture de ces canaux entraîne une légère production d'ERO qui permet de stimuler certaines voies de protection (Costa et Garlid, 2008).

Une autre cible importante de la voie RISK est la GSK-3 β , une kinase impliquée dans une grande variété de processus cellulaires dont les processus apoptotiques. La phosphorylation de GSK-3 β entraîne son inhibition et limite l'ouverture du mPTP (Juhaszova *et al.*, 2004 ; Obame *et al.*, 2008) probablement en empêchant sa liaison avec l'ANT ou avec la CypD (Nishihara *et al.*, 2007 ; Rasola *et al.*, 2010).

Enfin, la stimulation de la voie RISK inhiberait la translocation de Bax vers la mitochondrie (Tsuruta *et al.*, 2002).

5.2.1.4.1.4.2. Activation de la voie SAFE

La voie SAFE repose sur le recrutement de la voie de signalisation JAK-STAT3 (Lacerda *et al.*, 2009). Elle peut être stimulée par l'action du TNF α sur son récepteur membranaire TNFR2 et par l'action de facteurs de croissance ou de cytokines de type IL-6 sur la protéine gp130. Cette voie est en partie responsable des effets à plus long terme des conditionnements ischémiques. En effet, son activation aboutit à la translocation nucléaire de la forme dimérisée de STAT3 qui permet la synthèse de diverses protéines cardioprotectrices ou anti-apoptotiques telles que l'hème-oxygénase 1, la cyclo-oxygénase 2, Bcl-2 ou encore Bcl-xl (Bolli *et al.*, 2011). Toutefois, bien que STAT3 soit un facteur de transcription, la voie SAFE induit également une protection rapide sans lien avec son activité nucléaire. Parmi ces effets directs, la forme phosphorylée de STAT3 et son adressage à la mitochondrie lors du post-conditionnement améliore le fonctionnement du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et diminue la sensibilité des mitochondries à la surcharge calcique (Wegrzyn *et al.*, 2009). Enfin, l'activation de la voie SAFE entraîne également la phosphorylation inhibitrice de Bad et de GSK-3 β (Lecour *et al.*, 2005 ; Gross *et al.*, 2006).

5.2.1.4.1.5. Inhibition du PTP

Les différentes voies impliquées dans la cardioprotection induite par les conditionnements ischémiques convergent vers la mitochondrie. L'effet principal de la stimulation de ces différentes voies repose sur la diminution de la production de stress oxydant, acteur majeur de

l'ouverture du mPTP. Javadov *et al.* (2003) ont ainsi montré que le pré-conditionnement ischémique inhibe l'ouverture du mPTP. Il a également été démontré que le post-conditionnement inhibe la transition de perméabilité mitochondriale en diminuant la sensibilité des mitochondries à la surcharge calcique (Argaud *et al.*, 2005).

L'importance relative de chaque voie de signalisation impliquée dans la cardioprotection reste à ce jour controversé et semble dépendre grandement de l'espèce étudiée et des modèles employés.

5.2.1.4.2. Post-conditionnement pharmacologique

Le post-conditionnement ischémique ne peut être entrepris qu'au décours d'une angioplastie et ne peut donc pas être réalisé chez des patients reperfusés par thrombolyse intraveineuse. On conçoit donc la nécessité de développer des traitements médicamenteux ciblant les lésions de reperfusion administrables quelle que soit la technique de reperfusion utilisée. Plusieurs agents pharmacologiques ont ainsi été développés au cours de ces dernières décennies et ciblent les principales étapes aboutissant aux lésions de reperfusion.

5.2.1.4.2.1. Agents pharmacologiques limitant la surcharge calcique

Dès les premières minutes de la reperfusion, l'activation successive du NHE et du NCX permet une normalisation rapide du pH_i mais elle induit également une surcharge calcique. L'association de ces deux stimuli, surcharge calcique et alcalose transitoire, favorise l'ouverture du mPTP. Il apparaissait donc intéressant de pouvoir agir en amont de ces phénomènes, en inhibant ces transporteurs.

Cette hypothèse a conduit au développement d'inhibiteurs sélectifs du NHE-1 tels que le cariporide et l'éniporide. Dans des modèles pré-cliniques, ces puissants inhibiteurs possèdent des effets cardioprotecteurs notamment en inhibant l'apoptose (Chakrabarti *et al.*, 1997), la déplétion en ATP (Ruiz-Meana *et al.*, 2003), les phénomènes d'hypercontracture (Schäfer *et al.*, 2000), le recrutement de neutrophiles ou la dysfonction endothéliale (Gumina *et al.*, 2000 ; Hattori *et al.*, 2001). D'un point de vue clinique, si l'administration de cariporide avant la reperfusion a permis de diminuer la taille d'infarctus chez un petit nombre de patients (Rupprecht *et al.*, 2000), l'étude ESCAMI (*Evaluation of the Safety and Cardioprotective effect of eniporide in Acute Myocardial Infarction*) incluant 1400 patients n'a pas permis de mettre en évidence un effet cardioprotecteur (Zeymer *et al.*, 2001). L'échec de cet essai pourrait être dû aux modalités d'administration ou aux critères d'inclusion des patients. De

plus, le NHE n'est pas le seul transporteur permettant la normalisation du pH. En effet, une activité accrue du symporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ en présence d'inhibiteurs du NHE pourrait contourner leur effet.

Une autre stratégie pour limiter la surcharge calcique consiste à inhiber le NCX. Cependant, le NCX n'exerce ses effets délétères que lorsqu'il fonctionne en mode inverse. L'inhibition du NCX n'est donc bénéfique qu'au sein d'une fenêtre thérapeutique étroite. Le caldaret, un inhibiteur du mode inverse du NCX, permet de limiter les lésions de reperfusion chez le chien lorsqu'il est administré lors de la reperfusion (Kawasumi *et al.*, 2007). Les essais cliniques CASTEMI et EVOLVE n'ont toutefois pas permis de démontrer son pouvoir cardioprotecteur chez l'Homme (Bär *et al.*, 2006 ; Jang *et al.*, 2008).

Enfin, une autre stratégie consiste à inhiber l'entrée du calcium dans la mitochondrie. Plusieurs substances ont montré des effets protecteurs dans différents modèles expérimentaux. Ainsi, l'utilisation du rouge de ruthénium, un inhibiteur du MCU, limite la surcharge calcique mitochondriale et possède des propriétés cardioprotectrices (Ferrari *et al.*, 1982 ; Miyamae *et al.*, 1996). Dans un modèle de cœur isolé perfusé, l'administration de 2,4-dinitrophénol, un agent découplant, permet de limiter l'entrée de calcium lors de la reperfusion en diminuant le potentiel de membrane (Elz et Nayler, 1988). Le diazoxide permet également d'obtenir une légère diminution du potentiel de membrane en activant les canaux potassiques mitochondriaux dépendants de l'ATP (mKATP). Cette diminution de potentiel serait liée à l'entrée de K^+ et limiterait la surcharge calcique (Garlid *et al.*, 1997).

5.2.1.4.2.2. Agents limitant le stress oxydant

D'un point de vue pré-clinique, l'utilisation d'antioxydants permet de limiter les lésions d'ischémie-reperfusion dans différents modèles. Certains composés piègeurs d'ERO comme l' α -phényl N-*tert*-butyl nitron (Bolli *et al.*, 1988), la N-(2-mercaptopropionyl)-glycine (Horwitz *et al.*, 1994) ou l'édivarone (Rajesh *et al.*, 2003) permettent de diminuer la taille d'infarctus chez le chien ou le rat. D'autres molécules dérivées de la SOD permettent d'augmenter la dégradation des ERO et d'en limiter les effets délétères (Ambrosio *et al.*, 1986 ; Bognar *et al.*, 2006).

En revanche, l'efficacité des traitements antioxydants chez l'homme est très limitée et sujette à controverse. En effet, l'administration de vitamine E ou d'analogues de la SOD chez des patients présentant un infarctus du myocarde ne permet pas d'améliorer le pronostic (Flaherty *et al.*, 1994 ; Yusuf *et al.*, 2000). Cependant, l'essor de composés adressés plus

spécifiquement à la mitochondrie (Adlam *et al.*, 2005) ou ciblant d'autres voies (Schmidt *et al.*, 2015) pourrait s'avérer plus prometteur.

5.2.1.4.2.3. Agents pharmacologiques activant la voie RISK

L'activation de la voie RISK repose sur la stimulation de récepteurs couplés aux protéines G. Elle peut être obtenue par un grand nombre de ligands tels que l'adénosine (Olafsson *et al.*, 1987), la bradykinine (Bell et Yellon, 2003), la morphine (Gross *et al.*, 2004) ou encore l'érythropoïétine (Tamareille *et al.*, 2009).

Certains de ces ligands ont donné lieu à des essais cliniques. C'est notamment le cas de l'adénosine. Cependant, là encore, si cette molécule paraissait prometteuse en diminuant la taille d'infarctus lors de l'essai clinique AMISTAD I (*Acute Myocardial Infarction Study of ADenosine* ; Mahaffey *et al.*, 1999), les résultats d'AMISTAD II se sont révélés décevants puisque l'administration d'adénosine n'a pas permis de réduire le développement de l'insuffisance cardiaque et la mortalité (Ross *et al.*, 2005). Des essais cliniques ont aussi été réalisés avec l'érythropoïétine mais les résultats obtenus par les différents centres ne concordent pas (Ferrario *et al.*, 2009 ; Prunier *et al.*, 2012). Un autre essai clinique étudie actuellement l'effet de l'injection intracoronaire de morphine lors de la reperfusion (Essai MIAMI ; *Morphine in Acute Myocardial Infarction* ; NCT01186445).

Enfin, il est également possible de stimuler directement les intermédiaires de la voie RISK. En effet, il a été montré que l'administration d'atorvastatine au moment de la reperfusion permet de réduire la taille d'infarctus chez la souris en stimulant la voie PI3K/Akt indépendamment de son effet sur l'HMG-CoA réductase. L'essai clinique ARMYDA-ACS a confirmé ces résultats chez l'homme puisque l'administration de fortes doses d'atorvastatine a permis de diminuer les lésions myocardiques (Patti *et al.*, 2007).

5.2.1.4.2.4. Agents ciblant la mitochondrie

Toutes les voies de signalisation de la cardioprotection convergent vers la mitochondrie. Il paraît donc intéressant d'intervenir en aval de ces voies, en ciblant la mitochondrie et notamment le mPTP (Morin *et al.*, 2009). Pourtant, si la plupart des stratégies citées précédemment aboutissent in fine à une diminution de l'ouverture du mPTP, peu de traitements ciblent directement le mPTP. Ceci est en partie expliqué par l'absence de consensus sur la structure exacte de ce pore qui rend difficile le développement d'agents

pharmacologiques spécifiques mais une stratégie prometteuse consiste à inhiber l'activité de la CypD. Cette approche est détaillée au chapitre suivant.

5.2.1.4.2.5. Perspectives du post-conditionnement pharmacologique

À l'heure actuelle, la recherche de traitements médicamenteux utilisables en post-conditionnement pharmacologique a souvent abouti à des échecs durant les essais cliniques. Ces échecs peuvent être attribués à de mauvais choix de doses ou de délais d'administration. D'autre part, si beaucoup de résultats semblent prometteurs lors des études pré-cliniques, leur transposition clinique reste problématique, notamment en raison des différences physiopathologiques entre les modèles animaux d'ischémie-reperfusion et les syndromes coronaires rencontrés chez l'homme (Ludman *et al.*, 2010). En effet, la plupart des études pré-cliniques sont réalisées chez des animaux jeunes et sains. Or, nous savons que ce n'est pas le cas des patients subissant un infarctus et que certaines comorbidités telles que l'âge, le diabète ou l'obésité modifient les voies de signalisation cellulaires et diminuent l'efficacité des stratégies cardioprotectrices (Ferdinandy *et al.*, 2007). Néanmoins, bien que l'engouement pour l'inhibition de la CypD ait été contrarié par les résultats de l'essai CIRCUS (Cung *et al.*, 2015), le développement d'agents ciblant la mitochondrie et en particulier le mPTP reste une voie prometteuse.



Mitochondria and aging: A role for the mitochondrial transition pore?

Mathieu Panel^{1,2} | Bijan Ghaleh^{1,2} | Didier Morin^{1,2}

¹INSERM U955, équipe 3, Créteil, France

²Université Paris-Est, UMR_S955, DHU A-TV, UPEC, Créteil, France

Correspondence

Didier Morin, INSERM U955 – équipe 3, Faculté de Médecine de Créteil, 8, rue Général Sarrail, 94010 Créteil Cedex, France. Email: didier.morin@inserm.fr

Funding information

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Grant/Award Number: 2014-140

Summary

The cellular mechanisms responsible for aging are poorly understood. Aging is considered as a degenerative process induced by the accumulation of cellular lesions leading progressively to organ dysfunction and death. The free radical theory of aging has long been considered the most relevant to explain the mechanisms of aging. As the mitochondrion is an important source of reactive oxygen species (ROS), this organelle is regarded as a key intracellular player in this process and a large amount of data supports the role of mitochondrial ROS production during aging. Thus, mitochondrial ROS, oxidative damage, aging, and aging-dependent diseases are strongly connected. However, other features of mitochondrial physiology and dysfunction have been recently implicated in the development of the aging process. Here, we examine the potential role of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) in normal aging and in aging-associated diseases.

KEYWORDS

age-associated diseases, aging, calcium, mitochondria, mPTP, oxidative stress

1 | INTRODUCTION

Aging is a physiological process occurring over life that induces a general decline of physical and mental capacities. Despite numerous studies, the mechanisms of aging remain to be established. Aging is associated with dysfunction of organs and alteration of their performance, such as hearing failing or muscle weakness, which can lead to a loss of independence but also to the development of diseases. Therefore, a better knowledge of the mechanism of aging would contribute to improve the quality of life of the elderly. Several theories have been proposed to explain the mechanisms of aging (Allison et al., 2014; Park & Yeo, 2013). They include among others genetic predisposition, programmed senescence, DNA damage, endocrine dysfunction, or the free radical hypothesis. It is likely that the mechanisms described in these theories may participate to those of aging but none of them can directly explain the causes of aging. Another theory centered on mitochondrial dysfunction was proposed half a century ago (Harman, 1972). This theory is closely linked to the free

radical hypothesis of aging but also involves genetic and bioenergetic alterations. Mitochondria are central organelles in the cell. They are present in all cells of humans and animals (except red blood cells). They generate cellular energy, produce reactive oxygen species (ROS) that regulate physiological processes (Angelova & Abramov, 2016), and are involved in the control of cell death (Galluzzi, Kepp, Trojel-Hansen, & Kroemer, 2012). Therefore, it is not surprising that mitochondria could be involved in the normal mammalian aging process. One of the unique characteristics of mitochondria is that they possess their own genetic material in the form of a close circular DNA molecule. According to this latter theory, aging of cells would be due to the constant delivery of ROS inside mitochondria throughout life, damaging mitochondrial DNA which is vulnerable as it is not protected by protein histones or repairing enzymes such as nuclear DNA. The damaged mitochondrial DNA leads to deficiency of key electron transport enzymes and subsequent ROS generation, thus causing a vicious cycle of ROS resulting in a decrease in energy production (Fariss, Chan, Patel, Van Houten, & Orrenius, 2005).

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2018 The Authors. *Aging Cell* published by the Anatomical Society and John Wiley & Sons Ltd.

Although a large amount of data support the role of mitochondrial ROS production in aging, other features of mitochondrial physiology and dysfunction, including the mitochondrial permeability transition, have been more recently implicated in the mechanisms of aging (Balaban, Nemoto, & Finkel, 2005; Bratic & Larsson, 2013; Gonzalez-Freire et al., 2015; Payne & Chinnery, 2015).

The mitochondrial permeability transition has been characterized by the pioneering work of Hunter and Haworth and corresponds to the sudden increase in the permeability of the inner mitochondrial membrane to molecules of molecular mass up to 1,500 Da (Haworth & Hunter, 1979; Hunter & Haworth, 1979a, 1979b). The opening is due to a nonspecific pore called the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) occurring when mitochondria become overloaded with calcium. The sensitivity of the mPTP to calcium is enhanced under oxidative stress conditions, adenine nucleotide depletion, high phosphate concentrations, or membrane depolarization (Halestrap & Richardson, 2015). mPTP opening induces swelling of the organelle matrix, collapse of membrane potential, and uncoupling of oxidative phosphorylation (Crompton, 1999). This phenomenon plays a critical role in different types of cell death. Although the conditions leading to permeability transition are well known, the exact composition of the pore remains unknown. Many proteins were thought to form the core of the pore across the mitochondrial membrane but they have been successively ruled out by genetic modulation. This is the case for the voltage-dependent anion channel (VDAC) and the translocator protein (TSPO) in the outer membrane (Baines, Kaiser, Sheiko, Craigen, & Molkenin, 2007; Kokoszka et al., 2004). Recent data propose a role for ATP synthase as the major component of a multiprotein complex (Bernardi, Rasola, Forte, & Lippe, 2015). Currently, a common agreement considers that cyclophilin D (CypD), a soluble protein located within the mitochondrial matrix, is the main partner of the mPTP (Gutiérrez-Aguilar & Baines, 2015) and that mPTP formation is greatly sensitized by CypD which lowers the calcium threshold required to trigger mPTP opening. The crucial role of CypD has been shown by deletion of the gene in mice, allowing mitochondria to sustain high calcium concentrations and thus conferring major desensitization of mPTP (Baines et al., 2005). Two opening states of the pore have been distinguished, a permanent or long-lasting state which is associated with cell death, and a transient opening state having a physiological role by providing a pathway to release ROS and calcium from mitochondria which is also regulated by CypD (Elrod et al., 2010; Hausenloy, Wynne, Duchon, & Yellon, 2004; Petronilli et al., 1999). The mPTP is now considered to be central in numerous conditions such as heart, brain, or liver ischemia–reperfusion (Frigberg & Wieloch, 2002; Halestrap, 2010; Kim, He, Qian, & Lemasters, 2003; Morin, Hauet, Spedding, & Tillement, 2001; Rauen & de Groot, 2004), drug-induced liver injury (Jaeschke, McGill, & Ramachandran, 2012), age-related neurodegenerative diseases (Rao, Carlson, & Yan, 2014), and accumulating data imply the mPTP in organ dysfunction occurring during aging (Hepple, 2016; Rocha-Rodrigues et al., 2013; Toman & Fiskum, 2011). Conversely, caloric restriction, which is a proven strategy to delay aging and age-related disease (Balasubramanian, Howell, & Anderson,

2017), is associated with the inhibition of mPTP opening (Amigo, Menezes-Filho, Luévano-Martínez, Chausse, & Kowaltowski, 2017; Hofer et al., 2009; Kristal & Yu, 1998; Menezes-Filho et al., 2017).

The aim of this review is to summarize the current data showing a relationship between mPTP opening and aging. We will analyze this relationship through the alterations of the cellular stimuli involved in the two processes, the modification of the proteins that are considered as components of the pore and finally, we will show that mPTP opening is involved in the occurrence of different pathologies during aging.

2 | EXPERIMENTAL EVIDENCE SUPPORTING THE INVOLVEMENT OF THE MPTP DURING AGING

Mitochondrial dysfunction is considered as a main feature of aging (Bratic & Larsson, 2013; López-Otín, Blasco, Partridge, Serrano, & Kroemer, 2013). When a cell ages, the efficiency of oxidative phosphorylation decreases, reducing ATP production. This impairs mitochondrial function and results in an aging phenotype, more particularly in organs requiring a high energy supply such as the heart, muscles, brain, or liver. The regulation of mPTP opening is also altered by aging as demonstrated in mitochondria isolated from various aged or senescent tissues. This may be related to the similarity of the stimuli involved in mPTP opening and cellular aging.

An increased sensitivity to calcium overload was observed in mitochondria isolated from senescent rat heart (Fernandez-Sanz et al., 2015; Jahangir, Ozcan, Holmuhamedov, & Terzic, 2001; Ljubicic, Menzies, & Hood, 2010; Petrosillo, Moro, Paradies, Ruggiero, & Paradies, 2010). This effect was confirmed in permeabilized cardiomyocytes (Picard, Wright, Ritchie, Thomas, & Hepple, 2012) but may be restricted to interfibrillar mitochondria (Fernandez-Sanz et al., 2015; Hofer et al., 2009). An enhanced susceptibility to mPTP opening was also found in brain (Krestinina et al., 2015; Marques-Aleixo et al., 2012; Mather & Rottenberg, 2000) and appeared to depend on the brain area tested (Brown, Geddes, & Sullivan, 2004; LaFrance, Brustovetsky, Sherburne, DeLong, & Dubinsky, 2005), in the liver (Goodell & Cortopassi, 1998; Mather & Rottenberg, 2000), and in lymphocytes (Rottenberg & Wu, 1997). More recently, Picard, Ritchie, Thomas, Wright, and Hepple (2011) described an impaired mPTP function with aging in fast muscles of the rat that was also observed in aged human muscles (Gouspillou et al., 2014), showing that this phenomenon is not restricted to animal models of aging. Sensitization of mPTP opening was also involved in the bone loss occurring in aging mice (Shum et al., 2016). However, it should be kept in mind that most of these data were obtained in isolated mitochondria, which may amplify mitochondrial functional impairment (Picard et al., 2010).

Other studies also showed that mPTP regulation is dysfunctional in the aged myocardium. Indeed, pharmacological mPTP inhibitors failed to produce significant effects in either normal or stressed conditions. For instance, cyclosporin A (CsA) was unable to inhibit carboxyatractyloside-induced permeability transition in aged mitochondria

(García, Zazueta, Martínez-Abundis, Pavón, & Chávez, 2009) and to prolong the time necessary to induce mPTP opening in isolated mitochondria (Duicu et al., 2013) and in cardiomyocytes isolated from old rats (Liu, Zhu, Brink, Glass, & Rebecchi, 2011). Similarly, the ability of sevoflurane and isoflurane conditioning (Li et al., 2013; Zhu et al., 2010) and of the GSK-3 β inhibitor SB-216763 (Zhu, Rebecchi, Glass, Brink, & Liu, 2011) to protect against myocardial ischemia–reperfusion injury, which is mediated by inhibition of mPTP opening in young rats, is abrogated in senescent animals. Taken together, these data support the hypothesis of mPTP activation during aging in rodents. This is consistent with the increased apoptotic susceptibility observed in different organs (Chabi et al., 2008; Kwak, Song, & Lawler, 2006), although mechanisms other than mPTP activation for the induction of apoptosis have been proposed (Chabi et al., 2008).

3 | REGULATING FACTORS OF MPTP AND AGING

3.1 | Calcium homeostasis, mPTP, and aging

Elevated matrix calcium was the first factor described to activate mPTP opening (Haworth & Hunter, 1979). Although calcium overload is still considered as essential, other factors, such as oxidative stress, adenine nucleotide depletion, or high phosphate concentrations, are also involved in the formation and/or in the regulation of the pore. These factors enhance the sensitivity of the mPTP to calcium that possesses binding sites in the mitochondrial inner membrane facing the matrix (Halestrap & Richardson, 2015). Therefore, the level of cellular calcium can influence mPTP occurrence. Aging alters cytosolic calcium handling. This has been clearly demonstrated in the heart where aging impairs the myocardial calcium transport system, calcium storage capacities, and contractile function (Besse et al., 1994; Feridooni, Dibb, & Howlett, 2015; Frolkis et al., 1988; Kaplan et al., 2007). This was recently confirmed in myocytes isolated from human right atria (Herraiz-Martínez et al., 2015) and suggests a progressive decline in right atrial contractile function with age.

The enhancement of basal calcium levels can promote the activation of calcium-dependent enzymes such as phospholipases, proteases, and nucleases and can alter oxidative phosphorylation (Jahangir et al., 2001). This may predispose mitochondria to calcium overload and therefore to mPTP opening. This phenomenon is reinforced under stress such as ischemia–reperfusion (Jahangir, Sagar, & Terzic, 2007). Aging also impairs calcium communication between sarcoplasmic reticulum and mitochondria which are tightly interconnected in cardiac cells (Szalai, Csordás, Hantash, Thomas, & Hajnóczky, 2000). This defective communication alters calcium transfer and contributes to a deficiency in energy production and to an increase in oxidative stress in the aged heart (Fernandez-Sanz et al., 2014). A similar mechanism was observed in heart failure and may be involved in the initiation and progression of the disease (Kohlhaas & Maack, 2013).

Disturbances in calcium regulation and mitochondrial homeostasis may also contribute to the decline of muscle performance in aging (for review, see Del Campo, Jaimovich, & Tevy, 2016). Indeed,

Pietrangelo et al. (2015) described an age-related structural uncoupling between calcium release units and mitochondria which could impair the control of calcium levels in muscle and consequently the efficiency of ATP synthesis. The dysregulation of neuronal calcium homeostasis has also been identified as playing an important role in the process of normal aging in brain. This “calcium hypothesis of neuronal aging” has evolved over time, and the concomitant perturbations of cellular calcium, mitochondrial function, and oxidative stress are now considered to participate to the neuron degeneration occurring during aging (Toescu & Vreugdenhil, 2010). Whether mPTP opening is involved in this process remains an open question. However, recent data showed that aging reduced ATP synthesis and mitochondrial calcium buffering capacities and increased the sensitivity of mPTP formation in the putamen of aged monkeys. This was correlated with a reduction in locomotor activity compared with younger animals (Pandya et al., 2015).

Taken together, these data indicate that the disturbance of calcium cellular homeostasis may contribute to the aging process, more particularly in the excitable cells. Increasing evidence suggests that this alteration can affect mitochondrial energy production and promote oxidative stress (Figure 1). However, the available information does not allow to draw definite conclusions on a possible role of calcium dysregulation in the occurrence of mPTP opening in healthy aging, although calcium is a major actor in the induction of mPTP opening.

3.2 | ROS generation, mPTP, and aging

It is well known that mitochondria are producers of ROS. The electron leakage in the electron transport chain during respiration is generally considered as the main source of mitochondrial ROS but other mitochondrial enzymatic systems, such as monoamine oxidase and cytochrome b5 reductase in the outer membranes, cytochromes P450 enzymes in the inner membranes, or several matrix enzymes such as aconitase, can also produce ROS (Andreyev, Kushnareva, Murphy, & Starkov, 2015; Andreyev, Kushnareva, & Starkov, 2005). Although mitochondria are not always considered as the main producer of ROS in the cell (NADPH or xantine oxidases being able to produce high levels of ROS), the respiratory chain produces ROS continuously. Reactive oxygen species were initially considered to be toxic molecules but a growing body of evidence suggests that oxidative stress, which is the result of a balance between the formation of ROS and their scavenging by antioxidant defenses, is regulated and participates to the maintenance of redox homeostasis and various cellular signaling pathways. In normal cells, the cellular and mitochondrial levels of ROS are safe and participate to the vital activity of the cell (Angelova & Abramov, 2016; Bae, Oh, Rhee, & Yoo, 2011; Dröge, 2002; Nickel, Kohlhaas, & Maack, 2014). However, under acute and chronic cellular stress conditions (e.g., acute ischemia and neurodegenerative diseases, respectively), the production of ROS is no longer regulated and becomes detrimental for the cell. Evidence also suggests that aging involves a change in ROS regulatory processes encompassing a decline in mitochondrial function and an increase in ROS generation (Brand, 2014; Bratic & Larsson, 2013;

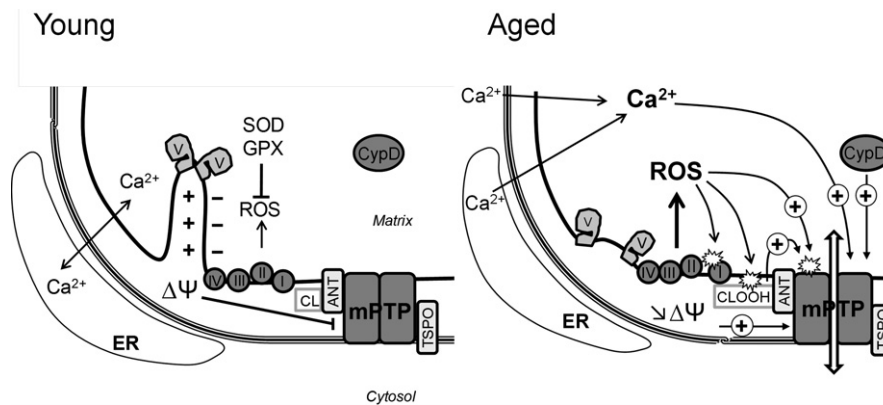


FIGURE 1 Reactive oxygen species (ROS), calcium, membrane potential, and mPTP opening during aging. In mitochondria from young animals, mPTP opening is prevented by the high membrane potential ($\Delta\Psi$), the regulation of the matrix calcium concentration, and ROS detoxification. Aging is characterized by loss of cristae structure due to disassembly of ATP synthase dimers, increased calcium content, and ROS production as well as decline in membrane potential. Alteration in calcium handling results in elevated matrix calcium which is the primary trigger for mPTP opening. Mitochondrial respiratory chain is the main producer and target of ROS. ROS have multiple targets including respiratory chain complexes, leading to defective complexes producing more ROS and lowering membrane potential in a vicious circle. ROS production also promotes cardiolipin (CL) peroxidation (CLOOH) which sensitizes mPTP to calcium overload. Translocator protein (TSPO) and adenine nucleotide translocase (ANT) might also play a role in mPTP opening during aging. ER, endoplasmic reticulum; SOD, superoxide dismutase; GPX, glutathione peroxidase; \perp , inhibition; $(+)\rightarrow$, stimulation

Skulachev & Skulachev, 2014). For instance, monoamine oxidase activity in 24-month-old rat cardiac mitochondria was much stronger than that in 1-month-old rats, showing that monoamine oxidase may be an important source of ROS in the aging heart (Di Lisa, Kaludercic, Carpi, Menabo, & Giorgio, 2009; Maurel et al., 2003). In this context, an interesting relationship was found between the rate of ROS production during mitochondrial reverse electron transport in vitro and lifespan in vertebrate homeotherms (Lambert et al., 2007). Several reviews have described the mechanisms of ROS production in mitochondria and discussed their potential contribution in aging (Balaban et al., 2005; Brand, 2010). Here, we will only give a brief summary and we will focus on the possible link between ROS production and mPTP opening during aging.

Mitochondrial ROS are primarily the result of the inefficient transfer of electrons through the electron transfer chain, and this effect was reported to increase with age. This was assigned to the decline in the electron transfer chain capacity, the dysfunction of respiratory complexes, the decrease in ROS scavenging enzymes, and the induction of mutations of mitochondrial DNA, which is susceptible to oxidative damage because it lacks protection from ROS and because of its proximity to them (Balaban et al., 2005; Genova & Lenaz, 2015; Hoppel, Lesnefsky, Chen, & Tandler, 2017; Kwon, Choi, Cho, & Lee, 2015). It was suggested that the accumulation of these mutations in turn deteriorates electron transfer chain function and further increases ROS production, leading to a deleterious vicious cycle. These data are the basis of the mitochondrial free radical theory of aging. Numerous data argue in favor of the central role of ROS in aging, and a progressive mitochondrial dysfunction with increased levels of oxidized lipids and proteins is always considered a hallmark of aging (Skulachev & Skulachev, 2014). The beneficial effects of mitochondria-targeted drugs such as plastoquinone derivatives (Anisimov et al., 2008, 2011) or MitoTEMPO (Miura et al.,

2017; Owada et al., 2017) and of endogenous indoleamine melatonin (Escames et al., 2010; Paradies, Paradies, Ruggiero, & Petrosillo, 2017) reinforce this theory. Similarly, mice deleted for the gene of the p66shc adaptor protein have reduced ROS generation and delayed aging (Migliaccio et al., 1999; Napoli et al., 2003). However, new recent data challenged this hypothesis as they show that ROS can be beneficial and extend lifespan at least in lower organisms such as flies and worms (Sanz, 2016; Sena & Chandel, 2012). Accumulating evidence suggests that other aspects of mitochondrial physiology must be considered to explain the contribution of mitochondria to aging (Gonzalez-Freire et al., 2015; Payne & Chinnery, 2015).

Reactive oxygen species decrease the calcium concentration needed for mPTP opening and thus sensitize mPTP opening (Figure 1). The increased formation of ROS and the oxidation of mitochondrial membrane lipids and proteins associated with mPTP are thus likely to promote mPTP opening during aging. This is what was observed with cardiolipin, a phospholipid that is specific of mitochondria and plays a major role in the molecular organization and the function of the inner mitochondrial membrane, interacting with many proteins (Klingenberg, 2009; Schlame & Greenberg, 2017). As cardiolipin is located close to the sources of ROS production and contains high level of unsaturated fatty acids, it is susceptible to lipid peroxidation. Oxidized cardiolipin was shown to sensitize heart mitochondria to mPTP opening (Petrosillo, Casanova, Matera, Ruggiero, & Paradies, 2006). The level of cardiolipin diminishes with age and that of oxidized cardiolipin increases. This has been suggested to be one of the mechanisms responsible for the alteration of the biochemical function of mitochondrial membranes (Paradies, Paradies, Ruggiero, & Petrosillo, 2014). A relevant hypothesis is that the oxidation of cardiolipin might sensitize mPTP opening to calcium during aging. In accordance with this hypothesis, Petrosillo et al. (2010)

demonstrated that the ability of mitochondria to retain calcium, a marker of mPTP sensitivity, is altered during aging. The mechanism may involve the adenine nucleotide translocase (ANT). Indeed, cardiolipin interacts with and plays a key role for the transport of adenine nucleotides by ANT (Hoffmann, Stöckl, Schlame, Beyer, & Klingenberg, 1994), which has long been considered as a structural component of the mPTP. Although deletion experiments have challenged this hypothesis (Kokoszka et al., 2004), additional data demonstrate a role of ANT in facilitating mPTP opening (Halestrap & Richardson, 2015). The oxidation of cardiolipine, which is tightly bound to ANT, could modify its conformation and facilitate mPTP opening.

Oxidation–reduction of critical protein residues could also influence mPTP opening (Chernyak & Bernardi, 1996). More particularly, the oxidation of thiol functions and cysteine residues, which is an important mechanism regulating protein structure, was reported on proteins described to be involved in the formation of the pore or in the regulation of its opening, such as ANT (Costantini et al., 2000; Halestrap, Woodfield, & Connern, 1997), CypD (Nguyen et al., 2011), ATP synthase (Wang, Murray, Chung, & Van Eyk, 2013), or complex I of the respiratory chain (Chouchani et al., 2013). As both glutathione and cysteine systems become oxidized during aging (Go & Jones, 2017), this can contribute to mPTP opening. For instance, ANT contains three redox-sensitive cysteines that are particularly prone to oxidation during aging (Yan & Sohal, 1998).

3.3 | Membrane potential, mPTP, and aging

Several studies have shown that the mitochondrial membrane potential is lower in aged cells (Sastre et al., 1996; Sugrue & Tatton, 2001). This may have consequences on mPTP opening as mPTP is a voltage-dependent channel which tends to open upon depolarization (Figure 1). In vitro, depolarization induces mPTP opening when mitochondria have been suitably loaded with calcium (Scorrano, Petronilli, & Bernardi, 1997). The reason for this decrease in mitochondrial membrane potential during aging is unknown but the enhancement of ROS formation, which is likely to modify mitochondrial membrane components and to promote mitochondrial uncoupling, is probably involved. Indeed, oxidative stress was shown to alter the fluidity and the permeability of membranes (Knobloch, Nelson, Köper, James, & McGillivray, 2015; Runas & Malmstadt, 2015). Whether the decrease in membrane potential is the cause or the result of the activation of mPTP opening is not clearly established. However, data from Rottenberg and Wu (1997) demonstrating that CsA restores mitochondrial potential in aging lymphocytes support the first hypothesis. Aging can also lower the threshold of potential necessary to mPTP opening and thus activate its opening and cell death.

Conversely, a mild decrease in mitochondrial potential caused by protonophores was shown to increase lifespan in yeast (Barros, Bandy, Tahara, & Kowaltowski, 2004), flies (Padalko, 2005) and mice (Caldeira da Silva, Cerqueira, Barbosa, Medeiros, & Kowaltowski, 2008). This is in accordance with data from Delaney et al. (2013) showing in yeast that cells with the lowest mitochondrial membrane potential have the longest subsequent replicative lifespan, but also

with the demonstration that mild uncoupling protects mitochondrial function and contributes to the longevity of the most active human muscle fibers (Amara et al., 2007). A possible reason for this protective effect is the prevention of ROS production which is a well-known consequence of a mild drop in membrane potential (Skulachev, 1998). Another explanation is the initiation of a mitochondrial retrograde response. The decline in potential activates beneficial changes in transcription resulting in increased lifespan (Miceli, Jiang, Tiwari, Rodriguez-Quinones, & Jazwinski, 2012). It must be mentioned that the reduction in membrane potential must be mild to avoid reaching the critical value for mPTP opening.

3.4 | Nicotinamide adenine nucleotides, mPTP, and aging

Several data suggest that aging reduces cellular nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺). This was observed in several organs in mice and in *Caenorhabditis elegans*. There is also evidence of NAD⁺ reduction in aged human tissues (Fang et al., 2014; Massudi et al., 2012; Mills et al., 2016; Mouchiroud et al., 2013; Zhang et al., 2016; Zhu, Lu, Lee, Ugurbil, & Chen, 2015). Conversely, supplementation with NAD⁺ precursors or overexpression of a NAD⁺ synthetic enzyme nicotinamidase have been reported to extend lifespan and to improve healthspan in different species (for review, see Fang et al., 2017). Conversion of NAD⁺ to NADH plays a key role in mitochondrial metabolism. NAD⁺ is reduced in NADH by four steps of the tricarboxylic acid cycle and during the oxidation of fatty and amino acids. NADH provides electrons to complex I of the respiratory chain to establish a protonmotive force which is responsible for ATP synthesis. A drop in NAD⁺ cellular levels can therefore limit NADH generation and consequently decrease mitochondrial membrane potential and oxidative phosphorylation. As previously mentioned, a drop in mitochondrial potential favors the frequency and the duration of mPTP opening which in turn can induce the release of NAD⁺ from mitochondria and thus contribute directly to its mitochondrial depletion during aging. In addition, the electron transport chain via NADH produces NAD⁺ and the decrease in mitochondrial NADH will contribute to the decline in mitochondrial NAD⁺. This decrease in NADH can also participate to mPTP opening as evidence shows that mitochondria are more susceptible to mPTP when the antioxidant power is exhausted (Kowaltowski, de Souza-Pinto, Castilho, & Vercesi, 2009).

Another important consequence of mitochondrial NAD⁺ depletion is the inhibition of mitochondrial sirtuin (SIRT) activity, especially SIRT3. Sirtuins are NAD⁺-dependent deacetylases that have been linked to lifespan prolongation in humans (Bellizzi et al., 2005) and involved in the response to nutritional and environmental perturbations such as DNA damage and oxidative stress (Sack & Finkel, 2012; Satoh, Stein, & Imai, 2011). SIRT3 plays a critical role in the protection of mitochondria and has received much attention for its role in aging (Ansari et al., 2017; Sadoshima, 2011). More particularly, SIRT3 was shown to deacetylate CypD, a component of the mPTP, and to inhibit mPTP opening, thereby reducing oxidative stress and slowing down cardiac aging (Hafner et al., 2010). There is

therefore a discrepancy with the concomitant observations showing that chronic inhibition of mPTP opening in CypD^{-/-} mice is not associated with a decrease but rather to an enhancement of cardiac hypertrophy during aging (Elrod et al., 2010). A possible link between both studies was provided by Nguyen et al. (2013) who demonstrated using CypD^{-/-} mice that CypD could modulate mitochondrial protein acetylation and thus mitochondrial metabolic changes in addition to its mPTP regulating properties.

In summary, the decrease in mitochondrial NAD⁺ levels during aging inactivates SIRT3 and further stimulates mPTP opening, thus reinforcing mitochondrial dysfunction (Figure 2).

4 | PUTATIVE MOLECULAR COMPONENTS OF MPTP AND AGING

Although mPTP activation is critical during the progression of aging, an important question is whether the putative structural components of the mPTP are concomitantly altered with age. The mPTP is a multiprotein complex whose molecular composition has evolved over time. As previously stated, genetic experiments have excluded some proteins such as VDAC, ANT, or TSPO from the main core of the pore and these proteins are now considered to rather have a regulatory role. Among the numerous components that have been proposed, only CypD is recognized as a real regulator of mPTP but it is not a structural pore component. Recent data propose ATP synthase as being the major component of the pore (Bernardi et al., 2015). This hypothesis is a priori counterintuitive as it seems opposite to the primary function of the enzyme, which is to produce energy, and furthermore requires a strict impermeability of the mitochondrial inner membrane. However, solid arguments support this hypothesis. The synthase could form a pore either by dimerization or by the detachment of the c ring subunit in association with the ANT, the phosphate carrier, and the CypD which binds to the oligomycin sensitivity conferral protein subunit of the enzyme (Bonora et al., 2017; Gerle, 2016; Giorgio et al., 2013).

4.1 | ATP synthase and aging

Aging was shown to alter some properties of ATP synthase (Frenzel, Rommelspacher, Sugawa, & Dencher, 2010). Aging could decrease the maximal ATP synthase activity and impact the available ATP concentration in vivo but can also contribute to mPTP activation. An increased number of oxidized cysteine residues and a nitration of specific tyrosines was found in the ATP synthase of aged mouse hearts (Fernandez-Sanz et al., 2015) and in the liver of aging rats (Haynes, Traaseth, Elfering, Fujisawa, & Giulivi, 2010), respectively.

Aging is also associated with post-translationally modified isoforms of the enzyme which were found in three different model species of aging. Interestingly, a post-translational modification of the oligomycin sensitivity conferral protein, which is considered as the ATP synthase binding target of CypD, has been identified in *Podospora anserina* (Groebe et al., 2007). This is in accordance with the progressive age-dependent reorganization of the inner mitochondrial membrane observed in *Podospora anserina*, including disassembly of ATP synthase dimers and formation of contact sites between the inner and the outer membranes (Daum, Walter, Horst, Osiewacz, & Kühlbrandt, 2013; Figure 1). Importantly, the dissociation of ATP synthase dimers may involve CypD, suggesting a role for mPTP in this mitochondrial membrane reorganization.

4.2 | CypD and aging

Besides ATP synthase, proteins regulating mPTP opening are modified by aging. CypD is enhanced in the brain mitochondria of old mice (Gaub, Guo, & Du, 2017) along with its interaction with its ATP synthase binding partner, the oligomycin sensitivity conferral protein, and this can mediate mPTP activation during aging. In contrast, partial deletion of CypD increases lifespan in mice (Vereczki et al., 2017) emphasizing the role of the enzyme in aging. Post-translational modifications of CypD have been suggested to play a role in aging. Oxidative stress observed in aged animals can alter the redox state of CypD, which is controlled by the thioredoxine system

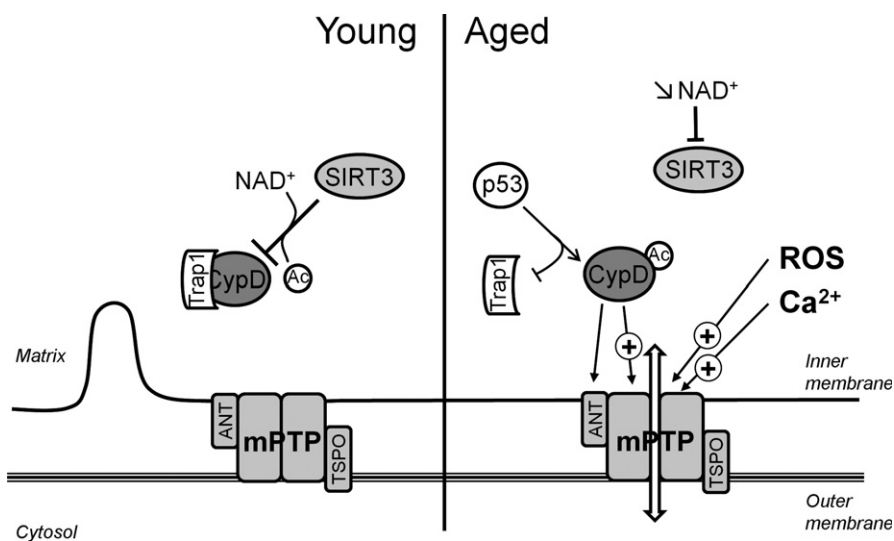


FIGURE 2 Age-related alteration in cyclophilin D (CypD) regulation promotes mPTP opening. In mitochondria from young animals, CypD, the main regulator of mPTP, is inhibited by the Hsp90-related mitochondrial matrix protein Trap1 and sirtuin 3 (SIRT3). CypD is no longer inhibited by association with Trap1 and deacetylation by sirtuin 3. The drop in NAD⁺ pool inhibits SIRT3 deacetylase activity, and translocation of p53 activates CypD by displacing it from Trap1, favoring the translocation of the protein to the mPTP complex. ANT, adenine nucleotide translocase; TSPO, translocator protein; Ac, acetyl; ⊥, inhibition; (+)→, stimulation

(Folda et al., 2016), and may lead to a more oxidized form of a critical site of CypD that may be responsible for mPTP activation (Nguyen et al., 2011). As discussed above, the inhibition of the deacetylation of CypD by SIRT3, resulting from the decrease in both NAD⁺ and SIRT3 levels in old animals, can also contribute to the enhancement of CypD activity and thus to mPTP opening (Hafner et al., 2010; Kwon, Kim, Lee, & Kim, 2015). In addition, SIRT3 regulates ROS-mediated signaling as well as the detoxification of damaging ROS (Van de Ven, Santos, & Haigis, 2017). The decrease in SIRT3 can therefore indirectly amplify oxidative stress and CypD activity during aging (Figure 2).

CypD has also been shown to interact with p53 which is involved in the alteration of the cellular response occurring during aging. In response to oxidative stress, p53 accumulates in the mitochondrial matrix where it forms a complex with CypD and triggers mPTP opening (Vaseva et al., 2012). Recently, Lebedev et al. (2016) suggested a model in which p53 activates CypD by displacing it from Trap1, an Hsp90-related mitochondrial matrix protein that complexes CypD, and maintains it inactive. This process may occur during aging and favors mPTP opening (Figure 2).

4.3 | ANT and aging

CypD was also shown to interact with ANT which was reported to regulate mPTP opening (Crompton, Barksby, Johnson, & Capano, 2002; Woodfield, Rück, Brdiczka, & Halestrap, 1998). An increase in the ratio between CypD and ANT with aging was observed. This may contribute to higher susceptibility to mPTP opening (Marzetti et al., 2008) and to the reduction in affinity of ANT for CypD. An increased phospho-GSK-3 β binding to ANT was suggested to be responsible for the inhibition of mPTP opening (Miura & Tanno, 2010; Nishihara et al., 2007). This mechanism would contribute to the cardioprotective effect of several drugs such as formononetin or resveratrol and of ischemic preconditioning (Cheng, Xia, Han, & Rong, 2016; Xi, Wang, Mueller, Norfleet, & Xu, 2009; Zhu, Rebecchi, Glass, Brink, & Liu, 2013; Zhu, Rebecchi, Wang, et al., 2013). In the aging heart, failure to reduce ANT/CypD interactions or decreased pGSK-3 β responsiveness of ANT could be responsible for the attenuation of cardioprotection afforded by ischemic preconditioning (Zhu, Rebecchi, Glass, et al., 2013; Zhu, Rebecchi, Wang, et al., 2013).

5 | EVIDENCE FOR THE INVOLVEMENT OF MPTP OPENING IN AGE-ASSOCIATED DISEASES

The incidence of pathology increases with age, and this is particularly marked for organs requiring a high and constant energy supply such as the heart, the brain, and the skeletal muscle but also the liver and the kidney. As mitochondria are the provider of energy of the cell, it is not surprising that mitochondrial dysfunction is considered as an important feature of aging (Tocchi, Quarles, Basisty, Gitari, & Rabinovitch, 2015). In this context, mPTP opening is

believed to be involved in numerous age-related disorders which are associated with a proapoptotic cellular environment (Ljubicic et al., 2010).

The incidence of myocardial infarction and heart failure increases with age. The aging heart is more susceptible to the damage induced by myocardial infarction, and most of the studies suggest that cardioprotection with ischemic or pharmacological conditioning becomes less effective (Boengler, Schulz, & Heusch, 2009; Fenton, Dickson, Meyer, & Dobson, 2000; Przyklenk, Maynard, Darling, & Whittaker, 2008; Schulman, Latchman, & Yellon, 2001). mPTP is thought to be a key factor in these processes, and the mechanism responsible for this loss of effectiveness may result from an activation of mPTP. Indeed, mPTP opening and cell death are increased in reperfused aged cardiomyocytes (Fernandez-Sanz et al., 2015). This may be the consequence of the oxidative stress due to the increase in ROS production coupled with a decline in antioxidant defenses (Ferrara et al., 2008; Judge, Jang, Smith, & Hagen, 2005; Meng, Wong, Chen, & Ruan, 2007) prevailing in the aging heart. The observations that a mitochondria-targeted ROS scavenger improved postischemic recovery of cardiac function (Escobales et al., 2014) and that the ROS scavenger Tempol restored pharmacological conditioning in aged rats (Zhu, Rebecchi, Glass, et al., 2013; Zhu, Rebecchi, Wang, et al., 2013) while preventing mPTP opening support this hypothesis.

mPTP opening also plays a role in the neuronal injury relevant to neurodegenerative diseases increasing in aging populations such as Alzheimer's, Parkinson's, and amyloid lateral sclerosis diseases (Angelova & Abramov, 2017; Du et al., 2008; Gandhi et al., 2009; Martin et al., 2009). This is particularly true for Alzheimer's disease which is characterized by the presence of extracellular senile plaques, mainly composed of amyloid- β (A β) peptide and intracellular neurofibrillary tangles made up of hyperphosphorylated tau protein (Selkoe, 2004). Several studies demonstrate that the A β peptide accumulates progressively into mitochondria (Hansson Petersen et al., 2008; Manczak et al., 2006) where it inhibits the activities of the respiratory chain complex and thus oxidative phosphorylation (Hernandez-Zimbron et al., 2012; Lahmy, Long, Morin, Villard, & Maurice, 2015; Tillement, Lecanu, & Papadopoulos, 2011; Tsukada et al., 2014). The A β peptide can also potentially cause mPTP opening in vivo as it induces mitochondrial swelling, decreases mitochondrial membrane potential, and potentiates the effect of mPTP inducers in isolated brain mitochondria (Du et al., 2008; Moreira, Santos, Moreno, & Oliveira, 2001; Shevtzova, Kireeva, & Bachurin, 2001). This can be due to an indirect effect on the pore as the A β peptide has the ability to enhance intracellular calcium (Abramov, Canevari, & Duchen, 2004; Chin, Tse, Harris, & Jhamandas, 2006) and to induce oxidative stress (Lustbader et al., 2004; Reddy & Beal, 2008), which is increasingly recognized as a key factor in neurodegenerative disorders. These effects are possible mechanisms contributing to mPTP opening. Among the various enzymatic sources generating ROS, NADPH oxidase is an important contributor of A β peptide-induced ROS (Abramov et al., 2004) and is considered as a common feature of neurodegenerative diseases. Whether this is a cause or a

consequence of the neurodegenerative process remains questionable (Sorce et al., 2017).

Recent studies also implicate CypD in A β -mediated mPTP. CypD binds to the A β peptide, and A β peptide–CypD complexes were isolated from patients with Alzheimer's disease and transgenic mice (Du, Guo, Zhang, Rydzewska, & Yan, 2011; Du et al., 2008). These complexes potentiate mitochondrial, neuronal, and synaptic stress, and genetic deletion of CypD protects the brain from A β -induced neuronal degeneration (Du et al., 2008, 2014; Guo et al., 2013). Pharmacological inhibition of CypD by CsA was also shown to alleviate the deleterious effect of A β accumulation in isolated brain mitochondria (Moreira et al., 2001). Unfortunately, CsA and CsA derivatives lack clinical significance in Alzheimer's disease because of their side effects and of their poor blood–brain barrier permeability. However, neuronal CypD represents a promising therapeutic target for Alzheimer's disease and the development of nonpeptidic small molecule inhibitors of CypD is a promising approach (Ahmed-Belkacem et al., 2016; Park et al., 2017).

Another promising drug target is the translocator protein (TSPO). Translocator protein is an outer mitochondrial membrane which has long been considered as a component of the mPTP and which regulates mitochondria-mediated apoptotic cell death (Gatliff & Campanella, 2012; Morin, Musman, Pons, Berdeaux, & Ghaleh, 2016). Translocator protein expression is increased in elderly people and in patients with Alzheimer's disease (Kumar et al., 2012; Yasuno et al., 2008). Interestingly, inhibition of TSPO in drosophila inhibited apoptosis, extended fly lifespan, and inhibited A β peptide-induced neurodegeneration (Lin et al., 2014). In addition, Elka-hawy et al. (2017) developed a novel class of TSPO ligands able to modulate A β peptide-induced mPTP opening in hippocampal neuronal cell line.

mPTP opening might also be involved in other neurodegenerative diseases appearing with age. Indeed, CypD deletion studies show benefit in mouse models of amyloid lateral sclerosis and Parkinson's diseases as genetic ablation of CypD delayed the onset of disease and extended lifespan (Martin, Semenkow, Hanaford, & Wong, 2014; Martin et al., 2009), strengthening the role of the mPTP in the mechanisms of both diseases. The beneficial effect observed with a novel small mPTP inhibitor in a mouse model of amyloid lateral sclerosis confirmed that the mPTP could represent an interesting target for drug development in amyloid lateral sclerosis (Martin, Fancelli, et al., 2014). This is in line with the data of Keep, Elmer, Fong, and Csiszar (2001) who observed an improvement by CsA of the motion disorders in an amyloid lateral sclerosis mouse model.

A role of mPTP was also suggested in Huntington's disease (Short review: Quintanilla, Tapia, & Pérez, 2017). Indeed, expression of mutant huntingtin protein alters mitochondrial and cell viability through mPTP opening in striatal cells and cortical neurons (Quintanilla, Jin, von Bernhardt, & Johnson, 2013) and CsA showed protecting effects in a Huntington's disease mouse model (Kumar & Kumar, 2009). This idea was reinforced by the fact that CypD is upregulated in Huntington's patients and that this upregulation increased as Huntington's disease progressed (Shirendeb et al.,

2011). However, other reports did not find such significant contribution of mPTP to mitochondrial injury in Huntington's disease, demonstrating that genetic inactivation of CypD does not modify the onset and the progression of the disease in mice (Brustovetsky et al., 2005; Pellman, Hamilton, Brustovetsky, & Brustovetsky, 2015; Perry et al., 2010).

Finally, it should be noted that the involvement of mPTP opening is not restricted to heart or brain age-associated diseases. For instance, it was recently demonstrated that mitochondria are impaired in aging bone and that a CypD-mPTP mechanism may be involved in aging-related bone loss (Shum et al., 2016).

6 | CONCLUSION

Life expectancy has greatly increased during the last 50 years, and logically, the number of elderly suffering from age-related diseases has progressed concomitantly. It is therefore essential to understand the cellular mechanism of aging to improve the quality of life of the elderly and to apply strategies to fight against the pathologies appearing during aging. Several lines of evidence suggest that the mitochondrion, due to its multiple cellular functions, plays a critical role in aging and age-related diseases. Mitochondrial bioenergetic dysfunction and its generation of damaging ROS were closely associated to aging and age-related diseases. Recently, a large number of studies demonstrated that the mPTP, which is not definitely characterized at the molecular level, is more sensitive to opening in aged animals and in aging-associated diseases and that its inhibition can enhance lifespan. This appears logical as the cellular modifications occurring during aging, that is, impaired calcium homeostasis, increased oxidative stress, oxidative modifications of proteins, enhancement of CypD level, and apoptosis, are factors contributing to and modulated by mPTP opening. However, doubts persist about the involvement of mPTP in the progression of aging and definitive experimental proofs of mPTP involvement have to be provided to demonstrate whether it is a cause or a consequence of aging. A better knowledge of the structural composition and of the regulation of the pore will probably help to elucidate the role of mPTP in longevity and healthspan.

ACKNOWLEDGMENTS

Mathieu Panel was supported by doctoral grants from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Grant Number 2014-140).

CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.P. and D.M. wrote the manuscript. B.G. reviewed the manuscript.

REFERENCES

- Abramov, A. Y., Canevari, L., & Duchon, M. R. (2004). Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochimica et Biophysica Acta*, 6(1742), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.006>.
- Ahmed-Belkacem, A., Colliandre, L., Ahnou, N., Nevers, Q., Gelin, M., Bessin, Y., ... Guichou, J. F. (2016). Fragment-based discovery of a new family of non-peptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with potent antiviral activities. *Nature Communications*, 7, 12777. <https://doi.org/10.1038/ncomms12777>.
- Allison, D. B., Antoine, L. H., Ballinger, S. W., Bamman, M. M., Biga, P., Darley-Usmar, V. M., ... Austad, S. N. (2014). Aging and energetics' 'Top 40' future research opportunities 2010–2013. *F1000Research*, 3, 219. <https://doi.org/10.12688/f1000research.5212.1>
- Amara, C. E., Shankland, E. G., Jubrias, S. A., Marcinek, D. J., Kushmerick, M. J., & Conley, K. E. (2007). Mild mitochondrial uncoupling impacts cellular aging in human muscles in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 1057–1062. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610131104>.
- Amigo, I., Menezes-Filho, S. L., Luévano-Martínez, L. A., Chausse, B., & Kowaltowski, A. J. (2017). Caloric restriction increases brain mitochondrial calcium retention capacity and protects against excitotoxicity. *Aging Cell*, 16, 73–81. <https://doi.org/10.1111/acel.12527>.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., Murphy, A. N., & Starkov, A. A. (2015). Mitochondrial ROS meta-bolism: 10 years later. *Biochemistry (Mosc)*, 80, 517–531. <https://doi.org/10.1134/S0006297915050028>.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., & Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, 70, 200–214. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0102-7>
- Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2016). Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.005>.
- Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2017). Alpha-synuclein and beta-amyloid - different targets, same players: Calcium, free radicals and mitochondria in the mechanism of neurodegeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483, 1110–1115. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.103>.
- Anisimov, V. N., Bakeeva, L. E., Egorin, P. A., Filenko, O. F., Isakova, E. F., Manskikh, V. N., ... Skulachev, V. P. (2008). Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 5. SkQ1 prolongs lifespan and prevents development of traits of senescence. *Biochemistry (Mosc)*, 73, 1329–1342. <https://doi.org/10.1134/S0006297908120055>
- Anisimov, V. N., Egorov, M. V., Krasilshchikova, M. S., Lyamzaev, K. G., Manskikh, V. N., Moshkin, M. P., ... Skulachev, V. P. (2011). Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents. *Aging (Albany, NY)*, 3, 1110–1119. <https://doi.org/10.18632/aging.100404>.
- Ansari, A., Rahman, M. S., Saha, S. K., Saikot, F. K., Deep, A., & Kim, K. H. (2017). Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease. *Aging Cell*, 16, 4–16. <https://doi.org/10.1111/acel.12538>.
- Bae, Y. S., Oh, H., Rhee, S. G., & Yoo, Y. D. (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and Cells*, 32, 491–509. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-0276-3>.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., ... Molkentin, J. D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 434, 658–662. <https://doi.org/10.1038/nature03434>.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J., & Molkentin, J. D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature Cell Biology*, 9, 550–555. <https://doi.org/10.1038/ncb1575>.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120, 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.001>.
- Balasubramanian, P., Howell, P. R., & Anderson, R. M. (2017). Aging and caloric restriction research: A biological perspective with translational potential. *EBioMedicine*, 21, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.06.015>.
- Barros, M. H., Bandy, B., Tahara, E. B., & Kowaltowski, A. J. (2004). Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 49883–49888. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408918200>.
- Bellizzi, D., Rose, G., Cavalcante, P., Covelto, G., Dato, S., De Rango, F., ... De Benedictis, G. (2005). A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics*, 85, 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.11.003>.
- Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M., & Lippe, G. (2015). The mitochondrial permeability transition pore: Channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology. *Physiological Reviews*, 95, 1111–1155. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2015>.
- Besse, S., Delcayre, C., Chevalier, B., Hardouin, S., Heymes, C., Bourgeois, F., ... Swynghedauw, B. (1994). Is the senescent heart overloaded and already failing? *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 8, 581–587. <https://doi.org/10.1007/BF00877412>
- Boengler, K., Schulz, R., & Heusch, G. (2009). Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovascular Research*, 83, 247–261. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp033>.
- Bonora, M., Morganti, C., Morciano, G., Pedriali, G., Lebedzinska-Arciszewska, M., Aquila, G., ... Pinton, P. (2017). Mitochondrial permeability transition involves dissociation of F1FO ATP synthase dimers and C-ring conformation. *EMBO Report*, 18, 1077–1089. <https://doi.org/10.15252/embr.201643602>.
- Brand, M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology*, 45, 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>.
- Brand, M. D. (2014). The role of mitochondria in longevity and healthspan. *Longevity & Healthspan*, 3, 7. <https://doi.org/10.1186/2046-2395-3-7>.
- Bratic, A., & Larsson, N. G. (2013). The role of mitochondria in aging. *Journal of Clinical Investigation*, 123, 951–957. <https://doi.org/10.1172/JCI64125>.
- Brown, M. R., Geddes, J. W., & Sullivan, P. G. (2004). Brain region-specific, age-related, alterations in mitochondrial responses to elevated calcium. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36, 401–406. <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000041775.10388.23>.
- Brustovetsky, N., LaFrance, R., Purl, K. J., Brustovetsky, T., Keene, C. D., Low, W. C., & Dubinsky, J. M. (2005). Age-dependent changes in the calcium sensitivity of striatal mitochondria in mouse models of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 93, 1361–1370. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03036.x>.
- Caldeira da Silva, C. C., Cerqueira, F. M., Barbosa, L. F., Medeiros, M. H., & Kowaltowski, A. J. (2008). Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell*, 7, 552–560. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00407.x>.
- Chabi, B., Ljubicic, V., Menzies, K. J., Huang, J. H., Saleem, A., & Hood, D. A. (2008). Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell*, 7, 2–12. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00347.x>.
- Cheng, Y., Xia, Z., Han, Y., & Rong, J. (2016). Plant natural product formononetin protects rat cardiomyocyte H9c2 cells against oxygen glucose deprivation and reoxygenation via inhibiting ROS formation and promoting GSK-3 β phosphorylation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2060874. <https://doi.org/10.1155/2016/2060874>.
- Chernyak, B. V., & Bernardi, P. (1996). The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both

- pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *European Journal of Biochemistry*, 238, 623–630. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0623w.x>
- Chin, J. H., Tse, F. W., Harris, K., & Jhamandas, J. H. (2006). Beta-amyloid enhances intracellular calcium rises mediated by repeated activation of intracellular calcium stores and nicotinic receptors in acutely dissociated rat basal forebrain neurons. *Brain Cell Biology*, 35, 173–186. <https://doi.org/10.1007/s11068-007-9010-7>.
- Chouchani, E. T., Methner, C., Nadtochiy, S. M., Logan, A., Pell, V. R., Ding, S., ... Murphy, M. P. (2013). Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nature Medicine*, 19, 753–759. <https://doi.org/10.1038/nm.3212>.
- Costantini, P., Belzacq, A. S., Vieira, H. L., Larochette, N., de Pablo, M. A., Zamzami, N., ... Kroemer, G. (2000). Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene*, 19, 307–314. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203299>.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal*, 341, 233–249. <https://doi.org/10.1042/bj3410233>
- Crompton, M., Barksby, E., Johnson, N., & Capano, M. (2002). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie*, 84, 143–152. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01368-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01368-8)
- Daum, B., Walter, A., Horst, A., Osiewacz, H. D., & Kühlbrandt, W. (2013). Age-dependent dissociation of ATP synthase dimers and loss of inner-membrane cristae in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 15301–15306. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305462110>.
- Del Campo, A., Jaimovich, E., & Tevy, M. F. (2016). Mitochondria in the aging muscles of flies and mice: New perspectives for old characters. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 9057593. <https://doi.org/10.1155/2016/9057593>.
- Delaney, J. R., Murakami, C., Chou, A., Carr, D., Schleit, J., Sutphin, G. L., ... Kaeberlein, M. (2013). Dietary restriction and mitochondrial function link replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental Gerontology*, 48, 1006–1013. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.12.001>.
- Di Lisa, F., Kaludercic, N., Carpi, A., Menabo, R., & Giorgio, M. (2009). Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: The relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase. *Basic Research in Cardiology*, 104, 131–139. <https://doi.org/10.1007/s00395-009-0008-4>.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
- Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, D., Sosunov, A. A., McKhann, G. M., ... Yan, S. D. (2008). Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 14, 1097–1105. <https://doi.org/10.1038/nm.1868>.
- Du, H., Guo, L., Wu, X., Sosunov, A. A., McKhann, G. M., Chen, J. X., & Yan, S. S. (2014). Cyclophilin D deficiency rescues A β -impaired PKA/CREB signaling and alleviates synaptic degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842, 2517–2527. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.03.004>.
- Du, H., Guo, L., Zhang, W., Ryzewska, M., & Yan, S. (2011). Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer disease mouse model. *Neurobiology of Aging*, 32, 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.03.003>.
- Duicu, O. M., Mirica, S. N., Gheorghesu, D. E., Privistirescu, A. I., Fira-Mladinescu, O., & Muntean, D. M. (2013). Ageing-induced decrease in cardiac mitochondrial function in healthy rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91, 593–600. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0422>.
- Elkamhawry, A., Park, J. E., Hassan, A. H. E., Pae, A. N., Lee, J., Park, B. G., & Roh, E. J. (2017). Design, synthesis, biological evaluation and molecular modelling of 2-(2-aryloxyphenyl)-1,4-dihydroisoquinolin-3(2H)-ones: A novel class of TSPO ligands modulating amyloid- β -induced mPTP opening. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104, 366–381. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.04.015>.
- Elrod, J. W., Wong, R., Mishra, S., Vagnozzi, R. J., Sakthivel, B., Goonasekera, S. A., & Molkentin, J. D. (2010). Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca(2+) exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120, 3680–3687. <https://doi.org/10.1172/JCI43171>.
- Escames, G., López, A., García, J. A., García, L., Acuña-Castroviejo, D., García, J. J., & López, L. C. (2010). The role of mitochondria in brain aging and the effects of melatonin. *Current Neuropharmacology*, 8, 182–193. <https://doi.org/10.2174/157015910792246245>.
- Escobales, N., Nuñez, R. E., Jang, S., Parodi-Rullan, R., Ayala-Peña, S., Sacher, J. R., ... Javadov, S. (2014). Mitochondria-targeted ROS scavenger improves post-ischemic recovery of cardiac function and attenuates mitochondrial abnormalities in aged rats. *Journal of Molecular Cellular Cardiology*, 77, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.10.009>.
- Fang, E. F., Lautrup, S., Hou, Y., Demarest, T. G., Croteau, D. L., Mattson, M. P., & Bohr, V. A. (2017). NAD⁺ in aging: Molecular mechanisms and translational implications. *Trends in Molecular Medicine*, 23, 899–916. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.08.001>.
- Fang, E. F., Scheibye-Knudsen, M., Brace, L. E., Kassahun, H., SenGupta, T., Nilsen, H., ... Bohr, V. A. (2014). Defective mitophagy in XPA via PARP-1 hyperactivation and NAD(+)/SIRT1 reduction. *Cell*, 157, 882–896. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.026>.
- Fariss, M. W., Chan, C. B., Patel, M., Van Houten, B., & Orrenius, S. (2005). Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular Interventions*, 5, 94–111. <https://doi.org/10.1124/mi.5.2.7>.
- Fenton, R. A., Dickson, E. W., Meyer, T. E., & Dobson, J. G. Jr (2000). Aging reduces the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in the rat heart. *Journal of Molecular Cellular Cardiology*, 32, 1371–1375. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1189>.
- Feridooni, H., Dibb, K. M., & Howlett, S. E. (2015). How cardiomyocyte excitation, calcium release and contraction become altered with age. *Journal of Molecular Cellular Cardiology*, 83, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.12.004>.
- Fernandez-Sanz, C., Ruiz-Meana, M., Castellano, J., Miro-Casas, E., Nuñez, E., Inserte, J., ... Garcia-Dorado, D. (2015). Altered FoF1 ATP synthase and susceptibility to mitochondrial permeability transition pore during ischaemia and reperfusion in aging cardiomyocytes. *Thrombosis and Haemostasis*, 113, 441–451. <https://doi.org/10.1160/TH14-10-0901>.
- Fernandez-Sanz, C., Ruiz-Meana, M., Miro-Casas, E., Nuñez, E., Castellano, J., Loureiro, M., ... Garcia-Dorado, D. (2014). Defective sarcoplasmic reticulum-mitochondria calcium exchange in aged mouse myocardium. *Cell Death and Disease*, 5, e1573. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.526>.
- Ferrara, N., Rinaldi, B., Corbi, G., Conti, V., Stiuso, P., Boccuti, S., ... Filippelli, A. (2008). Exercise training promotes SIRT1 activity in aged rats. *Rejuvenation Research*, 11, 139–150. <https://doi.org/10.1089/rej.2007.0576>.
- Folda, A., Citta, A., Scalcon, V., Cali, T., Zonta, F., Scutari, G., ... Rigobello, M. P. (2016). Mitochondrial thioredoxin system as a modulator of cyclophilin D redox state. *Scientific Report*, 6, 23071. <https://doi.org/10.1038/srep23071>.
- Frenzel, M., Rommelspacher, H., Sugawa, M. D., & Dencher, N. A. (2010). Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex. *Experimental Gerontology*, 45, 563–572. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.02.003>.
- Friberg, H., & Wieloch, T. (2002). Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration. *Biochimie*, 84, 241–250. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01381-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01381-0)
- Frolikis, V. V., Frolikis, R. A., Mkhitarian, L. S., Shevchuk, V. G., Fraifeld, V. E., Vakulenko, L. G., & Syrový, I. (1988). Contractile function and

- Ca²⁺ transport system of myocardium in ageing. *Gerontology*, 34, 64–74. <https://doi.org/10.1159/000212932>
- Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., & Kroemer, G. (2012). Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circulation Research*, 111, 1198–1207. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.268946>.
- Gandhi, S., Wood-Kaczmar, A., Yao, Z., Plun-Favreau, H., Deas, E., Klupsch, K., ... Abramov, A. Y. (2009). PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Molecular Cell*, 33, 627–638. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.013>.
- García, N., Zazueta, C., Martínez-Abundis, E., Pavón, N., & Chávez, E. (2009). Cyclosporin A is unable to inhibit carboxyatractyloside-induced permeability transition in aged mitochondria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*, 149, 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.09.006>.
- Gatliff, J., & Campanella, M. (2012). The 18 kDa translocator protein (TSPO): A new perspective in mitochondrial biology. *Current Molecular Medicine*, 12, 356–368.
- Gaub, E., Guo, L., & Du, H. (2017). Cyclophilin D promotes brain mitochondrial F1FO ATP synthase dysfunction in aging mice. *Journal of Alzheimers Disease*, 55, 1351–1362. <https://doi.org/10.3233/JAD-160822>.
- Genova, M. L., & Lenaz, G. (2015). The interplay between respiratory supercomplexes and ROS in aging. *Antioxidants and Redox Signaling*, 23, 208–238. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6214>.
- Gerle, C. (2016). On the structural possibility of pore-forming mitochondrial FoF1 ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1857, 1191–1196. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2016.03.008>.
- Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., ... Bernardi, P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 5887–5892. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217823110>.
- Go, Y. M., & Jones, D. P. (2017). Redox theory of aging: Implications for health and disease. *Clinical Science*, 131, 1669–1688. <https://doi.org/10.1042/CS20160897>.
- Gonzalez-Freire, M., de Cabo, R., Bernier, M., Sollott, S. J., Fabbri, E., Navas, P., & Ferrucci, L. (2015). Reconsidering the role of mitochondria in aging. *The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 70, 1334–1342. <https://doi.org/10.1093/geron/glv070>.
- Goodell, S., & Cortopassi, G. (1998). Analysis of oxygen consumption and mitochondrial permeability with age in mice. *Mechanisms of Ageing and Development*, 101, 245–256. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(97\)00182-6](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(97)00182-6)
- Gouspillou, G., Sgarioto, N., Kapchinsky, S., Purves-Smith, F., Norris, B., Pion, C. H., ... Hepple, R. T. (2014). Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in atrophied muscle of physically active older humans. *The FASEB Journal*, 28, 1621–1633. <https://doi.org/10.1096/fj.13-242750>.
- Groebe, K., Krause, F., Kunstmann, B., Unterluggauer, H., Reifschneider, N. H., Scheckhuber, C. Q., ... Schrattenholz, A. (2007). Differential proteomic profiling of mitochondria from *Podospira anserina*, rat and human reveals distinct patterns of age-related oxidative changes. *Experimental Gerontology*, 42, 887–898. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.07.001>.
- Guo, L., Du, H., Yan, S., Wu, X., McKhann, G. M., Chen, J. X., & Yan, S. S. (2013). Cyclophilin D deficiency rescues axonal mitochondrial transport in Alzheimer's neurons. *PLoS One*, 8, e54914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054914>.
- Gutiérrez-Aguilar, M., & Baines, C. P. (2015). Structural mechanisms of cyclophilin D-dependent control of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850, 2041–2047. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.009>.
- Hafner, A. V., Dai, J., Gomes, A. P., Xiao, C. Y., Palmeira, C. M., Rosenzweig, A., & Sinclair, D. A. (2010). Regulation of the mPTP by SIRT3-mediated deacetylation of CypD at lysine 166 suppresses age-related cardiac hypertrophy. *Aging (Albany, NY)*, 2, 914–923. <https://doi.org/10.18632/aging.100252>.
- Halestrap, A. P. (2010). A pore way to die: The role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochemical Society Transactions*, 38, 841–860. <https://doi.org/10.1042/BST0380841>.
- Halestrap, A. P., & Richardson, A. P. (2015). The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 78, 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.08.018>.
- Halestrap, A. P., Woodfield, K. Y., & Connern, C. P. (1997). Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 3346–3354. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.6.3346>
- Hansson Petersen, C. A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P. F., Alafuzoff, I., ... Ankarcrona, M. (2008). The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 13145–13150. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806192105>.
- Harman, D. (1972). The biologic clock: The mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society*, 20, 145–147. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1972.tb00787.x>
- Hausenloy, D., Wynne, A., Duchon, M., & Yellon, D. (2004). Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation*, 109, 1714–1717. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000126294.81407.7D>.
- Haworth, R. A., & Hunter, D. R. (1979). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 195, 460–467. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90372-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90372-2)
- Haynes, V., Traaseth, N. J., Elfering, S., Fujisawa, Y., & Giulivi, C. (2010). Nitration of specific tyrosines in FoF1 ATP synthase and activity loss in aging. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298, E978–E987. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00739.2009>.
- Hepple, R. T. (2016). Impact of aging on mitochondrial function in cardiac and skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, 98, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.017>.
- Hernandez-Zimbron, L. F., Luna-Muñoz, J., Mena, R., Vazquez-Ramirez, R., Kubli-Garfias, C., Cribbs, D. H., ... Gevorkian, G. (2012). Amyloid-β peptide binds to cytochrome C oxidase subunit 1. *PLoS One*, 7, e42344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042344>.
- Herraiz-Martínez, A., Álvarez-García, J., Llach, A., Molina, C. E., Ferrer, J., Ferrero-Gregori, A., ... Hove-Madsen, L. (2015). Ageing is associated with deterioration of calcium homeostasis in isolated human right atrial myocytes. *Cardiovascular Research*, 106, 76–86. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv046>.
- Hofer, T., Servais, S., Seo, A. Y., Marzetti, E., Hiona, A., Upadhyay, S. J., ... Leeuwenburgh, C. (2009). Bioenergetics and permeability transition pore opening in heart subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria: Effects of aging and lifelong calorie restriction. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130, 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.01.004>.
- Hoffmann, B., Stöckl, A., Schlame, M., Beyer, K., & Klingenberg, M. (1994). The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 1940–1944.
- Hoppel, C. L., Lesnefsky, E. J., Chen, Q., & Tandler, B. (2017). Mitochondrial dysfunction in cardiovascular aging. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 982, 451–464. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_24.

- Hunter, D. R., & Haworth, R. A. (1979a). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *195*, 453–459. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90371-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90371-0)
- Hunter, D. R., & Haworth, R. A. (1979b). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *195*, 468–477. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90373-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90373-4)
- Jaeschke, H., McGill, M. R., & Ramachandran, A. (2012). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews*, *44*, 88–106. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.602688>
- Jahangir, A., Ozcan, C., Holmuhamedov, E. L., & Terzic, A. (2001). Increased calcium vulnerability of senescent cardiac mitochondria: Protective role for a mitochondrial potassium channel opener. *Mechanisms of Ageing and Development*, *122*, 1073–1086. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00242-1](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00242-1)
- Jahangir, A., Sagar, S., & Terzic, A. (2007). Aging and cardioprotection. *Journal of Applied Physiology*, *1985*(103), 2120–2128. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00647.2007>
- Judge, S., Jang, Y. M., Smith, A., & Hagen, T. (2005). Leeuwenburgh C age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: Implications for the mitochondrial theory of aging. *The FASEB Journal*, *19*, 419–421. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2622.fje>
- Kaplan, P., Jurkovicova, D., Babusikova, E., Hudcovova, S., Racay, P., Sirova, M., ... Krizanova, O. (2007). Effect of aging on the expression of intracellular Ca(2+) transport proteins in a rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *301*, 219–326. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9414-9419>
- Keep, M., Elmer, E., Fong, K. S., & Csiszar, K. (2001). Intrathecal cyclosporin prolongs survival of late-stage ALS mice. *Brain Research*, *894*, 327–331. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02012-1)
- Kim, J. S., He, L., Qian, T., & Lemasters, J. J. (2003). Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Current Molecular Medicine*, *3*, 527–535. <https://doi.org/10.2174/1566524033479564>
- Klingenberg, M. (2009). Cardiolipin and mitochondrial carriers. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1788*, 2048–2058. <https://doi.org/10.1016/j.bba.mem.2009.06.007>
- Knobloch, J. J., Nelson, A. R., Köper, I., James, M., & McGillivray, D. J. (2015). Oxidative damage to biomimetic membrane systems. In situ Fe(II)/ascorbate initiated oxidation and incorporation of synthetic oxidized phospholipids. *Langmuir*, *31*, 12679–12687. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b02458>
- Kohlhaas, M., & Maack, C. (2013). Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovascular Research*, *98*, 259–268. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt032>
- Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Levy, S. E., Sligh, J. E., Cai, J., Jones, D. P., ... Wallace, D. C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, *427*, 461–465. <https://doi.org/10.1038/nature02229>
- Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., & Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, *47*, 333–343. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004>
- Krestinina, O., Azarashvili, T., Baburina, Y., Galvita, A., Grachev, D., Stricker, R., & Reiser, G. (2015). In aging the vulnerability of rat brain mitochondria is enhanced due to reduced level of 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase (CNP) and subsequently increased permeability transition in brain mitochondria in old animals. *Neurochemistry International*, *80*, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.09.008>
- Kristal, B. S., & Yu, B. P. (1998). Dietary restriction augments protection against induction of the mitochondrial permeability transition. *Free Radical Biology and Medicine*, *24*, 1269–1277. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00444-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00444-9)
- Kumar, P., & Kumar, A. (2009). Neuroprotective effect of cyclosporine and FK506 against 3-nitropropionic acid induced cognitive dysfunction and glutathione redox in rat: Possible role of nitric oxide. *Neuroscience Research*, *63*, 302–314. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.01.005>
- Kumar, A., Muzik, O., Shandal, V., Chugani, D., Chakraborty, P., & Chugani, H. T. (2012). Evaluation of age-related changes in translocator protein (TSPO) in human brain using (11)C-[R]-PK11195 PET. *Journal of Neuroinflammation*, *9*, 232. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-232>
- Kwak, H. B., Song, W., & Lawler, J. M. (2006). Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *The FASEB Journal*, *20*, 791–793. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5116.fje>
- Kwon, Y. Y., Choi, K. M., Cho, C., & Lee, C. K. (2015). Mitochondrial efficiency-dependent viability of *Saccharomyces cerevisiae* mutants carrying individual electron transport chain component deletions. *Molecules and Cells*, *38*, 1054–1063. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0153>
- Kwon, Y., Kim, J., Lee, C. Y., & Kim, H. (2015). Expression of SIRT1 and SIRT3 varies according to age in mice. *Anatomy & Cell Biology*, *48*, 54–61. <https://doi.org/10.5115/acb.2015.48.1.54>
- LaFrance, R., Brustovetsky, N., Sherburne, C., Delong, D., & Dubinsky, J. M. (2005). Age-related changes in regional brain mitochondria from fischer 344 rats. *Aging Cell*, *4*, 139–145. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2005.00156.x>
- Lahmy, V., Long, R., Morin, D., Villard, V., & Maurice, T. (2015). Mitochondrial protection by the mixed muscarinic/σ1 ligand ANAVEX2-73, a tetrahydrofuran derivative, in Aβ25-35 peptide-injected mice, a nontransgenic Alzheimer's disease model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 463. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00463>
- Lambert, A. J., Boysen, H. M., Buckingham, J. A., Yang, T., Podlutzky, A., Austad, S. N., ... Brand, M. D. (2007). Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell*, *6*, 607–618. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00312.x>
- Lebedev, I., Nemajerova, A., Foda, Z. H., Kornaj, M., Tong, M., Moll, U. M., & Seeliger, M. A. (2016). A novel in vitro CypD-mediated p53 aggregation assay suggests a model for mitochondrial permeability transition by chaperone systems. *Journal of Molecular Biology*, *428*, 4154–4167. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.001>
- Li, H., Zhou, C., Chen, D., Fang, N., Yao, Y., & Li, L. (2013). Failure to protect against myocardial ischemia-reperfusion injury with sevoflurane postconditioning in old rats in vivo. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, *57*, 1024–1031. <https://doi.org/10.1111/aas.12156>
- Lin, R., Angelin, A., Da Settimo, F., Martini, C., Taliani, S., Zhu, S., & Wallace, D. C. (2014). Genetic analysis of dTSPO, an outer mitochondrial membrane protein, reveals its functions in apoptosis, longevity, and Ab42-induced neurodegeneration. *Aging Cell*, *13*, 507–518. <https://doi.org/10.1111/accel.12200>
- Liu, L., Zhu, J., Brink, P. R., Glass, P. S., & Rebecchi, M. J. (2011). Age-associated differences in the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by cyclosporine A. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, *55*, 622–630. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.2011.02421.x>
- Ljubivic, V., Menzies, K. J., & Hood, D. A. (2010). Mitochondrial dysfunction is associated with a pro-apoptotic cellular environment in senescent cardiac muscle. *Mechanisms of Ageing and Development*, *131*, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.12.004>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, *153*, 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Lustbader, J. W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H. W., Takuma, K., Wang, N., ... Wu, H. (2004). AβAD directly links Aβeta to mitochondrial toxicity in

- Alzheimer's disease. *Science*, 2004(304), 448–452. <https://doi.org/10.1126/science.1091230>.
- Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., Park, B. S., Quinn, J., & Reddy, P. H. (2006). Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: Implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human Molecular Genetics*, 15, 1437–1449. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl066>.
- Marques-Aleixo, I., Rocha-Rodrigues, S., Santos-Alves, E., Coxito, P. M., Passos, E., Oliveira, P. J., ... Ascensão, A. (2012). In vitro salicylate does not further impair aging-induced brain mitochondrial dysfunction. *Toxicology*, 302, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.07.018>.
- Martin, L. J., Fancelli, D., Wong, M., Niedzwiecki, M., Ballarini, M., Plyte, S., & Chang, Q. (2014). GNX-4728, a novel small molecule drug inhibitor of mitochondrial permeability transition, is therapeutic in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 433. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00433>.
- Martin, L. J., Gertz, B., Pan, Y., Price, A. C., Molkentin, J. D., & Chang, Q. (2009). The mitochondrial permeability transition pore in motor neurons: Involvement in the pathobiology of ALS mice. *Experimental Neurology*, 218, 333–346. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.02.015>.
- Martin, L. J., Semenkow, S., Hanaford, A., & Wong, M. (2014). Mitochondrial permeability transition pore regulates Parkinson's disease development in mutant α -synuclein transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 35, 1132–1152. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.008>.
- Marzetti, E., Wohlgemuth, S. E., Lees, H. A., Chung, H. Y., Giovannini, S., & Leeuwenburgh, C. (2008). Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129, 542–549. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.05.005>.
- Massudi, H., Grant, R., Braid, N., Guest, J., Farnsworth, B., & Guillemin, G. J. (2012). Age-associated changes in oxidative stress and NAD⁺ metabolism in human tissue. *PLoS One*, 7, e42357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042357>.
- Mather, M., & Rottenberg, H. (2000). Ageing enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273, 603–608. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2994>.
- Maurel, A., Hernandez, C., Kunduzova, O., Bompard, G., Cambon, C., Parini, A., & Frances, B. (2003). Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 284, H1460–H1467. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00700.2002>.
- Menezes-Filho, S. L., Amigo, I., Prado, F. M., Ferreira, N. C., Koike, M. K., Pinto, I. F. D., ... Kowaltowski, A. J. (2017). Caloric restriction protects livers from ischemia/reperfusion damage by preventing Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Free Radical Biology and Medicine*, 110, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.06.013>.
- Meng, Q., Wong, Y. T., Chen, J., & Ruan, R. (2007). Age-related changes in mitochondrial function and antioxidative enzyme activity in fischer 344 rats. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.12.008>.
- Miceli, M. V., Jiang, J. C., Tiwari, A., Rodríguez-Quinones, J. F., & Jazwinski, S. M. (2012). Loss of mitochondrial membrane potential triggers the retrograde response extending yeast replicative lifespan. *Frontiers in Genetics*, 2, 102. <https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00102>.
- Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P. P., ... Pelicci, P. G. (1999). The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*, 399(6836), 309–313. <https://doi.org/10.1038/46311>.
- Mills, K. F., Yoshida, S., Stein, L. R., Grozio, A., Kubota, S., Sasaki, Y., ... Imai, S. I. (2016). Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age-associated physiological decline in mice. *Cell Metabolism*, 24, 795–806. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.013>.
- Miura, S., Saitoh, S. I., Kokubun, T., Owada, T., Yamauchi, H., Machii, H., & Takeishi, Y. (2017). Mitochondrial-targeted antioxidant maintains blood flow, mitochondrial function, and redox balance in old mice following prolonged limb ischemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), E1897. <https://doi.org/10.3390/ijms18091897>.
- Miura, T., & Tanno, M. (2010). Mitochondria and GSK-3beta in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 24, 255–263. <https://doi.org/10.1007/s10557-010-6234-z>.
- Moreira, P. I., Santos, M. S., Moreno, A., & Oliveira, C. (2001). Amyloid beta-peptide promotes permeability transition pore in brain mitochondria. *Bioscience Reports*, 21, 789–800. <https://doi.org/10.1023/A:1015536808304>.
- Morin, D., Hauet, T., Spedding, M., & Tillement, J. (2001). Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49, 151–174. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.11.004>.
- Morin, D., Musman, J., Pons, S., Berdeaux, A., & Ghaleh, B. (2016). Mitochondrial translocator protein (TSPO): From physiology to cardioprotection. *Biochemical Pharmacology*, 105, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.12.003>.
- Mouchiroud, L., Houtkooper, R. H., Moulán, N., Katsyuba, E., Ryu, D., Cantó, C., ... Auwerx, J. (2013). The NAD(+)/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. *Cell*, 154, 430–441. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.016>.
- Napoli, C., Martin-Padura, I., de Nigris, F., Giorgio, M., Mansueto, G., Somma, P., ... Pelicci, P. (2003). Deletion of the p66Shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 2112–2116. <https://doi.org/10.1073/pnas.0336359100>.
- Nguyen, T. T., Stevens, M. V., Kohr, M., Steenbergen, C., Sack, M. N., & Murphy, E. (2011). Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 40184–40192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.243469>.
- Nguyen, T. T., Wong, R., Menazza, S., Sun, J., Chen, Y., Wang, G., ... Murphy, E. (2013). Cyclophilin D modulates mitochondrial acetylome. *Circulation Research*, 113, 1308–1319. <https://doi.org/10.1161/CIR.CRESAHA.113.301867>.
- Nickel, A., Kohlhaas, M., & Maack, C. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.03.011>.
- Nishihara, M., Miura, T., Miki, T., Tanno, M., Yano, T., Naitoh, K., ... Shimamoto, K. (2007). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 43, 564–570. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.08.010>.
- Owada, T., Yamauchi, H., Saitoh, S. I., Miura, S., Machii, H., & Takeishi, Y. (2017). Resolution of mitochondrial oxidant stress improves aged-cardiovascular performance. *Coronary Artery Disease*, 28, 33–43. <https://doi.org/10.1097/MCA.0000000000000434>.
- Padalko, V. I. (2005). Uncoupler of oxidative phosphorylation prolongs the lifespan of Drosophila. *Biochemistry (Moscow)*, 70, 986–989. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0213-1>.
- Pandya, J. D., Grondin, R., Yonutas, H. M., Haghazari, H., Gash, D. M., Zhang, Z., & Sullivan, P. G. (2015). Decreased mitochondrial bioenergetics and calcium buffering capacity in the basal ganglia correlates with motor deficits in a nonhuman primate model of aging. *Neurobiology of Aging*, 36, 1903–1913. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.01.018>.
- Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2014). Cardiolipin and mitochondrial function in health and disease. *Antioxidants*

- & *Redox Signaling*, 20, 1925–1953. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5280>.
- Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2017). Mitochondrial bioenergetics decay in aging: Beneficial effect of melatonin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74, 3897–3911. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2619-5>.
- Park, I., Londhe, A. M., Lim, J. W., Park, B. G., Jung, S. Y., Lee, J. Y., ... Pae, A. N. (2017). Discovery of non-peptidic small molecule inhibitors of cyclophilin D as neuroprotective agents in A β -induced mitochondrial dysfunction. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 31, 929–941. <https://doi.org/10.1007/s10822-017-0067-9>.
- Park, D. C., & Yeo, S. G. (2013). Aging. *Korean Journal of Audiology*, 17, 39–44. <https://doi.org/10.7874/kja.2013.17.2.39>
- Payne, B. A., & Chinnery, P. F. (2015). Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847, 1347–1353. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2015.05.022>.
- Pellman, J. J., Hamilton, J., Brustovetsky, T., & Brustovetsky, N. (2015). Ca(2+) handling in isolated brain mitochondria and cultured neurons derived from the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 134, 652–667. <https://doi.org/10.1111/jnc.13165>.
- Perry, G. M., Tallaksen-Greene, S., Kumar, A., Heng, M. Y., Kneynsberg, A., van Groen, T., ... Lesort, M. (2010). Mitochondrial calcium uptake capacity as a therapeutic target in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 19, 3354–3371. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq247>.
- Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P., & Di Lisa, F. (1999). Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophysical Journal*, 76, 725–734. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77239-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77239-5).
- Petrosillo, G., Casanova, G., Matera, M., Ruggiero, F. M., & Paradies, G. (2006). Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: Induction of permeability transition and cytochrome c release. *FEBS Letters*, 580, 6311–6316. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.036>.
- Petrosillo, G., Moro, N., Paradies, V., Ruggiero, F. M., & Paradies, G. (2010). Increased susceptibility to Ca(2+)-induced permeability transition and to cytochrome C release in rat heart mitochondria with aging: Effect of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 48, 340–346. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00758.x>.
- Picard, M., Ritchie, D., Thomas, M. M., Wright, K. J., & Hepple, R. T. (2011). Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. *Aging Cell*, 10, 1047–1055. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00745.x>.
- Picard, M., Ritchie, D., Wright, K. J., Romestaing, C., Thomas, M. M., Rowan, S. L., ... Hepple, R. T. (2010). Mitochondrial functional impairment with aging is exaggerated in isolated mitochondria compared to permeabilized myofibers. *Aging Cell*, 9, 1032–1046. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00628.x>.
- Picard, M., Wright, K. J., Ritchie, D., Thomas, M. M., & Hepple, R. T. (2012). Mitochondrial function in permeabilized cardiomyocytes is largely preserved in the senescent rat myocardium. *PLoS One*, 7, e43003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043003>.
- Pietrangolo, L., D'Incecco, A., Ainbinder, A., Michelucci, A., Kern, H., Dirksen, R. T., ... Protasi, F. (2015). Age-dependent uncoupling of mitochondria from Ca²⁺ release units in skeletal muscle. *Oncotarget*, 6, 35358–35371. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6139>.
- Przyklenk, K., Maynard, M., Darling, C. E., & Whittaker, P. (2008). Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with post-conditioning. *Journal of the American College of Cardiology*, 51, 1393–1398. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.11.070>.
- Quintanilla, R. A., Jin, Y. N., von Bernhardi, R., & Johnson, G. V. (2013). Mitochondrial permeability transition pore induces mitochondria injury in Huntington disease. *Molecular Neurodegeneration*, 8, 45. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-45>.
- Quintanilla, R. A., Tapia, C., & Pérez, M. J. (2017). Possible role of mitochondrial permeability transition pore in the pathogenesis of Huntington disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483, 1078–1083. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.054>.
- Rao, V. K., Carlson, E. A., & Yan, S. S. (2014). Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842, 1267–1272. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.003>.
- Rauen, U., & de Groot, H. (2004). New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *Journal of Investigative Medicine*, 52, 299–309. <https://doi.org/10.1136/jim-52-05-29>.
- Reddy, P. H., & Beal, M. F. (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: Implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 14, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.12.002>.
- Rocha-Rodrigues, S., Santos-Alves, E., Coxito, P. M., Marques-Aleixo, I., Passos, E., Guimarães, J. T., ... Ascensão, A. (2013). Combined effects of aging and in vitro non-steroid anti-inflammatory drugs on kidney and liver mitochondrial physiology. *Life Sciences*, 93, 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.07.004>.
- Rotenberg, H., & Wu, S. (1997). Mitochondrial dysfunction in lymphocytes from old mice: Enhanced activation of the permeability transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240, 68–74. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7605>.
- Runas, K. A., & Malmstadt, N. (2015). Low levels of lipid oxidation radically increase the passive permeability of lipid bilayers. *Soft Matter*, 11, 499–505. <https://doi.org/10.1039/c4sm01478b>.
- Sack, M. N., & Finkel, T. (2012). Mitochondrial metabolism, sirtuins, and aging. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), a013102. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013102>.
- Sadoshima, J. (2011). Sirt3 targets mPTP and prevents aging in the heart. *Aging (Albany, NY)*, 3, 12–13. <https://doi.org/10.18632/aging.100266>.
- Sanz, A. (2016). Mitochondrial reactive oxygen species: Do they extend or shorten animal lifespan? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1857, 1116–1126. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2016.03.018>.
- Sastre, J., Pallardó, F. V., Plá, R., Pellín, A., Juan, G., O'Connor, J. E., ... Viña, J. (1996). Aging of the liver: Age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology*, 24, 1199–1205. <https://doi.org/10.1002/hep.510240536>.
- Satoh, A., Stein, L., & Imai, S. (2011). The role of mammalian sirtuins in the regulation of metabolism, aging, and longevity. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 206, 125–162. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21631-2_7.
- Schlame, M., & Greenberg, M. L. (2017). Biosynthesis, remodeling and turnover of mitochondrial cardiolipin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1862, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.08.010>.
- Schulman, D., Latchman, D. S., & Yellon, D. M. (2001). Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 281, H1630–H1636. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.4.H1630>
- Scorrano, L., Petronilli, V., & Bernardi, P. (1997). On the voltage dependence of the mitochondrial permeability transition pore. A critical appraisal. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12295–12299. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12295>
- Selkoe, D. J. (2004). Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature Cell Biology*, 6, 1054–1061. <https://doi.org/10.1038/ncb1104-1054>.
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, 48, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>.

- Shevtzova, E. F., Kireeva, E. G., & Bachurin, S. O. (2001). Effect of beta-amyloid peptide fragment 25–35 on nonselective permeability of mitochondria. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 132, 1173–1176. <https://doi.org/10.1023/A:1014559331402>
- Shirendeb, U., Reddy, A. P., Manczak, M., Calkins, M. J., Mao, P., Tagle, D. A., & Reddy, P. H. (2011). Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: Implications for selective neuronal damage. *Human Molecular Genetics*, 20, 1438–1455. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr024>.
- Shum, L. C., White, N. S., Nadtochiy, S. M., Bentley, K. L., Brookes, P. S., Jonason, J. H., & Eliseev, R. A. (2016). Cyclophilin D knock-out mice show enhanced resistance to osteoporosis and to metabolic changes observed in aging bone. *PLoS One*, 11, e0155709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155709>.
- Skulachev, V. P. (1998). Uncoupling: New approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1363, 100–124. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00091-1)
- Skulachev, M. V., & Skulachev, V. P. (2014). New data on programmed aging – slow phenoptosis. *Biochemistry (Mosc)*, 79, 977–993. <https://doi.org/10.1134/S0006297914100010>.
- Sorce, S., Stocker, R., Seredenina, T., Holmdahl, R., Aguzzi, A., Chio, A., ... Jaquet, V. (2017). NADPH oxidases as drug targets and biomarkers in neurodegenerative diseases: What is the evidence? *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.006>.
- Sugrue, M. M., & Tatton, W. G. (2001). Mitochondrial membrane potential in aging cells. *Biological Signals and Receptors*, 10, 176–188. <https://doi.org/10.1159/000046886>.
- Szalai, G., Csordás, G., Hantash, B. M., Thomas, A. P., & Hajnóczky, G. (2000). Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 15305–15313. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.20.15305>
- Tillement, L., Lecanu, L., & Papadopoulos, V. (2011). Alzheimer's disease: Effects of β -amyloid on mitochondria. *Mitochondrion*, 11, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.08.009>.
- Tocchi, A., Quarles, E. K., Basisty, N., Gitari, L., & Rabinovitch, P. S. (2015). Mitochondrial dysfunction in cardiac aging. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847, 1424–1433. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2015.07.009>.
- Toescu, E. C., & Vreugdenhil, M. (2010). Calcium and normal brain ageing. *Cell Calcium*, 47, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.11.008>.
- Toman, J., & Fiskum, G. (2011). Influence of aging on membrane permeability transition in brain mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43, 3–10. <https://doi.org/10.1007/s10863-011-9337-8>.
- Tsukada, H., Nishiyama, S., Ohba, H., Kanazawa, M., Kakiuchi, T., & Harada, N. (2014). Comparing amyloid- β deposition, neuroinflammation, glucose metabolism, and mitochondrial complex I activity in brain: A PET study in aged monkeys. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 41, 2127–2136. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2821-8>.
- Van de Ven, R. A. H., Santos, D., & Haigis, M. C. (2017). Mitochondrial sirTuins and molecular mechanisms of aging. *Trends in Molecular Medicine*, 23, 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.02.005>.
- Vaseva, A. V., Marchenko, N. D., Ji, K., Tsirka, S. E., Holzmann, S., & Moll, U. M. (2012). p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, 149, 1536–1548. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.014>.
- Vereczki, V., Mansour, J., Pour-Ghaz, I., Bodnar, I., Pinter, O., Zelena, D., ... Chinopoulos, C. (2017). Cyclophilin D regulates lifespan and protein expression of aging markers in the brain of mice. *Mitochondrion*, 34, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.03.003>.
- Wang, S. B., Murray, C. I., Chung, H. S., & Van Eyk, J. E. (2013). Redox regulation of mitochondrial ATP synthase. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 23, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.08.005>.
- Woodfield, K., Rück, A., Brdiczka, D., & Halestrap, A. P. (1998). Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochemical Journal*, 336, 287–290. <https://doi.org/10.1042/bj3360287>
- Xi, J., Wang, H., Mueller, R. A., Norfleet, E. A., & Xu, Z. (2009). Mechanism for resveratrol-induced cardioprotection against reperfusion injury involves glycogen synthase kinase 3 β and mitochondrial permeability transition pore. *European Journal of Pharmacology*, 604, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.12.024>.
- Yan, L. J., & Sohal, R. S. (1998). Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 12896–12901. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.22.12896>
- Yasuno, F., Ota, M., Kosaka, J., Ito, H., Higuchi, M., Doronbekov, T. K., ... Sahara, T. (2008). Increased binding of peripheral benzodiazepine receptor in Alzheimer's disease measured by positron emission tomography with [^{11}C]DAA1106. *Biological Psychiatry*, 64, 835–841. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.04.021>.
- Zhang, H., Ryu, D., Wu, Y., Gariani, K., Wang, X., Luan, P., ... Auwerx, J. (2016). NAD $^{+}$ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science*, 352, 1436–1443. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2693>.
- Zhu, X. H., Lu, M., Lee, B. Y., Ugurbil, K., & Chen, W. (2015). In vivo NAD assay reveals the intracellular NAD contents and redox state in healthy human brain and their age dependences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 2876–2881. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417921112>.
- Zhu, J., Rebecchi, M. J., Glass, P. S., Brink, P. R., & Liu, L. (2011). Cardioprotection of the aged rat heart by GSK-3 β inhibitor is attenuated: Age-related changes in mitochondrial permeability transition pore modulation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 300, H922–H930. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00860.2010>.
- Zhu, J., Rebecchi, M. J., Glass, P. S., Brink, P. R., & Liu, L. (2013). Interactions of GSK-3 β with mitochondrial permeability transition pore modulators during preconditioning: Age-associated differences. *The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 68, 395–403. <https://doi.org/10.1093/gerona/gls205>.
- Zhu, J., Rebecchi, M. J., Tan, M., Glass, P. S., Brink, P. R., & Liu, L. (2010). Age-associated differences in activation of Akt/GSK-3 β signaling pathways and inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening in the rat heart. *The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 65, 611–619. <https://doi.org/10.1093/gerona/glq035>.
- Zhu, J., Rebecchi, M. J., Wang, Q., Glass, P. S., Brink, P. R., & Liu, L. (2013). Chronic tempol treatment restores pharmacological preconditioning in the senescent rat heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 304, H649–H659. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00794.2012>.

How to cite this article: Panel M, Ghaleh B, Morin D. Mitochondria and aging: A role for the mitochondrial transition pore? *Aging Cell*. 2018;e12793. <https://doi.org/10.1111/ace1.12793>

Chapitre II : La Cyclophiline D

1. Généralités sur les cyclophilines

Les cyclophilines font partie de la superfamille des immunophilines qui comprend également les *FK501-binding proteins* (FKBP) et les parvulines (Pin1 notamment). Le terme cyclophiline est lié à la forte affinité de ces protéines pour la cyclosporine A. Chez l'homme on dénombre au moins 17 gènes codant pour des cyclophilines. Ces protéines sont très conservées entre les espèces puisque les cyclophilines majoritaires chez l'homme possèdent leur orthologue chez différents organismes tels que la levure *S. cerevisiae*, la plante *A. thaliana* ou certaines bactéries.

1.1. Structure

D'un point de vue structural, les cyclophilines sont de petites protéines globulaires de poids moléculaire d'environ 20 kDa, à l'exception de certaines d'entre elles dont le poids moléculaire atteint 40 kDa voire 74 kDa en raison de la présence de motifs particuliers de type tetratricopeptide. Toutes les cyclophilines partagent un domaine commun de 109 acides aminés appelé « *cyclophilin-like domain* » (CLD) qui leur confère une structure similaire. Elles sont ainsi composées de 8 brins β organisés en deux feuillets antiparallèles formant un tonneau β possédant un cœur hydrophobe. Les extrémités de ce tonneau β sont obstruées par deux hélices α . Cette disposition particulière empêche l'interaction de ligands avec l'intérieur de la protéine contrairement à d'autres protéines contenant un tonneau β qui sont chargées du transport de molécules comme les lipocalines. L'ensemble est relié par des boucles qui comprennent également une troisième courte hélice α . Le CLD est entouré d'autres régions plus variables en fonction des cyclophilines qui leur confèrent leurs fonctions spécifiques et leur localisation subcellulaire. Il existe aussi une variabilité génétique entre les espèces qui touche le domaine CLD, celle-ci est plus importante au niveau des boucles qu'au niveau des feuillets β et hélices α . Ces substitutions d'acides aminés sont généralement mineures en termes d'encombrement stérique ou de polarité et ne modifient pas la structure secondaire caractéristique du CLD (Figure 13A).

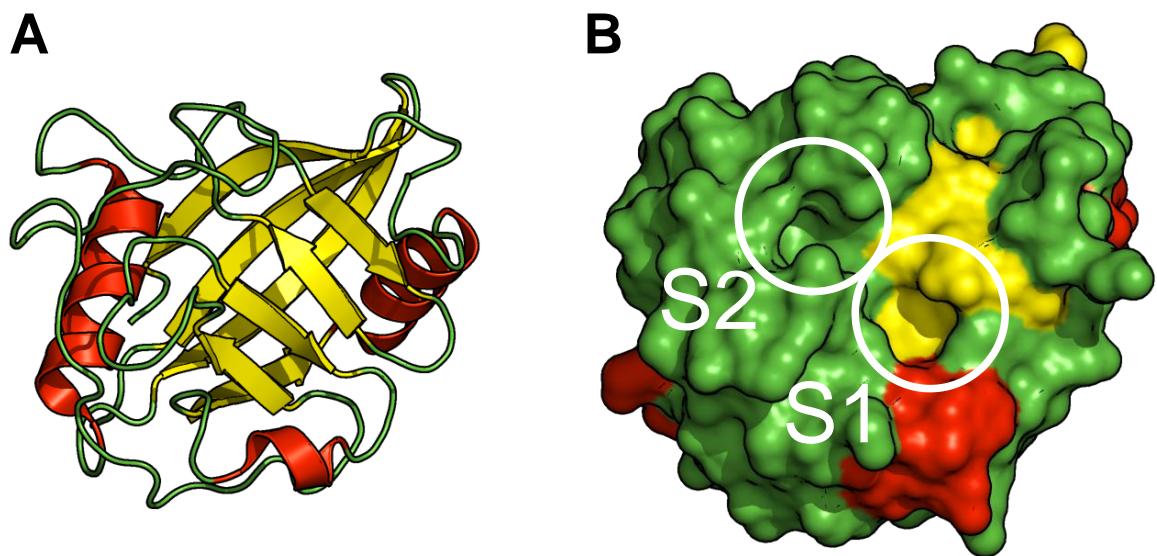


Figure 13 : Structure générale des cyclophilines, exemple de la CypD.

A : Représentation "cartoon" faisant apparaître en jaune les feuillets β , en rouge les hélices α et en vert les boucles. **B** : Représentation de la surface de la protéine et de la disposition des deux poches S1 et S2 du site actif. Représentations générées grâce au logiciel *PyMOL* d'après le fichier *2BIT.pdb*.

Le site actif des cyclophilines est très largement préservé entre les espèces et se situe au sommet de 4 des brins β (3-6) et est complété par une des boucles, soutenue par la courte hélice α . Ce site forme une poche hydrophobe, exposée et relativement peu profonde appelée poche S1, qui porte l'activité enzymatique d'isomérisation. C'est au niveau de ce site que se fixent la CsA et les peptides de synthèse utilisés pour l'étude de l'activité enzymatique des cyclophilines. En plus du site catalytique, la majorité des cyclophilines possèdent une seconde poche, contiguë à la poche S1 (Figure 13B). Cette poche, appelée « *gatekeeper pocket* » ou poche S2 n'a pas de rôle clairement établi. La variabilité des acides aminés qui en tapissent l'intérieur laisse penser qu'elle permet une certaine spécificité du substrat. Cependant, en l'absence de partenaire cellulaire privilégié et en raison de la capacité que présentent toutes les cyclophilines à isomériser les substrats synthétiques *in vitro*, il est difficile de conclure sur le rôle exact de cette poche. Néanmoins, la *gatekeeper pocket* pourrait permettre de synthétiser des agents pharmacologiques plus spécifiques d'une ou plusieurs cyclophilines, permettant ainsi un ciblage de différents processus pathologiques selon la cyclophiline impliquée. Par ailleurs, la relative planéité et l'exposition de la poche S1 rendent difficile la fixation de petits ligands de synthèse. Un moyen de contourner cette difficulté serait de développer des molécules qui puissent s'amarrer dans la poche S2, beaucoup plus profonde,

ce qui permettrait une inhibition plus efficace. Cette stratégie sera abordée plus en détail au chapitre II.3.4.

1.2. Fonctions

Les cyclophilines sont des enzymes qui possèdent une activité peptidyl-prolyl *cis trans* isomérase. Elles reconnaissent les régions des protéines contenant une proline et catalysent la conversion du peptide de sa forme *trans* vers sa forme *cis* au niveau de la liaison peptidique précédant la proline (liaison xxX-Pro ; Figure 14).

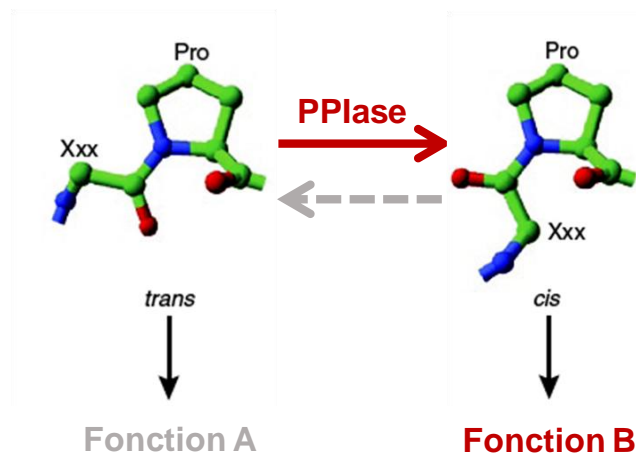


Figure 14 : Fonction d'isomérisation des cyclophilines. La fonction peptidylprolyl *cis-trans* isomérase (PPIase) des cyclophilines leur permet d'isomériser préférentiellement les liaisons peptidiques au niveau des prolines, de la forme naturelle *trans* vers la forme *cis*.

Ce type de réaction peut avoir lieu spontanément car les résidus proline ont la particularité d'être cyclisés au niveau de l'azote. A l'équilibre, ce type de liaison comporte 20% d'isomère *cis* et 80% d'isomère *trans*. La conformation *cis* est généralement défavorable d'un point de vue stérique et la transition depuis la forme *trans* requiert de l'énergie, ce qui la rend très lente et en fait une étape limitante pour le repliement protéique. Les cyclophilines, en catalysant l'isomérisation des liaisons de type *trans*, permettent d'augmenter la vitesse de conversion et de maintenir cette conformation *cis*. Cette activité enzymatique leur confère donc un rôle essentiel dans le repliement des protéines. Le mécanisme exact de l'activité isomérase semble reposer sur 9 acides aminés du site catalytique. L'interaction de la protéine cible avec les chaînes latérales de ces acides aminés permettrait d'amener la liaison peptidique X-Pro vers une conformation *cis* par un effet de torsion, la poche hydrophobe des cyclophilines ayant une affinité plus importante pour la configuration *cis*. Selon cette hypothèse mécanistique, l'interaction des résidus apolaires ou aromatiques du site actif avec la protéine cible

permettrait son amarrage puis la création de liaisons hydrogènes avec l'arginine 55, très conservée, amorcerait le mouvement de torsion pour amener la liaison peptidique vers une conformation *cis*.

En dehors de leur activité isomérase, les cyclophilines peuvent également avoir d'autres fonctions, portées par d'autres régions de la protéine. Ce type de fonction est notamment retrouvé dans la stabilisation de complexes ternaires impliquant plusieurs protéines dans lesquels les cyclophilines jouent le rôle de chaperons.

1.3. Localisation subcellulaire

Les cyclophilines sont des protéines ubiquitaires et sont retrouvées dans tous les compartiments subcellulaires. En revanche, chaque cyclophiline est spécifique d'un compartiment en raison de la présence de séquences d'acides aminés permettant leur adressage. La CypA est la cyclophiline la plus abondante. L'absence de séquence d'adressage la restreint au compartiment cytoplasmique. D'autres cyclophilines sont spécifiques de différents compartiments cellulaires. La CypB est la deuxième cyclophiline la plus abondante et est adressée au réticulum. La CypC est enchâssée dans les membranes cellulaires. Certaines cyclophilines sont nucléaires (CyP-58) ou situées au niveau de la membrane nucléaire (CyP-157 et CyP-358). Enfin, la CypD possède un motif de 29 acides aminés N terminal qui permet son adressage à la mitochondrie. La localisation précise de la plupart des cyclophilines reste néanmoins inconnue mais leur présence à tous les niveaux de la cellule laisse envisager des rôles importants dans les processus cellulaires (Galat, 2003).

1.4. Cyclophiline D

La CypD est une protéine de la matrice mitochondriale codée par le gène peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase F (*Ppif*), un membre de la superfamille des gènes codant pour les cyclophilines. Le gène *Ppif* est localisé sur le chromosome 10 humain et comprend 6 exons, tous codant et largement conservés par rapport à leur orthologue chez la levure. La CypD entière est composée de 207 acides aminés (22 kDa) dont 109 forment la partie CLD et portent l'activité enzymatique. Cette région est hautement conservée entre les différentes cyclophilines. Le reste des acides aminés confèrent à la CypD des caractéristiques propres. Les 27 premiers acides aminés (N-terminal) correspondent à une séquence permettant d'adresser la CypD vers la mitochondrie. D'autres acides aminés enfin pourraient permettre l'interaction de la CypD avec d'hypothétiques partenaires. Kajitani *et al.*, (2008) ont montré que la CypD est constituée de 8 brins β , 2 hélices α et une courte hélice, ce qui donne à la

CypD une structure similaire aux autres cyclophilines (figure 13). Cette même étude a démontré que la CypD se liait bien à la CsA via son site catalytique, comme les autres cyclophilines.

2. La cyclophiline D – Historique

2.1. Rôles de la CypD

2.1.1. Mort cellulaire, nécrose et apoptose

Le premier rôle attribué à la CypD est un rôle pathologique lié à sa participation à l'ouverture du mPTP. En effet, comme décrit précédemment, de fortes concentrations de calcium, de Pi et le stress oxydant favorisent l'interaction de la CypD avec les composants membranaires du mPTP et catalyse son ouverture.

A la fin des années 80, la démonstration de la capacité de la CsA à inhiber la transition de perméabilité mitochondriale a permis d'envisager la participation d'une cyclophiline mitochondriale (Crompton *et al.*, 1988 ; McGuinness *et al.*, 1990). Cette idée était renforcée par le fait que la CsA inhibe l'ouverture du mPTP à des concentrations équivalentes à celles nécessaires à l'inhibition de l'activité PPIase observée dans des extraits mitochondriaux (Halestrap et Davidson, 1990). L'existence d'une cyclophiline spécifique de la mitochondrie possédant une séquence d'adressage adéquate a rapidement été démontrée par Connern et Halestrap (1992). Cette cyclophiline mitochondriale a couramment été nommée CypD à partir du milieu des années 90 (Galat et Metcalfe, 1995). Les premières hypothèses mécanistiques de l'implication de la CypD dans l'ouverture du mPTP reposaient sur son interaction avec l'ANT. Selon Woodfield *et al.* (1998), la CypD pouvait interagir avec l'ANT qui possède une proline exposée vers la matrice mitochondriale et l'isomérisation de cette proline pouvait influencer sur la conformation du canal du transporteur et faciliter la perméabilisation membranaire. Avec une approche similaire, Crompton *et al.* (1998) ont montré qu'une CypD fixée sur résine pouvait lier avec une haute affinité un groupe de protéines composé de l'ANT et du VDAC. Une fois reconstitués dans des liposomes, ces assemblages protéiques étaient capables de produire un pore en présence de calcium, ce qui étayait cette première structure hypothétique. Cette hypothèse structurale a peu à peu été supplantée par celle faisant intervenir l'ATP synthase, hypothèse confortée par le fait que la CypD interagit aussi avec l'ATP synthase en se liant à l'OSCP au niveau de sa tige latérale (Giorgio *et al.*, 2009).

La confirmation du rôle majeur de la CypD dans l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire par nécrose a été apportée en 2005 par deux équipes qui ont généré des souris n'exprimant pas la

CypD (Baines *et al.*, 2005 ; Nakagawa *et al.*, 2005). Les mitochondries de ces souris sont résistantes à l'ouverture du mPTP induite par le calcium et le stress oxydant et ont une capacité de rétention calcique augmentée, comparable à celle de mitochondries sauvages incubées en présence de CsA. Lorsque ces animaux sont soumis à un protocole d'ischémie-reperfusion myocardique, la taille d'infarctus est très fortement diminuée chez les animaux délétés (Nakagawa *et al.*, 2005). Néanmoins, en absence de CypD, la réponse à des stimuli pro-apoptotiques tels que la staurosporine ou le TNF α n'est pas modifiée, ce qui indique que la CypD serait plutôt impliquée dans les processus nécrotiques (Baines *et al.*, 2005). Par ailleurs, si la délétion de la CypD confère aux mitochondries une plus grande résistance au calcium, l'ouverture du mPTP est toujours possible si le stimulus est important. Ces études ont permis de démontrer le rôle majeur de la CypD dans la sensibilité du mPTP et dans les processus de nécrose.

Au début des années 2000, un nouveau rôle de la CypD a été proposé. Contrairement à son rôle pro-nécrotique décrit précédemment, des études visant à surexprimer la CypD dans différents types cellulaires ont permis de démontrer un rôle anti-apoptotique de la CypD. En effet, Lin et Lechleiter (2002) ont montré que des cellules HEK293 surexprimant la CypD avaient un $\Delta\Psi_m$ plus élevé que les témoins et que ce potentiel était maintenu plus longtemps lorsque les cellules étaient soumises à un stress oxydant prolongé ou exposées à la staurosporine. Ces mêmes travaux indiquaient que la modification du site actif de la CypD ne modifiait pas son interaction avec l'ANT, ce qui d'après les auteurs démontrait la non-implication de la fonction enzymatique de la CypD dans cette interaction. L'inhibition de l'apoptose par la CypD pourrait reposer sur son interaction pérenne avec l'isoforme 1 de l'ANT. En effet, les travaux de Schubert et Grimm (2004) ont montré que cette association inhibe l'apoptose des cellules Hela et cela indépendamment de la fonction PPIase puisque l'introduction d'une CypD mutée dénuée d'activité enzymatique n'altère pas ses propriétés antiapoptotiques. Des résultats inverses ont cependant été obtenus dans une lignée cellulaire neuronale (B50) dans laquelle la surexpression de la CypD sensibilise les mitochondries à la surcharge calcique et au stress oxydant, ce qui s'accompagne d'une diminution du $\Delta\Psi_m$ au niveau basal, réversible en présence de CsA (Li *et al.*, 2004). Ces deux agents, calcium et stress oxydant, sont surtout utilisés pour l'étude de l'ouverture du mPTP à l'origine de la nécrose plutôt que de l'apoptose. Ces observations démontrent clairement une implication de la CypD et du mPTP dans ces phénomènes. Néanmoins, la surexpression de la CypD s'accompagne aussi d'une diminution de l'apoptose induite par la staurosporine (Li *et al.*,

2004). Ces travaux sont plus en accord avec les observations réalisées dans les fibroblastes embryonnaires et les thymocytes issus de souris délétées pour la CypD puisque dans les travaux de Nakagawa *et al.* (2005), les cellules CypD^{-/-} ne sont pas plus sensibles aux différents agents proapoptotiques testés. Des résultats similaires ont été obtenus chez les souris *Ppif*^{-/-} par l'équipe du Pr Molkentin (Baines *et al.*, 2005). En revanche, ces observations sont en contradiction avec les travaux de Lin et Lechleiter (2002) qui montrent que l'absence de CypD favorise l'apoptose. La source de cette différence réside peut-être dans le choix du type cellulaire étudié. Les travaux montrant un effet antiapoptique de la CypD, perdu lors de sa délétion, ont utilisé des souches immortalisées ou cancéreuses qui expriment fortement la CypD de façon basale comme un mécanisme de survie, discuté au chapitre II. A l'inverse, les travaux réalisés avec des cellules de souris *Ppif*^{-/-} utilisent des cellules primaires, non cancéreuses, ce qui pourrait expliquer que l'apoptose n'est pas favorisée par la délétion de la CypD qui n'est pas utilisée pour la résistance des cellules.

Bien qu'il existe quelques nuances, l'ensemble de ces travaux tend toutefois à montrer que la CypD ne serait pas impliquée dans l'induction de l'apoptose et que sa surexpression permettrait, au contraire, de la limiter. Ceci pourrait également signifier que le mPTP ne participe pas aux processus apoptotiques.

2.1.2. Rôles physiologiques

Si la participation de la CypD à l'ouverture du mPTP dans les processus de mort cellulaire par nécrose est bien établie, son rôle physiologique exact reste encore mal connu. Bien que présentant une activité d'isomérisation, la CypD ne semble pas intervenir dans le repliement des protéines mitochondriales après leur import. Ces dernières années, la caractérisation des mitochondries issues de souris *Ppif*^{-/-} a néanmoins permis de mettre en évidence des modifications de l'homéostasie calcique et du métabolisme.

La machinerie à l'origine de la production d'énergie, composée de l'ATP-synthase, de l'ANT et du PiC, est étroitement associée au niveau des crêtes mitochondriales au sein de ce qui est appelé le synthasome. La structure de ce synthasome est dynamique afin de s'adapter à la demande énergétique de la cellule. Récemment, des travaux ont montré que la CypD joue un rôle important dans la dynamique de ce complexe (Beutner *et al.*, 2017). En effet, la CypD interagit avec les trois composants principaux du synthasome, déstabilisant sa structure et favorisant les formes dimères et tétramères d'ATP-synthase, moins efficaces pour la production d'énergie. L'inhibition ou la délétion de la CypD permet une stabilité accrue du

synthasome sous la forme de grands complexes et s'accompagne d'une production d'énergie plus importante. Ainsi, la CypD jouerait un rôle dans l'adaptation métabolique. D'autres travaux ont montré que l'interaction de la CypD avec l'ATP synthase diminue l'activité enzymatique du complexe et que la présence de CsA ou la délétion de la CypD s'accompagne d'une augmentation de la production d'ATP sans modification du contenu matriciel en nucléotides adényliques (Giorgio *et al.*, 2009 ; Chinopoulos *et al.*, 2011). Le statut énergétique de la mitochondrie pourrait aussi moduler l'activité de la CypD. En effet, la CypD peut subir des modifications post-traductionnelles (détaillées plus loin), telles que l'acétylation, qui modulent son activité. Dans des conditions de forte production d'énergie, la diminution de l'acétyl-CoA, substrat pour l'acétylation, et le maintien concomitant d'un pool de NAD⁺ favorisent une déacétylation inhibitrice de la CypD par la SIRT3. A l'inverse, en cas de consommation d'énergie réduite, l'acétylation de la CypD conduit à son activation et au fractionnement du synthasome.

Au-delà de ces effets métaboliques, ces résultats peuvent être extrapolés au rôle pathologique de la CypD puisque, selon l'hypothèse actuelle de la composition du mPTP, l'ouverture du mPTP pourrait être le résultat d'un fractionnement prolongé et irréversible du synthasome, aboutissant à la libération de dimères ou de monomères instables d'ATP-synthase (Nesci, 2018).

2.1.2.1. Homéostasie calcique

L'un des rôles physiologiques supposés de la CypD concerne le maintien de l'homéostasie calcique mitochondriale. La mitochondrie est impliquée dans l'homéostasie calcique cellulaire. Dans ce processus, la CypD agirait en déclenchant l'ouverture du mPTP de façon transitoire dans un mode d'ouverture de faible conductance, perméable aux solutés de faible masse moléculaire, de l'ordre de 300 Da. Ces ouvertures brèves et isolées permettraient d'évacuer rapidement le calcium matriciel sans faire gonfler les mitochondries (Ichas et Mazat, 1998). De telles ouvertures brèves ont été observées dans des mitochondries isolées et au niveau cellulaire par des techniques de patch clamp (Hüser *et al.*, 1998 ; Petronilli *et al.*, 1999 et 2001). L'élévation de la concentration calcique matricielle chez les souris *Ppif*^{-/-} vient conforter cette hypothèse. En effet, les cœurs de ces souris présentent des altérations fonctionnelles telles qu'une diminution de la réserve contractile, des temps de raccourcissement et de relaxation allongés ainsi que des courants transitoires calciques plus longs, témoins d'une surcharge calcique mitochondriale chronique (Elrod *et al.*, 2010). En

revanche, d'autres travaux ont montré que la CypD et le mPTP ne sont pas indispensables pour l'efflux calcique et que celui-ci est assuré majoritairement par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitochondrial (Wei *et al.*, 2011).

A l'inverse de ses fonctions sur les efflux calciques, la CypD joue un rôle dans l'influx calcique provenant du réticulum. La mitochondrie et le réticulum endoplasmique sont considérés séparément comme deux éléments clés dans les processus de mort cellulaire qui ont lieu lors des phénomènes d'ischémie-reperfusion (Giorgi *et al.*, 2009 ; Rizzuto *et al.*, 2009). Ces deux organites sont cependant étroitement reliés par des points de contacts appelés *mitochondria-associated membranes* (ou MAM ; Figure 15). Ces interactions sont stabilisées par des complexes protéiques majoritairement constitués par l'isoforme 1 du VDAC mitochondrial, reliée au récepteur à l'1,4,5-inositol triphosphate de type 1 (IP3R1) du réticulum par le biais de la protéine chaperonne Grp75 (Szabadkai *et al.*, 2006).

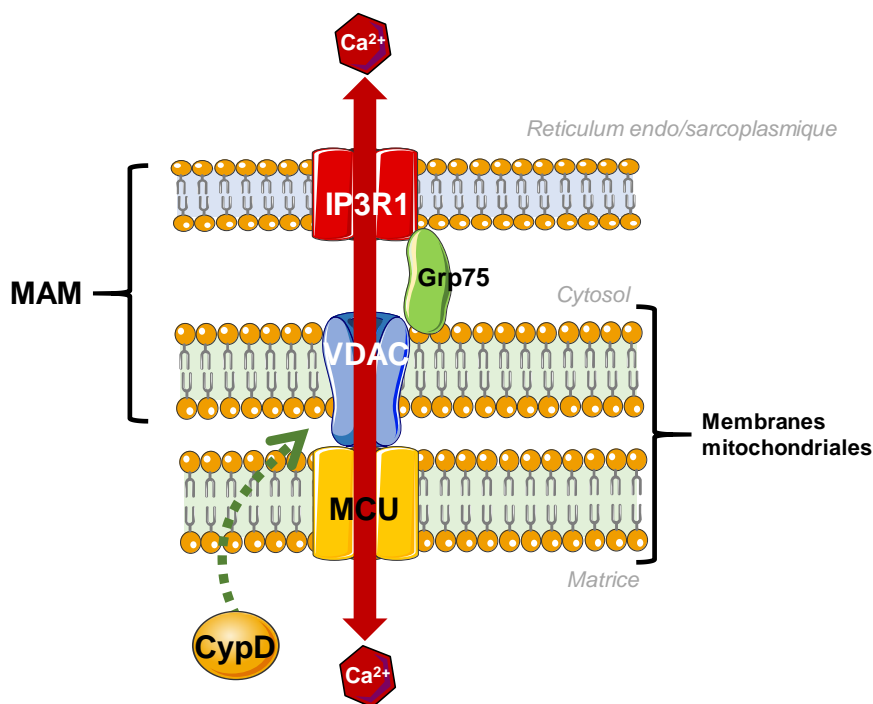


Figure 15 : Représentation schématique des membranes associées à la mitochondrie (MAM) impliquées dans les échanges calciques. La relation étroite entre le réticulum endo/sarcoplasmique et la mitochondrie permet le passage de calcium à travers un complexe comprenant le récepteur IP3R1 du réticulum et le VDAC mitochondrial maintenus alignés par la protéine chaperonne Grp75. Ces transferts calciques seraient sous le contrôle de la CypD bien que celle-ci soit matricielle. L'entrée de calcium dans la matrice mitochondriale utilise l'uniporteur calcique mitochondrial (MCU).

Ce complexe régule le transfert du calcium du réticulum vers la mitochondrie (García-Pérez *et al.*, 2011). Dans les conditions physiologiques, ces échanges sont essentiels au fonctionnement des cellules contractiles mais au cours de l'ischémie-reperfusion, un transfert massif de calcium vers la mitochondrie peut être observé, et pourrait contribuer à l'ouverture du mPTP. Récemment, l'équipe du Pr Ovize a montré que la CypD interagit avec les MAM et qu'elle contrôle les flux calciques entre la mitochondrie et le réticulum, même dans des conditions normoxiques. Cette interaction permet de réguler l'homéostasie calcique nécessaire au couplage excitation-contraction/production d'énergie (Paillard *et al.*, 2013). De plus, ces travaux réalisés sur des cellules ont permis de montrer que les interactions mitochondrie-RE augmentent lors des phénomènes d'hypoxie-réoxygénation et que cette augmentation est corrélée à la mortalité cellulaire. Enfin, le NIM811, un dérivé non immunosuppresseur de la CsA empêche l'interaction de la CypD avec les MAM et a pour effet de diminuer les transferts de calcium et les interactions mitochondrie-réticulum, indiquant un rôle modulateur mais également structural de la CypD dans ce complexe. L'inhibition de la CypD, ou sa délétion, induit un stress réticulaire modéré qui permettrait de protéger les cellules, bien que le mécanisme exact reste pour l'heure inconnu (Belaidi *et al.*, 2013). Ces travaux ont mis en évidence un rôle nouveau de la CypD dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion. En montrant que l'inhibition de la CypD agirait à deux niveaux distincts (ouverture du mPTP et stress réticulaire), ils confirment l'importance du développement de nouvelles molécules ciblant la CypD pour la cardioprotection.

2.1.2.2. Adaptation métabolique

Plusieurs enzymes du cycle de Krebs peuvent être stimulées par le calcium. Les ouvertures transitoires du mPTP, sous le contrôle de la CypD, peuvent ainsi moduler l'activité glycolytique en influençant les concentrations calciques matricielles. Le rôle de la CypD dans l'homéostasie glucidique et la production d'insuline a été démontré par l'étude de souris CypD^{-/-}. Chez ces souris, on observe une prédominance de la voie glycolytique dans les mitochondries cardiaques avec une augmentation de l'activité de la pyruvate deshydrogénase et de l' α -cétoglutarate deshydrogénase, en lien avec une augmentation de la concentration de calcium matriciel (Elrod *et al.*, 2010). Ce « shift » énergétique vers une consommation préférentielle de glucose, au dépend de la β -oxydation, est associé à une augmentation de la production d'insuline, une augmentation modérée de l'insulinémie et une meilleure tolérance au glucose (Tavecchio *et al.*, 2015). Il existerait néanmoins une spécificité du tissu puisque les résultats obtenus dans le cœur de souris n'ont pas été confirmés dans le muscle squelettique

(Taddeo *et al.*, 2014). Il se pourrait que la différence d'expression de la CypD ou de ses cibles ait moins de conséquences sur le muscle squelettique.

2.1.2.3. Mitophagie

Les mitochondries détériorées représentent un danger pour la cellule en raison de leur capacité à produire du stress oxydant et du risque de libération des médiateurs pro-apoptotiques qu'elles contiennent. La voie principale de dégradation de ces mitochondries est la macroautophagie également appelée mitophagie (Dutta *et al.*, 2012). Plusieurs travaux ont montré que la CypD pourrait jouer un rôle dans l'induction de la mitophagie. L'élément déclencheur de ce phénomène de dégradation est la dissipation prolongée du $\Delta\Psi_m$, dont la CypD pourrait être responsable via l'ouverture du mPTP. Des travaux ont montré que l'inhibition pharmacologique ou la délétion de la CypD permettent d'empêcher la mitophagie induite par l'incubation de cellules dans un milieu appauvri (Carreira *et al.*, 2010). Ainsi, la CypD pourrait participer au maintien d'une population de mitochondries saines en stimulant la dégradation des mitochondries endommagées.

2.1.3. Régulation de la CypD et implications pathologiques

Le rôle de la CypD dans l'ouverture du mPTP est connu depuis presque 30 ans. Les facteurs aboutissant à l'ouverture du mPTP induisent une translocation de la CypD vers les composants membranaires du pore. Depuis quelques années, des travaux ont mis en évidence une régulation fine de l'activité de la CypD par des modifications post-traductionnelles responsables d'une sensibilisation ou d'une inhibition du mPTP. Ces modifications sont fréquemment retrouvées pour un grand nombre de protéines et reposent sur la nitrosylation ou l'oxydation de cystéines, la phosphorylation ou l'acétylation (Tableau 1).

2.1.3.1. S-Nitrosylation

La S-nitrosylation est une modification post-traductionnelle d'une protéine qui correspond à la liaison covalente du NO avec une cystéine. Plusieurs études ont montré que la S-nitrosylation intervient dans les mécanismes de la cardioprotection, notamment en modifiant certains modulateurs du mPTP. La CypD possède un site de S-nitrosylation au niveau de la cystéine 203. Cette cystéine semble jouer un rôle important dans la sensibilité du mPTP puisque la mutation de cet acide aminé en sérine diminue la capacité de la CypD à induire l'ouverture du mPTP (Nguyen *et al.*, 2011). Néanmoins, ces résultats n'ont été obtenus qu'*in vitro* et il n'existe pas de démonstration *in vivo* de la participation des voies de signalisation

cardioprotectrices dans le phénomène de S-nitrosylation de la CypD. Le mécanisme par lequel s'exerce l'inhibition du mPTP par la S-nitrosylation pourrait reposer sur le masquage d'un site sensible à l'oxydation. Cette même sérine, ainsi que la sérine 157, peuvent en effet être oxydées en présence d'H₂O₂. Ces oxydations modifient la conformation et l'activité enzymatique de la CypD, ce qui facilite l'ouverture du mPTP (Linard *et al.*, 2009). Enfin, la participation de la CypD à l'équilibre redox mitochondrial a été suggérée par des travaux montrant une interaction de la CypD avec le système de la thiorédoxine (Folda *et al.*, 2016).

2.1.3.2. Phosphorylation

Un petit nombre d'études montre que la CypD possède également des sites de phosphorylation au niveau de résidus sérine et thréonine qui pourraient être utilisés par la protéine GSK-3 β . En effet, il a été montré *in vitro* à l'aide de protéines recombinantes que GSK-3 β est capable de phosphoryler la CypD. L'inhibition de GSK-3 β participe à l'effet cardioprotecteur induit par le pré-conditionnement ischémique. L'inhibition pharmacologique de GSK-3 β est associée à une diminution de la phosphorylation de la CypD dans des cellules de l'épithélium tubulaire de souris (Bao *et al.*, 2012). Par ailleurs, la phosphorylation de la CypD semble reposer sur l'axe ERK1/2-GSK-3 β -CypD puisqu'une inhibition de ERK1/2, stimule la phosphorylation de la CypD par GSK-3 β (Rasola *et al.*, 2010). La phosphorylation de la CypD par GSK-3 β pourrait ainsi apparaître comme un mécanisme régulateur du mPTP. D'après les travaux de Xi *et al.* (2009), le resvératrol induit la translocation de GSK-3 β vers la matrice mitochondriale ce qui expliquerait les effets cardioprotecteur du resvératrol. En revanche, d'autres travaux ont montré cette translocation n'aurait pas lieu lors du préconditionnement ischémique (Clarke *et al.*, 2008).

2.1.3.3. Acétylation

L'acétylation/déacétylation des protéines joue un rôle important dans la régulation du métabolisme mitochondrial. La déacétylation des protéines au niveau de la mitochondrie est assurée par la SIRT3 qui utilise le NAD⁺ comme cofacteur. Parmi les modifications post-traductionnelles de la CypD, l'acétylation de la lysine 166, proche du site catalytique, augmente la sensibilité du mPTP. Dans des cellules cancéreuses, la déacétylation de la CypD par la SIRT3 diminue son activité PPIase, réduit son interaction avec l'ANT et aboutit au détachement de l'hexokinase II, ce qui diminue la probabilité d'ouverture du mPTP (Shulga *et al.*, 2010). A l'inverse, l'inhibition de la SIRT3 entraîne un maintien de l'acétylation de la CypD et augmente la sensibilité du mPTP (Shulga et Pastorino, 2010).

2.1.3.4. Oxydation

Le stress oxydant favorise grandement l'ouverture du mPTP. Les ERO produits par la mitochondrie réagissent avec de nombreuses cibles. Parmi ces protéines, l'oxydation de la CypD sur ses résidus cystéines joue un rôle majeur dans la sensibilité du mPTP. En effet, la cystéine 203, cible de la nitrosylation, ainsi que la sérine 157, peuvent être oxydées en présence d'H₂O₂. Ces oxydations modifient la conformation et l'activité enzymatique de la CypD, ce qui facilite l'ouverture du mPTP (Linard *et al.*, 2009 ; Nguyen *et al.*, 2011). Cette ambivalence de la cystéine 203 dont la modification est tantôt inhibitrice, tantôt activatrice du mPTP, fait apparaître la CypD comme un senseur de l'état redox mitochondrial.

Tableau 1 : Modifications chimiques de la CypD et effet sur l'ouverture du mPTP

Modifications de la CypD	Sites	Effet sur le mPTP
Acétylation	Lysine 166	Sensibilise
Déacétylation	Lysine 166	Défavorise
Phosphorylation	Sérines et Thréonines	Sensibilise
Oxydation	Cystéine 203, Sérine 157	Sensibilise
Nitrosylation	Cystéine 203	Défavorise

2.1.3.5. Régulation par interaction avec les protéines

Outre les protéines impliquées dans la composition du mPTP (ANT, PiC, ATP Synthase) et des MAM, la CypD interagit avec d'autres protéines qui peuvent jouer un rôle régulateur dans les processus de mort cellulaire d'origine mitochondriale (Tableau 2).

Il a été récemment montré que la CypD peut former un complexe avec p53 sous l'effet du stress oxydant. La formation de ce complexe est associée à une ouverture du mPTP dépendante de la CypD (Vaseva *et al.*, 2012). Par ailleurs, p53 peut aussi interagir avec l'ATP synthase, comme la CypD, au niveau de l'OSCP (Bergeaud *et al.*, 2013). p53 n'est normalement pas présente dans la mitochondrie mais y pénètre en utilisant la protéine Drp1 dans des conditions de stress oxydant (Guo *et al.*, 2014). Si ce mécanisme a été mis en évidence dans plusieurs modèles cellulaires tels que des neurones (Zhao et al 2013), des îlots β pancréatiques (Chen *et al.*, 2013) et des ostéoblastes (Zhen *et al.*, 2014), il semble uniquement avoir lieu en présence de stress oxydant et n'est pas observé lors de l'ouverture du mPTP induite par le calcium (Karch et Molkentin, 2012). De plus, des données récentes

montrent que l'inhibition pharmacologique de p53 avec les pifithrines α et μ ne diminue pas la taille d'infarctus dans un modèle de cœur isolé perfusé de souris (Yano *et al.*, 2018). Ces travaux ont cependant montré chez des souris que la délétion partielle du gène de p53 permet d'améliorer les paramètres hémodynamiques lors des phases tardives de la reperfusion mais probablement indépendamment du mPTP.

Le facteur de transcription STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) joue un rôle important dans les voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection. Des études ont montré que STAT3 pénètre dans la mitochondrie lors de la stimulation de la voie SAFE et exerce un effet cardioprotecteur en inhibant l'ouverture du mPTP. Cette inhibition serait due à l'interaction de STAT3 avec la CypD (Boengler *et al.*, 2010). Cette interaction peut être inhibée par la CsA et fait intervenir le domaine N-terminal de STAT3 (Meier *et al.*, 2017).

Dans les cellules cancéreuses, un complexe de protéines chaperones composé de Hsp60, Hsp90 et de TRAP1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Protein 1*) est souvent surexprimé au niveau mitochondrial où il séquestre la CypD et l'empêche de stimuler l'ouverture du mPTP (Ghosh *et al.*, 2010 ; Kang, 2012). Ce mécanisme inhibiteur n'est néanmoins pas retrouvé dans des cellules saines, où les mitochondries ne contiennent pas ce complexe. Un autre acteur de ce système est la protéine DnaJC15 qui est capable de libérer la CypD de ce complexe et de l'activer (Sinha et D'Silva, 2014). Une autre protéine, MST1 (*Mammalian Sterile 20-like Kinase 1*), dont l'expression est augmentée par la gemcitabine, est capable de stimuler l'activité de la CypD en interagissant avec elle et de provoquer la mort cellulaire (Chen *et al.*, 2014). Enfin, dans les cellules cancéreuses, la CypD est également capable d'interagir avec Bcl-2 pour empêcher la libération de cytochrome *c* indépendante du mPTP (Eliseev *et al.*, 2009). Ce mécanisme est en lien avec les propriétés antiapoptotiques de la CypD. Cette interaction directe est a priori contrintuitive puisque Bcl-2 est considérée comme une protéine externe à la mitochondrie. Néanmoins elle pourrait aussi être présente sur la membrane interne mitochondriale ou au niveau des sites de contact membranaires (Hockenbery *et al.*, 1990 ; Motoyama *et al.*, 1998 ; Peng *et al.*, 2006).

Des travaux ont montré que la surexpression d'une protéine matricielle, la *complement 1q-binding protein* (C1qBP), inhibe l'ouverture du mPTP induite par le stress oxydant. Ces expériences ont également mis en évidence une co-précipitation de C1qBP avec la CypD, démontrant son interaction au sein de la mitochondrie (McGee et Baines, 2011). Cette protéine pourrait jouer un rôle d'inhibiteur endogène du mPTP en complexant la CypD.

Le peptide amyloïde β joue un rôle primordial dans la progression de la maladie d'Alzheimer puisque son accumulation sous forme d'agrégats au niveau cérébral est responsable de la perte neuronale. Le peptide A β est également capable de diffuser vers la matrice mitochondriale et d'inhiber la respiration mitochondriale (Manczka *et al.*, 2006 ; Hansson Petersen *et al.*, 2008) et des complexes CypD-A β ont été retrouvés chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et dans des modèles animaux de cette pathologie (Du *et al.*, 2008 ; 2011). Par ailleurs, le peptide A β sensibilise les mitochondries à l'ouverture du mPTP (Moreira *et al.*, 2001 ; Shetzova *et al.*, 2001 ; Du *et al.*, 2008) et la délétion ou l'inhibition de la CypD inhibe ces effets délétères (Du *et al.*, 2014 ; Moreira *et al.*, 2001). Néanmoins, le rôle de ce complexe dans l'ouverture du mPTP est difficile à établir car le peptide A β peut induire des augmentations des concentrations calciques intracellulaires (Abramov *et al.*, 2004 ; Chin *et al.*, 2006) et la production de stress oxydant (Lustbader *et al.*, 2004).

Tableau 2 : Interactions protéiques de la CypD en dehors des constituants hypothétiques du mPTP.

Protéine	Conditions d'interaction	Effet sur le mPTP
p53	Stress oxydant	Inducteur
C1qBP	Stress oxydant	Inhibiteur
STAT3	Préconditionnement	Inhibiteur
Hsp60/Hsp90/TRAP1	Cancer	Inhibiteur
DnaJC15	Cancer	Inducteur
MST-1	Cancer	Inducteur
Bcl-2	Cancer	Inhibiteur
Peptide Aβ	Maladie d'Alzheimer	Inducteur

3. Inhibition pharmacologique de la CypD et du mPTP

3.1. La cyclosporine A

La première démonstration de l'impact de la CypD sur l'ouverture du mPTP est due à l'observation de l'effet inhibiteur de la CsA sur la perméabilisation membranaire. La CsA se lie avec une haute affinité aux cyclophilines et en inhibe l'activité enzymatique. Au niveau mitochondrial, l'inhibition de la fonction PPIase de la CypD et de sa fixation au niveau des membranes empêche l'ouverture du pore, ce qui fait de la CsA l'inhibiteur de référence de la CypD. Depuis les observations faites par le laboratoire de Crompton (Crompton *et al.*, 1988),

il a été démontré dans de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* que la CsA possède des propriétés protectrices liées à l'inhibition du mPTP (Nazareth *et al.*, 1991 ; Argaud *et al.*, 2005 ; Gomez *et al.*, 2007 ; Zalewski *et al.*, 2015). L'inhibition de la CypD par la CsA est associée à une diminution des lésions de reperfusion, une amélioration des fonctions cardiaques et une diminution des lésions microvasculaires dans un grand nombre de modèles animaux. Néanmoins, quelques échecs ont été recensés chez le rat et chez le porc (Lie *et al.*, 2010 ; De Paulis *et al.*, 2013).

La preuve de concept clinique de cette stratégie, en termes de cardioprotection, a été apportée par une étude clinique de phase II réalisée chez 58 patients présentant un syndrome coronarien aigu. Dans cet essai, les patients ont reçu un *bolus* de CsA (2,5 mg/kg) juste avant la reperfusion par angioplastie. L'utilisation de la CsA au moment de la reperfusion a permis de diminuer la taille d'infarctus de 30 à 44%, objectivée par le relargage de biomarqueurs de nécrose cardiaque, créatine kinase et troponine I, témoignant d'une cardioprotection précoce (Piot *et al.*, 2008). L'inhibition du mPTP par la CsA au moment de la reperfusion apporte également un bénéfice durable puisqu'elle s'accompagne d'une diminution du remodelage ventriculaire à 6 mois chez ces patients (Mewton *et al.*, 2010). Cependant, deux essais de phase III, CIRCUS et CYCLE (*Cyclosporine and Prognosis in Acute Myocardial Infarction Patients*, NCT01502774 ; *CYCLOsporinE A in Reperfused Acute Myocardial Infarction*, NCT01650662) dont les résultats sont parus en 2015 et 2016 n'ont pas permis de confirmer ces résultats (Cung *et al.*, 2015 ; Ottani *et al.*, 2016). Les résultats de l'essai clinique CIRCUS ont été largement débattus. La modification de la formulation galénique de la CsA entre les deux essais fait partie des principales critiques. En effet, lors de l'étude pilote, la CsA a été administrée sous forme de Sandimmun®, une formulation utilisant le cremophor pour solubiliser la CsA mais contenant de l'acide ricinoléique qui expose au risque de choc anaphylactique, tandis que dans l'essai CIRCUS les patients ont reçu une dose de Ciclomulsion®. Or, l'excipient principal de Ciclomulsion® est l'intralipid, un agent possédant des propriétés cardioprotectrices (Li *et al.*, 2012), ce qui pourrait expliquer l'absence de différence entre les patients ayant reçu la CsA ou son placebo. Néanmoins, l'essai CYCLE a utilisé le Sandimmun® comme dans l'étude pilote et n'a pas montré d'effet bénéfique, ce qui exclue un rôle des excipients. D'autre part, plusieurs patients inclus dans le protocole présentaient des symptômes coronariens depuis plusieurs heures (jusqu'à 12h), ce qui laisse penser que pour ces patients, la marge de protection cellulaire était très faible. Le choix de la dose de CsA administrée est aussi critiquable puisque la CsA présente une fenêtre

d'efficacité très étroite pour l'inhibition du mPTP (Griffiths et Halestrap, 1993). Par ailleurs, l'emploi d'un dispositif d'injection intracoronaire comme celui utilisé pour les essais cliniques MIAMI et INFUSE-AMI aurait pu permettre d'assurer une meilleure distribution de la CsA au niveau de l'aire à risque et de traiter les tissus avant que ceux-ci ne soient soumis au stress de la reperfusion. Dans l'étude pilote, le dosage de la cyclosporinémie montre que la concentration plasmatique de CsA est réduite de 50% 20 minutes seulement après l'injection. Sans rationnel de concentration optimale, cette réduction rapide de la biodisponibilité de la CsA laisse néanmoins sous-entendre que la concentration nécessaire à l'inhibition du mPTP n'est atteinte que très transitoirement et n'est donc pas maintenue suffisamment longtemps pour protéger le myocarde. Par ailleurs, les nombreuses toxicités de la CsA rendent impossible l'administration répétée au risque d'induire une hépatotoxicité ou une néphrotoxicité aigue.

Augmenter la biodisponibilité mitochondriale de la CsA pourrait permettre d'éviter les effets indésirables ou toxiques et d'accroître sa marge thérapeutique. Dans cette optique, Dube *et al.* (2012) ont développé une CsA adressée à la mitochondrie (mtCsA) en y greffant un groupement triphénylphosphonium, lipophile et chargé positivement, qui permet une accumulation mitochondriale en raison du potentiel de membrane. Cette stratégie a permis de diminuer les interactions avec d'autres protéines que la CypD. Ceci s'est traduit, dans un modèle d'hypoxie-reoxygénation, par une diminution des concentrations de mtCsA nécessaires pour inhiber le mPTP tout en diminuant également la toxicité cellulaire. En suivant le même principe, le JW47, un dérivé de la CsA sur lequel est greffé un cation quinolinium a montré une moindre toxicité cellulaire et une protection significative dans un modèle murin d'encephalomyélite (Warne *et al.*, 2016).

La vectorisation de la CsA à l'aide de nanoparticules est également une stratégie prometteuse. Des travaux ont montré dans un modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque chez la souris que la CsA encapsulée dans des nanovésicules s'accumule de manière importante au niveau de l'aire à risque. Cette accumulation est associée à une diminution de la taille d'infarctus qui est observée à de plus faibles doses que la CsA non vectorisée (Ikeda *et al.*, 2016).

Si le choix du critère primaire de l'essai CYCLE, le temps de résolution du sus-décalage ST après angioplastie, est contestable car il n'est pas corrélé à la taille de l'infarctus, cet essai aura néanmoins permis d'éliminer le rôle de la formulation galénique dans l'échec de l'essai CIRCUS mais aussi de soulever une interrogation concernant la sécurité de l'emploi de la

CsA. En effet, bien que les effectifs aient été trop faibles pour tirer une conclusion statistiquement significative, le groupe traité par la CsA semblait présenter une mortalité plus importante (Ottani *et al.*, 2016). Néanmoins, cette surmortalité n'a pas été constatée dans l'essai CIRCUS qui incluait plus de patients.

Si pour l'heure l'inhibition du mPTP en tant que stratégie cardioprotectrice semble remise en question, l'échec des derniers essais cliniques est peut-être dû aussi au choix des patients recrutés. Il existe en effet certainement une fenêtre temporelle optimale pour l'application de cette stratégie avec, en deçà d'une certaine durée d'ischémie un impact limité des lésions de reperfusion et, au-delà, des dommages tissulaires trop importants. Ainsi, même si tous les patients ne peuvent en bénéficier, l'inhibition du mPTP pourrait toutefois s'adresser à un grand nombre d'entre eux étant donné l'augmentation rapide du nombre de patients coronariens.

3.2. Les dérivés de la cyclosporine A

L'activité immunosuppressive de la CsA limite son utilisation à d'autres fins et notamment pour des pathologies chroniques liées au mPTP. La modification de la partie du cycle qui n'interagit pas avec les cyclophilines a permis de mettre au point des dérivés non immunosuppresseurs de la CsA (Figure 16). En effet, la modification d'acides aminés empêche la formation du complexe ternaire CypA/CsA/Calcineurine, et supprime donc l'effet immunosuppresseur. C'est notamment le cas du NIM811 (N-méthyl-4-isoleucine-CsA) qui inhibe le mPTP (Nicolli *et al.*, 1996 ; Waldmeier *et al.*, 2002) et exerce des effets protecteurs dans différents modèles pathologiques où le mPTP joue un rôle tels que le syndrome post-arrêt cardiaque chez le lapin (Cour *et al.*, 2011), le traumatisme crânien chez la souris et le rat (Mbye *et al.*, 2008, 2009 ; Readnower *et al.*, 2011) ou l'ischémie-reperfusion cardiaque et hépatique (Belaidi *et al.*, 2013 ; Lin *et al.*, 2012). De la même façon, le Debio-025 (N-Me-Val-4-CsA ou alisporivir) a démontré des effets cardioprotecteurs mais son développement a été arrêté au cours de la phase III des essais cliniques pour des raisons de toxicité (Gomez *et al.*, 2007).

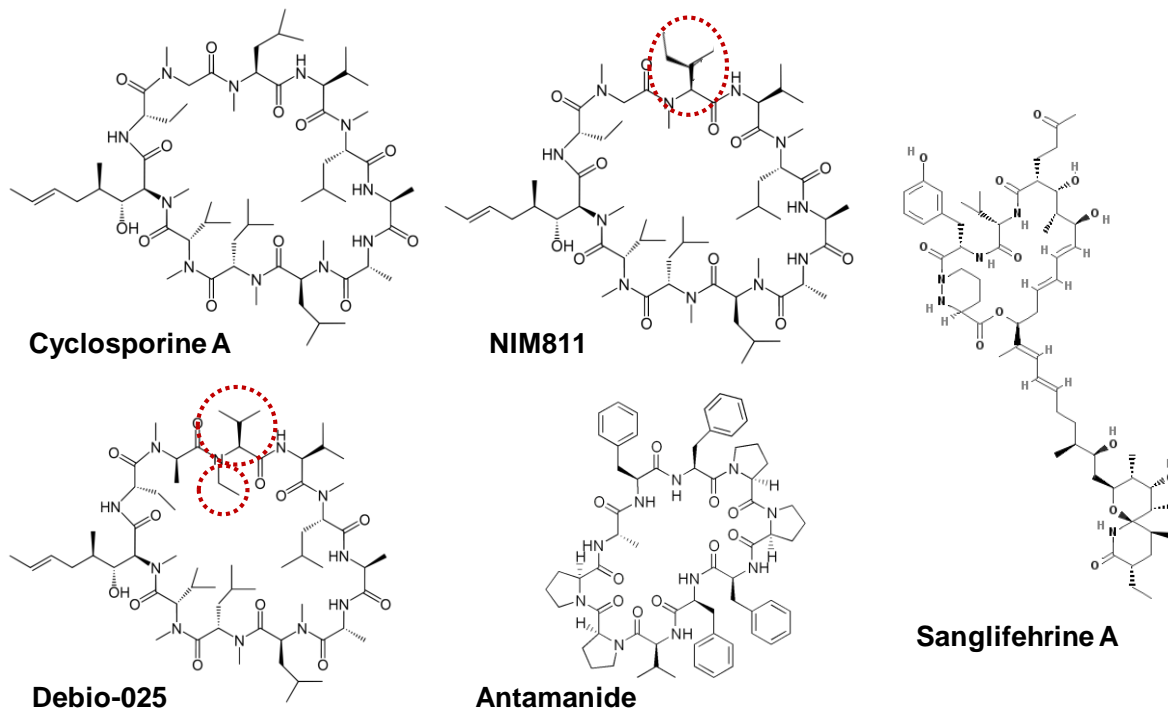


Figure 16 : Inhibiteurs de CypD de type polypeptidique. Le NIM811 et le Debio-025 sont des dérivés non immunosuppresseurs de la cyclosporine A dont les modifications chimiques sont indiquées par les cercles rouges.

D'autres peptides cycliques structurellement différents de la CsA ont également été décrits comme des inhibiteurs du mPTP. La Sanglifehrine A est un polypeptide cyclique immunosuppresseur mais son action est indépendante de la CypA (Figure 16). La SfA inhibe la CypD et l'ouverture du mPTP (Clarke *et al.*, 2002). Cependant, à la différence de la CsA, la Sanglifehrine A n'inhibe pas l'interaction de la CypD avec les protéines membranaires mitochondriales et plus particulièrement l'ANT. La Sanglifehrine A inhibe le mPTP aussi puissamment que la CsA, ce qui indique que ce serait l'inhibition de l'activité PPIase plutôt que la fixation de la CypD qui gouvernerait l'inhibition du mPTP. Un autre peptide cyclique, l'antamanide, produit par l'amanite phalloïde, possède un pouvoir immunosuppresseur lié à son interaction avec la CypA mais indépendant de la calcineurine (Siemion *et al.*, 1992). Cette inhibition de la CypA a conduit à émettre l'hypothèse que l'antamanide pourrait aussi inhiber la CypD et donc l'ouverture du mPTP. En effet, l'antamanide inhibe le mPTP en inhibant l'activité PPIase de la CypD bien que son affinité soit dix fois plus faible que celle de la CsA (Azzolin *et al.*, 2011). Ces peptides présentent cependant de nombreuses limites qui empêchent leur utilisation en clinique. Ils sont à l'origine d'un certain nombre de toxicités telles que la néphrotoxicité, l'hépatotoxicité ou encore la neurotoxicité. Leur caractère

peptidique limite également le passage des barrières physiologiques comme la barrière hématoencéphalique. Il apparaît donc important de développer de nouveaux inhibiteurs du mPTP dénués de ces effets toxiques afin de pouvoir prolonger leur administration durant les 48h suivant la reperfusion, période de constitution de l'infarctus.

3.3. Petits inhibiteurs de CypD

En raison des diverses limites à l'utilisation de la CsA et de ses dérivés énoncées plus haut il apparaît important de développer des molécules moins toxiques et peut-être plus facilement utilisables pour des affections chroniques. A l'heure actuelle, il existe très peu d'inhibiteurs de CypD autres que les dérivés de la CsA bien que le mPTP semble impliqué dans un grand nombre de pathologies. Un exemple récent de développement de tels ligands a été décrit par Valasani *et al.* (2016) dans des travaux montrant que des molécules dérivées du squelette 4-aminobenzenesulfonide sont des inhibiteurs de CypD. Dans cette étude, le composé C-9 inhibe l'activité PPIase de la CypD avec une IC_{50} d'ordre micromolaire et empêche le gonflement mitochondrial induit par le calcium, démontrant un effet sur le mPTP. Dans un modèle *in vitro* de dysfonction mitochondriale induite par le peptide A β , C-9 restaure la production d'ATP et l'activité de la cytochrome *c* oxydase (complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale). De plus, cette molécule présente une faible toxicité cellulaire (Valasani *et al.*, 2016).

3.4. Les Small-molecules cyclophilin inhibitors (SmCypI)

Pour notre part, nous avons étudié de nouveaux ligands de la cyclophiline D qui ont été développés par l'équipe du Pr Jean Michel Pawlotsky (Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Inserm U955, Equipe 18), en association avec le Centre de Biochimie Structurale des Universités Montpellier 1 et 2 (Inserm U1054, CNRS UMR5048, Montpellier, France). Nous décrivons dans ce paragraphe la découverte de cette nouvelle classe de molécules et quelques résultats publiés par l'équipe de Jean-Michel Pawlotsky (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2016). Ces molécules sont particulièrement intéressantes puisqu'elles ciblent le site actif des cyclophilines selon un mode de liaison inédit. En effet, la CsA, ses dérivés non immunosuppresseurs ou la Sanglifehrine A se lient avec une haute affinité à la CypD en interagissant uniquement avec son site catalytique tandis que les nouveaux inhibiteurs étudiés dans ce travail sont capables de se lier à la CypD via des interactions avec le site catalytique et la *gatekeeper pocket* (ou poche S2). Il n'existe à l'heure actuelle aucune autre famille de composés connus interagissant avec cette *gatekeeper pocket*.

3.4.1. Indication initiale : vers de nouveaux antiviraux

L'idée du développement de ces nouveaux inhibiteurs de cyclophilines est née de la constatation qu'une grande partie des virus affectant l'homme utilise les cyclophilines de leur hôte pour leur réplication. C'est notamment le cas pour le virus de l'hépatite C et le VIH (Scarлата *et al.*, 2003 ; Watashi *et al.*, 2005). Pourtant, la majorité des traitements antiviraux actuels cible directement les protéines virales, c'est ce que l'on appelle les antiviraux à action directe. Il existe cependant une autre stratégie qui cible non pas le virus mais l'hôte. Cette stratégie ciblant l'hôte (*Host Targeted Strategy*) a longtemps été employée pour le traitement de l'hépatite C par l'interferon- α ou la ribavirine.

Un des autres intérêts du développement de molécules ciblant les cyclophilines réside dans le fait qu'à la différence des antiviraux directs, ces molécules pourraient constituer des antiviraux à large spectre. Par ailleurs, leur capacité à cibler les protéines de l'hôte et pas celles du virus devrait diminuer le risque d'apparition de résistances (Pawlotsky, 2014). Enfin, le développement de molécules de faible poids moléculaire et de synthèse simple permet de faire diminuer les coûts de production par rapport aux nouvelles molécules dérivées de la CsA qui sont complexes et coûteuses à produire.

3.4.2. Rationnel de développement : *Fragment Based Drug Discovery*

Le design de ces nouveaux ligands des cyclophilines repose sur l'utilisation de la technique de *Fragment Based Drug Discovery* (FBDD). Cette technique fait appel au couplage des techniques de cristallographie aux rayons X et de RMN. Bien que relativement récente, cette méthode révolutionne actuellement le domaine de la recherche médicamenteuse. En effet, alors que les méthodes classiques employées (synthèse en série et screening à haut débit) consistent généralement à s'inspirer de molécules relativement puissantes et déjà existantes, la technique du FBDD s'attache à identifier l'interaction de fragments de tailles plus réduites (généralement des fonctions chimiques isolées) dont les interactions, bien que beaucoup plus faibles, permettront ensuite de concevoir des molécules innovantes de taille plus importante en les reliant entre eux (Figure 17).

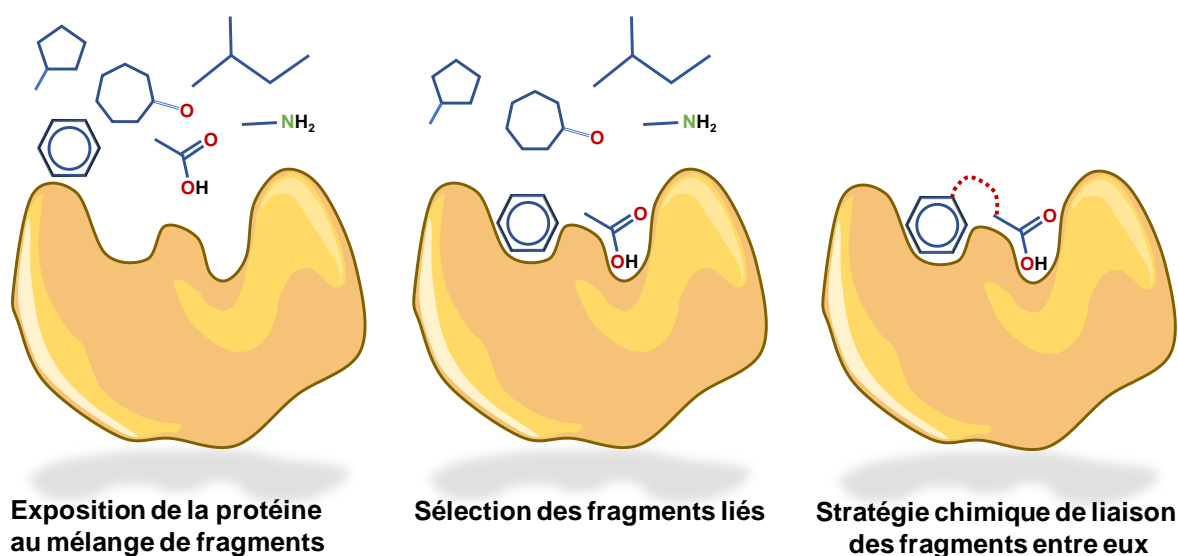


Figure 17 : Principe schématique du *Fragment Based Drug Discovery*.

Dans le cas présent, une première étape de *screening* a été réalisée *in silico*. Plusieurs banques de fragments chimiques ont été virtuellement testées à l'aide du logiciel *FlexX*. Cette première étape a permis de sélectionner une quarantaine de fragments susceptibles d'interagir avec les deux poches du site actif de la CypD.

Ces fragments ont ensuite été testés par spectroscopie RMN pour mettre en évidence leur interaction avec la CypD. Parmi ces fragments, une dizaine présentait une constante de dissociation d'ordre mM. Ces fragments et des dérivés proches ont été étudiés par cristallographie. Les structures obtenues sur les clichés de diffraction ont montré que 14 de ces fragments se lient au site actif de la CypD dont 4 au niveau du site catalytique, 5 au niveau de la *gatekeeper pocket* et 1 entre les deux sites. La capacité de ces fragments à inhiber l'activité enzymatique des cyclophilines A, B et D a ensuite été évaluée. Chacun de ces composés présentait une IC_{50} supérieure à 5 mM.

Enfin, certains de ces fragments ont été choisis pour la synthèse chimique des nouveaux inhibiteurs en fonction de leur localisation et du type d'interaction chimique, de leur potentiel d'optimisation future et de la faisabilité de la synthèse chimique. L'aniline, qui s'enfonce dans la *gatekeeper pocket* (poche S2 ; Figure 17), et la fonction méthoxyester qui interagit avec le site catalytique ont ainsi été sélectionnées pour débiter la synthèse chimique.

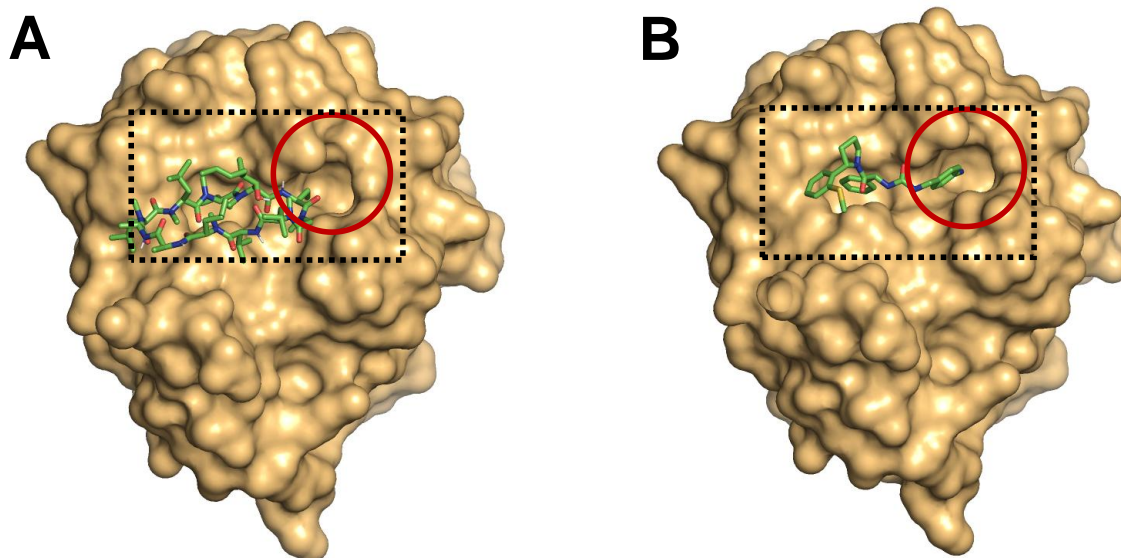


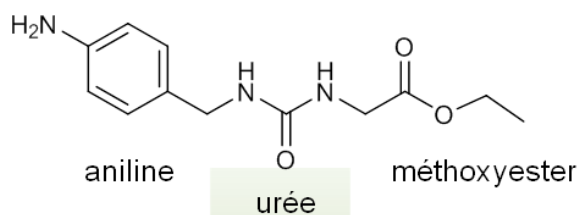
Figure 18 : Mode de liaison de la CsA (A) et du C31 (B) dans le site actif de la CypD. Le site actif est encadré en noir et la poche S2, atteinte uniquement par l'aniline du C31, est entourée en rouge. Docking moléculaire calculé par *AutoDock Vina* et représentations générées grâce au logiciel *PyMOL*.

L'étape suivante a consisté à relier ces fragments aniline et méthoxyester sélectionnés. Par analogie avec la structure de la CsA, le choix du *linker* s'est porté sur une fonction urée qui permet d'établir des liaisons hydrogène avec la glutamine-63 et l'asparagine-102. Le premier composé généré de cette façon inhibe l'activité enzymatique des cyclophilines avec une IC_{50} d'ordre micromolaire.

Par la suite, la première étape d'optimisation de cette molécule a porté sur la modification de la fonction méthoxyester, trop sensible à l'hydrolyse. Cependant, il était nécessaire que la fonction de remplacement puisse encore déplacer l'Arg55. Le choix du substituant s'est donc porté sur le groupement phénylpyrrolidine qui conserve cette interaction tout en couvrant largement le site catalytique. L'ajout d'un thiométhyle sur le groupement phényle permet une interaction plus prononcée avec l'Arg55 et diminue l' IC_{50} . Enfin, le carbone laissé libre entre l'urée et le carbonyle autorise la pharmacomodulation et la diversification des composés de dernière génération. Cette substitution, en augmentant la surface d'interaction avec le site catalytique des cyclophilines accroît l'affinité des molécules (Figure 19).

1^{ère} génération

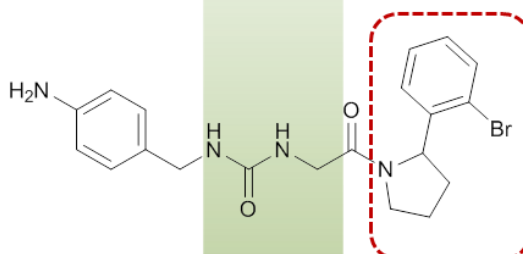
Inhibition de la CypD :
 $IC_{50} = 16,20 \pm 3,70 \mu M$



2^{ème} génération

Substitution de l'ester
par le groupement
Phénylpyrrolidine

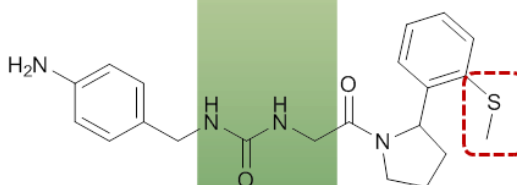
Inhibition de la CypD :
 $IC_{50} = 6,23 \pm 2,20 \mu M$



3^{ème} génération

Ajout d'un groupement
thiométhyle

Inhibition de la CypD :
 $IC_{50} = 0,64 \pm 0,07 \mu M$



4^{ème} génération

Pharmacomodulation
par substitution du carbone

Inhibition de la CypD :
 $IC_{50} = 0,21 \pm 0,08 \mu M$

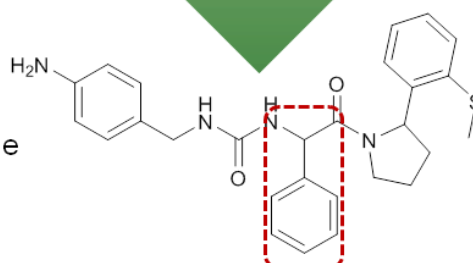


Figure 19 : Modifications chimiques majeures apportées au cours de l'amélioration des nouveaux inhibiteurs de CypD. Les modifications sont encadrées en rouge.

3.4.3. Première caractérisation

Les résultats des premières expériences *in vitro* montrent que ces nouveaux composés sont solubles dans les milieux aqueux ioniques quel que soit le pH et sont stables dans un tampon phosphate à 37°C. D'autres tests réalisés sur cellules montrent que ces molécules sont dépourvues d'effets cytotoxiques même à fortes concentrations. De plus, du fait de leur petite

taille, ces composés n'affectent ni l'interaction CypA/calcineurine ni l'état de phosphorylation du facteur nucléaire des lymphocytes T activés et sont donc dépourvus de propriétés immunosuppressives.

Depuis le début de ce travail, deux équipes de recherche ont développé des molécules similaires, de structure très proche comprenant entre-autres le groupement anilide et le groupement phényl-pyrrolidine, reliés par un pont urée. Ces deux groupes ont montré des effets protecteurs de ces petits inhibiteurs de cyclophilines dans des modèles cellulaires de pancréatite aiguë (Shore *et al.*, 2016) et de dégénérescence rétinienne induite par l'exposition aux ultra-violets (Xie *et al.*, 2017). Ces résultats obtenus en parallèle des nôtres confirment le potentiel thérapeutique de cette classe de molécules dans de multiples indications.

RESEARCH ARTICLE

Targeting mitochondrial permeability as a pharmacological cardioprotective strategy.

Mathieu Panel^{1,2,*}, Bijan Ghaleh^{1,2}, Didier Morin^{1,2}

Affiliations:

¹ INSERM U955, équipe 3, Créteil, France.

² Université Paris-Est, UMR_S955, DHU A-TVB, UPEC, Créteil, France.

***Corresponding author:** Didier MORIN, PHD, INSERM U955 – équipe 3, Faculté de Médecine de Créteil, 8, rue Général Sarrail, 94010 CRETEIL Cedex, France, Tel : 33-1-49.81.36.51, Fax : 33-1-49.98.36.61, E-mail: didier.morin@inserm.fr

E-mail addresses:

Mathieu Panel: mathieu.panel@inserm.fr

Bijan Ghaleh : bijan.ghaleh@inserm.fr

Abstract

Ischemia-reperfusion injury is a leading cause of death in Western countries. Currently, the only treatment to reduce infarct size and to improve the clinical outcome after myocardial ischemia is the rapid restoration of blood flow and the development of reperfusion techniques has strongly reduced the morbidity and mortality in patients. However, the efficacy of this clinical approach is limited because cardiac reperfusion *per se* gives birth to cellular injury. During the last decades, multiple studies demonstrated that the pathological signals induced by ischemia-reperfusion converge towards mitochondria and that most of cell death in the heart is induced by the permeabilization of mitochondrial membranes in the early reperfusion. The search for drugs able to block or to inhibit mitochondrial membrane permeabilization has been the subject of growing interest. It gave birth to several pharmacological approaches to protect from myocardial ischemia-reperfusion injury in experimental models and clinical settings. This review describes these mitochondrial-targeting strategies with a focus on new pharmacological approaches which constitute real hope for the future.

Keywords: mitochondria, cardioprotection, mitochondrial permeability transition, ischemia-reperfusion

Introduction

Myocardial ischemia is a leading cause of death in developed countries and progresses continuously in emerging countries. Today, the only available treatment to reduce infarct size and to improve the clinical outcome after myocardial ischemia remains the restoration as rapidly as possible of the blood flow (reperfusion) in the occluded coronary

arteries (by angioplasty, thrombolysis or surgery). However, the efficacy of this clinical strategy is limited because the restoration of blood flow in the ischemic myocardium paradoxically generates cellular lesions which are called "reperfusion injury". These lesions are mainly related to the massive cellular influx of Ca^{2+} and the production of reactive oxygen species (ROS). In the past decades, major efforts

have converged to find new "cardioprotective" pharmacological approaches that can be combined with reperfusion methods in order to reduce the lesions of reperfusion and thus the morbidity and the mortality following acute myocardial infarction (AMI).¹

This has been made possible by the enormous progresses that have been performed to decipher the cellular signaling pathways leading to cardioprotection after myocardial infarction and these advances provided several ways to develop pharmacological protective agents.¹

It is now well-established that the major cause of cell injuries during cardiac ischemia-reperfusion is the increase in the mitochondrial membrane permeability generated both by the formation of channels across the outer membrane and the opening of the mitochondrial transition pore (mPTP).^{2,3} This is a process whereby the inner mitochondrial membrane becomes permeable to solutes (For review see ⁴). Its opening is detrimental for the cell as it causes mitochondrial swelling, loss of membrane potential, inhibition of oxidative phosphorylation and may result in rupture of outer mitochondrial membrane leading to cell death.^{5,6}

The limitation of mitochondrial membrane permeability during the reperfusion of the ischemic myocardium represents, therefore, a major objective to attenuate lethal reperfusion injury and to get the most benefit from reperfusion strategies. In the present review, we will discuss pharmacological strategies (1) acting on signaling pathways and/or endogenous factors which promote mitochondrial membrane permeabilization or (2) targeting mitochondrial channels involved in the permeabilization. This review does not provide a coverage of the cellular and mitochondrial events occurring during cardiac reperfusion after a prolonged period

of ischemia since this has been well-reviewed in previous articles.⁷⁻¹⁰

1. Pharmacological strategies targeting signaling pathways involved in mitochondrial membrane permeabilization

The discovery of the cardioprotective effect of ischemic preconditioning, *i.e.*, non lethal brief episodes of ischemia-reperfusion preceding a prolonged ischemic period, was a major step to decipher the mechanisms leading to cell death during reperfusion injury and the signaling pathways responsible for cytoprotection.¹ Ischemic preconditioning which was originally described by Murry et al. is one of the most powerful strategies to protect the heart against lethal reperfusion injury.¹¹ Studies demonstrated that ischemic preconditioning causes the release of four G protein-coupled receptors agonists, adenosine, bradykinin, opioid and sphingosine that activates a cascade of cardioprotective kinases named the "Reperfusion Injury Salvage Kinase" or RISK pathway.¹² Although there is still some debate, this cascade includes PI3kinase, Akt, ERK1/2 and downstream proteins such as glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), protein kinase G (PKG), Bad or endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Other studies showed that protein kinase C (PKC) and mitochondrial ATP-sensitive potassium channels also belong to the ischemic preconditioning signaling pathway.^{13,14} Subsequently, another signaling pathway named the Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway that is activated independently of the RISK pathway was identified. It is initiated by the Tumor necrosis factor alpha and involves the activation of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3)¹⁵ but appears to play a more important role in larger animals than in rodents.¹⁶

Although the overall signaling pathway is not completely understood, it is now accepted that these actors converge to mitochondria to prevent the formation of the mPTP which is considered to induce much of cell death in the heart in the first minutes of reperfusion. The mechanism by which the RISK pathway inhibits mPTP is unclear, but several candidates have been proposed which may act in concert to mediate mPTP inhibition.^{17,18}

Similarly to ischemic preconditioning, postconditioning (reperfusion-reocclusion cycles at the onset of reperfusion) and remote preconditioning (brief periods of ischemia applied in a distant tissue) promote cardioprotection mediated by a kinase response and a limitation of mPTP opening.¹⁹⁻²² However, recent studies suggest that the cardioprotection induced by remote and postconditioning could be independent from the RISK pathway in large animals.¹⁶⁻²²

Nevertheless, activation of RISK and SAFE pathways provides a possible therapeutic intervention to inhibit mPTP opening and to protect the heart at reperfusion and several pharmacological strategies have been used.

1.1. Targeting of the RISK pathway

Adenosine was the first G protein-coupled receptor ligand shown to mimic the cardioprotective effect of ischemic preconditioning when administered prior to coronary occlusion in the animal.²³ This experimental investigation was followed by two small clinical trials showing myocardial protection when adenosine was administered at high doses during AMI as an adjunct to angioplasty and thrombolysis.^{24,25} Two larger randomized controlled studies also observed a reduction in infarct size^{26,27} but this pharmacological strategy failed to improve clinical outcomes.²⁷ However, a recent meta-analysis evaluating all randomized trials, comparing

intracoronary adenosine administration versus placebo in ST-segment myocardial infarction (STEMI) patients undergoing primary percutaneous coronary intervention (PCI), demonstrated a clinical benefit for adenosine in hard endpoints, such as adverse cardiovascular events.²⁸

Opioid receptors also activate the RISK pathway and morphine promotes potent cardioprotection in experimental studies when administered upon reperfusion.²⁹ This cardioprotective effect involves the inhibition of the mPTP.³⁰ In a clinical study, morphine improved the protective effect of remote preconditioning during PCI.³¹ In a more recent study, Zhang et al. showed that morphine may provide enhanced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in children undergoing corrections of Tetralogy of Fallot but this study concerned only a small number of children.³² However a recent trial failed to reduce infarct size in STEMI patients.³³

Other G protein-receptor ligands such as the growth factor urocortin and the glucagon-like peptide-1 confirmed the link between the activation of the RISK pathway and the induction of a cardioprotective effect.^{34,35} This link exists also for a variety of other pharmacological agents activating membrane receptors. Experimental studies demonstrated that TGF β -1, insulin, insulin growth factor and erythropoietin elicited cardioprotection through the activation of the RISK pathway when administered at reperfusion (for review see 36). Among these drugs, erythropoietin gave birth to several preclinical studies (for example 37-40) but also to some clinical trials. In patient with STEMI, the administration of high doses of erythropoietin did not show cardioprotective effect⁴¹⁻⁴⁴ whereas low doses of the drug appeared to be beneficial.⁴⁵ A large clinical study has been conducted but the results have not yet been published.⁴⁶

Besides to the drugs acting through membrane receptor mediated mechanisms, a number of agents confer cardioprotection by activating components of the RISK pathway downstream to these receptors. This is the case of statines which, in addition to their lipid lowering properties, were shown to stimulate different kinases belonging to the RISK pathway⁴⁷⁻⁴⁹ but also to activate the mitochondrial K_{ATP} channel through nitric oxide production.⁵⁰ Statins were investigated in clinical trials leading to mixed results.^{43,51,52}

Another pharmacological strategy is to directly target PKC which plays a crucial role in drug-induced cardioprotection. Epsilon-PKC is a primary cardioprotective PKC isoform, whereas delta-PKC promotes injury. In a recent clinical study, a selective inhibitor of delta-PKC, which reduced infarct size during ischemia-reperfusion in animal models, diminished myocardial necrosis and improved reperfusion in a pilot study during primary PCI⁵³ but did not reduce biomarkers of myocardial injury in a larger trial.⁵⁴

1.2. Targeting of the SAFE pathway

The discovery of the SAFE pathway is more recent but its components are also the target of drugs that mimic conditioning and offer the opportunity to promote cardioprotection at reperfusion. In this context, high density lipoproteins, glyceryltrinitrate, cariporide, resveratrol and melatonin were shown to protect the heart against ischemia-reperfusion damage by activating the SAFE pathway and thereby inhibiting mPTP opening.⁵⁵⁻⁵⁸ It is important to emphasize that crosstalk between the RISK and the SAFE pathways have been described⁵⁹ and some drugs first considered as selective activators of the RISK pathway also stimulate the SAFE pathway. For example, recent data indicate that the cardioprotective effect of morphine is also mediated by STAT3-activation⁶⁰ and Brulhart-Meynet et al. demonstrated that Akt, STAT3 and ERK1/2 were similarly activated by high density lipoproteins.⁶¹ In the same way,

erythropoietin-induced cardioprotection in a rodent model of prolonged hypothermic global ischemia-reperfusion injury seems to be mediated via activation of the SAFE cytoprotective signaling pathway.⁶² Similarly, the cardioprotective effect of atorvastatin is related to the inhibition of mPTP opening secondary to the activation of TNF- α and the JAK/STAT pathway in early reoxygenation of the human myocardium, *in vitro*.⁶³

2. Pharmacological modulation of endogenous factors inducing mPTP

It is well-established that mitochondrial Ca^{2+} overload is essential to activate mPTP opening at reperfusion and that other factors such as adenine nucleotide depletion, high phosphate concentrations and more particularly ROS are involved in the formation and/or in the regulation of the pore. These factors enhance the sensitivity of the mPTP for Ca^{2+} that possesses binding sites in the mitochondrial inner membrane facing the matrix.⁵ Therefore, inhibiting mitochondrial Ca^{2+} overload and limiting ROS, the primary activators of mPTP opening during cardiac ischemia-reperfusion, are relevant objectives to protect the heart.

2.1. Calcium

The majority of the studies indicate that cellular Ca^{2+} rises during ischemia and precedes irreversible injury of the cell.⁶⁴ This is in agreement with the observation that hearts issued from mice lacking the Na^+/Ca^{2+} or the Na^+/H^+ exchanger which both contribute to the rise in cellular Ca^{2+} during ischemia have decreased injury after ischemia-reperfusion.⁶⁵⁻⁶⁶ Inhibitors of these exchangers have been shown to limit ischemia-reperfusion injury⁶⁷⁻⁶⁹ and this constitutes an interesting strategy to attenuate mitochondrial Ca^{2+} overload and mPTP opening^{70,71}. Besides limiting Ca^{2+} accumulation, inhibition of Na^+/H^+

exchanger decreases intracellular pH which is also known to inhibit mPTP opening during early reperfusion.⁹

Another way to limit Ca^{2+} overload is to act on the sarcoplasmic reticulum. The sarcoplasmic reticulum is an important cellular Ca^{2+} sink which regulates cytosolic Ca^{2+} and improving sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} handling has been shown to protect mitochondria against mPTP opening and to reduce ischemic injury.^{72,73} In this context, recent results revealed that the interaction between sarcoplasmic reticulum and mitochondria⁷⁴ could play a role in mitochondrial Ca^{2+} overload at reperfusion and could constitute a target to protect cardiomyocytes against reperfusion injury.⁷⁵⁻⁷⁷

Since Ca^{2+} is a key inducer of mPTP opening, inhibition of mitochondrial Ca^{2+} uniporter, the protein responsible for mitochondrial Ca^{2+} uptake⁷⁸, was considered as a possible target. According to this hypothesis, Miyamae et al. reported that ruthenium red, a selective inhibitor of the Ca^{2+} uniporter, improved cardiac function in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion.⁷⁹ This was confirmed with the use of a selective and potent mitochondrial Ca^{2+} uniporter blocker.^{80,81} This is in line with the results of Kwong et al. demonstrating that hearts from mice lacking the mitochondrial Ca^{2+} uniporter produced mitochondria resistant to mPTP opening upon Ca^{2+} overload and these hearts were protected from acute ischemia-reperfusion injury.⁸² Taken together, these data suggest that acute inhibition of the Ca^{2+} uniporter could be an interesting therapeutic approach to protect against cell death. However, opposite results indicate that it is necessary to better understand the mechanisms governing cell survival and cellular responses due to the loss of Ca^{2+} uniporter before developing therapies designed to prevent mitochondrial Ca^{2+} overload.⁸³

2.2. Reactive oxygen species (ROS)

Mitochondria are one of the key initiators of cellular ROS production. Electron leakage from the electron transport chain during respiration is generally considered as the main source of mitochondrial ROS but several other mitochondrial enzymatic systems have been found to produce ROS.⁸⁴ In physiological conditions, ROS formed within mitochondria are eliminated by powerful antioxidant systems.⁸⁴ During post-ischemic reperfusion, the sudden influx of oxygen leads to a burst of ROS^{85,86} which can overwhelm endogenous antioxidant systems. ROS produced during early reperfusion have been shown to be primary activators of mPTP and cardiomyocyte death.⁸⁷ The sensitization of mPTP along with an increase in mitochondrial protein carbonylation during myocardial ischemia emphasizes the role of the oxidative stress.⁸⁸

The question is how an increase in ROS production can affect mPTP opening? Former studies performed in isolated mitochondria have mentioned the role of oxidation-reduction of critical protein residues which could influence mPTP opening.⁸⁹ More particularly, the oxidation of thiol functions and cysteine residues, which is considered as an important mechanism to regulate protein structure, was described on proteins supposed to be involved in the formation of the pore or in the regulation of its opening. This concerns the adenine nucleotide translocase^{90,91}, cyclophilin D (CypD)⁹², ATP synthase⁹³ or complex I of the respiratory chain.⁹⁴ The oxidation of cardiolipin can also contribute to the effect of ROS on mPTP opening. Indeed, cardiolipin is specific of mitochondria and is the main lipid of the inner membrane. Cardiolipine is located close to the sources of ROS production and contains high level of unsaturated fatty acids susceptible of lipid peroxidation. Oxidized cardiolipine was shown to sensitize heart mitochondria to mPTP opening.⁹⁵

Therefore, the use of antioxidant agents has emerged as a relevant approach to limit mPTP opening and thus ischemia-reperfusion injury. In addition, it was recently suggested that the contribution of ROS might be more necessary than Ca^{2+} overload to maintain sustained mPTP opening and cell death at reperfusion⁹⁶, reinforcing the suitability of this approach.

It should be noted that the reduction of oxidative stress was suggested to contribute to the cardioprotective effect of several therapeutic drugs such as the substrate of oxidative-phosphorylation pyruvate⁹⁷⁻⁹⁹, the non-selective β -adrenoceptor antagonist carvedilol^{100,101} or the anaesthetic drug propofol widely used in cardiac surgery.^{102,103}

Several strategies aimed at scavenging ROS or increasing their degradation using a wide range of natural antioxidants or pharmacological agents inhibit mPTP opening and display cardioprotective effects in different *in vitro* and *ex vivo* model of ischemia-reperfusion.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ However, the translation of these successful laboratory results to the clinical setting remains inconsistent.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ It should be noted that a recent clinical trial associating N-acetylcysteine with nitrate therapy showed reduced infarct size in STEMI patients undergoing PCI.¹¹¹ Adlam *et al.* demonstrated that targeting antioxidant to mitochondria can reduce reperfusion injury but that the protective effect is lost when the antioxidant agent did not accumulate into mitochondria.¹¹² This can explain the absence of effect of antioxidants since a lot of these drugs exhibit low bioavailability and low selectivity. Thus, they do not reach mitochondria or require high dosage to reach mitochondria *in vivo*. In this case, high doses of antioxidant agents, such as polyphenols for instance, can act as prooxidants¹¹³, leading to cellular dysfunction and cell death. The challenge is, therefore, to target antioxidants to mitochondria and to reduce the deleterious consequence of off-target subcellular localization.

Several approaches have been reported (see reviews^{86,101,114,115}) and here we just mention them briefly. The first one uses the high selective mitochondrial membrane potential as a selective system to deliver molecules to the organelle. Lipophilic cations are conjugated to antioxidant compounds which are sufficiently lipophilic to cross lipid bilayer membranes. These substances can be selectively taken up into the mitochondria by the large, negative inside, inner membrane potential.¹¹⁶ A disadvantage of this strategy is that the molecules need a certain level of membrane potential and thus viable mitochondria to accumulate inside the organelle. These drugs include alpha tocopherol (MitoVit E), ubiquinone (MitoQ), SNO (MitoSNO), tempol (MitoTempol), resveratrol (Mito-resveratrol) and plastoquinone (SkQs compounds). A number of experimental studies indicate that these drugs could constitute a valid approach to limit cardiac reperfusion-injury.^{112,117-119} The second mitochondrial delivery drug system are peptides engineered to facilitate the crossing through the mitochondrial inner membrane. These peptides are mitochondrial penetrating peptides¹²⁰, hemigramicidin-TEMPO conjugates¹²¹ and Szeto-Schiller (SS) peptides.¹²² SS-peptides are today the most promising peptides to reduce ischemia-reperfusion injury. SS-peptides include a sequence motif targeted to mitochondria and enter the mitochondria in a potential-independent manner. Their antioxidant effect is due to the presence of basic amino acids, tyrosine and dimethyltyrosine, which are effective at scavenging ROS. These peptides reduce mitochondrial ROS production, inhibit mPTP opening and prevent the release of cytochrome c from mitochondria.¹²³ They were shown to reduce infarct size in rats when they were administered before ischemia¹²⁴ or at reperfusion.¹²² One of these peptides was also shown to stabilize the interaction between cardiolipine and cytochrome c and to improve oxidative

phosphorylation.¹²⁵ This effect can also contribute to the anti-ischemic effect of these drugs. However, in a recent clinical trial, administration of this peptide at the time of PCI failed to reduce infarct size.¹²⁶

It should be kept in mind that ROS also exert physiological role. Therefore, we cannot disregard the importance of physiological low concentrations of ROS which are necessary for signaling processes. Determining the threshold separating the physiological from the pathological level of ROS remains a major objective which could help to develop antioxidant agents efficient during myocardial ischemia-reperfusion.

3. Pharmacological control of mPTP opening

mPTP is thought to be a multiprotein complex which forms and opens under conditions that prevail at the time of reperfusion such as Ca^{2+} overload, oxidative stress, adenine nucleotide depletion, high phosphate concentrations or membrane depolarization.⁵ mPTP was originally thought to form at contact sites between inner and outer membranes, involving the Voltage Dependent Anion Channel, the Adenine Nucleotide Transporter and the Phosphate Carrier. However, genetic ablation of those putative components successively ruled out their participation in the structure of the pore.^{127,128} Recently, a new hypothesis proposes that ATP synthase might form the core of the pore, either by dimerization or by detachment of the c subunit. Nevertheless, a common agreement considers that opening of the mPTP is under the control of CypD. CypD is a soluble matrix protein which catalyses or stabilizes the open state of mPTP. The crucial role of CypD has been demonstrated by the deletion of the gene in mice, allowing mitochondria to sustain higher Ca^{2+} concentrations by desensitizing mPTP.^{129,130}

3.1. Targeting CypD

3.1.1. Cyclosporin A and its derivatives

The first demonstration of the impact of CypD inhibition on pore opening was made by the observation that cyclosporin A (CsA), an immunosuppressant agent targeting all cyclophilins, inhibits mPTP opening. CsA binds tightly to cyclophilins and inhibits peptidyl-prolyl-*cis-trans*-isomerase (PPIase) activity. In mitochondria, interaction of CsA and CypD results in inhibition of PPIase activity and inability of CypD to bind to membrane proteins. This results in pore closure. Since the observations made by Crompton and colleagues¹³¹, CsA has been proven to be protective in several *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models although several failures were reported in larger animals (for a review, see¹³²). A proof of concept clinical trial demonstrated that administration of 2.5 mg/kg at the time of PCI is cardioprotective.¹³³ This was associated with reductions in biomarker release and adverse remodeling at 6 month post PCI.¹³⁴ Based on these encouraging results, CIRCUS (Cyclosporin to ImpRove Clinical Outcome in STEMI patient), a phase III placebo-controlled trial including 975 patients failed to demonstrate any beneficial effect of CsA administration on every endpoint.¹³⁵ Another phase III clinical trial, CYCLE, also failed to recapitulate the beneficial effects of CsA.¹³⁶ These negative results have been extensively commented elsewhere (e.g.¹³⁷⁻¹³⁹) and raise major concerns toward the clinical use of CsA in mPTP based pathologies.

Enhancing mitochondrial bioavailability might help to counteract the side effects observed with CsA and could enlarge its therapeutic window. To this end, a mitochondrial targeted CsA (mtCsA) designed to minimize non CypD interactions in cells was developed by the Crompton's group. They combined CsA with a triphenylphosphonium cation to specifically target mitochondria.^{140,141} This improved

cytoprotection in a simulated ischemia-reperfusion model by lowering the maximal concentration needed to inhibit mPTP opening and decreasing cellular toxicity.¹⁴¹ Following the same principle, JW47, a CsA derivative coupled with a quinolinium cation demonstrated reduced cellular toxicity and afforded significant protection in a mouse model of encephalomyelitis by selectively inhibiting CypD.¹⁴² Recently, the use of nanoparticles to address CsA to ischemic myocardium yielded promising results.¹⁴³ Indeed, encapsulated CsA accumulated in the mitochondria of the ischemic area, resulting in a decrease in infarct size in mice at lower concentrations than CsA alone.

CsA has also been modified to provide derivatives devoid of immunosuppressant activity by modifying the residues normally interacting with calcineurin. This is the case for NIM811 (N-methyl-4-isoleucine-CsA) which inhibits mPTP opening^{144,145} and exerts protective effect in various models of diseases where mPTP plays a major role such as post-cardiac arrest syndrome in rabbits^{146,147}, traumatic brain injury in rats and mice^{148,149} or cardiac and liver ischemia-reperfusion.^{150,151} Debio-025 (N-Me-Val-4-CsA, alisporivir) is another CsA derivative lacking the immunosuppressant activity which demonstrated cardioprotective effects.¹⁵²

Other cyclic polypeptides unrelated to CsA have been described as mPTP inhibitors. Sanglifehr A (SfA) is a cyclic polypeptide which exerts immunosuppressant activity independently from calcineurin interaction. As compared to CsA, SfA binds differently on CypD and shows important difference in its mechanism of action. Indeed, SfA inhibits PPIase function but does not inhibit the binding of CypD to mitochondrial membranes and especially to ANT.¹⁵³ SfA inhibits mPTP opening as potently as CsA, suggesting that inhibiting PPIase activity, rather than CypD binding to the mPTP components, is the key event in this mPTP inhibition strategy.

Antamanide is a cyclic decapeptide derived from the fungus *Amanita phalloides* which has been described to exert immunosuppressant activity by interacting with CypA but not calcineurin.¹⁵⁴ In this context, it has been supposed that antamanide could also inhibit CypD and therefore block mPTP opening. Antamanide antagonizes mPTP opening *in vitro* by inhibiting CypD PPIase activity although it displays a ten times lower affinity for CypD than CsA.¹⁵⁵

Nevertheless, all of these drugs have limitations which hamper their clinical use. Indeed, they have severe side effects including nephrotoxicity, neurotoxicity and hepatotoxicity which limit their use *in vivo*.

3.1.2. New small molecules inhibiting CypD

Recently, the discovery of new non peptidic small-molecules inhibitors of cyclophilins (SMCypI) unrelated to CsA or SfA have been described.¹⁵⁶ These compounds were designed by fragment based drug discovery and aimed at inhibiting cyclophilins PPIase activity with submicromolar activity. These inhibitors are non-toxic small molecules devoid of immunosuppressive effects. In addition, one can imagine coupling them to lipophilic cations to develop their mitochondrial selectivity similarly to previous antioxidant agents, to bypass the other cellular cyclophilins and increase their selectivity for CypD. Based on this molecular scaffold, two groups developed small inhibitors of CypD which demonstrated cytoprotection in cellular models of acute pancreatitis¹⁵⁷ and UV-associated retinal degeneration¹⁵⁸ by inhibiting mPTP opening although they have not been tested *in vivo* yet. The cardioprotective properties of these molecules remains currently under investigation.

Another group identified the 4-aminobenzenesulfonide scaffold as a CypD inhibitor.¹⁵⁹ Their compound, C-9, binds to CypD and inhibits PPIase activity with a micromolar IC₅₀. This allowed the inhibition

of Ca^{2+} induced mitochondrial swelling. *In vitro*, C-9 prevented mitochondrial dysfunction induced by $\text{A}\beta$ peptide in neuronal cells as demonstrated by the restoration of ATP content and cytochrome c oxidase function. Moreover, C-9 did not exert toxic effect on cellular cultures even at high concentrations (100 μM).

As CypD is only a modulator of mPTP opening, its inhibition decreases the susceptibility of opening rather than totally blocking it. Indeed, in mitochondria devoid of CypD, pore opening can still be observed at higher Ca^{2+} concentrations. Hence, inhibiting CypD may not be sufficient to afford protection in case of severe stimuli, emphasizing the needs for other targets as well.

3.2. mPTP inhibitors that do not interact with CypD

As previously described, CypD inhibition displays limitations and a number of groups try to identify inhibitors acting through other modulators of the pore or directly interacting with a pore component although the exact structure of the pore remains elusive.

3.2.1. TSPO ligands

An example is the 18 kDa translocator protein (TSPO), an outer membrane protein which has been shown to interact with putative components of the mPTP.¹⁶⁰ Several studies have demonstrated that TSPO ligands, such as SSR180575 and 4³-chlorodiazepam, exert cardioprotective effects.^{161,162} This effect was associated with a limitation of the permeability of mitochondrial membrane to cytochrome c and Apoptosis Inducing Factor. 4³-chlorodiazepam also increased the resistance of mitochondria to Ca^{2+} -induced mPTP opening. A similar profile was observed with TRO40303. TRO40303 is a ligand which was originally selected using a cell-based screening assay aimed to identify small molecules that maintain survival of trophic factor-deprived rat motor neurons.¹⁶³

TRO40303 binds specifically to the cholesterol site of TSPO and exhibits cytoprotective properties in various cell types. TRO40303 was shown to inhibit mPTP opening in isolated cardiomyocytes.¹⁶⁴ It has to be noted that TRO40303 does not decrease mitochondrial sensitivity to Ca^{2+} as assessed by the measurement of mitochondrial Ca^{2+} retention capacity, indicating that it might inhibit mPTP opening by an indirect mechanism of action. This is in line with the data of Sileikyte and co-workers who demonstrated that TSPO is not required to regulate mPTP opening in TSPO KO mouse heart.¹⁶⁵ However, a new indirect mechanism was recently described. Paradis et al. (2013) showed that the reperfusion of an ischemic myocardium was associated with an accumulation of cholesterol into mitochondria and a concomitant strong generation of auto-oxidized oxysterols resulting from the oxidation of cholesterol by ROS.¹⁶⁶ The TSPO ligands 4³-chlorodiazepam and TRO40403 abolished the mitochondrial accumulation of cholesterol and the formation of oxysterols, reduced oxidative stress and prevented mPTP opening at reperfusion.¹⁶⁶ They remained efficient in hypercholesterolemic conditions.¹⁶⁷ This new and original mechanism may contribute the cardioprotective properties of TSPO ligands.

In vivo, administration of TRO40303 reduced reperfusion injury in rats^{164,168} but the cardioprotective effect of the drug was not confirmed in a clinical trial (MITOCARE) which demonstrated no benefit in patients when TRO40303 was administrated at the time of PCI.¹⁶⁹

3.2.2. Ubiquinones

Several ubiquinones have been described as mPTP inhibitors while others are mPTP inducers. Indeed, mPTP might possess a quinone binding site which controls the Ca^{2+} sensitivity.¹⁷⁰ The most potent ubiquinone Ub0 increases the Ca^{2+} retention capacity in a

larger extent than CsA suggesting that ubiquinones do not act by inhibiting CypD. Another argument is that Ub5 is able to antagonize the inhibition afforded by Ub0 but not that afforded by CsA. Inhibition by ubiquinones is not limited to Ca²⁺-induced mPTP but is also observed with other inducers such as atractyloside, oxidative stress and mitochondrial depolarization.¹⁷⁰ The exact mechanism of action by which ubiquinones inhibit mPTP opening is not known but, as they also interfere with the electron transport chain, it has been suggested that ubiquinones act as electron acceptor and exert antioxidant effect.¹⁷¹ Nevertheless, the most active ubiquinone Ub0 has never been tested *in vivo*, except as a mitochondrial targeted ubiquinone, mitoQ, which is cardioprotective by limiting oxidative stress.¹¹² Ub10, which is as potent as CsA, has been previously described to improve cardiac functional recovery in an isolated perfused rabbit heart model of ischemia-reperfusion¹⁷² but the authors did not mention the inhibition of mPTP as the protective mechanism involved. The preservation of ATP observed may suggest that mitochondria remain functional at the time of reperfusion which is consistent with pore closure. Cardioprotective effects of Ub10 have been extensively studied in the past, including a clinical trial demonstrating the benefit of Ub10 administration following myocardial infarction.¹⁷³

3.2.3. Cinnamic anilides

High throughput screening of commercially available small molecules libraries, based on isolated mitochondrial swelling, has led to the discovery of at least four classes of new, direct, low molecular weight mPTP inhibitors. The first class of these compounds was reported in 2014 by Fancelli and colleagues who demonstrated the potency of cinamic anilides derivatives.¹⁷⁴ Cinnamic anilides inhibited mitochondrial swelling induced by various mPTP known inducers such as Ca²⁺ overload, oxidative stress and chemical cross

linkers in isolated mitochondria. The compounds enhanced mitochondrial Ca²⁺ retention capacity more efficiently than CsA. The higher Ca²⁺ retention capacity observed suggests a CypD independent mechanism of action and this was confirmed by the additive effects produced by the association of CsA and cinamic anilides. *In vivo*, treatment with cinamic anilides at the time of reperfusion was able to limit infarct size in a rabbit model of ischemia-reperfusion but there was no difference with CsA.¹⁷² GNX-4728, a cinnamic anilide derivative also demonstrated protective effect in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis as it slowed the disease progression and improved motor function by limiting mPTP-mediated neurodegeneration.¹⁷⁵ A possible explanation of the mechanism of action of cinamic anilides was proposed by Richardson and Halestrap.¹⁷⁶ Their data suggest that these drugs might inhibit mPTP opening by interacting at the Ca²⁺ binding site between the Adenine Nucleotide Translocase and the inorganic phosphate carrier and thereby stabilizing the “c” conformation which favors mPTP closure.

3.2.4. Isoxazoles

Screening of the NIH Molecular Libraries Small Molecule Repository using Ca²⁺-induced mitochondrial swelling followed by structure-activity relationship optimization led to the identification of isoxazoles as powerful mPTP blockers with picomolar inhibitory activity.¹⁷⁷ They inhibited mPTP in both mouse liver mitochondria and HeLa cells demonstrating that their effect is not species-specific. Isoxazoles do not target CypD as mitochondria treated with isoxazoles exhibited at least a three-fold higher Ca²⁺ retention capacity than with CsA and association of isoxazoles and CsA resulted in a synergistic effect. According to the most recent hypothesis on mPTP structure, F₁F₀-ATP Synthase might form the core of the pore. Effect of isoxazoles on F₁F₀-ATP

Synthase was thereby assessed and the authors demonstrated that isoxazoles do not interfere with mitochondrial respiration suggesting that isoxazoles do not target F_1F_0 -ATP Synthase. The most efficient analogue demonstrated beneficial effect in a zebra fish collagen VI myopathy model as it improved motor function and muscle structural organization. However, the use of isoxazoles in murine and larger animal models is hampered by the instability of the compounds which are rapidly degraded.

3.2.5. Benzamides

Along with isoxazoles, Roy and colleagues identified benzamide scaffold as a potential mPTP blocker by high throughput screening and further derived the hit compounds to increase their mPTP inhibitory effect.¹⁷⁸ Phenylbenzamides were able to inhibit mitochondrial swelling induced by various mPTP inducers and increased Ca^{2+} retention capacity as potently as isoxazoles but in a greater extent than CsA. This effect was still present in mitochondria isolated from CypD null mice, demonstrating a CypD-independent mechanism of action. However, *in vivo* use of benzamides is hampered by their cellular toxicity as they decrease inner membrane potential and ATP synthesis.

3.2.6. ER-000444793

Finally, another group identified the compound ER-000444793¹⁷⁹ which was shown to delay mitochondrial depolarization in response to Ca^{2+} overload and to increase Ca^{2+} retention capacity, indicating that ER-000444793 inhibits mPTP opening. Experiments performed on purified CypD demonstrated that ER-000444793 inhibiting properties do not rely on inhibition of CypD enzymatic function.

Taken together, these recent data are rather encouraging after the CIRCUS and CYCLE trials failure, showing that there is still a place for new mPTP inhibitors. These data demonstrate that mPTP can be efficiently

inhibited by other mechanism independent from CypD. Such compounds could also bring new insights in elucidating the exact mPTP molecular identity. However, the lack of knowledge of the mPTP structure remains the main obstacle to develop novel mPTP inhibitors.

4. Pharmacological control of mitochondrial outer membrane permeability

Although mPTP opening is a well established mechanism mediating cell death during myocardial ischemia-reperfusion, clinical trials aiming to inhibit mPTP failed to demonstrate positive results. As mentioned above, several explanations have been proposed to explain these failures but a possibility is that mPTP inhibition is not sufficient *per se* to improve clinical outcome. Indeed, other mechanisms which can permeabilize mitochondrial membrane in the absence of mitochondrial depolarization and release proapoptotic agents from the mitochondrial intermembrane space have been described.¹⁸⁰⁻¹⁸² They include the formation of a channel by the proapoptotic members (Bax/Bak) of the Bcl-2 family proteins which control mitochondrial membrane permeabilization². This channel seems to correspond to the mitochondrial apoptosis-induced channel MAC.^{183,184} Mouse models of this family of proteins have revealed their importance during myocardial ischemia-reperfusion. Over-expression of Bcl-2 in mice, Bax deletion or interference with Bax activation attenuate apoptosis and reduce infarct size, while reduction of Bcl-2 levels suppresses the protection afforded against injury¹⁸⁵⁻¹⁸⁹. Therefore, targeting Bcl-2 family proteins or inhibiting the MAC channel appears attractive to develop anti-ischemic agents which could act through a gain of antiapoptotic or a loss of proapoptotic function. Several molecules that inhibited cytochrome c release and apoptosis triggered by induction of the Bax channel were

identified^{190,191} but they were not investigated in animal models.

Similarly, Hetz et al.¹⁹² identified two small Bax channel inhibitors which prevented cytochrome c release, mitochondrial depolarization and blocked apoptosis of neurons in an animal model of ischemic brain injury but to our knowledge these molecules have not been evaluated in animal models of myocardial ischemia-reperfusion. More recently, a promising approach used a chemical inhibitor of dynamin-related protein (Drp1) which regulates Bax/Bak mitochondrial outer membrane permeability.¹⁹³ This inhibitor, the mitochondrial division inhibitor 1, afforded neuroprotection *in vitro* and *in vivo*¹⁹⁴ and was effective to protect against myocardial ischemia-reperfusion injury only when administered before the induction of ischemia.¹⁹⁵ Using a nanoparticle delivery system which improved the delivery of the drug to the myocardium, Ishikita et al.¹⁹⁶ demonstrated that the intravenous administration of the mitochondrial division inhibitor 1 *in vivo* at the time of reperfusion reduced ischemia-reperfusion injury in wild-type but also in CypD knock-out mice.

Another candidate for mitochondrial membrane permeabilization is the voltage-dependent anion channel (VDAC). VDAC is the main permeability pathway for metabolites through the mitochondrial outer membrane¹⁹⁷ and is important for communication between the mitochondria and the rest of the cell. This probably explains the large number of proteins and small molecules interacting with this channel.¹⁹⁸ VDAC interacts with pro- and anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family members and one of its isoforms (VDAC1) has been involved in the mitochondrial release of proapoptotic proteins independently of mPTP opening¹⁹⁹⁻²⁰¹ whereas VDAC2 attenuates cell death²⁰² in part by binding and inactivating the Bcl-2 family member Bak.²⁰³ This highlighted VDAC as a potential therapeutic target in

ischemia-reperfusion. According to this idea, a cell permeable peptide corresponding to the BH4 domain of Bcl-XL, which had been reported to close VDAC and to prevent the VDAC-mediated release of cytochrome c²⁰⁴, was shown to attenuate ischemia-reperfusion injury in rat hearts²⁰⁵. However, the studies on VDAC did not lead to more therapeutic development in ischemia-reperfusion probably because a lot of questions remain concerning the function and the regulation of the channel *in vivo*.

5. Inhibition of mitochondrial membrane permeability: from basic science to effective clinical therapy.

Since the identification of the cardioprotective effect of preconditioning by Murry et al.¹¹, three decades of basic science allowed to demonstrate the central role of mitochondrial channels in the induction of myocardial injuries and to propose pharmacological agents or conditioning strategies for reducing infarct size. Numerous animal model studies have clearly demonstrated the potentiality of these approaches to reduce the extent of myocardial injury and clinical pilot studies displayed promising results^{53,133}. However, larger multicentric studies annihilated the encouraging results generated by these proof-of-concept trials and, for example, no protective effect could be observed with CsA^{135,136} or the delta-PKC inhibitor decasertib⁵⁴. In the same way, the TSPO ligand TRO40303 which displayed cardioprotective effects in animal models was ineffective in a clinical study.¹⁶⁹ Up to now, the translation of pharmacological or other approaches issued from experimental studies into clinical application remains negative.^{46,206}

Different reasons can be evoked to explain these failures^{138,139} such as pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in STEMI patients, patient recruitments but also the concomitant use of other drugs during PCI that possess *per se* cardioprotective effects

such as the anesthetic propofol or the P2Y12 platelet inhibitors.

Given that a number of different pharmacological interventions limiting mitochondrial membrane permeability have demonstrated positive results in preclinical studies (Figure 1) and that multiple factors are

involved in its induction, the combination of pharmacological strategies acting on these different targets appears as a realistic approach to reduce myocardial reperfusion injury. A good example is the recent clinical trial associating an antioxidant, N-acetylcysteine, with nitrate therapy.¹¹¹

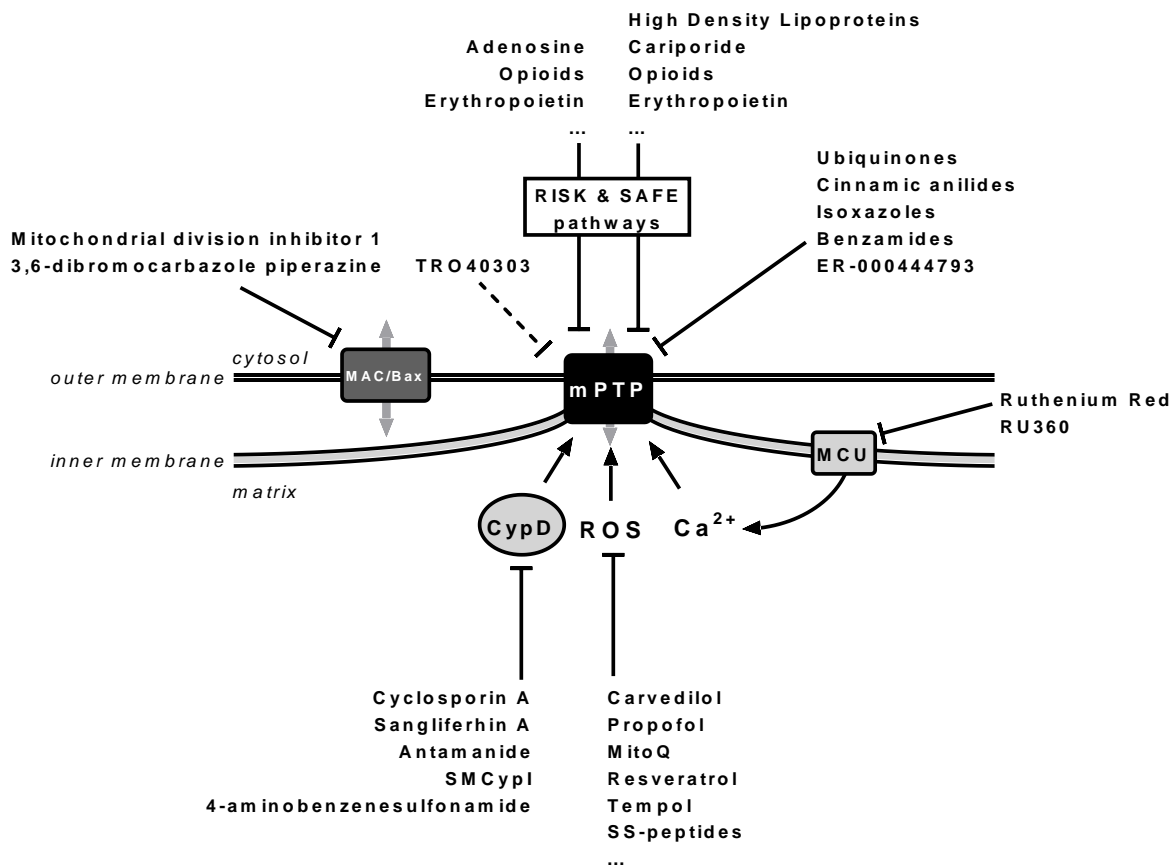


Figure 1: Pharmacological strategies aimed at limiting mitochondrial membrane permeabilization during myocardial ischemia-reperfusion.

Schematic representation of pharmacological strategies targeting mitochondrial membrane permeabilization either by limiting the formation of Mitochondrial Apoptosis-induced Channel (MAC/Bax) or by inhibiting the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP).

CypD: Cyclophilin D ; ROS: Reactive oxygen species ; RISK: Reperfusion Injury Salvage Kinase ; SAFE: Survivor Activating Factor Enhancement ; MCU: Mitochondrial Calcium Uniporter; SMCypI: small-molecule cyclophilins inhibitors

→ : induction

⊥ : direct (plain) or indirect (dotted) inhibition

References

1. Hausenloy DJ, Barrabes JA, Bøtker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J, Engstrom T, Ferdinandy P, Carbrera-Fuentes HA, Heusch G, Ibanez B, Iliodromitis EK, Inzerle J, Jennings R, Kalia N, Kharbanda R, Lecour S, Marber M, Miura T, Ovize M, Perez-Pinzon MA, Piper HM, Przyklenk K, Schmidt MR, Redington A, Ruiz-Meana M, Vilahur G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Garcia-Dorado D. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol.* 2016;111(6):70
2. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C45-C51.
3. Morciano G, Giorgi C, Bonora M, Punzetti S, Pavasini R, Wieckowski MR, Campo G, Pinton P. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Jan;78:142-53.
4. Szabo, I., Zoratti, M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev.* 2014;94(2):519-608.
5. Halestrap AP, Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Jan;78:129-41.
6. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 1999;341(Pt 2):233-49.
7. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357(11):1121-35.
8. Morin D, Assaly R, Paradis S, Berdeaux A. Inhibition of mitochondrial membrane permeability as a putative pharmacological target for cardioprotection. *Curr Med Chem.* 2009;16(33):4382-98
9. Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans.* 2010 Aug;38(4):841-60
10. Di Lisa F, Canton M, Carpi A, Kaludercic N, Menabò R, Menazza S, Semenzato M. Mitochondrial injury and protection in ischemic pre- and postconditioning. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(5):881-91.
11. Murry, C.E.; Jennings, R.B.; Reimer, K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74(5):1124-1136.
12. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005a;288(2):H971-6.
13. Auchampach JA, Grover GJ, Gross GJ. Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res.* 1992;26(11):1054-62.
14. Liu Y, Ytrehus K, Downey JM. Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26(5):661-8
15. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against

- reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(1):32-40.
16. Skyschally A, van Caster P, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, Schulz R, Heusch G. Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res.* 2009;104(1):15-8.
 17. Davidson SM, Hausenloy D, Duchon MR, Yellon DM. Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(3):414-9.
 18. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2010;105(6):771-85.
 19. Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med.* 2005b;15:69-75.
 20. Li J, Xuan W, Yan R, Tropak MB, Jean-St-Michel E, Liang W, Gladstone R, Backx PH, Kharbanda RK, Redington AN. Remote preconditioning provides potent cardioprotection via PI3K/Akt activation and is associated with nuclear accumulation of β -catenin. *Clin Sci (Lond).* 2011;120(10):451-62.
 21. Turrell HE, Thaitirarot C, Crumby H, Rodrigo G. Remote ischemic preconditioning of cardiomyocytes inhibits the mitochondrial permeability transition pore independently of reduced calcium-loading or sarcKATP channel activation. *Physiol Rep.* 2014;2(11). pii: e12231.
 22. Skyschally A, Gent S, Amanakis G, Schulte C, Kleinbongard P, Heusch G. Across-Species Transfer of Protection by Remote Ischemic Preconditioning With Species-Specific Myocardial Signal Transduction by Reperfusion Injury Salvage Kinase and Survival Activating Factor Enhancement Pathways. *Circ Res.* 2015;117(3):279-88.
 23. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation.* 1991;84(1):350-6.
 24. Marzilli M.; Orsini E.; Marraccini P.; Testa R. Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction. *Circulation,* 2000, 101(18), 2154-2159.
 25. Quintana M.; Hjemdahl P.; Sollevi A.; Kahan T.; Edner M.; Rehnqvist N.; Swahn E.; Kjerr A.C.; Näsman P.; ATTACC investigators. Left ventricular function and cardiovascular events following adjuvant therapy with adenosine in acute myocardial infarction treated with thrombolysis, results of the ATTenuation by Adenosine of Cardiac Complications (ATTACC) study. *Eur. J. Clin. Pharmacol.,* 2003, 59(1), 1-9.
 26. Mahaffey K.W.; Puma J.A.; Barbagelata N.A.; DiCarli M.F.; Leeser M.A.; Browne K.F.; Eisenberg P.R.; Bolli R.; Casas A.C.; Molina-Viamonte V.; Orlandi C.; Blevins R.; Gibbons R.J.; Califf R.M.; Granger C.B. Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a

- multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1999, 34(6), 1711-1720.
27. Ross A.M.; Gibbons R.J.; Stone G.W.; Kloner R.A.; Alexander R.W. AMISTAD-II Investigators. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2005, 45(11), 1775-1780.
28. Polimeni A, De Rosa S, Sabatino J, Sorrentino S, Indolfi C. Impact of intracoronary adenosine administration during primary PCI: A meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2016 Jan 15;203:1032-41
29. Gross, E.R.; Hsu, A.K.; Gross, G.J. Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ. Res.*, 2004, 94(7), 960-966.
30. Obame, F.N.; Plin-Mercier, C.; Assaly, R.; Zini, R.; Dubois-Randé, J.L.; Berdeaux, A.; Morin, D. Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 beta, SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2008, 326(1), 252-258.
31. Rentoukas I, Giannopoulos G, Kaoukis A, Kossyvakis C, Raisakis K, Driva M, Panagopoulou V, Tsarouchas K, Vavetsi S, Pyrgakis V, Deftereos S. Cardioprotective role of remote ischemic preconditioning in primary percutaneous coronary intervention: enhancement by opioid action. *JACC Cardiovasc Interv.* 2010;3(1):49-55.
32. Zhang R, Shen L, Xie Y, Gen L, Li X, Ji Q. Effect of morphine-induced preconditioning in corrections of tetralogy of fallot. *J Cardiothorac Surg.* 2013 Apr 11;8:76
33. Gwag HB, Kim EK1, Park TK, Lee JM, Yang JH, Song YB, Choi JH, Choi SH, Lee SH, Chang SA, Park SJ, Lee SC, Park SW, Jang WJ, Lee M, Chun WJ, Oh JH, Park YH, Choe YH, Gwon HC, Hahn JY. Cardioprotective Effects of Intracoronary Morphine in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention: A Prospective, Randomized Trial. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(4). pii: e005426.
34. Schulman D, Latchman DS, Yellon DM Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002, 283(4):H1481-H1488
35. Bose AK, Mocanu MM, Carr RD, Yellon DM Glucagon like peptide-1 is protective against myocardial ischemia/reperfusion injury when given either as a preconditioning mimetic or at reperfusion in an isolated rat heart model. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2005 19(1):9-11
36. Hausenloy DJ, Yellon DM Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev.* 2007;12:217-34.
37. Guillard C, Chretien S, Pelus AS, Porteu F, Muller O, Mayeux P, Duprez V. Activation of the mitogen-activated protein kinases Erk1/2 by erythropoietin receptor via a G(i)protein beta gamma-subunit-

- initiated pathway. *J Biol Chem* 2003, 278:11050–11056
38. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100(8):4802–4806
 39. Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers JR, Cutaia MV, El-Sherif N. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 308(4):990–994
 40. Hanlon PR, Fu P, Wright GL, Steenbergen C, Arcasoy MO, Murphy E Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *FASEB J* 2005, 19(10):1323–1325
 41. Ott I, Schulz S, Mehilli J, Fichtner S, Hadamitzky M, Hoppe K, Ibrahim T, Martinoff S, Massberg S, Laugwitz KL, Dirschinger J, Schwaiger M, Kastrati A, Schmig A; REVIVAL-3 Study Investigators. Erythropoietin in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized, double-blind trial. *Circ Cardiovasc Interv.* 2010 ; 3(5):408-13
 42. Najjar SS, Rao SV, Melloni C, Raman SV, Povsic TJ, Melton L, Barsness GW, Prather K, Heitner JF, Kilaru R, Gruberg L, Hasselblad V, Greenbaum AB, Patel M, Kim RJ, Talan M, Ferrucci L, Longo DL, Lakatta EG, Harrington RA; REVEAL Investigators. *JAMA.* 2011 ;305(18):1863-72.
 43. Ludman AJ, Yellon DM, Hasleton J, Ariti C, Babu GG, Boston-Griffiths E, Venugopal V, Walker M, Holdright D, Swanton H, Crake T, Brull D, Moon JC, Puranik R, Muthurangu V, Taylor A, Hausenloy DJ. Effect of erythropoietin as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention: a randomised controlled clinical trial. *Heart.* 2011 ;97(19):1560-5.
 44. Prunier F, Bière L, Gilard M, Boschat J, Mouquet F, Bauchart JJ, Charbonnier B, Genée O, Guérin P, Warin-Fresse K, Durand E, Lafont A, Christiaens L, Abi-Khalil W, Delépine S, Benard T, Furber A. Single high-dose erythropoietin administration immediately after reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: results of the erythropoietin in myocardial infarction trial. *Am Heart J.* 2012 ;163(2):200-7.
 45. Taniguchi N, Nakamura T, Sawada T, Matsubara K, Furukawa K, Hadase M, Nakahara Y, Nakamura T, Matsubara H. Erythropoietin prevention trial of coronary restenosis and cardiac remodeling after ST-elevated acute myocardial infarction (EPOC-AMI): a pilot, randomized, placebo-controlled study. *Circ J.* 2010 ;74(11):2365-71.
 46. Minamino T, Toba K, Higo S, Nakatani D, Hikoso S, Umegaki M, Yamamoto K, Sawa Y, Aizawa Y, Komuro I; EPO-AMI-II study investigators. Design and rationale of low-dose erythropoietin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (EPO-AMI-II study): a randomized controlled clinical trial. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2012;26(5):409-16.

47. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med.* 2000;6(9):1004-10.
48. Sanada S, Asanuma H, Minamino T, Node K, Takashima S, Okuda H, Shinozaki Y, Ogai A, Fujita M, Hirata A, Kim J, Asano Y, Mori H, Tomoike H, Kitamura S, Hori M, Kitakaze M. Optimal windows of statin use for immediate infarct limitation: 5'-nucleotidase as another downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circulation* 2004;110(15):2143-2149.
49. Efthymiou CA, Mocanu MM, Yellon DM Atorvastatin and myocardial reperfusion injury: new pleiotropic effect implicating multiple prosurvival signaling. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005; 45(3):247-52.
50. Jones, S.P.; Teshima, Y.; Akao, M.; Marbán, E. Simvastatin attenuates oxidant-induced mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2003;93(8):697-699.
51. Pan Y, Tan Y, Li B, Li X Efficacy of high-dose rosuvastatin preloading in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of fourteen randomized controlled trials. *Lipids Health Dis.* 2015 Aug 27;14:97.
52. Benjo AM, El-Hayek GE, Messerli F, DiNicolantonio JJ, Hong MK, Aziz EF, Herzog E, Tamis-Holland JE. High dose statin loading prior to percutaneous coronary intervention decreases cardiovascular events: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2015; 85(1):53-60.
53. Bates E, Bode C, Costa M, Gibson CM, Granger C, Green C, Grimes K, Harrington R, Huber K, Kleiman N, Mochly-Rosen D, Roe M, Sadowski Z, Solomon S, Widimsky P. Intracoronary KAI-9803 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Circulation.* 2008; 117(7):886-96
54. Lincoff AM, Roe M, Aylward P, Galla J, Rynkiewicz A, Guetta V, Zelizko M, Kleiman N, White H, McErlean E, Erlinge D, Laine M, Dos Santos Ferreira JM, Goodman S, Mehta S, Atar D, Suryapranata H, Jensen SE, Forster T, Fernandez-Ortiz A, Schoors D, Radke P, Belli G, Brennan D, Bell G, Krucoff M; PROTECTION AMI Investigators. Inhibition of delta-protein kinase C by delcasertib as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute anterior ST-segment elevation myocardial infarction: results of the PROTECTION AMI Randomized Controlled Trial. *Eur Heart J.* 2014; 35(37):2516-23
55. Lamont KT, Somers S, Lacerda L, Opie LH, Lecour S. Is red wine a SAFE sip away from cardioprotection? Mechanisms involved in resveratrol- and melatonin-induced cardioprotection. *J Pineal Res.* 2011;50(4):374-80
56. Frias MA, Lecour S, James RW, Pedretti S. High density lipoprotein/sphingosine-1-phosphate-induced cardioprotection: Role of STAT3 as part of the SAFE pathway. *JAKSTAT.* 2012;1(2):92-100.
57. Lochner A, Huisamen B, Nduhirabandi F. Cardioprotective effect of melatonin against ischaemia/reperfusion damage. *Front Biosci.* 2013 Jan 1;5:305-15.

58. Kwan JC, Gao L, Macdonald PS, Hicks M. Cardio-protective signalling by glyceryl trinitrate and cariporide in a model of donor heart preservation. *Heart Lung Circ.* 2015;24(3):306-18.
59. Somers SJ, Frias M, Lacerda L, Opie LH, Lecour S. Interplay between SAFE and RISK pathways in sphingosine-1-phosphate-induced cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2012;26(3):227-37.
60. Dorsch M, Behmenburg F, Raible M, Blase D, Grievink H, Hollmann MW, Heinen A, Huhn R. Morphine-Induced Preconditioning: Involvement of Protein Kinase A and Mitochondrial Permeability Transition Pore. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151025.
61. Brulhart-Meynet MC, Braunersreuther V, Brinck J, Montecucco F, Prost JC, Thomas A, Galan K, Pelli G, Pedretti S, Vuilleumier N, Mach F, Lecour S, James RW, Frias MA. Improving reconstituted HDL composition for efficient post-ischemic reduction of ischemia reperfusion injury. *PLoS One.* 2015; 10(3):e0119664.
62. Watson AJ, Gao L, Sun L, Tsun J, Jabbour A, Ru Qiu M, Jansz PC, Hicks M, Macdonald PS. Enhanced preservation of the rat heart after prolonged hypothermic ischemia with erythropoietin-supplemented Celsior solution. *J Heart Lung Transplant.* 2013; 32(6):633-40.
63. Lemoine S, Zhu L, Legallois D, Massetti M, Manrique A, Hanouz JL. Atorvastatin-induced cardioprotection of human myocardium is mediated by the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening via tumor necrosis factor- α and Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway. *Anesthesiology.* 2013; 118(6):1373-84.
64. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev.* 2008; 88(2):581-609.
65. Wang Y, Meyer JW, Ashraf M, Shull GE. Mice with a null mutation in the NHE1 Na⁺-H⁺ exchanger are resistant to cardiac ischemia-reperfusion injury. *Circ Res.* 2003;93(8):776-82.
66. Imahashi K, Pott C, Goldhaber JJ, Steenbergen C, Philipson KD, Murphy E. Cardiac-specific ablation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 2005; 97(9):916-21.
67. Avkiran M, Marber MS. Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39(5):747-53.
68. Mentzer RM Jr, Lasley RD, Jessel A, Karmazyn M. Intracellular sodium hydrogen exchange inhibition and clinical myocardial protection. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75(2):S700-8.
69. Namekata I, Shimada H, Kawanishi T, Tanaka H, Shigenobu K. Reduction by SEA0400 of myocardial ischemia-induced cytoplasmic and mitochondrial Ca²⁺ overload. *Eur J Pharmacol.* 2006; 543(1-3):108-15.
70. Toda T, Kadono T, Hoshiai M, Eguchi Y, Nakazawa S, Nakazawa H, Higashijima N, Ishida H. Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor cariporide attenuates the mitochondrial Ca²⁺ overload and PTP opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293(6):H3517-23.
71. Javadov S, Choi A, Rajapurohitam V, Zeidan A, Basnakian AG, Karmazyn M. NHE-1 inhibition-induced cardioprotection against

- ischaemia/reperfusion is associated with attenuation of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res.* 2008;77(2):416-24.
72. Piper HM, Kasseckert S, Abdallah Y. The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection. *Cardiovasc Res.* 2006;70(2):170-3.
73. Fauconnier J, Roberge S, Saint N, Lacampagne A. Type 2 ryanodine receptor: a novel therapeutic target in myocardial ischemia/reperfusion. *Pharmacol Ther.* 2013;138(3):323-32.
74. Lopez-Crisosto C, Pennanen C, Vasquez-Trincado C, Morales PE, Bravo-Sagua R, Quest AFG, Chiong M, Lavandero S. Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(6):342-360.
75. Shintani-Ishida K, Inui M, Yoshida K. Ischemia-reperfusion induces myocardial infarction through mitochondrial Ca^{2+} overload. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53(2):233-9.
76. Paillard M, Tubbs E, Thiebaut PA, Gomez L, Fauconnier J, Da Silva CC, Teixeira G, Mewton N, Belaidi E, Durand A, Abrial M, Lacampagne A, Rieusset J, Ovize M. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation.* 2013;128(14):1555-65.
77. Fazal L, Laudette M, Paula-Gomes S, Pons S, Conte C, Tortosa F, Sicard P, Sainte-Marie Y, Bissierier M, Lairez O, Lucas A, Roy J, Ghaleh B, Fauconnier J, Mialet-Perez J, Lezoualc'h F. Multifunctional Mitochondrial Epacl1 Controls Myocardial Cell Death. *Circ Res.* 2017;120(4):645-657.
78. Harrington JL, Murphy E. The mitochondrial calcium uniporter: mice can live and die without it. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Jan;78:46-53.
79. Miyamae M, Camacho SA, Weiner MW, Figueredo VM. Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of $[Ca^{2+}]_m$ overload in rat hearts. *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 2):H2145-53.
80. de Jesús García-Rivas G, Guerrero-Hernández A, Guerrero-Serna G, Rodríguez-Zavala JS, Zazueta C. Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by the oxo-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru360) prevents from irreversible injury in postischemic rat heart. *FEBS J.* 2005;272(13):3477-88.
81. García-Rivas G de J, Carvajal K, Correa F, Zazueta C. Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo. *Br J Pharmacol.* 2006;149(7):829-37.
82. Kwong JQ, Lu X, Correll RN, Schwanekamp JA, Vagnozzi RJ, Sargent MA, York AJ, Zhang J, Bers DM, Molkentin JD. The Mitochondrial Calcium Uniporter Selectively Matches Metabolic Output to Acute Contractile Stress in the Heart. *Cell Rep.* 2015;12(1):15-22.
83. Rasmussen TP, Wu Y, Joiner ML, Koval OM, Wilson NR, Luczak ED, Wang Q, Chen B, Gao Z, Zhu Z, Wagner BA, Soto J, McCormick ML, Kutschke W, Weiss RM, Yu L, Boudreau RL, Abel ED, Zhan F, Spitz DR, Buettner GR, Song LS, Zingman LV, Anderson ME. Inhibition of MCU forces extramitochondrial adaptations governing physiological and pathological stress responses in heart.

- Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(29):9129-34
84. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70(2):200-14.
85. Zweier, J.L. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem*, 1988;263(3):1353-1357.
86. 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(2):230-55
87. Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(5):H2024-34
88. Clarke SJ, Khaliulin I, Das M, Parker JE, Heesom KJ, Halestrap AP. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation. *Circ Res*. 2008;102(9):1082-90
89. Chernyak BV, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur J Biochem*. 1996;238(3):623-30.
90. Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem*. 1997;272(6):3346-54
91. Costantini P, Belzacq AS, Vieira HL, Laroche N, de Pablo MA, Zamzami N, Susin SA, Brenner C, Kroemer G. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene*. 2000;19(2):307-14.
92. Nguyen TT, Stevens MV, Kohr M, Steenbergen C, Sack MN, Murphy E. Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*. 2011;286(46):40184-92.
93. Wang SB, Murray CI, Chung HS, Van Eyk JE. Redox regulation of mitochondrial ATP synthase. *Trends Cardiovasc Med*. 2013;23(1):14-8
94. Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, Logan A, Pell VR, Ding S, James AM, Cochemé HM, Reinhold J, Lilley KS, Partridge L, Fearnley IM, Robinson AJ, Hartley RC, Smith RA, Krieg T, Brookes PS, Murphy MP. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat Med*. 2013;19(6):753-9.
95. Petrosillo G, Casanova G, Matera M, Ruggiero FM, Paradies G. Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: induction of permeability transition and cytochrome c release. *FEBS Lett*. 2006;580(27):6311-6
96. Seidlmayer LK, Juettner VV, Kettlewell S, Pavlov EV, Blatter LA, Dedkova EN. Distinct mPTP

- activation mechanisms in ischaemia-reperfusion: contributions of Ca²⁺, ROS, pH, and inorganic polyphosphate. *Cardiovasc Res.* 2015;106(2):237-48.
97. DeBoer LW, Bekx PA, Han L, Steinke L Pyruvate enhances recovery of rat hearts after ischemia and reperfusion by preventing free radical generation. *Am J Physiol.* 1993;265 (5 Pt 2):H1571-6.
98. Kerr PM, Suleiman MS, Halestrap AP. Reversal of permeability transition during recovery of hearts from ischemia and its enhancement by pyruvate. *Am J Physiol.* 1999;276(2 Pt 2):H496-502
99. Dobsak, P.; Courderot-Masuyer, C.; Zeller, M.; Vergely, C.; Laubriet, A.; Assem, M.; Eicher, J.C.; Teyssier, J.R.; Wolf, J.E.; Rochette, L. Antioxidative properties of pyruvate and protection of the ischemic rat heart during cardioplegia. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, 1999;34(5):651-59.
100. Oliveira, P.J.; Gonçalves, L.; Monteiro, P.; Providencia, L.A.; Moreno, A..J. Are the antioxidant properties of carvedilol important for the protection of cardiac mitochondria? *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2005;3(2):147-158.
101. Silva FS, Simoes RF, Couto R, Oliveira PJ. Targeting Mitochondria in Cardiovascular Diseases. *Curr Pharm Des.* 2016;22(37):5698-5717.
102. Javadov SA, Lim KH, Kerr PM, Suleiman MS, Angelini GD, Halestrap AP. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res.* 2000;45(2):360-9.
103. Kobayashi I, Kokita N, Namiki A. Propofol attenuates ischaemia-reperfusion injury in the rat heart in vivo. *Eur J Anaesthesiol.* 2008;25(2):144-51.
104. Rajesh, K.G.; Sasaguri, S.; Suzuki, R.; Maeda, H. Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability transition pore and upregulates Bcl-2 expression. *Am. J. Physiol.Heart Circ. Physiol.*, 2003;285(5):H2171-H2178.
105. Onogi H, Minatoguchi S, Chen XH, Bao N, Kobayashi H, Misao Y, Yasuda S, Yamaki T, Maruyama R, Uno Y, Arai M, Takemura G, Fujiwara H. Edaravone reduces myocardial infarct size and improves cardiac function and remodelling in rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(11):1035-41
106. Bogнар, Z.; Kalai, T.; Palfi, A.; Hanto, K.; Bogнар, B.; Mark, L.; Szabo, Z.; Tapodi, A.; Radnai, B.; Sarszegi, Z.; Szanto, A.; Gallyas, F. Jr.; Hideg, K.; Sumegi, B.; Varbiro, G. A novel SOD-mimetic permeability transition inhibitor agent protects ischemic heart by inhibiting both apoptotic and necrotic cell death. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(5):835-848.
107. Petrosillo G, Colantuono G, Moro N, Ruggiero FM, Tiravanti E, Di Venosa N, Fiore T, Paradies G. Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(4):H1487-93.
108. Griendling, K.K; FitzGerald, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation.* 2003;108(17):2034-2040.
109. Schmidt HH, Stocker R, Vollbracht C, Paulsen G, Riley D, Daiber A, Cuadrado A. Antioxidants in

- Translational Medicine. Antioxid Redox Signal. 2015;23(14):1130-43
110. Bartekova M, Barancik M, Ferenczyova K, Dhalla NS. Beneficial effects of N-acetylcysteine and N-mercaptopyropionylglycine on ischemia reperfusion injury in the heart. *Curr Med Chem.* 2017 Jun 8. doi: 10.2174/0929867324666170608111917.
111. Pasupathy S, Tavella R, Grover S, Raman B, Procter NEK, Du YT, Mahadavan G, Stafford I, Heresztyn T, Holmes A, Zeitz C, Arstall M, Selvanayagam JB, Horowitz JD, Beltrame JF. Early use of N-Acetylcysteine (NAC) with Nitrate Therapy in Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention for ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Reduces Myocardial Infarct Size (The NACIAM Trial). *Circulation.* 2017 Jun 20. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027575.
112. Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP, Sammut IA. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* 2005;19(9):1088-95
113. Ziberna L, Lunder M, Moze S, Vanzo A, Tramer F, Passamonti S, Drevensek G. Acute cardioprotective and cardiotoxic effects of bilberry anthocyanins in ischemia-reperfusion injury: beyond concentration-dependent antioxidant activity. *Cardiovasc Toxicol.* 2010;10(4):283-94.
114. Ajith TA, Jayakumar TG. Mitochondria-targeted agents: Future perspectives of mitochondrial pharmaceuticals in cardiovascular diseases. *World J Cardiol.* 2014;6(10):1091-9.
115. Jean SR, Ahmed M2, Lei EK3, Wisnovsky SP3, Kelley SO1. Peptide-Mediated Delivery of Chemical Probes and Therapeutics to Mitochondria. *Acc Chem Res.* 2016;49(9):1893-902.
116. Murphy MP. Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777(7-8):1028-31.
117. Skulachev VP1, Anisimov VN, Antonenko YN, Bakeeva LE, Chernyak BV, Elichev VP, Filenko OF, Kalinina NI, Kapelko VI, Kolosova NG, Kopnin BP, Korshunova GA, Lichinitser MR, Obukhova LA, Pasyukova EG, Pisarenko OI, Roginsky VA, Ruuge EK, Senin II, Severina II, Skulachev MV, Spivak IM, Tashlitsky VN, Tkachuk VA, Vyssokikh MY, Yaguzhinsky LS, Zorov DB. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1787(5):437-61.
118. Liang HL, Sedlic F, Bosnjak Z, Nilakantan V. SOD1 and MitoTEMPO partially prevent mitochondrial permeability transition pore opening, necrosis, and mitochondrial apoptosis after ATP depletion recovery. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(10):1550-60.
119. Dare AJ, Logan A, Prime TA, Rogatti S, Goddard M, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ, Murphy MP, Saeb-Parsy K. The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ decreases ischemia-reperfusion injury in a murine syngeneic heart transplant model. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34(11):1471-80
120. Horton KL, Stewart KM, Fonseca SB, Guo Q, Kelley SO. Mitochondria-

- penetrating peptides. *Chem Biol.* 2008;15(4):375-82.
121. Fink MP, Macias CA, Xiao J, Tyurina YY, Jiang J, Belikova N, Delude RL, Greenberger JS, Kagan VE, Wipf P. Hemigramicidin-TEMPO conjugates: novel mitochondria-targeted anti-oxidants. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(6):801-9.
122. Szeto HH. Development of mitochondria-targeted aromatic-cationic peptides for neurodegenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Dec;1147:112-21
123. Zhao, K.; Zhao, G.M.; Wu, D.; Soong, Y.; Birk, A.V.; Schiller, P.W.; Szeto, H.H. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* 2004;279(33) :34682-34690.
124. Cho J, Won K, Wu D, Soong Y, Liu S, Szeto HH, Hong MK Potent mitochondria-targeted peptides reduce myocardial infarction in rats. *Coron Artery Dis.* 2007;18(3):215-20.
125. Birk AV, Chao WM, Bracken C, Warren JD, Szeto HH. Targeting mitochondrial cardiolipin and the cytochrome c/cardiolipin complex to promote electron transport and optimize mitochondrial ATP synthesis. *Br J Pharmacol.* 2014;171(8):2017-28
126. Gibson CM, Giugliano RP, Kloner RA, Bode C, Tendera M, Jánosi A, Merkely B, Godlewski J, Halaby R, Korjian S, Daaboul Y, Chakrabarti AK, Spielman K, Neal BJ, Weaver WD. EMBRACE STEMI study: a Phase 2a trial to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of intravenous MTP-131 on reperfusion injury in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2016;37(16):1296-303
127. 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(6973):461-465.
128. Krauskopf A, Eriksson O, Craigen WJ, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1757(5-6):590-595.
129. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkenin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 2005;434(7033):658-62
130. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.* 2005;434(7033):652-8
131. Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J.* 1988;255(1):357-60
132. Javadov S, Jang S, Parodi-Rullán R, Khuchua Z, Kuznetsov AV. Mitochondrial permeability transition in cardiac ischemia-reperfusion: whether cyclophilin D is a viable target for cardioprotection? *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(15):2795-2813

133. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, André-Fouët X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2008;359(5):473-81
134. Mewton N, Croisille P, Gahide G, Rioufol G, Bonnefoy E, Sanchez I, Cung TT, Sportouch C, Angoulvant D, Finet G, André-Fouët X, Derumeaux G, Piot C, Vernhet H, Revel D, Ovize M. Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(12):1200-5
135. 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(11):1021-31
136. Ottani F, Latini R, Staszewsky L, La Vecchia L, Locuratolo N, Sicuro M, Masson S, Barlera S, Milani V, Lombardi M, Costalunga A, Mollicelli N, Santarelli A, De Cesare N, Sganzerla P, Boi A, Maggioni AP, Limbruno U; CYCLE Investigators. Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction: The Multicenter, Controlled, Open-Label CYCLE Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(4):365-74
137. Chen-Scarabelli C, Scarabelli TM. Cyclosporine A Prior to Primary PCI in STEMI Patients: The Coup de Grâce to Post-Conditioning? *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(4):375-8
138. Heusch G. CIRCUS: a kiss of death for cardioprotection? *Cardiovasc Res.* 2015;108(2):215-6
139. Monassier L, Ayme-Dietrich E, Aubertin-Kirch G, Pathak A. Targeting myocardial reperfusion injuries with cyclosporine in the CIRCUS Trial – pharmacological reasons for failure. *Fundam Clin Pharmacol.* 2016;30(2):191-3
140. Malouitre S, Dube H, Selwood D, Crompton M. Mitochondrial targeting of cyclosporin A enables selective inhibition of cyclophilin-D and enhanced cytoprotection after glucose and oxygen deprivation. *Biochem J.* 2009;425(1):137-48
141. Dube H, Selwood D, Malouitre S, Capano M, Simone MI, Crompton M. A mitochondrial-targeted cyclosporin A with high binding affinity for cyclophilin D yields improved cytoprotection of cardiomyocytes. *Biochem J.* 2012;441(3):901-7.
142. Warne J, Pryce G, Hill JM, Shi X, Lennerås F, Puentes F, Kip M, Hilditch L, Walker P, Simone MI, Chan AW, Towers GJ, Coker AR, Duchon MR, Szabadkai G, Baker D, Selwood DL. Selective Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Protects against Neurodegeneration in Experimental Multiple Sclerosis. *J Biol Chem.* 2016;291(9):4356-73

143. Ikeda G, Matoba T, Nakano Y, Nagaoka K, Ishikita A, Nakano K, Funamoto D, Sunagawa K, Egashira K. Nanoparticle-Mediated Targeting of Cyclosporine A Enhances Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening. *Sci Rep*. 2016 Feb 10;6:20467
144. Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J Biol Chem*. 1996;271(4):2185-92
145. Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, Lemasters JJ. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. *Mol Pharmacol*. 2002;62(1):22-9.
146. Cour M, Loufouat J, Paillard M, Augeul L, Goudable J, Ovize M, Argaud L. Inhibition of mitochondrial permeability transition to prevent the post-cardiac arrest syndrome: a pre-clinical study. *Eur Heart J*. 2011;32(2):226-35.
147. Jahandiez V, Cour M, Bochaton T, Abrial M, Loufouat J, Gharib A, Varennes A, Ovize M, Argaud L. Fast therapeutic hypothermia prevents post-cardiac arrest syndrome through cyclophilin D-mediated mitochondrial permeability transition inhibition. *Basic Res Cardiol*. 2017;112(4):35
148. Readnower RD, Pandya JD, McEwen ML, Pauly JR, Springer JE, Sullivan PG. Post-injury administration of the mitochondrial permeability transition pore inhibitor, NIM811, is neuroprotective and improves cognition after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 2011;28(9):1845-53.
149. Mbye LH, Singh IN, Sullivan PG, Springer JE, Hall ED. Attenuation of acute mitochondrial dysfunction after traumatic brain injury in mice by NIM811, a non-immunosuppressive cyclosporin A analog. *Exp Neurol*. 2008;209(1):243-53.
150. Belaidi E, Decorps J, Augeul L, Durand A, Ovize M. Endoplasmic reticulum stress contributes to heart protection induced by cyclophilin D inhibition. *Basic Res Cardiol*. 2013;108(4):363.
151. Lin HC, Lee TK, Tsai CC, Lai IR, Lu KS. Ischemic postconditioning protects liver from ischemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial permeability transition. *Transplantation*. 2012;93(3):265-71.
152. Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(3):H1654-61
153. 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(38):34793-9
154. Siemion IZ, Pedyczak A, Trojnar J, Zimecki M, Wieczorek Z. Immunosuppressive activity of antamanide and some of its analogues. *Peptides*. 1992;13(6):1233-7
155. Azzolin L, Antolini N, Calderan A, Ruzza P, Sciacovelli M, Marin O,

- Mammi S, Bernardi P, Rasola A. Antamanide, a derivative of Amanita phalloides, is a novel inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *PLoS One*. 2011 ;6(1):e16280
156. Ahmed-Belkacem A, Colliandre L, Ahnou N, Nevers Q, Gelin M, Bessin Y, Brillet R, Cala O, Douguet D, Bourguet W, Krimm I, Pawlotsky JM, Guichou JF. Fragment-based discovery of a new family of non-peptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with potent antiviral activities. *Nat Commun*. 2016 Sep 22;7:12777.
157. Shore ER, Awais M, Kershaw NM, Gibson RR, Pandalaneni S, Latawiec D, Wen L, Javed MA, Criddle DN, Berry N, O'Neill PM, Lian LY, Sutton R. Small Molecule Inhibitors of Cyclophilin D To Protect Mitochondrial Function as a Potential Treatment for Acute Pancreatitis. *J Med Chem*. 2016;59(6):2596-611
158. Xie L, Cheng L, Xu G, Zhang J, Ji X, Song E. The novel cyclophilin D inhibitor compound 19 protects retinal pigment epithelium cells and retinal ganglion cells from UV radiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;487(4):807-812
159. Valasani KR, Sun Q, Fang D, Zhang Z, Yu Q, Guo Y, Li J, Roy A, ShiDu Yan S. Identification of a Small Molecule Cyclophilin D Inhibitor for Rescuing A β -Mediated Mitochondrial Dysfunction. *ACS Med Chem Lett*. 2016;7(3):294-9
160. Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res*. 2009;83(2):213-25
161. Leducq N, Bono F, Sulpice T, Vin V, Janiak P, Fur GL et al. Role of peripheral benzodiazepine receptors in mitochondrial, cellular, and cardiac damage induced by oxidative stress and ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306(3):828-837.
162. 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(1):336-345.
163. Bordet T, Buisson B, Michaud M, Drouot C, Galéa P, Delaage P, Akentieva NP, Evers AS, Covey DF, Ostuni MA, Lacapère JJ, Massaad C, Schumacher M, Steidl EM, Maux D, Delaage M, Henderson CE, Pruss RM. Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(2):709-20.
164. 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(3):696-706.
165. 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(20):13769-81.
166. 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(3):420-7.
167. 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. *Biochem Pharmacol.* 2017 Jun 21. pii: S0006-2952(17)30449-5.
168. Le Lamer S, Paradis S, Rahmouni H, Chaimbault C, Michaud M, Culcasi M, Afxantidis J, Latreille M, Berna P, Berdeaux A, Pietri S, Morin D, Donazzolo Y, Abitbol JL, Pruss RM, Schaller S. Translation of TRO40303 from myocardial infarction models to demonstration of safety and tolerance in a randomized Phase I trial. *J Transl Med.* 2014 Feb 7;12:38.
169. Atar D, Arheden H, Berdeaux A, Bonnet JL, Carlsson M, Clemmensen P, Cuvier V, Danchin N, Dubois-Randé JL, Engblom H, Erlinge D, Firat H, Halvorsen S, Hansen HS, Hauke W, Heiberg E, Koul S, Larsen AI, Le Corvoisier P, Nordrehaug JE, Paganelli F, Pruss RM, Rousseau H, Schaller S, Sonou G, Tuseth V, Veys J, Vicaut E, Jensen SE. Effect of intravenous TRO40303 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction: MITOCARE study results. *Eur Heart J.* 2015;36(2):112-9.
170. Fontaine E, Ichas F, Bernardi P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* 1998;273(40):25734-40.
171. Walter L, Nogueira V, Leverve X, Heitz MP, Bernardi P, Fontaine E. Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *J Biol Chem.* 2000;275(38):29521-7.
172. Takeo S, Tanonaka K, Tazuma Y, Miyake K, Murai R. Possible mechanism by which coenzyme Q10 improves reoxygenation-induced recovery of cardiac contractile force after hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987;243(3):1131-8.
173. Singh RB, Wander GS, Rastogi A, Shukla PK, Mittal A, Sharma JP, Mehrotra SK, Kapoor R, Chopra RK. Randomized, double-blind placebo-controlled trial of coenzyme Q10 in patients with acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1998;12(4):347-53.
174. Fancelli D, Abate A, Amici R, Bernardi P, Ballarini M, Cappa A, Careni G, Colombo A, Contursi C, Di Lisa F, Dondio G, Gagliardi S, Milanese E, Minucci S, Pain G, Pelicci PG, Sacconi A, Storto M, Thaler F, Varasi M, Villa M, Plyte S. Cinnamic anilides as new mitochondrial permeability transition pore inhibitors endowed with ischemia-reperfusion injury protective effect in vivo. *J Med Chem.* 2014;57(12):5333-47.
175. Martin LJ, Fancelli D, Wong M, Niedzwiecki M, Ballarini M, Plyte S, Chang Q. GNX-4728, a novel small molecule drug inhibitor of mitochondrial permeability transition, is therapeutic in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2014 Dec 19;8:433.
176. Richardson AP, Halestrap AP. Quantification of active mitochondrial permeability transition pores using

- GNX-4975 inhibitor titrations provides insights into molecular identity. *Biochem J.* 2016;473(9):1129-40.
177. Roy S, Šileikytė J, Schiavone M, Neuenswander B, Argenton F, Aubé J, Hedrick MP, Chung TD, Forte MA, Bernardi P, Schoenen FJ. Discovery, Synthesis, and Optimization of Diarylisoxazole-3-carboxamides as Potent Inhibitors of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *ChemMedChem.* 2015;10(10):1655-71.
178. Roy S, Šileikytė J, Neuenswander B, Hedrick MP, Chung TD, Aubé J, Schoenen FJ, Forte MA, Bernardi P. N-Phenylbenzamides as Potent Inhibitors of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *ChemMedChem.* 2016;11(3):283-8.
179. Briston T, Lewis S, Koglin M, Mistry K, Shen Y, Hartopp N, Katsumata R, Fukumoto H, Duchon MR, Szabadkai G, Staddon JM, Roberts M, Powney B. Identification of ER-000444793, a Cyclophilin D-independent inhibitor of mitochondrial permeability transition, using a high-throughput screen in cryopreserved mitochondria. *Sci Rep.* 2016 Nov 25;6:37798.
180. Daugas E.; Susin S.A.; Zamzami N.; Ferri K.F.; Irinopoulou T.; Larochette N.; Prévost, M.C.; Leber B.; Andrews D.; Penninger J.; Kroemer G. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.*, 2000;14(5):729-739.
181. Li L.Y.; Luo X.; Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 2001;412(6842): 95-99.
182. Spierings D.; McStay G.; Saleh M.; Bender C.; Chipuk J.; Maurer U.; Green DR. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science.* 2005;310(5745):66-67.
183. Kinnally, K.W.; Antonsson, B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis.* 2007;12(5): 857-868.
184. Peixoto PM, Dejean LM, Kinnally KW. The therapeutic potential of mitochondrial channels in cancer, ischemia-reperfusion injury, and neurodegeneration. *Mitochondrion.* 2012;12(1):14-23.
185. Hattori R.; Hernandez T.E.; Zhu L.; Maulik N.; Otani H.; Kaneda Y.; Das D.K. An essential role of the antioxidant gene Bcl-2 in myocardial adaptation to ischemia: an insight with antisense Bcl-2 therapy. *Antioxid. Redox Signal.* 2001;3(3):403-413.
186. Chen Z.; Chua C.C.; Ho Y.S.; Hamdy R.C.; Chua B.H. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* 2001;280(5):H2313-H2320.
187. Hochhauser E.; Kivity S.; Offen D.; Maulik N.; Otani H.; Barhum Y.; Pannet H.; Shneyvays V.; Shainberg A.; Goldshtaub V.; Tobar A.; Vidne B.A. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(6):H2351-H2359.
188. Gustafsson AB, Tsai JG, Logue SE, Crow MT, Gottlieb RA. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation. *J Biol Chem.* 2004;279(20):21233-21238.
189. Huang J.; Nakamura K.; Ito Y.; Uzuka T.; Morikawa M.; Hirai S.; Tomihara K.; Tanaka T.; Masuta Y.; Ishii K.; Kato K.; Hamada H. Bcl-xL gene

- transfer inhibits Bax translocation and prolongs cardiac cold preservation time in rats. *Circulation*. 2005;112(1):76-83.
190. Bombrun A.; Gerber P.; Casi G.; Terradillos O.; Antonsson B.; Halazy S. 3,6-dibromocarbazole piperazine derivatives of 2-propanol as first inhibitors of cytochrome c release via Bax channel modulation. *J Med Chem*. 2003;46(21):4365-4368.
191. Sawada M.; Hayes P.; Matsuyama S. Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nat Cell Biol*. 2003;5(4):352-357.
192. Hetz C, Vitte PA, Bombrun A, Rostovtseva TK, Montessuit S, Hiver A, Schwarz MK, Church DJ, Korsmeyer SJ, Martinou JC, Antonsson B. Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia. *J Biol Chem*. 2005;280(52):42960-70.
193. Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingberman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, Kurth MJ, Shaw JT, Hinshaw JE, Green DR, Nunnari J. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell*. 2008;14(2):193-204.
194. Grohm J, Kim SW, Mamrak U, Tobaben S, Cassidy-Stone A, Nunnari J, Plesnila N, Culmsee C Inhibition of Drp1 provides neuroprotection in vitro and in vivo. *Cell Death Differ*. 2012;19(9):1446-58.
195. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2010;121(18):2012-22.
196. Ishikita A, Matoba T, Ikeda G, Koga J, Mao Y, Nakano K, Takeuchi O, Sadoshima J, Egashira K. Nanoparticle-Mediated Delivery of Mitochondrial Division Inhibitor 1 to the Myocardium Protects the Heart From Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibition of Mitochondria Outer Membrane Permeabilization: A New Therapeutic Modality for Acute Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(7). pii: e003872.
197. Colombini M. VDAC structure, selectivity, and dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(6):1457-65.
198. Roman I, Figys J, Steurs G, Zizi M. Hunting interactomes of a membrane protein: obtaining the largest set of voltage-dependent anion channel-interacting protein epitopes. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(9):1667-80.
199. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 1999;399(6735):483-7
200. Madesh M.; Hajnóczky G. VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J. Cell. Biol.*, 2001, 155(6), 1003-1015
201. Shoshan-Barmatz V, Krelin Y, Chen Q. VDAC1 as a player in mitochondria-mediated apoptosis and target for modulating apoptosis. *Curr Med Chem*. 2017 Jun 16. doi: 10.2174/0929867324666170616105200.
202. Das S, Steenbergen C, Murphy E Does the voltage dependent anion channel modulate cardiac ischemia-reperfusion

- injury? *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(6):1451-6.
203. Cheng, E.H.; Sheiko, T.V.; Fisher, J.K.; Craigen, W.J.; Korsmeyer, S.J. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*. 2003;301(5632):513-517.
204. Shimizu, S.; Konishi, A.; Kodama, T.; Tsujimoto, Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3100-05.
205. Ono M, Sawa Y, Ryugo M, Alechine AN, Shimizu S, Sugioka R, Tsujimoto Y, Matsuda H. BH4 peptide derivative from Bcl-xL attenuates ischemia/reperfusion injury through anti-apoptotic mechanism in rat hearts. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;27(1):117-21.
206. Hausenloy DJ, Garcia-Dorado D, Bøtker HE, Davidson SM, Downey J, Engel FB, Jennings R, Lecour S, Leor J, Madonna R, Ovize M, Perrino C, Prunier F, Schulz R, Sluijter JPG, Van Laake LW, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Ytrehus K, Heusch G, Ferdinandy P. Novel targets and future strategies for acute cardioprotection: Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart. *Cardiovasc Res*. 2017;113(6):564-585.

Objectifs du travail

Dans les chapitres précédents, nous avons souligné l'importance de développer de nouveaux inhibiteurs du mPTP pour protéger les organes des phénomènes d'ischémie-reperfusion. Cette constatation est d'autant plus importante que les résultats des deux derniers essais cliniques de phase III visant à inhiber la CypD dans le contexte de l'ischémie-reperfusion cardiaque ont démontré l'inefficacité de la CsA (Cung *et al.*, 2015 ; Ottani *et al.*, 2016), ce qui peut s'expliquer par sa faible marge thérapeutique. Au laboratoire, nous avons eu l'opportunité d'étudier de nouvelles molécules de faible poids moléculaire ciblant les cyclophilines, développées par l'équipe du Pr Jean-Michel Pawlotsky (Inserm U955, IMRB, Créteil, France) en collaboration avec l'équipe du Dr Jean-François Guichou (Centre de Biochimie Structurale, Inserm, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France). Ces molécules ont l'avantage de se lier aux cyclophilines d'une façon différente de la CsA, avec laquelle elles ne partagent aucune similarité chimique.

Nous avons émis l'hypothèse que ces nouveaux ligands des cyclophilines pouvaient inhiber l'ouverture du mPTP et servir de base au développement de nouveaux agents cardioprotecteurs.

Les objectifs de ce travail ont donc été :

- Dans un premier temps, de réaliser un screening sur mitochondries isolées de foie de souris afin de vérifier l'effet mPTP-inhibiteur de ces molécules.
- De préciser le mécanisme d'action du composé le plus efficace dans des mitochondries isolées de cœur de cœur et de foie de souris et d'évaluer ses propriétés inhibitrices du mPTP dans des modèles cellulaires utilisant des hépatocytes primaires et des cardiomyocytes isolés de souris.
- Enfin, d'évaluer *in vivo* l'effet inhibiteur du mPTP de la molécule la plus active chez des souris saines avant d'étudier son effet protecteur dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion hépatique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériels et méthodes

1. Modèles animaux

Les expériences ont été réalisées majoritairement sur des souris C57Bl/6J (25-30 g ; Janvier, Le Genest St Isle, France) et des souris *Ppif*^{-/-}, de fond génétique C57Bl/6J de 8 à 10 semaines (25-30 g ; Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, Etats-Unis). Ces souris sont délétées pour la CypD et dénommées *Ppif*^{-/-} dans la suite du texte. Certaines expériences ont également été réalisées sur des rats Wistar mâles de 250-300g (stade jeune adulte ; Janvier, Le Genest St Isle, France). Les animaux ont été hébergés dans l'animalerie conventionnelle commune aux équipes de l'IMRB (agrément n° D94-028-28), nourris avec de l'alimentation standard (SAFE A03) et de l'eau *ad libitum*. Leur environnement a été maintenu à une température ambiante de 22°C et une hygrométrie relative de 55% avec un cycle nyctéméral de 12h/12h. L'environnement des animaux a été enrichi avec du matériel pour la nidification (paille et papier) et des cubes de bois. L'ensemble des expériences a été réalisé conformément à la réglementation européenne relative à l'expérimentation animale (2010/63/EU-848 EEC) et après avis favorable du comité d'éthique ANSES/ENVA/Université Paris-Est Créteil (saisines n° 09/12/14-02 et 11/10/16-01).

2. Réactifs

Sauf indication contraire, tous les réactifs utilisés ont été commandés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Les *Small-Molecule Cyclophilins Inhibitors*, désignés par les noms de code C22, C23, C24, C25, C26, C27, C29, C30, C31 et C32 nous ont été fournis par l'équipe 18 de l'unité Inserm U955 (Pr JM Pawlowsky – IMRB, Créteil) et ont été synthétisés comme décrit précédemment (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2016).

3. Etude des fonctions mitochondriales

3.1. Isolement des mitochondries de foie et de cœur de rat

L'isolement des mitochondries de cœur de rats Wistar a été réalisé à 4°C. Les animaux ont été anesthésiés profondément par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (CEVA Santé animale) à la posologie de 80 mg/kg puis le cœur a été immédiatement prélevé et rincé dans une solution de NaCl 0,9 % à 4 °C. Les oreillettes ont été retirées afin de ne conserver que le ventricule gauche qui a été émincé finement au scalpel sur une plaque en inox maintenue à 4°C. La préparation a été déposée dans un tube contenant un tampon dit

«d'homogénéisation» (en mM : mannitol 220, saccharose 70, HEPES 10, EGTA 2 ; pH 7,4 à 4°C, 15 mL par cœur) et les morceaux ont été dilacérés par 150 coups de ciseaux avant d'être homogénéisés à l'aide d'un Ultra Turrax® T25 basic (IKA Labortechnik) pendant 5 secondes puis d'un Potter-Elvehjem motorisé (5 mL, 1500 tours/min, Eurostar digital, IKA Labortechnik) par 2 séquences de 5 allers-retours lents, espacées de 2 min environ.

L'isolement de mitochondries de cœur de souris sauvages et *Ppif*^{-/-} a été réalisé d'une façon légèrement différente. Les ventricules gauches ont été découpés finement au scalpel puis déposés dans 10 ml d'un tampon d'homogénéisation (en mM : mannitol 220, saccharose 70, HEPES 10, EGTA 2, BSA 0,25%, pH = 7,4 à 4 °C, 10 mL par cœur) avant d'être homogénéisés à l'aide d'un Potter-Elvehjem motorisé (5 ml, 1500 tours/min) par 2 séquences de 5 allers-retours lents, espacées de 2 min environ.

Pour l'isolement de mitochondries de foie de souris, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale puis le foie a été prélevé et immédiatement plongé dans une solution de NaCl 0,9% à 4°C. Le foie a été coupé en morceaux et placé dans un tampon d'homogénéisation (en mM : mannitol 220, saccharose 70, HEPES 10, EGTA, pH 7,4 à 4 °C, 10 mL par gramme de foie) puis homogénéisé à l'aide d'un Potter-Elvehjem motorisé (30 mL, 1500 tours/min) par 2 séquences de 3 allers-retours lents, espacées de 2 min environ.

Pour chaque tissu, l'homogénat obtenu a été déposé dans un tube de 15 mL et centrifugé une première fois à 1000 g pendant 5 min à 4°C (3000 rpm, rotor Sorval SM-24, Sorval RC 5 plus) puis le surnageant S1 contenant les mitochondries a été récupéré pour être centrifugé pendant 10 minutes à 10 000 g (9000 rpm, rotor Sorval SM-24, Sorval RC 5 plus). Le surnageant S2 a été éliminé et le culot C2 contenant les mitochondries a été repris par du tampon d'homogénéisation (en mM : mannitol 220, saccharose 70, HEPES 10, EGTA 10 µM, pH 7,4 à 4 °C ; 200 µL pour le cœur de rat, 100 µL pour le cœur de souris et 600 µL pour le foie de souris) pour obtenir l'extrait mitochondrial.

La concentration de mitochondries a été évaluée en dosant les protéines de l'extrait mitochondrial. Ce dosage a été réalisé par turbidimétrie. 5µL de l'extrait mitochondrial ont été dilués au 1/10ème dans 45 µL de tampon d'homogénéisation. 10 µL de cette suspension ont été introduits dans 990 µL de solution de NaCl 0,9% (3 fois). Un blanc a également été réalisé, à l'aide de 990 µL de solution de NaCl 0,9% et de 10 µL de tampon d'homogénéisation. L'absorbance de ces solutions a été mesurée à une longueur d'onde $\lambda =$

340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Ultraspec 500 pro (Biochem Ltd., Cambridge, Royaume-Uni) puis la concentration protéique de l'extrait mitochondrial a été calculée selon la formule :

$$[\text{mitochondries}] = \frac{(\text{moyenne des densités optiques})}{0,011}$$

Les concentrations protéiques étaient généralement comprises entre 20 et 25 mg/mL pour le cœur de rat, autour de 20 mg/mL pour le foie de souris et d'environ 10 mg/mL pour le cœur de souris. Les suspensions mitochondriales ont été utilisées pendant une durée de 4 h maximum.

3.2. Étude du gonflement mitochondrial

Le gonflement mitochondrial a été étudié par spectrophotométrie (Jasco V-530 ; Jasco, Lisses, France) dans une chambre thermostatée par effet Peltier permettant de chauffer le milieu à 30°C et de l'agiter. Les mesures ont été réalisées à une longueur d'onde $\lambda = 540$ nm, dans une cuve en verre munie d'un agitateur magnétique, dans un volume de 1 mL composé d'un tampon de respiration (en mM : Saccharose 50, KCl 100, HEPES 10, KH_2PO_4 5, pH 7,4 à 30°C) et d'un mélange de pyruvate/malate (5/5 mM), substrat de la respiration mitochondriale. Après introduction des mitochondries (0,5 mg de protéines/ml), l'absorbance du milieu a été mesurée pendant 200 à 400s.

Le gonflement mitochondrial a été induit par l'ajout soit de 50 μM de calcium, de 100 μM de carboxyatractyloside ou de 40 μM de *tert*-butylhydroperoxyde en présence de calcium après 30 secondes de mesure. Comme le montre la figure 20, l'ajout d'une forte concentration de calcium provoque une diminution de l'absorbance qui traduit le gonflement mitochondrial. Le gonflement mitochondrial est évalué en calculant la pente maximale de la variation de l'absorbance en fonction du temps (V_m) à l'aide du logiciel d'analyse de spectre *Spectra analysis* (Jasco) fourni avec le spectrophotomètre.

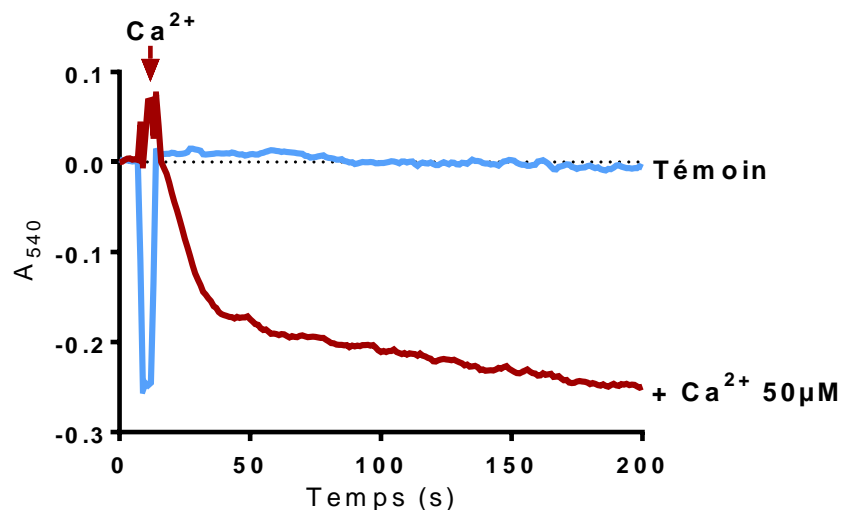


Figure 20 : Expérience représentative de gonflement mitochondrial induit par le calcium. La courbe témoin correspond à l'absorbance d'une suspension mitochondriale dans ajout de calcium.

Le gonflement mitochondrial a également été évalué en conditions « non respirantes », c'est-à-dire lorsque la chaîne respiratoire mitochondriale est inhibée. Pour cela, les mitochondries ont été incubées dans le tampon de respiration supplémenté par de la roténone (1 μ M) et de l'antimycine (1 μ M) afin de bloquer l'activité des complexes I et III. Après 1 min d'incubation, 100 à 200 μ M de calcium ont été ajoutés puis le gonflement mitochondrial a été induit par l'introduction d'un ionophore calcique, l'A23187 (1 μ M), ou par la phenylarsine oxyde (100 μ M).

Les nouveaux inhibiteurs de cyclophilines et la CsA ont été testés à des concentrations comprises entre 0,01 et 100 μ M et ont été introduits dans le milieu 1 min avant le début de la mesure.

3.3. Évaluation de la capacité de rétention calcique mitochondriale

La capacité de rétention calcique (CRC) peut être définie comme la quantité maximale de calcium que la mitochondrie peut absorber avant d'atteindre une concentration seuil déclenchant l'ouverture du mPTP. Comme le montre la figure 21, le protocole consiste à ajouter successivement des quanta de calcium (10 μ M) jusqu'à déclencher l'ouverture du mPTP, ce qui entraîne le relargage du calcium emmagasiné (Figure 21).

La CRC a été évaluée par spectrofluorimétrie dans une cuve de quartz à 30°C sous agitation à l'aide d'un spectrofluorimètre Jasco FP-6300 (Jasco, Lisses, France) grâce à une sonde fluorescente, le Calcium Green 5-N (1 μM , C3737, Molecular Probes, Invitrogen) qui fluoresce lorsqu'elle interagit avec le calcium ($\lambda_{\text{excitation}} = 506 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 532 \text{ nm}$).

Les mesures ont été effectuées dans 300 μL de milieu composé de tampon de respiration, de Calcium Green 5-N (1 μM) et de mitochondries (1 mg/mL ou 0,8 mg/ml dans le cas des mitochondries de cœur de souris) énergisées par le mélange pyruvate / malate (3/3 mM) ou glutamate/malate (3/3 mM). Après le démarrage de l'acquisition, du calcium (10 μM) a été ajouté toutes les 30 à 40 secondes. Les inhibiteurs de la cyclophiline D ont été introduits après les mitochondries et ont été incubés 1 min avant de débiter la mesure.

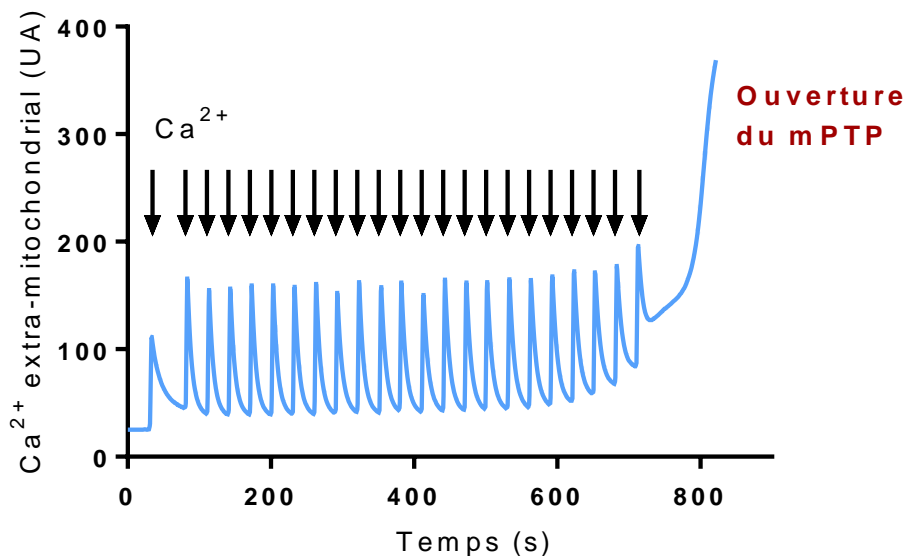


Figure 21 : Expérience représentative de mesure de la rétention calcique. Du calcium (10 μM) a été ajouté toutes les 30 s dans le milieu réactionnel contenant la suspension mitochondriale, un substrat de la respiration et une sonde fluorescente, le Calcium Green-5N qui réagit en présence de calcium extramitochondrial. Ces ajouts ont été poursuivis jusqu'à la libération rapide du calcium emmagasiné par les mitochondries qui correspond à l'ouverture du mPTP. (UA : unités arbitraires de fluorescence).

Généralement, 12 à 15 ajouts de calcium (120 à 150 μM) étaient nécessaires pour déclencher l'ouverture du mPTP lorsque les mitochondries de cœur de rat étaient énergisées par le pyruvate/malate. Les mitochondries de cœur ou de foie de souris retenaient environ 80 à 100 μM de calcium (8 à 10 pics) en présence du mélange glutamate/malate.

3.4. Évaluation du potentiel de membrane mitochondrial

Le potentiel de membrane mitochondrial, correspondant au différentiel de charges situées de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, est établi lors de la respiration grâce au transfert de protons vers l'espace intermembranaire à travers les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire. Ce gradient est essentiel pour le fonctionnement de l'ATP synthase et la production d'ATP.

Le potentiel de membrane mitochondrial a été évalué par spectrofluorimétrie (Luminescence Spectrometer LS50B, Perkin Elmer) grâce à une sonde fluorescente, la rhodamine 123 ($\lambda_{\text{excitation}} = 503 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 537 \text{ nm}$) dans une cuve de quartz, sous agitation, à 30°C. La rhodamine 123, chargée positivement, pénètre dans la mitochondrie selon le potentiel de membrane et ne fluoresce plus lorsqu'elle est dans la matrice. Une perte du potentiel est visualisée par une augmentation de la fluorescence du milieu correspondant à une sortie de la rhodamine.

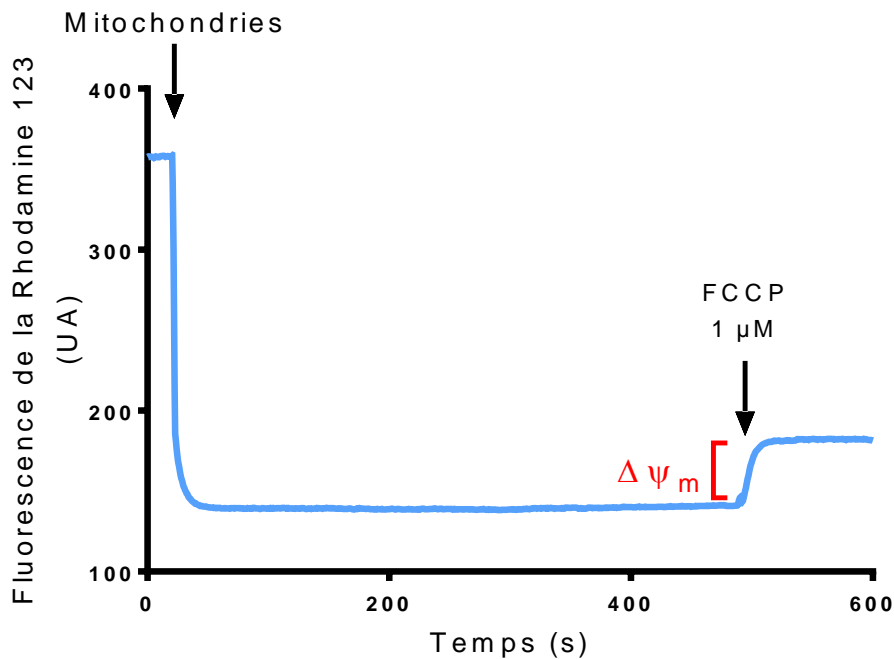


Figure 22 : Mesure du potentiel de membrane mitochondrial. Les mitochondries sont introduites dans un tampon contenant un substrat de la respiration et de la Rhodamine 123. La création d'un potentiel de membrane s'accompagne de la captation de la Rhodamine 123 et de son auto-extinction au sein de la matrice mitochondriale. L'ajout d'un découpleur (FCCP) à la fin de l'expérience met en évidence le potentiel de membrane lié au gradient protonique. (UA : unités arbitraires de fluorescence)

Les mesures ont été réalisées dans 1 mL de tampon de respiration contenant le mélange pyruvate/malate (5/5 mM) et de la Rhodamine 123 (1 μ M). 30 s après le début de la mesure, la suspension de mitochondries (0,4 mg/mL) a été ajoutée. A la fin de la mesure, les mitochondries ont été dépolarisées par l'ajout d'un agent découpleur, le carbonyl cyanide-4-(trifluorométhoxy) phénylhydrazone (FCCP, 1 μ M) afin de mettre en évidence l'absorption de Rhodamine 123 liée seulement au gradient protonique (figure 22).

3.5. Mesure de la phosphorylation oxydative

L'étude de la respiration mitochondriale a été réalisée par polarographie à l'aide d'une électrode de Clark (Hansatech, Cergy, France) qui mesure la quantité d'oxygène présente dans le milieu. Les mesures ont été effectuées dans une cuve thermostatée à 30°C sous agitation constante dans du tampon de respiration (en mM : KCl 100, sucrose 50, HEPES 10, KH_2PO_4 5, pH 7,4 à 30°C). Les mitochondries ont été incubées en présence d'un substrat de la respiration (glutamate/malate ou pyruvate/malate 5/5 mM selon le tissu étudié) dans un volume total de 500 μ L. Ces conditions permettent de mesurer la vitesse de consommation de l'oxygène dépendante du substrat, c'est-à-dire la respiration basale (ou stade 2). Après 1 min environ, de l'ADP (1 mM) a été ajoutée dans la cuve pour induire la synthèse d'ATP ce qui provoque une augmentation de la consommation d'oxygène appelée stade 3. Par la suite, 1 μ M de carboxyatractyloside, qui inhibe l'ANT et de ce fait l'entrée de l'ADP dans la mitochondrie, a été ajouté. Cet ajout entraîne une diminution de la vitesse de consommation de l'oxygène à mesure que la quantité d'ADP disponible dans la mitochondrie s'amenuise. La consommation d'oxygène diminue ainsi pour retrouver une valeur quasi identique à la respiration de base : c'est le stade 4. Enfin, le FCCP (1 μ M), un agent découplant, a été ajouté afin de mesurer la capacité maximale de consommation d'oxygène de la chaîne respiratoire, appelée stade 3'. Le calcul du rapport stade 3/stade 4, appelé contrôle respiratoire, permet d'évaluer l'état des mitochondries et reflète le couplage entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP (Figure 23).

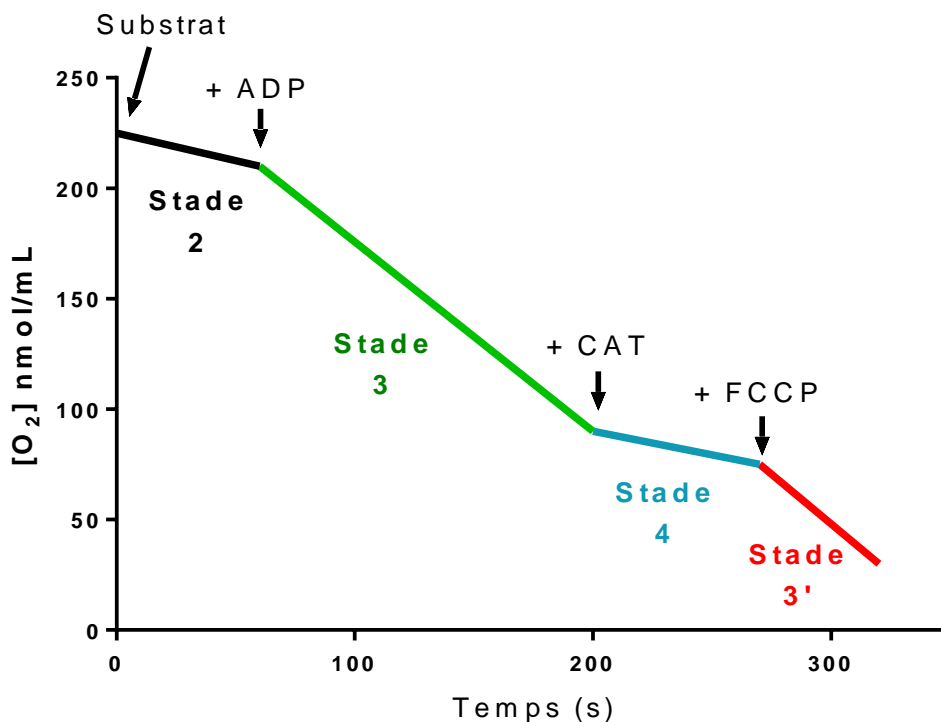


Figure 23 : Mesure de la consommation d'oxygène par les mitochondries isolées. La suspension mitochondriale est traitée successivement par différents substrats ou inhibiteurs et la vitesse de consommation d'oxygène est mesurée entre ces points. CAT : carboxyatractyloside, FCCP : carbonyl cyanide-4-(trifluorométhoxy) phénylhydrazone.

4. Mesure de l'activité peptidylprolyl *cis-trans* isomérase des extraits cytosoliques et mitochondriaux de cœur et de foie de souris.

4.1. Préparation des extraits protéiques

Les extraits mitochondriaux de cœur et de foie ont été obtenus en suivant le même protocole que celui utilisé pour isoler les mitochondries de cœur ou de foie (paragraphe 3.1). Après isolement, la suspension mitochondriale a subi 2 cycles de congélation/décongélation afin de rompre les membranes mitochondriales et de libérer les protéines matricielles.

Pour préparer les extraits cytosoliques, les surnageants S2 (paragraphe 3.1) ont été purifiés par une ultracentrifugation à 100 000g, à 4°C pendant 1 h (34 000 rpm, rotor 50Ti, Beckman Coulter Optima L-80).

La concentration protéique de chaque extrait a été mesurée par spectrophotométrie à l'aide du kit de dosage *Advanced Protein Assay* (Sigma-Aldrich).

4.2. Mesure de l'activité PPIase

L'activité PPIase a été mesurée par spectrophotométrie (Jasco V-530 ; Jasco, Lisses, France), dans 1 mL, dans une cuve en verre contenant le tampon utilisé pour la préparation des extraits (en mM : mannitol 220, saccharose 70, HEPES 10, EGTA 2 ; pH 7,4 à 4°C), 0,3 mg/ml d'extrait protéique et 25 µg/mL d' α -chymotrypsine. 10 secondes après le lancement de la mesure, le peptide de synthèse, le N-succinyl-Ala-Ala-Cis-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (60 µM dans un mélange LiCl/trifluoroéthanol), a été introduit dans la cuve. L'isomérisation de ce peptide, suivie de son clivage par l' α -chymotrypsine, permet la libération du *p*-nitroanilide dont l'absorbance a été mesurée à 390 nm pendant 1 min. La quantification de l'activité PPIase est ensuite réalisée en mesurant la vitesse maximale (V_m) de libération du *p*-nitroanilide (Figure 24).

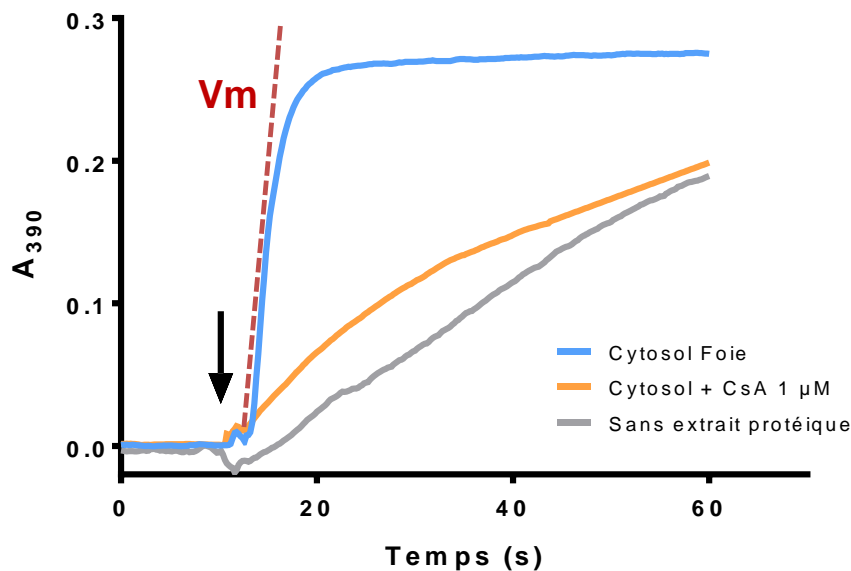


Figure 24 : Mesure de l'activité peptidylprolyl *cis-trans* isomérase. Les extraits protéiques de mitochondries et de cytosols de foie et de cœur sont incubés dans un tampon contenant de l' α -chymotrypsine en présence ou non d'inhibiteurs des cyclophilines (courbe orange). Après 10 s de mesure (flèche), un peptide de synthèse, le N-succinyl-Ala-Ala-Cis-Pro-Phe-*p*-nitroanilide est introduit et l'augmentation de l'absorbance du milieu traduit son isomérisation par les cyclophilines (courbe bleue). Un témoin d'isomérisation spontanée du peptide de synthèse, en absence de protéines, est également réalisé (courbe grise). V_m : vitesse maximale.

5. Expériences de microscopie à fluorescence sur cellules

5.1. Acquisition et analyse des résultats

L'ensemble des expériences de microscopie à fluorescence a été réalisé à l'aide d'un microscope Olympus IX 81, piloté par le logiciel « Xcellence » (Olympus, Rungis, France), équipé d'une caméra digitale Orca-ER (Hamamatsu, temps d'exposition 30-100 ms en fonction du fluorochrome utilisé) et d'un micro-incubateur thermostaté (Warner Instrument). L'excitation des fluorochromes a été réalisée à l'aide d'une ampoule au mercure et de la combinaison de filtres adéquats. Pour chaque expérience, un champ d'étude a été considéré comme satisfaisant s'il contenait au moins 25 cellules correctement marquées. L'évolution de l'intensité de fluorescence des sondes utilisées a été suivie pour chaque cellule du champ. Pour cela, une région d'intérêt d'environ 80 μm^2 a été choisie pour chaque cellule puis l'intensité de fluorescence a été intégrée à l'aide du logiciel « Xcellence ». Après avoir soustrait la fluorescence d'une région sans cellule (fond), l'intensité de fluorescence de chaque cellule a été exprimée en pourcentage de la valeur maximale ou initiale selon l'expérience. Les valeurs obtenues pour les cellules du champ ont ensuite été moyennées.

5.2. Ouverture du mPTP dans les hépatocytes primaires

5.2.1. Modèle cellulaire

Les expériences ont été réalisées sur des hépatocytes primaires de souris C57Bl/6J isolés par une technique d'hydrolyse enzymatique (Seglen, 1976). Les hépatocytes ont été dissociés *in situ* par perfusion de collagénase I via la veine porte. Après isolement, les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri préalablement recouvertes de collagène-I et maintenues dans un milieu adapté (DMEM, 10% SVF, 10 U/mL pénicilline, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycine, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insuline, 5,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ transferrine, 5 ng/mL sélénium, 0,1 μM dexaméthasone, 50 ng/mL EGF). Ces cellules,ensemencées à raison de 100 000 par boîtes peuvent être conservées plusieurs jours. Elles ont été utilisées dans les trois jours suivant la dissociation.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec des hépatocytes primaires humains. Ces cellules, disponibles commercialement, ont été obtenues auprès de Biopredict International (Saint-Grégoire, France) et ont été cultivées dans le même milieu que les hépatocytes de souris.

5.2.2. Marquage des cellules

Les cellules ont été marquées par la calcéine-AM (acétométhoxy ester) qui, en présence de CoCl_2 , permet de marquer spécifiquement les mitochondries (Petronilli *et al.*, 1999). La calcéine-AM, est une molécule non fluorescente hydrophobe qui peut traverser librement les membranes cellulaires. Au sein des cellules, son hydrolyse par les estérases la transforme en calcéine libre, composé fluorescent chargé négativement qui ne peut plus sortir de la cellule. Elle est caractérisée par une longueur d'onde d'excitation de 496 nm et une longueur d'onde d'émission de 516 nm. Employée seule, la calcéine peut être utilisée pour colorer les cellules vivantes en vert vif. Lorsqu'elle est couplée au CoCl_2 , son extinction par le Co^{2+} , qui diffuse librement dans toute la cellule sauf dans les mitochondries, permet d'obtenir un marquage sélectif de ces dernières. Lors de l'ouverture du mPTP, le Co^{2+} pénètre dans la mitochondrie et provoque l'extinction de la fluorescence de la calcéine.

Le milieu de culture a été remplacé par un milieu d'étude, le tyrode (en mM : CaCl_2 1,36, NaCl 130, KCl 5, HEPES 10, MgCl_2 1 ; pH 7,4 à 37°C) puis les cellules ont été incubées avec 2 mM de CoCl_2 pendant 30 min à 37°C. Après 10 min d'incubation, la calcéine-AM (1 μM) a été ajoutée. Au terme des 30 min de marquage, les cellules ont été rincées deux fois avec 1 mL de tyrode et placées dans le micro-incubateur thermostaté équipant le microscope.

5.2.3. Ouverture du mPTP

L'ouverture du mPTP peut être déclenchée au niveau cellulaire par certains agents pharmacologiques (Petronilli *et al.*, 1999). Dans ce travail, nous avons utilisé un ionophore calcique, l'A23187. L'A23187 joue un rôle de navette en se dimérisant autour d'ions calcium et leur permet de traverser les membranes biologiques sans emprunter de canal, ce qui aboutit à une surcharge calcique cellulaire.

La fluorescence émise par la calcéine AM a été détectée à 510 nm après excitation à 460-490 nm. Après 5 min de stabilisation, l'A23187 (0,5 μM) a été ajouté au milieu d'étude puis la mesure a été poursuivie pendant 30 min (Figure 25). Les cellules ont été incubées avec les inhibiteurs du mPTP ou leur solvant (DMSO 0,1%) pendant 15 min avant le début de l'expérience.

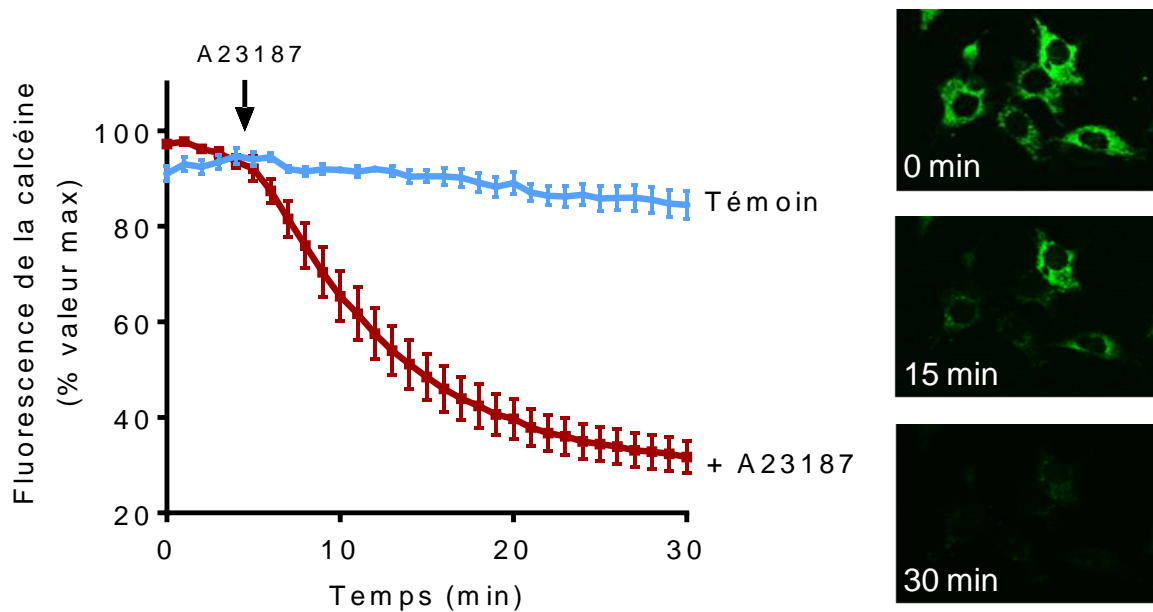


Figure 25 : Expérience représentative du suivi de l'ouverture du mPTP par le marquage calcéine/CoCl₂. Après 5 min de stabilisation, l'A23187 est ajouté au milieu d'étude et la mesure de la fluorescence de la calcéine est poursuivie pendant 30 min. Les cellules de la courbe témoin n'ont pas reçu d'A23187.

5.3. Etudes sur cardiomyocytes adultes isolés de souris

5.3.1. Isolement de cardiomyocytes de souris adultes

5.3.1.1. Prélèvement du cœur

Les souris ont été préalablement anesthésiées (90 mg/kg pentobarbital sodique, Ceva Santé Animale) et ont reçu 50 UI d'héparine (Sanofi Winthrop, Gentilly, France). Une thoracotomie a été réalisée puis le cœur a été excisé et immédiatement plongé dans un tampon de perfusion à 4°C dépourvu de calcium (en mM : NaCl 113, KCl 4,7, KH₂PO₄ 0,6, NaHPO₄ 0,6, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 12, KHCO₃ 10, HEPES 10, taurine 30, rouge de phénol 0,032, 2,3-butanedione monoxime (BDM) 10 et glucose 5,5, pH 7,4 à 37°C) pour arrêter tout battement. Le tampon de perfusion a préalablement été oxygéné et amené à un pH de 7,4 par l'apport de carbogène (95% O₂ et 5% CO₂).

5.3.1.2. Perfusion de type Langendorff et digestion enzymatique

L'aorte a ensuite été dégagée en retirant les débris de tissus qui l'entourent. La canule de perfusion, reliée à un montage de type Langendorff, a été introduite dans l'aorte et y a été fixée à l'aide d'un fil de soie. Le temps écoulé entre le prélèvement du cœur et sa perfusion était compris entre 1 et 2 min afin d'éviter une ischémie des tissus cardiaques. Le cœur a été

perfusé de manière rétrograde par le tampon de perfusion pendant 1 à 2 min pour le rincer, un bain-marie assurant le maintien de la température du cœur à 37°C (Figure 26).

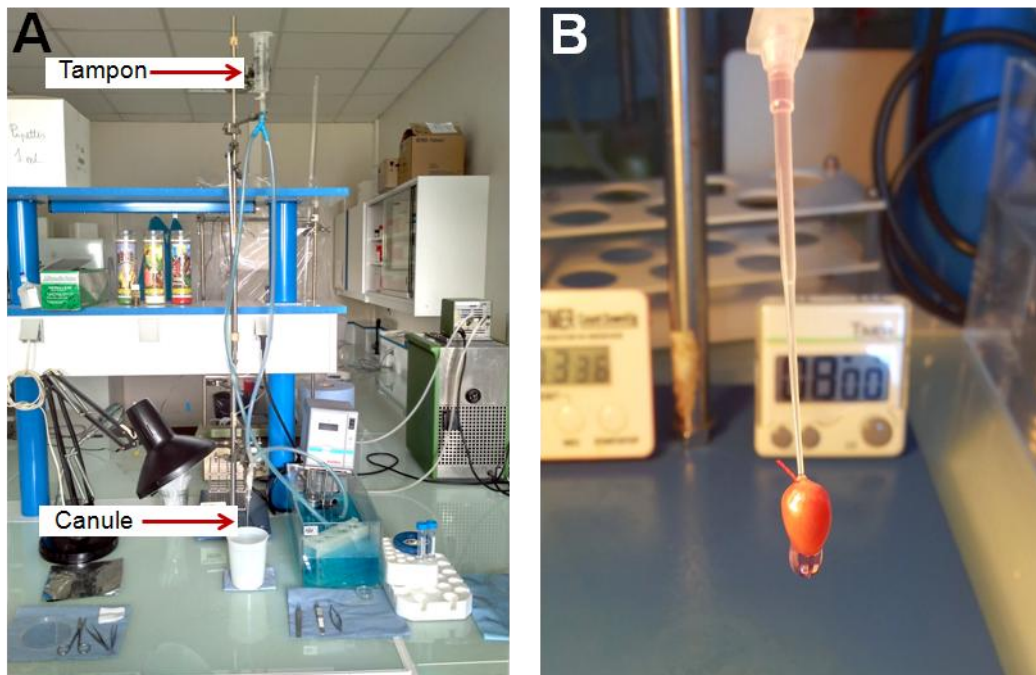


Figure 26 : Système de type Langendorff utilisé pour la dissociation de cardiomyocytes de souris. A : Système permettant la perfusion du cœur à pression constante par effet de gravité. B : Cœur de souris canulé par l'aorte en cours de dissociation.

Après environ 2 min de rinçage, le tampon de perfusion a été remplacé par le tampon de digestion (tampon de perfusion supplémenté avec 0,2 mg/mL de Libérase TM, 0,14 mg/mL de trypsine/EDTA et 12,5 μ M de CaCl_2 ; pH 7,4). Ce tampon a été perfusé pendant 8 à 9 min, jusqu'à ce que le cœur prenne une consistance gélatineuse.

À la fin de la période de digestion, le cœur a été détaché du montage de type Langendorff et placé dans un tampon d'arrêt (tampon de perfusion contenant 10 % de sérum de veau fœtal et 12,5 μ M de CaCl_2 ; pH 7,4) pour stopper la digestion enzymatique. Les oreillettes et le ventricule droit ont été retirés puis le ventricule gauche a été découpé en petits morceaux. Ces derniers ont ensuite été triturés à l'aide d'une pipette pasteur dans le tampon d'arrêt afin de libérer les cardiomyocytes par dissociation mécanique. Le surnageant a été filtré puis laissé à décanter pendant 10 min au cours desquelles les cellules vivantes ont sédimenté.

5.3.1.3. Réintroduction du calcium

Après 10 minutes de sédimentation, le surnageant du tampon d'arrêt, contenant les cellules mortes, a été éliminé. Le culot cellulaire a été re-suspendu dans un tampon ayant pour but de réintroduire du calcium (tampon de perfusion contenant 5% de sérum de veau fœtal et 12,5 μM de CaCl_2 ; pH 7,4) puis la suspension cellulaire a été laissée à décanter pendant 10 min. Le surnageant a de nouveau été éliminé et la même procédure (remise en suspension et décantation) a été répétée avec des concentrations croissantes de calcium (62, 112, 212, 500 puis 1000 μM de CaCl_2).

5.3.1.4. Évaluation de la viabilité cellulaire

Après avoir réintroduit la plus forte concentration de calcium (1 mM), la viabilité des cardiomyocytes a été évaluée grâce à une coloration au bleu trypan 0,4% (Figure 27). Un comptage sur cellule de Malassez des cardiomyocytes vivants (incolores) et morts (bleus) a été réalisé. Le pourcentage de viabilité a été exprimé selon la formule suivante :

$$\%viabilité = \frac{\text{nombre de cellules vivantes}}{\text{nombre total de cellules}} \times 100$$



Figure 27 : Suspension de cardiomyocytes à la fin de la réintroduction de calcium. Les cardiomyocytes viables sont incolores et ont une forme de bâtonnet tandis que les cellules mortes sont colorées en bleu.

5.3.1.5. Ensemencement des cardiomyocytes isolés

Les cardiomyocytes ont été ensemencés dans des boîtes de Pétri de 35 mm à raison de 150 000 cellules par boîte, dans 2 mL de M199 (Medium 199 supplémenté par 0,1% d'un mélange

Insuline Transferine Selenium). Les boîtes ont préalablement été revêtues avec de la laminine (250 µL de solution de laminine à 10 µg/mL dans du NaCl 0,9%). Les boîtes ont ensuite été placées dans un incubateur (37°C, 5% CO₂) pendant une 1h30 afin que les cellules adhèrent à la laminine. Au terme de l'incubation, les boîtes ont été rincées avec deux fois 1 mL de M199 et le milieu de culture a été remplacé par 2 mL de M199 « propre ».

5.3.2. Marquage des cellules

Pour l'ensemble des expériences, les cardiomyocytes ont été marqués avec différents fluorophores permettant de mesurer différents paramètres. Les sondes fluorescentes ont été introduites dans le M199 et les cellules ont été incubées à 37°C avant d'être rincées deux fois avec 1 mL de tyrode (en mM : CaCl₂ 1,36, NaCl 130, KCl 5, HEPES 10, MgCl₂ 1 ; pH 7,4 à 37°C) et incubées dans 2 mL de tyrode utilisé pour la mesure.

Pour évaluer l'ouverture du mPTP, les cardiomyocytes ont été marqués par l'association calcéine/CoCl₂. Les cellules ont été incubées en présence d'1 µM de calcéine-AM pendant 30 min et supplémentées avec 1 mM de CoCl₂ pendant les 10 dernières minutes. La fluorescence émise par la calcéine a été détectée à 510 nm après excitation à 460-490 nm.

Pour étudier le calcium intra-mitochondrial, les cellules ont été marquées à l'aide de Rhod-2 AM (5 µM) pendant 40 min.

La mort cellulaire a pu être mesurée en utilisant l'iodure de propidium (PI) qui ne pénètre que dans les cellules mortes et qui s'intercale dans l'ADN nucléaire (Lemasters *et al.*, 1987). La viabilité cellulaire est ainsi corrélée négativement à l'intensité de fluorescence émise. La fluorescence émise par le PI a été détectée à 580 nm après une excitation à 520-550 nm. Dans les expériences utilisant le PI, celui-ci était présent dans le milieu d'étude à la concentration de 5 µM tout au long de la mesure. Le PI a été utilisé simultanément avec la calcéine dans certaines expériences.

Le potentiel de membrane mitochondrial a été évalué grâce au TMRM (tetraméthylrhodaminéméthylester). Le TMRM est un composé cationique qui s'accumule sélectivement dans les mitochondries selon le potentiel de membrane mitochondrial. Il est caractérisé par une longueur d'onde d'excitation de 550 nm et une longueur d'onde d'émission de 572 nm détectée à l'aide du même jeu de filtres que le PI. Les cellules ont été incubées pendant 30 min en présence de 50 nM de TMRM avant la mesure. Pour certaines expériences, les cellules ont été co-marquées par le TMRM et l'association calcéine/CoCl₂.

5.4. Effet des ionophores calciques

Trois ionophores calciques ont été étudiés dans ce travail. Deux d'entre eux, l'A23187 et la ionomycine, sont des ionophores électroneutres qui équilibrent les concentrations calciques de part et d'autre des membranes biologiques. L'ETH129 est un ionophore dont l'activité dépend du potentiel de membrane et qui transporte donc le calcium vers les compartiments chargés négativement comme la mitochondrie.

L'effet des ionophores calciques a été étudié sur plusieurs paramètres cellulaires tels que l'ouverture du mPTP, le potentiel de membrane mitochondrial, le calcium intra-mitochondrial et la mort cellulaire. Tous ces paramètres ont été évalués à l'aide des marquages fluorescents décrits au paragraphe précédent.

A la fin du marquage, les cellules ont été incubées dans le tyrode (en mM : CaCl₂ 1,36, NaCl 130, KCl 5, HEPES 10, MgCl₂ 1, glucose 5,5 ; pH 7,4) et placées dans le micro-incubateur thermostaté monté sur la platine du microscope. Après stabilisation de la température du milieu à 37°C, les cellules ont été stimulées électriquement à l'aide d'une électrode délivrant un courant électrique continu (5 mV) à une fréquence de 0,5 Hz. Un champ contenant au moins 25 cellules viables et contractiles a été choisi pour la mesure. Pour chaque expérience, l'ETH129 (10, 20, 50 µM dans l'éthanol), la ionomycine (10 µM dans le DMSO) ou l'A23187 (1 µM dans le DMSO) ont été ajoutés dans le milieu d'étude après 5 min de stabilisation puis la mesure a été poursuivie jusqu'à 90 min. Les témoins respectifs, sans ajout de ionophore, ont été réalisés en ajoutant 1 µL du solvant utilisé pour dissoudre les ionophores (0,1% final). Les images ont été enregistrées toutes les minutes.

5.5. Hypoxie-réoxygénation

Les cellules ont été incubées pendant 30 min en présence de calcéine-AM (0,5 µM) et de PI (5 µM) et supplémentées par 1 mM de CoCl₂ après 20 min. A la fin du marquage, les cellules ont été rincées deux fois avec 1 mL de tyrode (en mM : CaCl₂ 1,36, NaCl 130, KCl 5, HEPES 10, MgCl₂ 1, glucose 5,5, PI 0,005 ; pH 7,4 à 37°C) et placées dans le microincubateur thermostaté monté sur la platine du microscope (Figure 28). Après stabilisation de la température du milieu à 37°C, les cellules ont été stimulées électriquement à l'aide d'une électrode délivrant un courant électrique continu (5 mV) à une fréquence de 0,5 Hz. Un champ contenant au moins 25 cellules viables et contractiles a été choisi. Pendant une première phase de stabilisation normoxique de 15 min, les cellules ont été perfusées avec du tyrode à un débit de 0,5 mL/min. L'hypoxie a ensuite été provoquée en arrêtant la pompe

péristaltique et en remplaçant le milieu d'incubation par du tyrode hypoxique, préalablement bullé à l'azote, sans glucose et contenant du 2-déoxyglucose (20 mM). Un flux constant d'azote a permis de maintenir une concentration d'oxygène de l'ordre de 1%. Enfin, après 45 à 90 min d'hypoxie, la réoxygénation a été induite par la restauration rapide de la perfusion de tyrode oxygéné et d'un flux d'air (21% O₂, 5% CO₂ 74% N₂) dans la chambre d'incubation. La réoxygénation a été poursuivie pendant 2 à 3 h. Au cours du protocole, les images ont été enregistrées toutes les 15 min pendant l'hypoxie, toutes les minutes pendant les 5 premières minutes de la réoxygénation puis toutes les 5 min, après une illumination avec une lampe à mercure de 25 ms pour la calcéine-AM et 75 ms pour le PI pour chaque image.

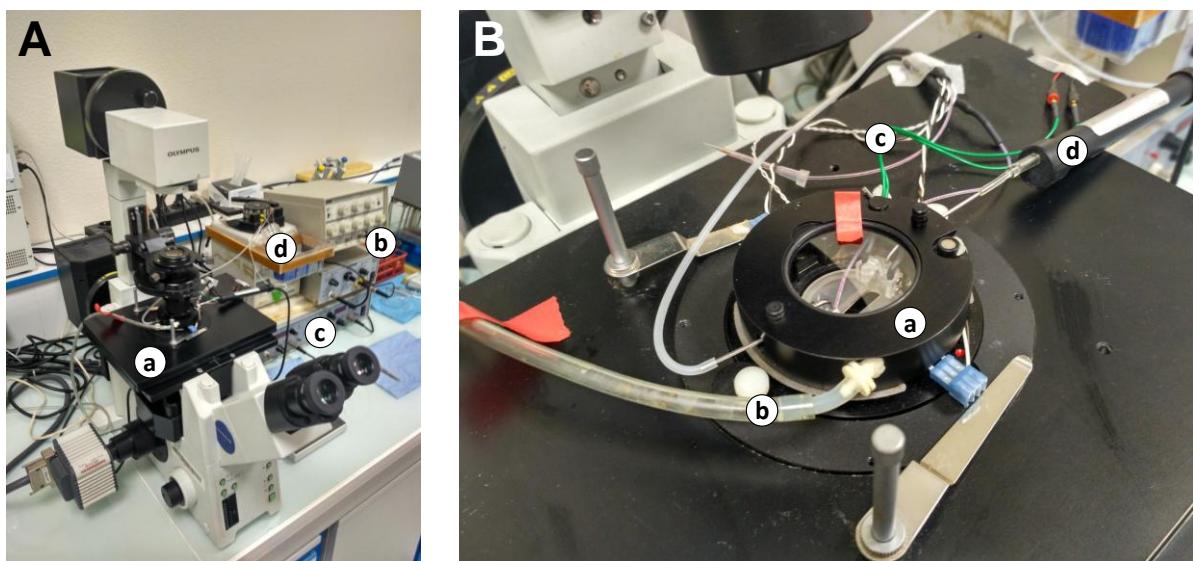


Figure 28 : Microscope Olympus IX-81 utilisé pour les expériences d'hypoxie-réoxygénation. A : vue d'ensemble du microscope (a) équipé d'un stimulateur électrique (b), d'un thermostat (c) et d'une pompe péristaltique (d). B : Platine du microscope équipée d'un micro-incubateur thermostaté (a) permettant l'apport de gaz (b), la stimulation électrique des cellules (c) et la circulation du milieu d'étude (d).

Pour chaque expérience, la variation de fluorescence observée pour chaque cellule a été déterminée et le temps de réoxygénation nécessaire à l'obtention d'une diminution de 50% de la fluorescence de la calcéine (temps nécessaire à l'ouverture de 50% des mPTP (t_{mPTP50})) a été évalué. La réponse globale a ensuite été obtenue en moyennant les variations de fluorescence pour tous les cardiomyocytes contenus dans le champ (25 à 30 cellules).

6. Étude de l'effet du composé C31 *in vivo*

6.1. Administration intraveineuse chez les animaux sains

Les souris C57Bl/6J ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (90 mg/kg, CEVA Santé animale), rasées au niveau du cou et désinfectées avec de la Vétédine (Vétoquinol®) puis intubées à l'aide d'une sonde endotrachéale et ventilées mécaniquement (volume respiratoire 200 µL, 120 insufflations par min) avec de l'air enrichi en oxygène (Carbogène – 95% O₂, 5% CO₂). Elles ont ensuite été placées sur un tapis chauffant permettant de maintenir la température corporelle à 37°C. Après la pose d'un cathéter jugulaire, le C31 (10 – 150 mg/kg), la CsA (20 mg/kg) ou le solvant (mélange polyéthylèneglycol/DMSO ou DMSO seul) ont été administrés à l'aide d'un pousse-seringue sur une période de 3 min. Le cœur et le foie de l'animal ont été prélevés 2 min après la fin de la perfusion et les mitochondries ont été isolées comme décrit précédemment.

6.2. Modèle d'ischémie-reperfusion hépatique chez la souris

Les souris C57Bl/6J ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (90 mg/kg, CEVA Santé animale), rasées au niveau de l'abdomen et du cou et désinfectées avec de la Vétédine (Vétoquinol®) puis ont été intubées à l'aide d'une sonde endotrachéale et ventilées mécaniquement (volume respiratoire 200 µL, 120 insufflations par min) avec de l'air enrichi en oxygène (Carbogène – 95% O₂, 5% CO₂). Elles ont ensuite été placées sur un tapis chauffant permettant de maintenir la température corporelle à 37°C. Après la pose d'un cathéter jugulaire et l'administration d'héparine (2,5 UI), une laparotomie a été réalisée et les ligaments hépatiques ont été sectionnés pour exposer le pédicule hépatique. L'ischémie a été induite par clampage du pédicule hépatique des segments I à V (lobe gauche et médians) et maintenue pendant 60 min (Figure 29A). L'efficacité du clampage a été systématiquement établie par vérification visuelle du blanchiment des segments ischémiés dès les premières minutes. Pour éviter une congestion du tractus gastro-intestinal, la circulation sanguine au sein des segments VI et VII (lobes droit et caudé) n'a pas été interrompue (Figure 29A). La reperfusion a été provoquée par retrait du clamp. La perfusion de C31 ou de son solvant a été débutée 1 min avant la reperfusion et maintenue pendant les 8 premières minutes de celle-ci (figure 29B).

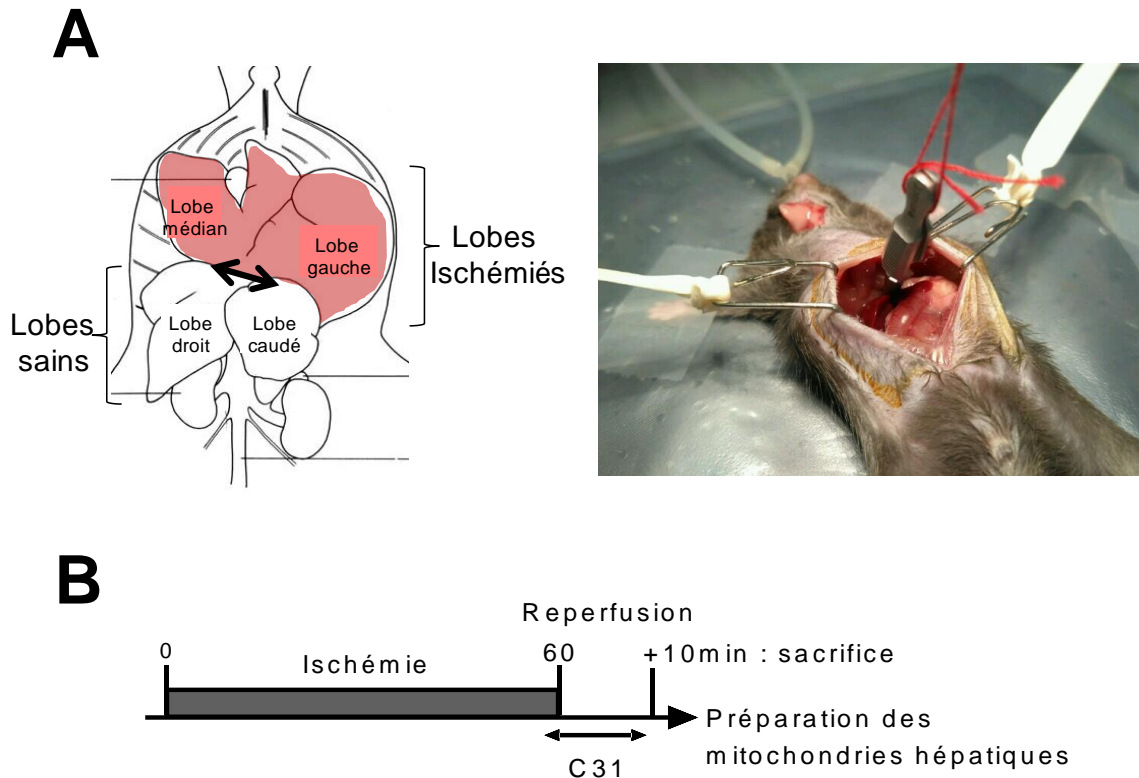


Figure 29 : Procédure d'ischémie-reperfusion hépatique chez la souris. **A :** gauche, choix des lobes ischémisés, la double flèche représente le site de clampage au niveau du pédicule hépatique. Droite, souris en cours d'opération, les lobes ischémisés sont réclinés contre le diaphragme. Les berges de la laparotomie sont écartées au moment du clampage et relâchées pour la durée de l'ischémie. Le clamp est maintenu en position verticale par un fil afin de ne pas appuyer sur les tissus adjacents. **B :** Schéma expérimental.

Pour étudier l'effet du C31 à la phase précoce de la reperfusion, les animaux ont été sacrifiés 2 min après la fin de la perfusion, soit à 10 min de reperfusion. Les foies ont été excisés et les mitochondries des lobes ischémisés ont été isolées selon le protocole décrit précédemment.

Pour évaluer l'effet du C31 sur la phase tardive de la reperfusion, l'abdomen des animaux a été refermé par suture en deux plans et les animaux ont été maintenus anesthésiés sur le tapis chauffant pendant 6 h. Au terme des 6 h de reperfusion, les animaux ont été sacrifiés et leur foie a été excisé. Les lobes ont été immédiatement découpés en tranches de 3 mm d'épaisseur et les coupes ont été incubées dans une solution de chlorure de triphényltétrazolium (TTC) pendant 5 min à 37°C. Après marquage au TTC, les coupes ont été fixées dans du formol 4% pendant une nuit. Enfin, les coupes ont été photographiées et pesées puis l'évaluation de la nécrose a été réalisée par mesure planimétrique en utilisant le logiciel *ImageJ*.

7. Étude du composé C31 *ex vivo*, dans un modèle de cœur isolé-perfusé

Pour les expériences de cœur isolé-perfusé, les étapes de préparation de l'animal et de prélèvement du cœur sont identiques au protocole utilisé pour l'obtention des cardiomyocytes isolés.

Après avoir canulé le cœur par l'aorte (Figure 30), la pression de perfusion a été augmentée progressivement jusqu'à atteindre 120 mmHg et maintenue pendant 2 min environ pour rincer le cœur en administrant un tampon de perfusion (en mM : NaCl 113, KCl 0,6, KH_2PO_4 0,6, NaHPO_4 0,6, MgSO_4 1,2, NaHCO_3 12, KHCO_3 10, CaCl_2 1, HEPES 10, Taurine 30, rouge de phénol 0,032, BDM 10, glucose 5,5 ; pH 7,4 à 37°C). Le tampon de perfusion a ensuite été remplacé par un tampon de même composition contenant la substance étudiée (C31 ou CsA) ou son solvant (DMSO 0,1%) et la pression de perfusion a été maintenue à 120-130 mmHg pendant 20 min.

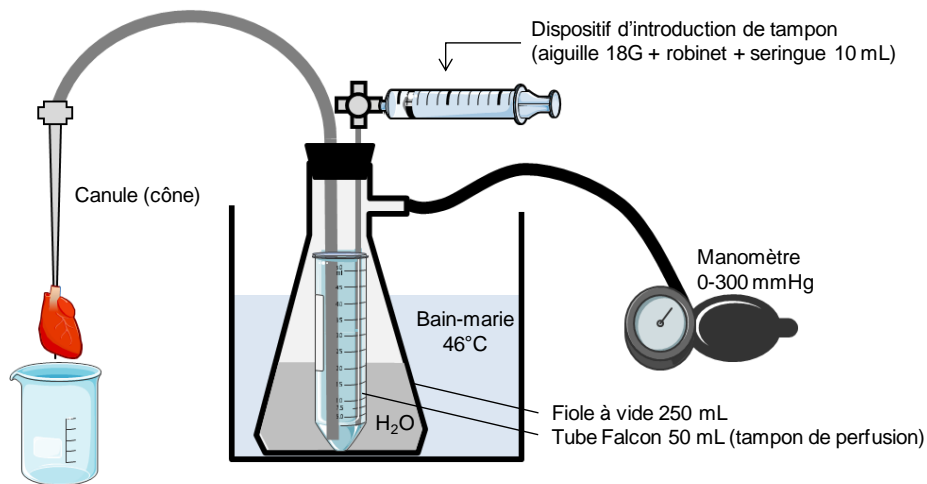


Figure 30 : Schéma du montage d'un cœur isolé-perfusé à pression élevée. Le cœur est canulé et perfusé de façon rétrograde comme pour la dissociation. La pression est transmise au sein d'une fiole à vide par un sphygmomanomètre. La fiole à vide est maintenue dans un bain-marie et contient de l'eau assurant les échanges thermiques avec le tube de tampon de perfusion.

Au bout de 20 min, le cœur a été détaché de la canule et immédiatement déposé dans un bécher contenant du NaCl 0,9 % à 4°C. Les oreillettes et le ventricule droit ont été retirés puis les mitochondries cardiaques ont été isolées comme décrit précédemment.

8. Analyse statistique

Chaque expérience a été réalisée sur au moins 3 à 5 préparations mitochondriales ou cellulaires différentes. Les IC_{50} pour les expériences de gonflement mitochondrial ont été calculées selon un modèle d'inhibition compétitive à deux paramètres, V_m et IC_{50} au moyen d'une régression non linéaire en utilisant le logiciel *Micropharm Binding* (*Micropharm INSERM 1999* ; Urien, 1995). Tous les résultats ont été exprimés comme la moyenne \pm SEM et ont été analysés à l'aide du logiciel *GraphPad Prism*[®] version 6. Les valeurs ont été comparées à l'aide d'une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie d'un test *post hoc* de Schéffé. Les différences ont été considérées comme significatives pour $p < 0,05$.

RÉSULTATS

Résultats 1 : Les nouveaux ligands des cyclophilines inhibent l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial et possèdent des propriétés hépatoprotectrices.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr Jean-Michel Pawlotsky (Inserm U955, Equipe 18) et est en cours de révision pour une resoumission à publication dans le journal *Gastroenterology*.

1. Objectif du travail

L'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP) participe à la mort cellulaire dans un grand nombre de pathologies. C'est notamment le cas lors des phénomènes d'ischémie-reperfusion au cours desquels le mPTP est responsable de lésions supplémentaires lors de la reperfusion. Celle-ci s'accompagne, en effet, d'une surcharge calcique mitochondriale et d'un stress oxydant qui stimulent la migration de la cyclophiline D (CypD) vers la membrane interne mitochondriale ce qui favorise l'ouverture du mPTP. L'inhibition pharmacologique de la CypD permet de désensibiliser le mPTP et limite les lésions lors de la reperfusion. Le développement de nouveaux inhibiteurs du mPTP représente donc un enjeu majeur pour protéger les organes au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion.

L'objectif de ce travail a été d'étudier les effets de nouveaux ligands de la cyclophiline D (SMCypI) sur l'ouverture du mPTP et d'évaluer leur effet hépatoprotecteur dans un modèle d'ischémie-reperfusion hépatique chez la souris.

2. Modèles expérimentaux

Au cours de cette étude, nous avons utilisé des souris C57Bl/6J sauvages et des souris de même fond génétique n'exprimant pas la CypD (*Ppif*^{-/-}). Les mitochondries hépatiques ont été isolées afin d'étudier l'effet des nouveaux inhibiteurs de cyclophilines sur :

- Le gonflement mitochondrial lié à l'ouverture du mPTP induit par le calcium et le stress oxydant,
- La capacité de rétention calcique qui traduit la résistance des mitochondries à l'ouverture du mPTP,
- La respiration mitochondriale.

Les hépatocytes primaires de souris ont été utilisés pour étudier l'ouverture du mPTP induite par un ionophore calcique et mise en évidence par l'association calcéine/CoCl₂ en microscopie à fluorescence. Les mêmes expériences ont été réalisées sur des hépatocytes primaires humains.

Enfin, l'effet hépatoprotecteur a été évalué grâce à un modèle d'ischémie-reperfusion hépatique au terme duquel les mitochondries hépatiques ont été isolées puis les fonctions mitochondriales, phosphorylation oxydative et rétention calcique, ont été analysées.

3. Résultats

3.1. Les nouveaux ligands de la CypD inhibent l'ouverture du mPTP de mitochondries hépatiques isolées.

Dans un premier temps, nous avons montré que les SMCypI inhibent l'ouverture du mPTP dans un modèle simple de gonflement mitochondrial induit par le calcium. Ce modèle a été validé au préalable avec la CsA, l'inhibiteur de référence du mPTP. Nous avons ensuite montré qu'il existe une corrélation entre les IC₅₀ d'inhibition du mPTP et d'inhibition de l'activité enzymatique de la CypD. Ce modèle a permis de choisir la molécule la plus active, le C31, pour la suite de l'étude.

Dans un second temps, nous avons étudié l'effet du C31 sur la capacité de rétention calcique mitochondriale. Ces expériences sont complémentaires à celles de mesure du gonflement car elles permettent de quantifier la sensibilité des mitochondries au calcium. Dans ces expériences, le C31 augmente de façon concentration-dépendante la capacité de rétention calcique et possède, pour des concentrations supérieures à 10 µM, un effet plus important que la CsA. Ainsi, bien que l'affinité du C31 pour la CypD soit plus faible que celle de la CsA, ce composé est plus efficace car il permet aux mitochondries de retenir des quantités de calcium beaucoup plus importantes.

3.2. Le composé C31 inhibe l'ouverture du mPTP par un mécanisme d'action original.

Afin d'expliquer la forte rétention calcique observée en présence de concentrations élevées de C31, nous avons étudié son effet dans des mitochondries isolées de foie de souris *Ppif*^{-/-}. Chez ces souris, la rétention calcique en conditions témoins est augmentée par rapport à celle observée chez les souris sauvages et correspond à celle obtenue chez ces mêmes animaux en présence de CsA. De façon surprenante, le C31 est capable d'augmenter la rétention calcique

chez ces souris, ce qui démontre un effet additionnel indépendant de la CypD. Le C31 inhibe donc le mPTP par deux mécanismes d'action distincts, faisant intervenir la CypD à faibles concentrations et une autre cible à plus fortes concentrations.

Nous avons ensuite montré que ce mécanisme additionnel n'est pas lié à une inhibition de la respiration mitochondriale qui pourrait désensibiliser le mPTP en réduisant modérément le potentiel de membrane. De plus, la structure aromatique du C31 ne lui confère pas de rôle de type ubiquinone qui aurait pu expliquer l'inhibition indépendante de la CypD observée avec l'ubiquinone 0 (Fontaine *et al.*, 1998). Enfin, l'étude d'une molécule chimiquement très proche du C31, qui ne diffère que par le cycle présent sur la chaîne latérale qui est totalement saturé, montre que l'insaturation du cycle phényle du C31 est responsable de cet effet additionnel.

3.3. Le composé C31 inhibe l'ouverture du mPTP dans les hépatocytes primaires

L'étape suivante de l'étude a consisté à vérifier les effets inhibiteurs du C31 *in situ*, dans des cellules, en utilisant des hépatocytes primaires de souris dont les mitochondries sont marquées par l'association calcéine/CoCl₂. L'ouverture du mPTP induite par un ionophore calcique, qui induit l'entrée de calcium dans la cellule, est visualisée par la diminution de la fluorescence de la calcéine. En présence d'une concentration optimale de CsA, cette diminution est ralentie et partiellement inhibée. Le C31 inhibe l'extinction de la calcéine de façon concentration-dépendante avec un effet total à 100 µM, présentant ainsi une efficacité supérieure à celle de la CsA. Des résultats identiques ont été obtenus avec les hépatocytes primaires humains, indiquant que l'inhibition du mPTP observée n'est pas dépendante de l'espèce. Ces résultats démontrent que le C31 est capable de franchir les membranes cellulaires et d'inhiber l'ouverture du mPTP induite par la surcharge calcique.

3.4. L'administration *in vivo* de C31 protège les mitochondries au cours de l'ischémie-reperfusion hépatique.

Dans un premier temps, des souris ont reçu une injection intraveineuse de C31 à différentes doses afin de vérifier que cette voie d'administration permet d'atteindre les mitochondries hépatiques. Après l'injection, les mitochondries hépatiques ont été isolées puis la capacité de rétention calcique a été évaluée. Dans ces conditions, le C31 augmente la capacité de rétention calcique de façon dose-dépendante, avec un effet plus important que la CsA à 150 mg/kg.

Cette dose a été choisie pour étudier les effets hépatoprotecteurs du C31 dans un modèle d'ischémie-reperfusion hépatique chez la souris. Dans ce modèle, l'administration de 150 mg/kg de C31 lors de la reperfusion permet de restaurer les deux paramètres mitochondriaux mesurés, la capacité de rétention calcique et la respiration mitochondriale, à des valeurs proches des valeurs témoins.

4. Conclusions

Ce travail a permis de montrer que les nouveaux ligands de la CypD sont des inhibiteurs du mPTP. La molécule la plus active, le C31, inhibe l'ouverture du mPTP dans les mitochondries isolées et les hépatocytes primaires par un mécanisme d'action original impliquant la CypD et une autre cible non identifiée. Administré à l'animal, le C31 peut atteindre les mitochondries hépatiques et restaure les fonctions mitochondriales dans un modèle d'ischémie-reperfusion. Ces résultats représentent une preuve de concept pour cette nouvelle famille de petits inhibiteurs de cyclophilines et devraient orienter la pharmacomodulation pour le développement de nouveaux dérivés plus stables et plus actifs.

5. Résultats complémentaires

Au-delà de la protection mitochondriale observée dans les premières minutes de la reperfusion, nous avons recherché une protection à plus long terme sur la taille de la nécrose hépatique. Après 6h de reperfusion, les foies ont été prélevés et la nécrose a été évaluée par coloration au chlorure de triphényltétrazolium et mesure planimétrique. Ces résultats montrent que malgré l'inhibition du mPTP et la restauration de la respiration mitochondriale dans les premiers instants de la reperfusion, la perfusion de C31 ne permet pas de limiter la nécrose (Figure 31). Nous avons émis l'hypothèse que la faible demi-vie du C31, de l'ordre de quelques minutes lorsqu'elle est mesurée *in vitro* en présence de microsomes hépatiques, pouvait être la raison de cette inefficacité lors de la phase tardive. L'une des voies principales de dégradation des xénobiotiques pouvant expliquer cette perte rapide d'efficacité repose sur l'activité oxydative des cytochromes P450 hépatiques. Nous avons donc inhibé l'activité de ces enzymes en administrant un inhibiteur non spécifique des cytochromes P450, l'aminobenzotriazole (50 mg/kg, Balani *et al.*, 2004), 30 minutes avant le début de l'ischémie. Cependant, l'inhibition de ces cytochromes n'a pas permis de réduire la nécrose des lobes ischémiés-reperfusés (Figure 31).

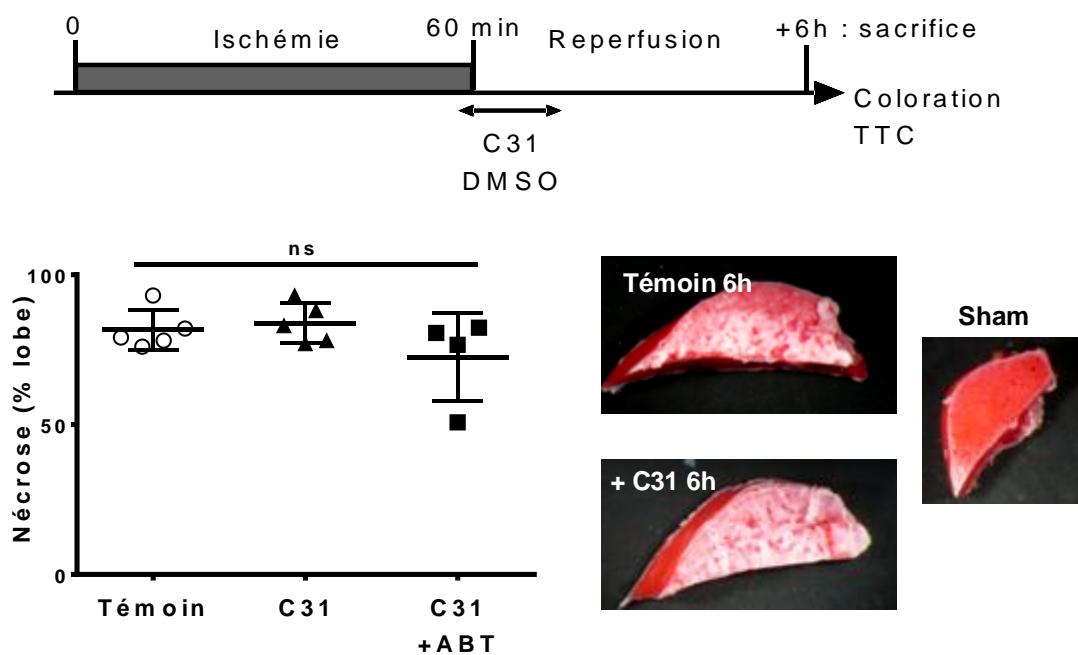


Figure 31 : Effet du C31 sur la nécrose observée à la phase tardive de la reperfusion. Les souris ont été soumises au modèle d'ischémie-reperfusion hépatique et ont reçu le solvant (DMSO, témoin) ou le C31 (150 mg/kg) au moment de la reperfusion. Après 6 h de reperfusion, le foie des souris a été prélevé et la nécrose tissulaire a été mise en évidence par coloration au chlorure de triphényltétrazolium (TTC). Les aires non colorées (en blanc) correspondent aux zones nécrosées. L'aminobenzotriazole (ABT, 50 mg/kg) a été administré 30 min avant l'ischémie pour inhiber les cytochromes P450 et prolonger la demi-vie du C31. ns : non significatif.

Afin de mettre en évidence une éventuelle prolongation de la durée de l'effet du C31 par le traitement à l'aminobenzotriazole, l'effet du C31 (150 mg/kg) sur la rétention calcique mitochondriale a été évalué 30 min après la perfusion chez des souris saines. Chez ces animaux, l'effet du C31 est totalement aboli puisque la rétention calcique des mitochondries isolées est équivalente à celle d'animaux ayant reçu uniquement le solvant (Figure 32). Un groupe d'animaux a également reçu une injection intrapéritonéale d'aminobenzotriazole (50 mg/kg) 30 min avant la perfusion de C31. Cette stratégie n'a pas permis d'augmenter la durée de l'effet du C31, celui-ci étant indécélable après 30 min (Figure 32). Enfin, chez le groupe d'animaux ayant reçu une perfusion de 20 mg/kg de CsA, la capacité de rétention calcique des mitochondries hépatiques est fortement augmentée, ce qui s'explique probablement par la plus grande stabilité de la molécule.

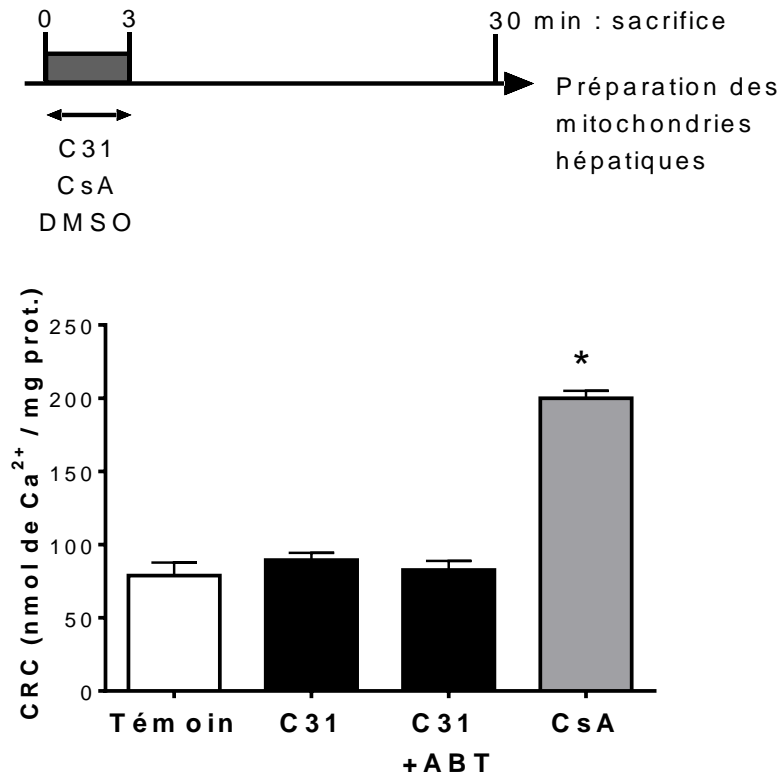


Figure 32 : Capacité de rétention calcique mitochondriale mesurée 30 min après injection de C31 ou de CsA. Des souris ont reçu une injection de solvant (DMSO, témoin), de C31 (150 mg/kg) ou de CsA (20 mg/kg) puis les mitochondries hépatiques ont été isolées après 30 min et la capacité de rétention calcique (CRC) a été évaluée. Certains animaux ont également reçu une injection d'aminobenzotriazole (ABT, 50 mg/kg) 30 min avant l'administration de C31 pour inhiber les cytochromes P450. * $p < 0,05$ versus témoin.

L'absence d'effet protecteur du C31 à 6 h de reperfusion peut donc être attribuée à sa très courte demi-vie du C31 et souligne la nécessité d'améliorer la stabilité métabolique de ces molécules.

1 **Small-molecule cyclophilin inhibitors block mitochondrial permeability transition pore**
2 **opening and protect from hepatic ischemia-reperfusion injury**

3
4
5
6
7 4 Mathieu Panel,^{1,2*} Abdelhakim Ahmed-Belkacem,^{3*} Isaac Ruiz,³ Rozenn Brillet,³ Fouad
8
9 5 Lafdil,^{3,4} Fatima Teixeira-Clerc,³ Muriel Gelin,⁵ Fred Allemand,⁵ Jean-François Guichou,⁵
10
11 6 Bijan Ghaleh,^{1,2} Didier Morin,^{1,2#} and Jean-Michel Pawlotsky^{3,6#}
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

8 *Authors share co-first authorship

9 #Authors share co-senior authorship.

11 ¹INSERM U955, Team 3, Créteil, France ;²Université Paris-Est, UMR S955, DHU A-TVB,
12 UPEC, Créteil, France ;³INSERM U955, Team “Pathophysiology and Therapy of Chronic
13 Viral Hepatitis and Related Cancers“, Créteil, France; ⁴Institut Universitaire de France (IUF),
14 Paris, France; ⁵Centre de Biochimie Structurale (CBS), INSERM, CNRS, Université de
15 Montpellier, Montpellier, France ; ⁵National Reference Center for Viral Hepatitis B, C and
16 Delta, Department of Virology, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

18 **SHORT TITLE: Cyclophilin inhibition and hepatic ischemia-reperfusion**

19
20 **Corresponding authors:**

21 - **Jean-Michel Pawlotsky** :Department of Virology, Hôpital Henri Mondor, 51 avenue
22 du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France.

23 E-mail : jean-michel.pawlotsky@aphp.fr

24 - **Didier Morin** : INSERM U955, équipe 3, Faculté de Médecine, 8 rue du général Sarrail,
25 94000, Créteil, France.

26 E-mail : didier.morin@inserm.fr
61
62
63
64
65

27

1
2 28 **Grant support:** Mathieu Panel was supported by a grant from the French Ministry for Higher
3
4 29 Education and Research (Grant #2014-140). Isaac Ruiz was supported by grants from the
5
6 30 National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) and the Mexican National
7
8 31 Council of Science and Technology (CONACYT).

32

13
14 33 **Conflict of interest disclosures:** Inserm Transfert is the owner of patent EP 09306294.1
15
16 34 covering the family of cyclophilin inhibitors described, for which Abdelhakim Ahmed-
17
18 35 Belkacem, Jean-François Guichou and Jean-Michel Pawlotsky are inventors. All other authors
19
20 36 declare no competing financial interests.

37

25
26 38 **Authors contributions:**

27
28 39 - Mathieu Panel: acquisition, analysis and interpretation of data; drafting of the
29
30 40 manuscript; statistical analysis.

31
32
33 41 - Abdelhakim Ahmed-Belkacem: acquisition, analysis and interpretation of data; drafting
34
35 42 of the manuscript; statistical analysis.

36
37
38 43 - Isaac Ruiz: contribution to the experimental design of murine ischemia-reperfusion
39
40 44 experiments; acquisition, analysis and interpretation of data.

41
42
43 45 - Rozenn Brillet: acquisition, analysis and interpretation of data.

44
45
46 46 - Fouad Lafdil: contribution to the experimental design of murine ischemia-reperfusion
47
48 47 experiments; revision of the manuscript.

49
50
51 48 - Fatima Teixeira-Clerc: contribution to the experimental design of murine ischemia-
52
53 49 reperfusion experiments; revision of the manuscript.

54
55 50 - Muriel Gelin: acquisition, analysis and interpretation of data.

56
57
58 51 - Fred Allemand: acquisition, analysis and interpretation of data.

- 52 - Jean-François Guichou: compound design and synthesis; generation of structural data,
1
2 53 revision of the manuscript.
3
4 54 - Bijan Ghaleh: study supervision; analysis and interpretation of data; drafting of the
5
6 55 manuscript.
7
8
9 56 - Didier Morin: study supervision; analysis and interpretation of data; drafting of the
10
11 57 manuscript.
12
13
14 58 - Jean-Michel Pawlotsky: study supervision; analysis and interpretation of data; critical
15
16 59 revision of the manuscript for important intellectual content.
17
18
19 60
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

61 **Abstract**

1
2 62
3
4 63 **Background & aims:** Hepatic ischemia-reperfusion injury is a major complication of
5
6 64 liver surgery in which mitochondrial dysfunction resulting from mitochondrial permeability
7
8
9 65 transition pore (mPTP) opening plays a major role. Cyclophilin D (CypD) is a key mPTP
10
11 66 opening regulator, thus a therapeutic target in the context of hepatic ischemia-reperfusion. Here,
12
13
14 67 we assessed whether and how a new family of potent small-molecule cyclophilin inhibitors
15
16 68 (SMCypIs) inhibits liver mitochondria mPTP opening in cellular and animal models and in the
17
18 69 context of experimental *in vivo* liver ischemia-reperfusion.

20
21 70 **Methods:** SMCypI inhibition of CypD enzyme activity was measured. Inhibition of
22
23 71 mPTP opening was studied in wild-type and *Ppif*^{-/-} (CypD-inactivated) mouse liver
24
25
26 72 mitochondria by measuring mitochondrial swelling and calcium retention capacity, and in
27
28 73 primary mouse and human hepatocytes by fluorescence microscopy. SMCypI protective effect
29
30
31 74 was assessed *in vivo* in a model of hepatic ischemia-reperfusion.

32
33 75 **Results:** The SMCypIs bound CypD with high affinity and inhibited its enzyme activity.
34
35
36 76 CypD inhibition induced a concentration-dependent inhibition of calcium-induced swelling
37
38 77 through inhibition of mPTP opening in wild-type and *Ppif*^{-/-} mouse liver mitochondria and in
39
40
41 78 primary human and mouse hepatocytes. The most potent SMCypI exerted an additional, CypD-
42
43 79 independent effect on mPTP opening. An experimental mouse ischemia-reperfusion model
44
45
46 80 provided proof-of-concept that the lead SMCypI compound reaches its target *in vivo*, restores
47
48 81 the hepatic calcium retention capacity and protects liver cells from injury.

49
50 82 **Conclusion:** The new lead SMCypI compound is a promising candidate drug in the
51
52
53 83 indication of hepatic protection in the context of ischemia-reperfusion after liver surgery and,
54
55 84 possibly, in other liver and non-hepatic disorders related to abnormal mPTP opening involving
56
57
58 85 CypD.

60 86

87 **Keywords:** hepatic ischemia-reperfusion injury; cyclophilin D; small-molecule cyclophilin
1
2 88 inhibitors; mitochondria; calcium; permeability transition.

3
4 89
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

90 Introduction

1
2 91
3
4 92 Hepatic ischemia-reperfusion injury is a major complication of liver surgery, including
5
6 93 liver resection, liver transplantation, and trauma surgery¹. Ischemia results from the interruption
7
8
9 94 of the blood flow that perturbs the cellular metabolism as a result of oxygen shortage.
10
11 95 Reperfusion restores the blood flow, oxygen delivery and tissue pH, thereby exacerbating
12
13 96 cellular damage initiated during hypoxia or anoxia^{2, 3}. Hepatic ischemia-reperfusion injury is
14
15
16 97 an important cause of liver dysfunction or functional failure post-liver surgery, which affects
17
18
19 98 perioperative morbidity, mortality and recovery^{2, 3}. There are two types of ischemia: the most
20
21 99 frequent form, warm ischemia, is observed when vascular occlusion occurs during hepatic
22
23
24 100 resection surgery or during exposure to low-flow incidences such as trauma, hemorrhagic
25
26 101 shock, cardiac arrest or hepatic sinusoidal obstruction syndrome; cold ischemia is observed
27
28
29 102 exclusively during orthotopic liver transplantation, when the graft is subjected to hypothermic
30
31 103 preservation before warm reperfusion³. Their mechanisms and main target cells differ.
32
33 104 Hepatocytes are a major target of warm ischemia-reperfusion injury through anoxia, nutrition
34
35
36 105 depletion and cytosolic acidosis³. In particular, sodium, chloride and calcium homeostasis are
37
38 106 significantly altered.

40
41 107 Mitochondrial dysfunction has been shown to play a major role in hepatic ischemia-
42
43 108 reperfusion injury³. Indeed, ischemia-reperfusion triggers the mitochondrial permeability
44
45
46 109 transition, which is characterized by an increase in the permeability of the inner mitochondrial
47
48 110 membrane mediated by the opening of a channel, called the “mitochondrial permeability
49
50 111 transition pore“ (mPTP)⁴. Once mitochondrial permeability transition initiates, solutes with a
51
52
53 112 molecular mass of up to 1.5 kDa diffuse across the mitochondrial inner membrane, inducing
54
55 113 mitochondrial depolarization, uncoupling and swelling, which in turn induce ATP depletion
56
57
58 114 and necrotic (and, to a lesser extent, apoptotic) cell death³. During hepatic ischemia-reperfusion,
59
60 115 mPTP opening is triggered by calcium-mediated mitochondrial reactive oxygen species

116 formation. The same phenomenon has been reported to play an important role during ischemia-
117 reperfusion affecting other organs (including heart and brain)⁵⁻⁸, neurodegenerative diseases⁹
118 and drug-induced liver injury¹⁰.

119 Therapies avoiding the consequences of hepatic ischemia-reperfusion injury remain
120 limited, due to the complex and intricaded mechanisms involved. Given the key role of mPTP
121 opening in ischemia-reperfusion injury, pharmacological inhibition of mPTP opening appears
122 as a promising target for new therapies. However, the molecular structure and functioning of
123 mPTP remain largely unknown. Several proteins have been suggested to be involved in the
124 structure of this channel, including ATP synthase, the adenine nucleotide translocase, a
125 phosphate carrier and cyclophilin D (CypD)¹¹. Cyclophilins are peptidyl prolyl *cis/trans*
126 isomerases (PPIases) that catalyze the interconversion of the two energetically preferred
127 conformers (*cis* and *trans*) of the planar peptide bond preceding an internal proline residue.
128 Seventeen human cyclophilins have been identified, but the function of most of them is
129 unknown^{12, 13}. CypD is located within the mitochondrial matrix where it acts as a key
130 component and regulator of the mPTP; mPTP formation appears to be catalyzed or stabilized
131 by CypD through lowering of its calcium threshold¹⁴. Thus, CypD represents an attractive target
132 for mPTP opening inhibition and cellular protection in the context of hepatic ischemia-
133 reperfusion injury.

134 Cyclosporine A (CsA) and its derivatives (together with sangliferin A) are known
135 macromolecular CypD ligands. They have been shown to efficiently desensitize mPTP opening
136 in various cellular and *in vivo* models¹⁵⁻¹⁸. However, CsA is a potent immunosuppressor and its
137 non-immunosuppressive derivatives suffer from many disadvantages, including their size,
138 complex multistep synthesis, cell toxicity and lack of chemical plasticity, making them unlikely
139 to be clinically developed. Thus, potent cyclophilin inhibitors unrelated to CsA or sangliferin
140 A and lacking the disadvantages of its non-immunosuppressive macromolecular derivatives are
141 needed.

142 By means of a fragment-based drug discovery approach based on X-ray crystallography
1 and nuclear magnetic resonance, we generated a new family of nonpeptidic small-molecule
2 143 and nuclear magnetic resonance, we generated a new family of nonpeptidic small-molecule
3
4 144 cyclophilin inhibitors (SMCypIs) unrelated to CsA or sanglifehrin A, with potent inhibitory
5
6
7 145 activity against CypA, CypB and CypD¹⁹. These compounds lack cellular toxicity and
8
9 146 immunosuppressive activity and they bear druggable pharmacological properties¹⁹. In the
10
11 147 present study, we assessed the ability of the new SMCypIs to inhibit liver mitochondria mPTP
12
13
14 148 opening through CypD inhibition, studied their mechanisms of inhibition, and evaluated *in vivo*
15
16 149 their protective properties in the context of experimental hepatic ischemia-reperfusion injury.
17
18
19 150

21 151 **Materials and Methods**

26 153 *Drugs and cells*

31 155 Unless specified, all reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin
32
33 156 Fallavier, France). Calcein AM (C3100MP) and calcium Green 5N (C3737) were obtained from
34
35
36 157 Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). SMCypIs were synthesized as previously described¹⁹.
37
38 158 Primary human hepatocytes were obtained from Biopredict International (Saint-Grégoire,
39
40
41 159 France).

46 161 *Animals*

50 163 Male C57BL/6J mice (8 to 10-week-old) were purchased from Janvier (Le Genest-St-
51
52
53 164 Isle, France). *Ppif*^{-/-} mice (i.e., CypD knock-out mice) were obtained from Jackson Laboratories
54
55 165 (Bar Harbor, Maine, USA). Animals were co-housed in an air-conditioned room with a 12-h
56
57
58 166 light-dark cycle and received standard rodent chow and drinking water *ad libitum*. All animal
59
60 167 procedures in this study were in strict accordance with the Directives of the European
61
62
63
64
65

168 Parliament (2010/63/EU-848 EEC) and approved by the Animal Ethics Committee
1 ANSES/ENVA/Université Paris-Est Créteil (approval numbers 09/12/14-02 and 11/10/16-01).

4 170

7 171 *Molecular modeling and docking of C31 into CypD*

9 172

11 173 Molecular modeling and docking experiments were performed by means of the
12
13 @TOME-2 server²⁰, which integrates an original interface for comparative docking of small
14 174
15
16 175 molecules detected in the Protein Data Bank (PDB) file of each template. The search for
17
18 homologous sequences and alignments were performed using @TOME-2, while the human
19 176
20
21 177 CypD sequence (P30405) was selected with a 100% identity. In each structural model, the
22
23 boundaries of the active site were deduced from the vicinity of co-crystallized ligands
24 178
25
26 179 (compounds C30, C27, and C24 were selected as templates, with corresponding PDB accession
27
28 numbers 4J5C, 4J5B and 4J5E, respectively) using @TOME-2 comparative option. They were
29 180
30
31 181 also used to guide docking in automatically computed models. The ligand files were generated
32
33 with MarvinSketch 6.2.2 for SMILES and with Frog2 server for mol2²¹. The figure was
34 182
35
36 183 generated by means of Pymol.

38 184

41 185 *Enzyme assay for CypD PPIase activity inhibition*

43 186

45 187 Inhibition of CypD PPIase activity by the SMCypIs was measured at 20°C by means of
46
47 the standard chymotrypsin coupled assay. The assay buffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl,
48 188
49
50 189 pH 7.8) and purified CypD (1900 nM stock solution) were pre-cooled at 4°C in the presence of
51
52 serial dilutions of the SMCypIs. Then, 5 µL of 50 mg/ml chymotrypsin in 1 mM HCl was added.
53 190
54
55 191 The reaction was initiated by adding 20 µL of 3.2 mM peptide substrate (N-succinyl-Ala-Ala-
56
57 Cis-Pro-Phe-p-nitroanilide). P-nitroanilide absorbance was measured at 390 nm for 1 min. In
58 192
59
60 193 all experiments, CsA was used as a positive control of PPIase inhibition. The percent inhibition

194 of CypD PPIase activity was calculated from the slopes and the IC_{50s} were determined from
195 percent inhibition curves using Sigmaplot software.

196

197 *Isolation of liver mitochondria*

198

199 Mouse livers were scissor-minced and homogenized on ice in a buffer (220 mM
200 mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES, 4 mM EGTA, pH 7.4 at 4°C) using a Potter-
201 Elvehjem glass homogenizer in a final volume of 10 ml. The homogenate was centrifuged at
202 1000 g for 5 min at 4°C. The supernatant was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. The
203 mitochondrial pellet was resuspended in 600 µl of homogenization buffer without EGTA and
204 protein concentration was determined using the “Advanced protein assay reagent” (Sigma-
205 Aldrich).

206

207 *Measurement of mitochondrial oxygen consumption*

208

209 Oxygen consumption of isolated mitochondria was measured with a Clark-type
210 electrode fitted to a water-jacketed reaction chamber (Hansatech, Cergy, France). Mitochondria
211 (1 mg protein/ml) were incubated at 30°C in a respiration buffer containing 100 mM KCl, 50
212 mM sucrose, 10 mM HEPES and 5 mM KH₂PO₄ at pH 7.4. Respiration was initiated by the
213 addition of glutamate/malate (5 mM each). After 1 min, ATP synthesis was induced by the
214 addition of 1 mM ADP (state 3 respiration rate) and 1 µM carboxyatractyloside was added to
215 measure the substrate-dependent respiration rate (state 4). The respiratory control ratio (state
216 3/state 4) was then calculated.

217

218 *Mitochondrial swelling assays*

219

220 Mitochondrial swelling was assessed by measuring the change in absorbance at 540 nm
1
2 221 (A_{540}) using a Jasco V-530 spectrophotometer equipped with magnetic stirring and thermostatic
3
4 222 control. Mitochondria (0.5 mg/ml) energized with pyruvate/malate (5 mM each) were incubated
5
6
7 223 30 sec in the respiration buffer before the induction of swelling with 10 mM phosphate, 100
8
9 224 μ M atractyloside or 40 μ M *tert*-butyl hydroperoxide in the presence of 50 μ M of CaCl_2 .

11 225 In de-energized condition, mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated 1 min at 30°C in a
12
13
14 226 swelling buffer containing 100 mM KCl, 50 mM sucrose, 10 mM HEPES, 5 mM KH_2PO_4 , 1
15
16 227 μ M rotenone, and 1 μ M antimycin at pH 7.4. Then, 50 μ M or 100 μ M CaCl_2 was added 1 min
17
18
19 228 before swelling induction with 1 μ M of A23187 or 10 μ M phenylarsine oxide, respectively,
20
21 229 introduced at the beginning of the incubation period.

23
24 230 In both conditions, SMCypIs or CsA were introduced at the beginning of the incubation
25
26 231 period.

27
28 232

30 233 *Measurement of the calcium retention capacity of isolated mitochondria*

31
32
33 234

34
35
36 235 Mitochondria were loaded with increasing concentrations of calcium until mPTP
37
38 236 opening and fast calcium release were achieved, as previously described²². Liver mitochondria
39
40
41 237 (1 mg/ml) energized with 5 mM glutamate/malate were incubated in the respiration buffer
42
43 238 supplemented with 1 μ M Calcium Green-5N fluorescent probe. The calcium concentration in
44
45
46 239 the extra-mitochondrial medium was monitored by means of a Jasco FP-6300
47
48 240 spectrofluorimeter (Jasco, Bouguenais, France) at excitation and emission wavelengths of 506
49
50
51 241 and 532 nm, respectively. The calcium signal was calibrated by addition of known calcium
52
53 242 amounts to the medium.

54
55 243

57 244 *Isolation of primary mouse hepatocytes*

58
59
60 245

246 Murine hepatocytes from C57BL6 animals were isolated by portal vein perfusion of
1 collagenase²³. Freshly isolated hepatocytes were cultured in DMEM supplemented with 10%
2
3
4 248 fetal calf serum, 10 U/mL penicillin, 10 µg/mL streptomycin, 10 µg/mL insulin, 5.5 µg/mL
5
6
7 249 transferrin and 5 ng/mL sodium selenite. Four hours post-perfusion, the medium was removed
8
9 250 and fresh medium, supplemented with 0.1 µM dexamethasone and 50 ng/mL epidermal growth
10
11 251 factor, was added.

12 252

16 253 *Measurement of mPTP opening in primary mouse and human hepatocytes*

18 254

21 255 Direct assessment of mPTP opening was performed in hepatocytes isolated from human
22
23 256 and mouse livers by loading the cells with calcein acetoxymethyl ester and CoCl₂ to induce
24
25
26 257 mitochondrial localization of calcein fluorescence, according to the established procedure with
27
28 258 minor modifications²⁴. Cells were loaded with 2 mM CoCl₂ at 30°C in 1 ml of Tyrode's solution
29
30 259 (NaCl 130 mM, KCl 5 mM, HEPES 10 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1.8 mM, pH 7.4 at 37°C) for
31
32
33 260 30 min. After 10 min, the cells were supplemented with 1 µM calcein acetoxymethyl ester. The
34
35
36 261 cells were then washed free of calcein and CoCl₂, placed in a thermostated chamber and
37
38 262 incubated in Tyrode's solution. After 5 min of incubation, 2 µM of the calcium ionophore
39
40
41 263 A23187 was added to induce mPTP opening, as previously described²⁵. When specified, either
42
43 264 C31 or CsA was added to the cells at the beginning of the incubation period.

45 265 Cells were imaged with an Olympus IX-81 motorized inverted microscope equipped
46
47
48 266 with a mercury lamp as the light source for epifluorescence illumination, combined with a 12-
49
50
51 267 bit cooled Hamamatsu ORCA-ER camera; 460-490 nm excitation and 510 nm emission filters
52
53 268 were used for detection of calcein fluorescence. Images were acquired every min for 30 min
54
55 269 after 30 ms of illumination per image using a digital epifluorescence imaging software (Cell M,
56
57
58 270 Olympus, Rungis, France). Fluorescence from each cell in each region of interest ($\approx 80 \mu\text{m}^2$)
59
60 271 was collected and background fluorescence corresponding to a cell-free area was subtracted.

272 Average fluorescence changes per field were calculated. For comparison, fluorescence intensity
1
2 273 minus background fluorescence was normalized to the maximal fluorescence value.

3
4 274

5
6
7 275 ***Ex vivo assessment of mPTP opening in mice treated with C31***

8
9 276

10
11 277 The mice were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (80
12
13
14 278 mg/kg). Different doses of C31 (10, 20, 50 and 150 mg/kg) or vehicle were randomly
15
16 279 administered as a 3-min infusion through the jugular vein. Two min after the end of the infusion,
17
18
19 280 the livers were excised and mitochondria were isolated to measure their capacity to retain
20
21 281 calcium, as a marker of the ability of C31 to inhibit mPTP opening *in vivo*.

22
23
24 282

25
26 283 ***In vivo assessment of the protective effect of SMCypIs in the context of hepatic ischemia-***
27
28
29 284 ***reperfusion***

30
31 285

32
33 286 The mice were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (80
34
35
36 287 mg/kg), intubated and mechanically ventilated. The depth of anesthesia was monitored using
37
38 288 the tail pinching response and the pedal reflex. After section of the liver ligaments, hepatic
39
40
41 289 normothermic ischemia of segments I to V was induced for 60 min by hilum clamping of the
42
43 290 hepatic pedicle. To preclude vascular congestion of the alimentary tract, blood supply by the
44
45
46 291 portal pedicle of segments VI and VII was not interrupted. Reperfusion occurred at removal of
47
48 292 the clamp. One min before reperfusion, C31 or the vehicle was infused through the jugular vein
49
50
51 293 and the infusion was maintained for the first 8 min of reperfusion. After 10 min of reperfusion,
52
53 294 the livers were excised and the mitochondria isolated.

54
55 295

56
57
58 296 ***Statistical analysis***

59
60 297

298 Results are expressed as mean±SEM of at least 5 independent experiments. Statistical
1
2 299 analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Scheffé *post-hoc* test.
3
4 300 Differences were considered significant for $p < 0.05$.

301

302 **Results**

303

304 *SMCypIs bind CypD and inhibit its PPIase activity*

305

306 We recently discovered, by means of fragment-based drug discovery, a new family of
307 small-molecule, nonpeptidic cyclophilin inhibitors (SMCypI)¹⁹. As shown in [Table 1](#) and
308 [Supplementary Figure 1](#), 9 members of the new SMCypI family, including compound C22,
309 compounds C23 to C27 and compounds C29 to C31 (which all resulted from structure-guided
310 chemical optimization of C22), inhibited CypD PPIase activity in an enzyme assay, with IC₅₀
311 values ranging from 0.2 to 16.2 μM. The most potent PPIase inhibitor was C31, with an IC₅₀ of
312 0.2±0.08 μM. Molecular modeling and docking experiments revealed that C31 binds both the
313 catalytic site and gatekeeper pocket of CypD ([Figure 1A](#)).

314

315 *SMCypIs inhibit calcium-induced swelling through the inhibition of CypD PPIase activity in* 316 *isolated mouse liver mitochondria*

317

318 The ability of the 9 SMCypIs to inhibit calcium-induced swelling of energized isolated
319 mouse liver mitochondria was studied. As shown in [Figure 1B](#), 1 μM CsA, used as a positive
320 control of CypD inhibition, fully inhibited mitochondrial swelling. The 9 SMCypIs also
321 inhibited mitochondrial swelling in a concentration-dependent manner. The corresponding
322 IC₅₀s are shown in [Table 1](#). The most effective compound was C31, with an IC₅₀ of 1.4±0.2 μM

323 (Figure 1B). SMCypI inhibition of calcium-induced mitochondrial swelling strongly correlated
1
2 324 with the compounds' CypD PPIase activity ($r=0.8535$; $p < 0.004$; Figure 1C).
3

4 325 Together, these results show that the new family of SMCypIs inhibits calcium-induced
5
6 326 mitochondrial swelling as a result of CypD PPIase activity inhibition by binding to both the
7
8
9 327 PPIase catalytic site and the gatekeeper pocket of CypD. C31, the most potent SMCypI, was
10
11 328 selected for subsequent experiments.
12
13

14 329
15
16 330 ***SMCypI inhibition of mitochondrial swelling is due to the inhibition of mPTP opening***
17
18

19 331
20
21 332 In order to assess whether mitochondrial swelling inhibition by SMCypIs is related to
22
23 333 the inhibition of mPTP opening, swelling was induced by different known mPTP opening
24
25 334 inducers. As shown in Figures 2A and 2B, C31 inhibited mitochondrial swelling induced by
26
27 335 both the pro-oxidant drug *tert*-butyl hydroperoxide and carboxyatractyloside, a ligand of
28
29 336 adenine nucleotide translocase, in energized conditions.
30
31

32
33 337 Because mitochondrial parameters, such as the membrane potential or the ATP/ADP
34
35 338 ratio, can modulate mPTP opening under energized conditions, thereby influencing the
36
37 339 observed effect of the inhibitors, the inhibitory effect of C31 was analyzed under de-energized
38
39 340 conditions, i.e., in the absence of substrate. For this, mitochondria were incubated in the
40
41 341 presence of rotenone and antimycin to fully block the respiratory chain and supplemented with
42
43 342 the calcium ionophore A23187 or the cross-linking thiol agent phenylarsine oxide in the
44
45 343 presence of calcium. In these conditions (Figure 2C and 2D, respectively), mitochondrial
46
47 344 swelling was slower than under energized conditions, but still inhibited by SMCypI C31.
48
49
50

51
52 345 Together, these results indicate that SMCypI compound C31 inhibits mitochondrial
53
54 346 swelling by inhibiting mPTP opening.
55
56
57

58 347
59
60
61
62
63
64
65

348 ***SMCypI compound C31 inhibits mPTP opening in both primary mouse and human***
1
2 349 ***hepatocytes***

3
4 350
5
6
7 351 In order to determine whether C31 inhibits mPTP opening in living liver cells, primary
8
9 352 mouse hepatocytes were loaded with calcein in the presence of CoCl_2 and mPTP opening was
10
11 353 induced by the addition of $1\ \mu\text{M}$ A23187 (Figure 3A). As shown in Figure 3B, CsA inhibited
12
13
14 354 the drop in calcein fluorescence associated with mPTP opening by only $55.4\pm 0.8\%$ at 30 min
15
16 355 at the most effective concentration of $2\ \mu\text{M}$. C31 inhibited the drop in calcein fluorescence in a
17
18
19 356 concentration-dependent manner, a result indicating that C31 inhibits mPTP opening in living
20
21 357 mouse liver cells (Figure 3B). The inhibitory effect of C31 was stronger than that of $2\ \mu\text{M}$ CsA,
22
23
24 358 with full inhibition of mPTP opening obtained with $100\ \mu\text{M}$ of C31.

25
26 359 To assess whether C31 also inhibits mPTP opening in human liver cells, the same set of
27
28
29 360 experiments was performed with primary human hepatocytes (Figure 3C). CsA inhibited mPTP
30
31 361 opening by approximately 50% at the most effective concentration of $0.2\ \mu\text{M}$. C31 inhibited
32
33
34 362 mPTP opening in a concentration-dependent manner in primary human hepatocytes, and full
35
36 363 inhibition was achieved at the concentration of $100\ \mu\text{M}$ (Figure 3C). This confirmed that results
37
38 364 obtained in mouse liver cells are representative of the human liver situation.

39
40
41 365
42
43 366 ***SMCypI compound C31 is more potent than CsA at increasing mitochondrial calcium***
44
45 367 ***retention capacity in isolated mouse mitochondria***

46
47
48 368
49
50 369 The calcium retention capacity of isolated mouse mitochondria (i.e., the maximal
51
52
53 370 calcium load achievable in the presence of a drug before mPTP opens) was measured, as
54
55 371 previously described²². As shown in Figures 4A and 4B, 6 ± 1 additions of $20\ \mu\text{M}$ calcium,
56
57
58 372 corresponding to $109\pm 15\ \text{nmol/mg}$ of mitochondrial proteins, were required to induce mPTP
59
60 373 opening in the absence of CypD inhibitors. CsA at the concentration of $1\ \mu\text{M}$ increased the

374 mitochondrial calcium retention capacity by 3-fold (337 ± 47 nmol/ mg of mitochondrial
1 proteins). C31 at concentrations up to 100 μ M also increased the mitochondrial calcium
2 retention capacity. The maximum effect of C31 was markedly greater than that of CsA
3
4 376 (550 \pm 37nmol/mg of mitochondrial proteins; [Figures 4A](#) and [4B](#)). C31 also more potently
5
6 377 increased mitochondrial calcium retention capacity than CsA when the respiratory chain was
7
8 378 fed with succinate in the presence of rotenone, indicating that this effect is independent from
9
10 379 the activated respiratory complex I or II (data not shown).
11
12
13
14 380

15
16 381 Maximum mitochondrial calcium retention capacities of the same order were achieved
17
18 382 in the presence of 10 μ M of C31 and 1 μ M of CsA, respectively. At these concentrations, that
19
20 383 correspond to approximately 10 times the respective compound IC₅₀ values, CypD saturation
21
22 384 is achieved. The combination of both C31 and CsA at the same concentrations did not result in
23
24 385 any additive effect ([Figure 4B](#)), a result in keeping with them sharing CypD as a target.
25
26
27

28 386 Together, these results indicate that SMCypI compound C31 inhibits mPTP opening at
29
30 387 least partly through CypD inhibition, and that this inhibition is more potent than that achieved
31
32 388 by CsA.
33
34
35

36 389
37
38 390 *The additional effectiveness of C31 as compared to CsA in inhibiting mPTP opening is*
39
40 391 *unrelated to CypD inhibition*
41
42

43 392
44
45 393 The mitochondrial calcium retention capacity in the presence of 100 μ M C31 was not
46
47 394 modified by the addition of 1 μ M CsA ([Figure 4B](#)). This suggests that the greater capacity of
48
49 395 C31 to inhibit mPTP opening as compared to CsA is unrelated to CypD inhibition. To verify
50
51 396 this hypothesis, the effects of C31 and CsA were assessed on liver mitochondria isolated from
52
53 397 *Ppif*^{-/-} mice, which have been knocked-out for CypD, in comparison with wild-type animals.
54
55 398 As previously shown²⁶, the mitochondrial calcium retention capacity of *Ppif*^{-/-} mice was
56
57 399 approximately 4-fold greater than that of wild-type animals ([Figure 5A](#) and [5B](#)). CsA 1 μ M had
58
59
60
61
62
63
64
65

400 no effect on *Ppif*^{-/-} mice mitochondrial calcium retention capacity. In contrast, C31 increased
1
2 401 the calcium retention capacity by approximately 1.5-fold at concentrations >20 μM in
3
4 402 mitochondria isolated from *Ppif*^{-/-} mice livers (Figure 5A and 5B). The C31 concentrations at
5
6
7 403 which this effect was observed were higher than those required to inhibit CypD PPIase activity
8
9 404 and mitochondrial swelling and to enhance calcium retention capacity in wild-type mouse
10
11 405 mitochondria (see Figures 1 and 3 for comparison). In addition, C31 inhibited swelling induced
12
13
14 406 by very high calcium concentrations in mitochondria isolated from *Ppif*^{-/-} mice (Figure 5C).

15
16 407 Together, these results indicate that, in addition to blocking CypD, C31 interacts with
17
18
19 408 another target at the mPTP level and that this interaction increases C31 blocking effectiveness
20
21 409 on mPTP opening as compared to exclusive CypD inhibitors, such as CsA.

22
23
24 410
25
26 411 *The additional effectiveness of C31 as compared to CsA in inhibiting mPTP opening is*
27
28 412 *related to the chemical structure of its phenyl moiety*

29
30
31 413
32
33 414 Comparison of the chemical structures of the SMCypIs (shown in Supplementary Figure
34
35
36 415 1) suggested that the phenyl moiety of C31 could be involved in this additional effect. Indeed,
37
38 416 SMCypI compound C34, that lacks the aromaticity of the cycle, lost the additional effect of
39
40
41 417 C31 over CypD inhibition in isolated *Ppif*^{-/-} mouse liver mitochondria (Figure 5D).

42
43 418
44
45 419 *The additional effectiveness of C31 as compared to CsA in inhibiting mPTP opening is*
46
47
48 420 *unrelated to a ubiquinone-like effect or an interaction with the mitochondrial respiratory*
49
50
51 421 *chain.*

52
53 422
54
55 423 Ubiquinones have been shown to inhibit mPTP opening to a greater extent than CsA²⁷.
56
57
58 424 The proximity between the urea and phenyl motifs of C31 raised the hypothesis that this
59
60 425 compound could share an mPTP target with ubiquinones. As shown in Figure 5E, ubiquinone

426 0 (Ub₀), the most efficient ubiquinone, strongly increased the calcium retention capacity of liver
1
2 427 mitochondria isolated from wild-type mice. However, Ub₀, unlike C31, had no effect on the
3
4 428 calcium retention capacity in liver mitochondria isolated from *Ppif*^{−/−} mice (Figure 5E). This
5
6
7 429 result indicates that the additional, CypD-independent effect of C31 on mPTP opening is not
8
9 430 ubiquinone-like.

10
11 431 We also investigated whether C31 has an effect on respiratory chain functions, because
12
13
14 432 it has been reported that inhibiting complex I with rotenone limits mPTP opening²⁸. C31 did
15
16 433 not alter substrate-dependent respiration rates or ADP-induced O₂ consumption, suggesting no
17
18
19 434 C31-induced alteration of mitochondrial respiration (Supplementary Figure 2). No drop in the
20
21 435 electron transport chain activity, which would be characterized by a lower ΔΨ_m and slower
22
23
24 436 calcium absorption, was detected in our experiments measuring calcium retention capacities.
25
26 437 Thus, the greater potency of C31 as compared to CsA in inhibiting mPTP opening is not related
27
28
29 438 to an interaction with mitochondrial complex I or the respiratory chain.
30

31 439

32 33 440 ***SMCypI compound C31 inhibits mPTP opening in vivo in mice***

34 441

35
36
37
38 442 Anesthetized mice were infused with different doses of C31 for 3 min and sacrificed 2
39
40
41 443 min later. Liver mitochondria were isolated and their calcium retention capacity was measured.
42
43 444 Mitochondria isolated from C31-treated mouse livers exhibited higher calcium retention
44
45
46 445 capacities than those from vehicle-treated mice, and this effect was dose-dependent. The effect
47
48 446 of C31 was more potent than that of CsA (Figure 6A). This result, showing *in vivo* inhibition
49
50
51 447 of mPTP opening by SMCypI compound C31, indicates that C31 reaches its mitochondrial
52
53 448 target after infusion in living mice.
54

55 449

56 57 58 450 ***SMCypI compound C31 bears protective properties during experimental liver ischemia-*** 59 60 451 ***reperfusion in mice***

452

1
2 453 Our last series of experiments aimed at demonstrating the protective effect of SMCypI
3
4 454 compound C31 in an experimental mouse model of hepatic ischemia-reperfusion. Mice were
5
6
7 455 subjected to 60 min of liver ischemia followed by 10 min of reperfusion, as described in the
8
9 456 Methods section. Ischemia-reperfusion reduced the calcium retention capacity of isolated
10
11 457 mouse mitochondria by 59% (96.1 ± 4.5 to 39.0 ± 2.7 nmol/mg of protein; $p < 0.001$). This
12
13
14 458 reduction was associated with an alteration of oxidative phosphorylation, as demonstrated by a
15
16 459 31% decrease of the rate of ADP-stimulated respiration ($p = 0.0016$ vs Sham) and a 52%
17
18
19 460 decrease of the respiratory control ratio ($p = 0.0026$ vs Sham) (Figure 6B). Infusion of the most
20
21 461 effective dose of C31 in the previous experiments (150 mg/kg) 1 min before reperfusion and
22
23
24 462 during the first 8 min of reperfusion restored a normal calcium retention capacity (84.9 ± 8.9
25
26 463 nmol/mg of protein). The protective effect of C31 also translated into a restoration of oxidative
27
28
29 464 phosphorylation parameters (Figure 6B).

30
31 465 Together, these findings indicate that SMCypI compound C31 exerts hepatoprotective
32
33 466 properties in mice exposed to ischemia-reperfusion.

467

468 Discussion

469

470 Hepatic ischemia-reperfusion injury is a major complication of liver surgery with
471 limited therapeutic options. Ischemia-reperfusion injury results in great part from hepatic
472 mitochondrial dysfunction related to abnormal mPTP opening. CypD has been shown to be an
473 important regulatory component of the mPTP complex and to play a key role in its opening in
474 several pathological conditions, including hepatic ischemia-reperfusion^{11, 14}. Indeed, CypD
475 translocation to the inner mitochondrial membrane triggers mPTP opening and promotes cell
476 death, two effects that can be prevented by pharmacological CypD inhibitors or CypD knock-

477 out^{26, 29-31}. Thus, CypD represents an attractive target for inhibition of mPTP opening and
1
2 478 hepatocellular protection in the context of hepatic ischemia-reperfusion injury.
3

4 479 The cyclophilins share a highly conserved double-pocket site, which includes a
5
6 480 hydrophobic pocket bearing the PPIase catalytic activity and a neighboring “gatekeeper
7
8
9 481 pocket”, the function of which remains unknown¹³. All known cyclophilin inhibitors, including
10
11 482 CsA and its analogues and sangliferin A, bind the hydrophobic catalytic pocket and inhibit
12
13
14 483 PPIase activity. In addition, CsA and its analogues prevent CypD binding to the inner
15
16 484 mitochondrial membrane, whereas sangliferin A does not³². Because CsA is a potent
17
18
19 485 immunosuppressor and its non-immunosuppressive analogues suffer from major disadvantages
20
21 486 for subsequent clinical development (including large size, complex industrial production, cell
22
23
24 487 toxicity and potential off-target effects), we decided to generate a new family of small-
25
26 488 molecule, non-peptidic cyclophilin inhibitors unrelated to the existing macromolecular
27
28
29 489 cyclophilin inhibitors and lacking all of their disadvantages.
30

31 490 We used an original approach based on fragment-based drug discovery using X-ray
32
33 491 crystallography and nuclear magnetic resonance to successfully design the new family of
34
35
36 492 SMCypIs, based on the linking of two fragments binding the cyclophilin catalytic and
37
38 493 gatekeeper pockets, respectively¹⁹. Our initial aim was to develop CypA inhibitors with
39
40
41 494 antiviral activity against the hepatitis C virus. We showed that our SMCypIs bind CypA,
42
43 495 potently inhibit CypA PPIase activity in enzyme assays, and also potently inhibit the replication
44
45
46 496 of hepatitis C virus and related viruses in cell culture models^{19, 33}. Because the different
47
48
49 497 cyclophilins are structurally very close (they essentially differ by their cellular localizations and
50
51 498 functions), we tested the ability of the new SMCypIs to inhibit CypD activity. As shown in the
52
53 499 present study, this inhibitory activity was potent and concentration-dependent; SMCypI
54
55 500 compound C31 was the most potent inhibitor in our models. We also showed that C31 binds
56
57
58 501 both the catalytic and gatekeeper pockets of Cyp D ([Figure 1](#)). Thus, our SMCypIs had the
59
60
61
62
63
64
65

502 potential to inhibit mPTP opening through CypD inhibition, and this was explored in the present
1
2 503 study.

3
4 504 The SMCypIs indeed inhibited mPTP opening and its mitochondrial consequences in a
5
6
7 505 concentration-dependent manner, as a result of CypD inhibition. This effect correlated with the
8
9 506 ability of the inhibitors to block PPIase activity. Inhibition of mPTP opening was observed in
10
11 507 different models and conditions, including energized and de-energized ones. This suggests that
12
13
14 508 the SMCypIs act directly on CypD and mPTP opening, downstream of the site of action of the
15
16 509 inducers used in the experiments. Importantly, this effect was observed in both human and
17
18
19 510 mouse primary hepatocytes, a result validating the human relevance of our findings.

20
21 511 Although the CypD affinity of the SMCypIs was lower than that of CsA, thereby
22
23
24 512 requiring higher concentrations of the former compounds to fully inhibit swelling, C31 was
25
26 513 found to be more potent than CsA in inhibiting mPTP opening. The effect of C31 increased in
27
28
29 514 a concentration-dependent manner, up to its maximum soluble concentration in the medium.
30
31 515 Importantly, several of our findings suggested that the additional effect of C31 on mPTP
32
33
34 516 opening as compared to CsA was independent from CypD inhibition: first, the concentrations
35
36 517 of CsA and C31 that fully inhibited CypD PPIase activity retained the same amount of calcium
37
38
39 518 in mitochondria; secondly, CsA did not alter the maximal calcium retention capacity induced
40
41 519 by C31; thirdly, C31 had an effect on calcium accumulation in liver mitochondria isolated from
42
43 520 *Ppi1^{-/-}* mice that do not express CypD. Because the structure of mPTP remains largely unknown,
44
45
46 521 we could not identify the second target of C31 responsible for its greater potency as compared
47
48 522 to CsA. We could however rule out an alteration of mitochondrial respiration²⁸ or a ubiquinone-
49
50
51 523 like mechanism²⁷. Altogether, SMCypI C31 appears to be particularly promising as an mPTP
52
53 524 opening blocking agent, because its effect on mPTP opening related to CypD PPIase activity
54
55 525 inhibition is enhanced by another complementary mechanism.

56
57
58 526 Key results in this study were obtained *in vivo* in murine models. Indeed, we showed
59
60 527 that C31 rapidly reaches its target after systemic administration. This is particularly important
61
62
63
64
65

528 in the context of ischemia-reperfusion, because mPTP was reported to open within the first
1
2 529 minutes of reperfusion after ischemia^{8, 34}. For this reason, proof-of-concept efficacy
3
4 530 experiments were performed *in vivo* in a murine model of ischemia-reperfusion. The
5
6
7 531 administration of C31 at reperfusion restored the mitochondrial function, proving the
8
9 532 hepatoprotective properties of the new SMCypI C31, as a result of mPTP opening inhibition.

11 533 In summary, we showed that our new, original family of small-molecule, non-peptidic
12
13
14 534 cyclophilin inhibitors binds CypD and inhibits its PPIase activity, and that this effect is, at least
15
16 535 in part, responsible for their concentration-dependent inhibitory effect on calcium-induced
17
18
19 536 swelling due to mPTP opening in both human and mouse hepatocytes. We also showed that the
20
21 537 most potent SMCypI, compound C31, exerts an additional effect on mPTP opening,
22
23
24 538 independent of its inhibitory effect on CypD, making it a promising pharmacological agent for
25
26 539 hepatocellular protection in the context of diseases involving mitochondrial dysfunction related
27
28
29 540 to abnormal mPTP opening. Finally, our study is the first to provide the *in vivo* proof-of-concept
30
31 541 of hepatic protection by SMCypI compound C31 in an experimental model of ischemia-
32
33
34 542 reperfusion injury.

36 543 Together, these results indicate that the new family of SMCypIs provides promising
37
38 544 candidates for new drug development in the indication of hepatic protection in the context of
39
40
41 545 warm ischemia-reperfusion after liver surgery. Whether similar protection can be obtained in
42
43 546 the context of cold ischemia-reperfusion related to orthotopic liver transplantation remains to
44
45
46 547 be assessed. Other applications in liver and non-hepatic diseases related to mPTP opening
47
48 548 involving CypD deserve to be explored. They include chronic alcohol consumption, which
49
50
51 549 enhances sensitivity to calcium-mediated mPTP opening and increases CypD expression³⁵,
52
53 550 drug-induced liver injury, myocardial ischemia-reperfusion, brain injury and neurodegenerative
54
55 551 disorders.

58 552

553 **References**

- 1
2 554
3
4 555 1. Konishi T, Lentsch AB. Hepatic ischemia/reperfusion: mechanisms of tissue injury, repair, and
5
6 556 regeneration. *Gene Expr* 2017;17:277-287.
- 7
8 557 2. Cannistra M, Ruggiero M, Zullo A, et al. Hepatic ischemia reperfusion injury: a systematic
9
10 558 review of literature and the role of current drugs and biomarkers. *Int J Surg* 2016;33 (Suppl.
11
12 559 1):S57-70.
- 13
14 560 3. Go KL, Lee S, Zendejas I, et al. Mitochondrial dysfunction and autophagy in hepatic
15
16 561 ischemia/reperfusion injury. *Biomed Res Int* 2015;2015:183469.
- 17
18 562 4. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol*
19
20 563 2009;46:821-31.
- 21
22 564 5. Friberg H, Wieloch T. Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration.
23
24 565 *Biochimie* 2002;84:241-50.
- 25
26 566 6. Kim JS, He L, Qian T, et al. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and
27
28 567 necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med* 2003;3:527-35.
- 29
30 568 7. Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage
31
32 569 injury. *J Investig Med* 2004;52:299-309.
- 33
34 570 8. Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and
35
36 571 cardioprotection. *Biochem Soc Trans* 2010;38:841-60.
- 37
38 572 9. Rao VK, Carlson EA, Yan SS. Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug
39
40 573 target for neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:1267-72.
- 41
42 574 10. Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death
43
44 575 mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity.
45
46 576 *Drug Metab Rev* 2012;44:88-106.
- 47
48 577 11. Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, et al. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the
49
50 578 permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:5887-92.
- 51
52 579 12. Wang P, Heitman J. The cyclophilins. *Genome Biol* 2005;6:226.
- 53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 580 13. Davis TL, Walker JR, Campagna-Slater V, et al. Structural and biochemical characterization of
1 581 the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biol* 2010;8:e1000439.
2
3
4 582 14. Javadov S, Kuznetsov A. Mitochondrial permeability transition and cell death: the role of
5
6 583 cyclophilin D. *Front Physiol* 2013;4:76.
7
8 584 15. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced
9
10 585 damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:1461-9.
11
12 586 16. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*
13
14 587 2000;47:119-25.
15
16
17 588 17. Azzolin L, Antolini N, Calderan A, et al. Antamanide, a derivative of *Amanita phalloides*, is a
18
19 589 novel inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *PLoS One* 2011;6:e16280.
20
21 590 18. Piot C, Croisille P, Staat P, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute
22
23 591 myocardial infarction. *N Engl J Med* 2008;359:473-81.
24
25 592 19. Ahmed-Belkacem A, Colliandre L, Ahnou N, et al. Fragment-based discovery of a new family
26
27 593 of non-peptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with potent antiviral activities. *Nat*
28
29 594 *Commun* 2016;7:12777.
30
31 595 20. Pons JL, Labesse G. @TOME-2: a new pipeline for comparative modeling of protein-ligand
32
33 596 complexes. *Nucleic Acids Res* 2009;37:W485-91.
34
35 597 21. Miteva MA, Guyon F, Tuffery P. Frog2: Efficient 3D conformation ensemble generator for
36
37 598 small compounds. *Nucleic Acids Res* 2010;38:W622-7.
38
39 599 22. Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, et al. Regulation of the permeability transition pore in skeletal
40
41 600 muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. *J*
42
43 601 *Biol Chem* 1998;273:12662-8.
44
45 602 23. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976;13:29-83.
46
47 603 24. Petronilli V, Miotto G, Canton M, et al. Transient and long-lasting openings of the
48
49 604 mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes
50
51 605 in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J* 1999;76:725-34.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 606 25. Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, et al. The mitochondrial permeability transition, release of
1 607 cytochrome C and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem*
2
3 608 2001;276:12030-4.
4
5
6 609 26. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for
7
8 610 mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005;434:658-62.
9
10 611 27. Walter L, Miyoshi H, Leverve X, et al. Regulation of the mitochondrial permeability transition
11
12 612 pore by ubiquinone analogs. A progress report. *Free Radic Res* 2002;36:405-12.
13
14
15 613 28. Li B, Chauvin C, De Paulis D, et al. Inhibition of complex I regulates the mitochondrial
16
17 614 permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D.
18
19 615 *Biochim Biophys Acta* 2012;1817:1628-34.
20
21 616 29. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial
22
23 617 permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*
24
25 618 2005;434:652-8.
26
27
28 619 30. Hansson MJ, Mattiasson G, Mansson R, et al. The nonimmunosuppressive cyclosporin analogs
29
30 620 NIM811 and UNIL025 display nanomolar potencies on permeability transition in brain-derived
31
32 621 mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2004;36:407-13.
33
34
35 622 31. Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, et al. Inhibition of the mitochondrial permeability
36
37 623 transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. *Mol Pharmacol*
38
39 624 2002;62:22-9.
40
41
42 625 32. Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the
43
44 626 mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to
45
46 627 cyclophilin D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* 2002;277:34793-9.
47
48 628 33. Nevers Q, Ruiz I, Ahnou N, et al. Characterization of the anti-hepatitis C virus activity of new
49
50 629 nonpeptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with the potential for broad anti-Flaviviridae
51
52 630 activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; epub ahead of print.
53
54
55 631 34. Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, et al. The contemporary role of antioxidant therapy in
56
57 632 attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver Transpl* 2005;11:1031-47.
58
59
60
61
62
63
64
65

- 633 35. King AL, Swain TM, Dickinson DA, et al. Chronic ethanol consumption enhances sensitivity
1 634 to Ca(2+)-mediated opening of the mitochondrial permeability transition pore and increases
2
3
4 635 cyclophilin D in liver. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2010;299:G954-66.
5

6 636

7
8 637
9

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

638 **Figure legends**

1
2 639
3
4 640 **Figure 1. (A)** Molecular modeling and docking of SMCypI compound C31 bound to the
5
6 641 catalytic site (left) and gatekeeper pocket (right) of CypD. **(B)** Concentration-dependent
7
8 642 inhibitory effect of SMCypI C31 on isolated mouse liver mitochondrial swelling. Swelling was
9
10 643 induced by 50 μM calcium in the absence of inhibitors, in the presence of 1 μM CsA (positive
11
12 644 control of inhibition) or in the presence of increasing (0.1 to 10 μM) concentrations of C31. No
13
14 645 calcium was added in the negative control. The x axis indicates times of measurement; the y
15
16 646 axis shows dynamic changes in absorbance at 540 nm (A_{540}) reflecting changes in
17
18 647 mitochondrial swelling. **(C)** Relationship between SMCypI inhibitions of CypD PPIase activity
19
20 648 in an enzyme assay and of isolated mouse liver mitochondrial swelling.
21
22
23
24
25

26 649
27
28
29 650 **Figure 2.** Inhibitory effect of SMCypI C31 on mitochondrial swelling triggered by mPTP
30
31 651 opening inducers in isolated mouse mitochondria. The x axis indicates times of measurement;
32
33 652 the y axis shows dynamic changes in absorbance at 540 nm (A_{540}) reflecting changes in
34
35 653 mitochondrial swelling. **(A)** mPTP opening induced by 40 μM *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BH)
36
37 654 in energized mitochondria. **(B)** mPTP opening induced by 100 μM carboxyatractyloside (CAT)
38
39 655 in energized mitochondria. **(C)** mPTP opening induced by 1 μM A23187 (A23) in non-
40
41 656 energized mitochondria. **(D)** mPTP opening induced by 10 μM phenylarsine oxide (PAO) in
42
43 657 non-energized mitochondria.
44
45
46
47

48 658
49
50
51 659 **Figure 3.** Inhibition of mPTP opening by CsA and SMCypI compound C31 in primary mouse
52
53 660 and human hepatocytes. **(A)** Experimental procedure: hepatocytes were loaded with calcein and
54
55 661 CoCl_2 and mPTP opening was induced by the addition of 1 μM of the calcium ionophore
56
57 662 A23187 (A23), in the absence (control) or in the presence of CsA or of increasing
58
59 663 concentrations of C31. Images were collected at 1-min intervals. The fluorescence was
60
61
62
63
64
65

664 normalized to 100% of the maximal value. The results of 4 to 7 experiments were averaged.

1
2 665 **(B)** Inhibition of mPTP opening by CsA and SMCypI compound C31 in primary mouse

3
4 666 hepatocytes. Left curves: kinetics of calcein fluorescence over time; right bar graph: calcein

5
6
7 667 fluorescence measured at 30 min ($\#p < 0.05$ vs A23 alone; $*p < 0.05$ vs control; $\dagger p < 0.05$ vs CsA)

8
9 668 **(C)** Inhibition of mPTP opening by CsA and SMCypI compound C31 in primary human

10
11 669 hepatocytes. Left curves: kinetics of calcein fluorescence over time; right bar graph: calcein

12
13
14 670 fluorescence measured at 30 min ($\#p < 0.05$ vs A23 alone; $*p < 0.05$ vs control; $\dagger p < 0.05$ vs

15
16 671 CsA).

17
18
19 672

20
21 673 **Figure 4.** Calcium retention capacity of isolated mouse liver mitochondria in the presence of

22
23 674 SMCypI compound C31 and of CsA. **(A)** Representative experiment showing mitochondrial

24
25
26 675 calcium retention capacity in the presence of 1 μ M CsA or increasing concentrations of C31.

27
28 676 Each fluorescence peak corresponds to the addition of 20 μ M calcium. **(B)** Average calcium

29
30 677 concentrations required for mPTP opening, expressed as a percentage of the control value

31
32
33 678 (100% represents 109 ± 15 μ M, as indicated by the dashed line). $*p < 0.05$ vs value observed with

34
35
36 679 0.1 μ M C31; $\dagger p < 0.05$ vs 1 μ M CsA. CsA: cyclosporine A; AU: arbitrary unit; CRC: calcium

37
38 680 retention capacity.

39
40
41 681

42
43 682 **Figure 5.** Investigation of the mechanisms underlying the more potent effect of SMCypI

44
45 683 compound C31 on mitochondrial calcium retention capacity, as compared to CsA. **(A)**

46
47 684 Mean \pm SEM calcium retention capacity of isolated liver mitochondria from *Ppif*^{-/-} (CypD

48
49
50 685 knocked-out) and wild-type mice. CRC: calcium retention capacity; WT: wild-type; $\#p < 0.05$

51
52
53 686 vs wild-type control; $*p < 0.05$ vs *Ppif*^{-/-} and wild-type controls, respectively; $\dagger p < 0.05$ vs CsA.

54
55 687 **(B)** Representative experiment showing the calcium concentrations required for mPTP opening

56
57
58 688 in liver mitochondria isolated from *Ppif*^{-/-} mice in the absence of compounds (control) or in the

59
60 689 presence of 1 μ M CsA or 100 μ M C31. Each fluorescence peak corresponds to the addition of

690 20 μ M calcium. AU: arbitrary units. (C) Concentration-dependent C31 inhibition of
 691 mitochondrial swelling induced by 500 μ M calcium in liver mitochondria isolated from *Ppif*^{-/-}
 692 mice. A_{540} : absorbance at 540 nm. (D) Effect of 100 μ M C31 and C34 (a C31 derivative lacking
 693 the aromaticity of its phenyl moiety) on mitochondrial calcium retention capacity in isolated liver
 694 mitochondria from *Ppif*^{-/-} mice. Each fluorescence peak corresponds to the addition of 20 μ M
 695 calcium. AU: arbitrary units. (E) Effect of 50 μ M C31 and 50 μ M ubiquinone 0 on mPTP
 696 opening in liver mitochondria isolated from wild-type and *Ppif*^{-/-} mice. Each fluorescence peak
 697 corresponds to the addition of 20 μ M calcium. WT: wild-type; Ub₀: ubiquinone 0; AU: arbitrary
 698 units.

699
 700 **Figure 6.** *In vivo* effect of C31 on mPTP opening and mitochondrial alterations related to liver
 701 ischemia-reperfusion. (A) Anesthetized mice were infused with vehicle (VEH), CsA or
 702 different doses of C31 for 3 min and were sacrificed 2 min later. Liver mitochondria were
 703 isolated and the calcium retention capacities of these mitochondria are shown. * p <0.05 vs
 704 VEH; # p <0.05 vs CsA. (B) The mice were subjected to 60 min of a 70% partial liver ischemia,
 705 followed by 10 min of reperfusion, and received either 150 mg/kg C31 or vehicle (VEH). At
 706 the end of the reperfusion period, mouse livers were excised and mitochondria were isolated to
 707 assess the calcium retention capacity (left) and mitochondrial respiration parameters (right), i.e
 708 the ADP-stimulated respiration rate (state 3), the substrate-dependent respiration rate (state 4)
 709 and the respiratory control ratio (RCR: state 3/state 4). * p <0.05 vs sham.

710

711 **Table 1:** Inhibitory activity of SMCypIs as measured by their IC₅₀ values on CypD PPIase

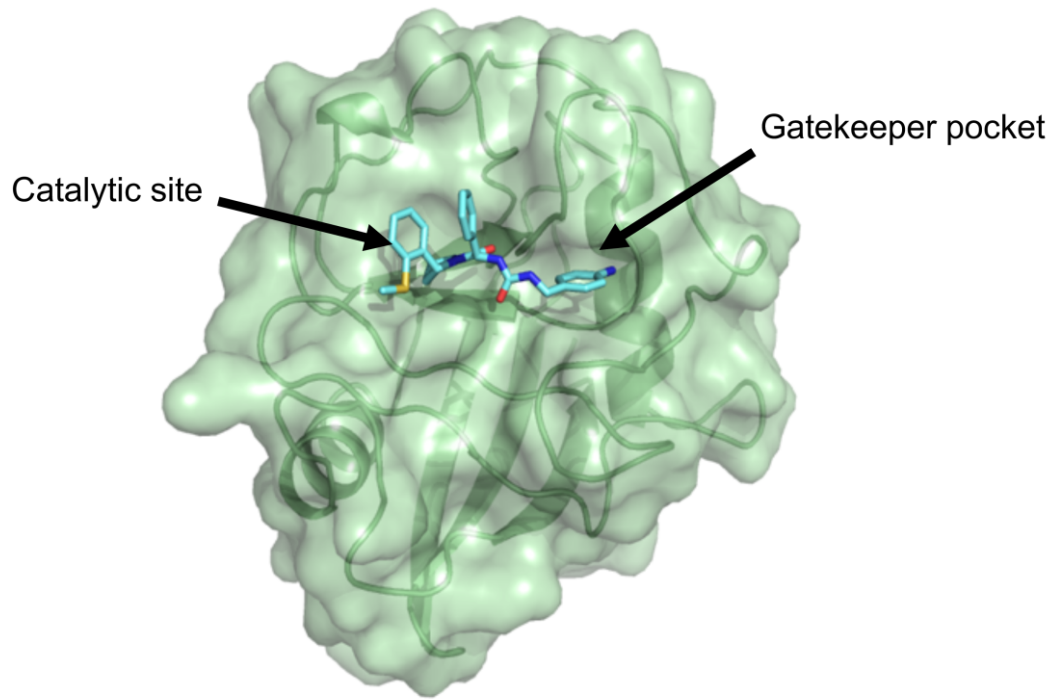
712 activity and mitochondrial swelling. CsA: cyclosporine A.

713

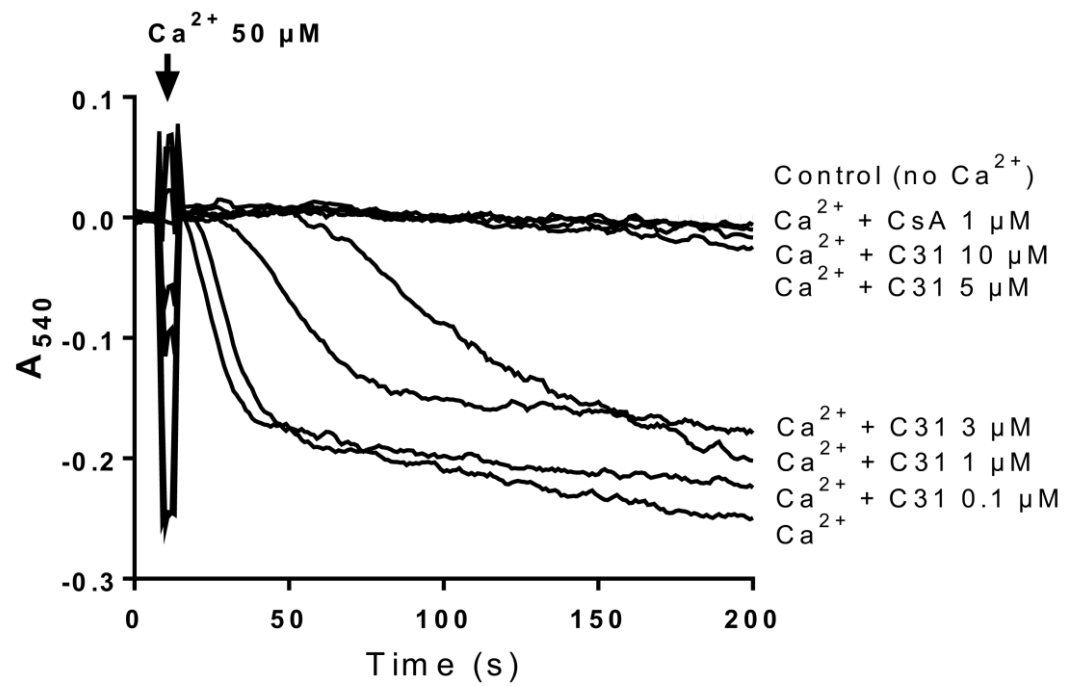
Compound	CypD PPIase activity IC ₅₀ (μM)	Mitochondrial swelling IC ₅₀ (μM)
C22	16.2±3.7	132.0±28.0
C23	12.0±1.2	83.4±47.3
C24	11.4±3.0	33.6±6.0
C25	6.2±2.2	42.0±2.0
C26	1.1±0.2	3.3±0.9
C27	0.6±0.07	2.3±0.4
C29	0.7±0.2	2.9±0.2
C30	3.0±0.7	3.0±0.06
C31	0.2±0.08	1.4±0.2
CsA	0.02±0.01	0.05±0.01

Fig. 1

A



B



C

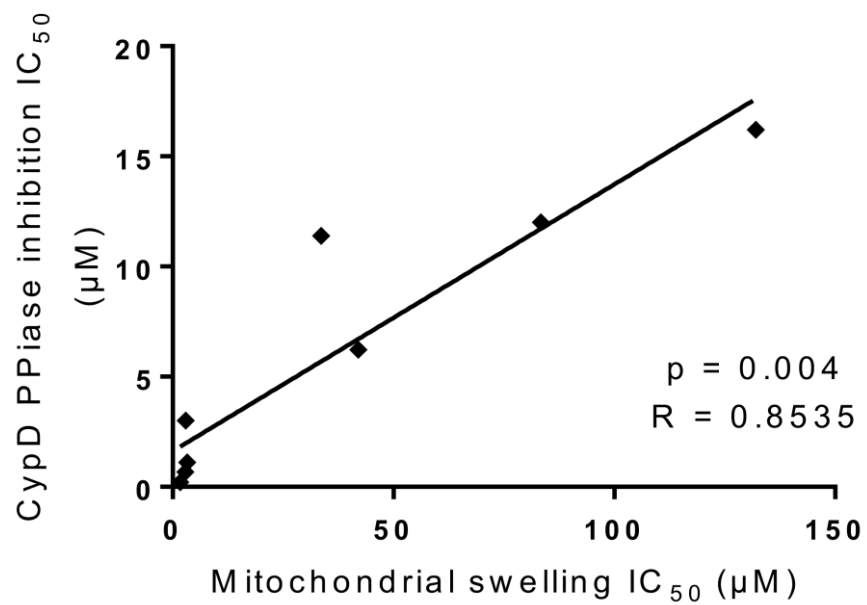


Fig. 2

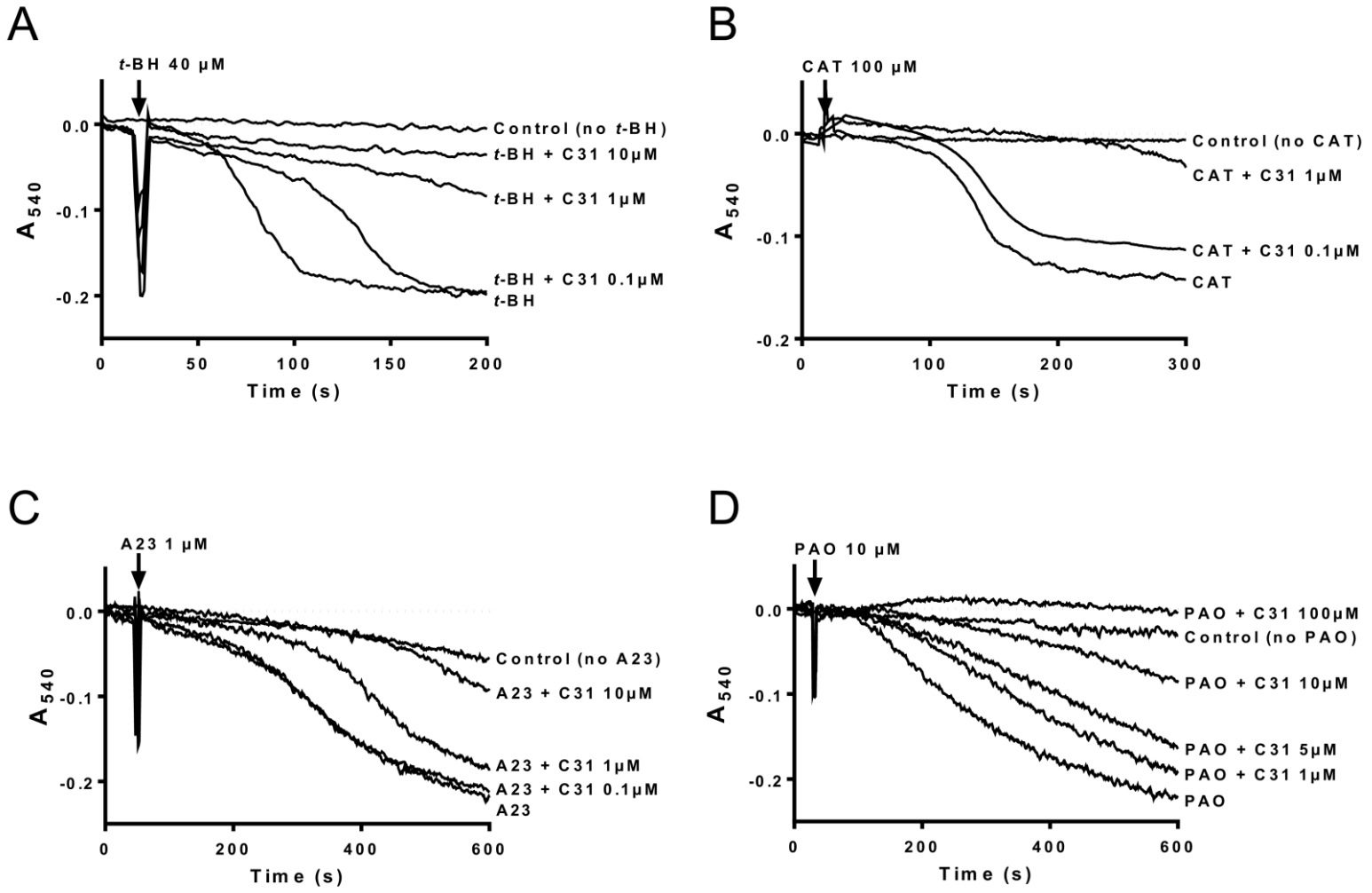
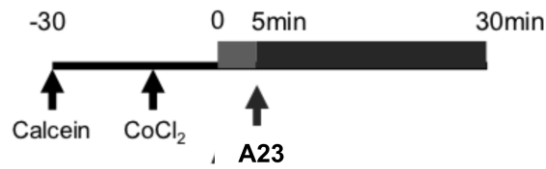


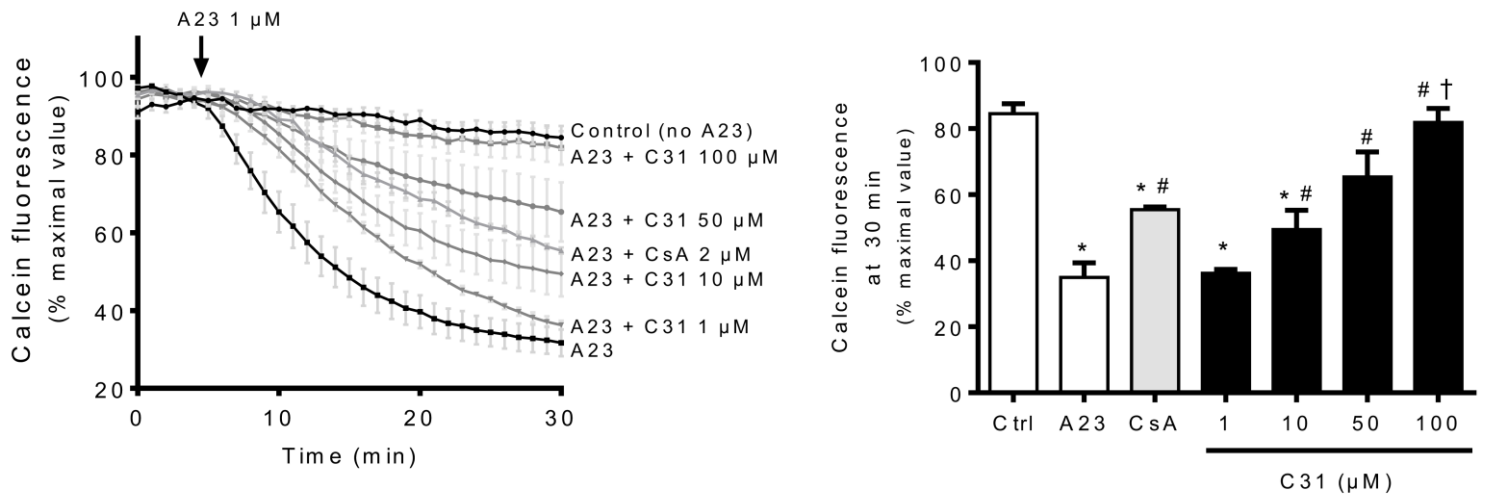
Fig. 3

A



B

Primary mouse hepatocytes



C

Primary human hepatocytes

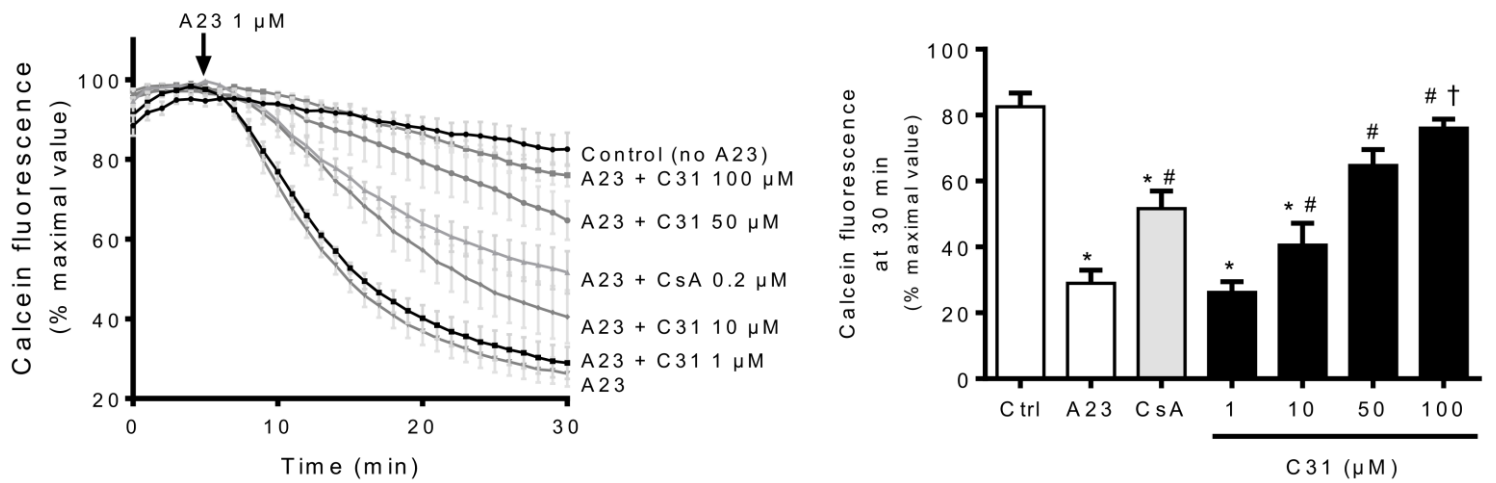


Fig. 4

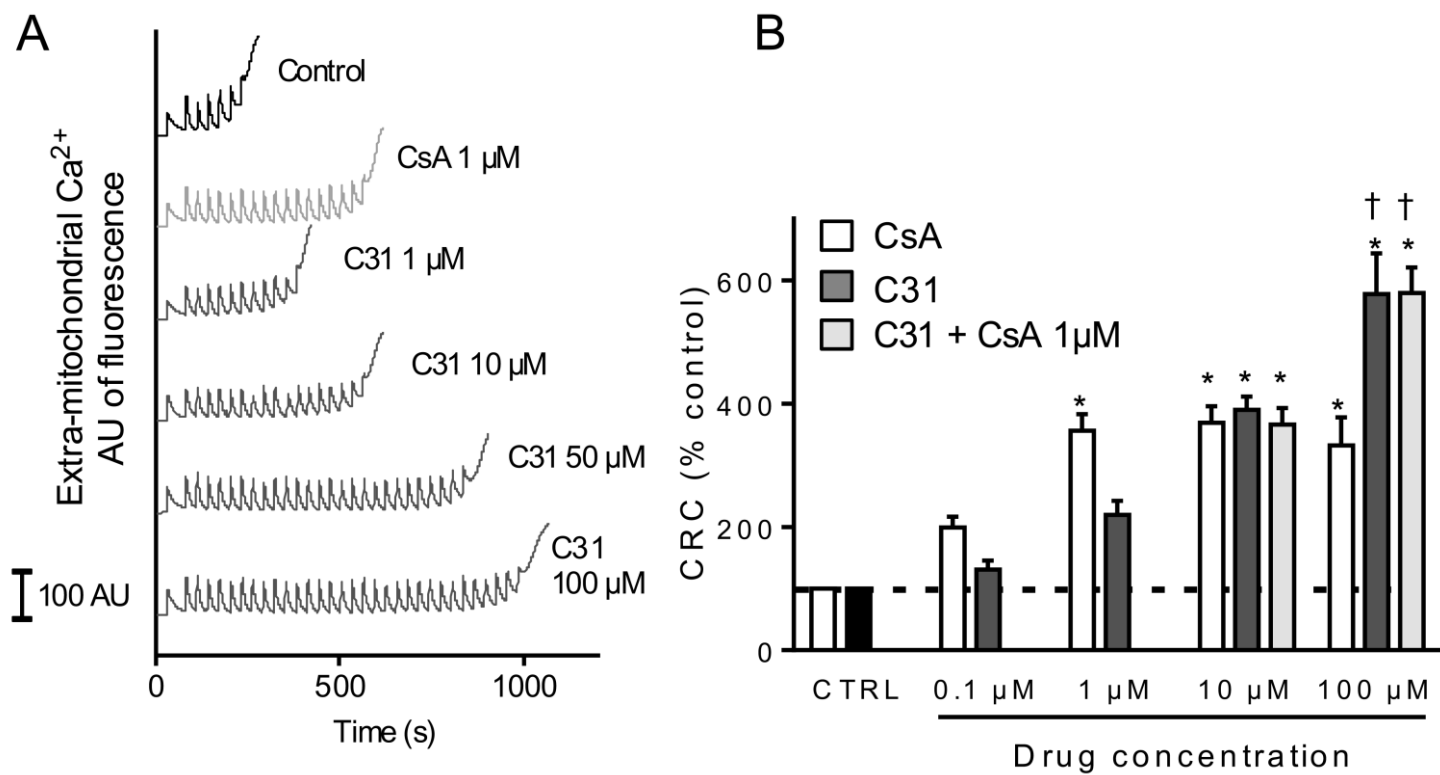
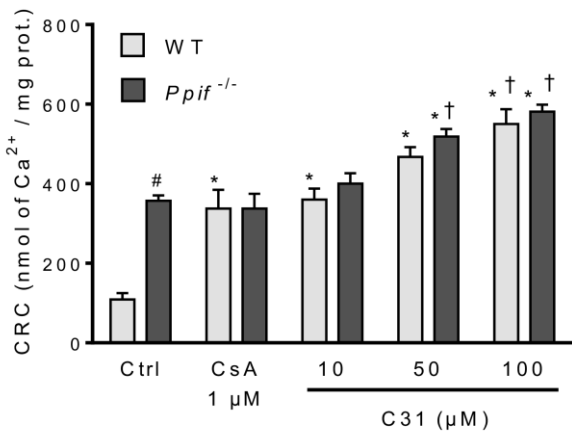
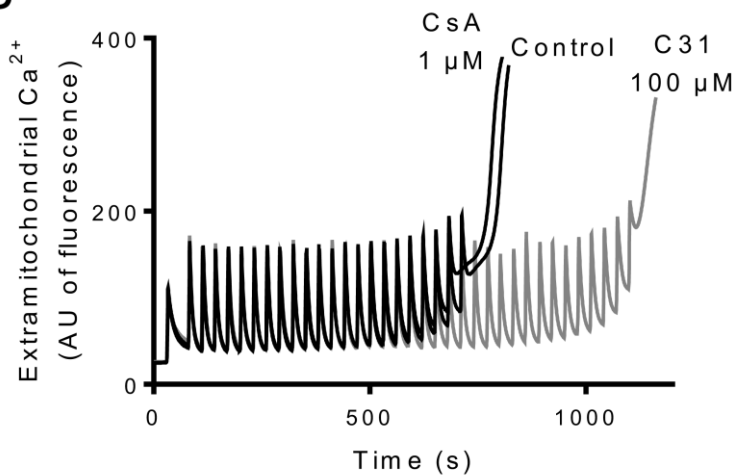


Fig. 5

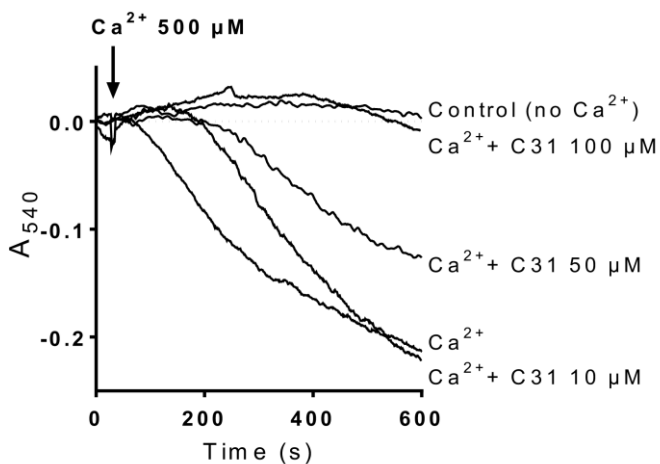
A



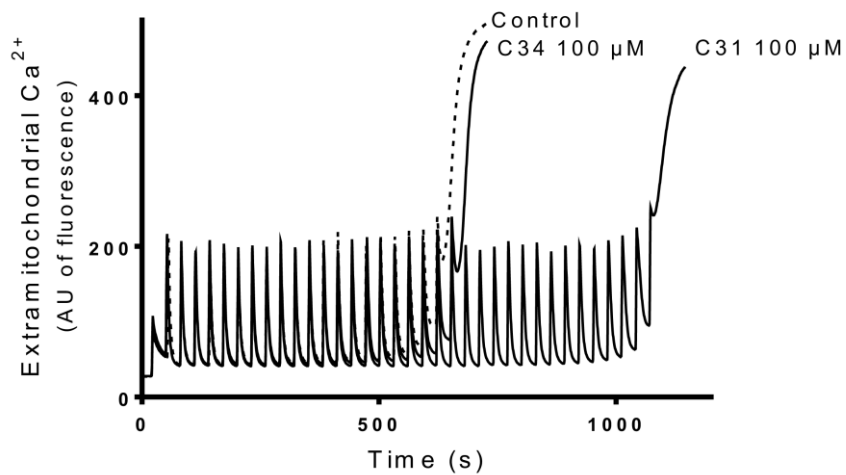
B



C

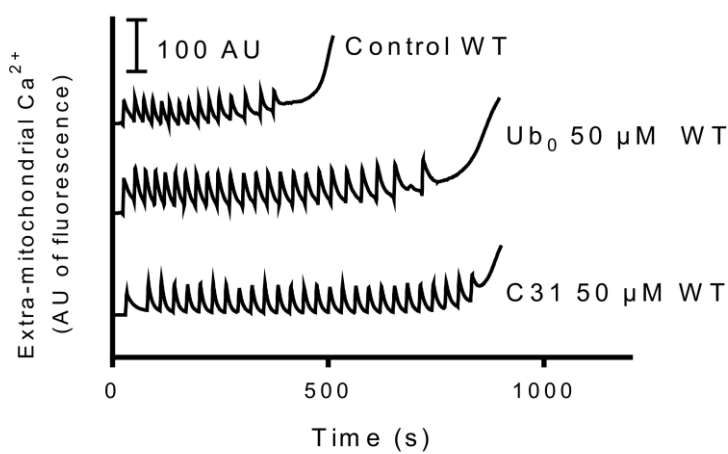


D



E

Wild-type mice



Ppif^{-/-} mice

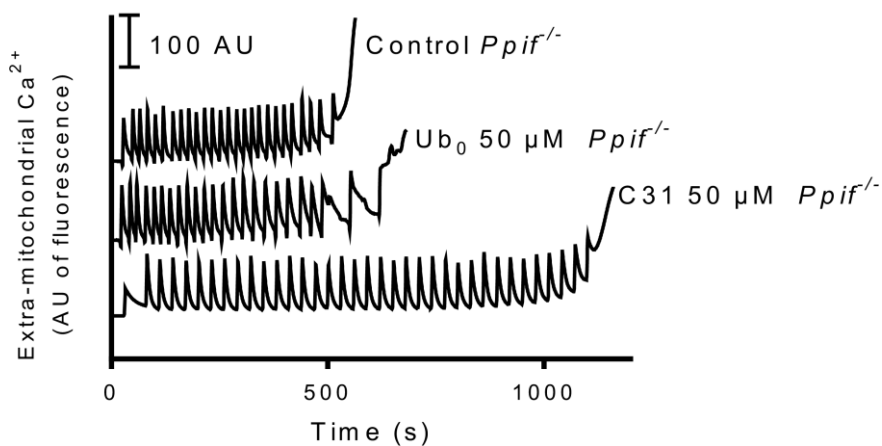
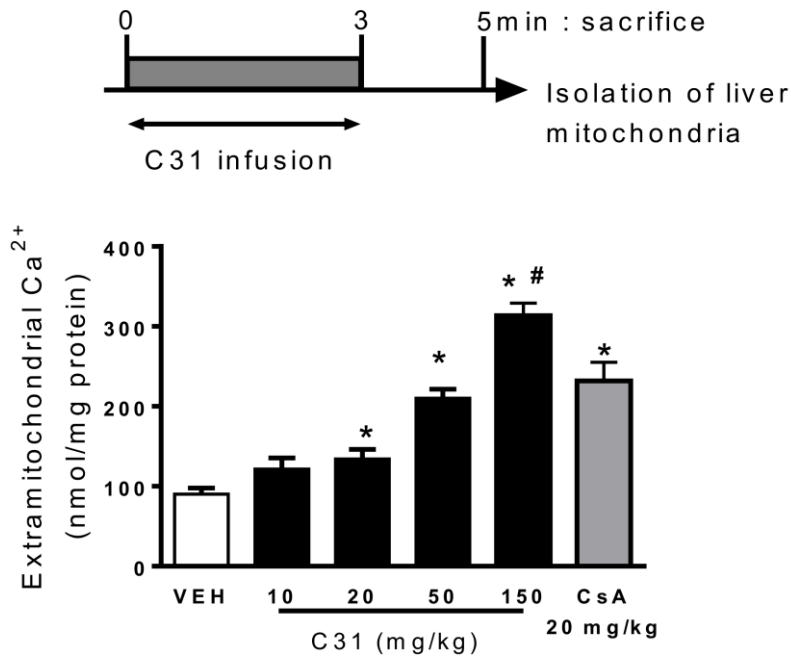
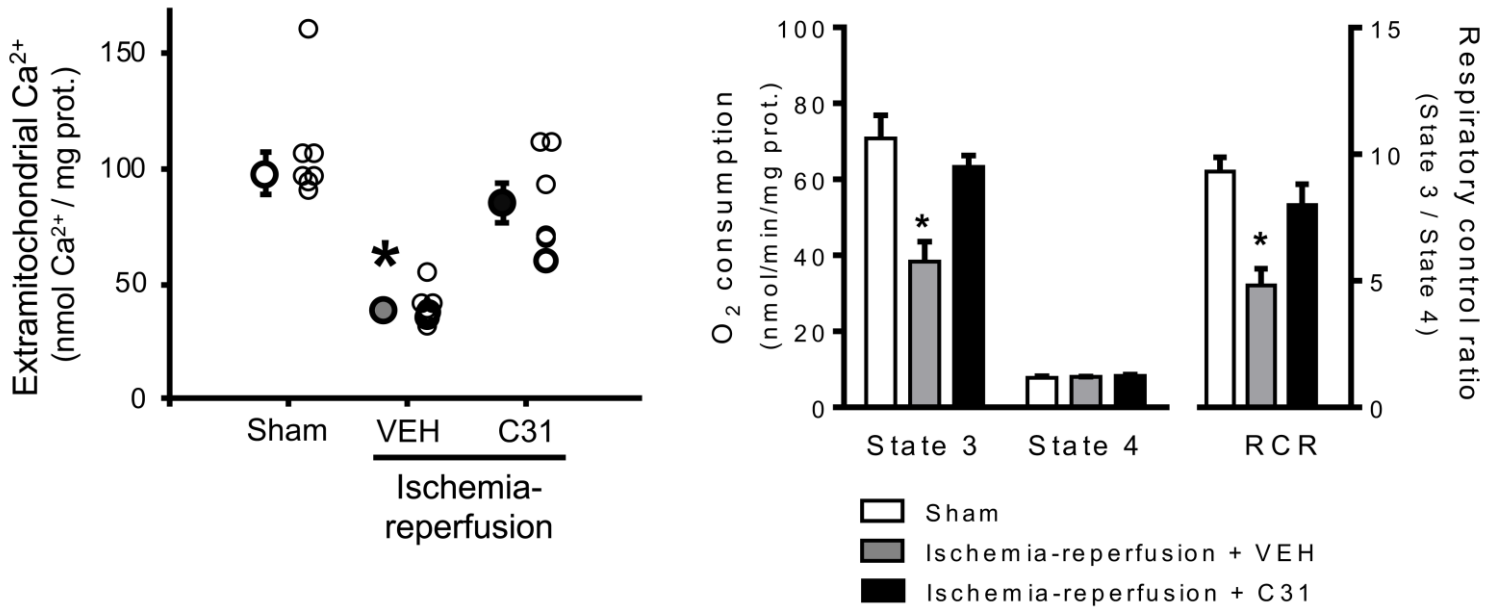
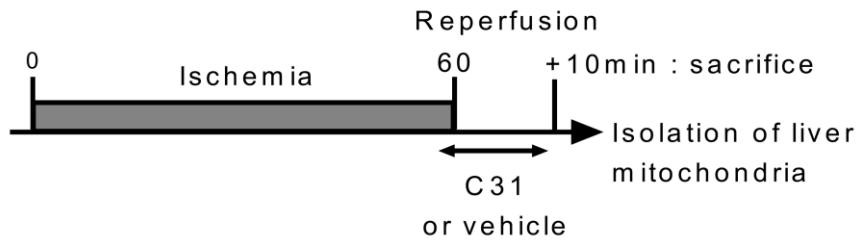


Fig. 6

A

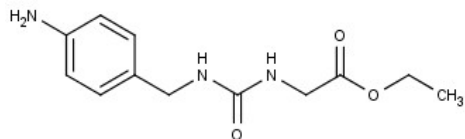


B

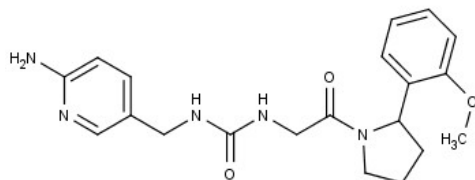


Supplementary Figure 1. Chemical structures of the SMCypls and CsA

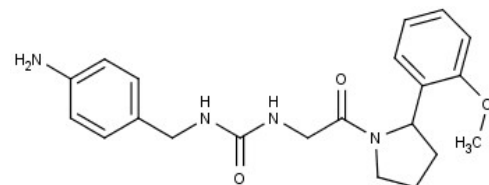
C22



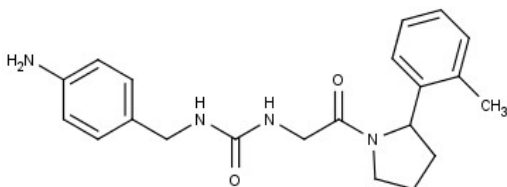
C23



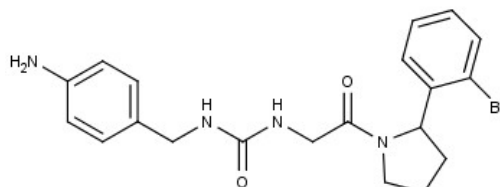
C24



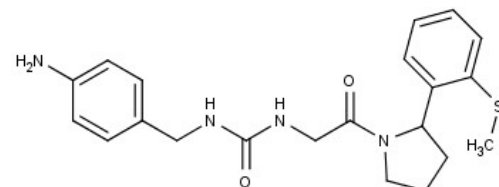
C25



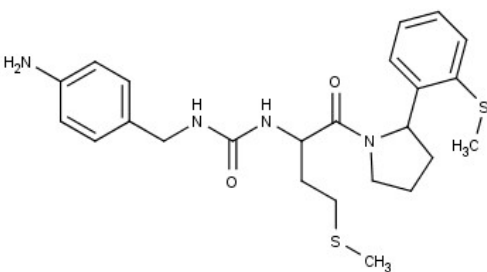
C26



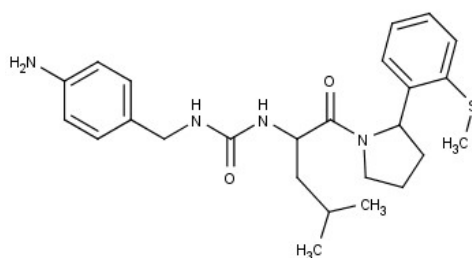
C27



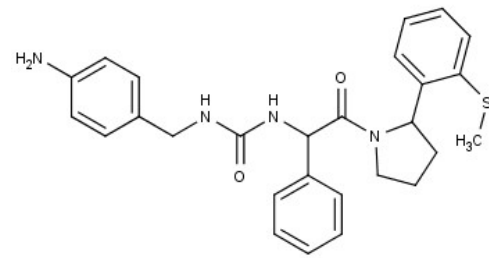
C29



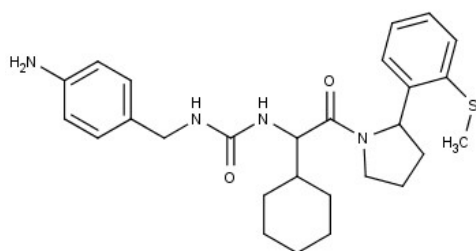
C30



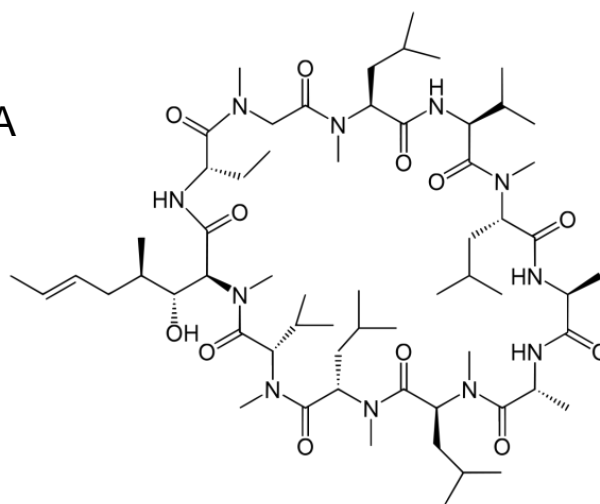
C31



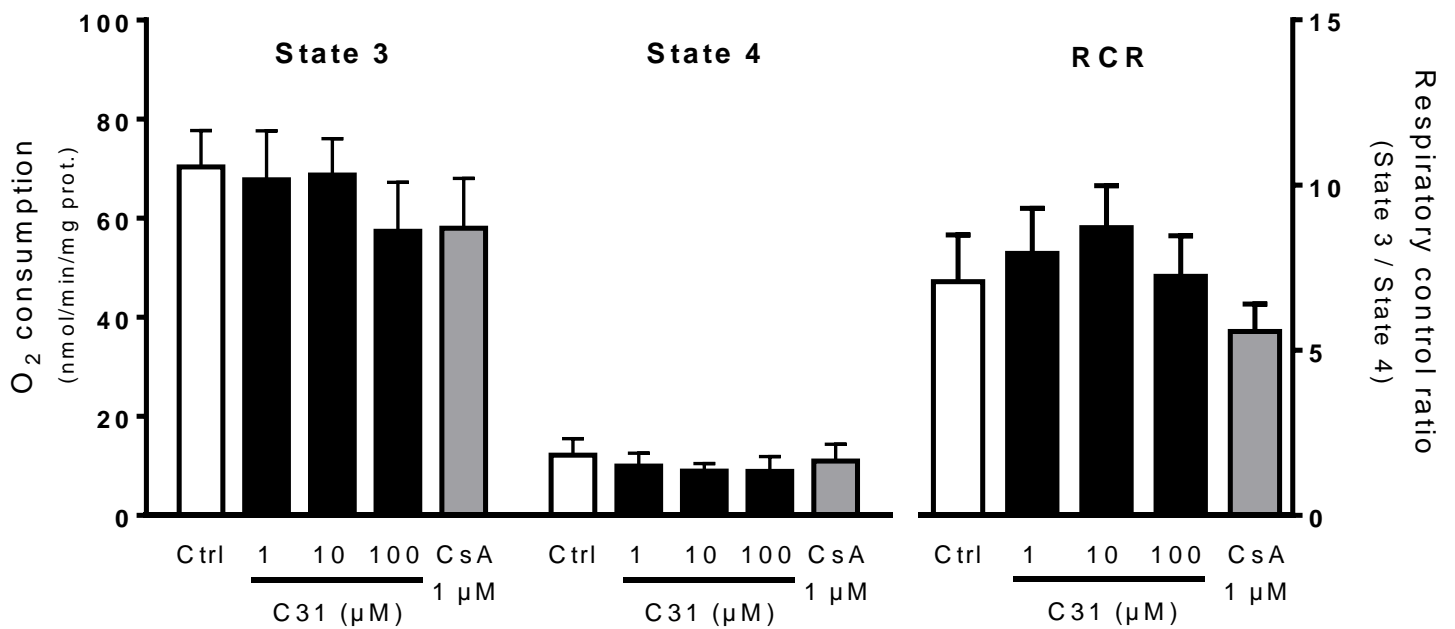
C34



CsA



Supplementary Figure 2. Effect of increasing concentrations of C31 and CsA on mitochondrial respiration. Isolated liver mitochondria were energized with glutamate/malate (5 mM each), then 1 mM ADP was added. Substrate (state 4) and ADP-stimulated respiration (state 3) were measured and the respiratory control ratio (state3/state 4) was calculated.



Résultats 2 : Les ionophores calciques ne sont pas utilisables pour étudier l'ouverture du mPTP dans des cardiomyocytes adultes isolés murins.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Scientific Reports* en 2017 sous la référence :

Panel M, Ghaleh B, Morin D. Ca(2+) ionophores are not suitable for inducing mPTP opening in murine isolated adult cardiac myocytes. *Sci Rep.* **2017** Jun27;7(1):4283. doi: 10.1038/s41598-017-04618-4. PubMed PMID: 28655872; PubMedCentral PMCID: PMC5487341.

1. Objectif de l'étude

L'ouverture du mPTP joue un rôle important dans la mort cellulaire au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion cardiaque. La CypD est un acteur majeur de cette ouverture et son inhibition réduit les lésions de reperfusion dans des modèles précliniques. Les stratégies pharmacologiques visant à inhiber la CypD constituent donc un enjeu majeur. Les cardiomyocytes adultes isolés sont un modèle cellulaire plus représentatif que les lignées cellulaires cultivées et constituent donc un support de choix pour étudier des molécules à visée cardioprotectrice.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'employabilité de plusieurs ionophores calciques afin de mettre au point un modèle simple d'ouverture du mPTP dans des cardiomyocytes adultes isolés murins. Nous avons utilisé deux ionophores couramment employés dans la littérature, l'A23187 et la ionomycine ainsi qu'un ionophore peu décrit et de mécanisme d'action différent, l'ETH129.

2. Protocoles expérimentaux

Pour cette étude, nous avons utilisé des cardiomyocytes adultes isolés de souris sauvages et de souris délétées pour la CypD ainsi que des cardiomyocytes isolés de rat. Ces cardiomyocytes ont été marqués avec différentes sondes fluorescentes permettant d'évaluer :

- L'ouverture du mPTP (association calcéine/CoCl₂)
- Le potentiel de membrane mitochondrial (TMRM)
- Le calcium intramitochondrial (Rhod-2)
- La mort cellulaire (PI)

L'effet des ionophores calciques A23187, ionomycine et ETH129 a été étudié sur ces paramètres en suivant l'évolution de la fluorescence à l'aide d'un microscope à fluorescence inverse.

Nous avons également étudié l'effet de chaque ionophore sur le gonflement des mitochondries cardiaques isolées ainsi que sur le potentiel de membrane mitochondrial dans le cas de l'ETH129.

Enfin, nous avons évalué l'ouverture du mPTP dans un modèle d'hypoxie-réoxygénation, plus long mais plus complet car il mime les phénomènes d'ischémie-reperfusion.

3. Résultats

3.1. Effets des ionophores électroneutres : A23187 et ionomycine

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de l'A23187 et de la ionomycine sur le gonflement mitochondrial. L'ajout de ces ionophores dans une suspension de mitochondries de cœur de rat non énergisées contenant du calcium induit un gonflement mitochondrial qui peut être inhibé par la CsA. L'A23187 et la ionomycine sont donc capables d'induire l'ouverture du mPTP de mitochondries isolées en provoquant l'entrée de calcium dans la mitochondrie.

Nous avons ensuite montré que ces ionophores sont capables d'augmenter la concentration de calcium mitochondrial de cardiomyocytes adultes isolés de souris. Pour mettre en évidence l'ouverture du mPTP, nous avons utilisé l'association calcéine/CoCl₂. Dans ces expériences, l'ajout d'A23187 provoque une extinction de la fluorescence de la calcéine. Cependant, cette diminution de fluorescence n'est limitée ni par la CsA, ni par la délétion de la CypD et elle n'est pas associée à une dépolarisation mitochondriale, ce qui exclue une ouverture du mPTP. De plus, nous avons montré qu'en absence de calcium cette extinction n'est pas modifiée et qu'en présence d'EGTA, un chélateur d'ions divalents, la fluorescence de la calcéine augmente et devient diffuse. Ces résultats nous ont conduits à émettre l'hypothèse que l'A23187 pourrait également transporter le cobalt et qu'en le faisant rentrer dans la mitochondrie, celui-ci serait responsable de l'extinction de la fluorescence de la calcéine indépendamment du mPTP. Cette hypothèse a été étayée par le fait que l'A23187 n'induisait plus d'entrée de calcium dans les mitochondries lorsque les cellules avaient été pré-traitées avec du cobalt.

Ce mécanisme particulier n'est retrouvé qu'avec l'A23187. En effet, la ionomycine n'induit aucune modification de la fluorescence de la calcéine et ne provoque pas de dépolarisation

mitochondriale. Ces résultats montrent que les ionophores électroneutres ne peuvent pas être utilisés pour induire l'ouverture du mPTP dans les mitochondries de cardiomyocytes.

3.2. L'ETH129 induit l'entrée de calcium dans la mitochondrie et provoque l'hypercontracture cellulaire suivie de la mort des cardiomyocytes.

Nous avons ensuite étudié les propriétés d'un autre ionophore calcique, l'ETH129, qui transporte le calcium en fonction du potentiel de membrane. L'ajout de calcium et d'ETH129 dans le tampon d'incubation de mitochondries cardiaques isolées entraîne une ouverture du mPTP qui peut être inhibée par la CsA.

Dans les cardiomyocytes isolés de souris, l'ETH129 induit une augmentation très importante de la concentration de calcium mitochondriale. Cette accumulation de calcium est associée à une hypercontracture des cellules, une dépolarisation mitochondriale et une extinction de la calcéine qui précèdent la mort cellulaire. L'ensemble de ces événements sont des caractéristiques reconnues de l'ouverture du mPTP. Cependant, ni la CsA, ni la délétion de la CypD n'ont permis de limiter ces effets, ce qui exclut l'implication de la CypD dans les effets de l'ETH129.

Des expériences réalisées dans un milieu sans calcium et après déplétion des stocks calciques réticulaires par la ryanodine ont permis de dissocier la perte de calcéine et la dépolarisation mitochondriale causées par l'ETH129. Dans ces conditions, l'absence de calcium retarde l'extinction de la calcéine mais ne modifie pas la dépolarisation. L'effet de l'ETH129 sur le potentiel de membrane mitochondrial semble donc indépendant du calcium. Des mesures sur mitochondries isolées, réalisées en absence de calcium, ont permis de montrer que l'ETH129 induit une dépolarisation rapide des mitochondries, permettant de conclure que l'utilisation de ce ionophore est rendue impossible par ses propriétés découplantes.

3.3. Le modèle d'hypoxie-réoxygénation induit une ouverture du mPTP dépendante de la CypD


La dernière partie de ce travail a consisté à mettre au point un modèle d'étude de l'ouverture du mPTP reposant sur une séquence d'hypoxie-réoxygénation qui mime les phénomènes d'ischémie-reperfusion. Ce type de modèle a déjà été utilisé par le laboratoire avec des cardiomyocytes isolés de rat en utilisant l'association calcéine/CoCl₂ pour mettre en évidence l'ouverture du mPTP et l'iodure de propidium pour marquer les cellules mortes. Chez la souris, une hypoxie de 45 min ne provoque pas de mort cellulaire ni de perte de calcéine. En

revanche, lors de la reperfusion, l'extinction de la fluorescence de la calcéine est rapidement suivie par la mort cellulaire. Lorsque ces expériences sont réalisées avec des cardiomyocytes issus de souris *Ppif*^{-/-}, l'hypercontracture des cardiomyocytes, la diminution de la fluorescence de la calcéine et la mort cellulaire sont fortement retardées par rapport aux cardiomyocytes de souris sauvages. Ces résultats démontrent que les phénomènes observés dans ce modèle d'hypoxie-réoxygénation sont liés à des ouvertures du mPTP dépendantes de la CypD.

4. Conclusion

L'utilisation d'un modèle pharmacologique d'ouverture du mPTP en normoxie provoquée par des ionophores calciques pourrait permettre d'évaluer le pouvoir cardioprotecteur de nouvelles molécules ciblant la CypD. Néanmoins, nous avons montré que de tels agents pharmacologiques ne sont pas utilisables dans des cardiomyocytes adultes isolés. S'ils induisent effectivement une augmentation de la concentration calcique mitochondriale, ils sont en revanche incapables de provoquer l'ouverture du mPTP et présentent même, dans le cas de l'A23187, des interactions avec la technique de marquage. Cette inefficacité pourrait être liée à la grande résistance des mitochondries cardiaques à la surcharge calcique. De plus, le transport pharmacologique d'ions à travers les membranes mitochondriales utilise la complexation et l'échange ionique, ce qui rend possible la dépolarisation mitochondriale sans ouverture du mPTP lorsque cet échange se fait au dépend du gradient électrochimique, comme dans le cas de l'ETH129. Enfin, si les cardiomyocytes adultes isolés ne peuvent pas être utilisés avec des ionophores calciques, l'étude de l'ouverture du mPTP peut se faire à l'aide d'un modèle d'hypoxie-réoxygénation. Ce modèle, dont la complexité et la durée limitent le nombre de conditions à tester, est plus complet et permet de mettre en évidence une ouverture du mPTP dépendante de la CypD associée à la mort cellulaire.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Ca²⁺ ionophores are not suitable for inducing mPTP opening in murine isolated adult cardiac myocytes

Mathieu Panel^{1,2}, Bijan Ghaleh^{1,2} & Didier Morin^{1,2}

Opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) plays a major role in cell death during cardiac ischaemia-reperfusion. Adult isolated rodent cardiomyocytes are valuable cells to study the effect of drugs targeting mPTP. This study investigated whether the use of Ca²⁺ ionophores (A23187, ionomycin and ETH129) represent a reliable model to study inhibition of mPTP opening in cardiomyocytes. We monitored mPTP opening using the calcein/cobalt fluorescence technique in adult rat and wild type or cyclophilin D (CypD) knock-out mice cardiomyocytes. Cells were either treated with Ca²⁺ ionophores or subjected to hypoxia followed by reoxygenation. The ionophores induced mPTP-dependent swelling in isolated mitochondria. A23187, but not ionomycin, induced a decrease in calcein fluorescence. This loss could not be inhibited by CypD deletion and was explained by a direct interaction between A23187 and cobalt. ETH129 caused calcein loss, mitochondrial depolarization and cell death but CypD deletion did not alleviate these effects. In the hypoxia-reoxygenation model, CypD deletion delayed both mPTP opening and cell death occurring at the time of reoxygenation. Thus, Ca²⁺ ionophores are not suitable to induce CypD-dependent mPTP opening in adult murine cardiomyocytes. Hypoxia-reoxygenation conditions appear therefore as the most reliable model to investigate mPTP opening in these cells.

Necrosis is a prevalent form of cell death that contributes to cell injuries in a number of diseases. This is particularly relevant during cardiac ischaemia-reperfusion^{1,2} where opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) has been shown to play a major role³. mPTP is thought to be a multiprotein complex which forms and opens under conditions that prevail at the time of reperfusion such as Ca²⁺ overload and oxidative stress⁴. Its opening causes mitochondrial swelling, loss of membrane potential, ATP depletion and outer membrane permeabilization leading to cell death. The precise components of the pore remain putative. Recent data provided evidence in support of a role for the F₁F₀ ATP synthase in pore formation^{5,6} although there is no agreement in the mechanism of pore formation. Nevertheless, a common agreement considers that the soluble protein cyclophilin D (CypD) located within the mitochondrial matrix is the main regulator of mPTP as CypD lowers the Ca²⁺ threshold required to elicit mPTP opening. Indeed, excess intramitochondrial Ca²⁺ is a crucial factor to trigger mPTP opening⁷. This is the reason why numerous studies have used Ca²⁺ ionophores to induce mPTP opening in a variety of cells^{8–11}. This is a useful approach to study the effect of drugs interacting with mPTP and the search for new mPTP inhibitors remains a major pharmacological objective.

The aim of this study was to investigate whether three Ca²⁺ ionophores, A23187, ionomycin and ETH129 might represent useful tools to study mPTP opening/inhibition in excitable cells such as cardiomyocytes where Ca²⁺ fluxes have a critical role. On one hand, A23187 and ionomycin are carboxylic acid ionophores which equilibrate Ca²⁺ concentrations across biological membranes and thus between the different compartments of the cell in an electroneutral manner¹². On the other hand, ETH129 is a neutral compound which binds Ca²⁺ with a high specificity over other divalent cations. The complex formed carries a positive charge and permeates membranes in response to negative membrane potential^{13,14}. We used the calcein loading CoCl₂ quenching technique¹⁵ to monitor mPTP opening and compared the effect observed in adult cardiomyocytes isolated from rat as well as wild type and CypD knock-out mice. We observed that among the three ionophores tested, ionomycin was without effect on calcein or TMRM fluorescence and that A23187 and ETH129 modified the distribution of calcein in cardiomyocytes independently from CypD and thereby are not valid tools to monitor mPTP in isolated cardiomyocytes. In contrast, hypoxia-reoxygenation was responsible for a CypD-dependent mPTP opening as

¹INSERM U955, équipe 03, Créteil, France. ²Université Paris-Est, UMR S955, DHU A-TVb, UPEC, Créteil, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.M. (email: didier.morin@inserm.fr)

demonstrated by the loss of mitochondrial calcein and the subsequent cell death. This setting appeared as the most suitable model to investigate mPTP opening in cardiomyocytes.

Results

Electroneutral Ca^{2+} ionophores and mPTP opening in isolated adult cardiomyocytes. *Induction of mPTP opening by A23187 and ionomycin in isolated rat cardiac mitochondria.* Cardiac mitochondria were incubated in the presence of rotenone (1 μM) and antimycin A (1 μM) in order to inhibit mitochondrial respiration. In these conditions, the lack of mitochondrial membrane potential limited Ca^{2+} influx and no swelling could be observed after addition of a high Ca^{2+} concentration (200 μM). A23187 (1 μM) and ionomycin (10 μM) allowed Ca^{2+} to equilibrate across mitochondrial membranes and triggered a slow mitochondrial swelling (Fig. 1a and b). This swelling could be inhibited by 2 μM CsA, a well-known de-sensitiser of mPTP opening, demonstrating that both drugs induced a CypD-dependent mPTP opening in isolated cardiac mitochondria.

Mitochondrial Ca^{2+} mobilization by A23187 and ionomycin in isolated adult cardiomyocytes. Then, we verified the ability of both ionophores to induce mitochondrial Ca^{2+} influx in cells. Mitochondrial compartment of isolated adult cardiomyocytes were preloaded with Rhod-2 at 37 °C for 40 min, and then supplemented with 0.5 μM A23187 or 10 μM ionomycin. Figure 1c and d show that both drugs induced a time-dependent increase in mitochondrial Ca^{2+} confirming the ionophoretic properties of the drugs.

A23187 but not ionomycin induced mitochondrial calcein loss. We next investigated the ability of the Ca^{2+} ionophores to induce mPTP opening in isolated rat adult cardiomyocytes. The cells were co-loaded with 1 μM calcein in the presence of CoCl_2 and TMRM and incubated at 37 °C. After 5 min incubation, the addition of 0.5 μM A23187 resulted in an immediate decrease in calcein fluorescence (Fig. 2a). This decrease occurred simultaneously in all cells and was not associated with mitochondrial depolarization as assessed by the stability of the TMRM signal (Fig. 2b). No signs of cell death were observed up to 60 min of incubation (not shown). Similar results were obtained with a higher concentration of A23187 (10 μM). When cells were incubated with CsA (0.2–2 μM) for 20 min prior to A23187 exposure, calcein fluorescence loss was not modified as compared to control cells (Fig. 2a). The same response to A23187 was obtained in cardiomyocytes isolated from wild type (WT) mice, with an immediate drop in calcein fluorescence which could not be limited by 2 μM CsA (Fig. 2c). These results indicate that mPTP is not involved in the loss of calcein fluorescence. However, since CsA has a narrow range of action, being ineffective at low and toxic at high concentrations^{16–18}, we performed the same experiments on cardiac myocytes isolated from CypD knock-out mice which are protected from mPTP opening¹⁹. In these cells A23187 induced calcein fluorescence loss in a same extent than in WT mice, confirming a mechanism independent from CypD and unrelated to mPTP opening (Fig. 2c).

To study the mechanism of calcein release from mitochondria, we performed experiments in a Tyrode's medium devoid of Ca^{2+} . The absence of Ca^{2+} in the incubation medium did not modify the decrease in calcein fluorescence induced by A23187 (Fig. 2d). Moreover, when EGTA (100 μM) was added to the medium, A23187 caused an increase in calcein fluorescence (Fig. 2d). As EGTA does not enter the cell and is able to bind cobalt²⁰, these data suggest that the increase in calcein fluorescence could be due to a possible cobalt efflux (de-quenching). Hence, we hypothesized that the decrease in calcein fluorescence was the consequence of an interaction between A23187 and cobalt instead of Ca^{2+} . The experiment of Fig. 1c confirmed this hypothesis. Indeed, mitochondrial Ca^{2+} influx was inhibited when cardiomyocytes were pre-treated with 1 mM CoCl_2 . Therefore in our experimental conditions (Tyrode's medium containing 1.3 mM Ca^{2+}) A23187 might transport cobalt across mitochondrial membranes inducing the quenching of calcein fluorescence inside mitochondria without triggering mPTP opening.

The ineffectiveness of electroneutral Ca^{2+} ionophores to induce mPTP opening in cardiomyocytes was confirmed using ionomycin. Although like A23187, high concentrations of ionomycin have the capacity to elicit a CypD-dependent mitochondrial swelling in isolated cardiac mitochondria (Fig. 1b) and to produce mitochondrial Ca^{2+} overload in cardiomyocytes (Fig. 1d), ionomycin altered neither calcein nor TMRM mitochondrial fluorescence (Fig. 2e and f).

ETH129 and mPTP opening in isolated adult cardiomyocytes. *ETH129 induced calcein and TMRM loss and cell death independently from mPTP opening in isolated adult cardiomyocytes.* The Ca^{2+} ionophore ETH129 was shown to induce mPTP opening in yeast²¹ and therefore we investigated its effect on isolated murine cardiomyocytes. First, we determined whether ETH129 was able to induce mitochondrial swelling in isolated mitochondria. Its mechanism of action differs from that of A23187 as it involves an electrophoretic transport of Ca^{2+} and requires a negative potential to exert its ionophore activity. Thus, swelling experiments were performed on energised mitochondria in which the mitochondrial Ca^{2+} uniporter was blocked by the presence of ruthenium red. Figure 3a shows that 20 μM ETH129 induced mitochondrial swelling which was inhibited by CsA, indicating that ETH129 induced mPTP opening in isolated mitochondria.

Then, we checked the ability of ETH129 to trigger mitochondrial Ca^{2+} influx in cardiomyocytes. As shown in Fig. 3b, the addition of increasing concentrations of ETH129 to cardiomyocytes induced a mitochondrial uptake of Ca^{2+} as demonstrated by the increase in rhod-2 fluorescence.

We next tested whether ETH129 was able to induce mPTP opening in isolated cardiomyocytes. Figure 4a shows that ETH129 induced a time-dependent release of calcein which was observed at 20 and 50 μM ETH129. As opposed to A23187, calcein release is preceded by mitochondrial depolarization shown by the loss of TMRM (Fig. 4b) that followed a concentration-dependent hypercontracture of the cells (Fig. 4c). Co-loading of the cells with calcein and propidium iodide demonstrated that the loss of calcein induced by 20 μM ETH129

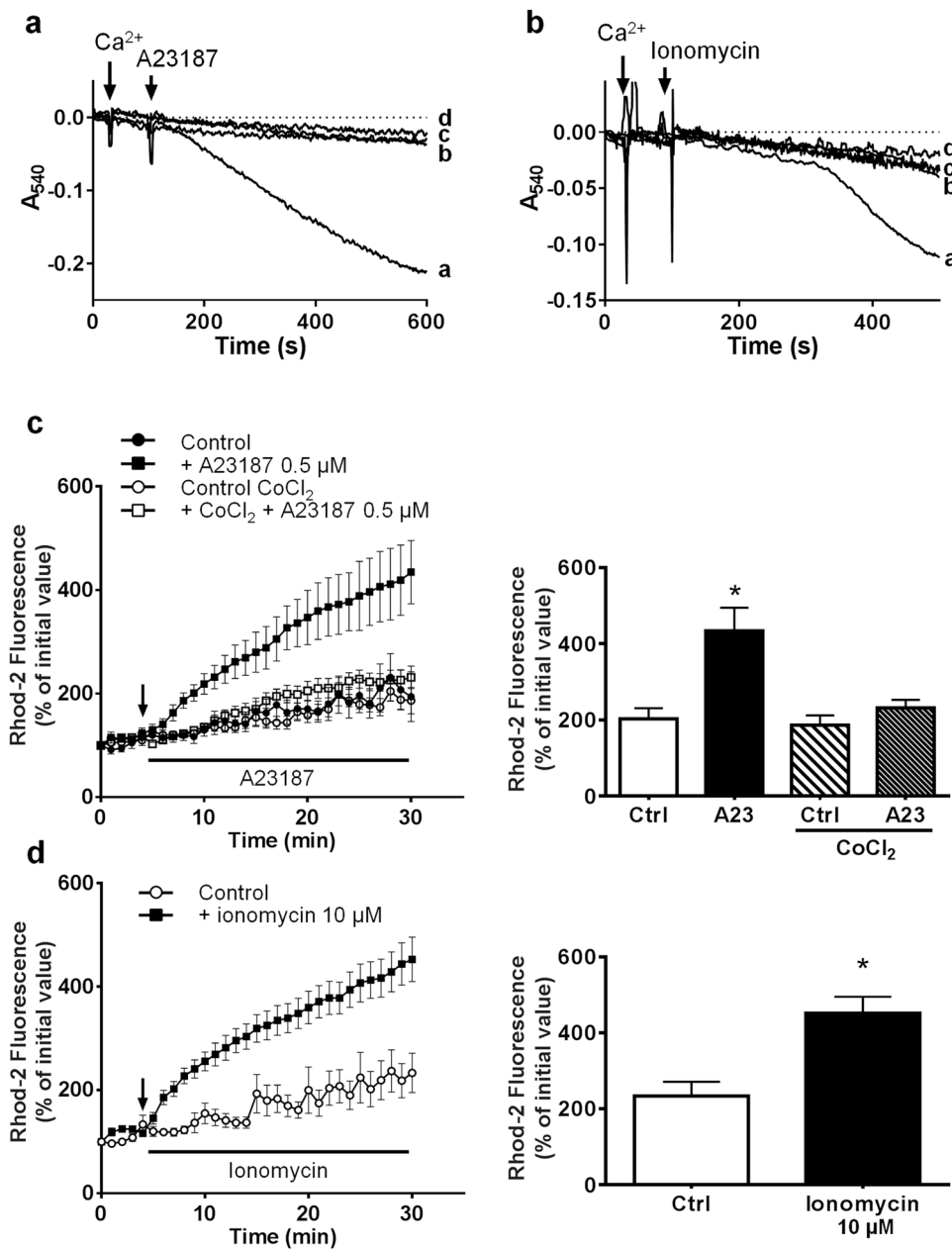


Figure 1. Effect of A23187 and ionomycin on mitochondrial swelling and mitochondrial Ca^{2+} in isolated cardiomyocytes. **(a and b)** Swelling was assessed in isolated rat cardiac mitochondria by measuring the change in absorbance of the mitochondrial suspension at 540 nm. Mitochondria were incubated in the presence of rotenone (1 μM) and antimycin A (1 μM) in order to inhibit mitochondrial respiration. Then 200 μM Ca^{2+} and 1 μM A23187 or 10 μM ionomycin were added. **(a)** line a: Ca^{2+} + A23187; line b: Ca^{2+} + A23187 + CsA 2 μM ; line c: Ca^{2+} alone; line d: A23187 alone. **(b)** line a: Ca^{2+} + ionomycin; line b: Ca^{2+} + ionomycin + CsA 2 μM ; line c: Ca^{2+} alone; line d: ionomycin alone. **(c,d)** Isolated adult cardiomyocytes were loaded with 5 μM rhod-2 for 40 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ and then incubated in a Tyrode's buffer. After 5 min incubation (arrow) A23187 **(c)** or ionomycin **(d)** were added to the medium. Fluorescence values were obtained by averaging pixel intensities after background subtraction and were normalised as a percentage of the initial value. Each trace represents the mean \pm SEM of 3–5 experiments. * $p < 0.05$ versus control (Ctrl). The ordinates of the bar graphs are the values of rhod-2 fluorescence observed at 30 min in the corresponding figures.

($T_{\text{mPTP}50} = 49 \pm 15$ min) led to cell death ($T_{\text{cell death}50} = 56 \pm 16$ min) (Fig. 4d). All these data converged to indicate that ETH129 induced mPTP opening.

To confirm this effect, the same experiments were duplicated in cardiomyocytes isolated from CypD knock-out mice. In these cells the absence of CypD was assumed to inhibit mPTP opening. Figure 4e and f show that the decrease in calcein and TMRM fluorescence induced by 20 μM ETH129 in CypD knock out

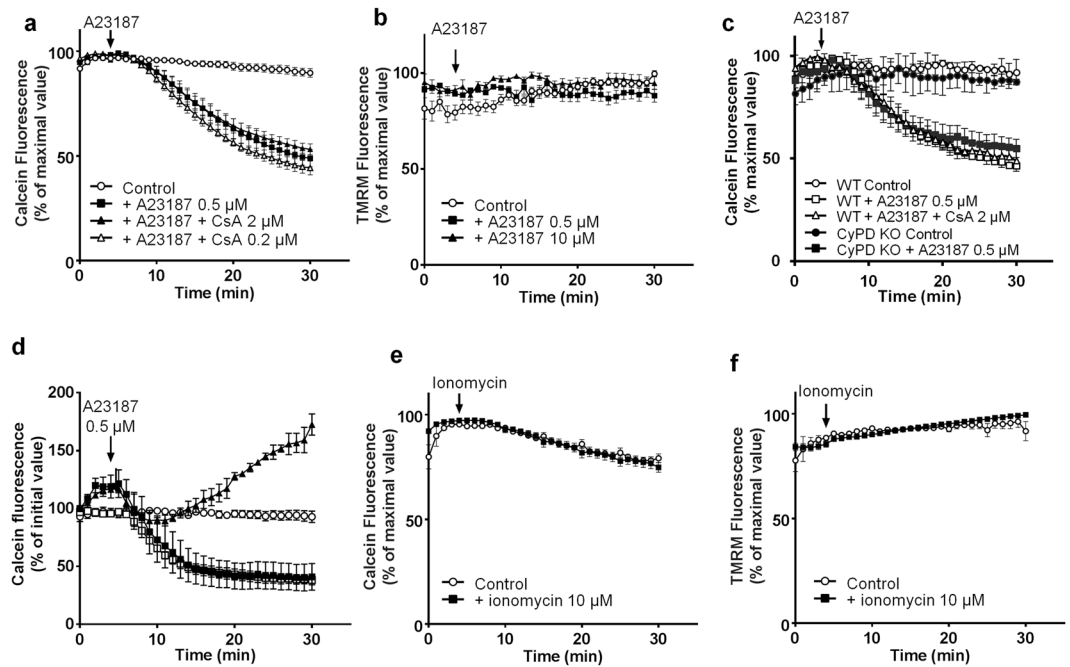


Figure 2. Effect of A23187 and ionomycin on mitochondrial calcein and TMRM fluorescence in isolated cardiomyocytes. Isolated adult cardiomyocytes were co-loaded with calcein, CoCl_2 and TMRM at 37°C and then incubated in a Tyrode's buffer. After 5 min incubation A23187 (a and b) or ionomycin (e and f) were added to the medium. (c) Cardiomyocytes isolated from wild type (WT) or CypD knock out (KO) mice were stained with $1\ \mu\text{M}$ calcein in the presence of $1\ \text{mM}$ CoCl_2 , pre-treated with $2\ \mu\text{M}$ CsA and $0.5\ \mu\text{M}$ A23187 was added 5 min after recording. (d) Cardiomyocytes were incubated in a Tyrode's buffer without Ca^{2+} (■), supplemented with $100\ \mu\text{M}$ EGTA (○, ▲) or containing $1.3\ \text{mM}$ Ca^{2+} (□). At 5 min, $0.5\ \mu\text{M}$ A23187 was added (except ○). Fluorescence values of calcein and TMRM were obtained by averaging pixel intensities after background subtraction and were normalised as a percentage of the initial value. Each trace represents the mean \pm SEM of 3 experiments.

cardiomyocytes was similar to that observed in cardiomyocytes isolated from wild type mice, *i.e.*, suggesting a CypD-independent mPTP opening process.

To further decipher the mechanism of action of ETH129, we analyzed the role of Ca^{2+} . The absence of Ca^{2+} in the incubation medium did not modify the effect of $20\ \mu\text{M}$ ETH129 on calcein and TMRM fluorescence (Fig. 5a and b) indicating that extracellular Ca^{2+} was not involved. Then cardiomyocytes were incubated for 40 min in a Tyrode's medium devoid of Ca^{2+} supplemented with low concentration of ryanodine ($20\ \text{nM}$) in order to deplete sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} stocks²². In these conditions, the effect of ETH129 was associated with a delay in calcein loss as compared to control cells (Fig. 5a) but intracellular Ca^{2+} depletion did not affect mitochondrial depolarization (Fig. 5b) and hypercontracture of the cells (not shown). This suggests that the mobilization of intracellular Ca^{2+} promoted the loss of calcein caused by $20\ \mu\text{M}$ ETH129 but that another mechanism was responsible for mitochondrial depolarization and cellular hypercontracture.

ETH129 displays mitochondrial uncoupling properties. It is well-established that mitochondrial depolarization and cellular hypercontracture are associated with ATP depletion and can be promoted by mitochondrial uncoupling²³. We observed the same behaviour in our experimental conditions since the uncoupling agent FCCP elicited hypercontracture of the cells resulting in an increase in calcein fluorescence (Fig. 5c). Therefore, we assessed whether the mechanism of ETH129 could be linked to changes in mitochondrial potential.

For this purpose, isolated rat cardiac mitochondria were energised with pyruvate/malate and membrane potential was assessed with rhodamine 123. At low concentrations ($\leq 10\ \mu\text{M}$), ETH129 did not modify mitochondrial membrane potential. Treatment of energised mitochondria with increasing concentrations of ETH129 (10 – $50\ \mu\text{M}$) resulted in a concentration-dependent depolarization and at $50\ \mu\text{M}$, ETH129 immediately collapsed membrane potential as effectively as FCCP (Fig. 5d). Thus, ETH129 has a direct uncoupling effect which explains mitochondrial depolarization and cell hypercontracture but not calcein loss or cell death since they were not altered by depolarization (Fig. 5c).

Hypoxia-reoxygenation: a relevant model to monitor mPTP opening in isolated cardiomyocytes. The conditions required to induce mPTP opening are those encountered by a mitochondria when an ischemic organ is subjected to reperfusion and this can be mimicked in cells using a sequence of hypoxia-reoxygenation. Figure 6 shows the results obtained with mouse cardiomyocytes challenged with 45 min hypoxia followed by reoxygenation. During the hypoxic period, only a small percentage ($\sim 10\%$) of cells exhibited

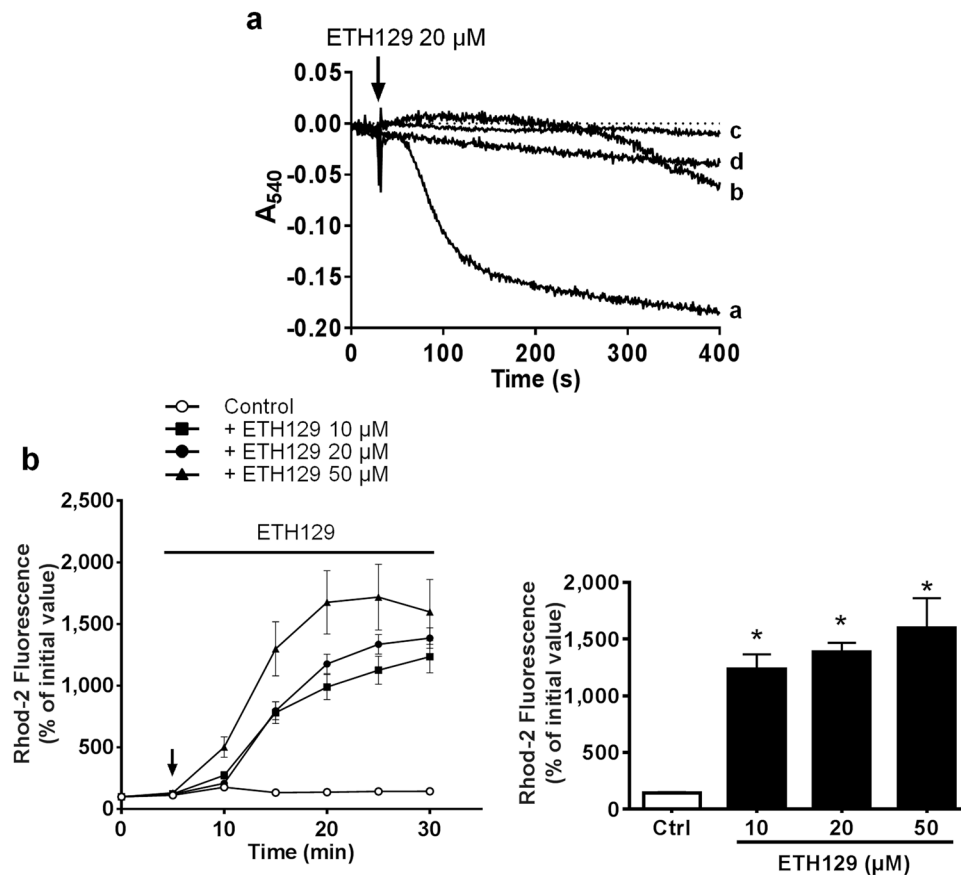


Figure 3. Effect of ETH129 on mitochondrial swelling and mitochondrial Ca^{2+} in isolated cardiomyocytes. **(a)** Swelling was assessed in isolated rat cardiac mitochondria by measuring the change in absorbance of the mitochondrial suspension at 540 nm. Mitochondria were energised with pyruvate/malate (5/5 mM) in the presence of 10 μM ruthenium red and 200 μM Ca^{2+} . Then 20 μM ETH129 were added (arrow). Line a: Ca^{2+} + ETH129; line b: Ca^{2+} + ETH129 + CsA 2 μM ; line c: Ca^{2+} alone; line d: ETH129 alone. **(b)** Isolated adult cardiomyocytes were loaded with 5 μM rhod-2 for 40 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ and then incubated in a Tyrode's buffer. After 5 min incubation (arrow) ETH129 was added to the medium. Fluorescence values were obtained by averaging pixel intensities after background subtraction and were normalised as a percentage of the initial value. Each trace represents the mean \pm SEM of 3–5 experiments. * $p < 0.05$ versus control (Ctrl). The ordinates of the bar graphs are the values of rhod-2 fluorescence observed at 30 min.

hypercontracture and no cell death was observed. Hypercontracture was unrelated to CypD as there is no difference between wild type and CypD knock out mice (Fig. 6a). Most of the damages were observed during reoxygenation. Indeed, Fig. 6a shows the time dependent occurrence of hypercontracture which was delayed in CypD knock out mice. In addition, in wild type mice, reoxygenation induced a loss of calcein ($t_{1/2} = 63 \pm 17$ min) that preceded propidium iodide labelling of cells by a few minutes (Fig. 6b). The deletion of CypD greatly delayed calcein loss ($t_{1/2} = 144 \pm 34$ min) and propidium iodide labelling. For instance, after 120 min reperfusion, whereas 80% of cardiomyocytes were still alive in the CypD deleted cells, nearly all the cells were dead in wild type cells. This demonstrates that these experimental conditions allow to monitor a CypD-dependent mPTP opening, leading to cell death in mouse cardiomyocytes.

Discussion

Numerous experimental protocols have been described to monitor mPTP opening in mitochondria isolated from different organs but the demonstration of its occurrence in cells is more difficult. The development of the calcein loading CoCl_2 quenching technique based on the monitoring of the mitochondrial fluorescence of calcein allowed the investigation of mPTP opening at the single cell level^{15,24}. This technique has been used to evaluate mPTP opening in different cells and pathological situations^{25–29} but also to investigate the regulation of the pore. Different biophysical methods or pharmacological agents modulating oxidative stress or Ca^{2+} fluxes have been used to induce mPTP opening^{25,30,31}.

In the present study, we have evaluated the use of Ca^{2+} ionophores to induce mPTP opening in cardiomyocytes which would represent a simple tool to identify potential mPTP inhibitors. We used freshly isolated murine adult cardiomyocytes because they are fully differentiated and can be electrically paced, *i.e.*, a more physiological setting than cultured cells. We investigated the effects of two families of Ca^{2+} ionophores. The first one includes A23187 and ionomycin which belong to the carboxylic acid ionophores. Such compounds allow the equilibration

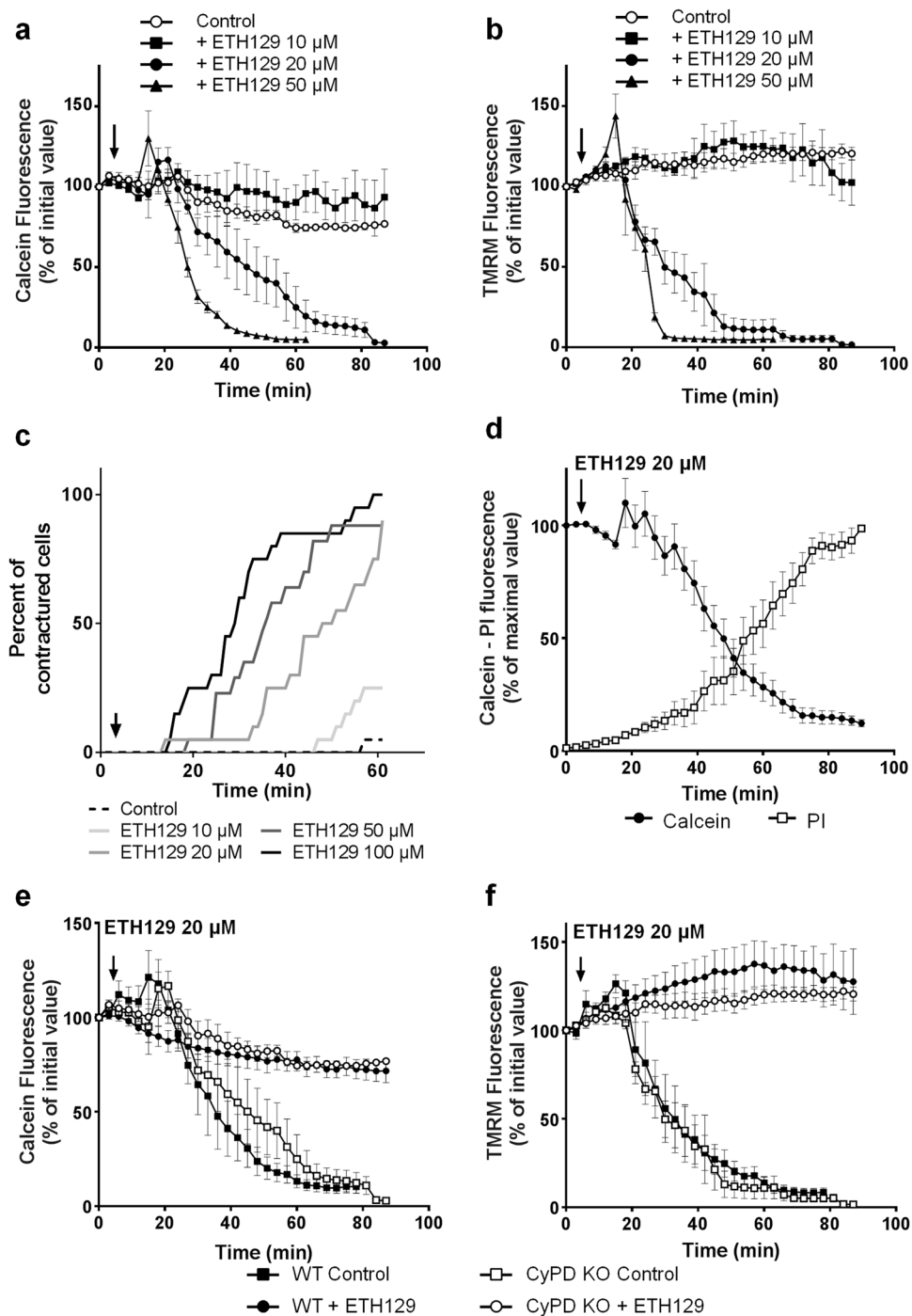


Figure 4. Effects of ETH129 on isolated mouse cardiomyocytes. (a and b) Isolated mouse adult cardiomyocytes were co-loaded with calcein, CoCl_2 and TMRM at 37°C and then incubated in a Tyrode's buffer. After 5 min incubation ETH129 (arrow) was added to the medium. (c) ETH129 induces a concentration-dependent hypercontracture of cardiomyocytes. (d) Isolated mouse adult cardiomyocytes were co-loaded with calcein, CoCl_2 and propidium iodide (PI) at 37°C and then incubated in a Tyrode's buffer. After 5 min incubation ETH129 ($20\ \mu\text{M}$; arrow) was added to the medium. (e and f) Cardiomyocytes isolated from wild type (WT) or CypD knock out (KO) mice were co-loaded with calcein, CoCl_2 and TMRM at 37°C and then incubated in Tyrode's buffer. After 5 min incubation, $20\ \mu\text{M}$ ETH129 (arrow) was added to the medium. Fluorescence values were obtained by averaging pixel intensities after background subtraction and were normalised as a percentage of the initial value. Each trace represents the mean \pm SEM of 3–5 experiments.

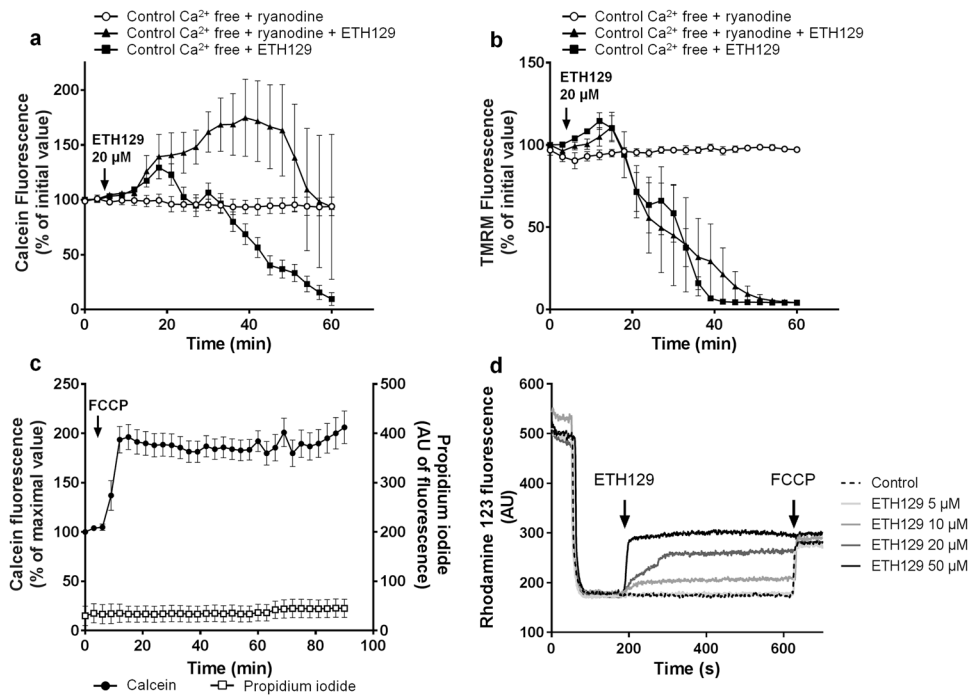


Figure 5. The role of Ca^{2+} and of uncoupling in the effect of ETH129. (a and b) Isolated mouse adult cardiomyocytes were co-loaded with calcein, CoCl_2 and TMRM at 37°C and then incubated in a Tyrode's buffer. After 5 min incubation, $20\ \mu\text{M}$ ETH129 (arrow) was added to the medium. Prior to experiments, cells were incubated for 40 min in Tyrode's medium devoid of Ca^{2+} supplemented with $20\ \text{nM}$ ryanodine to deplete sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} stocks. (c) Isolated mouse adult cardiomyocytes were co-loaded with calcein, CoCl_2 and propidium iodide at 37°C and then incubated in a Tyrode's buffer. After 5 min incubation $1\ \mu\text{M}$ FCCP (arrow) was added to the medium. Fluorescence values were obtained by averaging pixel intensities after background subtraction and were normalised as a percentage of the initial value. Each trace represents the mean \pm SEM of 3–5 experiments. (d) Mitochondrial membrane potential in isolated cardiac mitochondria treated with increasing concentrations of ETH129 was followed by measuring the uptake/release of the fluorescent dye rhodamine 123. Control: $1\ \mu\text{M}$ FCCP was added to depolarise mitochondrial membrane potential. Curves are representative of at least 4 independent experiments.

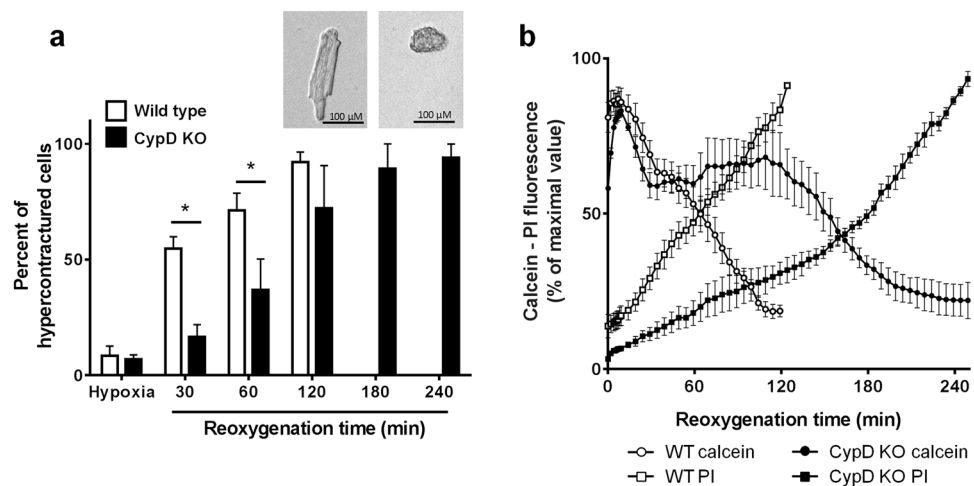


Figure 6. Effect of CypD deletion on hypercontracture, mPTP opening and cell death after 45 min hypoxia followed by reoxygenation in isolated adult mouse cardiomyocytes. Cardiomyocytes were isolated from wild type (WT) and CypD knock-out (KO) mice, were co-loaded with calcein, CoCl_2 and propidium iodide (PI) and were subjected to 45 min hypoxia and then reoxygenated. Images were collected every min during the first 5 min of reoxygenation and then every 5 min. (a) Percentage of cells exhibiting hypercontracture at the end of hypoxia and at different reoxygenation times. (b) Time course of mPTP opening and cell death during reoxygenation. Fluorescence was normalised to 100% of the maximal values. Traces from 3 to 5 experiments were averaged.

of Ca^{2+} concentrations across biological membranes by exchanging one Ca^{2+} for 2H^+ in an electroneutral manner. The second one, ETH129, is a neutral compound which binds Ca^{2+} with a high specificity over other divalent cations. The complexed form of ETH129, which carries a positive charge, permeates membranes in response to negative potential. Several studies demonstrated that ETH129 transports Ca^{2+} across biological membranes^{13, 14} and induces mPTP opening in mitochondria isolated from *Saccharomyces cerevisiae*²² but to our knowledge, ETH129 has never been used in mammalian cells.

Our data demonstrate that A23187 and ionomycin were unable to trigger mPTP opening in cardiomyocytes. They did not alter mitochondrial membrane potential or cell shape. The immediate and large calcein loss from cardiomyocytes challenged with A23187 was unrelated to mPTP opening. Indeed, this calcein loss could not be inhibited either by CsA treatment or CypD deletion. These results also rule out the possibility that calcein loss could be due to transient mPTP opening^{32, 33}. Our experiments suggest that A23187 is able to transport cobalt across membranes and therefore the decrease in calcein fluorescence is due to mitochondrial cobalt entry and not to mPTP opening in our experimental conditions. However a number of studies have used these drugs to trigger mPTP^{8–11, 31, 34, 35} and in the present study, isolated de-energised cardiac mitochondria treated with A23187 or ionomycin underwent a CsA-sensitive swelling. A possible explanation for this discrepancy is that the mitochondrial matrix Ca^{2+} concentration reached in the presence of these drugs is not sufficient to induce mPTP opening in cardiac mitochondria. Indeed, experiments performed with isolated cardiac mitochondria demonstrate that they are very resistant to Ca^{2+} overload and able to take up huge Ca^{2+} concentrations before mPTP opening in contrast to mitochondria issued from other organs such as liver³⁶. The greater resistance of cardiac mitochondria to Ca^{2+} overload might be linked to the contractile function of the heart which constantly involves large Ca^{2+} fluxes. It is also known that a moderate increase in intramitochondrial Ca^{2+} concentration influences energy production by stimulating several Krebs' cycle enzymes. Therefore, cardiac mitochondria should be able to handle larger amount of Ca^{2+} to supply sufficient energy for contractile adaptation. This hypothesis is in accordance with previous data showing that interfibrillar mitochondria, which produce ATP for contractile function, are more resistant to Ca^{2+} overload than subsarcolemmal mitochondria³⁷.

Contrasting with electroneutral ionophores, ETH129 induced a delayed and concentration-dependent hypercontracture of cardiomyocytes. This was associated with a loss of mitochondrial membrane potential preceding calcein loss by a few minutes. After calcein loss, cells quickly take up propidium iodide dye evidencing cell death. This might rely on intracellular Ca^{2+} stores as sarcoplasmic reticulum depletion with ryanodine greatly delayed calcein fluorescence decrease. These results support the existence of a rapid and permanent mPTP opening and are consistent with the ability of ETH129 to elicit mPTP opening in isolated mitochondria. Nevertheless, neither CsA treatment nor CypD deletion limited the decreases in calcein and TMRM fluorescence induced by ETH129 in cardiomyocytes. This shows that the effect of ETH129 is independent from a CypD-dependent mPTP opening process. However, it is well-established that CypD only facilitates mPTP opening. mPTP can form and open in the absence of CypD or in the presence of CsA when the inducing stimulus is sufficient³⁸. This is probably the case with ETH129 which provokes a fast and high mitochondrial Ca^{2+} overload and concomitantly uncouples mitochondrial membrane potential. Indeed membrane depolarization was shown to facilitate mPTP opening although the mechanisms involved remain uncertain^{39, 40}.

This study also reveals that hypoxia reoxygenation is an excellent model to highlight mPTP opening in cardiomyocytes. Matrix Ca^{2+} overload was the first factor described to activate mPTP opening^{7, 41} and is still considered as essential. However, other cellular regulatory factors such as oxidative stress, adenine nucleotide depletion or elevated phosphate concentrations are involved and proceed by enhancing the sensitivity of the mPTP to Ca^{2+} ^{3, 4}. This is why a cellular model that takes into account these regulatory factors seems more relevant to study mPTP opening. Indeed, the reoxygenation of hypoxic cardiomyocytes is clearly associated with a CypD-dependent mPTP opening. This protocol has the advantage to combine Ca^{2+} overload with other factors such as oxidative stress which are known to enhance the mPTP sensitivity to Ca^{2+} . Moreover, the cellular conditions generated by the hypoxic period (cellular Ca^{2+} overload, decrease in adenine nucleotide concentrations, high phosphate concentrations) facilitate mPTP opening during the reoxygenation phase.

In conclusion, Ca^{2+} ionophores are useful tools to induce mPTP opening in some cells. However, they cannot be used to trigger a CypD-dependent mPTP opening in cardiomyocytes either because the mechanism of Ca^{2+} transport at the level of the mitochondrial membrane is not effective enough (ionomycin, A23187) or the agent is too powerful (ETH129) and leads to a non-CypD regulated mPTP opening corresponding to what we observed during severe hypoxia-reoxygenation. In addition, the results of the present study demonstrate that the hypoxia-reoxygenation model is a suitable setting to highlight and investigate mPTP opening in cardiomyocytes.

Material and Methods

Reagents. All compounds were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) unless specified.

Animals. Male C57BL/6J mice (8 to 10 week-old) and male Wistar rats (250–300 g) were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). CypD knock-out mice (*Ppif*^{-/-} mice) were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA). Animals were housed in an air-conditioned room with a 12 h light–dark cycle and received standard rodent chow and drinking water *ad libitum*. All animal procedures used in this study were in accordance with the Directives of the European Parliament (2010/63/EU-848 EEC) and were approved by the Animal Ethics Committee Afssa/ENVA/Universite Paris Est Creteil (approval number 09/12/14-02).

Isolation of cardiac mitochondria. Male Wistar rats were used for the preparation of cardiac mitochondria as previously described²⁵. Briefly, hearts were homogenised for 5 s in a cold buffer solution (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 7.4 at 4 °C) using a Polytron homogeniser. Samples were

then further homogenised for five consecutive times in a Potter-Elvehjem glass homogeniser at 1500 rpm. The homogenate was centrifuged at 1000 g for 5 min at 4 °C. The supernatant was centrifuged at 10000 g for 10 min at 4 °C. The mitochondrial pellet was resuspended in homogenization buffer without EGTA and protein concentration was determined using the Advanced protein assay reagent (Sigma catalog number #57697).

Mitochondrial swelling assays. Mitochondrial swelling was assessed by measuring the change in absorbance at 540 nm (A_{540}) using a Jasco V-530 spectrophotometer equipped with magnetic stirring and thermostatic control. In a first set of experiments, mitochondrial swelling induced by A23187 and ionomycin was measured in deenergised mitochondria. Experiments were carried out at 30 °C in a swelling buffer (100 mM KCl, 50 mM sucrose, 10 mM HEPES, 5 mM KH_2PO_4 , pH 7.4 at 30 °C). Mitochondria (0.5 mg/mL) were incubated in the presence of rotenone, antimycin (1 μM each) and 200 μM Ca^{2+} . After 30 s, swelling was induced by addition of 1 μM A23187 or 10 μM ionomycin.

In a second set of experiments, the effect of ETH129 on mitochondrial swelling was measured in energised conditions. Mitochondria (0.5 mg/mL) were incubated at 30 °C in a respiration buffer containing 100 mM KCl, 50 mM sucrose, 10 mM HEPES, 5 mM KH_2PO_4 (pH 7.4 at 30 °C) in the presence of pyruvate/malate (5/5 mM), ruthenium red (10 μM) and 200 μM Ca^{2+} . After 30 s, swelling was induced by the addition of 10 μM ETH129. When used, cyclosporin A (CsA) was introduced at the beginning of the incubation period.

Mitochondrial membrane potential assays. Mitochondrial membrane potential was evaluated by the uptake of the fluorescent dye rhodamine 123 which accumulates electrophoretically into energised mitochondria in response to their negative inner-membrane potential. Rhodamine 123 (0.2 μM) and the respiratory substrates pyruvate/malate (5/5 mM) were added to respiration buffer contained in a cuvette maintained at 30 °C. Fluorescence was monitored over time using a Jasco FP 6300 spectrofluorometer (excitation wavelength 503 nm; emission wavelength 527 nm). After 20 s of recording, mitochondria (0.4 mg/mL) were added in the cuvette and the effect of increasing concentrations of ETH129 on the membrane potential was examined after addition of the compounds at 120 s. Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP, 1 μM) was added at the end of the experiment to depolarise mitochondrial membrane potential.

Isolation of primary adult rat and mouse cardiomyocytes. Ventricular cardiomyocytes were isolated from mice and rats by an enzymatic technique. The heart was retrogradely perfused for 15 min at 37 °C with a stock perfusion buffer bubbled with 95% O_2 /5% CO_2 containing 133 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 0.6 mM KH_2PO_4 , 0.6 mM Na_2HPO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 12 mM NaHCO_3 , 10 mM KHCO_3 , 10 mM HEPES, 30 mM taurine, 0.032 mM phenol red, 5.5 mM glucose, 10 mM 2,3butanedionemoxime pH 7.4 to wash out blood. After 2 min of perfusion, liberase (Blendzyme 10 mg/100 ml, Roche Applied Science, Mannheim, Germany), trypsin EDTA (14 mg/100 ml) and 12.5 μM Ca^{2+} were added to the buffer and the heart was perfused for approximately 8–9 and 13–15 min for mice and rats, respectively. The heart was placed into a beaker in the same buffer containing 10% bovine serum albumin pH 7.4 at 37 °C to stop the digestion. Ventricles were then cut into small fragments and cells isolated by stirring the tissue and successive aspirations of the fragments through a 10 ml pipette. After 10 min the supernatant was removed and the remaining tissue fragments were re-exposed to 10 ml of the same buffer. Then, the cells were suspended in the same buffer and Ca^{2+} was gradually added to 1 mM into an incubator at 37 °C. Finally, the cardiomyocytes were suspended in culture medium M199. They were seeded on 35 mm Petri dishes pre-coated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sterilised laminin and incubated for 90 min before being used.

Measurement of mPTP opening, membrane potential, cell death and mitochondrial Ca^{2+} in cells. Assessment of mPTP opening in cardiomyocytes was performed using the established calcein cobalt loading procedure by incubating cells with calcein-acetoxymethyl ester (calcein-AM) and CoCl_2 which results in calcein fluorescence localised in mitochondria^{15,24}. Cells were loaded with 1 μM calcein-AM for 30 min at 37 °C in 2 ml of M199, pH 7.4, supplemented with 1 mM CoCl_2 and then washed free of calcein and CoCl_2 and M199 was replaced by a Tyrode's buffer (in mM: NaCl 130; KCl 5; HEPES 10; MgCl_2 1; CaCl_2 1.8, pH 7.4 at 37 °C). When the mitochondrial membrane potential was analysed, cardiomyocytes were loaded with 20 nM tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) for 30 min at 37 °C and then rinsed with the Tyrode's solution. To monitor mitochondrial Ca^{2+} , cardiomyocytes were loaded with 5 μM rhod-2 AM (ThermoFisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) for 40 min at 37 °C and then washed free of rhod-2 AM. When cell death was studied, propidium iodide (5 μM) which permeates only the damaged cells was introduced in the Tyrode's buffer. To induce mPTP opening, calcium ionophores were added to the medium after 5 min stabilization, and remained present until the end of the measure (Fig. 7a). Cardiomyocytes were imaged with an Olympus IX-81 motorised inverted microscope equipped with a mercury lamp as a source of light for epifluorescence illumination and with a cooled camera (Hamamatsu ORCA-ER). For the detection of calcein fluorescence, a 460–490 nm excitation and a 510 nm emission filter were used. Propidium iodide and TMRM fluorescence were excited at 520–550 nm and recorded at 580 nm. For the detection of rhod-2 a 552 excitation and a 581 nm emission filter were used.

In normoxic experiments, images were acquired every 1 or 5 min. In hypoxia-reoxygenation experiments, images were acquired every 5 min during hypoxia, every min during the first 5 min following reoxygenation and then every 5 min. The illumination times were of 25 ms (calcein), 70 ms (propidium iodide), 50 ms (TMRM) and 70 ms (rhod-2). Images were analyzed using a digital epifluorescence imaging software (XCellence, Olympus, Rungis, France). Fluorescence was integrated over a region of interest ($\approx 80 \mu\text{m}^2$) for each cardiomyocyte and a fluorescence background corresponding to an area without cells was subtracted. For comparative purposes, the fluorescence intensity minus background was normalised according to the maximal fluorescence value (initial value for calcein, TMRM and rhod-2, final value for propidium iodide).

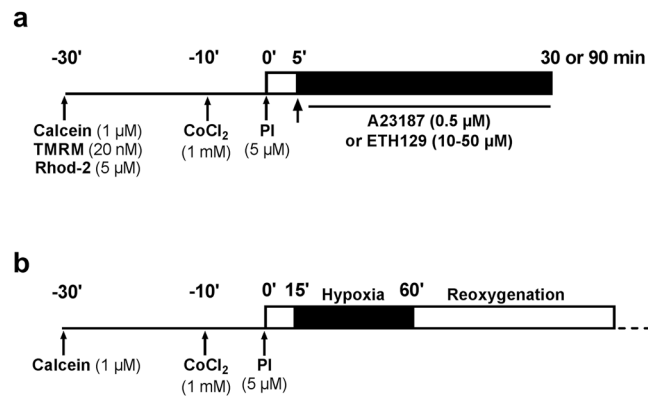


Figure 7. Design of the experiments performed on isolated cardiomyocytes.

For each experiment, the change of fluorescence was observed from a single cardiomyocyte and then, the global response was analysed by averaging the fluorescence changes obtained from all the cardiomyocytes (at least 30 cells) contained in a single field. In hypoxia-reoxygenation experiments, the time of reoxygenation necessary to induce a 50% decrease in calcein fluorescence (time to 50% mPTP opening [T_{mPTP50}]) and to induce a 50% increase in propidium iodide fluorescence (time to 50% cell death [$T_{cell\ death50}$]) were determined. When cell contracture was evaluated, cells were considered hypercontracted when they exhibited an irreversible loss of the rod-like shape (Fig. 6a). Hypercontracture was expressed as the percentage of contracted cells over the total cells on the field.

Hypoxia-reoxygenation model. Mouse cardiomyocytes were placed into a thermostated (37°C) chamber (Warner Instruments Inc, Connecticut) which was mounted on the stage of an IX81 Olympus microscope (Olympus, Rungis, France) and were perfused with the Tyrode's solution at a rate of 0.5 ml/min. The chamber was connected to a gas bottle diffusing a constant stream of O₂ (21%), N₂ (74%) and CO₂ (5%) maintaining an O₂ concentration of 21%. Oxygen in the perfusate was measured in the chamber using a fibre optic sensor system (Ocean Optics Inc., Florida). Cardiomyocytes were paced to beat by field stimulation (5 ms, 0.5 Hz).

To simulate ischaemia, the perfusion was stopped and cardiomyocytes exposed for 45 or 90 min to a hypoxic medium maintaining an O₂ concentration of 1–2%. This medium was the Tyrode's solution (bubbled with 100% N₂) supplemented with 20 mM 2-deoxyglucose and subjected to a constant stream of N₂ (100%). At the end of the ischemic period, reoxygenation was induced by rapidly restoring the Tyrode's flow and 21% O₂ in the chamber (Fig. 7b).

Statistical analysis. The data are reported as mean \pm S.E.M. Statistical significance was determined using either Student's two-tailed unpaired *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls' post test. Significance was accepted when $p < 0.05$.

References

- Orogo, A. M. & Gustafsson, Å. B. Cell death in the myocardium: my heart won't go on. *IUBMB Life*. **65**, 651–656 (2013).
- Moe, G. W. & Marin-García, J. Role of cell death in the progression of heart failure. *Heart Fail. Rev.* **21**, 157–167 (2016).
- Halestrap, A. P. & Richardson, A. P. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **78**, 129–141 (2015).
- Szabo, I. & Zoratti, M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol. Rev.* **94**, 519–608 (2014).
- Alavian, K. N. *et al.* A. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci USA*. **111**, 10580–10585 (2014).
- Giorgio, V. *et al.* Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci USA*. **110**, 5887–5892 (2013).
- Haworth, R. A. & Hunter, D. R. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch. Biochem. Biophys.* **195**, 460–467 (1979).
- Mather, M. W. & Rottenberg, H. The inhibition of calcium signaling in T lymphocytes from old mice results from enhanced activation of the mitochondrial permeability transition pore. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 707–724 (2002).
- Macho, A. *et al.* Calcium ionophoretic and apoptotic effects of ferutinin in the human Jurkat T-cell line. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 875–883 (2004).
- Tornero, D., Posadas, I. & Ceña, V. Bcl-x(L) blocks a mitochondrial inner membrane channel and prevents Ca²⁺ overload-mediated cell death. *PLoS One*. **6**, e20423 (2011).
- Yun, B. *et al.* Serine hydrolase inhibitors block necrotic cell death by preventing calcium overload of the mitochondria and permeability transition pore formation. *J. Biol. Chem.* **289**, 1491–1504 (2014).
- Abramov, A. Y. & Duchon, M. R. Actions of ionomycin, 4-BrA23187 and a novel electrogenic Ca²⁺ ionophore on mitochondria in intact cells. *Cell Calcium*. **33**, 101–112 (2003).
- Prestipino, G., Falugi, C., Falchetto, R. & Gazzotti, P. The ionophore ETH 129 as Ca²⁺ translocator in artificial and natural membranes. *Anal. Biochem.* **210**, 119–122 (1993).
- Wang, E. *et al.* Transport properties of the calcium ionophore ETH-129. *Biophys. J.* **81**, 3275–3284 (2001).
- Petronilli, V. *et al.* Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys. J.* **76**, 725–734 (1999).
- Griffiths, E. J. & Halestrap, A. P. Protection by Cyclosporin A of ischaemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **25**, 1461–1469 (1993).

17. Waldmeier, P. C., Feldtrauer, J. J., Qian, T. & Lemasters, J. J. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporine derivative NIM811. *Mol. Pharmacol.* **62**, 22–29 (2002).
18. Qian, T., Nieminen, A. L., Herman, B. & Lemasters, J. J. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* **273**, 1783–1792 (1997).
19. Baines, C. P. *et al.* Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. **434**, 658–662 (2005).
20. Simonsen, L. O., Brown, A. M., Harbak, H., Kristensen, B. I. & Bennekou, P. Cobalt uptake and binding in human red blood cells. *Blood Cells Mol. Dis.* **46**, 266–276 (2011).
21. Carraro, M. *et al.* Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* **289**, 15980–15985 (2014).
22. Xue, H. H. *et al.* Store depletion by caffeine/ryanodine activates capacitative Ca(2+) entry in nonexcitable 549 cells. *J. Biochem.* **128**, 329–336 (2000).
23. Stapleton, M. T., Fuchsbaue, C. M. & Allshire, A. P. BDM drives protein dephosphorylation and inhibits adenine nucleotide exchange in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* **275**, 1260–1266 (1998).
24. Petronilli, V. *et al.* Imaging the mitochondrial permeability transition pore in intact cells. *Biofactors*. **8**, 263–272 (1998).
25. Petronilli, V., Penzo, D., Scorrano, L., Bernardi, P. & Di Lisa, F. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. *Correlation with the duration of pore openings in situ.* *J. Biol. Chem.* **276**, 12030–12034 (2001).
26. Gillessen, T., Grasshoff, C. & Szincic, L. Mitochondrial permeability transition can be directly monitored in living neurons. *Biomed Pharmacother.* **56**, 186–193 (2002).
27. Obame, F. N. *et al.* Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 beta, SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **326**, 252–258 (2008).
28. Schaller, S. *et al.* TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **333**, 696–706 (2010).
29. Ilmarinen-Salo, P., Moilanen, E., Kinnula, V. L. & Kankaanranta, H. Nitric oxide-induced eosinophil apoptosis is dependent on mitochondrial permeability transition (mPT), JNK and oxidative stress: apoptosis is preceded but not mediated by early mPT-dependent JNK activation. *Respir. Res.* **13**, 73 (2012).
30. Batista Napotnik, T., Wu, Y. H., Gundersen, M. A., Miklavčič, D. & Vernier, P. T. Nanosecond electric pulses cause mitochondrial membrane permeabilization in Jurkat cells. *Bioelectromagnetics*. **33**, 257–264 (2012).
31. Treulen, F., Uribe, P., Bogue, R. & Villegas, J. V. Mitochondrial permeability transition increases reactive oxygen species production and induces DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* **30**, 767–776 (2015).
32. Ichas, F., Jouaville, L. S. & Mazat, J. P. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*. **89**, 1145–1153 (1997).
33. Huser, J. & Blatter, L. A. Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore. *Biochem. J.* **343**, 311–317 (1999).
34. Deniaud, A. *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*. **27**, 285–299 (2008).
35. Kahraman, S., Bambrick, L. L. & Fiskum, G. Effects of FK506 and cyclosporin A on calcium ionophore-induced mitochondrial depolarization and cytosolic calcium in astrocytes and neurons. *J. Neurosci. Res.* **89**, 1973–1978 (2011).
36. Endlicher, R. *et al.* Tissue specific sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to Ca²⁺ ions. *Acta Medica*. **52**, 69–72 (2009).
37. Hofer, T. *et al.* Bioenergetics and permeability transition pore opening in heart subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria: effects of aging and lifelong calorie restriction. *Mech Ageing Dev.* **130**, 297–307 (2009).
38. Basso, E. *et al.* Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J. Biol. Chem.* **280**, 18558–18561 (2005).
39. Halestrap, A. P., Woodfield, K. Y. & Connern, C. P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J. Biol. Chem.* **272**, 3346–3354 (1997).
40. Scorrano, L., Petronilli, V. & Bernardi, P. On the voltage dependence of the mitochondrial permeability transition pore. A critical appraisal. *J. Biol. Chem.* **272**, 12295–12299 (1997).
41. Crompton, M. & Costi, A. A heart mitochondrial Ca²⁺(+)-dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem. J.* **266**, 33–39 (1990).

Acknowledgements

Mathieu Panel was supported by doctoral grants from the Ministère de la Recherche et de la Technologie.

Author Contributions

M.P. and D.M. designed and performed experiments. B.G. and D.M. supervised the research. M.P. and D.M. wrote the manuscript. B.G. reviewed the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Résultats 3 : Le nouveau ligand de la CypD, C31, inhibe l'ouverture du mPTP dans des mitochondries cardiaques.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr Jean-Michel Pawlotsky (Inserm U955, Equipe 18, Créteil) et un manuscrit est en préparation.

1. Objectif du travail

L'ischémie-reperfusion cardiaque représente un enjeu majeur de santé publique. Si le développement des techniques de reperméabilisation des artères coronaires occluses a permis de réduire la mortalité de l'infarctus du myocarde, ces techniques sont par elles-mêmes génératrices de lésions dites « de reperfusion » qui accroissent la taille d'infarctus et donc le risque de développer une insuffisance cardiaque. Parmi les acteurs majeurs de ces lésions, le mPTP est une cible pharmacologique essentielle car son inhibition est la finalité de la majorité des voies de signalisation cardioprotectrices. Deux essais cliniques de phase III ont montré que l'inhibition de la CypD par la CsA, un modulateur essentiel du mPTP, ne permet pas de limiter les lésions de reperfusion mais cette molécule n'est pas forcément idéale dans cette indication. Nous avons précédemment montré qu'une nouvelle classe d'inhibiteurs de cyclophilines, totalement différents de la CsA, est capable d'inhiber l'ouverture du mPTP et que la molécule la plus active, le C31, possède des propriétés hépatoprotectrices en restaurant les paramètres mitochondriaux dans un modèle d'ischémie-reperfusion hépatique.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer (1) les effets du C31 sur l'ouverture du mPTP de mitochondries cardiaques et (2) son effet cardioprotecteur.

2. Protocoles expérimentaux

La préparation de mitochondries isolées de ventricule gauche a permis d'étudier l'effet des inhibiteurs du mPTP sur le gonflement mitochondrial induit par le calcium et la capacité de rétention calcique. Ce type de préparation a également été utilisé pour obtenir les extraits mitochondriaux et cytosoliques permettant l'étude de l'activité peptidyl-prolyl isomérase présente dans ces compartiments cellulaires.

L'effet cardioprotecteur du C31 a été évalué dans des cardiomyocytes isolées de souris adultes à l'aide d'un modèle d'hypoxie-réoxygénation utilisant la microscopie à fluorescence pour la détection de l'ouverture du mPTP et de la mort cellulaire.

Un modèle de cœur isolé perfusé de souris a été mis au point et utilisé pour perfuser la CsA et le C31 directement dans la circulation coronaire par perfusion rétrograde.

La capacité du C31 à inhiber l'ouverture du mPTP *in vivo* a été évaluée par mesure de la capacité de rétention calcique mitochondriale après injection par voie intraveineuse et préparation des mitochondries cardiaques.

3. Résultats

3.1. Le C31 atteint les mitochondries hépatiques mais pas les mitochondries cardiaques *in vivo*.

Nos travaux précédents ont montré que l'administration de C31 chez la souris par voie intraveineuse permettait d'augmenter la capacité de rétention calcique des mitochondries hépatiques. Selon le même protocole, les mitochondries cardiaques ont été isolées après la perfusion puis la capacité de rétention calcique a été évaluée. Dans ces expériences, les différentes doses de C31 (10 – 150 mg/kg) et la CsA (20 mg/kg) n'ont pas permis d'augmenter la rétention calcique, indiquant que les inhibiteurs n'atteignent pas les mitochondries cardiaques (Figure 33).

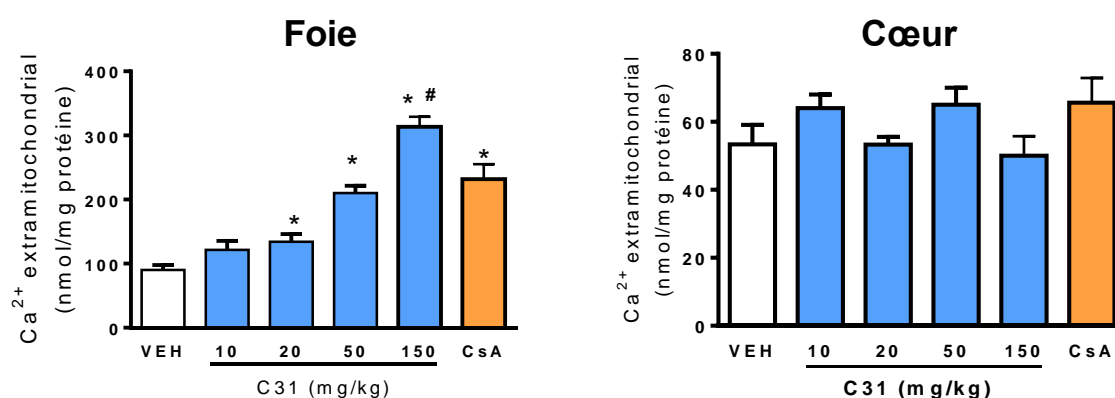


Figure 33 : Rétention calcique mitochondriale après injection *in vivo* du C31 et de la CsA. Les souris ont été perfusées pendant 3 min avec des concentrations croissantes de C31 (10 – 150 mg/kg), de la CsA (20 mg/kg) ou le solvant (VEH) puis les mitochondries cardiaques et hépatiques ont été isolées 2 min après la fin de la perfusion et la rétention calcique a été mesurée. * $p < 0,05$ vs VEH ; # $p < 0,05$ vs CsA.

3.2. Le C31 inhibe l'ouverture du mPTP de mitochondries cardiaques isolées.

Pour vérifier que l'absence d'effet *in vivo* n'est pas liée à une différence entre le cœur et le foie, nous avons vérifié que le C31 est capable d'inhiber l'ouverture du mPTP *in vitro*, dans des mitochondries isolées. Dans un premier temps, des mitochondries de cœur de rat ont été traitées avec des concentrations croissantes de C31 puis soumises à une surcharge calcique pour déclencher le gonflement mitochondrial (Figure 34). Dans ces conditions, le C31 inhibe l'ouverture du mPTP de façon concentration-dépendante avec une IC_{50} de $1,29 \pm 0,35 \mu\text{M}$, comparable à celle observée avec les mitochondries de foie, ce qui indique que le C31 est aussi efficace dans les deux tissus.

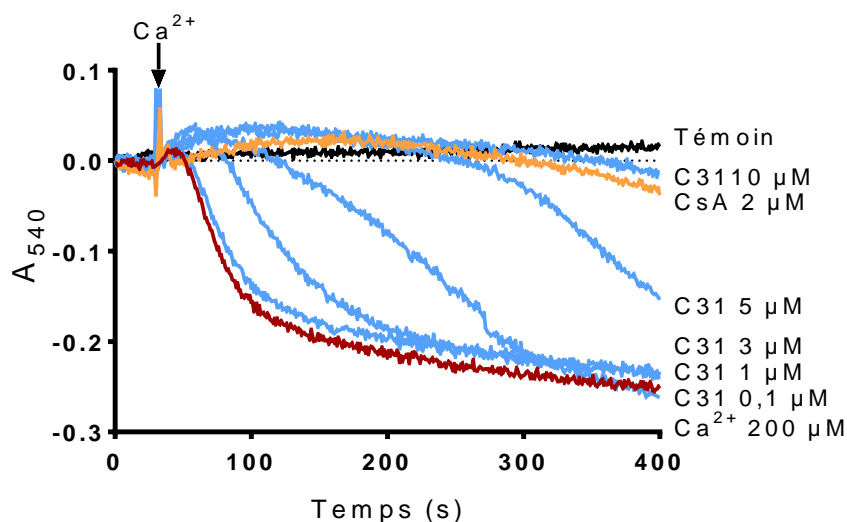


Figure 34 : Expérience représentative de mesure du gonflement mitochondrial. Les mitochondries isolées sont énergisées par le mélange pyruvate/malate puis exposées à $200 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} , ce qui déclenche l'ouverture du mPTP et le gonflement mitochondrial. Ce gonflement peut être inhibé par des concentrations croissantes de C31 ou par la CsA.

Par la suite, nous avons étudié l'effet du C31 sur la rétention calcique. Pour ces expériences, des mitochondries de cœur de souris C57Bl6/J ont été traitées avec $2 \mu\text{M}$ de CsA ou $100 \mu\text{M}$ de C31. En présence de CsA, la rétention calcique mitochondriale est significativement augmentée par rapport aux mitochondries non traitées. Lorsque les mitochondries sont incubées en présence de C31, leur capacité de rétention calcique est doublée et plus importante que celle observée en présence de CsA (Figure 35A).

Pour expliquer cette capacité de rétention calcique plus importante en présence de C31 qu'en présence de CsA, les mêmes expériences ont été réalisées avec des mitochondries isolées de

souris *Ppif*^{-/-}. Chez ces animaux, la capacité de rétention calcique mitochondriale basale est augmentée. De plus, elle n'est pas modifiée par la CsA et est comparable à celle obtenue chez les animaux sauvages en présence de CsA (Figure 35A et 35B). En revanche, l'ajout de C31 permet d'accroître significativement la rétention calcique (Figure 35B et 35C), ce qui démontre que le C31 inhibe l'ouverture du mPTP en inhibant la CypD mais également par un second mécanisme d'action indépendant de la CypD.

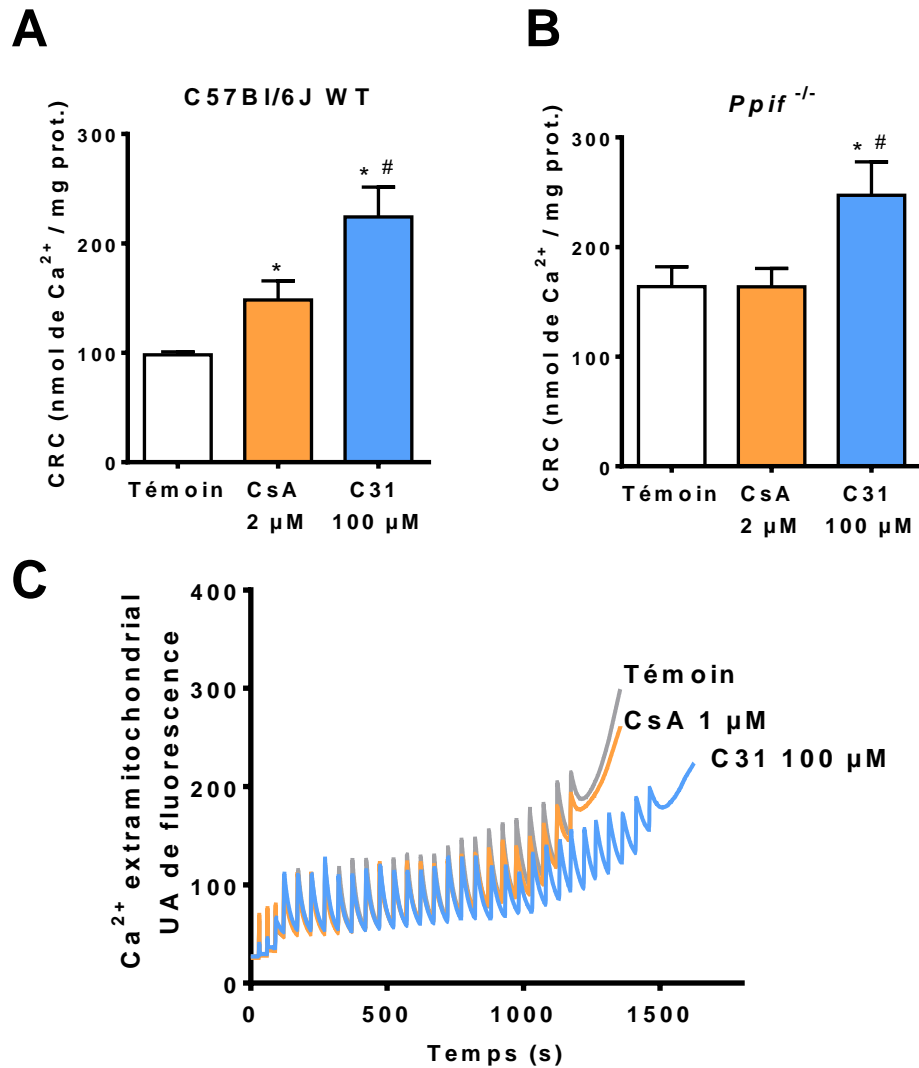


Figure 35 : Effet du C31 et de la CsA dans des mitochondries cardiaques de souris sauvages et *CypD*^{-/-}. **A :** Capacité de rétention calcique (CRC) des mitochondries de souris sauvages (WT) en présence de CsA ou de C31. **B :** Capacité de rétention calcique des mitochondries de souris *Ppif*^{-/-} en présence de CsA ou de C31. **C :** Expérience représentative de mesure de la capacité de rétention calcique des mitochondries de cœur de souris *Ppif*^{-/-}. UA : Unités arbitraires. **p* < 0,05 vs témoin ; #*p* < 0,05 vs CsA.

3.3. Le C31 inhibe l'ouverture du mPTP dans les cardiomyocytes isolés et retarde la mort cellulaire induite par l'hypoxie-reoxygénation.

Nous avons ensuite étudié les effets protecteurs du C31 dans des cardiomyocytes adultes isolés de souris à l'aide d'un modèle d'hypoxie-réoxygénation au cours duquel l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire ont été évalués par microscopie à fluorescence (Figure 36). Les cardiomyocytes ont été soumis à 45 min d'hypoxie suivies de 3 heures de réoxygénation. L'ajout de 100 μM de C31 15 min avant la réoxygénation permet de retarder l'ouverture du mPTP (le t_{mPTP} passant de 62 à 120 min, figure 36C) et diminue ainsi la mort cellulaire. En revanche, dans ce modèle, l'utilisation de la CsA (2 μM) ne modifie pas ces paramètres.

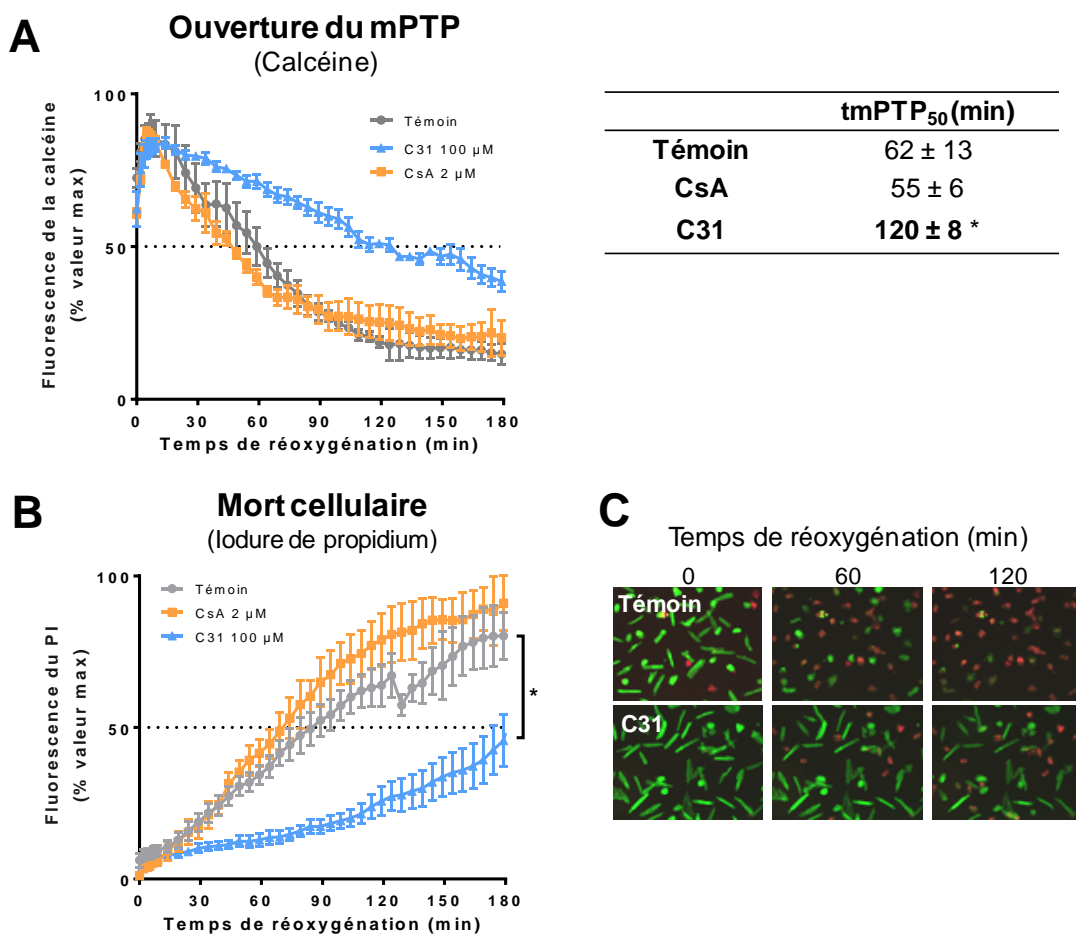


Figure 36 : Modèle d'hypoxie-réoxygénation sur cardiomyocytes adultes isolés de souris. Les cardiomyocytes préalablement marqués par la calcéine (fluorescence verte) ont été soumis à 45 min d'hypoxie suivie de 3h de réoxygénation. **A** : Evolution de la fluorescence de la calcéine au cours de la réoxygénation et temps nécessaire à l'ouverture du 50% du mPTP ($t_{\text{mPTP}50}$). $*p < 0,05$ vs témoin. **B** : Mort cellulaire associée à l'ouverture du mPTP mise en évidence par l'iodure de propidium (fluorescence rouge). $*p < 0,05$. **C** : Images représentatives de l'effet protecteur du C31 au cours de la réoxygénation.

3.4. De fortes concentrations d'inhibiteurs de CypD sont nécessaires pour inhiber l'ouverture du mPTP dans un modèle de cœur isolé-perfusé.

Nous avons ensuite étudié la capacité des inhibiteurs à atteindre les mitochondries cardiaques à l'aide d'un modèle *ex vivo* de cœur isolé-perfusé. Des cœurs de souris C57Bl6/J ont ainsi été perfusés pendant 20 min de façon rétrograde à pression constante avec une solution de perfusion contenant du C31 (100 μ M), de la CsA (2 et 10 μ M) ou leur solvant (DMSO 0,1%). Les mitochondries ont ensuite été isolées et leur capacité de rétention calcique a été évaluée (Figure 37). La capacité de rétention calcique maximale de chaque préparation a été obtenue en présence d'1 μ M de CsA. Dans ce modèle, la perfusion de 100 μ M de C31 ne permet d'obtenir qu'une inhibition d'environ 75% du mPTP dépendant de la CypD. Par ailleurs, il a été nécessaire de perfuser de fortes concentrations de CsA (10 μ M) pour obtenir une inhibition complète, ce qui montre qu'il existe, au niveau du tissu cardiaque, un phénomène limitant la diffusion des inhibiteurs étudiés.

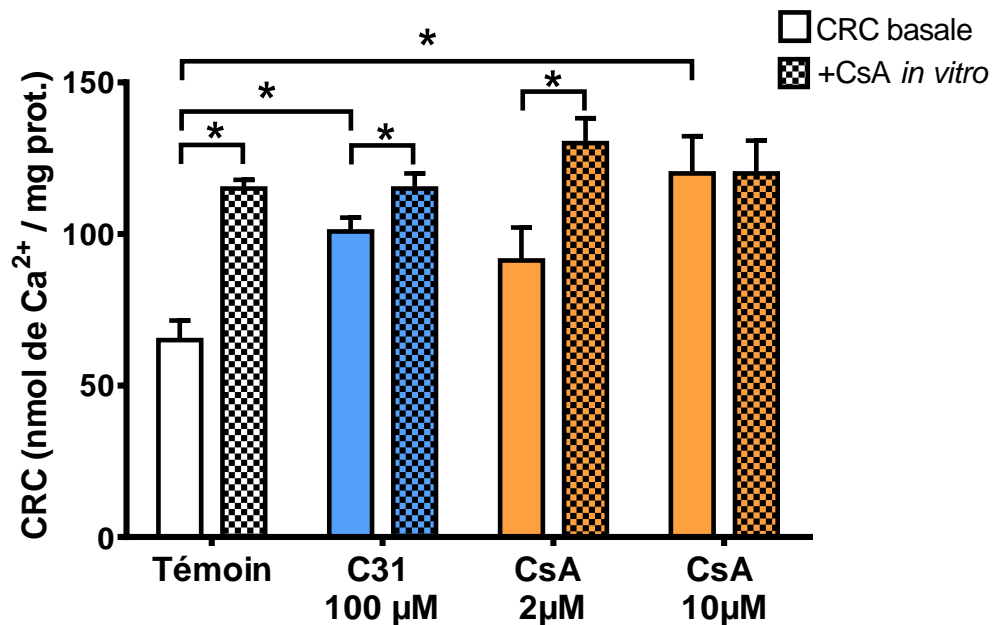
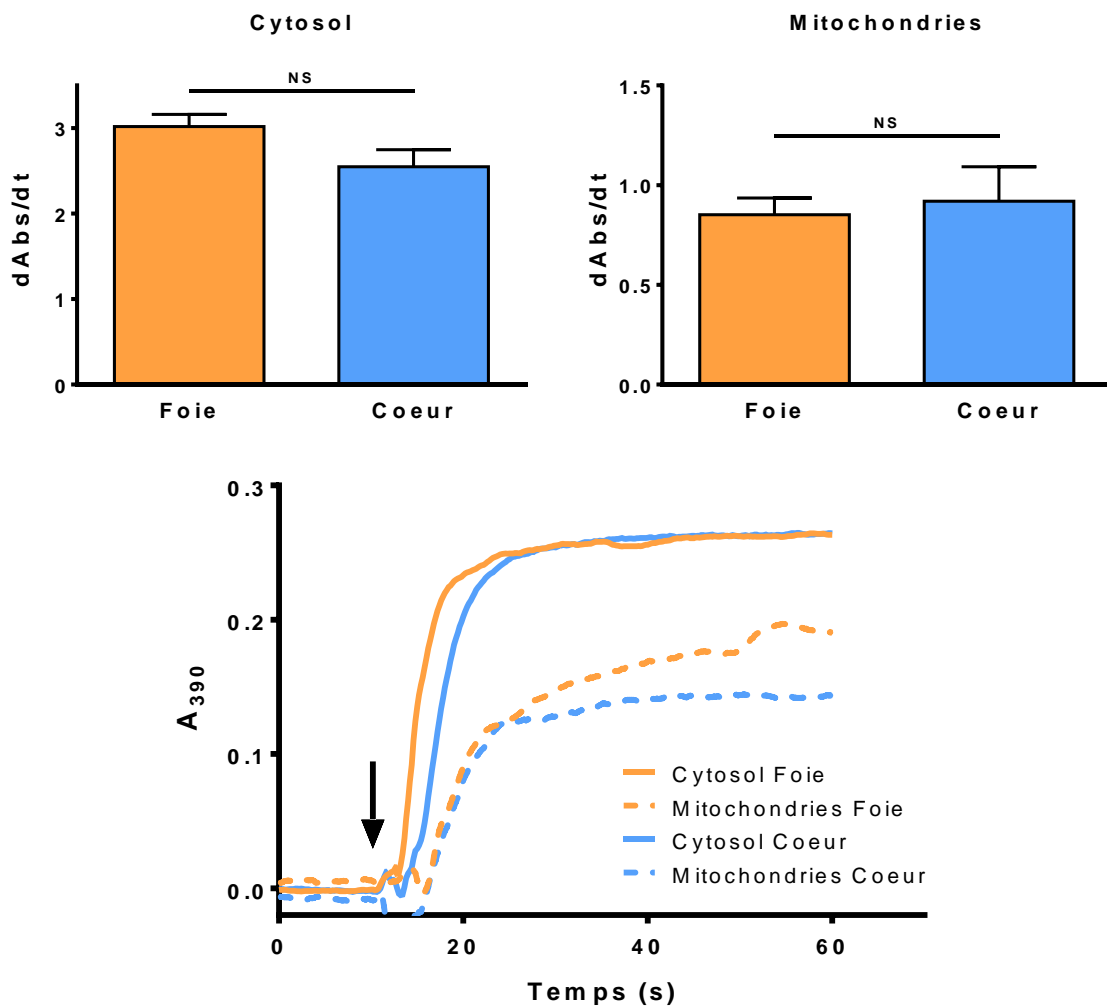


Figure 37 : Capacité de rétention calcique mitochondriale après perfusion des inhibiteurs de CypD dans le modèle de cœur isolé-perfusé. Les mitochondries ont été isolées après 20 minutes de perfusion d'un tampon contenant du C31, de la CsA ou leur solvant (DMSO) puis la capacité de rétention calcique (CRC) a été évaluée. Pour chaque préparation, la CRC maximale a été obtenue en rajoutant 1 μ M de CsA dans la cuve du spectrofluorimètre. * $p < 0,05$

3.5. Les cyclophilines cytosoliques ne sont pas responsables de l'absence d'effet de la CsA et du C31 *in vivo*.

La faible diffusion des inhibiteurs de CypD au niveau des mitochondries cardiaque pourrait être liée à leur interaction avec les autres cyclophilines cellulaires et notamment les cyclophilines cytosoliques. Nous avons donc comparé l'activité peptidylprolyl *cis-trans* isomérase (PPIase) d'extraits cytosoliques et mitochondriaux de cœur et de foie de souris. Cette activité PPIase est le reflet de la quantité de cyclophilines pouvant piéger les inhibiteurs.



Les données obtenues montrent qu'à concentration protéique égale, l'activité PPIase est beaucoup plus importante dans le cytosol que dans les mitochondries pour les deux tissus. En revanche, il n'y a pas de différence d'activité entre les cytosols hépatique et cardiaque ni entre les extraits mitochondriaux des deux tissus (Figure 38). La faible diffusion des inhibiteurs de CypD ne serait donc pas due à une expression plus importante des autres cyclophilines au niveau cardiaque.

4. Conclusion

Ces résultats montrent que, dans les mitochondries cardiaques, le C31 inhibe efficacement l'ouverture du mPTP par un mécanisme d'action original impliquant l'inhibition de la CypD à faibles concentrations et une autre cible à plus fortes concentrations. Cette inhibition est associée à une réduction de la mortalité cellulaire dans un modèle d'hypoxie-réoxygénation. Cependant, son métabolisme rapide et sa faible biodisponibilité cardiaque limitent son utilisation *in vivo*. En effet, le C31 n'atteint pas les mitochondries cardiaques lors de l'administration intraveineuse et il est nécessaire d'en perfuser de fortes concentrations dans le modèle de cœur isolé pour observer un effet. Néanmoins, une optimisation chimique de cette molécule visant à accroître sa stabilité et son affinité pour sa cible pourrait permettre de contourner ces limites et de développer de nouveaux agents cardioprotecteurs.

Discussion générale et conclusion

La mitochondrie est un organite essentiel à la survie cellulaire mais elle peut également en impacter le destin en induisant la mort cellulaire par nécrose ou apoptose. Il existe plusieurs mécanismes de mort cellulaire liés à la mitochondrie et nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'ouverture du mPTP qui joue un rôle crucial dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion.

Notre étude s'est attachée à évaluer les effets de nouveaux ligands de la CypD, les *Small-molecule Cyclophilin Inhibitors* (SMCypI), sur l'ouverture du mPTP en utilisant différents modèles allant de la mitochondrie isolée au modèle d'ischémie-reperfusion hépatique chez la souris. L'objectif initial du projet était d'étudier les propriétés cardioprotectrices de la molécule la plus active mais ce travail a été complété par un important volet hépatoprotection en raison des propriétés pharmacologiques et physicochimiques du dérivé C31.

Effets des *Small-molecule cyclophilin inhibitors* dans les mitochondries isolées

Les premiers résultats d'inhibition du mPTP par ces nouvelles molécules ont été obtenus dans des mitochondries isolées hépatiques. Le choix de cet organe est lié à sa taille, qui permet d'extraire une grande quantité de mitochondries chez un seul animal. Cet aspect était essentiel pour pouvoir réaliser un screening pharmacologique des différents SMCypI et établir des relations concentration-réponse avec une large gamme de concentrations pour chaque molécule. Nous avons ainsi pu montrer, en comparant l'activité d'une dizaine de SMCypI, que cette famille de molécules est capable d'inhiber le gonflement mitochondrial et que cette inhibition est corrélée à celle de la fonction enzymatique de la CypD. Ces premières expériences ont conduit au choix du C31, molécule la plus efficace, pour la suite de notre travail. Par la suite, la mesure de la rétention calcique mitochondriale a permis de mettre en évidence une particularité intéressante du C31 à fortes concentrations, puisque celui-ci permet d'augmenter la rétention calcique mitochondriale de façon beaucoup plus importante que ne le permet la CsA. Nous avons dans un premier temps attribué cet effet au mode d'interaction innovant du C31 avec la poche S2 de la CypD, des molécules présentant ce type d'ancrage n'ayant jamais été décrites. Cependant, les expériences réalisées avec des mitochondries isolées de souris *Ppif*^{-/-}, délétées pour la CypD, ont montré que cet effet est dû à un mécanisme additionnel, indépendant de la CypD. Chez les animaux *Ppif*^{-/-}, la rétention

calcique est identique à celle observée avec les mitochondries issues d'animaux sauvages traitées avec la CsA, ce qui démontre que l'effet maximal observé avec la CsA chez les souris sauvages correspond à une inhibition totale de la CypD.

Des expériences similaires ont été réalisées sur des mitochondries cardiaques de souris et de rats. L'utilisation de mitochondries de cœur de rat est justifiée par la masse de cet organe, dix fois plus importante que chez la souris, ce qui permet de recueillir suffisamment de mitochondries pour réaliser les expériences de gonflement mitochondrial. Dans ces mitochondries, la réponse aux inhibiteurs de CypD (C31 et CsA) est inchangée puisque les IC_{50} calculées dans le tissu cardiaque sont comparables à celles obtenues avec les mitochondries hépatiques, d'ordre micromolaire pour le C31.

Toutefois, au cours de ces expériences de gonflement induit par le calcium nous avons noté une importante différence dans la sensibilité au calcium des mitochondries issues des deux organes lorsque les mitochondries sont énergisées par le mélange pyruvate/malate. Il faut en effet 250 μ M de calcium pour déclencher le gonflement avec les mitochondries de cœur de rat, contre seulement 25 μ M dans les mitochondries hépatiques. Ce mélange de substrats, habituellement utilisé au laboratoire pour énergiser les mitochondries cardiaques, ne permettait pas une rétention calcique satisfaisante avec les mitochondries de foie de souris. Nous avons donc substitué le pyruvate par le glutamate dans nos expériences de mesure de la rétention calcique réalisées sur mitochondries hépatiques, ce qui a permis d'augmenter la capacité rétention calcique basale. Cette différence de sensibilité entre les mitochondries de différents tissus, déjà soulignée par d'autres laboratoires (Friberg et al., 1999 ; Berman et al., 2000 ; Endlicher et al., 2009), ne semble pas due à une différence d'activité de la CypD. En effet, nous avons montré que l'activité PPIase d'extraits mitochondriaux, reflet de l'activité de la CypD, est identique entre le cœur et le foie. Ces résultats sont en contradiction avec les travaux de Li *et al.* (2012) qui montrent, par des expériences de western blot, une expression plus importante de la CypD dans le cœur de souris que dans le foie. D'après ces résultats, il serait donc nécessaire d'augmenter la concentration de C31 ou de CsA dans les mitochondries cardiaques pour inhiber le mPTP puisque ces mitochondries contiennent plus de CypD pouvant potentiellement favoriser l'ouverture du mPTP. Une différence dans les mécanismes de régulation de la CypD, dont l'activité serait plus réprimée au niveau cardiaque qu'au niveau hépatique, pourrait toutefois expliquer cette discordance entre expression protéique et activité catalytique. La présence de partenaires membranaires de la CypD, tels que l'ANT, en quantités différentes pourrait également en être la cause (Li *et al.*, 2012). Néanmoins,

l'hypothèse actuelle impliquant plutôt la F_0F_1 -ATP synthase, également fortement exprimée dans le tissu cardiaque, en tant que constituant majeur du mPTP semble peu compatible avec cette idée.

La présence nécessaire du cycle aromatique sur la chaîne du C31, dont dépend le second mécanisme d'action, laisse penser, par ses propriétés physico-chimiques, que le mode d'action pourrait passer par une interaction spécifique de type hydrophobe au niveau du site actif d'une protéine ou au niveau d'interactions protéine-protéine qui restent à identifier. Nous avons émis plusieurs hypothèses concernant ce site d'action à partir de données de la littérature. Il existe des substances qui peuvent potentialiser l'inhibition du mPTP par la CsA en inhibant le complexe I. C'est le cas de la roténone qui diminue la sensibilité des mitochondries au calcium dans des tissus où la CsA seule est peu efficace (Li *et al.*, 2012 ; Teixeira *et al.*, 2013). Une inhibition du complexe I a un retentissement direct sur la phosphorylation oxydative qui peut être mis en évidence lorsque les mitochondries sont énergisées par le mélange pyruvate/malate ou glutamate/malate qui fournissent le substrat du complexe I *via* le cycle de Krebs. Nous avons montré que, même à fortes concentrations, le C31 ne modifie pas la respiration mitochondriale et avons donc conclu qu'il n'inhibe pas le complexe I. Il existe également des molécules plus efficaces que la CsA. Une certaine classe d'ubiquinones, en particulier l'ubiquinone 0, augmente fortement la rétention calcique mitochondriale (Fontaine *et al.*, 1998). Les ubiquinones sont naturellement présentes au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale au sein de laquelle elles sont chargées de transporter les électrons des complexes I et II vers le complexe III. Sur le C31, la présence d'un cycle aromatique à proximité du groupement urée, contenant un carbonyle, permettait d'envisager une délocalisation électronique et donc une réactivité semblable à celle des ubiquinones, d'autant plus que le C32 qui ne diffère du C31 que par la non-aromaticité de son cycle ne possède pas de second site d'action. En plus de la classe d'ubiquinones inhibitrices du mPTP, il existe une classe d'ubiquinones, comme l'ubiquinone 5, capable d'antagoniser l'effet de l'ubiquinone 0. Nous avons donc exposé les mitochondries isolées à des concentrations équimolaires de C31 et d'ubiquinone 5 et nous n'avons pas constaté de modification de la rétention calcique induite par le C31, ce qui nous a permis de conclure que le mécanisme additionnel du C31 ne reposait pas sur un effet de type « ubiquinone-like ». L'absence de consensus sur les protéines constitutrices ou modulatrices du mPTP rend difficile l'étude de l'interaction directe du C31 avec celles-ci. Il existe néanmoins une protéine récemment suggérée comme pouvant être le composant principal du mPTP. Cette

protéine, la *paraplegin* ou SPG7, est présente au niveau de la membrane mitochondriale et interagit avec la CypD selon un mode CsA-dépendant (Shanmughapriya *et al.*, 2015). Sa délétion permet d'inhiber l'ouverture du mPTP aussi puissamment que la CsA (Shanmughapriya *et al.*, 2015). Cependant, cette cible nous semble peu probable puisque :

1) sa délétion ne permet pas d'obtenir une rétention calcique plus importante que celle obtenue avec la CsA ou avec la délétion de la CypD contrairement à ce qui est observé avec le C31,

2) l'effet de cette protéine semble dépendre uniquement de son association avec la CypD.

On notera cependant que les auteurs ne présentent pas d'expériences de mesure de capacité de rétention calcique avec les mitochondries délétées pour SPG7 en présence de CsA, ou d'un double knockdown SPG7/CypD. Des expériences avec la CsA sont présentées avec le modèle cellulaire calcéine et ionophore calcique mais les conditions expérimentales ne permettent pas de conclure sur un mécanisme additif puisque la délétion de SPG7 ou de la CypD suffit à elle seule à antagoniser totalement l'effet du ionophore. Enfin, d'autres laboratoires ont entre temps développé des inhibiteurs du mPTP à l'aide de techniques de screening à haut débit et ont montré que le ciblage d'autres sites que la CypD, bien que ceux-ci ne soient pas clairement définis, permet effectivement d'obtenir une inhibition du pore plus importante que celle obtenue en présence de CsA (Fancelli *et al.*, 2014 ; Roy *et al.*, 2015 ; Briston *et al.*, 2016 ; Roy *et al.*, 2016).

Effets du *Small-Molecule Cyclophilin Inhibitor* C31 au niveau cellulaire

L'étape suivante de notre projet a été de confirmer l'inhibition du mPTP par le C31 dans des cellules. Nous avons utilisé pour cela un modèle pharmacologique de l'ouverture du mPTP induite par un ionophore calcique, l'A23187, en normoxie. Ce modèle repose sur un marquage des mitochondries par la calcéine en présence de cobalt qui pénètre dans la mitochondrie lors de l'ouverture du mPTP, ce qui provoque l'extinction de la fluorescence de la calcéine. Les ionophores calciques sont des agents chimiques permettant le transport du calcium à travers les membranes biologiques sans utilisation des transporteurs membranaires. Dans notre cas, le ionophore calcique induit une surcharge calcique cytosolique, résorbée par la mitochondrie, ce qui déclenche l'ouverture du mPTP. Ce modèle a permis de confirmer les capacités inhibitrices du C31 dans des hépatocytes primaires de souris. Ce modèle a également permis d'obtenir avec le C31 une inhibition concentration-dépendante identique dans des hépatocytes primaires humains. Ce résultat est intéressant car il montre une absence

de différences inter-espèces et peut laisser envisager une efficacité thérapeutique de cette famille de molécules chez l'homme. De plus, le C31 s'est montré plus efficace que la CsA dans ces expériences puisque l'effet de cette dernière n'est que partiel tandis que 50 à 100 μM de C31 permettent d'inhiber totalement l'effet du ionophore. Plusieurs concentrations de CsA ont été testées dans ce modèle mais seules les concentrations comprises entre 0,2 et 2 μM ont permis de limiter l'ouverture du mPTP. Pour des concentrations plus faibles ou plus élevées, la CsA s'est révélée inefficace voire toxique. Cette faible marge d'efficacité a déjà été décrite (Nazareth *et al.*, 1991 ; Griffiths et Halestrap, 1993 ; Dube *et al.*, 2012) et constitue l'un des principaux défauts de cette molécule. Cette particularité semble être liée à l'activité de la CsA en dehors de la mitochondrie puisque des expériences visant à l'adresser spécifiquement au compartiment mitochondrial permet d'en réduire fortement la toxicité et d'élargir ainsi sa fenêtre d'efficacité (Dube *et al.*, 2012).

Nous avons également employé ce modèle d'ouverture du mPTP pour l'étude des propriétés cardioprotectrices du C31 dans des cellules de la lignée H9C2, dérivées de cardiomyoblastes de rat. Ce modèle cellulaire nous a permis de montrer la même relation concentration-réponse qu'avec les hépatocytes, le C31 inhibant de façon concentration-dépendante, et plus efficacement que la CsA, l'ouverture du mPTP induite par l'A23187. Bien que présentant une expression de protéines typiquement cardiaques, ce type cellulaire est néanmoins très éloigné d'un point de vue physiologique des cardiomyocytes adultes isolés. Pour démontrer un réel effet cardioprotecteur, nous avons donc choisi de travailler avec des cardiomyocytes isolés de souris adultes. Contrairement aux lignées cellulaires cardiaques (HL-1 ou H9C2 par exemple) ou aux cardiomyocytes murins néonataux, ces cellules ne prolifèrent pas et ne peuvent pas être conservées plus de 48 h, période au-delà de laquelle les cellules meurent ou se différencient. Une préparation quotidienne est donc nécessaire. Ces cellules ont en revanche l'avantage d'être parfaitement différenciées et contractiles, reflétant ainsi la physiologie d'un cardiomyocyte. Le modèle d'ouverture du mPTP en conditions normoxiques utilisant différents ionophores calciques n'a cependant pas pu être utilisé avec ces cellules. Notre travail montrant les effets de différents ionophores calciques, électroneutres ou dépendants du potentiel de membrane, dans les cardiomyocytes adultes isolés murins souligne la rigueur méthodologique à laquelle il faut s'astreindre lors de l'utilisation de modèles pharmacologiques de l'ouverture du mPTP au niveau cellulaire. En effet, cette technique de marquage fluorescent associée à l'utilisation d'agents chimiques induisant l'ouverture du mPTP a été employée depuis près de 20 ans avec plusieurs lignées cellulaires par d'autres

laboratoires (Lemasters *et al.*, 1998 ; Petronilli *et al.*, 2001 ; Dumas *et al.*, 2009) mais a également fonctionné dans nos travaux utilisant les autres types cellulaires. Pourtant, dans le cas des cardiomyocytes, il semble que la résistance au calcium des mitochondries cardiaques soulignée dans les mitochondries isolées et probablement liée aux flux calciques importants rencontrés à chaque contraction cardiaque, joue un rôle dans la non spécificité du transport de cations observée avec l'A23187. Par ailleurs, le calcium est plus fortement régulé dans les cardiomyocytes adultes que dans les autres types cellulaires, notamment pour assurer le fonctionnement de l'appareil contractile, ce qui peut contribuer à cette résistance. Ainsi, le réticulum sarcoplasmique maintient, *via* les pompes SERCA, une faible concentration calcique au niveau cytosolique afin de réguler les cycles de contraction-décontraction. Dans ces conditions, nous avons montré que l'A23187 interagit alors avec le cobalt, un cation divalent libre et fortement concentré par la technique de marquage et le transporte vers la mitochondrie au sein de laquelle le cobalt réagit avec la calcéïne et provoque la diminution de sa fluorescence indépendamment de l'ouverture du mPTP rendant ce modèle inutilisable dans ces cellules.

Pour étudier l'ouverture du mPTP dans les cardiomyocytes adultes, le choix du modèle cellulaire s'est donc porté sur l'hypoxie-réoxygénation puisque nous avons montré que l'ouverture du mPTP et la mort cellulaire qui y est associée sont bien dépendants de la CypD. En effet, lorsque des cardiomyocytes isolés de souris *Ppif*^{-/-} sont soumis à 45 min d'hypoxie, l'ouverture du mPTP est fortement retardée lors de la réoxygénation. Ce modèle, bien que long et complexe, présente l'avantage de mimer les phénomènes d'ischémie-reperfusion en privant les cardiomyocytes d'oxygène et de glucose tout en maintenant leur demande énergétique par stimulation électrique. Du fait de sa durée, une seule expérience peut être réalisée pour chaque préparation et nous avons donc choisi d'étudier uniquement la concentration la plus efficace de C31 obtenue avec les autres types cellulaires et d'en comparer les effets avec la CsA. Le traitement des cellules par le C31 juste avant la réoxygénation et pendant les premières minutes de celle-ci permet de ralentir l'ouverture du mPTP, de limiter la mort cellulaire et de préserver la morphologie des cardiomyocytes. De façon surprenante, la CsA n'a pas permis d'obtenir d'inhibition du mPTP. Plusieurs concentrations et modalités de traitement ont été testées sans succès. Pourtant, des travaux antérieurs du laboratoire ont montré, avec ce modèle mais en utilisant des cardiomyocytes de rat, que la CsA permettait effectivement de ralentir la diminution de la fluorescence de la calcéïne et de retarder la mort cellulaire (Assaly *et al.*, 2012). De même, l'inhibition du mPTP

par la CsA dans des cardiomyocytes de souris soumis à l'hypoxie-reoxygénation a été observée par d'autres (Teixeira *et al.*, 2013). Cette absence d'effet protecteur chez la souris sauvage, pourtant obtenu chez les souris *Ppif*^{-/-}, renforce l'idée que la CsA possède une fenêtre thérapeutique très étroite déjà démontrée par d'autres laboratoires (Nazareth *et al.*, 1991 ; Griffiths et Halestrap, 1993 ; Dube *et al.*, 2012). Il existe aussi certainement une différence entre les cardiomyocytes de rat et ceux de souris puisque pour pouvoir observer une inhibition du mPTP chez la souris nous utilisons des durées d'hypoxie de 45 minutes contre 2h chez le rat. En effet, si les cardiomyocytes de souris *Ppif*^{-/-} sont soumis à une hypoxie plus longue, de 90 minutes, une proportion non négligeable des cellules meurt au cours de celle-ci et, lors de la réoxygénation, l'absence de CypD ne permet pas de limiter l'ouverture du mPTP dans les cellules restantes. Dans ces conditions il n'y a aucune différence entre les résultats obtenus avec les cardiomyocytes de souris *Ppif*^{-/-} et ceux obtenus avec les cellules de souris sauvages. Ceci est certainement lié au stress cellulaire plus important que subissent les cellules au cours de la longue période d'hypoxie, comme en témoigne le grand nombre de cellules qui meurent pendant cette phase, ou à une plus grande fragilité des cardiomyocytes de souris. Ces résultats soulignent ainsi que le ciblage unique de la CypD ne permet de protéger les cellules que lors d'un stress modéré et que pour protéger plus de cellules ou pour limiter la mort cellulaire lors d'un stress plus important il est nécessaire de développer de nouvelles molécules plus efficaces, agissant à d'autres niveaux du mPTP.

Effets du *Small-Molecule Cyclophilin Inhibitor C31 in vivo.*

L'étape suivante du projet a consisté à mettre en évidence la capacité du C31 à atteindre les mitochondries après injection intraveineuse pour définir la dose à utiliser pour les expériences d'ischémie-reperfusion.

Nous avons ainsi montré que les SMCypI permettent d'augmenter la capacité de rétention calcique des mitochondries hépatiques, ce qui démontre leur capacité à inhiber le mPTP *in vivo*. Ceci tend à montrer que le C31 s'accumule dans le foie. Cette accumulation est d'autant plus intéressante qu'elle permet d'atteindre la mitochondrie très rapidement. L'inhibition du mPTP est en effet mise en évidence seulement deux minutes après la perfusion. De plus, lorsqu'une forte dose de C31 (150 mg/kg) est administrée, son efficacité est plus élevée que celle de la CsA, ce qui indique que le site d'action additionnel peut également être atteint *in vivo* par la molécule. Cette dose efficace, qui correspond à la limite acceptable entre solubilité et volume d'injection, a permis d'établir la preuve de concept du potentiel hépatoprotecteur de

cette molécule dans le modèle d'ischémie-reperfusion hépatique. Ce modèle, qualifié d'ischémie « chaude » car l'organe est maintenu à la température du corps de l'animal, reflète la situation rencontrée au cours de certaines chirurgies hépatiques telles que la résection ou les traumatismes hépatiques. Il serait aussi intéressant d'étudier l'effet de ces molécules dans l'ischémie-reperfusion dite « froide » qui a lieu lors de la transplantation hépatique, au cours de laquelle le greffon est préservé dans une solution à 4°C jusqu'à son implantation.

L'effet hépatoprotecteur du C31 a été objectivé par la restauration des fonctions mitochondriales après 10 minutes de reperfusion, période pendant laquelle le mPTP est actif. Néanmoins, des expériences complémentaires montrent que le C31 ne permet pas de prévenir les lésions nécrotiques survenant à la phase tardive (6 h ou 24 h) de reperfusion, les lobes ischémiés présentant alors une nécrose massive de l'ordre de 80%. Cette absence d'effet protecteur à long terme peut être expliquée par la courte demi-vie du C31, rapidement métabolisé par le foie, qui ne permettrait pas une inhibition du mPTP pendant plus de quelques minutes. Dans des essais de stabilité utilisant des microsomes hépatiques, le C31 présente en effet une très courte demi-vie, de l'ordre de quelques minutes (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2016). Le mécanisme exact de cette dégradation rapide reste néanmoins incertain. La voie majeure de dégradation des xénobiotiques par le foie repose sur l'activité oxydative des cytochromes P450. Nous avons donc essayé de prolonger l'effet du C31 en inhibant ces enzymes hépatiques. Les expériences ont été réalisées soit par gavage des animaux au kétoconazole pendant 3 jours afin d'inhiber le cytochrome P450 3A4, soit par injection d'un inhibiteur non spécifique des cytochromes P450, l'aminobenzotriazole, 30 minutes avant l'administration de C31 (Balani *et al.*, 2004). Cette stratégie n'a pas permis de maintenir une efficacité prolongée de la molécule puisque, chez ces animaux, la rétention calcique des mitochondries de foie mesurée seulement 30 min après l'injection est identique à celle obtenue chez les animaux non traités. A l'inverse, l'augmentation de la capacité de rétention calcique qui accompagne l'administration de CsA persiste à 30 min. Une autre hypothèse pour expliquer ce manque de protection à long terme repose sur les mécanismes intervenant au cours de la phase tardive de la reperfusion, hautement inflammatoire, qui n'impliquent certainement plus l'ouverture du mPTP mais plutôt les dégâts causés par l'infiltration lymphocytaire et l'inflammation (Konishi *et al.*, 2017). Nous avons obtenu des images de microscopie qui montrent cet important infiltrat et la nécrose hépatocytaire environnante après 24 h de reperfusion mais les dommages tissulaires observés sont très probablement liés à la dissipation de l'effet du C31 rapidement après le début de la reperfusion.

L'objectif initial de notre projet était d'étudier les propriétés cardioprotectrices des nouveaux inhibiteurs de CypD. Cependant, leur incapacité à atteindre les mitochondries cardiaques a restreint cette partie de nos travaux à des modèles *in vitro* et *ex vivo*. Plusieurs hypothèses peuvent tenter d'expliquer ce phénomène. Tout d'abord, l'administration par voie jugulaire du C31 et de la CsA permet aux molécules de passer en premier lieu par le cœur mais seule une faible proportion du sang éjectée par le ventricule gauche est distribuée dans les coronaires. Ainsi, dès les premiers instants, la majeure partie du traitement est distribuée dans la circulation générale puis traverse le foie avant de revenir au cœur. L'importante capacité du foie à extraire et métaboliser les xénobiotiques circulants peut ainsi être à l'origine de l'absence d'effet cardiaque des molécules administrées. La structure chimique du C31 découle des modifications chimiques apportées pour augmenter son pouvoir inhibiteur mais elle n'a pas été conçue pour résister au métabolisme hépatique. Des dérivés plus récents ont été modifiés en vue d'accroître leur stabilité métabolique mais nous avons montré, dans des mitochondries isolées, que de telles modifications suppriment l'effet additionnel indépendant de la CypD observé avec le C31. Ces nouvelles molécules, plus actives et beaucoup plus stables biologiquement, restent néanmoins d'intéressants inhibiteurs de CypD.

Une autre hypothèse concerne la biodisponibilité mitochondriale des inhibiteurs de CypD, C31 mais également CsA. En effet, la plupart des stratégies de post-conditionnement pharmacologique ciblent des récepteurs ou des échangeurs situés au niveau de la membrane cellulaire des cardiomyocytes. C'est le cas par exemple de l'adénosine, de la morphine ou du cariporide. Pour atteindre leur cible au niveau des cardiomyocytes, ces molécules n'ont besoin que de traverser l'endothélium capillaire. Le ciblage direct du mPTP requiert quant à lui que les substances administrées pénètrent dans les cardiomyocytes puis dans la mitochondrie, ce qui ajoute deux barrières supplémentaires à franchir. Nos expériences sur les cellules montrent que le C31 est capable de traverser ces barrières et atteint la mitochondrie. De plus, les inhibiteurs de CypD peuvent être piégés par les autres cyclophilines de la cellule. En effet, l'abondance des cyclophilines cytosoliques, qui partagent une forte homologie du site actif avec la CypD, représente autant de sites d'interactions pouvant détourner les molécules de leur cible mitochondriale. Cependant, nos travaux réalisés sur les extraits cytosoliques et mitochondriaux ne montrent pas de différence d'activité enzymatique des cyclophilines entre le cœur et le foie, ce qui ne semble pas pouvoir expliquer l'absence d'effet des inhibiteurs de CypD au niveau des mitochondries cardiaques. Ce serait donc la forte captation hépatique qui permettrait d'atteindre des concentrations cellulaires de C31 ou de CsA assez élevées pour

qu'une quantité suffisante de molécule pénètre dans la mitochondrie. A l'inverse, la faible capacité d'extraction des cardiomyocytes ne permettrait pas d'atteindre de telles concentrations.

La dernière partie de notre travail souligne la difficulté de cibler les mitochondries cardiaques. La stabilité des composés est primordiale car dans un organisme entier une grande partie est captée par le foie et peut subir un métabolisme oxydatif. Cependant, de façon surprenante, la perfusion directe des inhibiteurs de CypD dans les coronaires d'un cœur isolé-perfusé ne permet pas forcément d'aboutir à une inhibition puissante de la CypD. Nous avons utilisé un modèle de perfusion à pression élevée afin d'être sûrs de perfuser l'arbre coronaire mais, pour atteindre les mitochondries et augmenter leur capacité de rétention calcique, de fortes concentrations de C31 ou de CsA ont été nécessaires. Pourtant, plusieurs études ont montré, en utilisant également un montage de type Langendorff, que la perfusion de CsA permettait de limiter la taille d'infarctus dans des modèles *ex vivo* d'ischémie-reperfusion myocardique. A la différence de nos expériences chez la souris, ces études ont été réalisées chez le rat. Certaines d'entre-elles ont introduit la CsA au moment de la reperfusion pendant des temps très brefs (Prendes *et al.*, 2008 ; Duan *et al.*, 2011) et l'on peut supposer que l'ischémie a pu fragiliser l'endothélium, favorisant le passage de la molécule. Cependant, d'autres laboratoires ont utilisé la CsA en pré-conditionnement, lorsque que l'endothélium coronaire est intact et ont montré que la CsA atteignait rapidement les mitochondries à des concentrations de 0,2 μM (Griffiths et Halestrap, 1993 ; Halestrap *et al.*, 1997 ; Clarke *et al.*, 2002). Dans le cas présent, nos résultats semblent indiquer qu'atteindre la CypD au sein des mitochondries cardiaques est rendu difficile par des barrières présentes au sein même de l'organe et que dans un organisme entier le foie limite encore plus la disponibilité des molécules par sa capacité d'extraction. Le développement de stratégies de ciblage est donc un enjeu majeur pour adresser les molécules cardioprotectrices spécifiquement au cœur, voire même uniquement au niveau de la zone ischémique.

Les nombreux échecs rencontrés lors des essais cliniques soulignent la difficulté de transposition des résultats d'études précliniques (les derniers échecs majeurs et leurs causes probables ont été recensés par un groupe de travail de la Société Européenne de Cardiologie : Hausenloy *et al.*, 2017). Dans la majorité des modèles précliniques, les animaux sont jeunes et ne présentent pas de comorbidités telles que le diabète, les dyslipidémies ou l'obésité, contrairement aux patients subissant un infarctus du myocarde. De plus, l'utilisation de souches consanguines ne reflète pas la variabilité interindividuelle. Néanmoins, ces travaux

ont permis de mettre en évidence des mécanismes fondamentaux impliqués dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion et de conditionnements. Le choix de l'inhibition de la CypD, modulateur essentiel du mPTP, permet d'agir directement en aval des voies de signalisation cardioprotectrices qui aboutissent principalement à la mitochondrie et inhibent le mPTP. Cette stratégie permet donc de s'affranchir des cascades de phosphorylation, des translocations de protéines et d'éventuelles transcriptions ce qui représente un gain de temps non négligeable et permet d'inhiber le mPTP avec une efficacité « maximale ». Toutefois, la simple inhibition de la CypD n'est certainement pas suffisante puisque plusieurs travaux ont montré que le mPTP pouvait toujours s'ouvrir lorsque les stimuli sont trop importants (Baines *et al.*, 2005 ; Nakagawa *et al.*, 2005), ce que nous avons observé avec les mitochondries de souris *Ppif*^{-/-}. Dans ces conditions, une molécule permettant d'augmenter encore plus la résistance au calcium permettrait de dépasser cette limite. D'autre part, l'association de plusieurs molécules agissant à différents niveaux des événements à l'origine des lésions de reperfusion peut également être envisagée pour obtenir un effet additif, voire synergique. L'inconvénient majeur de cette dernière approche réside dans l'importante complexification de la conception des essais cliniques, notamment en ce qui concerne le choix des doses de chaque produit administré et la composition des groupes de patients.

Les récents échecs de cardioprotection avec la CsA ne doivent pas faire abandonner le concept de post-conditionnement pharmacologique. Le recrutement des patients de l'essai CIRCUS a probablement inclus des patients aux profils trop hétérogènes en termes de durée d'ischémie. En effet, il est établi que pour des ischémies de courte durée, la taille d'infarctus et les lésions de reperfusion sont limitées, ne justifiant pas l'adjonction d'un traitement cardioprotecteur au moment de la reperfusion. De même, pour de longues périodes séparant le début des symptômes et la prise en charge thérapeutique, l'aire ischémiée présente déjà des lésions étendues qui ne pourront être réduites. Un défi important pour les années à venir sera de définir une fenêtre temporelle pour laquelle les patients coronariens pourront bénéficier de l'inhibition du mPTP.

Implication du mPTP dans d'autres pathologies.

Un nombre croissant d'études soulignent une participation probable du mPTP dans d'autres pathologies que les phénomènes d'ischémie-reperfusion. Parmi celles-ci, les maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, dont la prévalence augmente avec le vieillissement global de la population, sont des cibles privilégiées, d'autant

plus que l'arsenal thérapeutique actuel est restreint. L'inhibition du mPTP dans ces maladies pourrait représenter une nouvelle approche thérapeutique. Des expériences réalisées dans un modèle murin d'amyotrophie latérale ont montré que le traitement de ces souris par un inhibiteur du mPTP permet une amélioration des troubles moteurs ainsi qu'une prolongation de la durée de vie. Toutefois, ce type de pathologies nécessite un traitement chronique, à la différence de l'inhibition du mPTP lors de la reperfusion, ce qui semble incompatible avec le ciblage de la CypD. En effet, même si les rôles physiologiques de la CypD restent mal connus, l'inhibition chronique de cette dernière pourrait favoriser les perturbations métaboliques et l'apparition de pathologies cardiaques. Une plus faible réserve contractile cardiaque et une tendance à l'obésité, quoique ne touchant pas toutes les souris d'une même portée, ont par exemple été observées chez des souris délétées pour la CypD. Ainsi, plutôt que de cibler uniquement la CypD, qui ne fait que sensibiliser le mPTP aux différents stimuli tels que la surcharge calcique ou le stress oxydant, l'inhibition « directe » du mPTP serait préférable. Cependant, la recherche d'agents pharmacologiques de ce type est rendue difficile par l'absence de consensus sur la structure exacte du pore.

En conclusion, notre travail a permis d'identifier les *Small-molecule Cyclophilin Inhibitors* comme de nouveaux inhibiteurs de CypD qui limitent l'ouverture du mPTP dans les mitochondries et les cellules cardiaques et hépatiques. Ce travail apporte également la preuve de concept des propriétés hépatoprotectrices du composé C31 en démontrant sa capacité à restaurer les fonctions mitochondriales lorsqu'il est administré au moment de la reperfusion chez la souris. Cependant il sera nécessaire d'effectuer un travail de pharmacomodulation pour obtenir, sur la base du composé C31, de nouveaux dérivés plus stables et plus efficaces. Une analyse de structure-activité incluant de nombreux composés pourrait par ailleurs permettre d'identifier le second site d'action de cette molécule et donc d'obtenir de nouveaux candidats efficaces en termes de cardioprotection.

Références bibliographiques

Abramov AY, Canevari L, Duchen MR. (2004) Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta*. 1742: 81-87.

Abramov AY, Fraley C, Diao CT, Winkfein R, Colicos MA, Duchen MR, French RJ, Pavlov E. (2007) Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 18091-18096.

Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP, Sammut IA. (2005) Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*. 19: 1088-1095.

Ahmed-Belkacem A, Colliandre L, Ahnou N, Nevers Q, Gelin M, Bessin Y, Brillet R, Cala O, Douguet D, Bourguet W, Krimm I, Pawlotsky JM, Guichou JF. (2016) Fragment-based discovery of a new family of non-peptidic small-molecule cyclophilin inhibitors with potent antiviral activities. *Nat Commun*. 7: 12777.

Alavian KN, Beutner G, Lazrove E, Sacchetti S, Park HA, Licznerski P, Li H, Nabili P, Hockensmith K, Graham M, Porter GA Jr, Jonas EA. (2014) An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111: 10580-10585.

Ambrosio G, Becker LC, Hutchins GM, Weisman HF, Weisfeldt ML. (1986) Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: insights into the pathophysiology of reperfusion injury. *Circulation*. 74: 1424-1433.

Andrienko TN, Pasdois P, Pereira GC, Ovens MJ, Halestrap AP. (2017) The role of succinate and ROS in reperfusion injury - A critical appraisal. *J Mol Cell Cardiol*. 110: 1-14.

Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M. (2005a) Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 38: 367-374.

Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. (2005b) Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 111: 194-197.

Assaly R, de Tassigny Ad, Paradis S, Jacquin S, Berdeaux A, Morin D. (2012) Oxidative stress, mitochondrial permeability transition pore opening and cell death during hypoxia-reoxygenation in adult cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol*. 675: 6-14.

Azzolin L, Antolini N, Calderan A, Ruzza P, Sciacovelli M, Marin O, Mammi S, Bernardi P, Rasola A. (2011) Antamanide, a derivative of Amanita phalloides, is a novel inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *PLoS One*. 6: e16280.

Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD. (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. 434: 658-662.

- Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD. (2007) Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol.* 9: 550-555.
- Balani SK, Li P, Nguyen J, Cardoza K, Zeng H, Mu DX, Wu JT, Gan LS, Lee FW. (2004) Effective dosing regimen of 1-aminobenzotriazole for inhibition of antipyrine clearance in guinea pigs and mice using serial sampling. *Drug Metab Dispos.* 32: 1092-1095.
- Bao H, Ge Y, Zhuang S, Dworkin LD, Liu Z, Gong R. (2012) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β prevents NSAID-induced acute kidney injury. *Kidney Int.* 81: 662-673.
- Bär FW, Tzivoni D, Dirksen MT, Fernández-Ortiz A, Heyndrickx GR, Brachmann J, Reiber JH, Avasthy N, Tatsuno J, Davies M, Hibberd MG, Krucoff MW; CASTEMI Study Group. (2006) Results of the first clinical study of adjunctive CALdaret (MCC-135) in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-Elevation Myocardial Infarction: the randomized multicentre CASTEMI study. *Eur Heart J.* 27: 2516-2523.
- Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. (2008) Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *J Biol Chem.* 283: 26307-26311.
- Beatrice MC, Stiers DL, Pfeiffer DR. (1984) The role of glutathione in the retention of Ca²⁺ by liver mitochondria. *J Biol Chem.* 259: 1279-1287.
- Belaidi E, Decorps J, Augeul L, Durand A, Ovize M. Endoplasmic reticulum stress contributes to heart protection induced by cyclophilin D inhibition. *Basic Res Cardiol.* (2013) Jul;108(4):363.
- Bell RM, Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol.* (2003) Feb;35(2):185-93.
- Benhabbouche S, Crola da Silva C, Abrial M, Ferrera R. The basis of ischemia-reperfusion and myocardial protection. *Ann Fr Anesth Reanim.* (2011) 30 Suppl 1:S2-16.
- Bergeaud M, Mathieu L, Guillaume A, Moll UM, Mignotte B, Le Floch N, Vayssière JL, Rincheval V. (2013) Mitochondrial p53 mediates a transcription-independent regulation of cell respiration and interacts with the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase. *Cell Cycle.* 12: 2781-2793.
- Berman SB, Watkins SC, Hastings TG. (2000) Quantitative biochemical and ultrastructural comparison of mitochondrial permeability transition in isolated brain and liver mitochondria: evidence for reduced sensitivity of brain mitochondria. *Exp Neurol.* 164: 415-425.
- Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. (1999) Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem.* 264: 687-701. Erratum in: *Eur J Biochem* (1999) 265: 847.
- Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabó I, Zoratti M. (1992) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem.* 267: 2934-2939.

- Bernardi P, Veronese P, Petronilli V. (1993) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me^{2+} binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J Biol Chem.* 268: 1005-1010.
- Bernardi P, von Stockum S. (2012) The permeability transition pore as a Ca^{2+} release channel: new answers to an old question. *Cell Calcium.* 52: 22-27.
- Bernardi P. (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev.* 79: 1127-1155.
- Beutner G, Alanzalon RE, Porter GA Jr. (2017) Cyclophilin D regulates the dynamic assembly of mitochondrial ATP synthase into synthasomes. *Sci Rep.* 7: 14488.
- Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R. (2010) Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 105: 771-785.
- Bognar Z, Kalai T, Palfi A, Hanto K, Bognar B, Mark L, Szabo Z, Tapodi A, Radnai B, Sarszegi Z, Szanto A, Gallyas F Jr, Hideg K, Sumegi B, Varbiro G. (2006) A novel SOD-mimetic permeability transition inhibitor agent protects ischemic heart by inhibiting both apoptotic and necrotic cell death. *Free Radic Biol Med.* 41: 835-848.
- Bolli R, Stein AB, Guo Y, Wang OL, Rokosh G, Dawn B, Molkenstein JD, Sanganalmath SK, Zhu Y, Xuan YT. A murine model of inducible, cardiac-specific deletion of STAT3: its use to determine the role of STAT3 in the upregulation of cardioprotective proteins by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* (2011) 50(4):589-597.
- Bonora M, Bravo-San Pedro JM, Kroemer G, Galluzzi L, Pinton P. (2014) Novel insights into the mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle.* 13: 2666-2670.
- Briston T, Lewis S, Koglin M, Mistry K, Shen Y, Hartopp N, Katsumata R, Fukumoto H, Duchon MR, Szabadkai G, Staddon JM, Roberts M, Powney B. (2016) Identification of ER-000444793, a Cyclophilin D-independent inhibitor of mitochondrial permeability transition, using a high-throughput screen in cryopreserved mitochondria. *Sci Rep.* 6: 37798.
- Brustovetsky N, Tropschug M, Heimpel S, Heidkämper D, Klingenberg M. (2002) A large Ca^{2+} -dependent channel formed by recombinant ADP/ATP carrier from *Neurospora crassa* resembles the mitochondrial permeability transition pore. *Biochemistry.* 41: 11804-11811.
- Carreira RS, Lee Y, Ghochani M, Gustafsson ÅB, Gottlieb RA. (2010) Cyclophilin D is required for mitochondrial removal by autophagy in cardiac cells. *Autophagy.* 6: 462-472.
- Chakrabarti S, Hoque AN, Karmazyn M. (1997) A rapid ischemia-induced apoptosis in isolated rat hearts and its attenuation by the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE 642 (cariporide). *J Mol Cell Cardiol.* 29: 3169-3174.
- Chauvin C, De Oliveira F, Ronot X, Mousseau M, Leverve X, Fontaine E. (2001) Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem.* 276: 41394-41398.
- Chelli B, Falleni A, Salvetti F, Gremigni V, Lucacchini A, Martini C. (2001) Peripheral-type benzodiazepine receptor ligands: mitochondrial permeability transition induction in rat cardiac tissue. *Biochem Pharmacol.* 61: 695-705.

- Chen B, Xu M, Zhang H, Wang JX, Zheng P, Gong L, Wu GJ, Dai T. (2013) Cisplatin-induced non-apoptotic death of pancreatic cancer cells requires mitochondrial cyclophilin-D-p53 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 437: 526-531.
- Chen S, Li S. (2012) The Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research.* 18: 161-165.
- Chen SH, Li DL, Yang F, Wu Z, Zhao YY, Jiang Y. (2014) Gemcitabine-induced pancreatic cancer cell death is associated with MST1/cyclophilin D mitochondrial complexation. *Biochimie.* 103:71-79.
- Chin JH, Tse FW, Harris K, Jhamandas JH. (2006) Beta-amyloid enhances intracellular calcium rises mediated by repeated activation of intracellular calcium stores and nicotinic receptors in acutely dissociated rat basal forebrain neurons. *Brain Cell Biol.* 35: 173-186.
- Chinopoulos C, Konràd C, Kiss G, Metelkin E, Töröcsik B, Zhang SF, Starkov AA. (2011) Modulation of F₀F₁-ATP synthase activity by cyclophilin D regulates matrix denine nucleotide levels. *FEBS J.* 278: 1112-1125.
- Clarke SJ, Khaliulin I, Das M, Parker JE, Heesom KJ, Halestrap AP. (2008) Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation. *Circ Res.* 102: 1082-1090.
- Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. (2002) Sanglifehrin 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.* 277: 34793-34799.
- Claypool SM, Oktay Y, Boontheung P, Loo JA, Koehler CM. (2008) Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial innermembrane. *J Cell Biol.* 182: 937-950. Erratum in: *J Cell Biol.* (2012) 197: 1029.
- Connern CP, Halestrap AP. (1992) Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochem J.* 284 (Pt 2): 381-385.
- Costa AD, Garlid KD. (2008) Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295(2):H874-882.
- Cour M, Loufouat J, Paillard M, Augeul L, Goudable J, Ovize M, Argaud L. (2011) Inhibition of mitochondrial permeability transition to prevent the post-cardiac arrest syndrome: a pre-clinical study. *Eur Heart J.* 32: 226-235.
- Crompton M, Costi A. (1988) Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload. *Eur J Biochem.* 178: 489-501.
- Crompton M, Ellinger H, Costi A. (1988) Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J.* 255: 357-360.

Crompton M, Virji S, Ward JM. (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem.* 258: 729-735.

Crompton M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 341 (Pt 2): 233-249.

Crouser ED, Julian MW, Huff JE, Joshi MS, Bauer JA, Gadd ME, Wewers MD, Pfeiffer DR. (2004) Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia. *Crit Care Med.* 32: 478-88.

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. (2015) Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 373: 1021-1031.

Datler C, Pazarentzos E, Mahul-Mellier AL, Chaisaklert W, Hwang MS, Osborne F, Grimm S. (2014) CKMT1 regulates the mitochondrial permeability transition pore in a process that provides evidence for alternative forms of the complex. *J Cell Sci.* 127(Pt 8): 1816-1828.

de Macedo DV, da Costa C, Pereira-Da-Silva L. (1997) The permeability transition pore opening in intact mitochondria and submitochondrial particles. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 118: 209-216.

De Paulis D, Chiari P, Teixeira G, Couture-Lepetit E, Abrial M, Argaud L, Gharib A, Ovize M. (2013) Cyclosporine A at reperfusion fails to reduce infarct size in the in vivo rat heart. *Basic Res Cardiol.* 108: 379.

Detaille D, Guigas B, Chauvin C, Batandier C, Fontaine E, Wiernsperger N, Leverve X. (2005) Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes.* 54: 2179-2187.

Di Lisa F, Blank PS, Colonna R, Gambassi G, Silverman HS, Stern MD, Hansford RG. (1995) Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition. *J Physiol.* 486 (Pt1): 1-13.

Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, Yan Y, Wang C, Zhang H, Molkentin JD, Gunn-Moore FJ, Vonsattel JP, Arancio O, Chen JX, Yan SD. (2008) Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med.* 14: 1097-1105.

Du H, Guo L, Wu X, Sosunov AA, McKhann GM, Chen JX, Yan SS. (2014) Cyclophilin D deficiency rescues A β -impaired PKA/CREB signaling and alleviates synaptic degeneration. *Biochim Biophys Acta.* 1842: 2517-2527.

- Du H, Guo L, Zhang W, Rydzewska M, Yan S. (2011) Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer disease mouse model. *Neurobiol Aging*. 32: 398-406.
- Duan X, Ji B, Yu K, Liu J, Hei F, Long C. (2011) Pharmacological postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury: the role of mitochondrial permeability transition pore. *ASAIO J*. 57: 197-202.
- Dube H, Selwood D, Malouitre S, Capano M, Simone MI, Crompton M. (2012) A mitochondrial-targeted cyclosporin A with high binding affinity for cyclophilin D yields improved cytoprotection of cardiomyocytes. *Biochem J*. 441: 901-907.
- Dumas JF, Argaud L, Cottet-Rousselle C, Vial G, Gonzalez C, Detaille D, Leverve X, Fontaine E. (2009) Effect of transient and permanent permeability transition pore opening on NAD(P)H localization in intact cells. *J Biol Chem*. 284: 15117-15125.
- Dutta D, Calvani R, Bernabei R, Leeuwenburgh C, Marzetti E. (2012) Contribution of impaired mitochondrial autophagy to cardiac aging: mechanisms and therapeutic opportunities. *Circ Res*. 110: 1125-1138.
- Eliseev RA, Malecki J, Lester T, Zhang Y, Humphrey J, Gunter TE. (2009) Cyclophilin D interacts with Bcl2 and exerts an anti-apoptotic effect. *J Biol Chem*. 284: 9692-9699.
- Elrod JW, Molkentin JD. (2013) Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circ J*. 77: 1111-1122.
- Elrod JW, Wong R, Mishra S, Vagnozzi RJ, Sakthivel B, Goonasekera SA, Karch J, Gabel S, Farber J, Force T, Brown JH, Murphy E, Molkentin JD. (2010) Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca(2+) exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *J Clin Invest*. 120: 3680-3687.
- Elz JS, Nayler WG. (1988) Calcium gain during postischemic reperfusion. The effect of 2,4-dinitrophenol. *Am J Pathol*. 131: 137-145.
- Endlicher R, Kriváková P, Lotkova H, Milerová M, Drahotka Z, Cervinková Z. (2009) Tissue specific sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to Ca²⁺ ions. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 52: 69-72.
- Fancelli D, Abate A, Amici R, Bernardi P, Ballarini M, Cappa A, Carezzi G, Colombo A, Contursi C, Di Lisa F, Dondio G, Gagliardi S, Milanesi E, Minucci S, Pain G, Pelicci PG, Saccani A, Storto M, Thaler F, Varasi M, Villa M, Plyte S. (2014) Cinnamic anilides as new mitochondrial permeability transition pore inhibitors endowed with ischemia-reperfusion injury protective effect in vivo. *J Med Chem*. 57: 5333-5347.
- Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. (2007) Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev*. 59: 418-458.
- Ferrari R, di Lisa F, Raddino R, Visioli O. (1982) The effects of ruthenium red on mitochondrial function during post-ischaemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 14: 737-740.

- Ferrari R, Pedersini P, Bongrazio M, Gaia G, Bernocchi P, Di Lisa F, Visioli O. (1993) Mitochondrial energy production and cation control in myocardial ischaemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 88: 495-512.
- Ferrario M, Arbustini E, Massa M, Rosti V, Marziliano N, Raineri C, Campanelli R, Bertolotti A, De Ferrari GM, Klersy C, Angoli L, Bramucci E, Marinoni B, Ferlini M, Moretti E, Raisaro A, Repetto A, Schwartz PJ, Tavazzi L. (2011) High-dose erythropoietin in patients with acute myocardial infarction: a pilot, randomised, placebo-controlled study. *Int J Cardiol.* 147: 124-131.
- Flaherty JT, Pitt B, Gruber JW, Heuser RR, Rothbaum DA, Burwell LR, George BS, Kereiakes DJ, Deitchman D, Gustafson N, et al. (1994) Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation.* 89: 1982-1991.
- Folda A, Citta A, Scalcon V, Calì T, Zonta F, Scutari G, Bindoli A, Rigobello MP. (2016) Mitochondrial Thioredoxin System as a Modulator of Cyclophilin D Redox State. *Sci Rep.* 6:23071.
- Fontaine E, Ichas F, Bernardi P. (1998) A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* 273: 25734-25740.
- Fournier N, Ducet G, Crevat A. (1987) Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr.* 19: 297-303.
- Frey TG, Mannella CA. (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends BiochemSci.* 25: 319-324.
- Friberg H, Connern C, Halestrap AP, Wieloch T. (1999) Differences in the activation of the mitochondrial permeability transition among brain regions in the rat correlate with selective vulnerability. *J Neurochem.* 72: 2488-2497.
- Fujimoto K, Chen Y, Polonsky KS, Dorn GW 2nd. (2010) Targeting cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition enhances beta-cell survival and prevents diabetes in Pdx1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 10214-10219.
- Fujimoto K, Ford EL, Tran H, Wice BM, Crosby SD, Dorn GW 2nd, Polonsky KS. (2010) Loss of Nix in Pdx1-deficient mice prevents apoptotic and necrotic β cell death and diabetes. *J Clin Invest.* 120: 4031-4039.
- Galat A, Metcalfe SM. (1995) Peptidylproline cis/trans isomerases. *Prog Biophys MolBiol.* 63: 67-118.
- Galat A. (1993) Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem.* 2016: 689-707.
- Galat A. (2003) Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions. *Curr Top Med Chem.* 3: 1315-1347.
- Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, Plun-Favreau H, Deas E, Klupsch K, Downward J, Latchman DS, Tabrizi SJ, Wood NW, Duchon MR, Abramov AY. (2009) PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell.* 33: 627-638.

- García-Pérez C, Schneider TG, Hajnóczky G, Csordás G. (2011) Alignment of sarcoplasmic reticulum-mitochondrial junctions with mitochondrial contact points. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301: H1907-1915.
- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 81: 1072-1082.
- Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB. (1988) Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest.* 82: 476-485. Erratum in: *J Clin Invest* (1988) 82: following 1807.
- Gerle C. (2016) On the structural possibility of pore-forming mitochondrial FOF1-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 1857: 1191-1196.
- Ghosh JC, Siegelin MD, Dohi T, Altieri DC. (2010) Heat shock protein 60 regulation of the mitochondrial permeability transition pore in tumor cells. *Cancer Res.* 70: 8988-8993.
- Giorgi C, De Stefani D, Bononi A, Rizzuto R, Pinton P. (2009) Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol.* 41: 1817-1827.
- Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Dabbeni-Sala F, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P, Lippe G. (2009) Cyclophilin D modulates mitochondrial FOF1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J Biol Chem.* 284: 33982-33988.
- Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabó I, Lippe G, Bernardi P. (2013) Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 5887-5892.
- Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G, Ovize M. (2007) Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293: H1654-1661.
- Griffiths EJ, Halestrap AP. (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J.* 307 (Pt 1):93-98.
- Griffiths EJ, Halestrap AP. (1993) Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 25: 1461-1469.
- Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. (2004) Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res.* 94 : 960-966.
- Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. (2006) The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291: H827-834.
- Guigas B, Detaille D, Chauvin C, Batandier C, De Oliveira F, Fontaine E, Leverve X. (2004) Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J.* 382(Pt 3):877-884.

Gumina RJ, Auchampach J, Wang R, Buerger E, Eickmeier C, Moore J, Daemmgen J, Gross GJ. (2000) Na(+)/H(+) exchange inhibition-induced cardioprotection in dogs: effects on neutrophils versus cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279: H1563-570.

Guo X, Sesaki H, Qi X. (2014) Drp1 stabilizes p53 on the mitochondria to trigger necrosis under oxidative stress conditions in vitro and in vivo. *Biochem J.* 461: 137-146.

Gutiérrez-Aguilar M, Douglas DL, Gibson AK, Domeier TL, Molkentin JD, Baines CP. (2014) Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition. *J Mol Cell Cardiol.* 72: 316-325.

Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, Kerr PM. (1997b) Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 174: 167-172.

Halestrap AP, Davidson AM. (1990) Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J.* 268: 153-160.

Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. (1998) Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta.* 1366: 79-94.

Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP. (1997a) Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem.* 272: 3346-3354.

Halestrap AP. (2006) Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans.* 34: 232-237.

Halestrap AP. (1991) Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem J.* 278 (Pt 3): 715-719.

Hansson Petersen CA, Alikhani N, Behbahani H, Wiehager B, Pavlov PF, Alafuzoff I, Leinonen V, Ito A, Winblad B, Glaser E, Ankarcrona M. (2008) The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:13145-13150.

Hattori R, Otani H, Moriguchi Y, Matsubara H, Yamamura T, Nakao Y, Omiya H, Osako M, Imamura H. (2001) NHE and ICAM-1 expression in hypoxic/reoxygenated coronary microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280: H2796-2803.

Hausenloy DJ, Garcia-Dorado D, Bøtker HE, Davidson SM, Downey J, Engel FB, Jennings R, Lecour S, Leor J, Madonna R, Ovize M, Perrino C, Prunier F, Schulz R, Sluijter JPG, Van Laake LW, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Ytrehus K, Heusch G, Ferdinandy P. (2017) Novel targets and future strategies for acute cardioprotection: Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart. *Cardiovasc Res.* 113: 564-585.

Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. (2004) Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 63: 305-312.

Haworth RA, Hunter DR. (1979) The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys.* 195(2): 460-467.

He J, Carroll J, Ding S, Fearnley IM, Walker JE. (2017) Permeability transition in human mitochondria persists in the absence of peripheral stalk subunits of ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114: 9086-9091.

He J, Ford HC, Carroll J, Ding S, Fearnley IM, Walker JE. (2017) Persistence of the mitochondrial permeability transition in the absence of subunit c of human ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114: 3409-3414.

He L, Lemasters JJ. (2002) Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett.* 512: 1-7.

Herdson PB, Kaltenbach JP, Jennings RB. (1969) Fine structural and biochemical changes in dog myocardium during autolysis. *Am J Pathol.* 57: 539-557.

Heusch G. (2015) Treatment of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Ischemic and Pharmacological Postconditioning. *Compr Physiol.* 5: 1123-1145.

Hirakawa A, Takeyama N, Nakatani T, Tanaka T. (2003) Mitochondrial permeability transition and cytochrome c release in ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *J Surg Res.* 111: 240-247.

Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* 348: 334-336.

Horwitz LD, Fennessey PV, Shikes RH, Kong Y. (1994) Marked reduction in myocardial infarct size due to prolonged infusion of an antioxidant during reperfusion. *Circulation.* 89: 1792-1801.

Hunter DR, Haworth RA. (1979a) The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys.* 195: 453-459.

Hunter DR, Haworth RA. (1979b) The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Arch Biochem Biophys.* 195: 468-477.

Hunter DR, Haworth RA, Southard JH. (1976) Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem.* 251: 5069-5077.

Hüser J, Rechenmacher CE, Blatter LA. (1998) Imaging the permeability pore transition in single mitochondria. *Biophys J.* 74: 2129-2137.

Ichas F, Mazat JP. (1998) From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta.* 1366: 33-50.

Ikeda G, Matoba T, Nakano Y, Nagaoka K, Ishikita A, Nakano K, Funamoto D, Sunagawa K, Egashira K. (2016) Nanoparticle-Mediated Targeting of Cyclosporine A Enhances

Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening. *Sci Rep.* 6: 20467.

Jang IK, Weissman NJ, Picard MH, Zile MR, Pettigrew V, Shen S, Tatsuno J, Hibberd MG, Tzivoni D, Wackers FJ; EVOLVE Investigators. (2008) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of intravenous MCC-135 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction: Evaluation of MCC-135 for left ventricular salvage in acute myocardial infarction (EVOLVE). *Am Heart J.* 155: 113.e1-8.

Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. (2010) Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 47:53-67.

Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP. (2003) Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol.* 549(Pt 2): 513-524.

Jennings RB, Reimer KA. (1991) The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med.* 42:225-246.

Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. (1960) Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 70: 68-78.

Juhaszova M, Wang S, Zorov DB, Nuss HB, Gleichmann M, Mattson MP, Sollott SJ. (2008) The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown. *Ann N Y Acad Sci.* 1123:197-212.

Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. (2004) Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest.* 113: 1535-1549.

Kajitani K, Fujihashi M, Kobayashi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y, Miki K. (2008) Crystal structure of human cyclophilin D in complex with its inhibitor, cyclosporin A at 0.96-Å resolution. *Proteins.* 70: 1635-1639.

Kang BH. (2012) TRAP1 regulation of mitochondrial life or death decision in cancer cells and mitochondria-targeted TRAP1 inhibitors. *BMB Rep.* 45: 1-6.

Karch J, Kwong JQ, Burr AR, Sargent MA, Elrod JW, Peixoto PM, Martinez-Caballero S, Osinska H, Cheng EH, Robbins J, Kinnally KW, Molkenin JD. (2013) Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *Elife.* 2: e00772.

Karch J, Molkenin JD. (2012) Is p53 the long-sought molecular trigger for cyclophilin D-regulated mitochondrial permeability transition pore formation and necrosis? *Circ Res.* 111: 1258-1260

Kawasumi H, Satoh N, Kitada Y. (2007) Caldaret, an intracellular Ca²⁺ handling modulator, limits infarct size of reperfused canine heart. *J Pharmacol Sci.* 103: 222-233.

Keep M, Elmér E, Fong KS, Csiszar K. (2001) Intrathecal cyclosporin prolongs survival of late-stage ALS mice. *Brain Res.* 894: 327-31.

- Kevin LG, Camara AK, Riess ML, Novalija E, Stowe DF. (2003) Ischemic preconditioning alters real-time measure of O₂ radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284: 566-574.
- Ko YH, Delannoy M, Hullihen J, Chiu W, Pedersen PL. (2003) Mitochondrial ATPsynthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem*. 278:12305-12309.
- Kohr MJ, Aponte AM, Sun J, Wang G, Murphy E, Gucek M, Steenbergen C. (2011) Characterization of potential S-nitrosylation sites in the myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 300: H1327-1335.
- Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC. (2004) The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*. 427: 461-465.
- Konishi T, Lentsch AB. (2017) Hepatic Ischemia/Reperfusion: Mechanisms of Tissue Injury, Repair, and Regeneration. *Gene Expr*. 17: 277-287.
- Korde AS, Pettigrew LC, Craddock SD, Pocernich CB, Waldmeier PC, Maragos WF. (2007) Protective effects of NIM811 in transient focal cerebral ischemia suggest involvement of the mitochondrial permeability transition. *J Neurotrauma*. 24: 895-908.
- Krauskopf A, Eriksson O, Craigen WJ, Forte MA, Bernardi P. (2006) Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1757: 590-595.
- Kumar P, Kumar A. (2009) Possible neuroprotective effect of *Withania somnifera* root extract against 3-nitropropionic acid-induced behavioral, biochemical, and mitochondrial dysfunction in an animal model of Huntington's disease. *J Med Food*. 12: 591-600.
- Kupriyanov VV, Yang L, Deslauriers R. (1996) Cytoplasmic phosphates in Na(+)-K+balance in KCN-poisoned rat heart: a ⁸⁷Rb-, ²³Na-, and ³¹P-NMR study. *Am J Physiol*. 270(Pt 2):H1303-1311.
- Kwong JQ, Davis J, Baines CP, Sargent MA, Karch J, Wang X, Huang T, Molkenin JD. (2014) Genetic deletion of the mitochondrial phosphate carrier desensitizes the mitochondrial permeability transition pore and causes cardiomyopathy. *Cell Death Differ*. 21: 1209-1217.
- Lablanche S, Cottet-Rousselle C, Lamarche F, Benhamou PY, Halimi S, Leverve X, Fontaine E. (2011) Protection of pancreatic INS-1 β -cells from glucose- and fructose-induced cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition with cyclosporin A or metformin. *Cell Death Dis*. 2: e134.
- Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. (2009) Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res*. 84: 201-208.
- Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, Opie LH. (2005) Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation*. 112: 3911-3918.

- Lemasters JJ, DiGuiseppi J, Nieminen AL, Herman B. (1987) Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature*. 325: 78-81.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 1366: 177-196.
- Lenartowicz E, Bernardi P, Azzone GF. (1991) Phenylarsine oxide induces the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. 23: 679-688.
- Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP. (2008) The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem*. 283: 26312-26323.
- Li B, Chauvin C, De Paulis D, De Oliveira F, Gharib A, Vial G, Lablanche S, Leverve X, Bernardi P, Ovize M, Fontaine E. (2012) Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D. *Biochim Biophys Acta*. 1817: 1628-1634.
- Li J, Iorga A, Sharma S, Youn JY, Partow-Navid R, Umar S, Cai H, Rahman S, Eghbali M. (2012) Intralipid, a clinically safe compound, protects the heart against ischemia-reperfusion injury more efficiently than cyclosporine-A. *Anesthesiology*. 117:836-846.
- Li J, Wang J, Zeng Y. (2007) Peripheral benzodiazepine receptor ligand, PK11195 induces mitochondria cytochrome c release and dissipation of mitochondria potential via induction of mitochondria permeability transition. *Eur J Pharmacol*. 560:117-122.
- Li Y, Johnson N, Capano M, Edwards M, Crompton M. (2004) Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis. *Biochem J*. 383(Pt 1):101-109.
- Lie RH, Stoettrup N, Sloth E, Hasenkam JM, Kroyer R, Nielsen TT. (2010) Post-conditioning with cyclosporine A fails to reduce the infarct size in an in vivo porcine model. *Acta Anaesthesiol Scand*. 54:804-813.
- Lin DT, Lechleiter JD. (2002) Mitochondrial targeted cyclophilin D protects cells from cell death by peptidyl prolyl isomerization. *J Biol Chem*. 277: 31134-31141.
- Lin HC, Lee TK, Tsai CC, Lai IR, Lu KS. (2012) Ischemic postconditioning protects liver from ischemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial permeability transition. *Transplantation*. 93: 265-271.
- Lin KM, Lin B, Lian IY, Mestral R, Scheffler IE, Dillmann WH. (2001) Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation*. 103: 1787-1792.
- Linard D, Kandlbinder A, Degand H, Morsomme P, Dietz KJ, Knoops B. (2009) Redox characterization of human cyclophilin D: identification of a new mammalian mitochondrial redox sensor? *Arch Biochem Biophys*. 491: 39-45.

- Liu Y, Fiskum G, Schubert D. (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 80: 780-787.
- Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, Yang Y, Chen Y, Hirschey MD, Bronson RT, Haigis M, Guarente LP, Farese RV Jr, Weissman S, Verdin E, Schwer B. (2007) Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol.* 27: 8807-8814.
- Lu X, Kwong JQ, Molkentin JD, Bers DM. (2016) Individual Cardiac Mitochondria Undergo Rare Transient Permeability Transition Pore Openings. *Circ Res.* 118: 834-841.
- Ludman AJ, Yellon DM, Hausenloy DJ. (2010) Cardiac preconditioning for ischaemia: lost in translation. *Dis Model Mech.* 3: 35-38.
- Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X, Pollak S, Chaney M, Trinchese F, Liu S, Gunn-Moore F, Lue LF, Walker DG, Kuppusamy P, Zewier ZL, Arancio O, Stern D, Yan SS, Wu H. (2004) ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science.* 304 : 448-452.
- Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata NA, DiCarli MF, Leeser MA, Browne KF, Eisenberg PR, Bolli R, Casas AC, Molina-Viamonte V, Orlandi C, Blevins R, Gibbons RJ, Califf RM, Granger CB. (1999) Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol.* 34: 1711-1720.
- Malaguti C, La Guardia PG, Leite AC, Oliveira DN, de Lima Zollner RL, Catharino RR, Vercesi AE, Oliveira HC. (2014) Oxidative stress and susceptibility to mitochondrial permeability transition precedes the onset of diabetes in autoimmune non-obese diabetic mice. *Free Radic Res.* 48:1494-1504.
- Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH. (2006) Mitochondria area direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet.* 15: 1437-1449.
- Martin LJ, Fancelli D, Wong M, Niedzwiecki M, Ballarini M, Plyte S, Chang Q. (2014) GNX-4728, a novel small molecule drug inhibitor of mitochondrial permeability transition, is therapeutic in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 8:433.
- Martinou JC, Green DR. (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:63-67.
- Masubuchi Y, Nakayama S, Horie T. (2002) Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatocyte injury in rats. *Hepatology.* 35:544-551.
- Masubuchi Y, Suda C, Horie T. (2005) Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Hepatol.* 42: 110-116.
- Matsumura K, Jeremy RW, Schaper J, Becker LC. (1998) Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation.* 97: 795-804.

- Mbye LH, Singh IN, Carrico KM, Saatman KE, Hall ED. (2009) Comparative neuroprotective effects of cyclosporin A and NIM811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog, following traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29: 87-97.
- Mbye LH, Singh IN, Sullivan PG, Springer JE, Hall ED. (2008) Attenuation of acute mitochondrial dysfunction after traumatic brain injury in mice by NIM811, a non-immunosuppressive cyclosporin A analog. *Exp Neurol.* 209: 243-253.
- McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH. (1992) 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.* 89: 3170-3174.
- McGee AM, Baines CP. (2011) Complement 1q-binding protein inhibits the mitochondrial permeability transition pore and protects against oxidative stress-induced death. *Biochem J.* 433: 119-125.
- McGuinness O, Yafei N, Costi A, Crompton M. (1990) The presence of two classes of high-affinity cyclosporin A binding sites in mitochondria. Evidence that the minor component is involved in the opening of an inner-membrane Ca(2+)-dependent pore. *Eur J Biochem.* 194: 671-679. Erratum in: *Eur J Biochem* (1991) 195: 871.
- McStay GP, Clarke SJ, Halestrap AP. (2002) Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem J.* 367(Pt2): 541-548.
- Meier JA, Hyun M, Cantwell M, Raza A, Mertens C, Raje V, Sisler J, Tracy E, Torres-Odio S, Gispert S, Shaw PE, Baumann H, Bandyopadhyay D, Takabe K, Larner AC. (2017) Stress-induced dynamic regulation of mitochondrial STAT3 and its association with cyclophilin D reduce mitochondrial ROS production. *Sci Signal.* 10.
- Mewton N, Croisille P, Gahide G, Rioufol G, Bonnefoy E, Sanchez I, Cung TT, Sportouch C, Angoulvant D, Finet G, André-Fouët X, Derumeaux G, Piot C, Vernhet H, Revel D, Ovize M. (2010) Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 55: 1200-1205.
- Misra HP, Fridovich I. (1972) The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. *J Biol Chem.* 247: 188-192.
- Miyamae M, Camacho SA, Weiner MW, Figueredo VM. (1996) Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of [Ca²⁺]_m overload in rat hearts. *Am J Physiol.* 271(5 Pt 2):H2145-2153.
- Miyata H, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS. (1992) Relation of mitochondrial and cytosolic free calcium to cardiac myocyte recovery after exposure to anoxia. *Circ Res.* 71: 605-613.
- Moreira PI, Santos MS, Moreno A, Oliveira C. (2001) Amyloid beta-peptide promotes permeability transition pore in brain mitochondria. *Biosci Rep.* 21: 789-800.
- Morin D, Assaly R, Paradis S, Berdeaux A. (2009) Inhibition of mitochondrial membrane permeability as a putative pharmacological target for cardioprotection. *Curr Med Chem.* 16: 4382-4398.

- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. (2000) The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 20: 7146-7159.
- Motoyama S, Kitamura M, Saito S, Minamiya Y, Suzuki H, Saito R, Terada K, Ogawa J, Inaba H. (1998) Bcl-2 is located predominantly in the inner membrane and cristae of mitochondria in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 249: 628-636.
- Muller JE, Stone PH, Turi ZG, Rutherford JD, Czeisler CA, Parker C, Poole WK, Passamani E, Roberts R, Robertson T, et al. (1985) Circadian variation in the frequency of onset of acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 313: 1315-1322.
- Murphy MP. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 417: 1-13.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74: 1124-1136.
- Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.* 434: 652-658.
- Nathanson L, Gromet-Elhanan Z. (2000) Mutations in the beta-subunit Thr(159) and Glu(184) of the *Rhodospirillum rubrum* F(0)F(1) ATP synthase reveal differences in ligands for the coupled Mg(2+)- and decoupled Ca(2+)-dependent F(0)F(1) activities. *J Biol Chem.* 275: 901-905.
- Nazareth W, Yafei N, Crompton M. (1991) Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *J Mol Cell Cardiol.* 23: 1351-1354.
- Nesci S. (2018) A Lethal Channel between the ATP Synthase Monomers. *Trends Biochem Sci.* 43: 311-313.
- Nguyen TT, Stevens MV, Kohr M, Steenbergen C, Sack MN, Murphy E. (2011) Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* 286: 40184-40192.
- Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P. (1996) Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J Biol Chem.* 271: 2185-2192.
- Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, Ohori K, Hotta H, Terashima Y, Shimamoto K. (2007) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol.* 43: 564-570.
- Nishino T, Okamoto K, Kawaguchi Y, Hori H, Matsumura T, Eger BT, Pai EF, Nishino T. (2005) Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant. *J Biol Chem.* 280: 24888-24894.
- Nohl H, Koltover V, Stolze K. (1993) Ischemia/reperfusion impairs mitochondrial energy conservation and triggers O₂.- release as a byproduct of respiration. *Free Radic Res Commun.* 18: 127-137.

- Obame FN, Plin-Mercier C, Assaly R, Zini R, Dubois-Randé JL, Berdeaux A, Morin D. (2008) Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 beta, SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Pharmacol Exp Ther.* 326: 252-258.
- Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H, Leaf J. (1986) Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 92(3 Pt 2): 613-620.
- Olafsson B, Forman MB, Puett DW, Pou A, Cates CU, Friesinger GC, Virmani R. (1987) Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation.* 76:1135-1145.
- Ottani F, Latini R, Staszewsky L, La Vecchia L, Locuratolo N, Sicuro M, Masson S, Barlera S, Milani V, Lombardi M, Costalunga A, Mollicelli N, Santarelli A, DeCesare N, Sganzerla P, Boi A, Maggioni AP, Limbruno U; CYCLE Investigators. (2016) Cyclosporine A in Reperused Myocardial Infarction: The Multicenter, Controlled, Open-Label CYCLE Trial. *J Am Coll Cardiol.* 67: 365-374.
- Paillard M, Tubbs E, Thiebaut PA, Gomez L, Fauconnier J, Da Silva CC, Teixeira G, Mewton N, Belaidi E, Durand A, Abrial M, Lacampagne A, Rieusset J, Ovize M. (2013) Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation.* 128: 1555-1565.
- Panel M, Ghaleh B, Morin D. (2018) Mitochondria and aging: A role for the mitochondrial transition pore? *Aging Cell.* 11:e12793.
- Pasdois P, Parker JE, Halestrap AP. (2012) Extent of mitochondrial hexokinase II dissociation during ischemia correlates with mitochondrial cytochrome c release, reactive oxygen species production, and infarct size on reperfusion. *J Am Heart Assoc.* 2:e005645.
- Pastorino JG, Simbula G, Gilfor E, Hoek JB, Farber JL. (1994) Protoporphyrin IX, an endogenous ligand of the peripheral benzodiazepine receptor, potentiates induction of the mitochondrial permeability transition and the killing of cultured hepatocytes by rotenone. *J Biol Chem.* 269: 31041-31046.
- Patti G, Pasceri V, Colonna G, Miglionico M, Fischetti D, Sardella G, Montinaro A, Di Sciascio G. (2007) Atorvastatin pretreatment improves outcomes in patients with acute coronary syndromes undergoing early percutaneous coronary intervention: results of the ARMYDA-ACS randomized trial. *J Am Coll Cardiol.* 49: 1272-1278.
- Pawlotsky JM. (2014) What are the pros and cons of the use of host-targeted agents against hepatitis C? *Antiviral Res.* 105:22-25.
- Peng J, Tan C, Roberts GJ, Nikolaeva O, Zhang Z, Lapolla SM, Primorac S, Andrews DW, Lin J. (2006) tBid elicits a conformational alteration in membrane-bound Bcl-2 such that it inhibits Bax pore formation. *J Biol Chem.* 281: 35802-35811.
- Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F. (1999) Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be

monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J*. 76: 725-734.

Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F. (2001) The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem*. 276: 12030-12034.

Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, André-Fouët X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M. (2008) Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 359: 473-481.

Prendes MG, Torresín E, González M, Fernández MA, Perazzo JC, Savino EA, Varela A. (2008) Protection of ischaemic-reperfused rat heart by dimethylamiloride is associated with inhibition of mitochondrial permeability transition. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 35: 201-206.

Prunier F, Bière L, Gilard M, Boschat J, Mouquet F, Bauchart JJ, Charbonnier B, Genée O, Guérin P, Warin-Fresse K, Durand E, Lafont A, Christiaens L, Abi-Khalil W, Delépine S, Benard T, Furber A. (2012) Single high-dose erythropoietin administration immediately after reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: results of the erythropoietin in myocardial infarction trial. *Am Heart J*. 163: 200-207.

Quintanilla RA, Jin YN, von Bernhardt R, Johnson GV. (2013) Mitochondrial permeability transition pore induces mitochondria injury in Huntington disease. *Mol Neurodegener*. 8:45.

Rajesh KG, Sasaguri S, Suzuki R, Maeda H. (2003) Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability transition pore and upregulates Bcl-2 expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 285: H2171-2178.

Rasola A, Sciacovelli M, Chiara F, Pantic B, Brusilow WS, Bernardi P. (2010) Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 726-731.

Rasola A, Sciacovelli M, Pantic B, Bernardi P. (2010) Signal transduction to the permeability transition pore. *FEBS Lett*. 584: 1989-1996.

Readnower RD, Pandya JD, McEwen ML, Pauly JR, Springer JE, Sullivan PG. (2011) Post-injury administration of the mitochondrial permeability transition pore inhibitor, NIM811, is neuroprotective and improves cognition after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 28:1845-1853.

Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E, Pinton P. (2009) Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta*. 1787: 1342-1351.

Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, Alexander RW; AMISTAD-III Investigators. (2005) A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol*. 45: 1775-1780.

Roy S, Šileikytė J, Schiavone M, Neuenswander B, Argenton F, Aubé J, Hedrick MP, Chung TD, Forte MA, Bernardi P, Schoenen FJ. (2015) Discovery, Synthesis, and Optimization of Diarylisoxazole-3-carboxamides as Potent Inhibitors of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *ChemMedChem*. 10: 1655-1671.

Roy S, Šileikytė J, Neuenswander B, Hedrick MP, Chung TD, Aubé J, Schoenen FJ, Forte MA, Bernardi P. (2016) N-Phenylbenzamides as Potent Inhibitors of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *ChemMedChem*. 11: 283-288.

Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E, Garcia-Dorado D. (2007) Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca²⁺ overloaded cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol*. 102: 542-552.

Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Pina P, Inserte J, Agulló L, Soler-Soler J. (2003) Cariporide preserves mitochondrial proton gradient and delays ATP depletion in cardiomyocytes during ischemic conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 285: H999-1006.

Rupprecht HJ, vom Dahl J, Terres W, Seyfarth KM, Richardt G, Schultheis HP, Buerke M, Sheehan FH, Drexler H. (2000) Cardioprotective effects of the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. *Circulation*. 101: 2902-2908.

Sato H, Jordan JE, Zhao ZQ, Sarvotham SS, Vinten-Johansen J. (1997) Gradual reperfusion reduces infarct size and endothelial injury but augments neutrophil accumulation. *Ann Thorac Surg*. 64: 1099-1107.

Scarlata S, Carter C. (2003) Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochim Biophys Acta*. 1614: 62-72.

Schäfer C, Ladilov YV, Schäfer M, Piper HM. (2000) Inhibition of NHE protects reoxygenated cardiomyocytes independently of anoxic Ca⁽²⁺⁾ overload and acidosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 279: H2143-2150.

Schmidt HH, Stocker R, Vollbracht C, Paulsen G, Riley D, Daiber A, Cuadrado A. (2015) Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxid Redox Signal*. 23: 1130-1143.

Schroers A, Krämer R, Wohlrab H. (1997) The reversible antiport-uniport conversion of the phosphate carrier from yeast mitochondria depends on the presence of a single cysteine. *J Biol Chem*. 272: 10558-10564.

Schubert A, Grimm S. (2004) Cyclophilin D, a component of the permeability transition-pore, is an apoptosis repressor. *Cancer Res*. 64: 85-93.

Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ. (2002) A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell*. 2: 55-67.

Seglen PO. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*. 13: 29-83.

Shanmughapriya S, Rajan S, Hoffman NE, Higgins AM, Tomar D, Nemani N, Hines KJ, Smith DJ, Eguchi A, Vallem S, Shaikh F, Cheung M, Leonard NJ, Stolakis RS, Wolfers MP, Ibeti J, Chuprun JK, Jog NR, Houser SR, Koch WJ, Elrod JW, Madesh M. (2015) SPG7 Is an

Essential and Conserved Component of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Mol Cell*. 60: 47-62.

Shevtzova EF, Kireeva EG, Bachurin SO. (2001) Effect of beta-amyloid peptide fragment 25-35 on nonselective permeability of mitochondria. *Bull Exp Biol Med*. 132: 1173-1176.

Shore ER, Awais M, Kershaw NM, Gibson RR, Pandalaneni S, Latawiec D, Wen L, Javed MA, Criddle DN, Berry N, O'Neill PM, Lian LY, Sutton R. (2016) Small Molecule Inhibitors of Cyclophilin D To Protect Mitochondrial Function as a Potential Treatment for Acute Pancreatitis. *J Med Chem*. 59: 2596-2611.

Shulga N, Pastorino JG. (2010) Ethanol sensitizes mitochondria to the permeability transition by inhibiting deacetylation of cyclophilin-D mediated by sirtuin-3. *J Cell Sci*. 123(Pt 23): 4117-4127.

Shulga N, Wilson-Smith R, Pastorino JG. (2010) Sirtuin-3 deacetylation of cyclophilin D induces dissociation of hexokinase II from the mitochondria. *J Cell Sci*. 123(Pt 6): 894-902.

Siemion IZ, Pedyczak A, Trojnar J, Zimecki M, Wieczorek Z. (1992) Immunosuppressive activity of antamanide and some of its analogues. *Peptides*. 13:1233-1237.

Šileikytė J, Blachly-Dyson E, Sewell R, Carpi A, Menabò R, Di Lisa F, Ricchelli F, Bernardi P, Forte M. (2014) 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*. 289: 13769-13781.

Sinha D, D'Silva P. (2014) Chaperoning mitochondrial permeability transition: regulation of transition pore complex by a J-protein, DnaJC15. *Cell Death Dis*. 5: e1101.

Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M. (2005) Postconditioning the human heart. *Circulation*. 112: 2143-2148.

Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE. (1987) Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res*. 60: 700-707.

Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. (2005) Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 288: H1900-1908.

Sun J, Murphy E. (2010) Protein S-nitrosylation and cardioprotection. *Circ Res*. 106: 285-296.

Sun J. (2007) Protein S-nitrosylation: a role of nitric oxide signaling in cardiac ischemic preconditioning. *Sheng Li Xue Bao*. 59:544-552.

Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R. (2006) Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol*. 175: 901-111.

Szabó I, De Pinto V, Zoratti M. (1993) The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *FEBS Lett*. 330: 206-210.

Szabó I, Zoratti M. (1993) The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett.* 330: 201-205.

Taddeo EP, Laker RC, Breen DS, Akhtar YN, Kenwood BM, Liao JA, Zhang M, Fazakerley DJ, Tomsig JL, Harris TE, Keller SR, Chow JD, Lynch KR, Chokki M, Molkentin JD, Turner N, James DE, Yan Z, Hoehn KL. (2013) Opening of the mitochondrial permeability transition pore links mitochondrial dysfunction to insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Metab.* 3: 124-134.

Tamareille S, Ghaboura N, Treguer F, Khachman D, Croué A, Henrion D, Furber A, Prunier F. (2009) Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 297: H2035-2043.

Tavecchio M, Lisanti S, Bennett MJ, Languino LR, Altieri DC. (2015) Deletion of Cyclophilin D Impairs β -Oxidation and Promotes Glucose Metabolism. *Sci Rep.* 5:15981.

Teixeira G, Abrial M, Portier K, Chiari P, Couture-Lepetit E, Tourneur Y, Ovize M, Gharib A. (2013) Synergistic protective effect of cyclosporin A and rotenone against hypoxia-reoxygenation in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 56: 55-62.

Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. (2002) The phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem.* 277:14040-14047.

Urien S. (1995) MicroPharm-K, a microcomputer interactive program for the analysis and simulation of pharmacokinetic processes. *Pharm Res.* 12(8):1225-1230.

Valasani KR, Sun Q, Fang D, Zhang Z, Yu Q, Guo Y, Li J, Roy A, ShiDu Yan S. (2016) Identification of a Small Molecule Cyclophilin D Inhibitor for Rescuing A β -Mediated Mitochondrial Dysfunction. *ACS Med Chem Lett.* 7: 294-299.

Varanyuwatana P, Halestrap AP. (2012) The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion.* 12:120-125.

Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. (2012) p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell.* 149:1536-1548.

Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, Lemasters JJ. (2002) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporine derivative NIM811. *Mol Pharmacol.* 62: 22-29.

Walsh SR, Tang T, Sadat U, Dutka DP, Gaunt ME. (2007) Cardioprotection by remote ischaemic preconditioning. *Br J Anaesth.* 99: 611-616.

Warne J, Pryce G, Hill JM, Shi X, Lennerås F, Puentes F, Kip M, Hilditch L, Walker P, Simone MI, Chan AW, Towers GJ, Coker AR, Duchon MR, Szabadkai G, Baker D, Selwood DL. (2016) Selective Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Protects against Neurodegeneration in Experimental Multiple Sclerosis. *J Biol Chem.* 291: 4356-4373.

Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. (2005) Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell.* 19: 111-122.

- Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NB, Zhang Q, Koeck T, Derecka M, Szczepanek K, Szelag M, Gornicka A, Moh A, Moghaddas S, Chen Q, Bobbili S, Cichy J, Dulak J, Baker DP, Wolfman A, Stuehr D, Hassan MO, Fu XY, Avadhani N, Drake JI, Fawcett P, Lesnefsky EJ, Larner AC. (2009) Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science*. 323: 793-797.
- Wei L, Salahura G, Boncompagni S, Kasischke KA, Protasi F, Sheu SS, Dirksen RT. (2011) Mitochondrial superoxide flashes: metabolic biomarkers of skeletal muscle activity and disease. *FASEB J*. 25:3068-3078.
- Woodfield K, Rück A, Brdiczka D, Halestrap AP. (1998) Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J*. 336 (Pt 2): 287-290.
- Xi J, Wang H, Mueller RA, Norfleet EA, Xu Z. (2009) Mechanism for resveratrol-induced cardioprotection against reperfusion injury involves glycogen synthase kinase3 beta and mitochondrial permeability transition pore. *Eur J Pharmacol*. 604:111-116.
- Xie L, Cheng L, Xu G, Zhang J, Ji X, Song E. (2017) The novel cyclophilin D inhibitor compound 19 protects retinal pigment epithelium cells and retinal ganglion cells from UV radiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 487: 807-812.
- Yang JC, Kahn A, Cortopassi G. (2000) Bcl-2 does not inhibit the permeability transition pore in mouse liver mitochondria. *Toxicology*. 15: 65-72.
- Yano T, Abe K, Tanno M, Miki T, Kuno A, Miura T, Steenbergen C. (2018) Does p53 Inhibition Suppress Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury? *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 23: 350-357.
- Yellon DM, Hausenloy DJ. (2007) Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 357: 1121-1135.
- Yoshida EM, Lilly LB, Marotta PJ, Mason AL, Bilodeau M, Vaillancourt M. (2013) Canadian national retrospective chart review comparing the long term effect of cyclosporine vs. tacrolimus on clinical outcomes in patients with post-liver transplantation hepatitis C virus infection. *Ann Hepatol*. 12: 282-293.
- Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. (2000) Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med*. 342: 154-160.
- Zalewski J, Claus P, Bogaert J, Driessche NV, Driesen RB, Galan DT, Sipido KR, Buszman P, Milewski K, Van de Werf F. (2015) Cyclosporine A reduces microvascular obstruction and preserves left ventricular function deterioration following myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol*. 110:18.
- Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, Linssen G, Tebbe U, Schröder R, Tiemann R, Machnig T, Neuhaus KL; ESCAMI Investigators. (2001) The Na(+)/H(+) exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol*. 38:1644-1650.

- Zhao LP, Ji C, Lu PH, Li C, Xu B, Gao H. (2013) Oxygen glucose deprivation (OGD)/re-oxygenation-induced in vitro neuronal cell death involves mitochondrial cyclophilin-D/P53 signaling axis. *Neurochem Res.* 38: 705-713.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285: H579-88. Erratum in: *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 286: H477.
- Zhen YF, Wang GD, Zhu LQ, Tan SP, Zhang FY, Zhou XZ, Wang XD. (2014) P53 dependent mitochondrial permeability transition pore opening is required for dexamethasone-induced death of osteoblasts. *J Cell Physiol.* 229: 1475-1483.
- Zhou A, Rohou A, Schep DG, Bason JV, Montgomery MG, Walker JE, Grigorieff N, Rubinstein JL. (2015) Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM. *Elife.* 4:e10180.
- Zoccarato F, Nicholls D. (1982) The role of phosphate in the regulation of the independent calcium-efflux pathway of liver mitochondria. *Eur J Biochem.* 127: 333-338.
- Zoratti M, Szabó I. (1994) Electrophysiology of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr.* 26: 543-553.
- Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. (2000) Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med.* 192:1001-1014.

Titre : Étude de l'effet de nouveaux ligands de la cyclophiline D sur le pore de transition de perméabilité mitochondrial et de leur effet protecteur.

Mots clés : mitochondrie ; cyclophiline D ; ischémie-reperfusion ; cardioprotection ; hépatoprotection

Résumé : Les phénomènes d'ischémie-reperfusion sont rencontrés dans plusieurs situations physiopathologiques. Le seul traitement de l'ischémie repose sur une restauration précoce du flux sanguin. Paradoxalement, la reperfusion génère des lésions supplémentaires, appelées « lésions de reperfusion », dont la mitochondrie est un acteur majeur *via* l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP). L'ouverture du mPTP est principalement modulée par la cyclophiline D (CypD), une protéine de la matrice mitochondriale, dont l'inhibition pharmacologique par la cyclosporine A (CsA) permet de limiter l'ouverture du pore. Cette inhibition, obtenue *in vitro* et *in vivo*, permet de réduire les lésions de reperfusion. Néanmoins, de récents essais cliniques n'ont pas permis de confirmer ce bénéfice dans le cadre de l'infarctus du myocarde, soulignant la

nécessité de développer de nouveaux inhibiteurs du mPTP. Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de nouveaux ligands de la CypD sur l'ouverture du mPTP. Ces petites molécules innovantes, de structure radicalement différente de la CsA inhibent l'ouverture du mPTP de mitochondries isolées et le dérivé le plus actif, le C31, permet une inhibition plus efficace du mPTP que la CsA. Le C31 inhibe également le mPTP au niveau cellulaire, dans des hépatocytes primaires et dans des cardiomyocytes isolés. *In vivo*, le C31 atteint les mitochondries cardiaques et protège le foie dans un modèle d'ischémie-reperfusion hépatique. Cependant, la stabilité métabolique du C31 ne lui permet pas d'atteindre le cœur. La poursuite du développement de ces inhibiteurs pourrait aboutir à de nouveaux candidats pour protéger les organes des lésions de reperfusion.

Title: Effect of new cyclophilin D ligands on mitochondrial permeability transition pore opening.

Keywords: mitochondria ; cyclophilin D ; ischemia-reperfusion ; cardioprotection ; hepatoprotection

Abstract: Ischemia-reperfusion can occur in various pathophysiological situations such as myocardial infarction or organ transplantation. The only available treatment of ischemia relies on a timely reperfusion which paradoxically causes additional damage, so-called « reperfusion injury ». Mitochondria play a central role in this phenomenon through the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) which extends cell death. mPTP opening is modulated by the matrix protein cyclophilin D (CypD). CypD inhibition by cyclosporin A (CsA), the most described CypD inhibitor, limits reperfusion injury *in vivo*. Nevertheless, recent clinical trials failed to recapitulate such protection in the context of myocardial infarction,

emphasizing the urge to develop new mPTP inhibitors. Here, we investigated the effects of new CypD ligands on mPTP opening. We demonstrated that these small molecules unrelated to CsA are potent mPTP inhibitors and that the most active compound, C31, exhibited stronger mPTP-inhibiting properties as compared to CsA. C31 also inhibited mPTP opening in primary hepatocytes and isolated cardiomyocytes. *In vivo*, C31 reaches liver mitochondria and protects mitochondrial function in a hepatic ischemia-reperfusion model. Nevertheless, C31 metabolic stability hampers cardiac uptake of the compound. Further development of these new inhibitors might lead to interesting candidates to protect organs against ischemia-reperfusion injury.

Laboratoire de rattachement :

Institut Mondor de Recherche Biomédicale
Inserm U955, Equipe 03
Faculté de Médecine de Créteil
8, rue du Général Sarrail
94010 Créteil

Université Paris-Saclay

Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

