



**HAL**  
open science

# Implication des ROS mitochondriaux dans le couplage excitation contraction cardiaque

Audrey Semont

► **To cite this version:**

Audrey Semont. Implication des ROS mitochondriaux dans le couplage excitation contraction cardiaque. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0426 . tel-02878396

**HAL Id: tel-02878396**

**<https://theses.hal.science/tel-02878396v1>**

Submitted on 23 Jun 2020

**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.

THESE

PRESENTEE À

L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Par

**Audrey Semont**

Pour le grade de

**DOCTEUR EN PHYSIO PATHOLOGIE CELLULAIRE**

Implication des ROS mitochondriaux dans le couplage excitation-contraction cardiaque

**Encadrée par le Docteur Philippe Diolez**

Obtenu le 20 décembre 2019 à 14h

**Membres du jury :**

**Dr Roger Marthan**

Centre de Recherche Cardiothoracique U1045, Université de Bordeaux, CHU de Bordeaux

**Dr Sylvain Richard**

Directeur de Recherche, Université de Montpellier INSERM U1046

**Dr Laura Baciou**

Directrice de Recherche, Université de Paris-Sud CNRS UMR8000

**Dr Jean Pierre Mazat**

Professeur, Université de Bordeaux IBGC-CNRS UMR 5095

**Pr Pierre Dos Santos**

Professeur, U1045, Université de Bordeaux, CHU de Bordeaux

**Dr Philippe Diolez**

Chargé de recherche, CNRS, Université de Bordeaux

**Président**

**Rapporteur**

**Rapportrice**

**Examineur**

**Invité**

**Directeur de thèse**

# TABLE DES MATIERES

## Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>1</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>8</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>9</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>11</b>
<b>Liste des publications &amp; communications</b> .....	<b>13</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>14</b>
<b>I. Français</b> .....	<b>14</b>
<b>II. Anglais</b> .....	<b>15</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>17</b>
<b>I. Le cœur : un organe siège d'une activité métabolique aérobie intense finement régulée</b> .....	<b>17</b>
<b>II. Le couplage excitation-contraction dans la cellule cardiaque</b> .....	<b>18</b>
1) Structure du cardiomyocyte.....	18
2) De l'excitation au potentiel d'action.....	19
3) Mécanisme d'excitation- contraction .....	22
a. Du potentiel d'action à l'augmentation du calcium intracytosolique : la libération de calcium induite par le calcium .....	22
b. De l'augmentation du calcium intracytosolique au raccourcissement des sarcomères.....	25
4) Mécanisme de relaxation.....	27
5) Implication de la mitochondrie dans la contraction cardiaque.....	30
<b>III. Modulation du couplage excitation-contraction cardiaque par les ROS</b> .....	<b>34</b>
1) Mode de production des espèces radicalaires de l'oxygène.....	34
2) Mode d'action des ROS lors du couplage excitation-contraction.....	36
a. Enzymes impliquées.....	38
PKA.....	38
PKC.....	39
CamKII.....	39
b. Canaux impliqués.....	39
<b>IV. Production de ROS mitochondriaux</b> .....	<b>41</b>
1) Particularités de la production mitochondriale de ROS.....	41
2) Interrelation entre le Calcium et les ROS mitochondriaux .....	44
3) Régulation des ROS par les systèmes antioxydants.....	46
a. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	46
b. Systèmes antioxydants non-enzymatiques.....	47
4) Conséquences d'une production trop élevée de ROS.....	47
a. Conséquences Cellulaires.....	48
b. Maladies neurodégénératives .....	48
5) Maladies cardiovasculaires.....	48
<b>Objectif, hypothèse de travail et stratégie expérimentale</b> .....	<b>51</b>
<b>Matériels &amp; Méthodes</b> .....	<b>55</b>
<b>I. Préparation des échantillons</b> .....	<b>55</b>



1) Modèle animal .....	55
2) Préparation des échantillons.....	55
a. Isolement des mitochondries .....	55
b. Isollements cellulaires.....	56
a. Dosage des protéines.....	57
b. Comptage des cellules : Lame de Malassez.....	57
<b>II. Mise au point du modèle expérimental .....</b>	<b>58</b>
1) Le céramide, induction d'un gonflement mitochondrial.....	58
2) Les lipopolysaccharides, facteurs de transcription de la nécrose et de l'apoptose...	58
3) Les substrats énergétiques : une source de stress oxydant ? .....	58
4) Modulation par l'utilisation d'antioxydants.....	58
a. Antioxydants cellulaires.....	58
Préparation du Trolox : .....	59
Préparation du NAC.....	59
b. Antioxydants mitochondriaux.....	59
Préparation de OP2113.....	60
Préparation MitoTEMPO.....	60
<b>III. Mesure de la respiration : Oxygraphie .....</b>	<b>60</b>
<b>IV. Mesure de la production de ROS : Spectrophotomètre (Safas®) .....</b>	<b>61</b>
1) Sonde utilisée : Amplex Red .....	61
2) Protocole expérimental.....	62
a. Mitochondries.....	62
b. Cardiomyocytes.....	62
<b>V. Mesure simultanée de la contraction cellulaire et du transitoire calcique .....</b>	<b>62</b>
1) Protocole expérimental.....	62
2) Mesure du raccourcissement des sarcomères.....	64
3) Sonde calcique : Fura 2 AM, Fura 4 AM .....	65
4) Mesure du transitoire calcique.....	66
5) Mise au point d'un code pour analyser les résultats : collaboration INRIA .....	67
6) Interaction entre l'antioxydant MitoTEMPO et la sonde calcique.....	68
<b>VI. Mécanismes d'action des ROS dans la modulation du calcium et de la contraction cardiaque .....</b>	<b>69</b>
<b>VII. Statistiques.....</b>	<b>70</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>72</b>
<b>I. La production de ROS et sa mesure.....</b>	<b>72</b>
1) Corrélacion entre la concentration de cellules et leur viabilité .....	72
2) Étude de la production de ROS des cellules en condition contrôle.....	73
3) Augmentation de la production de ROS.....	73
a. Le céramide, inducteur d'un gonflement mitochondrial et de l'apoptose (Leducq, 2002).....	73
b. Les lipopolysaccharides, facteurs de transcription de la nécrose et de l'apoptose.....	75
c. Les substrats énergétiques : une source de stress oxydant ? .....	76
<b>II. La modulation de la production de ROS au moyen d'antioxydants.....</b>	<b>77</b>
1) Effets des antioxydants cellulaires .....	78
a. Trolox.....	78
b. N-acetyl-cystéine .....	79
2) Effets des antioxydants mitochondriaux.....	80
a. MitoTEMPO.....	80
b. EUK : un antioxydant qui combine l'effet de la SOD et de la catalase .....	82
c. OP2113 : un des premiers inhibiteurs spécifiques du site principal de production de ROS de la mitochondrie.....	83
OP2113, une molécule inoffensive pour la mitochondrie .....	83

Inhibition spécifique de la production mitochondriale de ROS au site I <sub>Q</sub> .....	85
Étude du métabolite principal d'OP2113 : OP2116.....	87
Production de ROS dans notre modèle en présence d'OP2113.....	88
<b>III. L'effet de la modulation des ROS sur le couplage excitation-contraction.....</b>	<b>90</b>
1) Introduction.....	90
2) Objectifs.....	90
3) Mesure du raccourcissement des sarcomères.....	90
Choix de la fréquence de contraction des cardiomyocytes.....	91
a.....	91
b. Influence d'une surproduction de ROS mitochondriaux sur les paramètres de la contraction.....	92
Effet des médicaments sur la contraction et la relaxation des cardiomyocytes.....	92
Effet d'une surproduction de ROS sur la contraction et la relaxation des cardiomyocytes isolés de ventricule de rat.....	93
Analyse des profils de contraction et de relaxation.....	94
c. Probabilité de développer un événement arythmique en présence de nos différents antioxydants.....	97
4) Mesure du transitoire calcique.....	97
a. Préambule : Étude des effets des sondes calciques sur la contraction.....	98
b. Effet des antioxydants sur le transitoire calcique en condition contrôle.....	99
c. Effet d'une surproduction de ROS sur le transitoire calcique.....	99
d. Influence des ROS et des antioxydants sur la probabilité de développer un événement arythmique.....	101
5) Effet de la modulation de différents modes de transport du Ca <sup>2+</sup> mitochondrial... du couplage excitation-contraction.....	102
a. La cyclosporine A, inhibiteur de l'ouverture du pore et donc de la sortie de calcium lors de l'étude de l'inhibiteur Cyclosporine A sur des cardiomyocytes isolés en condition contrôle.....	103
Inhibition du pore de transition de perméabilité lors d'une surproduction de ROS mitochondriaux.....	104
b. Inhibition du canal calcique mitochondrial : MCU.....	105
L'inhibiteur Ru360 dans des conditions contrôle.....	105
Effet de l'inhibition du MCU sur la production de ROS et l'activité contractile des cardiomyocytes isolés en présence de succinate.....	106
<b>Discussion Générale.....</b>	<b>109</b>
1) Production mitochondriale de ROS.....	109
2) Étude des ROS produits en conditions contrôle.....	112
3) Modèle de surproduction mitochondriale de ROS.....	113
4) Effets de la surproduction mitochondriale de ROS sur la fonction contractile des cardiomyocytes.....	116
5) Étude du mode d'action des ROS sur la contraction.....	118
<b>Conclusion Générale.....</b>	<b>124</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>128</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>150</b>

## Liste des figures

Figure 1 Structure d'un sarcomère .....	19
Figure 2 Concentrations ioniques intra- et extracellulaire dans un cardiomyocyte .....	19
Figure 3 Pompes électrogéniques qui régulent le potentiel de repos.....	20
Figure 4 Système de conduction électrique du cœur.....	21
Figure 5 Représentation d'un potentiel d'action de cardiomyocyte ventriculaire .....	22
Figure 6 Le couplage excitation-contraction cardiaque .....	23
Figure 7 Schéma des composés impliqués dans le transfert du calcium entre le réticulum et la mitochondrie.....	25
Figure 8 Schéma des myofilaments fin d'actine .....	26
Figure 9 Cycle actine myosine lors d'une contraction .....	26
Figure 10 Interactions entre les voies de signalisation cardiaques.....	28
Figure 11 Exemple d'enregistrement simultané du potentiel d'action, du transitoire calcique et de la contraction .....	29
Figure 12 Voies de transport du calcium dans des mitochondries isolées dans des conditions physiologiques .....	30
Figure 13 Deux représentations du cycle calcique à travers la membrane interne mitochondriale .....	30
Figure 14 Influx et efflux calcique dans la mitochondrie.....	31
Figure 15 Illustration schématique de la communication du RS et de la mitochondrie .....	32
Figure 16 Effet du calcium au sein de la mitochondrie .....	32
Figure 17 Structure et mécanisme d'ouverture du pore de transition de perméabilité .....	33
Figure 18 Nouvelle hypothèse suite aux travaux de l'équipe du Dr Diolez .....	34
Figure 19 Origine des espèces réactives de l'oxygène .....	35
Figure 20 Sources et mode d'action des ROS impliqués dans la modulation des protéines de l'ECC.....	37
Figure 21 Implication des ROS dans le couplage excitation-contraction Les ROS peuvent influencer le couplage excitation-contraction par divers chemins.....	38
Figure 22 Étude de l'action de PKA et PKC sur la régulation du phospholamban.....	39
Figure 23 Phosphorylation oxydative mitochondriale.....	42
Figure 24 Les différents sites de production de ROS mitochondriaux.....	44
Figure 25 Principaux sites producteurs de ROS en présence de succinate .....	44
Figure 26 Activation des différentes enzymes du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative par le Ca <sup>2+</sup> mitochondrial .....	45
Figure 27 Mécanismes de stimulation du calcium sur la production de ROS mitochondriaux .....	45
Figure 28 Concept de l'approche médicale.....	51
Figure 29 Comptage des cardiomyocytes sur une lame de Malassez .....	57
Figure 30 Mode d'action de l'ajout de différents substrats: glucose, pyruvate et succinate .....	58
Figure 31 Conséquences d'un traitement au NAC.....	59
Figure 32 Réaction d'oxydation entre la sonde Amplex Red et l'enzyme HRP pour former de la Résorufin .....	61

Figure 33 Dispositif expérimental pour la mesure de la contraction des sarcomères de cardiomyocytes et de la mesure du transitoire calcique. ....	63
Figure 34 Paramètres étudiés pour la contraction sur IONWIZARD .....	64
Figure 35 Exemple de cellules en arythmie lors de la stimulation par le IonOptix .....	65
Figure 36 Structure et propriétés de la sonde Fura-2 .....	66
Figure 37 Structure de la sonde Fura4AM.....	66
Figure 38 Étude des paramètres de contraction avec Python .....	67
Figure 39 Fit des courbes de contraction et de relaxation.....	68
Figure 40 Interaction de l'antioxydant MitoTEMPO avec la sonde calcique .....	69
Figure 41 Mécanismes de régulation du calcium mitochondrial .....	69
Figure 42 Mode d'action de la cyclosporine au niveau cellulaire et mitochondrial.....	70
Figure 43 Structure moléculaire du Rouge de Ruthénium et de son dérivé Ru360 .....	70
Figure 44 Corrélation entre le dosage de protéines des cellules et la viabilité cellulaire.....	72
Figure 45 Étude de la production de ROS en présence de différentes concentrations croissantes de céramide.....	74
Figure 46 Étude de la viabilité cellulaire en présence ou non de 40µM de céramide.....	75
Figure 47 Étude de la production de ROS en présence de différentes concentrations de LPS .....	75
Figure 48 Localisation des substrats utilisés pour notre expérience .....	76
Figure 49 Surproduction de ROS mesurée après addition des substrats énergétiques mitochondriaux.....	76
Figure 50 Utilisation de différents antioxydants en fonction de leur localisation .....	77
Figure 51 Production de ROS en fonction de la concentration de Trolox en absence de succinate .....	78
Figure 51 Production de ROS en fonction de la concentration de Trolox en présence de succinate .....	79
Figure 52 Production de ROS en fonction des différentes concentrations de NAC.....	79
Figure 53 Effet de la concentration de NAC sur la sonde Amplex Red en absence de cellules .....	80
Figure 54 Production de ROS en fonction de la concentration de MitoTEMPO en absence de succinate .....	80
Figure 55 Production de ROS en fonction de la concentration de MitoTEMPO .....	81
Figure 56 Étude de l'action du MitoTEMPO en présence de notre sonde Amplex Red .....	81
Figure 57 Production de ROS en fonction des concentrations d'EUK en condition contrôle .....	82
Figure 58 Production de ROS en fonction de la concentration d'EUK en présence de succinate .....	82
Figure 59 Formule chimique de la molécule OP2113.....	83
Figure 60 Étude de l'effet d'OP2113 sur la phosphorylation oxydative mitochondriale .....	84
Figure 61 Sites principaux de la production de ROS dans les mitochondries isolées .....	85
Figure 62 Étude de la production de ROS au niveau des différents sites de la chaîne respiratoire mitochondriale en fonction de la concentration d'OP2113 .....	86

Figure 63 Effet spécifique de la molécule OP2113 sur les différents sites de production des ROS mitochondriaux.....	87
Figure 64 Étude de la production de ROS en présence de OP2116, principal métabolite de OP2113.....	88
Figure 65 Production de ROS en fonction de la concentration d'OP2113 en condition contrôle.....	89
Figure 66 Production de ROS en présence de différentes concentrations d'OP2113.....	89
Figure 67 Analyse des paramètres contractiles d'un cardiomyocyte isolé avec PYTHON ....	91
Figure 68 Analyse des paramètres de la contraction d'un cardiomyocyte isolé.....	91
Figure 69 Mesure de la contraction de cardiomyocytes isolés à différentes fréquences de stimulation.....	92
Figure 70 Paramètres de la fonction contractile des cardiomyocytes isolés de cœur de rat en condition contrôle.....	92
Figure 71 Paramètres de la fonction contractile des cardiomyocytes isolés du ventricule de rat en présence de succinate et des antioxydants.....	93
Figure 72 Comparaison de l'amplitude de contraction calculée grâce au logiciel IONWIZARD ou via notre propre méthode de mesure.....	94
Figure 73 Raccourcissement des sarcomères en présence de succinate et des différents antioxydants.....	94
Figure 74 Paramètres de la fonction contractile classiquement étudiés lors d'une stimulation d'un cardiomyocyte de ventricule de rat avec IONWIZARD.....	95
Figure 75 Vitesses maximales de contraction et de relaxation IONWIZARD.....	95
Figure 76 Vitesses de contraction et relaxation obtenues avec le script Python.....	96
Figure 77 Probabilité de développer des arythmies en conditions de surproduction de ROS.....	97
Figure 78 Paramètre étudié pour la mesure du transitoire calcique sur IONWIZARD et PYTHON.....	97
Figure 79 Étude de la production de ROS en présence de sonde calcique Fura 2AM utilisée pour les mesures du transitoire calcique.....	98
Figure 80 Comparaison de 2 sondes calciques sur le raccourcissement des sarcomères....	98
Figure 81 Amplitude du transitoire calcique en condition contrôle.....	99
Figure 82 Paramètres des transitoires calciques des cardiomyocytes isolés du ventricule de rat calculés à partir de IONWIZARD.....	99
Figure 83 Étude de la concentration de calcium systolique et diastolique.....	100
Figure 84 Amplitude du transitoire calcique dans nos différentes conditions.....	101
Figure 85 Comparaison de deux méthodes de mesure de la concentration du transitoire calcique. ....	101
Figure 86 Probabilité de développer une arythmie chez des cardiomyocytes ventriculaires lors de la mesure du transitoire calcique avec (B) ou sans (A) surproduction de ROS.....	102
Figure 87 Exemple de développement d'arythmie en présence d'EUK.....	102
Figure 88 Mécanismes de régulation du calcium mitochondrial.....	103
Figure 89 Effet de la cyclosporine A sur la production de ROS (A) et sur le raccourcissement des sarcomères (B) en présence des antioxydants.....	104

Figure 90 Effet de la cyclosporine A sur la production de ROS (A) et sur le raccourcissement des sarcomères (B) en présence de succinate et des antioxydants .....	105
Figure 91 Effet du Ru360 sur notre modèle en présence des antioxydants .....	106
Figure 92 Effet du Ru360 sur notre modèle en présence des antioxydants et du succinate .....	107
Figure 93 Diagramme illustrant la complexité des propriétés bioénergétiques de la mitochondrie.....	109
Figure 94 Nouvelle hypothèse suite aux travaux de l'équipe du Dr Diolez .....	110
Figure 95 Production de ROS mitochondriale.....	111
Figure 96 Pathologies conduisant à une production de ROS du site I <sub>Q</sub> ou III <sub>Q0</sub> de la mitochondrie.....	111
Figure 97 Schéma récapitulatif de l'effet de OP2113 sur la production de ROS mitochondriale .....	112
Figure 98 Formation de ROS due à l'accumulation du succinate au cours de l'ischémie reperfusion.....	114
Figure 99 Sites potentiels d'action des ROS au moment du couplage excitation-contraction .....	118
Figure 100 Régulation du transitoire calcique par le Trolox.....	120
Figure 101 Couplage excitation-contraction en présence de Trolox et de cyclosporine A	122
Figure 102 Schéma général de l'implication des ROS mitochondriaux dans le couplage ECC .....	126

## Liste des tableaux

Tableau 1 Répartition de la recapture du calcium lors de la relaxation .....	27
Tableau 2 Les principaux acteurs du couplage excitation-contraction.....	29
Tableau 3 Différentes cibles des ROS au niveau des cibles du couplage excitation – contraction .....	37
Tableau 4 Différence entre les sondes Fura2-AM et Fura 4-AF, AM .....	66

## Liste des abréviations

ADP : Adénosine DiPhosphate  
AKAP : Protéines Kinases A d’Ancre  
ANT : Adénine Nucléotide Translocateur  
ATP : Adénosine Triphosphate  
ATP : Adénosine TriPhosphate  
ATR : Atractyloside  
BSA : Bovine Serum Albumine  
CAMKII : Calmodulin-dependent proteine kinase  
DAD : Post-dépolarisation tardive (Delayed AfterDepolarization)  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
EAD : Post-depolarisation précoce (Early AfterDepolarization)  
ECC : Couplage Excitation-contraction  
EGTA : Acide éthylène diamine tétraacétique  
FA : Fibrillation Atriale  
FCCP : Carbonyl cyanide-4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d’hydrogène  
HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine éthane sulfonique  
ICa : Courant calcique de type L  
OH<sup>•</sup> : radical hydroxyle  
Ito : Courant transitoire potassique sortant  
Kd : Constante de dissociation  
LPS : Lipopolysaccharides  
MAM : Association Mitochondrie et Membrane du réticulum sarcoplasmique  
MCU : Uniporteur calcique mitochondrial (Mitochondrial Calcium Uniporter)  
mPTP : Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale  
mUI/ml : milli Unités Internationales par millilitres  
Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> : Pompe sodium-potassium  
NAV : Nœud Auriculo-Ventriculaire  
NCX : Échangeur sodium-calcium  
NSA : Nœud Sino-atrial  
NAC : N-Acétyle Cystéine  
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide  
NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
NCX : Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> échangeur  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : radical superoxyde  
PBS : Tampon Phosphate Salin  
PCMA : Pompe membranaire calcique ATPase  
PKA : Protéine Kinase A  
PKC : Protéine Kinase C



PLB : phospholamban

Q : quinone

SQ<sup>•</sup> : radical semiquinone

ROS : Reactive Oxygen Species = Espèces Radicalaire de l'oxygène

RS : Réticulum Sarcoplasmique

RyR : Récepteur à la Ryanodine

SERCA : Pompe Ca<sup>2+</sup> ATPasique du réticulum sarcoplasmique (Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase)

SOD : superoxyde dismutase

Tau : Constante de temps

TnC : Troponine C

TnI : Troponine I

TnT : Troponine T

## Remerciements

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été effectués au sein de l'Institut de Rythmologie et de modélisation Cardiaque (IHU LIRYC), Unité 1045 de l'Inserm de Bordeaux sous la direction du Docteur Philippe Diolez.

Je souhaite avant tout remercier très sincèrement les membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail, le Docteur Laura Baciou, le Docteur Sylvain Richard et le Professeur Jean Pierre Mazat.

Je tiens également à remercier très chaleureusement le Professeur Roger Marthan de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie également le Professeur Michel HAÏSSAGUERRE pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe 3 d'électrophysiologie cardiaque du laboratoire.

Je remercie le Professeur Pierre Dos Santos de m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Mes remerciements vont également à mon directeur de thèse, le Docteur Philippe Diolez, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse et m'avoir fait confiance au cours de ces 4 années. Merci à tous les deux pour le temps que vous avez accordé à la relecture et à la correction de cette thèse.

Merci à la société OP2drugs et en particulier son directeur Frederic Marin pour m'avoir permise de travailler avec la molécule OP2113.

Merci également aux Docteurs Philippe Pasdois et Dominique Detaille qui m'ont accompagnée au cours de ces quatre années de thèse et qui étaient toujours là quand j'avais une question ou une incompréhension. Merci pour tous vos précieux conseils, et plus particulièrement Philippe merci pour ton aide vraiment importante pendant cette dernière partie de thèse.

Je remercie particulièrement le Docteur David Benoist pour son accompagnement tout au long de ma formation sur le Ionoptix. Merci d'avoir pris du temps pour m'aider, me conseiller, me rassurer. L'aide que tu m'as apportée était vraiment précieuse et efficace.

Merci à Mickaël Leguebe, pour m'avoir aidée à écrire un script Python. On partait de loin avec moi mais ça ne t'a pas découragé. Tu as pris le temps de tout m'expliquer (plusieurs fois). Même si je ne serai pas capable de faire ça toute seule j'ai vraiment appris beaucoup de choses avec toi. Merci également pour tes nombreux conseils.

Merci à Camille Colin et Emmanuel Suraniti, pour vos conseils, votre écoute attentive, pour nos déjeuners ou nos verres. C'est toujours un vrai plaisir de vous voir.

Merci à Emma Abell pour ton aide précieuse que ce soit pour l'anglais ou en manip, notamment quand je t'appelais au secours pour les calculs (ma bête noire).

Merci à Fanny Vaillant pour tes conseils et ton oreille attentive.

Merci à l'ensemble des stagiaires que j'ai pu encadrer et en particulier Nicolas Denisi. Tu m'as vraiment apporté une aide précieuse pour la dernière ligne droite de mes manip.

Merci également à tous mes collègues du deuxième étage et particulièrement Nolwenn Tan, Gwladys Ravon, et Elodie Perdreau.

Elodie et Gwladys qui ont partagé mon bureau. Des collègues qui m'ont beaucoup manqué une fois qu'elles sont parties l'une après l'autre. C'était vraiment top d'être avec vous. Vous étiez toujours de bon conseil bienveillant, vous m'avez écoutée quand ça n'allait pas, quand j'avais besoin d'aide. Vraiment merci.

Et Nolwenn, ma nono, cette thèse tu le sais n'aurait pas été pareille sans toi ! Merci pour tout, merci pour nos gouters, nos fous rires, nos pleurs, merci de m'avoir écoutée quand j'en avais besoin, tu es une vraie amie. Tout le monde aurait besoin d'une Nonno dans sa vie !

Merci également à Auriane mon crapaud d'amour, heureusement que tu étais là au laboratoire. Une amie avec qui je pouvais parler de tout, tu m'as manqué quand tu es partie. Le laboratoire était beaucoup plus triste sans toi. Il me tarde déjà d'aller te voir à Amsterdam, quand tout ça sera fini, voir où tu travailles où tu vis, pouvoir parler pendant des heures de tout et de rien.

Merci également à la team Run !! Un sacré challenge depuis février 2019, courir deux fois par semaines, je ne pensais pas en être capable. Merci surtout à Jérémy d'avoir coaché cette team et vous tous pour votre motivation, Nolwenn, Philippe, Emma, Laura, Mathieu, Julien, Peter, Julien, Jairo, Nestor, Léa! Même si vous êtes des machines et que vous allez beaucoup trop vite pour moi c'est vraiment un plaisir de se retrouver pour décompresser entre midi et deux.

Un grand merci à la team communication, Laurence, Anne Laure, Elodie, et Laure, avec qui c'est toujours un bonheur de travailler. Merci pour votre pêche communicative les filles, vous avez toujours le sourire c'est tellement agréable ! Menez des petits projets avec vous me permettait de m'évader un peu de tout l'aspect purement scientifique de ma thèse.

Merci également à Delphine Ge, qui a été là dans un tournant important de ma thèse, merci de m'avoir écoutée et conseillée. Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance.

Je remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont prodigué conseils et support tout au long de mon projet.

Je remercie ma famille et mes amies de m'avoir soutenue durant toutes ces années et d'avoir cru en moi. Merci à mes parents de m'avoir soutenue jusqu'au bout, merci à mes correcteurs préférés Laura, Laure Fabien, mes frères et sœurs. Laura le buffet sera tout à toi le jour de la délivrance! Merci à mes minis d'amour qui grandissent beaucoup trop vite !!! Zoé, merci pour ton aide également, même à l'autre bout du monde tu es toujours là. Mamie, pépé, merci pour avoir toujours été là pour moi, et pour continuer de veiller sur moi depuis là-haut, j'en suis certaine. Et merci à mon papi éternel et ma mamie d'amour, je ferai tout mon possible pour que vous soyez fière de moi.

Pour finir je souhaite remercier Etienne qui partage ma vie depuis plus de 3 ans, merci pour tout l'amour que tu m'apportes.

## Liste des publications & communications

### Articles

An old medicine as a new drug to prevent mitochondrial complex I from producing oxygen radicals, 2019, Plos One

Dominique Detaille., Philippe Pasdois., Audrey Sémont., Pierre Dos Santos., Philippe Diolez.

### Communications (poster)

Hypothesis on Skeletal Muscle Aging: Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocator Decreases Reactive Oxygen Species Production While Preserving Coupling Efficiency

Diolez.P, Bourdel-Marchasson.I, Calmettes.G, Pasdois.P, Detaille.D, Sémont A.

Rouland.R, Gouspillou.G.

EBEC, Riva del Garda 2016

Implication of mitochondrial Reactive Oxygen Species production in cardiomyocyte signaling and cardiac rhythm

Sémont A. , Pasdois P. , Colin C , Ernault A., Dos Santos P. & Diolez P.

EBEC, 2018 Budapest

Implication of mitochondrial Reactive Oxygen Species production in cardiomyocyte signaling and cardiac rhythm

Sémont A., Pasdois P., Colin C., Ernault A., Dos Santos P. & Diolez P.

ISACB, 2018 Bordeaux

### Communications (orales)

Implication of cardiac mitochondrial ROS production in cardiomyocyte signaling and cardiac rhythm

Sémont A., Detaille D., Pasdois P., Vaillant F., Abell E., Colin C., Arbault S., Dos Santos P.& Diolez P.

Groupe Français de Bioénergétique (GFB), 2017 Lacanau

Flash poster (Anglais) Journée scientifique départementale médicale

## Résumé

### I. Français

L'activation électrique des cardiomyocytes, via le courant de dépolarisation qu'elle induit, est primordiale dans la contraction cardiaque qui requiert l'adéquation de la production d'énergie par les mitochondries et des besoins énergétiques de l'appareil contractile. Les espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) ont été récemment impliquées dans la régulation de nombreux acteurs du couplage excitation-contraction cardiaque.

L'objectif de ce travail est d'explorer l'implication des ROS d'origine mitochondriale dans la régulation du couplage excitation-contraction au niveau du cardiomyocyte, en conditions physiologiques et pathologiques. C'est à cette fin qu'un modèle de surproduction endogène de ROS par addition de succinate - substrat énergétique mitochondrial - dans des cardiomyocytes isolés de cœur de rat a été mis au point. Différents protocoles pharmacologiques utilisant différents antioxydants (Trolox, MitoTEMPO et EUK) nous ont permis d'établir l'origine mitochondriale des ROS produits en présence de succinate. Enfin une étude pharmacologique utilisant la molécule OP2113 (inhibiteur spécifique de la production mitochondriale de ROS au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire- Brevet Philippe Diolez) nous a permis d'établir qu'environ 80% de cette production provenait du complexe I de la chaîne respiratoire.

Notre travail s'est alors attaché à étudier, sur des cardiomyocytes isolés battants, les effets des ROS mitochondriaux sur différents paramètres du couplage excitation-contraction. Le succinate, *via* une surproduction de ROS mitochondriaux, provoque une baisse de 50% de l'amplitude de la contraction. L'amplitude de la contraction initiale est rétablie en présence de Trolox, MitoTEMPO ou OP2113, ce qui indique l'implication des ROS mitochondriaux et plus spécifiquement ceux produits au niveau du site I<sub>0</sub>. Cette surproduction de ROS induit également une diminution de l'amplitude du transitoire calcique impliquant une diminution de la concentration en calcium systolique au cours de la contraction. Ces effets sont annulés en présence de Trolox et OP2113.

Nous nous sommes alors attachés à moduler la concentration mitochondriale de calcium grâce à la cyclosporine A (inhibiteur du pore de transition mitochondrial) et au Ru360 (inhibiteur de l'entrée de calcium dans la mitochondrie). Il s'est avéré que ces inhibiteurs induisent une production de ROS insensible au Trolox et à OP2113 dont l'origine reste à établir.

En conclusion une augmentation de la production mitochondriale de ROS se traduit par une diminution de la contraction intracytosolique et du transitoire calcique. L'ensemble de nos résultats illustre donc l'importance majeure de la mitochondrie dans le couplage excitation-contraction. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le contexte de l'insuffisance cardiaque aigüe ou chronique.

Mots clés: cardiomyocytes ; couplage excitation-contraction ; calcium ; mitochondrie ; espèces radicalaires de l'oxygène

## II. Anglais

The electrical activation of the cardiomyocyte through a generated depolarisation current is essential in the cardiac contraction, which requires the adequacy of the mitochondrial energy production and the energy needs of the contractile system. Radical oxygen species (ROS) have recently been involved in the regulation of many actors of the excitation-contraction coupling.

The aim of this study was to explore the involvement of mitochondrial ROS in the regulation of the excitation-contraction coupling in cardiomyocytes, under physiological and pathological conditions. A model of endogenous ROS overproduction with the use of succinate was developed in isolated rat cardiomyocytes. Different pharmacological protocols, using various antioxidants (Trolox, Mito-Tempo, EUK and OP2113) allowed us to establish the mitochondrial origin of ROS production. Finally, the use of OP2113, (a specific inhibitor of mitochondrial ROS production, Patent P.Diolez) enabled us to establish that approximately 80 % of ROS production came from complex I in the respiratory chain.

To start with, isolated cardiomyocytes were used to study the effects of mitochondrial ROS on different excitation-contraction coupling parameters. Succinate induced an overproduction of mitochondrial ROS, which lead to a drop of 50% of the contraction amplitude. The initial amplitude of contraction was recovered with addition of Trolox, Mito Tempo or OP2113, which demonstrates the implication of mitochondrial ROS produced at the site of Iq.

Secondly, the overproduction of ROS leads to a decrease of the calcium transient amplitude, due to a decrease of systolic calcium concentration during contraction. These effects were inhibited by Trolox and OP2113.

Finally, mitochondrial calcium concentration was modulated with the use of Cyclosporin A (mitochondrial transition pore inhibitor) and Ru360 (mitochondrial calcium entry inhibitor). The inhibitors induced a ROS production unresponsive to Trolox and OP2113. The origin of which remains to be established.

To conclude, an increase of mitochondrial ROS production results in a decrease of contraction amplitude and calcium transients. Our overall results demonstrate the critical significance of the mitochondrion in the excitation-contraction coupling. Our results open new therapeutic perspectives in the context of acute or chronic heart failure.

Keywords: cardiomyocytes; excitation-contraction coupling; calcium; mitochondrion; reactive oxygen species

# INTRODUCTION

## Introduction

### I. Le cœur : un organe siège d'une activité métabolique aérobie intense finement régulée

La fonction du cœur est de produire un débit sanguin systémique apte à satisfaire les besoins métaboliques de l'organisme dans des conditions de précharge normales. La satisfaction de ces besoins procède d'un apport en oxygène et en substrats énergétiques à chaque cellule de l'organisme en quantité suffisante pour lui permettre de synthétiser de l'ATP à une vitesse correspondant à ses besoins énergétiques. Elle procède de la succession de phases de contraction, définissant la systole, et de relaxation suivie de remplissage, définissant la diastole, et qui définissent ensemble le cycle cardiaque. Cette fonction, vitale par excellence, est donc assurée par la contraction rythmique et incessante du myocarde qui fait de cet organe le site d'une activité métabolique intense, susceptible de varier brutalement en fonction des besoins de l'organisme tout entier. Le cœur peut donc être assimilé à une pompe et sa fonction appréciée par l'activité mécanique qu'il développe. Comme tous les autres organes, il tire l'énergie nécessaire à l'accomplissement de ce travail mécanique (et donc de sa fonction) de l'oxydation de divers « substrats énergétiques » au premier rang desquels figurent les acides gras, le glucose et le lactate. C'est à cette fin que la circulation coronaire apporte, au niveau des myofibrilles, l'oxygène et des proportions variables de substrats énergétiques.

L'activité mécanique du myocarde est donc accomplie grâce au métabolisme énergétique, un processus complexe, se déroulant quasi exclusivement en aérobie au niveau du myocarde, très finement régulé et contrôlé, que l'on a coutume de diviser en trois étapes:

- l'utilisation des substrats énergétiques, essentiellement cytosolique, consistant en une série d'oxydations qui conduisent à la formation d'acétyl CoA;
- la phosphorylation oxydative, correspondant à la métabolisation mitochondriale de l'acétyl-CoA par le cycle de Krebs et conduisant à la production d'équivalents réduits, qui sont ensuite oxydés par la chaîne respiratoire mitochondriale, aboutissant à la formation d'ATP;
- le processus de transfert énergétique, faisant intervenir le système phosphocréatine - créatine kinase qui assure le transfert de l'énergie du site de production mitochondrial vers les différents sites d'utilisation que sont les ATPases, notamment au niveau des sarcomères et du réticulum sarcoplasmique.

Le cœur est un organe quelque peu exceptionnel du point de vue de l'énergétique, ne serait-ce que du fait de l'intensité de son activité métabolique. Un premier calcul simple permet d'illustrer cette affirmation. Considérons le ventricule gauche du cœur d'un homme de 70 kg au repos et en position couchée, pesant environ 0,2 kg, se contractant à une fréquence de 60 battements par minute pour éjecter un volume de 0,1 l de sang par battement, correspondant à un débit cardiaque de 6 L / min, contre une pression de 12 kPa (soit 90 mmHg). Il accomplit donc un travail de  $6 \times 12 = 72$  J/min, soit 100,7 kJ/jour. Ce travail équivaut, pour ce muscle de 200 g, à soulever un poids de dix tonnes d'une hauteur d'un mètre. L'hydrolyse de l'ATP produit



au niveau du pont actine-myosine est d'environ 60 kJ/mol dans des conditions physiologiques. Il faut donc pour accomplir ce travail quotidien d'environ 100 kJ :  $100 / (60 \times 0,6)^1 = 2,8$  moles d'ATP, soit  $499 \times 2,8 = 1\,400$  g d'ATP, soit six fois le poids du ventricule gauche. Cela explique que la perfusion coronaire du ventricule gauche (environ 0,25 % de la masse corporelle), capte environ 5% du débit cardiaque.

Une autre caractéristique essentielle du myocarde est sa capacité à modifier de manière brutale et sur une grande échelle son activité mécanique. A titre d'illustration, lors d'un exercice musculaire intense produit par un athlète, la consommation en oxygène de l'organisme est plus de dix fois la consommation au repos, obligeant ainsi le cœur à multiplier son débit par six. Le contrôle de l'utilisation des substrats énergétiques et le contrôle de la phosphorylation oxydative au niveau des myocytes cardiaques sont donc, peut-être plus qu'ailleurs, des processus essentiels à la vie. Ils permettent une balance précise et instantanée entre vitesse de régénération et d'utilisation de l'ATP. La voie de synthèse de l'ATP quantitativement la plus importante dans le myocarde est la phosphorylation oxydative. Un calcul simple permet de mieux appréhender l'importance vitale des processus de contrôle et d'intégration de l'utilisation des substrats énergétiques, de la respiration mitochondriale, du métabolisme des phosphates à haute énergie et de l'activité mécanique du myocarde. La vitesse d'utilisation de l'ATP par le myocarde varie entre 0,66 mmol/s/g tissu au repos et 2,35 mmol/s/g tissu en conditions de travail élevé. Le contenu intramyocytaire en ATP et en phosphocréatine se situe respectivement aux alentours de 10 mM et 25 mM. Cela signifie que pour une vitesse moyenne d'utilisation de l'ATP de 1 mmol/s/g tissu, le pool d'ATP intracellulaire doit être régénéré douze fois par minute. Même si l'on additionne le pool de phosphocréatine au pool d'ATP, le pool de phosphates à haute énergie est renouvelé 3 à 4 fois par minute par un cœur au « repos ». En d'autres termes, les réserves intracellulaires en phosphates à haute énergie ne permettent au cœur de battre que quinze secondes. Ceci illustre pourquoi la synthèse d'ATP doit être contrôlée avec beaucoup de précision.

## II. Le couplage excitation-contraction dans la cellule cardiaque

### 1) Structure du cardiomyocyte

Les cardiomyocytes sont des cellules musculaires particulières en raison des disques de jonctions (ou disques intercalaires) qui les relient. Ces disques intercalaires contiennent des desmosomes et des jonctions communicantes (jonctions gap). Les jonctions gap et les desmosomes (composés de connexines) assurent la cohésion des myocytes entre eux (cohésion intercellulaire) et permettent le maintien de l'architecture cellulaire (cohésion intracellulaire) en s'associant à des protéines du cytosquelette. Les connexines sont des protéines transmembranaires assemblées au nombre de six pour former un connexon

---

<sup>1</sup> Il est considéré que le rendement de la conversion de l'énergie chimique en travail est de 60%

comportant un pore. Au niveau cardiaque, il a été identifié quatre types de connexine : la connexine 45, la connexine 43 (prédominante dans le cœur adulte), la connexine 40, et la connexine 30.2. Les connexines assurent la communication électrique de la cellule.

Les flux ioniques assurés par les connexines permettent d'entraîner la contraction des sarcomères de manière coordonnée.

Le sarcomère est l'unité contractile des muscles striés squelettique et cardiaque. Au sein des cardiomyocytes, le sarcomère se répète sur la totalité de la cellule (Figure 1)

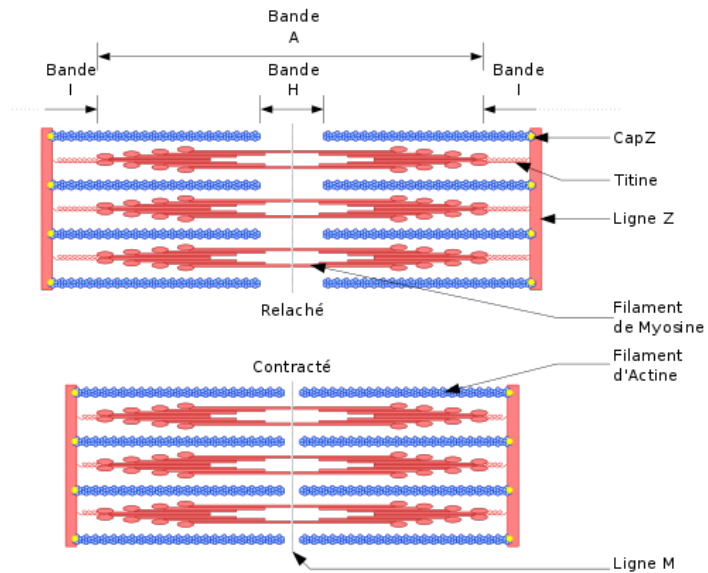


Figure 1 Structure d'un sarcomère

Représentation schématique du sarcomères, en rouge les filaments épais de myosine et en bleu les filaments fins d'actine. L'association de filaments fins d'actine, de filaments élastiques de titine et de filaments épais de myosine constitue le sarcomère, structure contractile caractéristique des cellules musculaires délimitées par deux bandes Z, et facilement identifiable en microscopie électronique.

## 2) De l'excitation au potentiel d'action

Le cœur est un organe qui présente une fonction autonome, régulée secondairement par le système nerveux végétatif ainsi que par des composantes hormonales. Le cœur comporte des cellules qui initient et propagent l'excitation : les cellules nodales et les cellules du tissu conducteur, ainsi que des cellules qui répondent à l'excitation par une contraction : les cardiomyocytes.

La membrane plasmique de la cellule cardiaque joue un rôle fondamental dans les processus électriques. Dans les cardiomyocytes, trois ions sont au cœur de la polarité de la cellule : le sodium, le potassium et le calcium. Le passage d'un ion au travers de la membrane dépend du gradient électrochimique, qui comprend lui-même le gradient de concentration et le potentiel électrique de la membrane. Les différences de concentration des ions sodium, potassium et calcium entre les milieux intra et extracellulaire, ainsi que les propriétés d'ouverture des canaux ioniques, expliquent l'existence des différences de potentiel électrique entre les deux faces de la

Ions	Concentration intracellulaire	Concentration extracellulaire
Na <sup>+</sup>	10mM	140mM
K <sup>+</sup>	150mM	5mM
Ca <sup>2+</sup>	10 <sup>-4</sup> mM	2mM

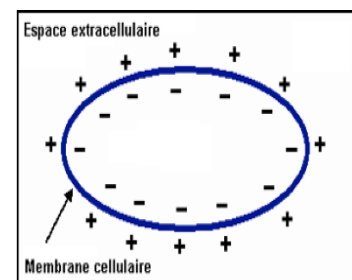


Figure 2 Concentrations ioniques intra- et extracellulaire dans un cardiomyocyte

membrane des cellules cardiaques (voir Figure 2).

Au repos, les cellules myocardiques sont polarisées avec une prédominance de charges positives à l'extérieur et de charges négatives à l'intérieur. Le potentiel de membrane est donc d'environ -70mV.

D'après l'équation de Nernst, le potentiel d'équilibre correspond à l'équilibre entre le gradient électrique et le gradient de concentration de l'ion. La plupart des canaux ioniques sont dits « voltage dépendants » car comme leur nom l'indique leur ouverture et fermeture dépendent du potentiel de membrane. Le potentiel de repos est maintenu par deux pompes électrogéniques (Figure 3) :

- NCX qui échange trois ions  $\text{Na}^+$  contre un ion  $\text{Ca}^{2+}$  sans consommation d'ATP, qui peut également fonctionner en mode inverse (entrée de calcium dans la cellule) (Figure 3A)
- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ou Na-K ATPases, qui échangent trois ions  $\text{Na}^+$  contre deux ions  $\text{K}^+$  au prix d'une consommation d'ATP (Figure 3B)

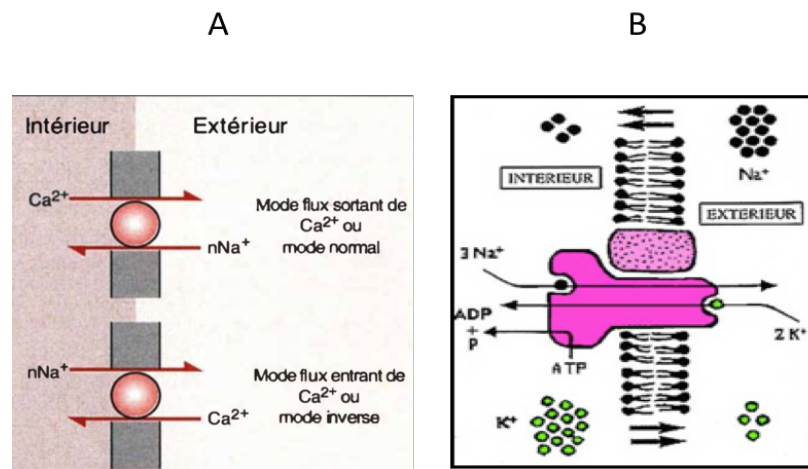


Figure 3 Pompes électrogéniques qui régulent le potentiel de repos

Les cardiomyocytes ainsi que les cellules nodales sont des cellules excitables. Leur excitation déclenche un potentiel d'action susceptible de se propager à l'ensemble de l'organe. Lorsqu'elle est stimulée (par l'arrivée du potentiel d'action), la cellule cardiaque se dépolarise c'est-à-dire que la membrane du cardiomyocyte va devenir positive à l'intérieur et négative à l'extérieur. Ceci est dû au fait que le potentiel d'action augmente la perméabilité de la membrane aux charges positives (notamment aux  $\text{Na}^+$  et pour certaines au  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Kai-Chien Yanga, *et al*, 2014). Ces courants ioniques sont activés par le potentiel d'action qui permet le passage sélectif des ions par des canaux ioniques. Ces canaux vont s'ouvrir et ainsi permettre la diffusion des ions en fonction de leur gradient électrochimique. Le passage des ions au travers des canaux ioniques génère des courants électriques responsables des phénomènes de dépolarisation et de repolarisation membranaire. Ces variations du potentiel de membrane sont à la base du potentiel d'action (Nerbonne & Kass, 2005).

Ainsi, en conditions physiologiques, le potentiel d'action déclenché spontanément (à une fréquence d'environ 1 Hz) au niveau des cellules du nœud sinusal (situé au niveau du toit de l'oreillette droite, proche de l'insertion de la veine cave supérieure) se propage de proche en proche aux cellules de l'oreillette droite puis de l'oreillette gauche, et parvient au faisceau de His. Ce courant de dépolarisation est alors propagé rapidement (à une vitesse de deux à quatre mètres par seconde) à l'ensemble des deux ventricules cardiaques par les différentes branches du faisceau de His et le tissu de Purkinje, ce qui déclenche la dépolarisation synchrone des cardiomyocytes ventriculaires (Figure 4).

Le potentiel d'action ventriculaire (représenté sur la Figure 5) correspond à une modification brutale du potentiel de membrane (dépolarisation membranaire) qui par conséquent ouvre les canaux sodiques ( $\text{Nav1.5}$ ) entraînant l'entrée rapide d'ions  $\text{Na}^+$  (Phase 0). Le courant sodique ( $I_{\text{Na}}$ ) dépolarise la cellule cardiaque depuis un potentiel de repos (environ  $-85\text{mV}$ ) jusqu'à une valeur maximale (environ  $+20\text{mV}$ ).

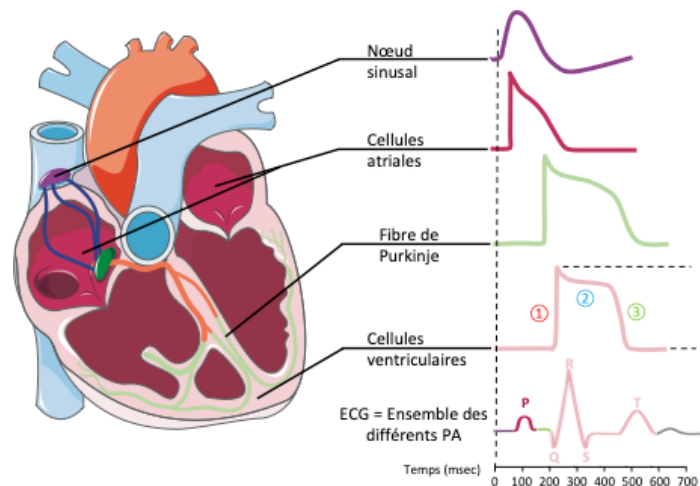


Figure 4 Système de conduction électrique du cœur

La contraction cardiaque s'effectue par la dépolarisation des différents types cellulaires cardiaques. La genèse de l'activité cardiaque s'établit dans le nœud sinusal (violet) pour ensuite dépolariser les cellules atriales. Ensuite l'activité électrique migre dans le nœud atrio-ventriculaire (en vert) et empreinte un système de conduction rapide via le faisceau de His et les fibres de Purkinje (en orange & vert). Finalement, l'activité électrique arrive jusqu'aux deux ventricules (en rose) aboutissant à l'éjection du sang dans les deux circulations sanguines (pulmonaire et systémique).

La forme des PA, la durée et les courants responsables du PA varient en fonction des tissus. La forme du PA dépend des conditions extérieures (température, environnement ionique, oxygénation, système nerveux végétatif, médicaments, toxiques) et du type de cellules spécialisées. L'aspect du potentiel d'action est modulé par la présence ou non de certains canaux au niveau des myocytes cardiaques. L'expression des divers canaux au niveau cardiaque est très hétérogène.

Puis le canal sodique s'inactive empêchant l'entrée du sodium, et le canal potassique s'active ce qui entraîne un courant potassique sortant transitoire ( $I_{to}$ ), entraînant la repolarisation qui est précoce, rapide et partielle (Phase 1).

Les canaux calciques de type L (LTCC ou  $Ca_v1.2$ ), ouverts pendant la phase 0 (seuil d'activation  $-30mV$ ), génèrent la composante lente du courant calcique ( $I_{CaL}$ ) et sont responsables de la phase plateau du potentiel d'action ventriculaire (Phase 2). Lors de cette phase de plateau on distingue un courant entrant

calcique et donc une entrée de calcium dans la cellule en contrepartie d'une sortie de potassium. Cette phase 2 induite par le courant  $I_{CaL}$  déclenche la contraction des cardiomyocytes en provoquant la libération du  $Ca^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique. L'inactivation de ces canaux est déterminante dans la durée du potentiel d'action, et dans le déclenchement de la phase 3. La pompe NCX participe également à cette phase de plateau.

Par la suite, les canaux calciques se ferment, permettant la repolarisation de la membrane par les courants potassiques qui deviennent prédominants, jusqu'à l'obtention du potentiel de repos (Phase 3). Au cours de cette phase (Phase 4) le maintien de ce potentiel de repos dépend essentiellement des ions potassiques qui est assuré majoritairement par la pompe  $Na^+/K^+ ATP_{ase}$  et courant potassique  $I_{K1}$ . Ce canal permet la sortie du potassium puisque le potentiel d'équilibre des ions potassiques est plus négatifs que le potentiel de membrane ( $-90$  et  $-70$  respectivement). (Nerbonne & Kass, 2005).

Les phases 0, 1, 2 et 3 appartiennent au potentiel d'action, la phase 4 au potentiel de repos des cardiomyocytes ou à la dépolarisation diastolique des cellules douées d'automatisme.

### 3) Mécanisme d'excitation-contraction

#### a. Du potentiel d'action à l'augmentation du calcium intracytosolique : la libération de calcium induite par le calcium

« It is quite impossible to explain the rapid development of full activity in a skeletal muscle twitch by assuming that it is set up by the arrival at any point of some substance diffusing from the surface: diffusion is far too slow. Either we must suppose that the muscle is stimulated by excitation (natural or artificial), throughout the interior, not merely at the

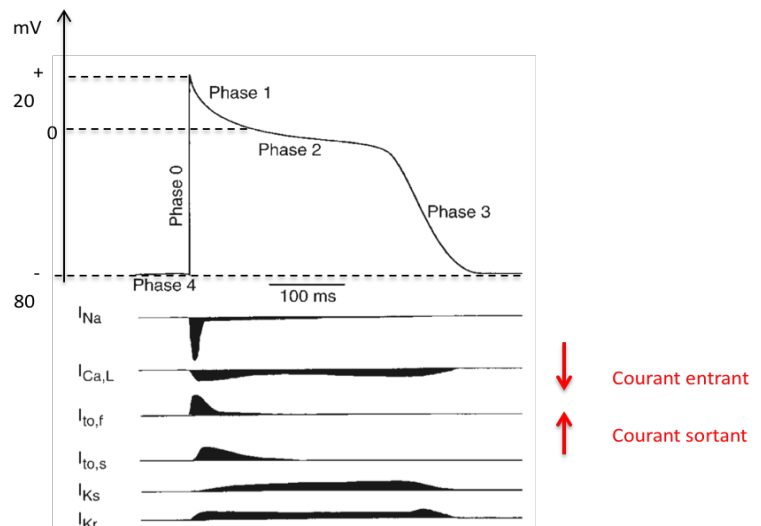


Figure 5 Représentation d'un potentiel d'action de cardiomyocyte ventriculaire

On parle d'un courant entrant quand il est négatif et qu'il dépolarise la membrane et inversement un courant sortant quand il est positif et qu'il repolarise la membrane. Figure adaptée de Nerbonne & Kass 2005.

surface; or we must look for some physical or physico-chemical process which is related by excitation at the surface and then propagated inwards. » (HILL, 1949). Cette observation de (HILL, 1949), prémonitoire, qui posait que la diffusion est trop lente pour permettre à une substance quelconque entrant dans le milieu intracellulaire d'activer en un temps très court en tout point de la cellule la « machinerie » contractile, est à la base du concept de couplage excitation-contraction qui décrit l'ensemble des phénomènes expliquant comment la dépolarisation membranaire (le potentiel d'action) initie la contraction.

En cohérence avec la prédiction de (HILL, 1949), la contraction ample et rapide des cardiomyocytes adultes s'explique par le fait que l'activation du muscle cardiaque adulte repose sur un processus plus rapide que la diffusion, et qu'un activateur diffusible, dont on sait maintenant qu'il s'agit du calcium, est libéré en grande quantité à l'intérieur de la cellule. Ces deux phénomènes sont à la base du couplage excitation-contraction qui dépend, au niveau des cardiomyocytes adultes, de l'interaction entre deux systèmes membranaires et qui permet de surmonter les limitations imposées par la lenteur des phénomènes de diffusion et la nécessité de grandes quantités

d'activateur. Le premier système membranaire est celui du système tubulaire transverse (système t ou tubules t) qui consiste en des invaginations de la membrane plasmique qui pénètrent au cœur du cardiomyocyte et propagent ainsi le potentiel d'action à l'intérieur du cardiomyocyte. Le second système est le réticulum sarcoplasmique qui délimite un large compartiment intracellulaire au sein duquel la concentration en calcium (l'activateur) est très élevée (Figure 6). Chez les cardiomyocytes fœtaux, qui se contractent lentement et développent peu de tension, ces systèmes membranaires spécialisés sont absents et l'activation dépend exclusivement de la diffusion du calcium extracellulaire entrant et sortant de la cellule par la membrane plasmique. En revanche, les cardiomyocytes adultes, qui se

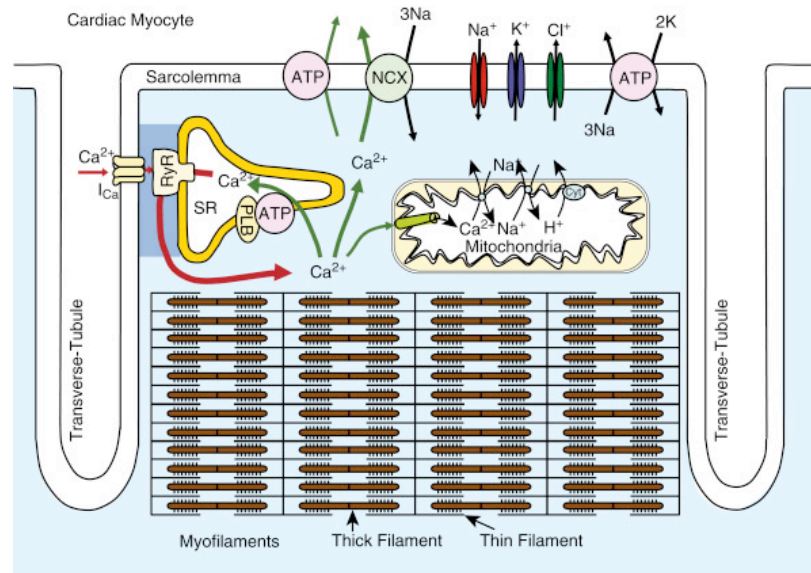


Figure 6 Le couplage excitation-contraction cardiaque

Dans la cellule, le potentiel d'action déclenche la contraction cardiaque, elle-même précédée par une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire qui atteint son maximum pendant le plateau du potentiel d'action. Le couplage ECC met en jeu une cascade d'événements au cours desquels le calcium joue un rôle essentiel en permettant la formation des ponts actine-myosine à l'origine de la contraction. On distingue également les mouvements du calcium lors d'un cycle cardiaque avec une entrée de calcium par les canaux calciques de type L du tubule transverse (invagination de la membrane plasmique) en face des canaux récepteurs de la ryanodine des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique. L'entrée de calcium provoque la libération de calcium par les canaux récepteurs de la ryanodine. Le calcium libéré se fixe sur les protéines contractiles, provoquant leur contraction. La relaxation se traduit par un recaptage du calcium par la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase qui est contrôlée par le phospholamban vu par (Bers, 2018).

contractent rapidement et développent une tension élevée, sont activés par du calcium dont l'origine est intracellulaire (le réticulum sarcoplasmique) et dont la libération est déclenchée par un potentiel d'action transmis jusqu'au cœur de la cellule le long du système t. Ainsi, chez le cardiomyocytes adultes, plus de calcium est disponible pour activer la contraction, et les distances de diffusion du calcium vers ses sites de fixation (la troponine C) sont plus courtes.

Incidentement, on peut noter que ce phénomène présente un autre avantage non négligeable. La pénétration de calcium (chargé positivement) depuis le milieu extracellulaire vers le cytosol (polarisé négativement) induit un courant de dépolarisation potentiellement proarythmogène, alors que la libération de calcium depuis le réticulum sarcoplasmique, qui induit un cycle de calcium intracellulaire, n'est pas dépolarisante.

Chez le cardiomyocyte adulte en conditions basales, la libération de calcium depuis le réticulum sarcoplasmique est suffisante pour occuper 40% seulement des sites de fixation sur la troponine C. En conséquence, l'intensité de la réponse contractile peut être régulée par des phénomènes modifiant la quantité de calcium libérée ou l'affinité de la troponine C pour le calcium.

Les tubules T sont des invaginations en doigt de gant de la membrane plasmique. Ils représentent environ 30% de la membrane des cardiomyocytes. Ils sont riches en canaux calciques voltage-dépendants, en pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$   $\text{ATP}^{\text{ase}}$  et NCX. D'après une étude la distribution membranaire des courants ioniques au sein des tubules T est de 80% pour le courant  $I_{\text{CaL}}$ , 63% pour le courant  $I_{\text{NCX}}$ , et 59% pour le courant  $I_{\text{Na/K}}$  dans les cardiomyocytes de rat (Brette & Orchard, 2007).

L'onde de dépolarisation du potentiel d'action se propage le long des tubules T et ouvre le canal calcique voltage dépendant LTCC (L-type calcium channels, ce nom est dû à sa longue ouverture). Il en résulte une augmentation de la perméabilité membranaire du tubule T au calcium et une entrée de calcium dans le cytoplasme de la cellule. Cet influx du calcium dans les cardiomyocytes à travers le LTCC pendant la phase 2 du potentiel d'action déclenche en retour la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  des zones de stockage intracellulaire, à savoir le réticulum sarcoplasmique. Ce phénomène est appelé CICR, « Calcium induced, calcium released ». La libération du calcium des citernes du RS suit le gradient de concentration du calcium entre le RS (où elle est très élevée, de l'ordre de 5mM) et le cytosol (où elle est beaucoup plus basse, inférieure à 0,1 $\mu\text{M}$  en phase relaxée) (Figure 7).

Le réticulum représente un réservoir important de calcium et contient une molécule tampon, la calséquestrine, qui est un complexe protéique qui fixe les ions calciques. Sa capacité à complexer les ions  $\text{Ca}^{2+}$  permet d'augmenter considérablement la concentration calcique dans le réticulum sarcoplasmique, qui sans cette fixation serait toxique.



On distingue deux régions dans le réticulum sarcoplasmique (Figure 7) (De la Fuente & Sheu, 2019):

- Les « citernes subsarcolemmales » qui contiennent le canal qui libère le calcium du réticulum dans la cellule (RyR2) lorsqu'il est stimulé par l'entrée de calcium dans la cellule (par le LTTP, L-type channels)
- Le « réseau sarcotubulaire » qui contient la pompe SERCA qui diminue la concentration de calcium cellulaire en le recapturant ce dernier pour le stocker dans le réticulum sarcoplasmique lors de la relaxation.

La proximité du canal voltage-dépendant de la membrane plasmique et du canal à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique résulte en l'émergence de micro-compartiments (appelés diades) permettant un couplage fonctionnel entre ces deux types de canaux. Ainsi, une entrée modeste de calcium dans le cytosol depuis le milieu extracellulaire est convertie en une libération « massive » de calcium dans le cytosol depuis le réticulum sarcoplasmique.

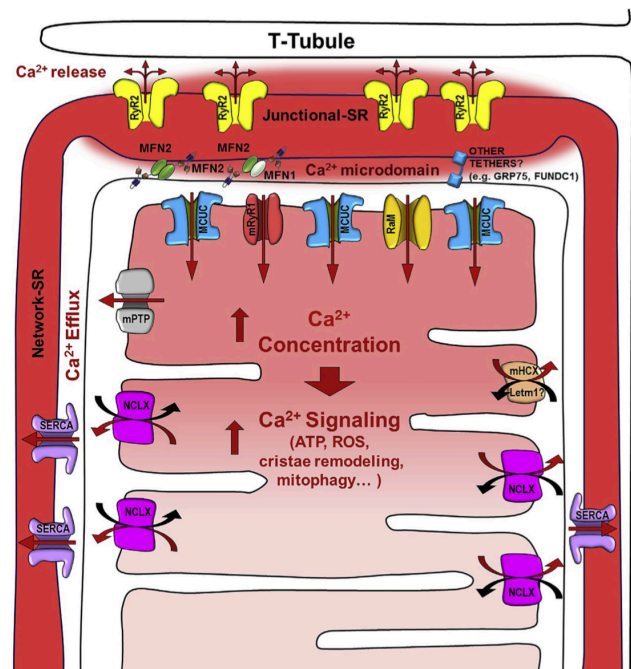


Figure 7 Schéma des composés impliqués dans le transfert du calcium entre le réticulum et la mitochondrie. Représentation schématique des T-tubules, du réticulum sarcoplasmique (jonctionnel et network) et de la mitochondrie. Les différents canaux impliqués dans le transport calcique sont aussi représentés à savoir le récepteur ryanodine de type 2 (RyR2), l'uniporteur mitochondrial calcique (MCU) à l'interface entre la mitochondrie et la partie jonctionnel du RS, mais également le rapide mode (RaM), le pore de transition de perméabilité (mPTP), l'échangeur mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCLX) proche de la partie network du RS comportant la SERCA. La proximité de la mitochondrie et du réticulum sarcoplasmique permet une communication étroite entre ces deux organelles. (De la Fuente & Sheu, 2019).

### b. De l'augmentation du calcium intracytosolique au raccourcissement des sarcomères

En conditions de concentration en calcium intracytosolique basse le domaine d'interaction entre l'actine et les têtes de myosine est masqué par la tropomyosine. La tropomyosine est une protéine fibreuse dimérique (composée d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité bêta) logée dans la gouttière du microfilament d'actine. Elle s'enroule autour de celui-ci pour le stabiliser. Un complexe sensible au calcium appelé la troponine est arrimé à la tropomyosine tous les 400 angström environ.

La troponine est un élément globulaire protéique participant à la composition du myofilament fin (Figure 8). Elle permet la stabilisation du complexe actine-tropomyosine. Il existe trois sous-unités différentes de troponine :



- Troponine T qui attache le complexe troponine à la tropomyosine et l'actine
- Troponine I qui inhibe l'activité  $ATP_{asique}$  de la myosine lors de l'interaction actine-myosine
- Troponine C qui lie le calcium et permet de déclencher la contraction

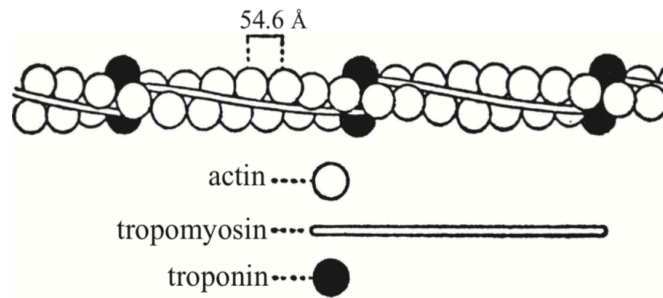


Figure 8 Schéma des myofilaments fin d'actine (Wakabayashi, 2015)

Les protéines contractiles (l'actine et la myosine) vont s'activer sous l'influence de l'augmentation de la concentration intracytosolique en calcium. La longueur des sarcomères varie en conséquence du fait du glissement des filaments fins d'actine dans le réseau des filaments épais de myosine : la longueur de la bande A (longueur des filaments de myosine) reste inchangée, tandis que les bandes H et I ont des longueurs variables. Une cascade d'événements très complexes survient entre le moment où la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) passe de  $0,01 \mu\text{M/l}$  au repos à  $10 \mu\text{M/l}$  ( $\times 1\,000$ ).

Le  $Ca^{2+}$  intracellulaire se fixe sur le site spécifique de la troponine C (cf. le point 1 de la Figure 9). Cette fixation modifie la conformation de la molécule de tropomyosine : le complexe actine – tropomyosine se désolidarise permettant de démasquer les sites de fixation de l'actine de la tête de myosine (point 2).

Les têtes globulaires de myosine se fixent alors sur les sites spécifiques de l'actine. Dans le même temps, la fixation du  $Ca^{2+}$  sur la troponine C permet de lever l'inhibition exercée par la troponine I sur l'activité  $ATP_{asique}$  de la tête de myosine. (Bers, 2002a) ; (Köhler *et al.*, 2014).

Après hydrolyse de l'ATP sur la tête de myosine, le  $P_i$  puis l'ADP se détachent du complexe permettant une modification de l'angle formé par la tête de myosine (point 3, de  $90^\circ$  celui-ci se réduit à  $45^\circ$ ). La libération des molécules d'ADP et de  $P_i$  entraîne le glissement de l'actine sur la myosine.

La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP permet la rupture de la liaison entre l'actine et la myosine et le redressement de la tête de myosine (point 4). Chaque nouveau cycle entraîne un raccourcissement du sarcomère de  $10\text{nm}$  environ. L'hydrolyse de l'ATP en  $ADP+P_i$  (point 5)

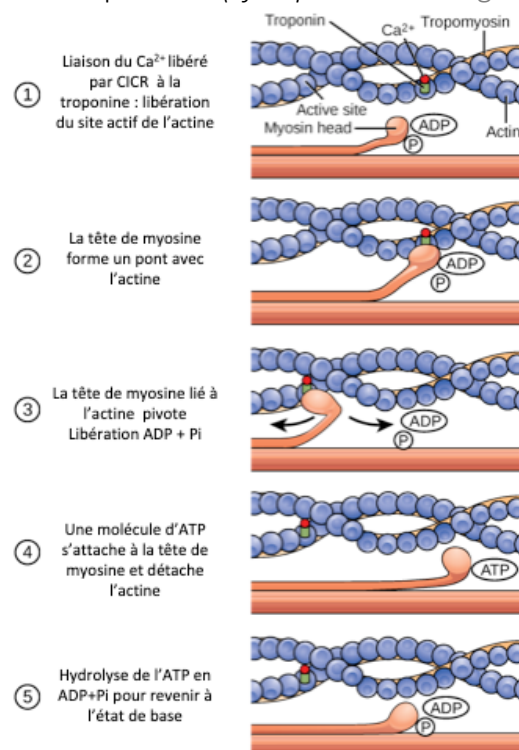


Figure 9 Cycle actine myosine lors d'une contraction

Adapté de <https://courses.lumenlearning.com>

permet au cycle de se répéter tant que le calcium est présent en quantité suffisante dans la cellule. Le mécanisme prend fin quand la concentration en calcium intracellulaire passe en dessous de  $1\mu\text{mol/l}$  et que la troponine ne fixe plus le calcium.

La contraction musculaire nécessite de grandes quantités d'ATP. Cette molécule est produite par la cellule au niveau des mitochondries durant la phosphorylation oxydative.

#### 4) Mécanisme de relaxation

Pour que la relaxation ait lieu, le calcium doit être évacué du cytoplasme, entraînant une diminution de la concentration intracellulaire de calcium et donc la dissociation du calcium de la troponine C. Quatre modalités de transport de calcium sont impliquées dans l'évacuation du calcium intracellulaire (Bers, 2002). Le calcium peut être transporté

- 1) vers le réticulum sarcoplasmique par l'action de la SR Calcium ATP<sub>ases</sub> pump, SERCA),
- 2) vers le milieu extracellulaire par l'action de la Ca-ATP<sub>ase</sub> du sarcolemme,
- 3) vers le milieu extracellulaire par l'échangeur sodium/calcium (Na/Ca exchanger, NCX),
- 4) vers la matrice mitochondriale.

Le Tableau 1 suivant représente la répartition des 3 principaux types de transports de calcium. L'implication du transport du calcium vers la mitochondrie est développée à la section suivante.

La concentration de calcium intracellulaire diminue au moment de la diastole. Le calcium est principalement capturé par la SERCA pour être stocké à nouveau dans le réticulum. La SERCA est une pompe ATP<sub>ase</sub> qui dissipe rapidement environ 70 à 92% du calcium intracellulaire (Wang *et al.*, 2002). La SERCA compte plusieurs isoformes, SERCA 2a étant la principale isoforme exprimée au niveau cardiaque (Periasamy & Kalyanasundaram, 2007).

Transporteurs	Suppression flux calcique
SL-Ca Pompe	0,86%
Na/Ca exchanger	30%
SR-Ca-Pompe	68,5%

Tableau 1 Répartition de la recapture du calcium lors de la relaxation



Le phospholamban est une protéine de la membrane du réticulum qui, dans sa forme déphosphorylée, est un inhibiteur du canal SERCA. Cependant lorsque le phospholamban est phosphorylé par l'action de la PKA, il se dissocie de la pompe SERCA2a et active la pompe calcique. Cette phosphorylation stimule le stockage calcique dans le SR ce qui aide à protéger le cœur contre des situations de surcharge (Köhler *et al.*, 2014) ; (MacLennan & Kranias, 2003)

Une fois dans le réticulum, le calcium est chélaté par plusieurs protéines présentes dans les citernes subsarcolemmales. La plus importante est la calséquestrine, dont chaque molécule fixe entre 18 et 50 molécules de calcium. La présence de telles protéines à fort pouvoir chélateur de  $\text{Ca}^{2+}$  permet de maintenir une forte concentration calcique dans le RS sous forme d'ions liés et libres.

Puis nous trouvons l'échangeur calcique sodique (NCX), qui se trouve au niveau du sarcolemme. Au cours de la diastole et dans des conditions physiologiques, à savoir un faible

potentiel de  $[Na^+]_i$  et une membrane polarisée, le NCX échange l'efflux d'un ion  $Ca^{2+}$  contre l'influx de trois ions  $Na^+$  dans la cellule, générant ainsi un courant dépolarisant (Köhler *et al.*, 2014). Cet échange est électrogénique, donc pro-arythmogène et se produit donc aux dépens du potentiel de membrane.

Également la pompe calcium  $ATP_{ase}$  du sarcolemme couple l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP pour activer le transport de calcium vers le milieu extracellulaire. L'augmentation du calcium cytosolique stimule la pompe indirectement. Quand cette concentration est faible la pompe est inhibée au niveau de la région C terminale intracytosolique. Cette inhibition est levée quand cette région C terminale est liée au complexe calcium-calmoduline et la pompe est donc activée.

On distingue deux voies de signalisation cellulaire cardiaques impliquées dans l'élévation des deux seconds messagers principaux du cœur : le calcium et l'AMP cyclique. Comme nous l'avons vu la SERCA est régulée par le phospholamban qui est la cible principale de la phosphorylation de la

protéine kinase A (PKA) via la deuxième voie de signalisation, la voie du récepteur  $\beta$  adrénergique. Une élévation en AMP cyclique active la PKA (protéine kinase dépendante de cAMP) qui phosphoryle et altère la fonction de quelques protéines cardiaques comme le phospholamban. Sous sa forme phosphorylée le phospholamban se dissocie de SERCA en activant cette dernière (MacLennan & Kranias, 2003) (Figure 10).

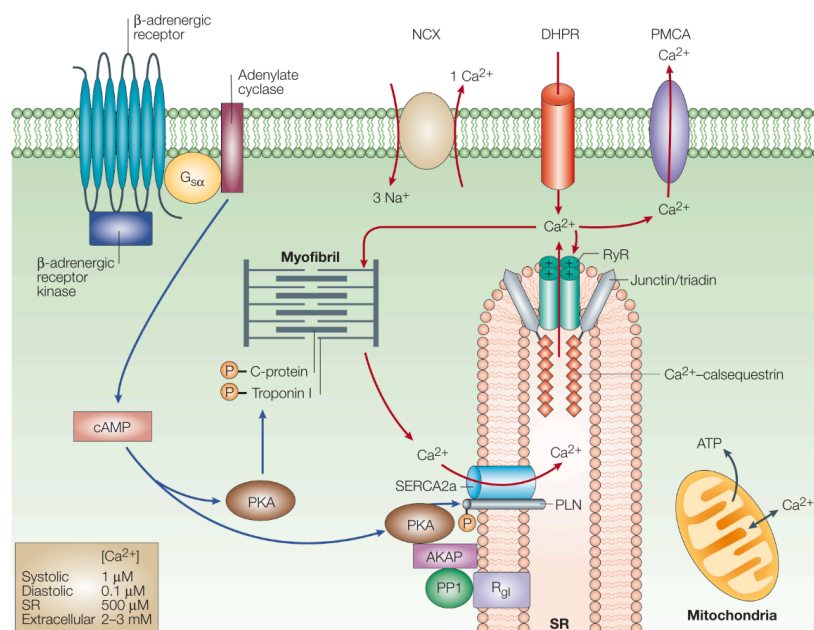


Figure 10 Interactions entre les voies de signalisation cardiaques (MacLennan & Kranias, 2003)

Le couplage excitation-contraction suivant le modèle établi par Bers (Bers, 2002), peut être résumé dans le Tableau 2 suivant. De nombreuses études, ainsi que des travaux de l'équipe ont remis en cause l'implication de la mitochondrie dans ce modèle que nous allons détailler dans le paragraphe suivant.

Le Tableau 2 reprend les rôles classiques des différents acteurs du couplage excitation-contraction relaxation : le sarcolemme, le tubule transverse, le réticulum sarcoplasmique et les myofilaments. Les événements sont classés par ordre chronologique lors de la séquence excitation-contraction-relaxation.

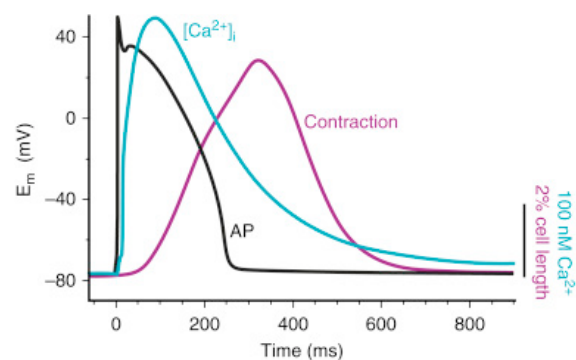
Structure	Excitation	Contraction	Relaxation
Sarcolemme	1) Dépolarisation (canaux sodiques) 2) Ouverture des canaux calciques 3) Plateau du PA 6) Augmentation de la concentration de calcium		9) Diminution de la concentration de calcium 10) Recapture du calcium (Na/Ca exchanger)
Tubule transverse	4) Propagation du potentiel d'action dans la cellule	4) Ouverture des canaux qui libèrent le calcium intracellulaire (LTCC)	
Réticulum sarcoplasmique		5) Calcium induced, calcium released : sortie du calcium par le RyR2	10) Recapture du calcium par la SERCA 11) Stockage et régulation par la casequestrine
Myofilaments		7) Liaison du calcium à la Troponine C 8) Cycle actine myosine	10) Rupture liaison calcium troponine C
Mitochondrie			10) Recapture du calcium via le MCU

Tableau 2 Les principaux acteurs du couplage excitation-contraction

Les différentes étapes temporelles du couplage excitation-contraction peuvent être résumées sur la Figure 11 suivante. Comme nous l'avons vu précédemment, dans un premier temps le potentiel d'action excite la cellule, ce qui entraîne l'augmentation de la concentration de calcium, puis vient la contraction.

*Figure 11 Exemple d'enregistrement simultané du potentiel d'action, du transitoire calcique et de la contraction*

*La figure montre la superposition temporelle de la contraction, de la concentration intracellulaire de calcium, et de la dépolarisation membranaire. Ces paramètres ont été mesurés sur un cardiomyocyte ventriculaire de lapin à 37°C pendant une stimulation de 1 Hertz (Nerbonne & Kass, 2005).*



5) Implication de la mitochondrie dans la contraction cardiaque

Alors que la conception actuelle du couplage excitation-contraction suggèrerait que la mitochondrie joue un faible rôle dans l'homéostasie calcique, elle est cependant importante pour la production d'énergie. Le calcium entre au niveau de l'uniporteur mitochondriale MCU sous un gradient électrochimique d'environ -180mV. Le calcium est expulsé par l'antiporteur Na/Ca, et le sodium quant à lui est éliminé au niveau de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Figure 12) (Griffiths *et al.*, 2010).

Une quantité élevée de calcium au niveau du cytoplasme entraine une augmentation de la concentration calcique mitochondriale, ce qui active les déshydrogénases mitochondriales. En effet le calcium stimule les déshydrogénases du cycle de Krebs, ce qui augmente la production de NADH (nicotinamide adénine di nucléotide) et la quantité d'ATP pour répondre à la demande énergétique de la cellule (Figure 13) (Brandes & Bers, 1997) ; (Diolez *et al.*, 2006) ;(Griffiths *et al.*, 2010).

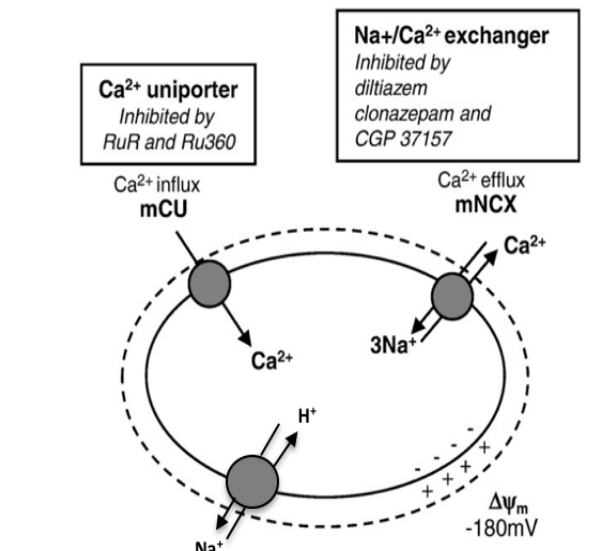


Figure 12 Voies de transport du calcium dans des mitochondries isolées dans des conditions physiologiques

L'influx de calcium se fait par le canal MCU, l'efflux par l'intermédiaire de l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> le mNCX. L'ovale en trait plein représente la membrane interne et l'ovale en pointillé la membrane externe perméable. Δψ<sub>m</sub> = potentiel membranaire mitochondrial, environ -180 mV dans les mitochondries (Griffiths *et al.*, 2010).

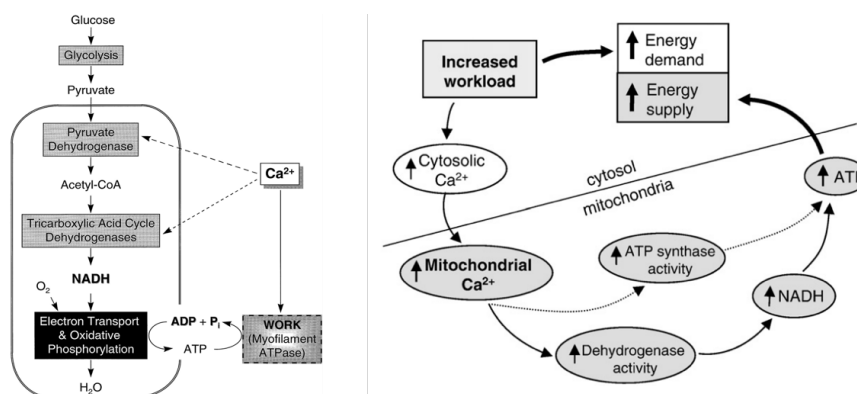


Figure 13 Deux représentations du cycle calcique à travers la membrane interne mitochondriale

de gauche à droite : (Brandes & Bers, 1997) et (Griffiths *et al.*, 2010)

Une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire entraine une augmentation de la demande en ATP ce qui cause l'augmentation de la quantité de calcium mitochondrial. On distingue plusieurs mécanismes de régulation tels que le contrôle direct de la production de NADH par la stimulation de la pyruvate dshydrogénase, une enzymes du cycle de Krebs. (Brandes & Bers, 1997).

La mitochondrie est un des acteurs essentiels dans la régulation dynamique du signal calcique. La capture du calcium au sein de la mitochondrie est sous la dépendance du potentiel de membrane négatif à l'intérieur (matrice). Cette capture joue un rôle crucial dans la physiologie et la pathologie cellulaire. (Görlach *et al.*, 2015).

La Figure 14 souligne les principaux mécanismes d'entrée du calcium dans la mitochondrie. On trouve dans un premier temps le MCU (Mitochondrie Calcium Uniport) : des études récentes suggèrent que le MCU est un canal calcique très sélectif. L'uniport mitochondrial est le canal majeur de l'entrée des ions calcium dans la mitochondrie (Brookes, 2004). La capture du calcium par l'uniport de la mitochondrie est dépendante de la libération de ce dernier par le Ryr<sub>2</sub> du réticulum. Des altérations dans la libération du calcium affecteront également la fonction mitochondriale par la régulation de la capture du calcium par la mitochondrie (Xie *et al.*, 2015).

Également connu, le canal RaM, « rapide mode » permet des changements rapides dans la concentration du calcium mitochondrial. Ce canal est sensible à des concentrations de moins de 300nM de calcium (Beutner *et al.*, 2001).

L'étude de (Beutner *et al.*, 2001) a également démontré l'existence d'une isoforme du canal à la ryanodine sur la membrane interne mitochondriale que l'on appelle le mRyR<sub>1</sub>. D'après cette étude ce canal permettrait la capture rapide de calcium, et participerait ainsi à la régulation des processus cellulaires modulés par le calcium tel que la production d'ATP.

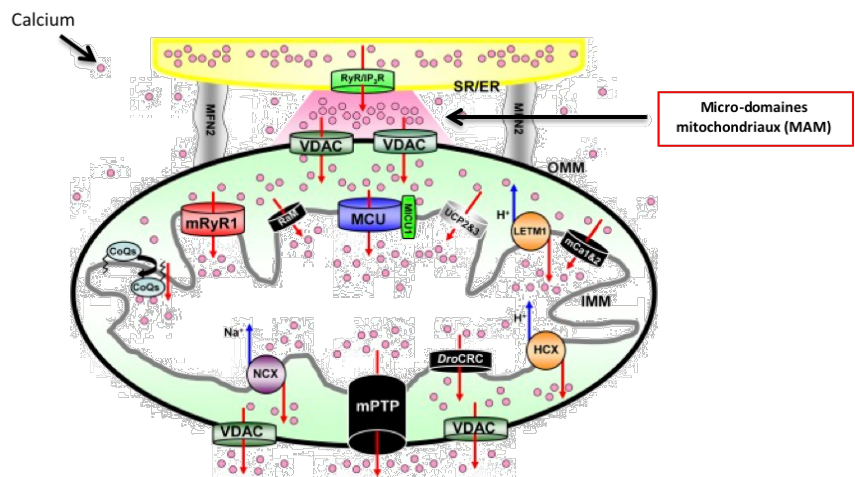


Figure 14 Influx et efflux calcique dans la mitochondrie Cette figure représente un schéma des différents canaux/transporteurs de calcium mitochondriaux pour les mécanismes d'influx et d'efflux. Le couplage étroit et fonctionnel des mitochondries (vert) et du réticulum sarcoplasmique (jaune) est représenté ici en rose, et est attribué à la structure spécifique d'attaches telle que les protéines mitofusins 2 représentées en grises. Les sites libérant du Ca<sup>2+</sup> du réticulum font face à des microdomaines situés entre les mitochondries et le RS (zone en rose). Au moment de la libération du calcium par le réticulum, la mitochondrie détecte les fortes augmentations de calcium au niveau de ces microdomaines ce qui entraîne une propagation du calcium dans la matrice mitochondriale à travers une variété de canaux/transporteurs de calcium. L'influx mitochondrial de calcium (qui est représenté sur la partie supérieure de la mitochondrie est déterminé par le MCU, le RaM, le RyR mitochondrial, les protéines découplantes UCP2&3, la protéine transmembranaire Letm1, la coenzyme Q10 (CoQ). Le mPTP, NCX, et HCX contribuent à l'efflux de calcium (partie inférieure de la figure). Les canaux VDAC fournissent une voie de transport du calcium à travers la membrane externe mitochondriale. Le DroCRC est un autre canal de libération sélective de calcium qui concerne les drosophiles. Les flèches rouges indiquent les mouvements de calcium, les flèches bleues les autres mouvements d'ions (adapté de O-Uchi *et al.*, 2012).



Ces différents canaux sont à l'origine du couplage excitation-contraction dans lequel le calcium cellulaire, qui induit une contraction, est lié avec le calcium mitochondrial qui stimule la phosphorylation oxydative.

Dans les cellules cardiaques, la mitochondrie et le réticulum sarcoplasmique sont souvent co-localisés dans les « micro-domaines mitochondriaux » également

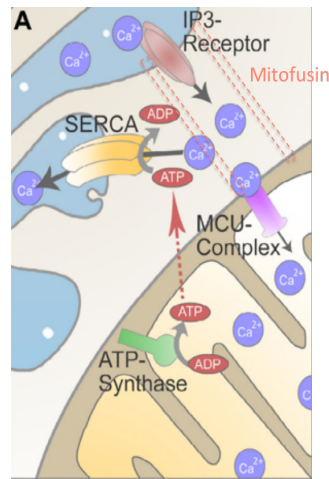


Figure 15 Illustration schématique de la communication du RS et de la mitochondrie

Le calcium provient de l'IP<sub>3</sub>, et est capté par la mitochondrie au niveau du MCU. La communication ER-mito est contrôlée par la présence de Mitofusin (Madreiter-Sokolowski et al., 2016).

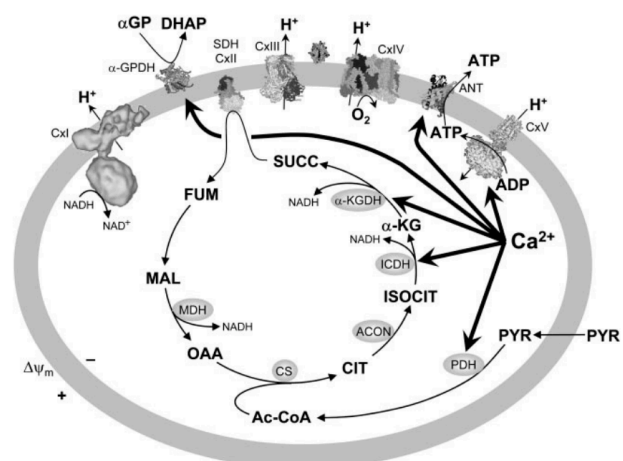
appelés MAMs (Mitochondria Associated ER membranes) (Figure 15). La majeure partie du calcium stocké par la mitochondrie provient du récepteur IP<sub>3</sub> (Inositol 1,4,5 triphosphate) du réticulum sarcoplasmique (Madreiter-Sokolowski *et al.*, 2016). Cet échange est essentiel pour le transfert du calcium à la mitochondrie pendant le CICR (Kohlhaas & Maack, 2013). Ces micro-domaines mitochondrie-RS sont contrôlés par des protéines présentes dans la membrane externe mitochondriale, la mitofusin 2.

Comme nous pouvons le voir au niveau de la Figure 16, une fois à l'intérieur de la mitochondrie, le calcium va permettre l'activation allostérique de la pyruvate déshydrogénase, de l'isocitrate déshydrogénase et de l'alpha-ketoglutarate déshydrogénase. De plus le calcium stimule la formation et le transport d'ATP en activant l'ATP synthase. L'élévation du calcium mitochondrial régule l'ensemble des mécanismes de phosphorylation oxydative, entraînant une activité de la chaîne respiratoire plus rapide et une augmentation de la production d'ATP. Le calcium est donc un effecteur positif de la fonction mitochondriale (Brookes, 2004) ; (Diolez *et al.*, 2007).

Figure 16 Effet du calcium au sein de la mitochondrie

Le calcium active le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. Les flèches fines représentent les réactions métaboliques, alors que les flèches épaisses représentent l'action du calcium.

Abbreviations : succ, succinate ; isocit, isocitrate ; cit, citrate ; OAA, oxaloacétate ; mal, malate ; fum, fumarate ; Ac-CoA, acetyl coenzyme A ; pyr, pyruvate ; PDH, pyruvate déshydrogénase ; acon, aconitase ; CS, citrate synthase ; MDH, malate déshydrogénase ; ICDH, isocitrate déshydrogénase ; CxI-IV, complexe I-IV ; SDH, succinate déshydrogénase. (Brookes, 2004).



La mitochondrie possède également des canaux sur la membrane mitochondriale permettant un efflux rapide de calcium. Différents mécanismes ont été mis en avant impliquant l'échangeur calcium-sodium (Figure 16) qui est lié également à un échangeur de protons.

On distingue également un autre mécanisme impliquant le pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP). La structure et l'origine du pore de perméabilité restent incertaines. Jusqu'à récemment trois molécules ayant été identifiées pour être des composants clés de la structure du mPTP : le translocateur ANT dans la membrane interne, la cyclophiline D dans la matrice et le transporteur mitochondrial de phosphate (PiC) dans la membrane externe (Javadov *et al.*, 2009) ;(Halestrap & Pasdois, 2009). Le mPTP possède des sites spécifiques au calcium au niveau de la membrane interne mitochondriale, ce qui lui permet d'être régulé par le calcium. En condition physiologique le pore s'ouvre et se ferme de manière transitoire pour libérer le calcium mitochondrial dans le cytoplasme. Le mPTP est un pore non sélectif, et lors de son ouverture il est perméable à l'eau, aux ions et à n'importe quelle molécule dont la masse moléculaire est inférieure à 1,5kDa (Javadov *et al.*, 2009) ;(Halestrap &

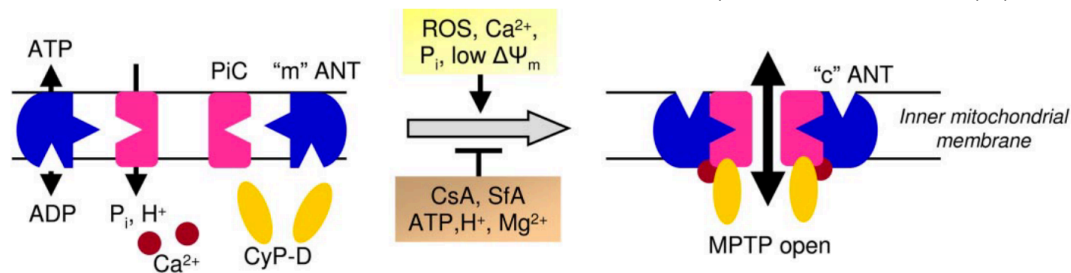


Figure 17 Structure et mécanisme d'ouverture du pore de transition de perméabilité (Javadov *et al.*, 2009)

Pasdois, 2009). Cependant une ouverture prolongée du pore due à une concentration excessive de calcium peut entraîner des conséquences pathologiques et irréversibles comme la perméabilisation de la membrane interne mitochondriale qui s'accompagne d'une libération de facteurs pro apoptotique dans le cytoplasme entraînant l'apoptose de la cellule et la chute du potentiel de membrane (Brookes, 2004). Le pore est régulé par la cyclophiline D, et cette régulation est déclenchée par une forte concentration de calcium mitochondrial (Figure 17).

Le mPTP est une cible potentielle pour des traitements pharmacologiques de maladies cardiaques. De nombreuses études cherchent à bloquer l'ouverture du pore notamment lors de l'ischémie reperfusion où son rôle est particulièrement important (Halestrap & Pasdois, 2009) ;(Javadov *et al.*, 2009). Le pore peut être inhibé de manière indirecte au niveau de la cyclophiline D par la cyclosporine A. En effet l'ouverture du mPTP est bloquée par un pH acide, et des concentrations élevées de cations (Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>). Cependant de plus en plus d'études suggèrent que des antioxydants peuvent être particulièrement prometteurs pour empêcher l'ouverture pathologique du pore. Une augmentation de la production de ROS mitochondriaux est à l'origine de l'ouverture pathologique du pore. Les piègeurs de ROS mitochondriaux apparaissent donc aujourd'hui comme une des principales voies de protection contre l'ouverture pathologique du pore (Javadov *et al.*, 2009) ;(Rajesh *et al.*, 2003) ;(Halestrap & Pasdois, 2009).

A l'inverse de ce qu'a démontré Bers (Bers, 2002), les travaux de l'équipe ont montré que, contrairement au muscle squelettique, le calcium active directement les mitochondries lors de la contraction cardiaque (Diolez *et al.*, 2015) ; (Diolez *et al.*, 2006). Cette entrée de calcium,



comme cela a été vu dans le paragraphe précédent, est électrogénique, sous l'influence du potentiel de membrane mitochondrial et active la phosphorylation oxydative. Nous avons proposé que l'ouverture transitoire du mPTP pourrait être un des mécanismes de régulation de l'homéostasie calcique mitochondriale dans le processus d'excitation-contraction (Figure 18).

L'ensemble de ces considérations est à la base de notre hypothèse de travail. Nous souhaitons tester l'hypothèse que, une fois la mitochondrie activée au moment de la contraction, la diminution de demande en ATP lors de la diastole couplée à l'accumulation intra-mitochondriale de calcium lors de la systole crée les conditions d'une augmentation de la production de ROS par la chaîne respiratoire favorisant l'ouverture du mPTP conduisant à la libération du calcium par la mitochondrie. C'est dans cette perspective que s'inscrit ce travail.

La validation de cette hypothèse est susceptible de proposer un nouveau schéma de la régulation calcique par les mitochondries cardiaques impliquant la production mitochondriale de ROS (peroxyde d'hydrogène), le taux de réduction des quinones de la chaîne respiratoire, la dynamique calcique et la dynamique du potentiel de membrane déterminée par l'ouverture du pore de perméabilité transitoire (mPTP).

Les ROS jouant un rôle central lors de cette séquence, l'étude de leur production au cours de la contraction cardiaque et de leur modulation sur les différents acteurs de la contraction est donc indispensable.

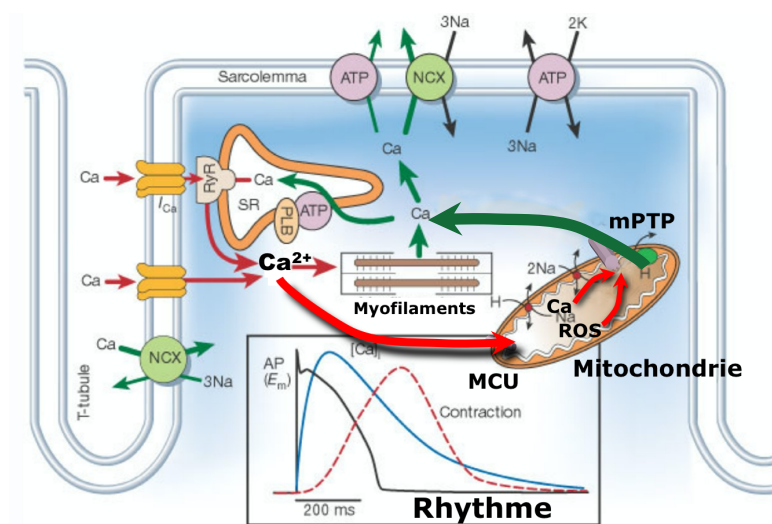


Figure 18 Nouvelle hypothèse suite aux travaux de l'équipe du Dr Diolez (adaptée de Bers)

### III. Modulation du couplage excitation-contraction cardiaque par les ROS

#### 1) Mode de production des espèces radicalaires de l'oxygène

Un radical libre est une espèce chimique neutre ou chargée, caractérisée par un électron libre dit « célibataire » sur son orbitale externe. Les radicaux libres participent à différents types de réactions radicalaires pouvant induire, soit un processus de réaction en

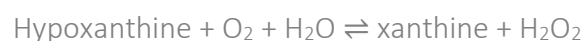
chaîne, soit un arrêt de la propagation des réactions radicalaires. Les radicaux libres les plus importants en biologie sont les radicaux libres oxygénés et le monoxyde d'azote.

La réduction de l'oxygène par un électron produit un intermédiaire : l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ). Il s'agit d'un radical libre chargé négativement issu de la réaction monovalente de l'oxygène moléculaire avec un électron. Il est produit par presque toutes les cellules en aérobie et peut constituer un radical à la fois oxydant et réducteur. C'est le précurseur de la formation des ROS et un médiateur dans les réactions d'oxydation. La dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$  produit le peroxyde d'hydrogène. Ce n'est pas un radical puisqu'il ne possède pas d'électron célibataire mais il est considéré comme un dérivé activé de l'oxygène et peut traverser les membranes biologiques. Le peroxyde d'hydrogène possède un fort pouvoir oxydant participant indirectement à la toxicité de l'oxygène. A son tour il peut être réduit en eau ou partiellement en un radical hydroxyle (réaction de Fenton). Ce radical hydroxyle est produit principalement à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en présence d'ions ferriques au cours de la réaction d'Haber Weiss. Le radical hydroxyle possède une très grande réactivité et peut se combiner avec de nombreuses molécules, c'est un oxydant très puissant constituant le radical le plus toxique (Turrens, 2003). Ces réactions sont représentées dans la Figure 19 suivante.

*In vivo*  $O_2^{\bullet -}$  est produit à la fois de manière enzymatique et non enzymatique.

Dans les cardiomyocytes, il existe différentes sources enzymatiques d'espèces radicalaires de l'oxygène : cellulaires et mitochondriales. Les ROS mitochondriaux seront décrits ultérieurement.

Nous avons tout d'abord la xanthine oxydase qui est une enzyme dont la fonction principale est l'oxydation des bases puriques. Le produit d'oxydation final est l'acide urique. Cette enzyme est présente sous deux formes : la forme déshydrogénase (XD) qui utilise le nicotinamide comme accepteur d'électrons et la forme oxydase (XO) qui utilise l'oxygène. *In vivo* la forme XD est prédominante.



Cependant dans certaines conditions pathologiques comme l'ischémie reperfusion la forme XD est convertie en XO qui réduit l'oxygène moléculaire en anion superoxyde.

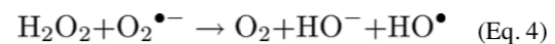
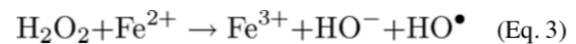
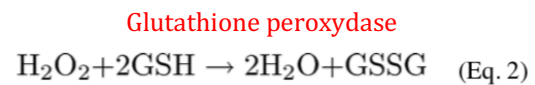
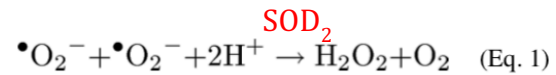


Figure 19 Origine des espèces réactives de l'oxygène

Les quatre équations de la réduction d'oxygène et la formation des intermédiaires partiellement réduits y sont détaillée. La réaction 1 est réalisée par la superoxyde dismutase (MnSOD ou SOD<sub>2</sub> située dans la matrice mitochondriale). Puis l' $H_2O_2$  est converti dans la réaction 2 en  $H_2O$  par la glutathione peroxydase en présence de glutathione dans la mitochondrie et le cytosol. L' $H_2O_2$  peut être également transformé en radical hydroxyl par la réaction de Fenton (equation 3), ou combiné à l' $O_2^{\bullet -}$  lors du mécanisme d'Haber Weiss (equation 4). Pour rappel  $Fe^{3+} + O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$  (adapté de Yeong-Renn Chen and Jay L. Zweier, 2014)

La dégradation des bases puriques est associée à la libération d'un radical superoxyde impliquant la formation de peroxyde d'hydrogène.

Puis on distingue les NADPH oxydases (Nox). Les protéines Nox sont des isoenzymes, elles transfèrent les électrons à travers la membrane cellulaire vers l'oxygène moléculaire afin de produire l'anion superoxyde par la réaction de formation  $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{O}_2^- + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$ .

On distingue sept isoformes, Nox1 à Nox5, puis duox1 et duox2. L'isoforme Nox4 qui est spécifiquement mitochondriale et constitutivement active. Leur localisation tissulaire diffère selon le type de NOX. Par exemple Nox2 est surtout exprimée dans les cellules non phagocytaires, principalement les neurones ou les cellules endothéliales, tandis que l'expression de Nox4 est ubiquitaire. Dans les cardiomyocytes les principales isoformes sont la Nox2 et 4. Ces enzymes se retrouvent impliquées dans un nombre croissant de maladies liées soit à leur inactivation (déficience immunitaire) soit à une augmentation anormale de leur activité (inflammations chroniques, maladie d'Alzheimer ou de Parkinson).

Enfin le  $^{\circ}\text{NO}$  qui est synthétisé à partir de l'un des atomes d'azote du groupement guanidine *via* une réaction enzymatique faisant intervenir les *nitric oxide synthase* en présence d'oxygène (Quinlan *et al.*, 2013) ; (Turrens, 2003).

Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des ROS dans notre organisme. On parle d'une production non enzymatique, en effet un électron célibataire est directement transféré à l'oxygène par la réduction de coenzyme, ou par des xénobiotiques (Turrens, 2003).

Les ROS, mitochondriaux et cellulaires, sont impliqués dans la modulation de l'activité de différents facteurs de transcription tel que NFkB et les AP-1. Une augmentation de la production de ROS peut entraîner une activation du NFkB par la dégradation de Ikb, qui en temps normal inhibe le facteur de transcription (Moris *et al.*, 2017). De plus les ROS sont aussi des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire. Les ROS modulent par exemple le facteur TNF alpha, une cytokine pro inflammatoire, impliqué dans l'apoptose des cardiomyocytes. Par conséquent les ROS sont vitaux pour la transduction du signal dans les cellules endothéliales. Au niveau des cardiomyocytes les ROS participent à la régulation de nombreux acteurs clés du couplage excitation-contraction notamment au niveau du réticulum sarcoplasmique en régulant le récepteur à la ryanodine et la SERCA. De plus ils agissent comme second messagers en régulant les protéines kinases CaMKII, PKA et PKC essentielles pour la contraction (Köhler *et al.*, 2014) et impliquées dans la cardioprotection vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion.

## 2) Mode d'action des ROS lors du couplage excitation-contraction

De plus en plus d'études décrivent l'implication physiologique des ROS dans l'homéostasie intra cardiomyocytaire sodique et calcique (Köhler *et al.*, 2014) ; (Sag *et al.*, 2013). Les ROS peuvent oxyder les protéines, donc les canaux et les transporteurs. Il existe deux

types de régulations différentes : la modulation directe ou indirecte, comme nous le montre la Figure 20.

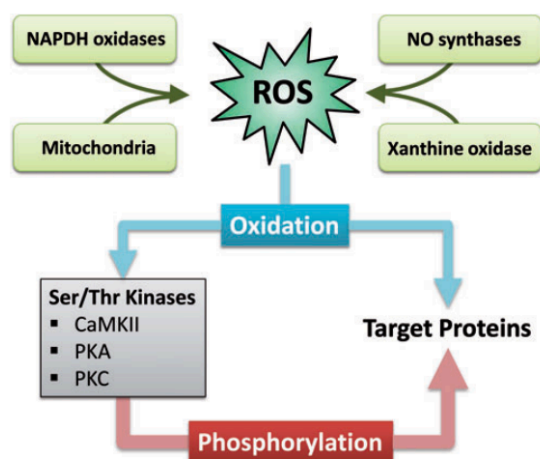


Figure 20 Sources et mode d'action des ROS impliqués dans la modulation des protéines de l'ECC

Modulation directe à droite avec l'oxydation des protéines cibles / Modulation indirecte à gauche avec l'activation de la serine/threonine kinase par oxydation, qui pourra à son tour phosphoryler les protéines cibles (Wagner *et al.*, 2013.)

En premier lieu, les ROS induisent l'oxydation de deux types d'acides aminés différents : les cystéines et les méthionines. Ces modifications oxydatives dépendent de la concentration de ROS présente, par conséquent si les ROS sont présents en faible quantité elles peuvent être réversibles : il y aura alors la formation de ponts disulfures, d'acide sulfonique et de méthionine sulfoxyde résultant de l'oxydation des chaînes latérales des résidus cystéine et méthionine, les plus sensibles à l'oxydation.

En second lieu les ROS peuvent également avoir un rôle de second messager en oxydant des protéines kinases : CaMKII, PKA, PKC qui vont à leur tour pouvoir phosphoryler les différentes protéines impliquées dans le couplage excitation-contraction (modulation indirecte réversible) (Köhler *et al.*, 2014) ; (Maier & Bers, 2007) (Figure 21).

En fonction de leur origine les ROS vont avoir des cibles différentes au niveau du couplage excitation-contraction voir Tableau 3.

La section suivante développe les différents enzymes et canaux impliqués dans le couplage excitation-contraction et leur régulation par les espèces réactives de l'oxygène.

ROS	Cible de l'ECC
Superoxide	CamKII – RyR – LTPP – SERCA – canaux sodiques - NXC
Peroxyde d'hydrogène	CamKII – RyR – LTPP – SERCA – canaux sodiques - NXC
Radical hydroxyl	Ryr – SERCA – LTPP - NCX
Peroxinitrite	Ryr – SERCA – LTPP – canaux sodiques - NCX

Tableau 3 Différentes cibles des ROS au niveau des cibles du couplage excitation – contraction

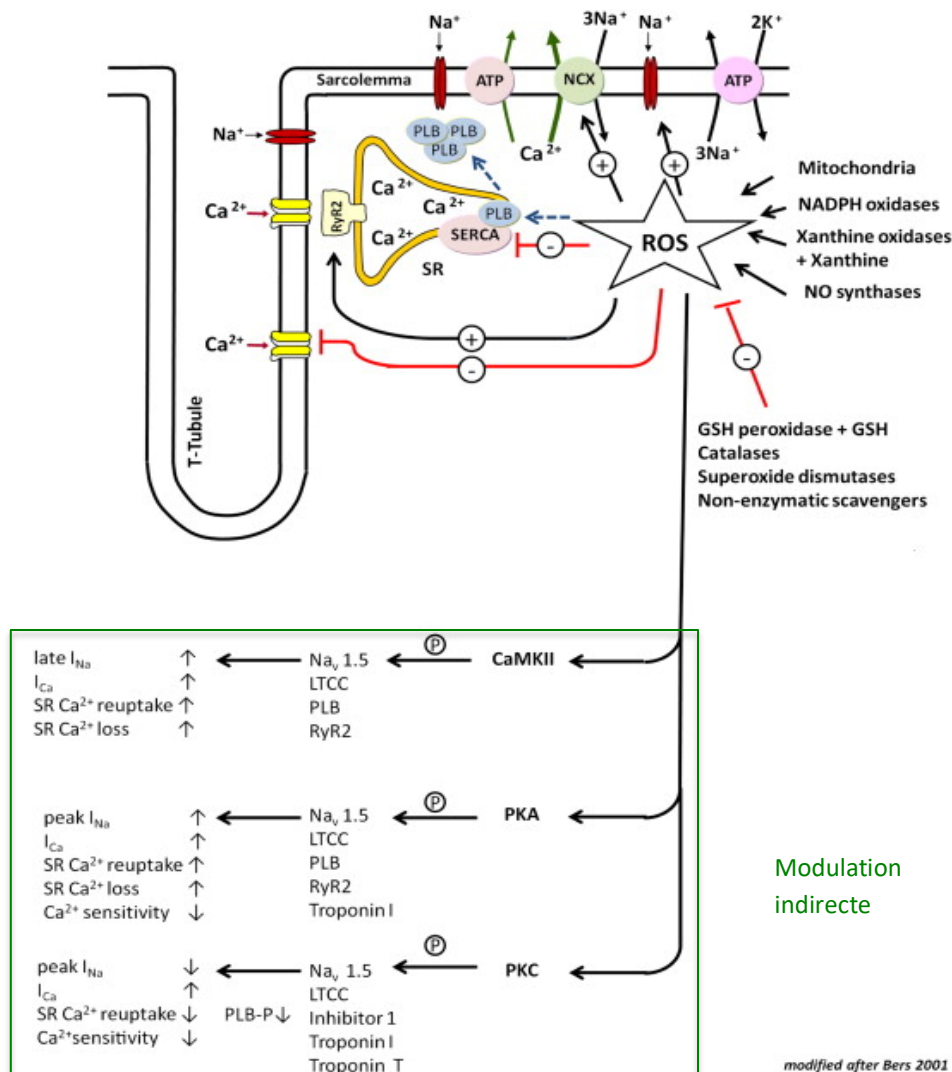


Figure 21 Implication des ROS dans le couplage excitation-contraction  
 Les ROS peuvent influencer le couplage excitation-contraction par divers chemins. On trouve dans un premier temps les modifications directes des protéines telle qu'une augmentation du courant « late  $I_{Na}$  » via  $Na_v 1.5$ , mais également une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal  $RyR2$ , et une augmentation de la fonction du canal  $NCX$ . Au contraire les ROS peuvent inhiber des canaux tels que le  $LTCC$ , ou le  $SERCA2a$ . Cependant cet effet peut être contrôlé par la protéine régulatrice de la  $SERCA$ , le phospholamban qui une fois phosphorylé permet l'activation de cette dernière. Le deuxième moyen pour les ROS de moduler les acteurs du couplage ECC est la modulation indirecte via l'activation de plusieurs protéines kinases (voir carré vert) (Köhler et al., 2014).

### a. Enzymes impliquées

Lors de leur modulation les ROS peuvent activer comme nous l'avons vu précédemment trois types de kinases différentes :

#### PKA

La kinase pKA existe sous deux types : type I (présent dans le cytosol), et type II (AKAP protéine kinases A d'ancrage). Elle peut phosphoryler plusieurs protéines impliquées dans l'homéostasie calcique intra cardiomyocytaire comme  $RyR_2$ ,  $LTCC$ , le phospholamban ou directement la troponine I (qui régule la sensibilité au calcium au niveau des myofilaments).

La PKA de type I est sujette à l'oxydation par les ROS : activation et translocation du cytosol à la membrane et aux myofilaments ce qui entraîne une augmentation de la contractilité des cellules.

### PKC

La modulation de l'activité de la PKC affecte la déphosphorylation du réticulum sarcoplasmique  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases-2 (SERCA-2), en inhibant la phosphorylation de sa protéine régulatrice, le phospholamban (PLB). La PKC phosphoryle la protéine phosphatase inhibitrice-1 (I-1) entraînant son inactivation, ce qui augmente l'activité de la protéine phosphatase-1 (Figure 22). Cette activation de la protéine phosphatase-1 réduit efficacement la phosphorylation du PLB, et donc entraîne la réduction de la fonction SERCA. Par conséquent il apparaît une diminution du contenu calcique du réticulum et du transitoire calcique (Braz *et al.*, 2004). Les espèces réactives de l'oxygène amplifient la signalisation de la protéine PKC, cependant la PKC est connue également pour induire la production de ROS *via* l'activation de la NADPH (Lee *et al.*, 2004).

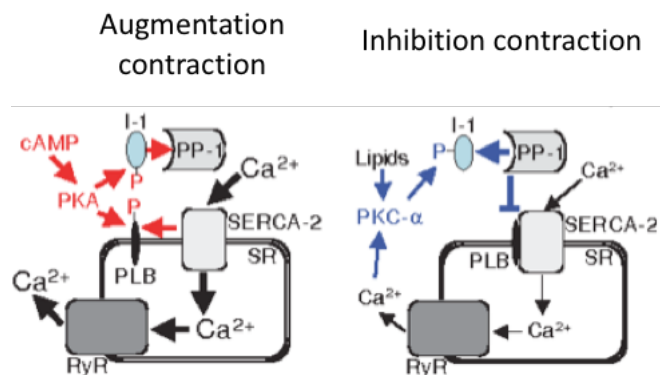


Figure 22 Étude de l'action de PKA et PKC sur la régulation du phospholamban (Braz *et al.*, 2004)

### CamKII

CamKII est cruciale pour la régulation intracellulaire du calcium lors du couplage excitation-contraction. C'est une protéine kinase exprimée dans le cœur.

CamKII peut phosphoryler LTCC, RyR et phospholamban mais aussi le canal sodique voltage dépendant comme on le verra par la suite.

Le calcium active la liaison calcium-calmoduline (Ca-CaM) ce qui entraîne un changement de conformation et une auto-phosphorylation au niveau de la thréonine 286-287 en présence d'ATP.

Les kinases directement activées par les ROS ont donc la capacité d'activer ou d'inhiber des acteurs majeurs du couplage excitation-contraction.

#### *b. Canaux impliqués*

Les ROS peuvent simultanément induire une activation (*via* une serine kinase) ou une inhibition (*via* l'oxydation des cystéines ou de méthionine) directe du courant calcique  $I_{\text{Ca}}$ . Cette modulation entraîne une variation de la concentration de calcium intracytosolique lors de l'ouverture des canaux calciques pendant la phase de plateau du potentiel d'action. Ce canal est aussi régulé de manière indirecte par les protéines kinases PKA, PKC, CaMKII préalablement activées par les ROS (Köhler *et al.*, 2014).

Au cours de la phase de plateau du potentiel d'action, on constate que le NaV1.5 n'est pas totalement inactivé et conduit à l'apparition d'un courant faible en amplitude mais persistant appelé « late  $I_{Na}$  ». Dans plusieurs pathologies comme le stress oxydant ou l'insuffisance cardiaque ce courant tardif contribue à la surcharge du sodium cytosolique pouvant conduire à des arythmies (Nesterenko, 2014). Les ROS *via* une action directe ou indirecte ralentissent l'inactivation de ce canal ce qui entraîne une accumulation de sodium intracellulaire et une prolongation du potentiel d'action (Wagner *et al.*, 2013).

Les ROS activent le RyR<sub>2</sub> et le canal IP<sub>3</sub> par la formation de ponts disulfures. Il en découle une plus grande probabilité d'ouverture de RyR<sub>2</sub> susceptible d'engendrer une fuite diastolique du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique entraînant une surcharge calcique intracellulaire pouvant, en retour, augmenter la pénétration intracellulaire de sodium via le NCX (Wagner *et al.*, 2013). Ces activations dépendent du temps d'exposition et de la concentration en ROS (Köhler *et al.*, 2014)

Enfin, pour ce qui concerne l'activité de la fonction SERCA deux cas de figure sont possibles en fonction de la concentration des ROS présents dans la cellule (Köhler *et al.*, 2014). Dans un premier temps les ROS activent la fonction de la SERCA2a via la phosphorylation et donc la dissociation du phospholamban PLB, substrat des protéines kinases PKA ou de CAMKII. Cependant de nombreuses études ont montré la diminution de l'activité SERCA en réponse à un stress oxydant, et donc une surproduction de ROS (Balderas-Villalobos *et al.*, 2013) ;(Mustroph *et al.*, 2019) ; (Qaisar *et al.*, 2019). Également de manière contradictoire, la phosphorylation de la PKC par les ROS augmente l'activité de la phosphatase qui inhibe la phosphorylation de PLB et donc inhibe la SERCA (Köhler *et al.*, 2014). L'expression de la SERCA2a est réduite, ce qui entraîne une diminution de la capture du calcium par le SR, diminue en conséquence le transitoire calcique, et la production de force lors de la contraction (Wagner *et al.*, 2013).

De nombreuses études ont analysé comment les ROS modulent la contraction cardiaque (Köhler *et al.*, 2014) ;(Zima & Blatter, 2006) ;(Santos *et al.*, 2011), néanmoins il est actuellement encore difficile de statuer sur le rôle des ROS au cours de l'ECC.

Il est clairement établi dans la littérature que les ROS augmentent la probabilité d'ouverture du RyR<sub>2</sub> lors de la diastole favorisant ainsi la diminution du contenu calcique du réticulum sarcoplasmique. De plus de nombreuses études suggèrent que les ROS inhibent la recapture du calcium, participant également à une diminution du contenu calcique du RS et donc une augmentation du calcium intracellulaire au cours de la relaxation.

On constate également des effets contradictoires entre la phosphorylation des canaux par les protéines kinases, ou l'oxydation par les ROS. En effet la phosphorylation par les protéines kinases est connue pour activer le LTCC (Köhler *et al.*, 2014). Néanmoins l'oxydation directe des ROS quant à elle, inhibe l'ouverture du canal LTCC, diminuant ainsi la quantité de calcium intracellulaire présent pour le phénomène du CICR (Zima & Blatter, 2006) ;(Gill *et al.*, 1995) ;(Köhler *et al.*, 2014). Enfin, en ce qui concerne l'origine des ROS modulant le couplage excitation-contraction, de nombreuses études suggèrent qu'ils proviennent principalement de la NADPH oxydase et de la xanthine oxydase. Cependant la mitochondrie est considérée comme

la principale source de ROS (De Giusti *et al.*, 2013), il est donc important de s'intéresser à la part des ROS mitochondriaux dans la régulation des différents acteurs du couplage excitation-contraction.

#### IV. Production de ROS mitochondriaux

##### 1) Particularités de la production mitochondriale de ROS

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires dynamiques qui jouent un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique des cellules humaines. Elles occupent plus de 30% du volume des cardiomyocytes et fournissent plus de 90% de l'ATP requis par la contraction au niveau cardiaque (Kwong, 2017) ; (Yeong-Renn Chen and Jay L. Zweier, 2014).

La mitochondrie possède deux membranes délimitant un espace inter membranaire et un compartiment matriciel. La membrane externe, formée de 50% de protéines et 50% de lipides polaires, est perméable aux ions et aux molécules de petite taille grâce entre autres à l'existence de porines. La membrane interne, quant à elle, est constituée pour 80% de protéines et ne contient que 20% de lipides dont une proportion élevée de cardiolipine (20%) qui contribuerait à rendre la membrane interne imperméable aux ions et la rendrait relativement plus rigide que les autres membranes.

Une grande majorité de l'énergie cellulaire est obtenue par différentes voies métaboliques mitochondriales, en particulier le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons. La membrane interne mitochondriale est le siège de la phosphorylation oxydative qui correspond au couplage de la phosphorylation de l'ATP au transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire jusqu'à un accepteur final : l'oxygène. Ces électrons proviennent des équivalents réduits NADH, et FADH<sub>2</sub>. A ce flux d'électrons est associé un transfert actif de protons de la matrice vers l'espace inter membranaire générant la force motrice. La phosphorylation oxydative est le processus de couplage entre le transfert d'électrons (oxydation) et la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique Pi. Il va donc s'établir le long de la chaîne respiratoire un gradient de potentiels d'oxydoréduction et les électrons vont transiter de molécules à faible potentiel vers l'oxygène, qui est une molécule à fort potentiel (Figure 23).



La chaîne de transport des électrons est composée d'une série de transporteurs incluant les complexes I et II, l'ubiquinone, le complexe III, le cytochrome c et le complexe IV.

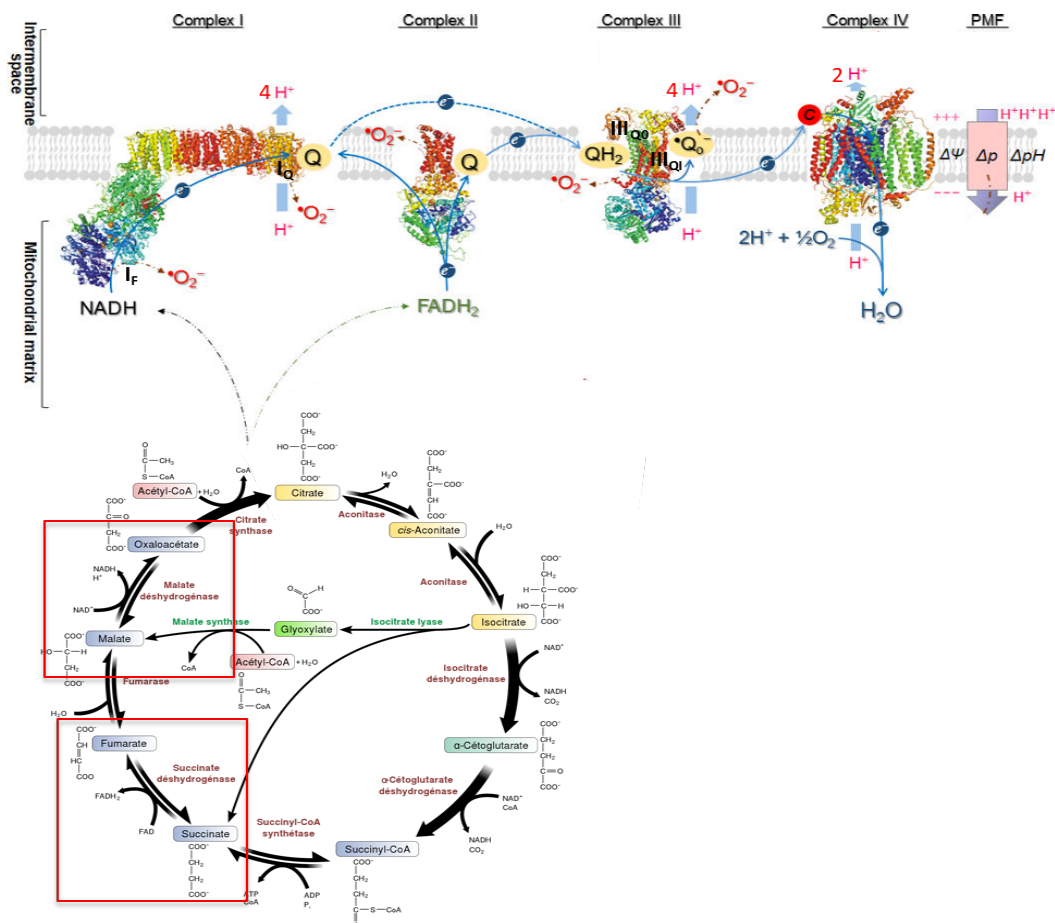


Figure 23 Phosphorylation oxydative mitochondriale

La phosphorylation oxydative correspond au processus permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP grâce à l'énergie libérée par l'oxydation de donneurs d'électrons provenant du cycle de Krebs (représenté en dessous) par la chaîne respiratoire.

Le complexe I ou NADH ubiquinone oxydoreductase, est la première enzyme de la chaîne respiratoire. Cette enzyme est constituée d'environ 45 sous-unités, d'un mononucléotide flavinique (FMN) receveur d'électrons, de plusieurs centres fer-soufre permettant le transfert de ces mêmes électrons et de 3 molécules ubiquinones liées, le coenzyme Q. Ce premier complexe contient le site de liaison du NADH, la flavine mononucléotide, deux électrons et  $4\text{H}^+$  sont transférés de la matrice à l'espace intermembranaire. Cette réaction est couplée avec l'oxydation du malate en oxaloacétate. Le complexe I initie donc le transfert de deux électrons provenant du NADH à l'ubiquinone (Murphy, 2009) ; (Quinlan *et al.*, 2013). On distingue deux sites différents importants dans la génération de superoxyde : le site  $\text{I}_F$ , et  $\text{I}_Q$ . Ce complexe est inhibé en présence de roténone, ou de DPI.

Le complexe II, ou succinate déshydrogénase est la seule enzyme commune à la mitochondrie et au cycle de Krebs. Cette enzyme est composée de 4 sous unités et est ancrée dans la membrane mitochondriale interne par un cytochrome de type b. Elle catalyse

l'oxydation du succinate en fumarate et participe au transfert d'électrons de FADH<sub>2</sub> vers les ubiquinones dans la matrice mitochondriale. L'oxydation du succinate est couplée à la réduction de l'ubiquinone. Lorsque le substrat de la chaîne respiratoire est le FADH<sub>2</sub>, 6 protons seulement au total (comparés à 10H<sup>+</sup> pour le complexe I) sont exportés dans l'espace inter-membranaire. Le complexe II peut également contribuer à la génération de ROS mitochondriaux, de manière beaucoup plus modeste, à partir de deux régions enzymatiques : l'une localisée au niveau du cofacteur FAD, l'autre sur le site de l'ubiquinone (Yeong-Renn Chen and Jay L. Zweier, 2014). Cependant dans certaines conditions le transport d'électrons peut fonctionner en sens inverse, on parle alors du « transport réverse ». Les électrons retournent au niveau du site I<sub>Q</sub> du complexe I, et participent à une génération importante d'espèces radicalaires de l'oxygène. Des défauts de l'activité de ce complexe ont été corrélés au développement de pathologie neurodégénératives telles que l'ataxie de Friedrich, ou la maladie de Huntington. Ce complexe peut être inhibé par l'ajout de malonate.

Le complexe III appelé également Q-cytochrome c oxydoréductase entraîne le transfert des électrons de l'ubiquinol (QH<sub>2</sub>) vers le ferricytochrome c. Il est composé de 11 sous unités protéiques. Ce complexe III peut être inhibé par l'antimycine A, le myxothiazol ou la stigmatellin. Cette enzyme catalyse le transfert de deux électrons associés avec le transfert de 4 protons de la matrice vers l'espace inter membranaire. Dans des conditions physiologiques la production de ROS est faible et même négligeable comparée à la production du complexe I. (Murphy, 2009). Le cytochrome c qui reçoit les électrons du complexe III, est une protéine mobile. En effet, elle est située dans l'espace inter-membranaire mitochondrial et grâce à un hème ferrique peut transporter un électron à la fois pour l'amener au niveau du complexe IV.

Le complexe IV aussi appelé cytochrome oxydase est le complexe final de la phosphorylation oxydative. La COX catalyse le transfert de 4 électrons provenant du cytochrome c pour la réduction finale d'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O. Durant cette étape 4 protons sont consommés et 2 autres sont transloqués de la matrice vers l'espace inter membranaire.

Enfin comme nous l'avons vu au cours de la phosphorylation oxydative, l'énergie libérée par les électrons est convertie en un gradient de H<sup>+</sup> à travers la membrane interne mitochondriale. Ce gradient est à son tour utilisé par l'ATP synthase pour synthétiser de l'ATP. L'ATP synthase est composé de 2 sous complexes : F<sub>0</sub> qui est inséré dans la membrane interne mitochondriale et F<sub>1</sub> qui est matriciel et qui utilise le gradient de protons pour convertir l'ADP en ATP. L'ATP sera ensuite transporté vers l'espace inter-membranaire par le translocateur ANT (Adénine Nucléotide Translocase), pour être utilisé par la cellule notamment lors de la contraction.

La formation de superoxyde se produit dans la matrice et dans la membrane interne mitochondriale. Bien que les O<sub>2</sub><sup>-</sup> générés dans la matrice soient transformés par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène, des études suggèrent qu'une part d'entre eux, produits dans l'espace inter membranaire mitochondrial, sont transportés jusqu'au cytoplasme via le canal voltage dépendant, VDAC (Han *et al.*, 2003) ; (Brookes, 2004). Les concentrations de O<sub>2</sub><sup>-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont respectivement de 10<sup>-10</sup> et 5x10<sup>-9</sup>M (Turrens, 2003). Selon les études réalisées par Quinlan (Quinlan *et al.*, 2013) il existe onze sites différents de production de ROS associés à des substrats cataboliques et à la chaîne de transport des électrons. Les électrons peuvent donner

un radical superoxyde (fuite seule) ou générer de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (fuite par paire) (Watson *et al.*, 2019). Parmi les onze sites, il y en a six qui fonctionnent avec le potentiel redox NADH/NAD<sup>+</sup> et cinq avec le potentiel redox ubiquinol/ubiquinone (QH<sub>2</sub>/Q).(Brand, 2016).

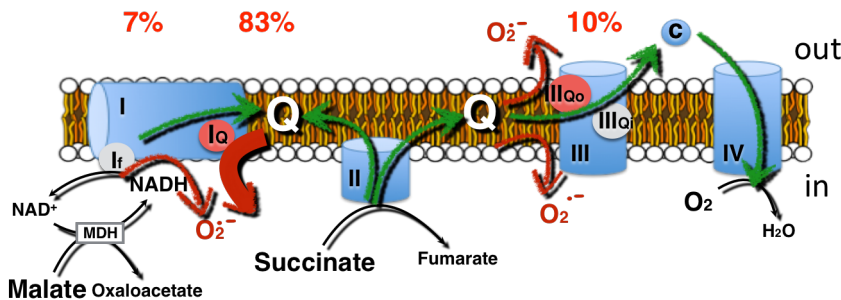


Figure 24 Les différents sites de production de ROS mitochondriaux. On distingue trois sites majeurs de production de ROS dans la mitochondrie : les sites I<sub>F</sub>, I<sub>Q</sub>, III<sub>Qo</sub>. Les pourcentages indiqués en rouge sont ceux établis par l'équipe de Martin Brand sur des mitochondries de muscles au repos. Les flèches vertes représentent le transfert classique des électrons, les flèches rouges représentent la fuite d'électrons et donc la production de ROS (Detaille *et al.*, 2019)

Les sites les plus importants dans la production d'espèces radicalaires de l'oxygène sont le complexe I et le complexe III (Figure 24). Au niveau du complexe I il y a deux sites différents le dite I<sub>F</sub> (flavin NADH-oxidizing site) et le site I<sub>Q</sub> (ubiquinone-reducing site). Au niveau du complexe III le seul site producteur de ROS est le site III<sub>Qo</sub> (quinol oxidizing site).

En effet selon une étude de Quinlan (Quinlan *et al.*, 2013) réalisée sur des mitochondries isolées de muscle au repos en condition physiologique, la production de ROS serait principalement issue du complexe I (83% de la production), puis proviendrait du site III<sub>Qo</sub> et I<sub>F</sub> (7% et 10% respectivement) (Figure 25).

La dégradation des radicaux est contrôlée par des systèmes de défense (cellulaire et mitochondriale que nous détaillerons ultérieurement) les antioxydants, qui s'adaptent au taux de radicaux présents. Néanmoins, comme nous l'avons vu, quand le niveau de superoxyde et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est trop élevé, les dommages cellulaires qu'ils causent deviennent trop importants à réparer pour la cellule et peuvent entraîner différentes pathologies.

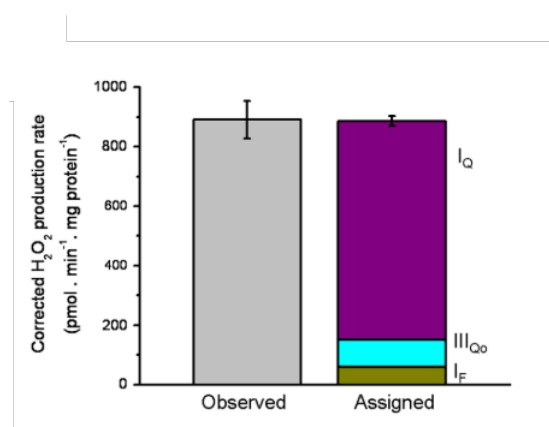


Figure 25 Principaux sites producteurs de ROS en présence de succinate (Quinlan *et al.*, 2013)

## 2) Interrelation entre le Calcium et les ROS mitochondriaux

Le calcium peut être à la fois un modulateur physiologique et pathologique de la fonction mitochondriale. Le calcium intra-mitochondrial est également impliqué dans les mécanismes de production mitochondriale de ROS.

Le rôle principal du calcium mitochondrial est de stimuler la phosphorylation oxydative. En effet comme on peut le voir sur la Figure 26 le calcium stimule différentes enzymes du cycle

de Krebs tel que la pyruvate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase, ou l'α cétooglutarate déshydrogénase (Brookes, 2004) ; (Kohlhaas, *et al.*, 2010) ; (Hamilton *et al.*, 2018). Cette stimulation va activer ces différentes déshydrogénases et donc conduire à une augmentation de la production de NADH (Bertero & Maack, 2018). Le cycle de Krebs participe également à la régénération de la glutathione peroxidase. Le calcium stimule également la synthèse d'ATP *via* l'activation de l'ATP synthase et de l'ANT.

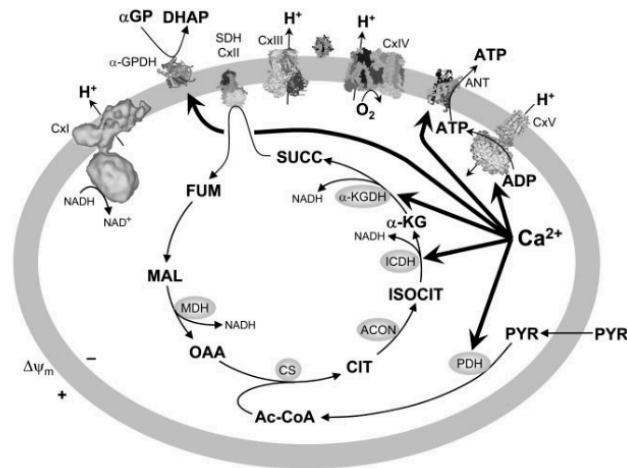
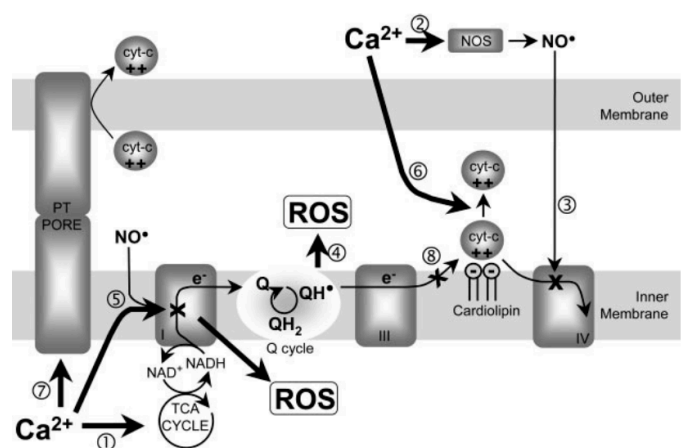


Figure 26 Activation des différentes enzymes du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative par le Ca<sup>2+</sup> mitochondrial (Brookes, 2004)

La Figure 27 montre les différents mécanismes théoriques par lesquels le calcium mitochondrial augmente la production de ROS. La stimulation du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative par le calcium mitochondrial contrôle donc la production de ROS en activant la chaîne respiratoire et la consommation d'oxygène. Le calcium stimule également la NO synthase qui produit des NO<sup>•</sup> et inhibe le complexe IV, ce qui stimule en retour la production de ROS au niveau du cycle des quinones. Enfin le Ca<sup>2+</sup> entraîne la dissociation du cytochrome c par compétition avec le site de liaison de la cardiolipine. En conséquence on observe une augmentation de la production de ROS au niveau du complexe III de la chaîne respiratoire (Brookes, 2004).

Figure 27 Mécanismes de stimulation du calcium sur la production de ROS mitochondriaux

La Ca<sup>2+</sup> stimule le cycle de Krebs (1), ce qui entraîne une augmentation du flux d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire. Le calcium stimule également l'oxyde nitrique synthase (2), et par conséquent la production de NO qui à son tour inhibe le complexe IV de la chaîne respiratoire. Ces différents évènements sont à l'origine de l'augmentation de la production de ROS au niveau du cycle des quinones (4). Additionné au calcium, le NO peut inhiber le complexe I et donc augmenter la production de ROS au niveau de ce complexe (5). Le calcium peut également dissocier le cytochrome c (cyt-c) des cardiolipines de la membrane interne (6), et à de fortes concentrations le calcium entraîne l'ouverture du pore de transition mitochondriale (7). L'inhibition au niveau du complexe III quant à elle (8) augmenterait la génération de ROS au niveau du cycle Q (4). Le complexe II a été retiré de l'image pour plus de visibilité. (Brookes, 2004).



Réciproquement, nous avons vu dans le paragraphe précédent que lors des différentes phases du couplage excitation-contraction, les ROS peuvent perturber l'homéostasie calcique intracardiomyocytaire.

### 3) Régulation des ROS par les systèmes antioxydants

Le maintien de la balance redox dans les cellules est assuré par des systèmes antioxydants chargés de maintenir les ROS à un niveau non toxique et d'éliminer ou de limiter les dommages qu'ils induisent. Ces systèmes peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques.

#### a. *Systèmes antioxydants enzymatiques*

Parmi les systèmes enzymatiques, les principaux acteurs sont :

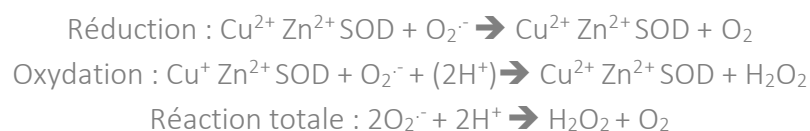
*La Superoxyde dismutase* qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. Elle est présente dans la matrice mitochondriale.

Son rôle est crucial dans le piègeage des radicaux libres. Les superoxydes dismutases sont des métalloprotéines caractérisées par le métal. Des atomes spécifiques tel que le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le fer (Fe) et le nickel (Ni) sont des cofacteurs essentiels des différents types de SOD dans leur réactivité avec les  $O_2^{\cdot-}$ .

Il existe trois types de SOD qui sont :

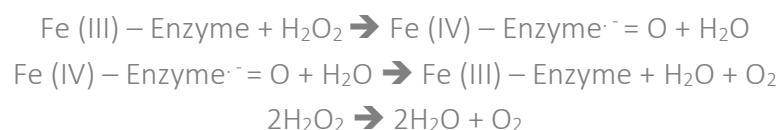
- la SOD1 (présente majoritairement dans le cytoplasme)
- la SOD2 (localisée dans la mitochondrie)
- la SOD3 (localisée dans le compartiment extracellulaire).

L'activité de la SOD induit une réduction et une oxydation du cuivre par  $O_2^{\cdot-}$ .



L'action de la SOD doit être couplée à celle d'une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène, comme une catalase ou une glutathion peroxydase. Elle peut être inhibée par des chélateurs d'ions cuivre.

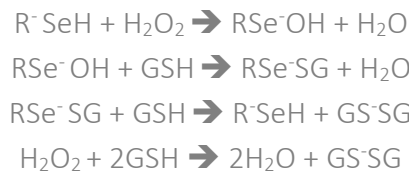
*Les catalases* qui sont des enzymes faisant partie de la famille des peroxydases. Elles possèdent quatre sous-unités identiques qui permettent de transformer le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau. Les catalases sont localisées à l'intérieur des peroxysomes exclusivement (Zuo *et al.*, 2015).



*Les Glutathion peroxydases* qui sont des enzymes cytoplasmiques et mitochondriales pouvant réduire le peroxyde d'hydrogène en eau. Les GPx permettent également de limiter la propagation des réactions radicalaires. Elles piègent les radicaux excessifs et réduisent les

lipides hydroperoxydes (Zuo *et al.*, 2015). Elles sont présentes dans la mitochondrie mais également dans le cytosol des cardiomyocytes.

La réaction complète est la suivante :



#### *b. Systèmes antioxydants non-enzymatiques*

D'autres systèmes de défense non-enzymatiques participent également à la détoxification des ROS comme par exemple :

*Le glutathion* sous sa forme GSH agit comme un antioxydant. Le GSH est un composé piègeur pouvant réagir avec l'hydroxyle ou un peroxyde pour donner un radical thylil pouvant lui-même réagir avec l'oxygène et entraîner une série de réactions. Les radicaux formés peuvent se recombinaison en glutathion stoppant ainsi la réaction radicalaire en chaîne.

*La vitamine C ou acide ascorbique* est considérée comme l'antioxydant hydrosoluble le plus efficace dans le plasma humain. La vitamine C est capable de céder un électron à pratiquement tous les radicaux libres pouvant intervenir dans un système biologique. La monoxydation de l'ascorbate (AH<sup>-</sup>) conduit à la formation du radical ascorbyle AH<sup>•</sup>, puis à l'anion ascorbyle A<sup>•-</sup>, qui est une forme hautement stabilisée par délocalisation de l'électron libre sur les cycles insaturés de la molécule (Kim *et al.*, 2013).

*La vitamine E* représentée en majorité par l'alpha tocophérol est un antioxydant puissant notamment du fait de son caractère lipophile qui lui permet d'agir au site même de la peroxydation lipidique membranaire. En échangeant un électron, le tocophérol se transforme en radical tocophéroxyde qui peut être régénéré par l'ascorbate en devenant radicalaire. Lors d'un stress oxydant, ces deux molécules agissent ensemble en formant une chaîne de détoxification des radicaux libres (Distelmaier *et al.*, 2012).

Cependant d'autres facteurs comme l'âge, l'environnement, le régime alimentaire peuvent avoir une influence sur l'absorption des antioxydants.

#### 4) Conséquences d'une production trop élevée de ROS

Une exposition aiguë aux ROS peut perturber l'homéostasie rédox de la cellule ce qui implique la régulation de la formation des ROS et des activités antioxydantes (présentées précédemment). Lorsque la génération de ROS ne peut plus être contrôlée, des dommages cellulaires se produisent (Zuo *et al.*, 2015). Les dommages cellulaires induits par le stress oxydant comprennent la peroxydation lipidique et la carbonylation des protéines. Les ROS sont susceptibles de dénaturer tous les acides aminés, mais les molécules contenant du soufre sont plus vulnérables. En effet une exposition aiguë au ROS inactive le centre Fe-S sur les complexes

I, II, III et du cycle de Krebs résultant en un arrêt de la production d'énergie mitochondriale et donc en une exposition chronique au ROS et aux dommages oxydants (sur protéines lipides et acides nucléiques). L'exposition à un stress oxydatif excessif entraîne une augmentation des ROS, atteignant un seuil qui déclenche la dépolarisation de la membrane ainsi que l'ouverture pathologique du pore de transition de perméabilité. Il apparaît alors un effondrement du potentiel de membrane mitochondrial et une augmentation transitoire de la génération de ROS par la chaîne de transfert des électrons. Les ROS mitochondriaux générés seront alors libérés dans le cytosol et peuvent déclencher le phénomène de RIRR « ROS induced ROS released » dans les mitochondries voisines (Zorov *et al.*, 2006).

#### a. Conséquences Cellulaires

Les lipides jouent un rôle important de structure dans la membrane. Les doubles liaisons dans les acides gras polyinsaturés sont une cible importante d'attaque pour les ROS.

L'oxydation des protéines par les ROS génère une série de produits stables mais aussi réactifs. Ces derniers altèrent la fonction protéique. Ainsi les protéines sont rapidement supprimées ou accumulées avec le temps et les ROS participent aux dommages associés au vieillissement ou aux pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose, ou les maladies neurodégénératives (Zuo *et al.*, 2015).

Enfin l'ADN est une cible privilégiée des ROS. La guanine, par exemple, peut réagir avec  $\bullet\text{OH}^-$  pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguano- sine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement.

#### b. Maladies neurodégénératives

Un niveau élevé en ROS est impliqué dans de nombreuses pathologies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson. Cette accumulation de ROS modifie les voies de signalisation, ce qui entraîne des lésions au niveau des cellules neuronales. Un traitement d'antioxydant peut aider à protéger les cellules nerveuses des dommages provoqués par les ROS (Zuo *et al.*, 2015). Également, de nombreuses études ont montré l'existence d'une production accrue de ROS lors du vieillissement, dans le contexte des coronaropathies, du diabète, ou de l'insuffisance cardiaque (Sovari & Dudley, 2012).

### 5) Maladies cardiovasculaires

Une exposition chronique aux ROS entraîne un trouble du couplage excitation-contraction et contribue au remodelage cardiaque (Turrens, 2003). Les ROS sont impliqués dans les pathologies cardiaques tel que l'ischémie-reperfusion (l'infarctus du myocarde à la phase aiguë), l'hypertension artérielle ou l'insuffisance cardiaque. L'ischémie-reperfusion induit des lésions myocardiques irréversibles, notamment de nécrose. De nombreuses études ont montré que des stratégies thérapeutiques, comme le pré-conditionnement ischémique ou pharmacologique, permettent de déclencher des voies de signalisation de la cardioprotection par des mécanismes impliquant une production contrôlée de ROS (Zuo *et al.*, 2015).

Réciproquement, des stratégies de post-conditionnement ischémique ou pharmacologiques sont susceptibles de réduire les lésions myocardiques irréversibles liées à une production massive de ROS lors de la reperfusion (Piot, 2010).

Les progrès de la recherche cardiovasculaire ont identifié le stress oxydatif comme une voie physiopathologique importante dans le développement et la progression de l'insuffisance cardiaque. Chez les patients en insuffisance cardiaque, on remarque plusieurs dysfonctionnements tels que la diminution du stockage du calcium dans le réticulum sarcoplasmique, mais également un épuisement des mécanismes de défense antioxydants. Plusieurs études ont observé une diminution significative des activités de la SOD et de la catalase dans les modèles animaux d'insuffisance cardiaque. De plus l'enzyme responsable de la production de NAD<sup>+</sup> (qui rappelons-le est un antioxydant majeur des cellules) est réprimée de manière significative chez les patients à insuffisances cardiaques (van der Pol *et al.*, 2019). De plus on constate que la concentration en sodium est plus élevée, ce qui active le mode reverse de l'échangeur sodium calcium pour contribuer à l'influx du calcium pendant le potentiel d'action (Kohlhaas *et al.*, 2017). Depuis de nombreuses années plusieurs études ont tenté de cibler le stress oxydant dans le but d'améliorer les résultats chez les patients à insuffisance cardiaque sans succès. Les raisons pour lesquelles ces études n'ont démontré que très peu d'effets restent obscures. Cependant une explication plausible pourraient être que les stratégies employés inhibent la production totale de ROS, alors que renforcer la capacité antioxydante endogène pourrait être bien plus efficace (van der Pol *et al.*, 2019).



# OBJECTIFS , HYPOTHESE DE TRAVAIL ET STRATÉGIE EXPERIMENTALE

## Objectif, hypothèse de travail et stratégie expérimentale

De manière générale, ce travail traite de l'implication de la physiologie mitochondriale dans le couplage excitation-contraction, c'est-à-dire l'ensemble de la séquence allant de l'excitation du cardiomyocyte au moment de la genèse du potentiel d'action, à la production de force par raccourcissement des sarcomères et à la relaxation. Contrairement à une vision partagée qui octroie un rôle négligeable, voire nul, à la mitochondrie lors du couplage excitation-contraction (Bers, 2002) le principal objectif de ce travail est de tester l'hypothèse selon laquelle le transitoire calcique cytosolique déclenché suite à la genèse du potentiel d'action provoquerait une entrée de calcium dans la matrice mitochondriale au cours de la systole, qui serait suivie par une libération de calcium au cours de la relaxation. Cette libération pourrait être médiée par l'activation du pore de transition de perméabilité mitochondrial, elle-même sensibilisée par l'augmentation du calcium matriciel mitochondrial et la production mitochondriale de ROS.

La validation de cette hypothèse pourrait ouvrir des perspectives dans le domaine thérapeutique. En effet, de nombreux travaux suggèrent une implication des ROS d'origine mitochondriale dans de nombreuses pathologies cardiaques comme l'athérosclérose coronarienne, l'hypertension artérielle, les arythmies, et l'insuffisance cardiaque. La mitochondrie, notamment du fait de son implication dans la production de ROS, apparaît donc comme une cible thérapeutique potentielle pour ces maladies. De plus, des études récentes (Köhler *et al.*, 2014) ont montré l'implication des ROS dans la régulation du couplage excitation-contraction. Ces observations revêtent un intérêt fondamental pour ce qui concerne l'implication des ROS dans l'insuffisance cardiaque et les arythmies qui sont les deux principaux domaines d'intérêt de notre laboratoire.

Le fait que de nombreuses pathologies soient associées à un stress oxydant permet d'avancer que ces maladies pourraient être corrigées par une thérapie basée sur des antioxydants. Néanmoins, bien que de nombreux essais cliniques visant à démontrer l'efficacité de molécules antioxydantes aient été entrepris, aucun de ces essais n'a été à ce jour couronné de succès. Les

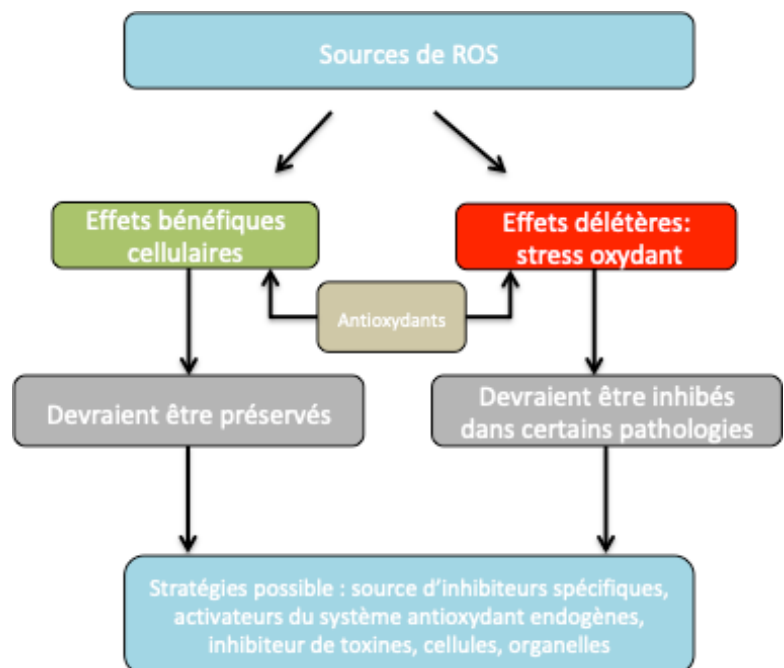


Figure 28 Concept de l'approche médicale (Egea *et al.*, 2017)

résultats sur diverses pathologies se sont révélés décevants et même parfois négatifs, avec des effets délétères (Egea *et al.*, 2017). Une des explications proposées est l'absence de sélectivité des molécules anti-radicalaires utilisées (Egea *et al.*, 2017). En effet, comme nous pouvons le voir sur la Figure 28, les ROS jouent non seulement un rôle délétère mais sont aussi fortement impliqués comme messagers dans la régulation redox de processus cellulaires essentiels ou dans l'activation de voies de signalisation cardioprotectrices (notamment dans le contexte de l'ischémie-reperfusion).

Les mitochondries apparaissent non seulement comme le site majeur de production de ROS mais aussi comme une des principales cibles de sa propre production de ROS (Watson *et al.*, 2019). Les dysfonctions mitochondriales étant de plus fortement impliquées dans les pathologies liées au stress oxydatif, une des pistes suivies actuellement concerne le développement de molécules anti-radicalaires ciblant spécifiquement les mitochondries (Smith & Murphy, 2011) ;(Detaille, 2019).

C'est dans ce contexte et dans l'objectif de tester notre hypothèse de travail que nous avons, en premier lieu, mis au point un modèle expérimental de stress oxydant sur cardiomyocytes isolés. La technique expérimentale généralement employée pour engendrer un stress oxydant consiste à incuber les cellules avec de l' $H_2O_2$  pendant 3, 6 et parfois 24 heures (Oda *et al.*, 2015) ;(Zhang *et al.*, 2019) ; (Wang, He, *et al.*, 2019). Pour notre étude, nous avons fait le choix, qui nous semble beaucoup plus pertinent, de développer un modèle de production endogène de ROS, et plus particulièrement de production mitochondriale de ROS. En cohérence avec ce type d'approche, des études ont montré que le TLR4 (Toll Like Recepteur 4), un récepteur membranaire activé par le LPS (LipoPolySaccharides), augmente la production de succinate, ce qui favorise le transport réverse des électrons le long de la chaîne respiratoire et stimule donc la production de ROS au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire (Mills, *et al.*, 2016). Une autre possibilité que nous avons prise en considération suite à des travaux préliminaires de notre équipe est l'emploi de céramide. En effet, le céramide est un sphingolipide qui augmente la production de radicaux libres par un mécanisme impliquant l'inhibition des complexes I et II de la chaîne respiratoire (Di Paola, Cocco, Lorusso, *et al.*, 2000) (Villena *et al.*, 2008). Il déclenche le gonflement mitochondrial et l'apoptose des cellules indépendamment de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (Leducq *et al.*, 2002). Enfin nous avons étudié une troisième possibilité de production mitochondriale de ROS procédant par stimulation du transport reverse des électrons au moyen de substrats de la chaîne respiratoire. Dans la mesure où notre intérêt porte sur l'étude de l'implication des mitochondries dans le couplage excitation-contraction, il était important pour nous de disposer d'un modèle de production « contrôlée » de ROS ne déclenchant pas la mort cellulaire.

En deuxième lieu, après mise au point de ce modèle expérimental de production de ROS et des techniques de mesure des ROS ainsi produits, différents antioxydants agissant sur différents sites de production ont été employés afin d'évaluer l'éventuelle implication des ROS dans le couplage excitation-contraction. Cinq antioxydants ont retenu notre attention : le Trolox, la N-Acétyl Cystéine, le MitoTEMPO, l'EUK et l'OP2113. En effet ces antioxydants agissent dans différents compartiments cellulaires, au niveau du cytosol ou de la mitochondrie.

Ils ne ciblent donc pas les mêmes ROS. Le Trolox et la NAC sont des antioxydants cellulaires qui ne ciblent que les ROS produits en intracytosoliques ou les ROS mitochondriaux ayant diffusé vers le cytosol. MitoTEMPO est spécifique de la mitochondrie et n'agit donc que sur les ROS produits en intra-mitochondrial. EUK quant à lui est présent dans la mitochondrie mais également dans le cytosol. Il cible donc l'ensemble des ROS produits. Le cas de l'OP2113 est particulier. Il s'agit d'un médicament en repositionnement dont nous avons eu l'opportunité de montrer le mécanisme d'action dans le cadre d'une collaboration de notre équipe avec la société OP2drugs. Comme nous le développerons en détail plus loin au chapitre des résultats, nous avons montré que cette drogue inhibe spécifiquement la production de radicaux libres au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire. Ces travaux ont donné lieu à un brevet dont le Docteur P. Diolez est un des inventeurs. Dans la lignée des antioxydants ciblant les mitochondries, la molécule OP2113 (Anetholtrithion, or 5-(4-methoxyphenyl) dithiole-3-thione—CAS number 532-11-6), présente un fort caractère lipophile et possède un groupement quinone, deux caractéristiques autorisant le ciblage mitochondrial.

En troisième lieu, une fois les modèles de production endogène de ROS et de leur modulation mis au point, nous avons adapté nos protocoles à l'analyse combinée, en temps réel, par microspectrophotométrie du transitoire calcique et de la contraction des cardiomyocytes au moyen d'un microscope à épi fluorescence.

# MATERIELS & METHODES

## Matériels & Méthodes

### I. Préparation des échantillons

#### 1) Modèle animal

Les rats mâles Wistar (Laboratoire Janvier, France) pesant de 250 à 350 g ont été hébergés dans un environnement contrôlé (cycle jour/nuit 12h/12h, 22°C, 60% d'humidité) avec un accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées en conformité avec les directives du Conseil de la Communauté Européenne du 24 Novembre 1986 (86/609-EEC), et ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Université de Bordeaux.

Le rat est anesthésié en présence d'isoflurane (4 %) dans une chambre en plexiglas. Une dose d'héparine (0,1 ml à 5000 UI/ml) lui est administrée 5 min avant euthanasie et dissection, afin d'éviter toute coagulation sanguine. Le rat est ensuite euthanasié par dislocation cervicale, puis le cœur est immédiatement extrait après thoracotomie. Lors du transfert jusqu'à l'appareil de Langendorff le cœur est immergé dans la glace dans un tampon d'isolement avec  $\text{CaCl}_2$  à 4°C.

#### 2) Préparation des échantillons

Selon le type d'expérimentation prévue, à partir d'un cœur nous isolons les mitochondries ou les cardiomyocytes.

##### *a. Isolement des mitochondries*

A l'issue du prélèvement, le cœur est découpé en un fin broyat à l'aide de ciseaux. Le broyat est ensuite incubé à 4°C pendant 7 minutes sous agitation dans 25 ml de solution tampon (Sucrose 300 mM, Tris 10 mM, EGTA 2 mM à pH 7) supplémentée par 0,1 mg/ml de protéinase (type XIV, from *Streptomyces* ; Sigma-Aldrich). La suspension tissulaire résultante est ensuite versée dans un Potter en verre de 50 ml et homogénéisée pendant 3 minutes à l'aide d'un pilon téflon motorisé. L'homogénat est filtré à travers une toile à bluter puis centrifugé à 7500 g pendant 7 minutes. Le culot est ensuite remis en suspension dans 20 ml de solution tampon avec 2 mg/ml de SAB (Sérum Albumine Bovine). L'homogénat est ensuite centrifugé à 680 g pendant 10 minutes et le surnageant récupéré pour être de nouveau centrifugé à 7000 g pendant 10 minutes afin d'obtenir un culot mitochondrial brut. Le culot mitochondrial brut final est remis en suspension dans le tampon avec SAB pour obtenir une concentration en protéines mitochondriales finale comprise entre 40 et 60 mg/ml, déterminée par mesure colorimétrique des protéines. À la suite de l'isolement, les mitochondries sont immédiatement utilisées pour les tests fonctionnels (mesure de la production de ROS ou suivie de la consommation d'oxygène).

### *b. Isolements cellulaires*

À la suite de la dissection, le cœur est canulé par l'aorte et rétro-perfusé à 8 ml/min par des solutions d'isolement à 37°C. Les solutions perfusées étaient continuellement oxygénées (100% O<sub>2</sub>) par des oxygénateurs placés dans le réservoir de solution afin de maintenir le pH à 7,4.

Le tampon d'isolement est composé de : 130 mM de NaCl ; 5,4 mM de KCl ; 1,4 mM de MgCl<sub>2</sub> ; 0,4 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 5 mM HEPES ; 10 mM de Glucose ; 10 mM de créatine et 20 mM de taurine, pH ajusté à 7,4 avec du NaOH.

Le cœur est d'abord perfusé avec du tampon d'isolement supplémenté en CaCl<sub>2</sub> à 0,75 mM durant 30 sec à 1 min pour faire rebattre le cœur et le rincer du sang qu'il contient. Puis il est perfusé avec un tampon supplémenté en EGTA à 0,1 mM durant 5 à 7 min. L'EGTA est un chélateur d'ions calciques et par conséquent il inhibe la contraction. L'absence de Ca<sup>2+</sup> va induire une fragilisation des connections intercellulaires.

Enfin le cœur est perfusé par une solution enzymatique composée de :

- 4 µL de tampon CaCl<sub>2</sub> à 1 M,
- 1 mg/ml de Collagénase de type II à 310 U/mg (Worthington)
- 0,1 mg/ml mg de protéase de type XIV, de Streptomyces (Sigma-Aldrich)

Le tout durant environ 7 à 8 min, selon l'aspect du cœur. Le cœur est ensuite découpé en morceaux en présence de la solution enzymatique, puis transféré dans un erlenmeyer - toujours en présence de solution enzymatique - et mis en agitation dans un bain marie à 37°C durant 5 min. Le contenu est passé à travers un filtre en nylon (maille 200 µm) pour séparer le tissu non digéré de la solution enzymatique contenant les cellules qui sont récupérées dans un premier falcon® 10 ml puis centrifugée (1 min, 400 rpm). Le culot de cellules formé est re-suspendu dans un tampon CaCl<sub>2</sub> 0,2 mM à l'aide d'une pipette pasteur (embout fin) et laissé à sédimenter. Les morceaux de cœur présents dans le filtre sont récupérés et remis à agiter pendant 5 min à 37°C en présence de la solution enzymatique (2<sup>ème</sup> digestion). Pour finir, 4 ou 5 digestions (selon l'état des cellules des premières digestions) de ce type sont effectuées. Une fois que les 4 ou 5 tubes de cellules re-suspendues dans le tampon CaCl<sub>2</sub> à 0,2 mM ont sédimenté, les cellules sont de nouveau re-suspendues dans le tampon CaCl<sub>2</sub> 0,75 mM. Après la première re-suspension à 0,2 mM de CaCl<sub>2</sub>, chaque « batch » est observé sur lame, au microscope optique (objectif ×10) afin d'estimer l'état des cellules (la quantité et la viabilité) et adapter le temps de digestion en bain marie des « batch » suivants. Finalement, tous les « batch » sont observés au microscope après resuspension dans le tampon CaCl<sub>2</sub> 0,75 mM et seuls ceux présentant une bonne quantité de cellules viables (>70% de cellules vivantes) sont retenus et re-suspendus ensemble. Ce qui nous donne un volume global d'environ 10 à 15 ml de suspension cellulaire dont nous allons déterminer la quantité non seulement par comptage (cellule de Malassez) mais aussi par dosage de protéines (méthode SAB).

Une fois toutes les cellules réunies, nous allons pouvoir procéder aux deux différents dosages.

### a. Dosage des protéines

Un dosage de protéine par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) permet de quantifier le contenu en protéines de la fraction mitochondriale, à partir d'une gamme étalon de SAB de concentrations connues allant de 0 à 1mg/ml. Les mitochondries sont diluées 100 fois et déposées sur une plaque 96 en duplicat. Le tampon dans lequel sont contenues nos mitochondries est également déposé et soumis au dosage pour vérifier que notre résultat ne sera pas biaisé, (contrôle négatif). Le réactif utilisé est le Bradford, la réaction avec les protéines est très rapide, il y a une incubation de seulement 8 minutes. Le résultat est lu grâce à un lecteur de plaque réglé à une absorption de 595nm.

En ce qui concerne les cardiomyocytes nous utilisons également un dosage au BCA avec le kit Pierce TM BCA Protein Assay Kit, Thermofisher. Il s'agit d'un dosage colorimétrique à partir d'un stock de SAB (2 mg/ml) qui nous permet de réaliser une gamme étalon est réalisé de 0 à 40 µg/ml. Les cardiomyocytes sont dilués 500 fois. Comme pour les mitochondries la gamme, les cellules et le tampon sont répartis en duplicata sur une microplaque de 96 puits. Enfin, la mesure de la coloration est réalisée au bout d'une heure d'incubation à 37°C sur un lecteur de plaque réglé à une absorption de 570 nm.(Mallia *et al.*, 1985).

### b. Comptage des cellules : Lame de Malassez

Une lame de malassez est utilisée pour le comptage des cardiomyocytes. A l'aide d'une pipette pasteur, une goutte de la solution finale contenant les meilleurs « batch » de cellules est prélevée et déposée sur la lame. Puis les cellules sont observées et comptées au microscope (grossissement  $\times 10$ ). Les grands rectangles ont une aire de  $0,25 \times 0,20 = 0,05 \text{ mm}^2$ . Le quadrillage est composé de 100 grands rectangles (chaque côté étant composé de 10 grands rectangles). Un grand rectangle est subdivisé en 20 petits carrés avec une aire de  $0,05 \times 0,05 = 0,0025 \text{ mm}^2$ . Le volume total du quadrillage est de  $1 \text{ mm}^3$  c'est-à-dire  $1 \mu\text{L}$  (voir Figure 29).

Pour quantifier les cellules vivantes et les cellules mortes, nous avons utilisé une solution de bleu Trypan concentrée à 0,4%. Elle colorera les cellules mortes en bleu et les cellules vivantes resteront incolores, car elles sont imperméables au colorant. Nous avons préparé une solution composée de 100µL de bleu de Trypan et de 200µL de solution d'isolement cellulaire conservée au frais. Lors de la coloration, nous avons mis sur la lame de Malassez 10µL de solution cellulaire et ajouté 2µL de la solution de bleu de Trypan préparée au préalable.

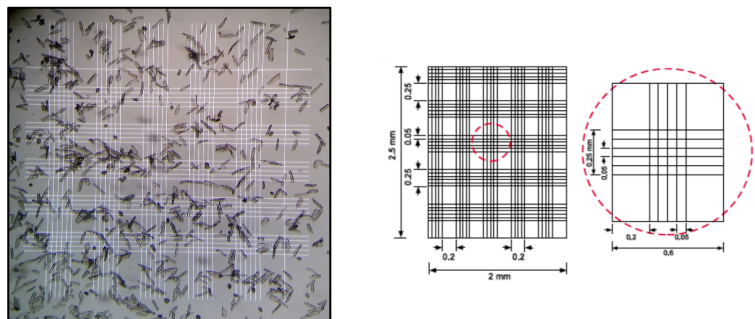


Figure 29 Comptage des cardiomyocytes sur une lame de Malassez



II. Mise au point du modèle expérimental

Nous avons étudié différents protocoles dans le but d’augmenter la production des radicaux libres mitochondriaux dans les cardiomyocytes.

Dans un premier temps, aux vues des précédentes études réalisés par mon équipe nous nous sommes concentrés sur le céramide.

1) Le céramide, induction d’un gonflement mitochondrial

Nous avons réalisé une concentration de C2-céramide de 5,86mmol/l dans du DMSO (PM = 341,53g/mol), différentes concentrations ont été étudiées allant de 10 à 50µM.

2) Les lipopolysaccharides, facteurs de transcription de la nécrose et de l’apoptose

La production de ROS étant lié à l’apoptose, nous avons voulu nous intéresser également à un des facteurs de transcription principal de l’apoptose les lipopolysaccharides (Munshi *et al.*, 2002).

Le LPS a été préparé dans du tampon phosphate salin (PBS pour « phosphate buffered saline) à une concentration de 5mg/ml.

3) Les substrats énergétiques : une source de stress oxydant ?

Enfin nous avons établi un dernier protocole ou nous allons directement ajouter des substrats énergétiques aux cellules (Figure 30).

Les deux substrats sont solubilisés dans l’eau, le succinate à une concentration de 0,5 M, et le pyruvate à 1 M.

4) Modulation par l’utilisation d’antioxydants

a. *Antioxydants cellulaires*

Nous avons décidé d’étudier plusieurs antioxydants en raison de leurs modes d’action différents.

Le Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7,8-tetramethyl- chroman-2-Carboxylic Acid) est un analogue hydrophile de la vitamine E et un piègeur direct des radicaux hydroxyles et alkyls. Le Trolox est un des antioxydants les plus utilisés dans le cas d’une comparaison avec des antioxydants spécifiquement mitochondriaux tel que mitoVitE ou MitoQ du fait de sa localisation non mitochondriale (Echtay *et al.*, 2002). De par son action antioxydante le Trolox annulerait entre autres l’inhibition de la SERCA du réticulum sarcoplasmique par les ROS probablement en diminuant la peroxydation lipidique du RS (Distelmaier *et al.*, 2012).

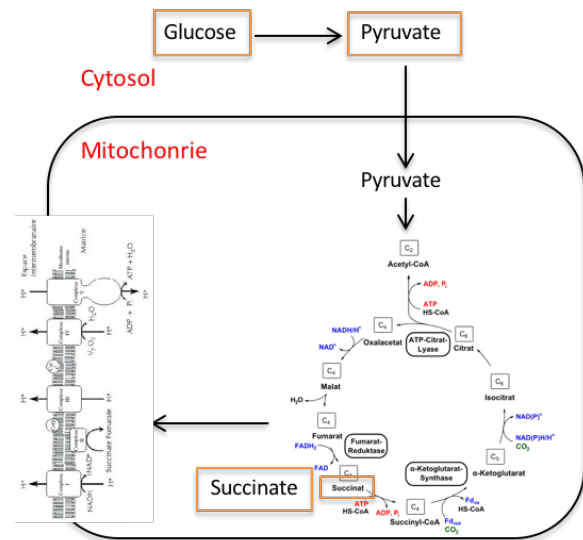


Figure 30 Mode d’action de l’ajout de différents substrats: glucose, pyruvate et succinate

### Préparation du Trolox :

Le Trolox a une masse molaire de 250,29g/mol. Une solution mère a été préparée à 2 mM dans de l'eau. Puis les cardiomyocytes ont été incubés à différentes concentrations : 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M et 100  $\mu$ M.

Le NAC est un composé thiol qui agit directement et indirectement sur les ROS. En effet c'est un précurseur de la L-cystéine et de la glutathione qui intervient dans de nombreuses réactions de détoxication et d'élimination d'espèces réactives de l'oxygène (Taherian *et al.*, 2014). De plus une étude en 2006 suggère que le NAC augmente l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) en diminuant l'ion peroxyneutre. Les différentes conséquences d'un traitement au NAC sont établies dans la Figure 31 (Ga *et al.*, 2005) ;(Salvemini *et al.*, 2006).

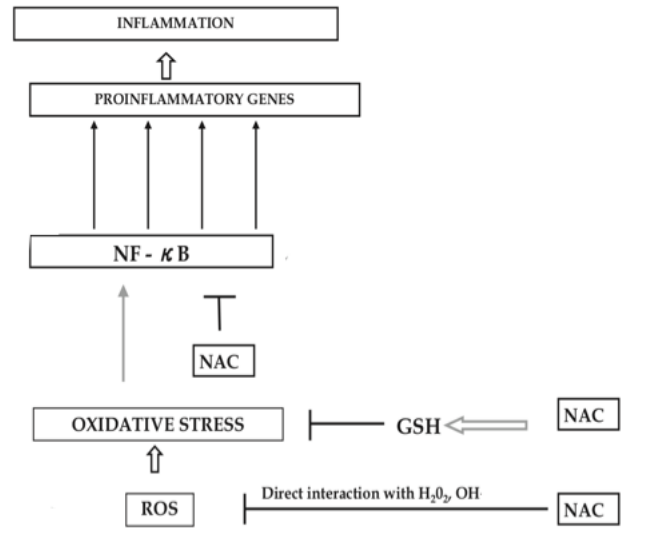


Figure 31 Conséquences d'un traitement au NAC  
La NAC inhibe le stress oxydant en agissant en tant que piègeur des ROS et en modifiant le statut redox cellulaire, ce qui peut influencer l'activité du facteur NFκB et moduler la réponse inflammatoire (Sadowska, 2012).

### Préparation du NAC

La masse molaire du NAC est de 163,19g/mol, une solution de 0,7M va être réalisée dans l'eau.

#### *b. Antioxydants mitochondriaux*

Nous avons travaillé en collaboration avec la startup OP2drugs. OP2drugs nous autorise à utiliser la molécule OP2113 à la fois dans le but d'étudier son mécanisme d'action et comme modulateur spécifique de la production mitochondriale de ROS. Ce médicament, en repositionnement, s'est révélé posséder des propriétés uniques au niveau mitochondrial. Nous avons ainsi pu démontrer que la production de ROS par le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale est fortement inhibée par OP2113.

C'est ainsi la première molécule possédant déjà une autorisation de mise sur le marché chez l'humain capable d'inhiber spécifiquement la production de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale. L'ensemble des résultats a abouti à plusieurs dépôts de Brevet (Diolez, Detaille, OP2drugs, Liryc) et une demande d'autorisation de réalisation d'essais cliniques (phase 2), en ce moment même examinée par l'administration Américaine (Food&Drug administration). L'ensemble des résultats concernant cette molécule sera présenté dans le Resultat-II (Detaille *et al.*, 2019).

### Préparation de OP2113

OP2113 a une masse molaire de 240g/mol et est très lipophile. Dans un premier temps nous allons préparer une solution à 20mM en pesant 5mg qui sont dissous dans 1 ml de DMSO. Puis une solution de 6mM (obtenue par dilution à partir de la solution mère de 20mM) sera établie pour réaliser le protocole. Différentes concentrations ont été étudiées allant de 5µM à 30µM.

Au niveau mitochondrial, un autre antioxydant bien connu que nous allons étudier est le MitoTEMPO, 2-(2, 2, 6,6- tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-ylamino)-2-oxoethyl) triphenylphosphonium chloride). MitoTEMPO est un composé physicochimique qui mime l'effet de la SOD. Il peut passer la bicouche lipidique et s'accumuler spécifiquement dans la mitochondrie. Des études in vivo et in vitro ont confirmé que MitoTEMPO est un antioxydant mitochondrial, et qu'il cible les superoxydes et les radicaux alkyls. Des études in vitro ont montré qu'une incubation en présence de MitoTEMPO prévient la mort cellulaire chez les cardiomyocytes adultes en présence d'un inhibiteur de la SOD (Ni *et al.*, 2016).

### Préparation MitoTEMPO

Le MitoTEMPO est un antioxydant dont la masse molaire est de 510,03 g/mol. Cette molécule est préparée dans l'eau. Les concentrations finales utilisées varient entre 2,5µM et 15µM.

Enfin, nous avons étudié un dernier médicament spécifique à la mitochondrie EUK, grâce à un don de la molécule par la société MindSet Rx (Arlington, MA, USA). EUK est un SOD et catalase mimétiques c'est à dire qu'il transforme les  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  puis en  $H_2O$  (Pucheu *et al.*, 1996) ;(Ajith, 2014). Il existe 4 molécules différentes : EUK-8, EUK-134, EUK-189 et EUK-207. Au laboratoire nos essais ont été réalisés à partir de EUK-207. Ce médicament est très intéressant pour compléter l'effet de MitoTEMPO.

### Préparation de l'EUK

L'EUK 207 est un antioxydant dont la masse molaire est de 526,42g/mol. Nous avons donc préparé une concentration mère à 60mM dans un mélange eau éthanol, 65% et 35% respectivement.

## III. Mesure de la respiration : Oxygraphie

L'évolution de la concentration d'oxygène du milieu est mesurée en temps réel dans la cuve d'un oxygraphe thermostaté à 37°C (Oxygraph- 2K, Oroboros Instruments, Autriche) contenant un tampon de respiration (composé en mM : Sucrose 140, KCl 100, EGTA 1,  $MgCl_2$  20,  $KH_2PO_4$  10, BSA 0,1% à pH 7,2 à 37°C) sous agitation constante, et des mitochondries. L'électrode de Clark est composée d'une anode en argent et d'une cathode en platine, l'ensemble est immergé dans une solution de chlorure de potassium semi-saturé.

Le tout est séparé du milieu de respiration par une membrane en téflon uniquement perméable au dioxygène dissous dans le milieu. La cathode est polarisée à -0,8 V.

Le courant produit par la réduction du dioxygène à la cathode est directement proportionnel à la concentration en dioxygène du milieu de respiration. L'oxygraphe est relié à un ordinateur permettant, grâce au logiciel Datlab, de suivre l'évolution de la concentration en dioxygène dans la cuve ainsi que sa dérivée première. Ces données nous permettent d'accéder au flux de consommation de l'oxygène par les mitochondries isolées et facilitent l'identification des états stationnaires.

#### IV. Mesure de la production de ROS : Spectrophotomètre (Safas®)

##### 1) Sonde utilisée : Amplex Red

La mesure de la production de ROS est réalisée grâce à la mesure de production d' $H_2O_2$  par les mitochondries de cœur et les cardiomyocytes de rat à l'aide d'un Spectrophotomètre (SAFAS Xenius XC). Le cycle de mesure dure 20 min et la lecture 3 sec, avec une agitation des cuves à 15 %, la tension de PM est de l'ordre de 550V pour les mitochondries, et aux alentours de 500V pour les cardiomyocytes. Les bandes passantes à l'excitation et l'émission sont de 10 nm.

Une réaction assez simple permet de suivre l'évolution de la concentration en  $H_2O_2$  (Figure 32). La production de ROS est évaluée grâce à l'utilisation de la sonde incolore et non fluorescente Amplex Red qui, en présence d' $H_2O_2$  et sous l'action de la Peroxydase (HRP, Sigma-Aldrich, France), est transformée en Résorufin, composé fluorescent stable ( $\lambda_{excitation}=560nm$ ,  $\lambda_{émission}=590nm$ ).

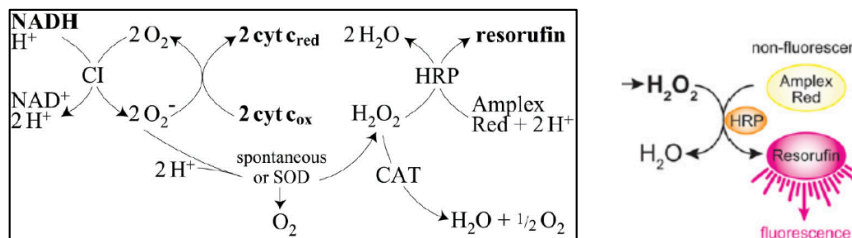


Figure 32 Réaction d'oxydation entre la sonde Amplex Red et l'enzyme HRP pour former de la Résorufin (Kussmaul & Hirst, 2006)

Chaque cuve de mesure contient :

- Du tampon de respiration décrit précédemment qsp 3ml
- 10 $\mu$ g/ml d'HRP
- 13,3 $\mu$ M d'Amplex Red
- 0,2mg/ml de mitochondries ou bien 0,5mg/ml de cardiomyocytes

Nous avons effectué la calibration de la fluorescence en fonction d'une concentration connue en  $H_2O_2$ . Les résultats seront dans un premier temps exprimés en fonction de la cinétique de production de  $H_2O_2$  (pmol  $H_2O_2$  par minutes). Puis les résultats seront également rapportés à la concentration en protéines de chaque expérimentation ; ce qui donne une unité finale de production de ROS en pmol  $H_2O_2$ / min/ mg de protéines.

## 2) Protocole expérimental

### a. *Mitochondries*

Les mitochondries sont ajoutées à la préparation de la cuve selon leur concentration en protéines (concentration finale = 0,2mg/ml final).

Au niveau des mitochondries seule la molécule OP2113 et son métabolite OP2116 ont été testés. Ces derniers sont ajoutés directement dans la cuve après un protocole permettant une production de ROS au niveau des différents sites mitochondriaux.

La mesure de la production de ROS au niveau des différents sites de production mitochondriaux a été décrite par le groupe de M.Brand (Quinlan *et al.*, 2013). Les sites de production mitochondriaux ont été ciblés individuellement en utilisant des combinaisons de substrats et inhibiteurs mitochondriaux :

- Site I<sub>Q</sub> : 5mM de succinate
- Site I<sub>F</sub>/DH : 5mM glutamate + 2,5mM malate + 4μM rotenone
- Site III<sub>Q0</sub> : 5mM succinate + 4μM rotenone + 2,5μM antimycine A
- Site II<sub>F</sub> : 15μM palmitoylcarnitine + 2,5μM antimycine A + 2μM myxothiazol
- mGPDH (mitochondrial glycerol-3-phosphate déhydrogénase) : 25mM glycérolphosphate + 4μM roténone + 2,5μM antimycine A + 1mM malonate + 2μM myxothiazol

### b. *Cardiomyocytes*

Pour établir notre modèle de surproduction de ROS dans les cardiomyocytes nous les avons ajoutés directement dans la cuve de mesure du Safas. Pour tester les différents antioxydants, nous avons mis au point le protocole d'incubation suivant : les cardiomyocytes étaient incubés pendant 20 min avec différentes concentrations d'antioxydants avant d'être soumis ou non à un protocole de surproduction de ROS. Pour chaque test un groupe contrôle était également incubé avec la dose maximale des différents solvants que recevaient les cardiomyocytes.

## V. Mesure simultanée de la contraction cellulaire et du transitoire calcique

Dans la mesure où nous maîtrisons les conditions expérimentales permettant de moduler la production de ROS dans les cardiomyocytes isolés, nous possédons tous les éléments nécessaires pour étudier les effets d'une dérégulation des ROS sur le couplage excitation-contraction. C'est à cette fin que j'ai été formée sur un système qui nous permet de détecter en temps réel la contraction des cardiomyocytes isolés et de quantifier le calcium intracellulaire par microspectrofluorimétrie, le IonOptix.

### 1) Protocole expérimental

Les cardiomyocytes sont placés dans une chambre expérimentale sur un microscope inversé à épifluorescence (Nikon Eclipse Ti-U) et sont stimulés à une fréquence de 1 Hz par un champ électrique généré via deux électrodes de platine positionnées de part et d'autre de la chambre et reliées à un stimulateur électrique. Le stimulateur était réglé pour délivrer des

pulses rectangulaires monophasiques de 5ms et de 70 V environ à sa sortie. La température de la solution circulant dans la chambre expérimentale était ajustée à  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  par un contrôleur de température (mTCII, Cell Microcontrols). Le cardiomyocyte sélectionné est alors perfusé de manière continue avec le tyrode contenant (en mM) : 137 NaCl ; 5,4 KCl ; 0,33  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ; 0,5  $\text{MgCl}_2$  ;  $6\text{H}_2\text{O}$  ; 5 HEPES ; 5,6 Glucose ; 1.8  $\text{CaCl}_2$  avec un pH ajusté à 7,4 par le NaOH. Puis il recevra successivement du succinate (pour induire une production de ROS) et l'antioxydant sélectionné (pour réduire la production de ROS induite par le succinate).

Le dispositif expérimental est illustré dans la Figure 33 ci-jointe.

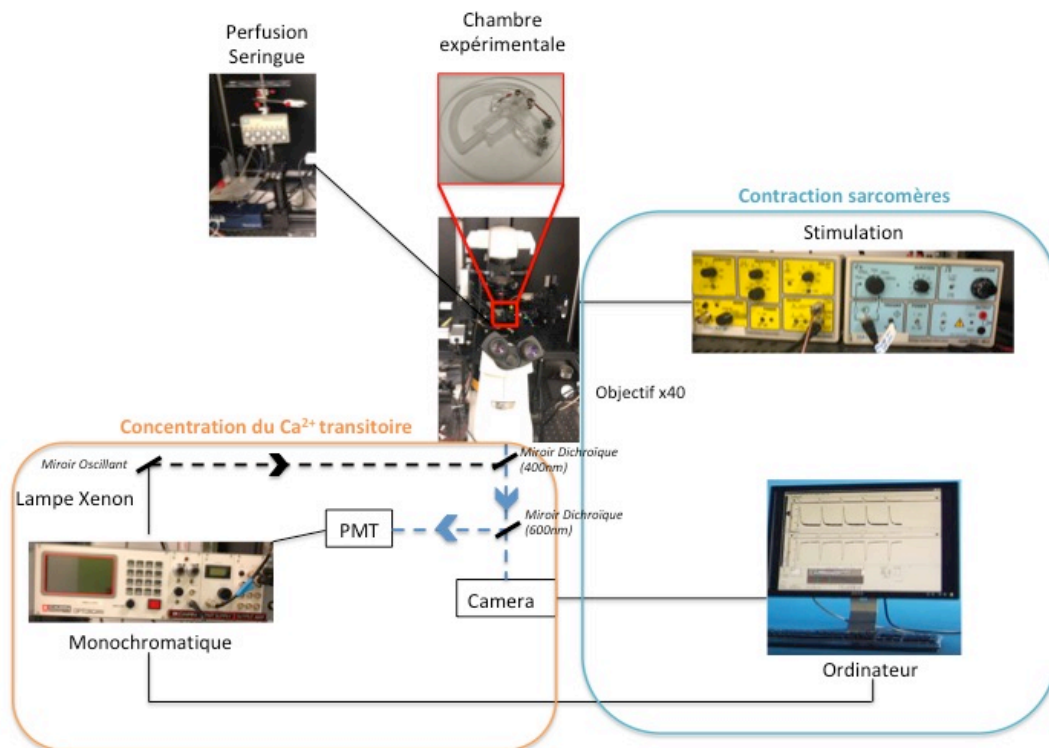


Figure 33 Dispositif expérimental pour la mesure de la contraction des sarcomères de cardiomyocytes et de la mesure du transitoire calcique.

Les cardiomyocytes sont placés dans la chambre expérimentale (en rouge), et sont observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence avec un objectif x40. Après sédimentation, ils sont soumis à un champ électrique pour les faire se contracter. La contraction des myocytes est étudiée par analyse de contraste sur l'image de la cellule obtenue à l'aide d'une caméra CCD connectée au microscope (carré bleu). Un système de spectrofluorimétrie cellulaire équipé d'un monochromateur utilisé pour exciter la sonde calcique (Fura-2 ou 4) et d'un tube photomultiplicateur (PMT) pour collecter la fluorescence émise par la sonde (carré orange) (Adaptée de la thèse du Dr Dubes V).

Pour être sélectionné le cardiomyocyte devra répondre à différents critères :

- La cellule doit avoir une forme rectangulaire
- La striation doit être homogène
- La longueur des sarcomères au repos doit être supérieure à  $1,7\mu\text{m}$
- La cellule ne doit pas présenter d'événement arythmogène en l'absence d'intervention

## 2) Mesure du raccourcissement des sarcomères

L'analyse de la contraction des cellules cardiaques repose sur la mesure de la distance séparant deux stries Z (Yamada *et al.*, 2004) et le suivi de cette distance au cours du temps. Pour cela une transformée de Fourier est appliquée en continu sur le profil de lumière obtenu à partir d'une région d'intérêt sur l'image vidéo de la cellule provenant d'une caméra CCD MyoCam-S (IonOptix) à un taux d'échantillonnage de 250 Hz. La transformée de Fourier permet de déterminer la fréquence spatiale dominante entre les stries Z de la région d'intérêt qui correspond donc à la longueur des sarcomères de notre cellule.

Différents paramètres d'analyse sont alors recueillis et/ou calculés par le logiciel du Ionoptix (Figure 34) :

- L'amplitude du raccourcissement

Dans le logiciel Ionwizard, l'amplitude du raccourcissement des sarcomères est calculée en pourcentage par rapport à la longueur des sarcomères au repos.

- La longueur de repos du sarcomère
- Le pic de contraction
- Le temps de raccourcissement des sarcomères ;
- Le temps pour atteindre 90% du pic de contraction ;
- Le temps pour atteindre 50% sa longueur initiale en phase de relaxation
- La constante de temps tau pour la courbe de relaxation qui a été « fittée » par une exponentielle

Le logiciel nous donne également accès aux dérivées minimales et maximales correspondant à la vitesse maximale de contraction et de relaxation respectivement.

Nous avons également déterminé la probabilité de développer une arythmie lors de la mesure de la contraction des cardiomyocytes. Les critères que nous avons retenus pour catégoriser une arythmie sont les suivants :

- Contraction désorganisée, cellules en fibrillation
- Contraction ne répondant pas à la stimulation imposée de 1 Hertz
- Apparition d'EAD ou de DAD

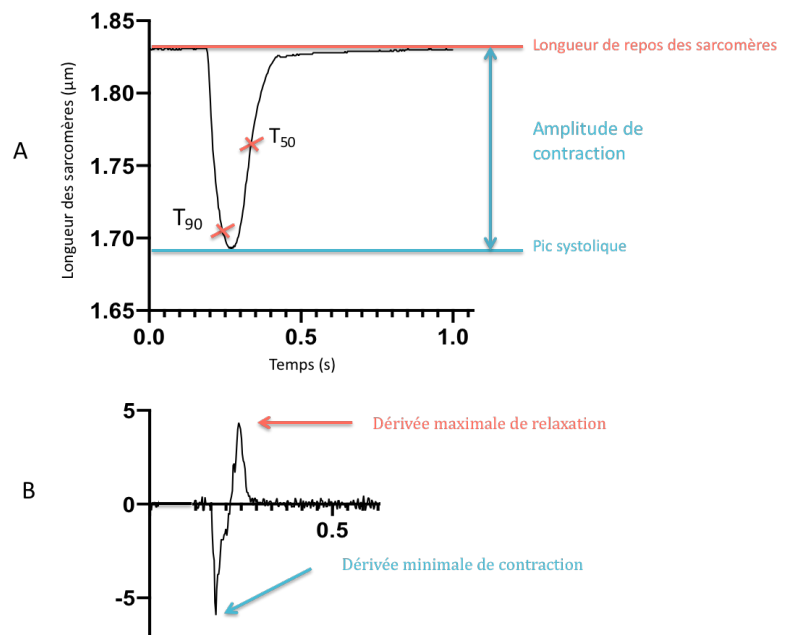


Figure 34 Paramètres étudiés pour la contraction sur IONWIZARD



Ci-dessous quelques exemples de traces au cours desquelles les cellules sont en arythmie (Figure 35).

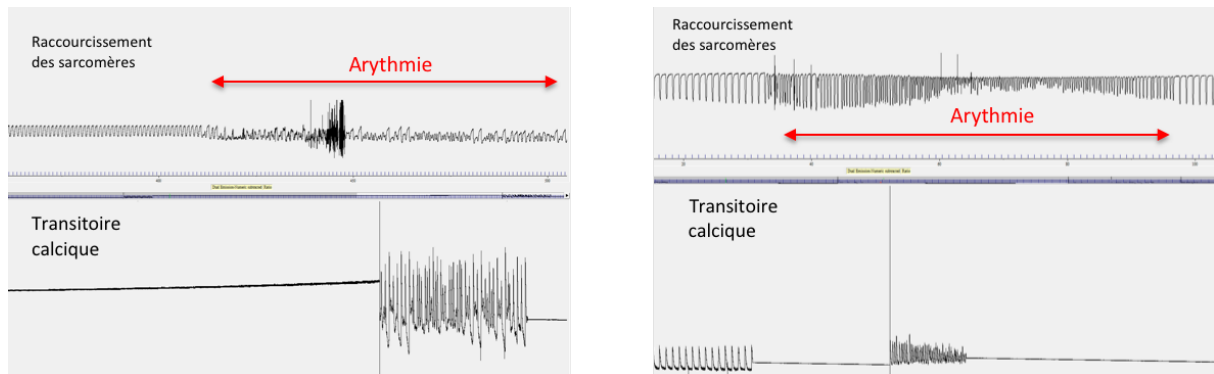


Figure 35 Exemple de cellules en arythmie lors de la stimulation par le IonOptix

### 3) Sonde calcique : Fura 2 AM, Fura 4 AM

Les sondes calciques permettent de réaliser des mesures dynamiques de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  libre. La sonde est constituée d'une partie capable de fixer de manière spécifique un ou plusieurs ions  $\text{Ca}^{2+}$  associée à un chromophore. Les sondes principalement utilisées pour étudier la dynamique de la signalisation calcique intracellulaire sont des protéines fluorescentes modifiées, ou des molécules synthétiques comme Fura-2AM (Invitrogen) et le Fura-4AM (Invitrogen). Le groupement acetoxy-méthylester (AM) rend les sondes Fura-2 et Fura-4 perméantes à la membrane plasmique en masquant les charges négatives des groupements carboxyles ( $\text{R-COOH}$ ) de la molécule. Les sondes sont ainsi hydrophobes et lipophiles et pénètrent dans le cytoplasme du cardiomyocyte. Cependant l'ajout de ce groupement les rend insensibles au calcium (empêche la complexation de l'ion par le chélateur). Dans le cytoplasme, elles vont donc subir l'action d'estérases endogènes clivant le groupement AM, libérant ainsi les formes carboxylées du Fura-2 et Fura-4 qui pourront se lier au  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces formes carboxylées ne sont plus perméantes et ne peuvent donc pas entrer dans les mitochondries.

Nous avons dans un premier temps testé la sonde Fura-2AM. Le Fura 2 est une sonde ratiométrique à double excitation (340nm et 380nm) et mono émission (510nm) (Figure 36). En effet, la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à la sonde entraîne un décalage de son spectre d'excitation de 340 à 380 nm. Ainsi la fluorescence obtenue suite à une excitation à 380 nm correspond à la sonde sans  $\text{Ca}^{2+}$  lié et celle à 340 nm à celle provenant de la sonde ayant lié le calcium. Le rapport de fluorescence émise à 510 nm en réponse à ces deux longueurs d'ondes d'excitation permet de s'affranchir de potentielles différences de charge entre les groupes de cellules étudiés, des effets de photo-blanchiment et permet d'obtenir un niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  diastolique plus fiable que par des techniques non-ratiométriques.



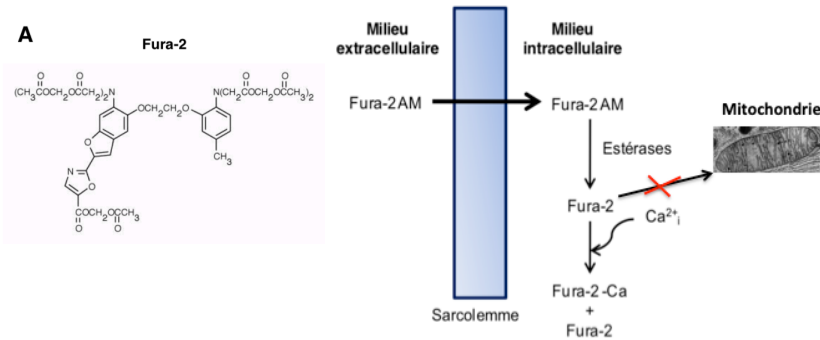


Figure 36 Structure et propriétés de la sonde Fura-2 A gauche on retrouve la structure de la sonde Fura-2 sous la forme AM. A droite le mécanisme d'entrée de la sonde dans la cellule. La sonde pénètre dans la cellule sous la forme AM lipophile. Dans la cellule, les estérases endogènes vont activer la sonde fluorescente c'est-à-dire libérer sa forme acide qui pourra se lier au  $Ca^{2+}$  cellulaire, la sonde ne traverse pas la membrane mitochondriale. adapté du site internet [www.Moleculardevices.com](http://www.Moleculardevices.com)

Au cours de nos expérimentations nous nous sommes rendu compte que la sonde Fura2-AM modifiait considérablement la contraction des cardiomyocytes. Nous avons donc entrepris des recherches pour travailler avec une sonde ayant une moins grande affinité pour le calcium et donc moins d'effet secondaire sur la contraction (Redpath *et al.*, 2013).

Nous avons donc opté pour la sonde Fura4-AM dont l'affinité pour le calcium était plus faible (Voir Tableau 4).

Remarque : plus le  $K_d$  est fort plus l'affinité pour le calcium est faible

Indicateur	Excitation (nm)	Emission (nm)	$K_d$ (nM)
Fura-2AM	340/380	505	145
Fura-4AM	340/380	505	770

Tableau 4 Différence entre les sondes Fura2-AM et Fura 4-AF, AM

La sonde Fura 4AF, AM est également une sonde ratiométrique qui possède les mêmes propriétés spectrales que le Fura-2AM. Son mode d'action est identique à Fura2AM (Figure 37).

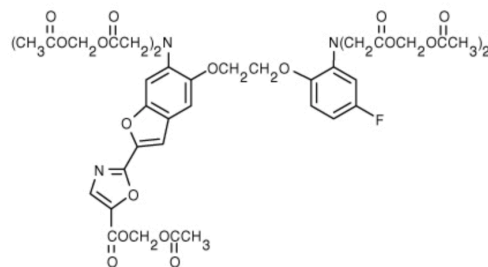


Figure 37 Structure de la sonde Fura4AM (structure Thermofisher)

#### 4) Mesure du transitoire calcique

Les cardiomyocytes sont incubés dans une solution tyrode (vue précédemment) à 0,75 mM de  $CaCl_2$ , contenant 4 $\mu$ M de la sonde Fura-4AM AF, pendant 20 minutes à l'obscurité. Les cellules sont ensuite centrifugées manuellement une minute, puis sont resuspendues dans le même tyrode que précédemment. Par la suite, pour désestérifier la sonde, les cardiomyocytes

sont incubés 30min à l'obscurité sous agitation constante. Les cellules suivent ensuite le protocole établi pour la mesure de contraction cardiaque.

La lumière d'excitation à 340 et 380 nm produite par le monochromateur (Optoscan, Cairn Research) est dirigée par un premier miroir dichroïque (à 400 nm) vers l'objectif (x40, Nikon) et la chambre expérimentale pour atteindre les myocytes chargés avec la sonde.

La fluorescence émise par la sonde va redescendre dans l'objectif, franchir le miroir à 400nm et avant d'être réfléchi vers le tube photomultiplicateur (PMT) par un deuxième dichroïque à 600nm. Pour sélectionner uniquement la lumière émise par la sonde, un filtre optique à  $510 \pm 60$  nm était placé à l'entrée du PMT. Les données sont ensuite démultiplexées et moyennées par le module de spectrophotométrie intégré au monochromateur.

Le logiciel Ionwizard va par la suite pouvoir calculer le rapport de fluorescence  $R_{flu0} = F_{340}/F_{380}$ .

##### 5) Mise au point d'un code pour analyser les résultats : collaboration INRIA

Dans le cadre de la collaboration avec l'équipe INRIA pour l'ANR MITOCARD nous avons conçu un code pour analyser et traiter les données de contraction cardiaque et de mesure du transitoire calcique.

L'objectif est de déterminer les caractéristiques de la contraction des sarcomères (longueur, vitesse) en se basant sur les données brutes provenant du logiciel IonWizard, notamment pour comprendre comment celui-ci propose des résultats sur les vitesses de relaxation.

Dans un premier temps, nous avons dû calculer (bien qu'identiques) les amplitudes de contraction et de relaxation des cardiomyocytes en présence des différents antioxydants (Figure 38). Pour cela, les longueurs des sarcomères au repos sont évaluées avant et après la contraction à partir des données que l'on a lissées au préalable. Pour le lissage nous avons effectué une moyenne glissante des valeurs de part et d'autre des points des courbes dont le nombre avait été défini au préalable.

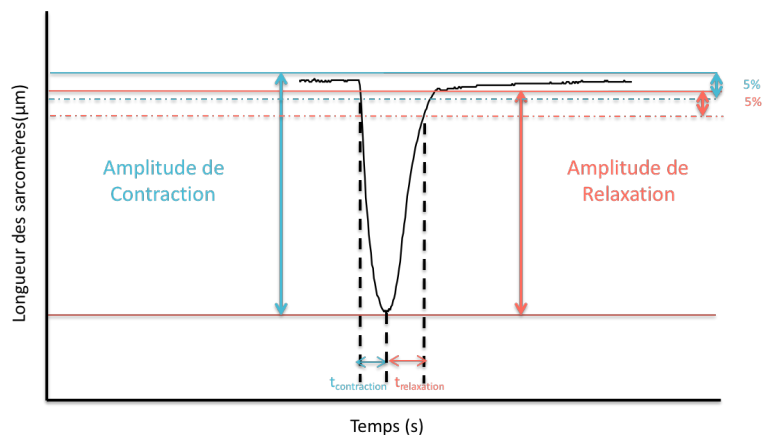


Figure 38 Étude des paramètres de contraction avec Python

Ainsi sont définies les amplitudes de contraction et de relaxation, en se basant sur la longueur minimum au cours du temps (le pic systolique). Le temps de contraction (respectivement de relaxation) est mesuré à partir de l'instant où le sarcomère s'est contracté (respectivement relâché) de 5% de son amplitude maximum.

Ce lissage est également utilisé pour mesurer le pic de contraction et calculer ses dérivées minimale et maximale – qui sont respectivement les vitesses maximales de contraction et de relaxation respectivement.

Pour tenter de reproduire les estimations d'IONWIZARD du temps caractéristique de relaxation  $\tau$ , nous avons effectué un fit d'une courbe exponentielle avec la partie des données qui a effectivement un profil de fonction exponentielle (*i.e.* à partir du point d'inflexion de la courbe de relaxation). Notons que cette constante de temps  $\tau$  est liée à la vitesse de contraction  $v$  par la simple relation  $v = \tau^{-1}$ . Nous avons également analysé la partie de la courbe de contraction en réalisant un fit parabolique afin d'étudier la vitesse de contraction (Figure 39).

Les vitesses de contraction et de relaxation sont déterminées en réalisant des fits (recalages). Le profil de contraction est approché par une parabole dont les paramètres  $a$ ,  $b$  et  $t_0$  permettent de donner une estimation de la vitesse, qui est mesurée au début de la contraction

$$F(t) = a + b(t - t_0)^2$$

Le profil de relaxation est quant à lui approché par une fonction exponentielle (de manière similaire à ce que semble proposer IonWizard). La forme de la courbe de relaxation n'étant pas celle d'une exponentielle, le fit est réalisé à partir du point d'inflexion de la courbe.

Ce point, où la vitesse est maximale, nous sert de point de mesure.

$$F(t) = a * e^{-(t-t_0)/\tau}$$

Le script importe directement les données depuis les tableaux Excel et permet d'exporter les résultats de longueurs et vitesses vers le logiciel de traitement statistique Python.

#### 6) Interaction entre l'antioxydant MitoTEMPO et la sonde calcique

Au fur et à mesure de nos expérimentations, nous avons remarqué que lorsque les cellules sont incubées avec la sonde Fura4AM, l'antioxydant MitoTEMPO ne réverse plus l'effet de la surproduction de ROS en ce qui concerne la contraction. Nous avons alors suspecté une interaction entre le MitoTEMPO et le Fura4AM puisque MitoTEMPO n'a plus l'air d'assurer son rôle d'antioxydant. Pour mesurer cette interaction nous aurions dû incuber des cellules en présence de MitoTEMPO et de Fura4AM et étudier la production de ROS. Cependant comme nous le verrons dans le Résultats-II, nous ne pouvons pas mesurer la production de ROS en présence de MitoTEMPO avec notre technique de mesure.

Nous avons donc décidé de tester cette interaction en réalisant différentes titrations d' $H_2O_2$  en présence de MitoTEMPO et de sonde calcique Fura4AM en l'absence de cardiomyocytes (Figure 40). Lors de la présence de MitoTEMPO ou de Fura4AM seule nous n'avons observé

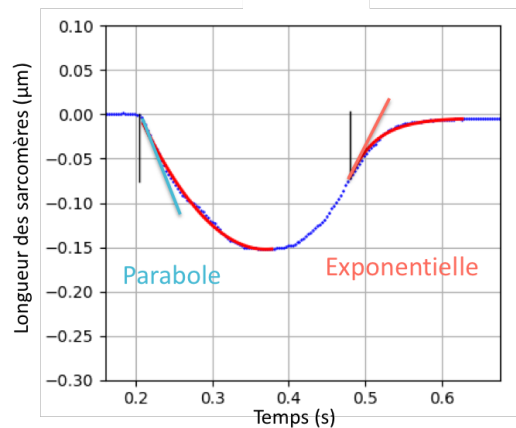


Figure 39 Fit des courbes de contraction et de relaxation

En bleu les données brutes issues de IonWizard, en rouge les fits réalisés par le script. Les traits fins noirs indiquent les positions où les vitesses de contraction et de relaxation sont calculées.

aucune différence lors de la titration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cependant en présence des deux sondes simultanément dans la même cuve il s'est avéré que le delta de fluorescence mesuré (courbe violette) avec la sonde Amplex Red est différente de 30% par rapport à la courbe contrôle (courbe bleue). L'ajout simultané de Fura4AM et de MitoTEMPO perturbe donc la mesure de la production de ROS dans nos conditions.

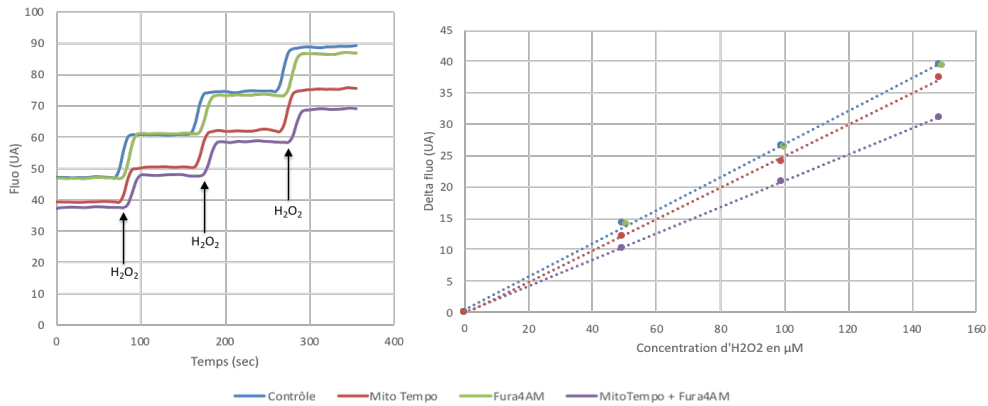


Figure 40 Interaction de l'antioxydant MitoTEMPO avec la sonde calcique

## VI. Mécanismes d'action des ROS dans la modulation du calcium et de la contraction cardiaque

De nombreuses études ont montré l'interaction entre la production de ROS et la concentration de calcium. Après avoir mesuré l'évolution du transitoire calcique dans nos différentes conditions, il apparaissait indispensable de tenter de moduler la concentration de calcium intra-mitochondriale pour mieux comprendre l'impact des ROS mitochondriaux sur le couplage excitation-contraction cardiaque dans notre modèle. Pour cela nous avons utilisé deux inhibiteurs bien différents : la cyclosporine A et le Ru360 (Figure 41)

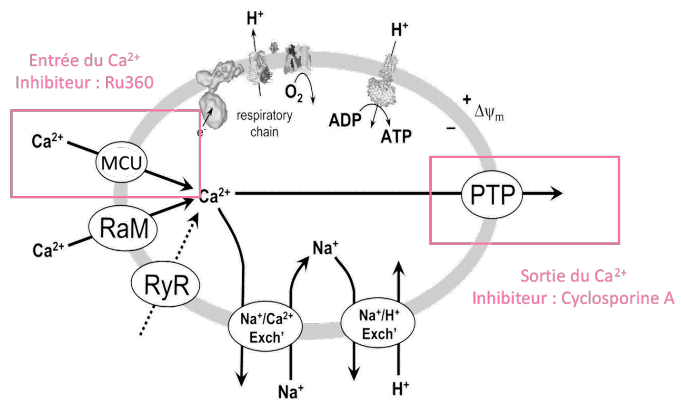


Figure 41 Mécanismes de régulation du calcium mitochondrial adaptée de (Brookes, 2004).

Dans de nombreuses études la cyclosporine A a montré un intérêt particulier dans le domaine de l'ischémie reperfusion pour ses propriétés anti-apoptotiques, par l'inhibition de l'ouverture pathologique du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm) (Lu *et al.*, 2016) ; (Gennai *et al.*, 2013). Lors de l'addition de cyclosporine, deux complexes se forment : le premier est avec la cyclophiline A au niveau du cytoplasme, de ce complexe découle une cascade d'évènements, dont l'inhibition de la calcineurine, à l'origine de l'effet immunologique de la cyclosporine A. Le deuxième complexe est réalisé dans la matrice

mitochondriale à la cyclophiline D qui va empêcher la modification de conformation de l'ANT à l'origine de l'ouverture du mPTP (Gennai *et al.*, 2013) (Figure 42). D'un point de vue pathologique, une inhibition de l'ouverture du mPTP entraîne une surcharge calcique mitochondriale ainsi qu'une augmentation de la production de ROS mitochondriaux conduisant à des dysfonctionnements cardiaques (Lu *et al.*, 2016). Notre intérêt dans cette étude est de tester l'inhibition transitoire de l'ouverture du mPTP, et selon notre hypothèse la sortie du calcium intra-mitochondrial.

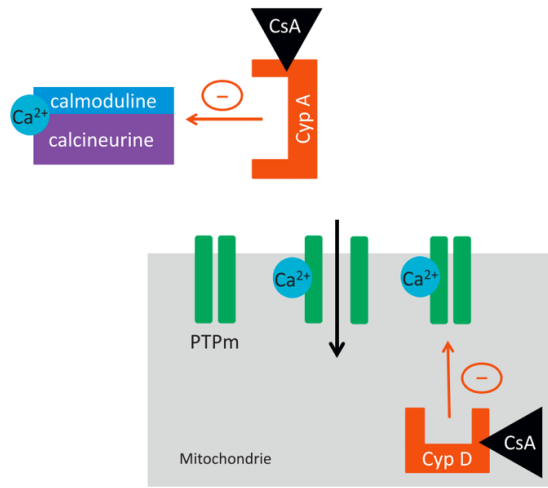


Figure 42 Mode d'action de la cyclosporine au niveau cellulaire et mitochondrial

La cyclosporine A (M = 1201,6 g/mol) est préparée à la concentration de 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à partir de solution de cyclosporine A à 10 mmol.l<sup>-1</sup>.

L'influx calcique mitochondrial est contrôlé par l'uniport MCU localisé dans la membrane mitochondriale (Figure 41). Le MCU est connu pour être bloqué par le Rouge de Ruthénium. Le Rouge de ruthénium (RR) est cependant aussi connu pour interagir avec de nombreuses protéines du cycle de contraction (De J García-Rivas *et al.*, 2006). Un des dérivés du Rouge de ruthénium, le Ru360 est plus spécifique du canal MCU. Comme nous pouvons le voir dans la Figure 43 le Ru360 contient deux atomes de ruthénium contrairement à son homologue RR qui en contient 3 (De J García-Rivas *et al.*, 2006). Pour nos expérimentations nous utiliserons le Ru360 (M = 546,7 g/mol), il est préparé à la concentration de 10 mM dans H<sub>2</sub>O.

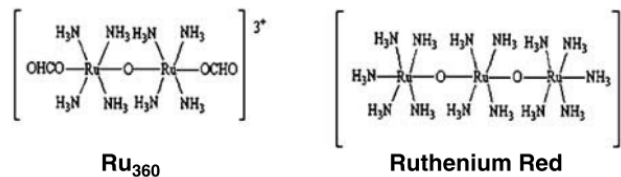


Figure 43 Structure moléculaire du Rouge de Ruthénium et de son dérivé Ru360 (De J García-Rivas *et al.*, 2006)

## VII. Statistiques

Les résultats sont exprimés en valeurs brutes ou en pourcentage et sont présentés comme les moyennes ± SEM. Les données sont traitées statistiquement à l'aide d'une analyse de variance non paramétrique (test de Kruskal-Wallis) suivie d'un test de comparaisons multiples de Dunn ou paramétrique (ANOVA) suivi d'un test post hoc Bonferroni. Les analyses sont réalisées grâce au logiciel PRISM (GraphPad) avec une significativité fixée à \* p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001.

# RESULTATS

A – La production de ROS et sa mesure

B- La modulation de la production de ROS aux moyens d'antioxydants

C – L'effet de la modulation des ROS sur le couplage excitation - contraction

## Résultats

### I. La production de ROS et sa mesure

Les ROS mitochondriaux ont été récemment impliqués dans l'induction de nombreuses pathologies cardiaques (athérosclérose, hypertension, coronaropathies, cardiomyopathies, insuffisance cardiaque) ainsi que dans les arythmies. Les mitochondries apparaissent ainsi comme une cible potentielle pour les thérapies anti-arythmiques. Cependant il apparaît également que les ROS joueraient un rôle physiologique important dans la régulation du couplage excitation-contraction (Köhler *et al.*, 2014).

Le stress oxydant décrit les conditions dans lesquelles les défenses antioxydantes de la cellule sont inefficaces pour complètement inactiver les espèces radicalaires de l'oxygène, généralement en raison d'une surproduction de ROS (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

Pour provoquer un stress oxydant au niveau cellulaire, dans de nombreuses études les cellules sont directement incubées avec de l' $H_2O_2$  pendant 1, 3, 6 et parfois 24h (Oda *et al.*, 2015) ;(Zhang *et al.*, 2019) ; (Wang, He, *et al.*, 2019).

Au contraire pour notre étude, nous souhaitons créer des conditions pour augmenter la production endogène des espèces radicalaires de l'oxygène par les cellules cardiaques. Des études ont montré que le TLR4 (Toll Like Recepteur 4) un récepteur membranaire activé par le LPS (LipoPolySaccharides) augmente la production de succinate ce qui favorise le transport réverse et donc stimule la production de ROS au niveau du complexe I (Mills, *et al.*, 2016). Une autre piste que nous avons étudiée suite aux travaux de notre équipe est le céramide. Enfin nous étudierons également l'effet de deux substrats différents sur la surproduction de ROS.

#### 1) Corrélation entre la concentration de cellules et leur viabilité

Lors de chaque expérience présentée dans cette partie un dosage de la quantité de protéines a été réalisé. Nous avons voulu comparer ce dosage de protéine avec la viabilité cellulaire des cardiomyocytes, mesurée à l'aide de la lame de Malassez. Le résultat visible sur la Figure 44 n'est pas très concluant, mais on peut cependant distinguer une tendance à une augmentation de la viabilité avec la concentration de cellules présentes.

Il aurait été intéressant de rapporter l'ensemble de nos résultats en fonction de la concentration cellulaire, qui est elle-même lié à la viabilité cellulaire.

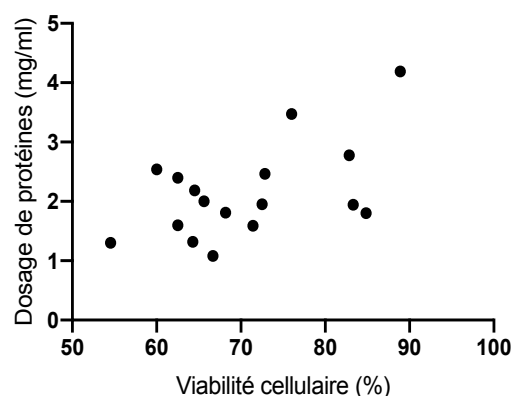


Figure 44 Corrélation entre le dosage de protéines des cellules et la viabilité cellulaire calculé à partir de la Lame de Malassez ; N=4 ; n=17

## 2) Étude de la production de ROS des cellules en condition contrôle

Nous avons dans un premier temps cherché à savoir quelle quantité de cellules nous allions utiliser pour nos expérimentations.

La production de ROS de différentes quantités de cellule a donc été étudiée pour différentes densités cellulaires de manière à obtenir le signal optimal de fluorescence, à savoir (en concentration de protéines) : 0,5mg/ml ; 0,8mg/ml et 1mg/ml. La concentration des cellules de 0,8mg/ml de protéines et 1mg/ml était trop élevée et le signal de fluorescence saturé. Nous avons donc décidé de réaliser nos expérimentations avec la concentration de cellule la plus faible, à savoir un dosage de protéines de 0,5mg/ml. En fonction de la densité de la préparation de cellules, ces dernières étaient plus ou moins diluées dans le tampon utilisé pour la mesure pour atteindre la quantité voulue.

Nos résultats indiquent dans un premier temps que la production de ROS dans des cardiomyocytes isolés est non négligeable, elle est de l'ordre de 90 pmol d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéine.

## 3) Augmentation de la production de ROS

Dans la littérature de nombreuses techniques ont été utilisées pour obtenir une surproduction de ROS comme l'addition de t-butyl hydroperoxyde, l'addition de peroxyde d'hydrogène ou encore d'éthanol (Zima & Blatter, 2006) ; (Mustroph *et al.*, 2018). Cette technique génère la plupart du temps un stress oxydant, qui permet d'étudier le rôle pathologique des ROS. Au contraire à travers notre étude nous souhaitons étudier le rôle physiologique des ROS, pour cela notre premier travail a été d'entraîner la production de radicaux libres mitochondriaux dans les cardiomyocytes. Nous avons donc testé différentes conditions susceptibles de provoquer une augmentation de la production endogène de ROS mitochondriaux par les cardiomyocytes.

### *a. Le céramide, inducteur d'un gonflement mitochondrial et de l'apoptose (Leducq, 2002)*

Le céramide est un lipide composé d'une base sphingoïde liée à un acide gras à plus ou moins longue chaîne (entre 14 et 26 carbones). Il est naturellement synthétisé dans la cellule au niveau du réticulum endoplasmique (RE) sous différents isomères, à plus ou moins longue chaîne. Ensuite le céramide est transporté dans l'appareil de Golgi pour être transformé en sphingomyeline (Galadari *et al.*, 2013). La continuité des membranes entre le RE et la mitochondrie fait que l'on retrouve le céramide dans la composition de la membrane externe et de la membrane interne mitochondriale (Di Paola *et al.*, 2000) (Kogot-Levin & Saada, 2014). L'apoptose est un programme de mort cellulaire, qui joue un rôle important dans la maintenance de l'homéostasie tissulaire. Lors de l'apoptose la dérégulation du cycle de la sphingomyeline entraîne une accumulation du céramide. Il est un médiateur lipidique puisqu'il intervient dans de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation, la prolifération, l'apoptose ou la mitophagie. Dans les cellules pancréatiques il a été montré que le céramide augmente la perméabilité de la membrane mitochondriale entraînant l'activation de facteurs



intrinsèques de l'apoptose tel que la libération du cytochrome c dans le cytosol (Galadari *et al.*, 2013). De précédentes études ont montré un effet direct du céramide sur les mitochondries (libération du cytochrome c, inhibition de la chaîne respiratoire) et en 2002 le travail de mon équipe a pu mettre en évidence que l'addition directe de céramide sur cellules ou mitochondries isolées entraîne un gonflement mitochondrial insensible à la cyclosporine A (inhibiteur du pore de transition de perméabilité) (Belaud-Rotureau *et al.*, 1998)(Leducq *et al.*, 2002)(Belaud-Rotureau *et al.*, 2000). De plus une autre étude a montré que le céramide inhibe l'activité du complexe I et du complexe II, l'inhibition de ces deux sites montre une augmentation de la production de ROS dans des mitochondries isolées (Di Paola *et al.*, 2000). Alors que le céramide naturel ne rentre pas dans la cellule, nous avons utilisé ici une forme synthétique de céramide à courte chaîne dans lequel le groupe acetyl remplace le groupe naturel d'acide gras à chaîne longue (Leducq *et al.*, 2002). Ainsi, de par ses propriétés physico-chimiques, le céramide serait capable d'agir sur le fonctionnement des complexes et d'induire une augmentation de la production de ROSm (Di Paola, Cocco, & Lorusso, 2000);(Kogot-Levin & Saada, 2014). Enfin d'après (Galadari *et al.*, 2013) le déclenchement de l'apoptose par le céramide passerait par une augmentation de la production de ROS mitochondriaux.

Nous avons donc testé différentes concentrations de céramide allant de 10µM à 50µM. Nous n'avons obtenu aucune modification durable de la production de ROS par les cardiomyocytes isolés (Figure 45-B); seulement une augmentation de la production de ROS transitoire (quelques secondes) dans le cas d'une incubation des cardiomyocytes avec 40µM de céramide (Figure 45- A).

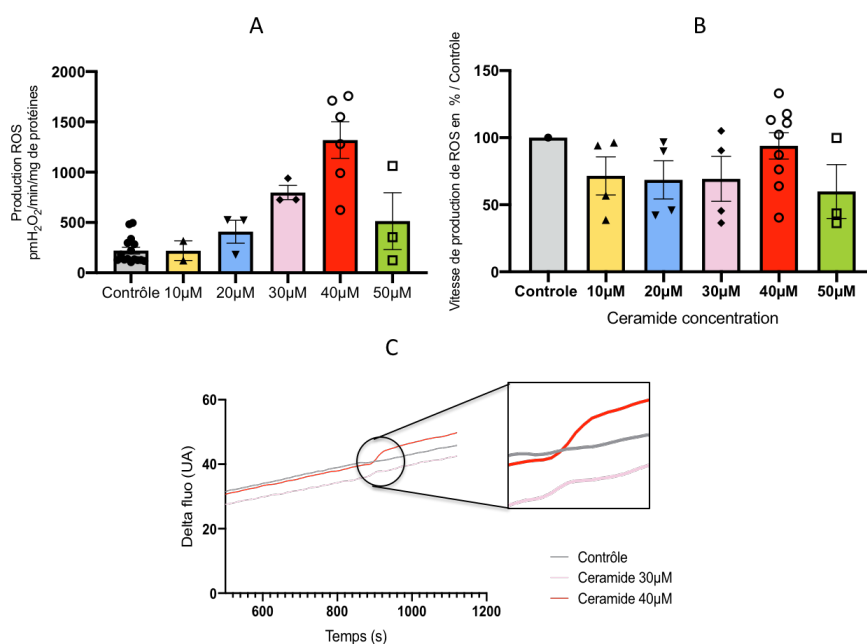


Figure 45 Étude de la production de ROS en présence de différentes concentrations croissantes de céramide

A : Etude de la production instantanée de ROS en présence de différentes concentrations croissantes de céramide, au moment de l'injection de céramide

B : Etude de la production de ROS en présence de différentes concentrations croissantes de céramide

C : Traces de la production de ROS en présence de céramide et zoom sur l'augmentation transitoire lorsque la concentration de céramide est de 40µM

Moyenne des valeurs en pmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéines : contrôle = 220,; céramide 40µM au moment de l'injection 1485,21; céramide 40µM après 1min d'injection : 169,44. ; N=4 ; n=9

Nous nous sommes intéressés par la suite à la viabilité cellulaire en présence de 40µM de céramide. On remarque que l'augmentation transitoire des ROS est associée à une diminution de la viabilité cellulaire, résultat qui confirme que le céramide augmente la mortalité cellulaire (Figure 46). Bien qu'en présence de céramide, la production de ROS semble être, d'après la littérature, mitochondriale (Galadari *et al.*, 2013) elle est malheureusement seulement transitoire et nous ne pouvons donc pas utiliser ce modèle dans nos expérimentations.

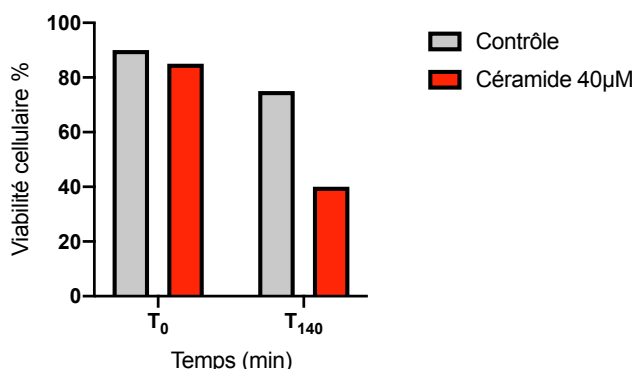


Figure 46 Étude de la viabilité cellulaire en présence ou non de 40µM de céramide

*b. Les lipopolysaccharides, facteurs de transcription de la nécrose et de l'apoptose*

Le lipopolysaccharide (ou LPS) est un composant essentiel de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif. Les lipopolysaccharides sont connus pour induire l'apoptose dans différents types de cellules endothéliales. Le LPS se lie au récepteur TLR4 et favorise la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Sachant que lors de l'apoptose il y a une surproduction de ROS nous avons voulu tester l'incubation de nos cardiomyocytes avec du lipopolysaccharides. (Mills, *et al.*, 2016). Comme le céramide, le LPS déclenche l'apoptose par la voie mitochondriale (Munshi *et al.*, 2002). Les cardiomyocytes isolés ont donc été traités avec différentes doses de LPS (1µg/ml à 300µg/ml).

Nous n'avons obtenu aucune différence dans la production d'espèces radicalaires de l'oxygène avec ou sans LPS (Figure 47-A). Nous n'avons observé aucune augmentation transitoire lors de l'ajout de LPS. Cependant après quelques recherches bibliographiques, nous avons également testé les effets d'une incubation des cellules avec la concentration la plus utilisée de LPS à savoir 1µg/ml pendant 30, 60 ou 90 minutes (Figure 47-B). Nous n'avons cependant observé aucune modification dans la production de ROS avec ou sans LPS.

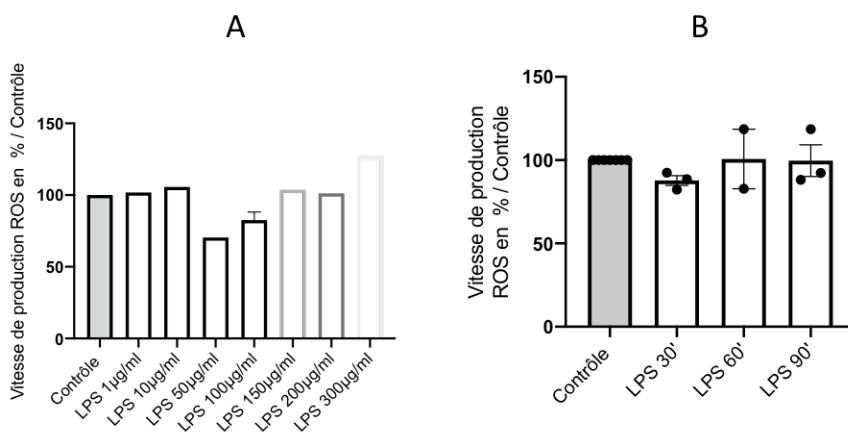


Figure 47 Étude de la production de ROS en présence de différentes concentrations de LPS

A : Etude de la production de ROS en fonction de la concentration de LPS  
 B : Incubation spécifique de la dose 1µg/ml pendant 30min, 60min, ou 90min  
 Moyenne des valeurs contrôle (100%)  
 142,33 pmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéines ; N=3

*c. Les substrats énergétiques : une source de stress oxydant ?*

N'ayant obtenu aucun résultat concluant avec le céramide et le LPS nous avons décidé de tester l'ajout de différents types de substrats énergétiques d'origine mitochondriale et cellulaire (Figure 48). Le glucose étant présent dans l'ensemble des milieux de préparation utilisés dans la littérature nous avons défini cet état comme représentant l'état « contrôle » dans nos conditions d'étude. La supplémentation en succinate, et pyruvate a donc été testée.

Nos résultats indiquent que le pyruvate multiplie par 3 la production de ROS par rapport à l'état contrôle (production de ROS = 248 pmol d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéine).

Enfin l'addition de succinate provoque une augmentation 10 fois plus importante que le glucose (p<0,0001) de la production de ROS dans les cardiomyocytes (Figure 49). Finalement avec le succinate nous obtenons une surproduction de ROS issue de nos cardiomyocytes très significative. Ce substrat sera donc celui que nous utiliserons tout au long de nos expérimentations.

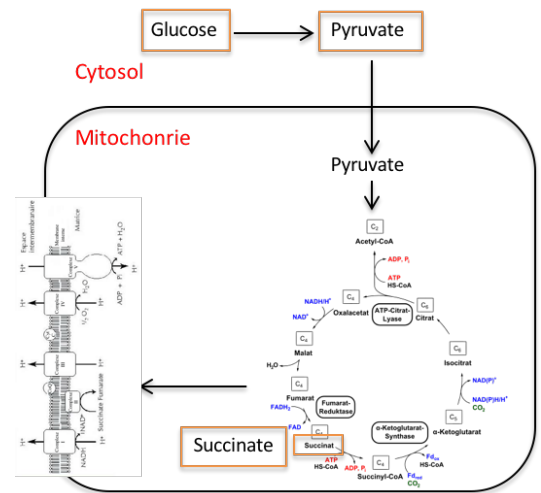


Figure 48 Localisation des substrats utilisés pour notre expérience

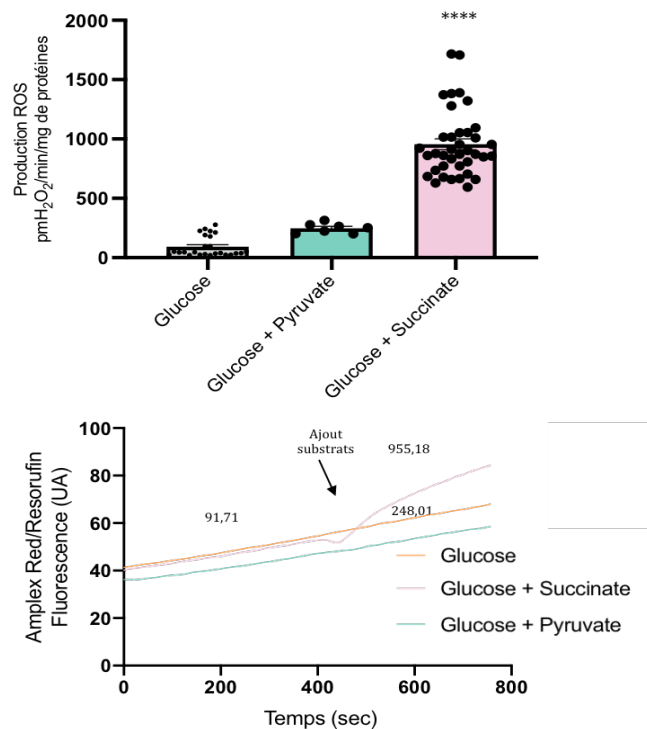
Figure 49 Surproduction de ROS mesurée après addition des substrats énergétiques mitochondriaux

A- Mesure de la production de ROS ; \*\*\*\* p<0,0001 entre succinate et contrôle (glucose seul)

B- Traces typiques de la cinétique de production des ROS

Les chiffres représentent la moyenne des valeurs en pmol d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par min par mg de protéines dans les différentes conditions de l'ensemble de nos expérimentations.

N= 15 ; n=7-38 ; tests statistiques : ANOVA



## II. La modulation de la production de ROS au moyen d'antioxydants

L'utilisation d'une batterie d'antioxydants nous permet par la suite de déterminer l'origine des ROS produits par notre modèle. En effet ces antioxydants sont localisés dans différents compartiments (soit au niveau du cytosol, de la mitochondrie ou d'un complexe mitochondrial) et donc n'auront pas les mêmes ROS ciblés (Figure 50). En effet le Trolox et le NAC sont des antioxydants cellulaires, ils ne ciblent que les ROS cytosoliques ou les ROS mitochondriaux présents dans le cytosol. MitoTEMPO et OP2113 sont eux spécifiques de la mitochondrie et donc n'agissent que sur les ROS mitochondriaux présents dans la mitochondrie. EUK quant à lui est présent dans la mitochondrie mais également dans le cytosol, il cible donc l'ensemble des ROS produits.

Nous allons maintenant nous intéresser à déterminer l'origine des ROS produits suite à l'addition de succinate.

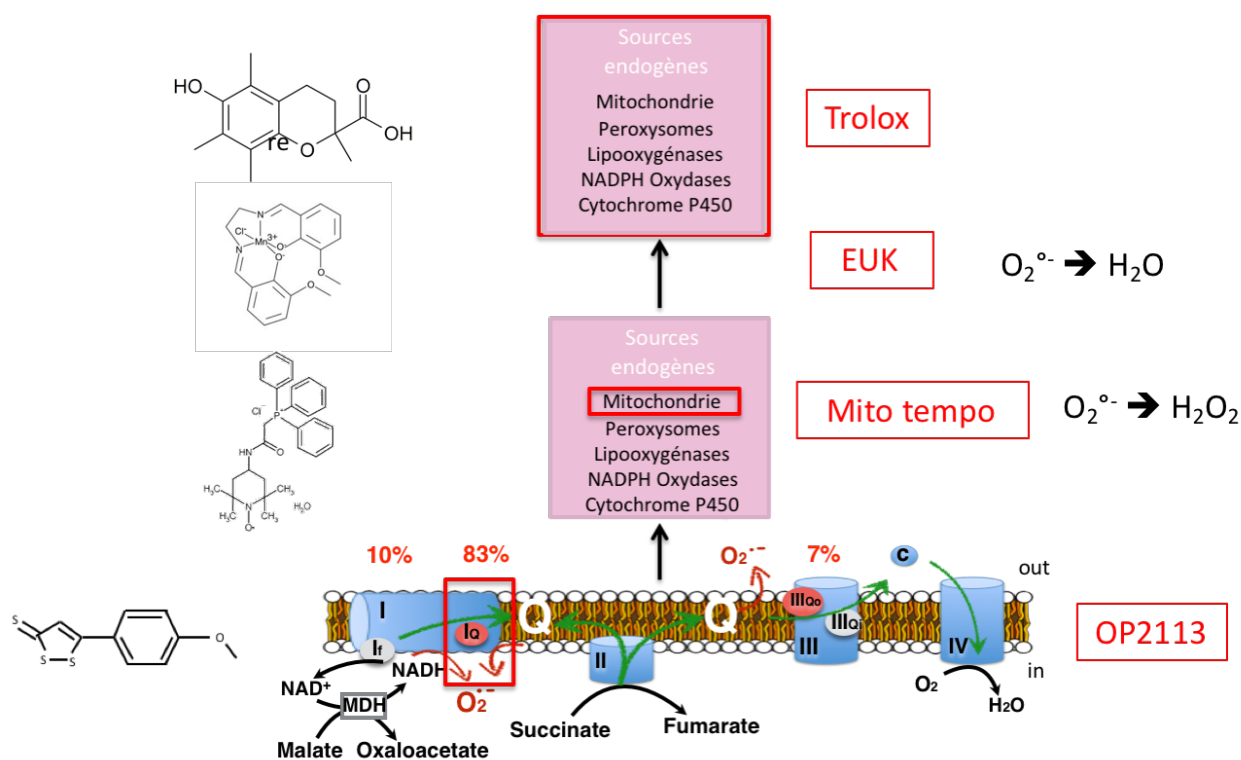


Figure 50 Utilisation de différents antioxydants en fonction de leur localisation

1) Effets des antioxydants cellulaires

## a. Trolox

Le Trolox est un analogue hydrophile de la vitamine E, largement utilisé dans de nombreux domaines et qui sert de référence pour la mesure du pouvoir antioxydant de nouvelles molécules (Marc *et al.*, 2004). Le Trolox est un des antioxydants les plus utilisés pour diminuer la production de ROS cytosolique du fait de sa localisation non mitochondriale (Echtay *et al.*, 2002). Les cardiomyocytes isolés ont donc été incubés pendant vingt minutes avec différentes concentrations de Trolox, de 30 à 100 $\mu$ M.

Dans un premier temps nous avons analysé la production de ROS des cardiomyocytes isolés en présence de Trolox en situation contrôle (glucose). On remarque que le Trolox, même à sa concentration minimale testée ici (30 $\mu$ M), entraîne une diminution de 30% de la production de ROS. L'effet maximal est obtenu vers 60 $\mu$ M et conduit à une diminution de la production de ROS par les cardiomyocytes isolés de 40% (Figure 51). Le Trolox agit donc sur la concentration basale de production de ROS dans les cardiomyocytes isolés.

En condition de surproduction de ROS due au succinate, nous avons pu observer une diminution largement significative de plus de 50% de la valeur initiale dès la première concentration de Trolox à savoir 30 $\mu$ M. Cette diminution est amplifiée de 10 et 30% avec les concentrations de 60 $\mu$ M et 100 $\mu$ M respectivement. En condition basale de production de ROS et en présence de 100 $\mu$ M de Trolox, nous avons une production moyenne de 54,7 pmold'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéines, alors qu'en condition de surproduction de ROS cette même production est de 260,23 pmold'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéines. En présence de succinate et de 100  $\mu$ M de Trolox, la production de ROS est presque 5 fois plus importante qu'en condition contrôle (Figure 52).

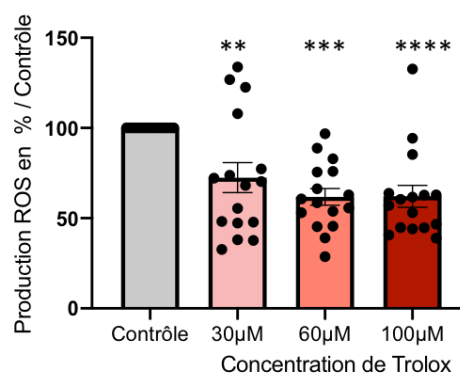


Figure 51 Production de ROS en fonction de la concentration de Trolox en absence de succinate

Les valeurs sont calculées en % par rapport à la condition contrôle de nos cardiomyocytes \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  par rapport au contrôle;  $N=6$ ;  $n=16$ ; Kruskal-Wallis  
Moyenne des valeurs (pmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéines) : Contrôle = 91,71; 30 $\mu$ M = 63,7; 60 $\mu$ M = 54,6; 100 $\mu$ M = 54,7.

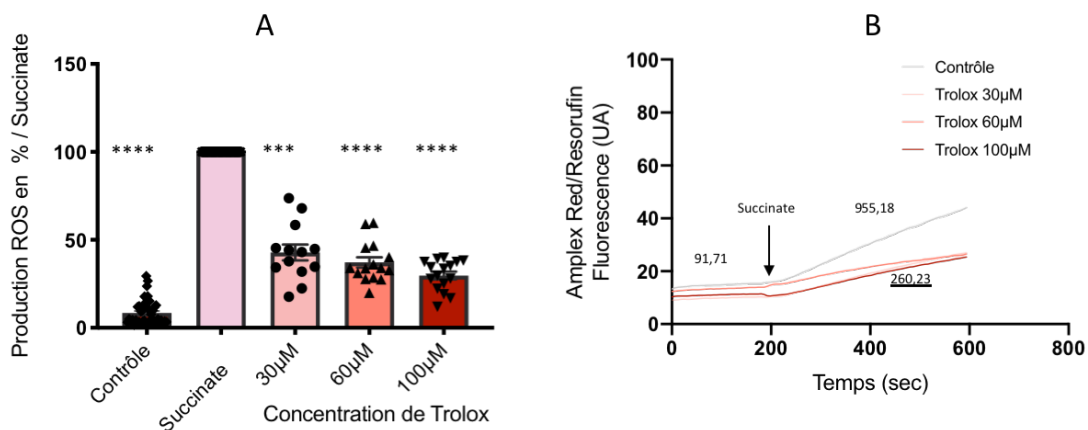


Figure 52 Production de ROS en fonction de la concentration de Trolox en présence de succinate

A- Résultats de la production de ROS

B- Traces directement extraites de l'appareil de mesure le Safas ; elles correspondent à un exemple de tracés obtenus dans cette expérience.

Les chiffres représentent la moyenne des valeurs en pmol d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par min par mg de protéines dans nos différentes conditions de l'ensemble de nos expérimentations.

La valeur soulignée correspond à la moyenne des valeurs de la plus forte concentration d'antioxydant (100µM)

\*\*\* p=0,004 ; \*\*\*\*p<0,0001 par rapport au succinate; N=6 ; n=13 ; *Kruskal-Wallis*

### b. N-acetyl-cystéine

Nous avons voulu ensuite compléter cette caractérisation des ROS en utilisant la N acétylcystéine (NAC). En effet la NAC est très connue pour être un piègeur de radicaux libres (Villagrasa *et al.*, 1997), et plus récemment pour ses effets sur la contraction cardiaque que nous détaillerons dans le paragraphe III (Mustroph *et al.*, 2018).

Lors de l'analyse de la production de ROS sur des cardiomyocytes préalablement incubés avec les différentes concentrations de NAC (300 à 700µM) nous avons remarqué une augmentation de la quantité d'espèces radicalaires de l'oxygène (Figure 53).

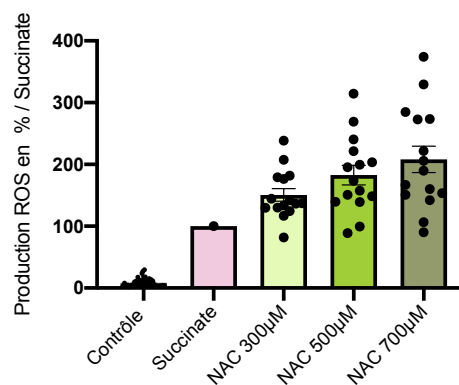


Figure 53 Production de ROS en fonction des différentes concentrations de NAC Moyenne des valeurs en pmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéines: Contrôle = 91,71; succinate = 955,18; 300µM = 846,18; 500µM= 1560,94; 700µM= 1730 ; N=3 ; n=15

### Interférence de NAC avec la méthode de mesure des ROS

Nous avons donc cherché à comprendre l'origine de cette augmentation. Il s'est avéré que la NAC réagissait avec notre système de mesure, la sonde Amplex Red (Figure 54).

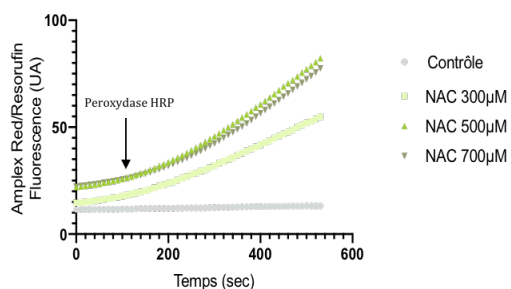


Figure 54 Effet de la concentration de NAC sur la sonde Amplex Red en absence de cellules

## 2) Effets des antioxydants mitochondriaux

### a. MitoTEMPO

Pour connaître spécifiquement l'origine des ROS produits par notre modèle nous nous sommes ensuite intéressés aux antioxydants mitochondriaux et tout d'abord au MitoTEMPO. MitoTEMPO est un composé qui mime l'action de la superoxyde dismutase et possède donc des propriétés anti radicalaires. MitoTEMPO est une combinaison d'un antioxydant et d'un cation lipophile (TPP) lui donnant la possibilité de traverser la bicouche phospholipidique et de s'accumuler spécifiquement dans la matrice mitochondriale chargée négativement. Des études in-vitro et in-vivo ont toutes confirmé l'effet antioxydant du MitoTEMPO dans la mitochondrie (Ni *et al.*, 2016)

Dans un premier temps nous avons tout d'abord étudié l'effet du MitoTEMPO en conditions contrôle.

Nous avons ainsi pu constater que lorsque les cardiomyocytes sont incubés en présence de MitoTEMPO (de 2,5µM à 10µM) il n'y a aucun effet sur la mesure de la production de ROS en condition contrôle (Figure 55).

Les cardiomyocytes fraîchement isolés ont ensuite été incubés en présence de succinate avec des concentrations de MitoTEMPO allant de 2,5µM à 10µM. De même, nous n'avons remarqué aucune différence dans la mesure de la surproduction de ROS de notre modèle (Figure 56).

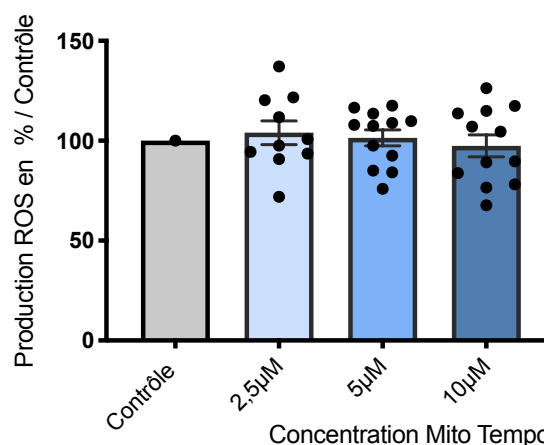


Figure 55 Production de ROS en fonction de la concentration de MitoTEMPO en absence de succinate

Les valeurs sont calculées en % par rapport à la condition contrôle de nos cardiomyocytes ; n=12  
Moyenne des valeurs en pmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéines : Contrôle = 91,71 ; 2,5µM = 95,74 ; 5µM=85,51 ; 10µM= 81,68 ; N=3 ; n=12

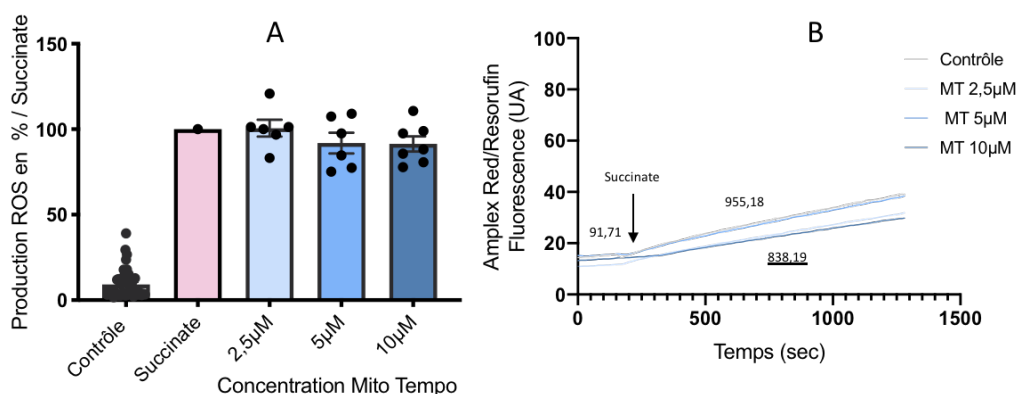


Figure 56 Production de ROS en fonction de la concentration de MitoTEMPO  
 A- Résultats de la production de ROS en présence de succinate  
 B- Traces directement extraites de l'appareil de mesure le Safas ; elles correspondent à un exemple de tracés obtenus dans cette expérience.  
 Les chiffres représentent la moyenne des valeurs en pmol d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par min par mg de protéines dans nos différentes conditions de l'ensemble de nos expérimentations. La valeur soulignée correspond à la moyenne des valeurs de la plus faible concentration d'antioxydant ; N=3 ; n=12

Cependant comme nous l'avons vu précédemment le MitoTEMPO mime l'effet de la superoxyde dismutase. Pour rappel, la superoxyde dismutase est une enzyme essentielle aux mécanismes d'élimination des radicaux libres. Elle transforme O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La sonde utilisée pour mesurer la production de ROS dans nos expérimentations est l'Amplex Red qui quantifie l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> présent dans notre solution. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 57, il paraît donc logique que nous ne mesurons aucune différence en présence de MitoTEMPO lors d'une surproduction de ROS.

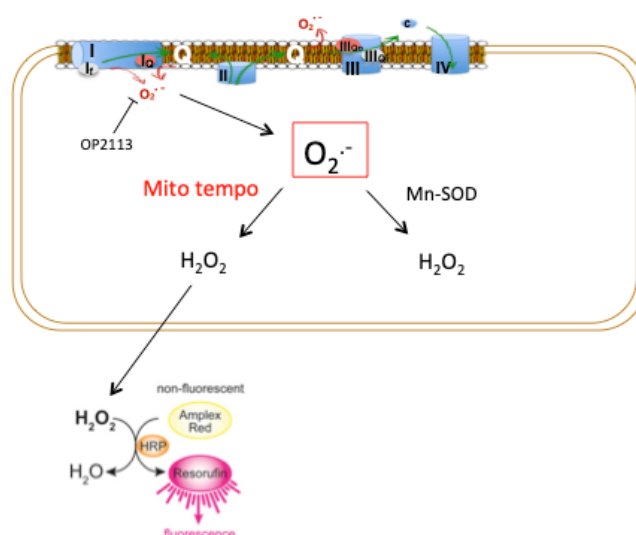


Figure 57 Étude de l'action du MitoTEMPO en présence de notre sonde Amplex Red



*b. EUK : un antioxydant qui combine l'effet de la SOD et de la catalase*

Grâce à une récente collaboration de l'équipe, nous avons pu obtenir la molécule EUK-207. L'EUK est une molécule ciblée sur la mitochondrie qui est à la fois SOD et catalase mimétique, qui transforme donc les superoxydes en peroxyde d'hydrogène puis en eau (Dai *et al.*, 2017). Cette molécule, qui interagit avec l'ensemble des ROS mitochondriaux, apparaissait pour cette étude comme une intéressante molécule de remplacement du MitoTEMPO.

L'effet de l'EUK sur des cardiomyocytes en condition contrôle est présenté dans la Figure 58. Il se traduit par une légère diminution de la production de ROS allant de 15% jusqu'à 27% en présence de la concentration d'EUK la plus forte (100µM).

Puis nous avons réalisé la même mesure dans un contexte de surproduction de ROS et donc en présence de succinate. Nous avons remarqué dans ces conditions une diminution de la production de ROS qui devient significative à partir de la concentration de 50µM. En présence de 100µM d'EUK on obtient une diminution de la production de ROS d'environ 45%. Nous avons donc choisi de continuer cette étude en utilisant la concentration de 50µM d'EUK par rapport aux résultats que nous avons obtenus et aux

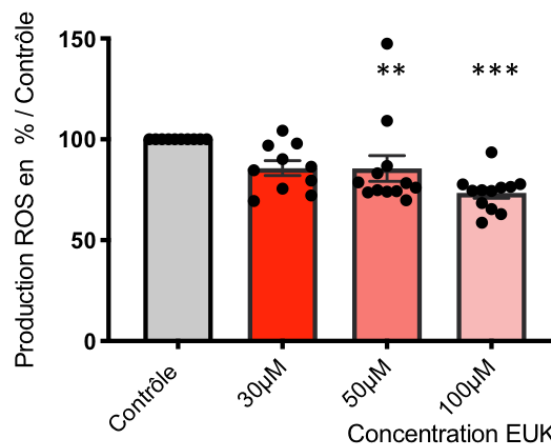


Figure 58 Production de ROS en fonction des concentrations d'EUK en condition contrôle \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  par rapport au condition contrôle ;  $n=12$

Moyenne des valeurs en pmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéines: Contrôle = 91,7; 30µM = 77,94; 50µM = 76,8; 100µM = 66,9;  $N=2$ ;  $n=12$ ; Kruskal-Wallis

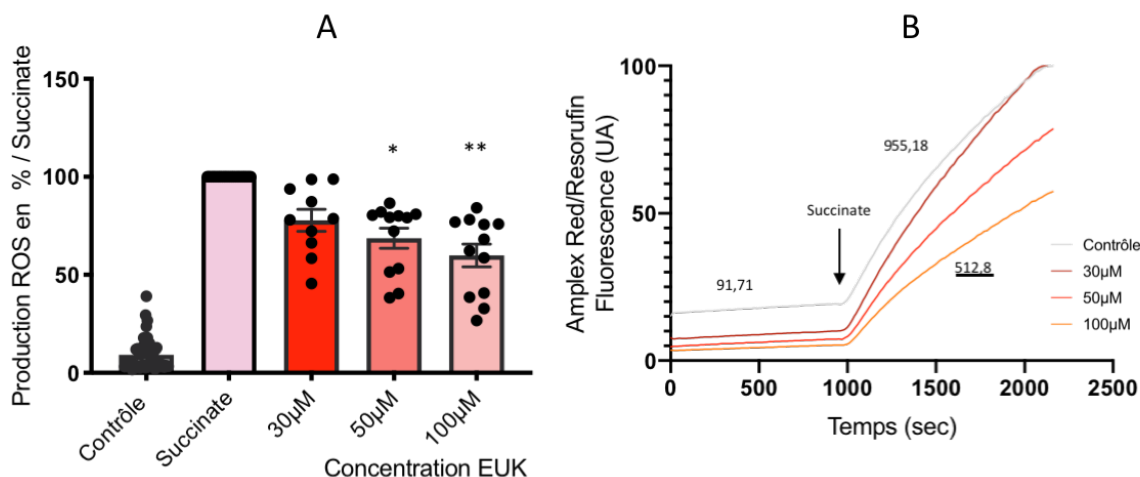


Figure 59 Production de ROS en fonction de la concentration d'EUK en présence de succinate \*  $p=0,02$ ; \*\* $p=0,0042$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  par rapport à la condition succinate ;  $N=2$ ;  $n=12$ ; Kruskal-Wallis

A- Résultats de la production de ROS

B- Traces directement extraites de l'appareil de mesure Safas ; elles correspondent à un exemple de tracés obtenus dans cette expérience

Les chiffres représentent la moyenne des valeurs en pmol d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par min par mg de protéines dans nos différentes conditions de l'ensemble de nos expérimentations

données issues de la littérature qui utilisent préférentiellement cet antioxydant à une concentration d'environ 50 $\mu$ M (Figure 59).

*c. OP2113 : un des premiers inhibiteurs spécifiques du site principal de production de ROS de la mitochondrie*

La molécule OP2113 (dont la formule est représentée en (Figure 60)) est déjà connue dans plusieurs pays comme la France, l'Allemagne et la Chine pour son augmentation de sécrétion salivaire chez des patients traités par rayons. Elle possède également des propriétés cholérétique (lors d'une insuffisance biliaire). L'anétholtrithion présente également des effets chimio protecteurs contre le cancer et plusieurs types de toxicités causées par des médicaments ou des xénobiotiques.

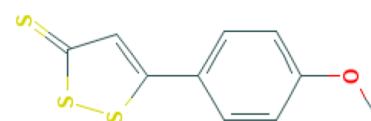


Figure 60 Formule chimique de la molécule OP2113 (Anétholtrithion, ou 5-(4-méthoxyphényl) dithiole-3-thione—CAS number 532-11-6

Cependant, jusqu'à ce que cette molécule ne soit étudiée par les D<sup>r</sup> Philippe Diolez et Dominique Detaille, aucun mécanisme d'action précis n'avait été établi pour cette molécule. Considérant son fort potentiel lipophile, la mitochondrie promettait d'être une cible intéressante pour OP2113. L'objectif du début de ma thèse a donc été de rejoindre l'étude de l'équipe de P. Diolez pour participer à l'analyse des effets de OP2113, et en particulier en ce qui me concerne de son métabolite OP2116 (maintenant breveté lui aussi), sur la mitochondrie et notamment la production de ROS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondriaux.

*OP2113, une molécule inoffensive pour la mitochondrie*

Nous avons donc étudié dans un premier temps l'impact de OP2113 sur la phosphorylation oxydative et l'intégrité mitochondriale des mitochondries isolées de cœur de rat. Cette étude a été réalisée en mesurant la consommation d'oxygène dans la cuve d'un oxygraphe thermostatée à 37°C (Oxygraph- 2K, Oroboros Instruments, Autriche).

Différentes combinaisons de substrats ont été testées (voir Figure 61). Trois substrats ont été testés : glutamate + malate (Figure 61-B), succinate (Figure 61-C) et enfin du glutamate+malate+succinate (Figure 61-D). Le malate est un des substrats d'une enzyme du cycle de Krebs, son apport permet donc de stimuler le cycle de Krebs afin de réduire le NAD<sup>+</sup> en NADH et fournir un électron à la chaîne de transport mitochondriale via le complexe I. L'ajout de glutamate augmente également l'apport de NADH. Le NADH va alors être réduit par le complexe I de la chaîne respiratoire, transférant les électrons aux ubiquinones. Quant à lui, le complexe II est étudié par ajout de succinate, substrat de la succinate-déshydrogénase (complexe II) en présence de roténone, inhibiteur du complexe I, qui prévient le transport réverse des électrons. Enfin, l'ajout simultané de substrats des complexes I et II permet d'étudier la phosphorylation oxydative dans des conditions plus proches de la physiologie.

La consommation d'oxygène mitochondriale est également déterminée à différents états respiratoires pour un même substrat. Les états respiratoires définis par (Chance & Williams, 1956) selon l'ordre d'addition des différents réactifs, sont les suivants :

- État mitochondrie seule
- État substrat
- État 3 : ajout d'ADP en quantité limitée, la vitesse de respiration est stimulée
- État 4 : l'ADP a été converti en ATP, la vitesse de respiration diminue. Cet état peut également être obtenu en bloquant la synthèse d'ATP par l'oligomycine (qui inhibe l'ATP synthase) ou l'atractyloside (ATR, qui inhibe le translocateur ATP/ADP).

En activant la synthèse d'ATP, l'ajout d'ADP provoque le retour des protons de l'espace inter membranaire vers la matrice mitochondriale, augmentant alors la vitesse de phosphorylation oxydative. L'ANT est ensuite inhibé par ajout d'atractyloside (ATR) afin d'arrêter la phosphorylation oxydative, addition qui permet également de vérifier l'intégrité de la membrane interne.

La Figure 61 présente les effets de la molécule OP2113 (5 à 30µM) sur la phosphorylation oxydative de mitochondries isolées de cœur de rat. En présence de Glutamate + Malate, nous n'observons aucune différence significative pour toutes les concentrations d'OP2113 entre les différents états de la mitochondrie. Nous observons le même résultat en présence de succinate

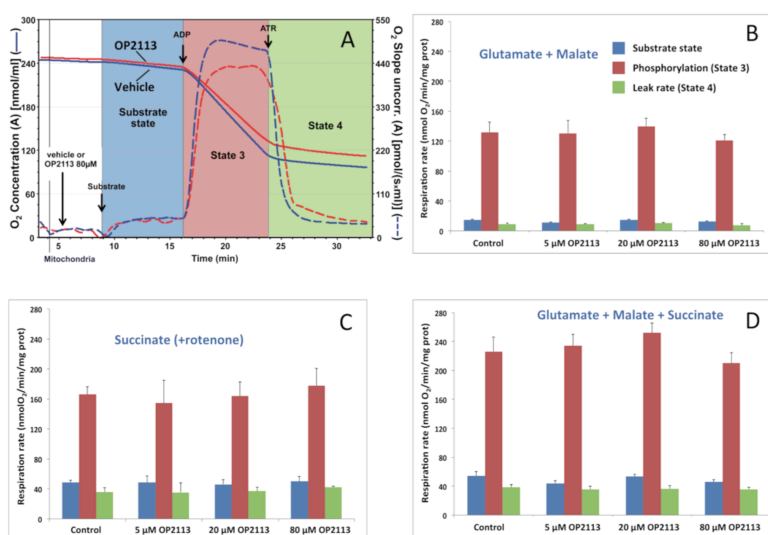


Figure 61 Étude de l'effet d'OP2113 sur la phosphorylation oxydative mitochondriale

La figure A représente une trace classique de consommation d'oxygène par les mitochondries isolées de cœur après une courte incubation en présence d'OP2113 (ligne rouge) ou de son véhicule (ligne bleue). Les 3 états mitochondriaux sont représentés : en bleu l'état substrat ou nous avons ajouté pour ce tracé du glutamate et du malate, en rouge l'état 3 (état phosphorylant) obtenu par ajout d'1mM d'ADP pour obtenir la vitesse de phosphorylation maximale. Enfin l'état 4 en présence d'ATR, qui inhibe le translocateur ADP/ATP, et correspond donc à l'état non phosphorylant.

La figure B correspond à l'ajout du Glutamate et du malate qui active le complexe I. la figure C au succinate (en présence de rotenone) qui active le complexe II, et la figure D dont les substrats glutamate, malate, et succinate activent les complexes I&II simultanément. (Figure provenant de (Detaillie et al, 2019)).

et rotenone (inhibition du complexe I, oxydation du complexe II) ainsi qu'en présence des trois substrats réunis. Il n'apparaît aucun changement de vitesse dû à l'ajout d'OP2113 même à des concentrations relativement élevées (80µM). Cela démontre que OP2113 ne présente aucun effet sur la phosphorylation oxydative mitochondriale, l'activité de la chaîne respiratoire ou l'intégrité de la membrane interne (absence de découplage). L'absence d'effet de OP2113 après l'ajout d'ADP nous permet de conclure que la synthèse d'ATP n'est pas troublé par cette molécule. Enfin l'inhibition du translocateur ANT nous permet d'en déduire que notre molécule ne perturbe pas l'intégrité de la membrane interne mitochondriale.

Inhibition spécifique de la production mitochondriale de ROS au site I<sub>Q</sub>

La production de ROS mitochondriaux par la chaîne respiratoire est entièrement dépendante de l'état énergétique mitochondrial. La production maximale de ROS est en effet obtenue quand le potentiel membranaire est élevé et que les quinones de la chaîne mitochondriale sont très réduites, donc dans des conditions de faible activité de phosphorylation oxydative (conditions obtenues précédemment en état 4 en présence d'ATR) (Yeong-Renn 2014);(Detaille et al, 2019). Dans ces conditions les ROS sont produits au niveau de différents sites de la chaîne mitochondriale. Deux sites se distinguent particulièrement, le site I<sub>Q<sub>0</sub></sub> du complexe I et le site III<sub>Q<sub>i</sub></sub> du complexe III (Quinlan et al., 2013). Pour une première étude de l'effet de OP2113 sur la production des ROS par la chaîne respiratoire, nous avons conçu l'expérience de l'étude des différents sites dont la représentation schématique est présentée dans la Figure 62. L'ajout de l'ensemble des substrats (Glutamate Malate Succinate) permet d'activer la chaîne au niveau du complexe I ainsi que du complexe II, conditions favorisant le transport reverse des électrons (Figure 62-A). L'ajout de roténone, inhibiteur spécifique du complexe I, inhibe la production de ROS au niveau du complexe I (Figure 62-B). Puis, pour l'étude de la production des ROS par le site III<sub>Q<sub>0</sub></sub>, nous ajoutons l'Antimycine A. L'Antimycine est un inhibiteur du site III<sub>Q<sub>i</sub></sub>, elle bloque le transfert des électrons entre le complexe III et le cytochrome c. On assiste ainsi à une augmentation

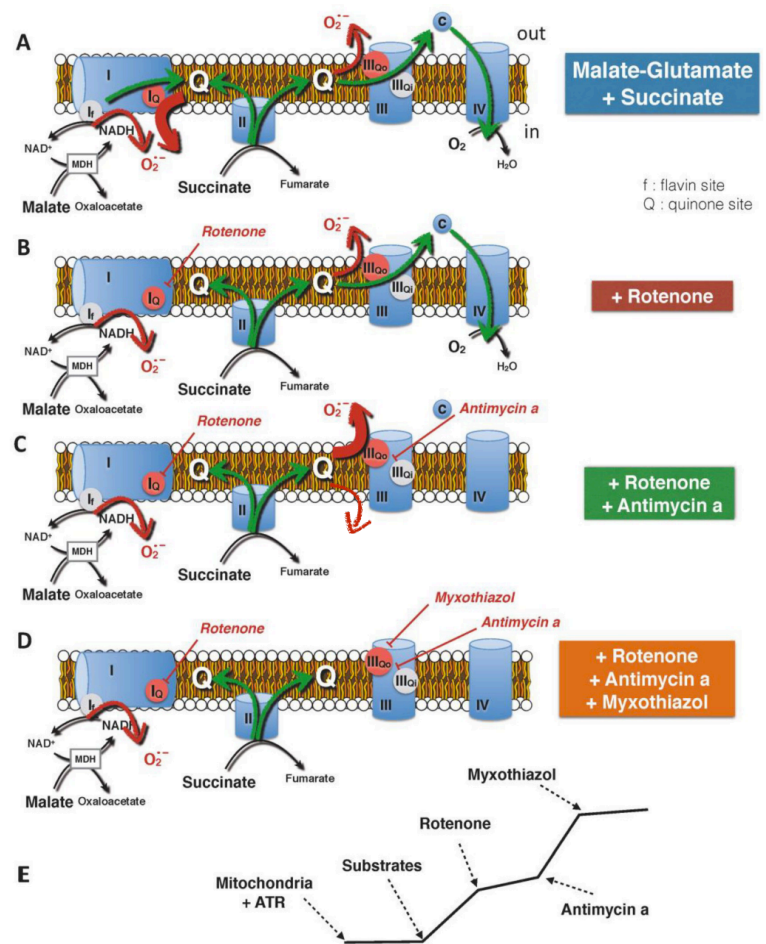


Figure 62 Sites principaux de la production de ROS dans les mitochondries isolées

Lorsque la chaîne respiratoire est stimulée par les substrats du complexe I et II (A) la production de ROS mitochondriale est due principalement au transport reverse des électrons. Les ROS issus du complexe I sont relargués du côté matriciel de la membrane interne. L'ajout de roténone (ROT) (B) diminue la production de ROS mitochondriaux en bloquant le site I<sub>Q</sub>, comme on peut le voir sur la courbe en (E), la production de ROS restante correspond à la production issue du complexe I<sub>f</sub> et III<sub>Q<sub>0</sub></sub>. Lorsque le complexe III est inhibé en présence d'antimycine (C) la production de ROS augmente, due à une réduction plus importante des quinones qui ne ont plus réoxydées par le cytochrome c. Finalement l'ajout de myxothiazol (l'inhibiteur spécifique du site III<sub>Q<sub>0</sub></sub> du complexe III) permet de bloquer la production de ROS du complexe III au niveau du site III<sub>Q<sub>0</sub></sub>, la production de ROS résiduelle est attribuée au site I<sub>f</sub> du complexe I (Figure provenant Detaille et al, 2019).

importante de la production de ROS au niveau de ce complexe III liée à une augmentation du taux de réduction des quinones (Figure 62-C).

Enfin l'ajout de Myxothiazol empêche la production de ROS du complexe III par l'inhibition du site III<sub>Qo</sub> (Figure 62-D). Dans ces conditions, la production très faible de ROS résiduelle proviendrait du site I<sub>F</sub> (Quinlan *et al.*, 2013).

Différentes concentrations d'OP2113 (5, 20, 50, 80µM) ont donc été testées sur la production de ROS dans ces conditions et les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 63). Le principal résultat que nous avons observé est la diminution largement significative de la production de ROS en absence de roténone. On remarque également que cette diminution semble atteindre son maximum à partir de 50µM d'OP2113. En présence de roténone, l'inhibiteur spécifique du complexe I OP2113, aurait tendance à légèrement diminuer la production de ROS, qui est déjà bien inhibée par la présence de roténone. Lors de l'ajout d'antimycine la production de ROS provient essentiellement du complexe III, et on constate également une très légère tendance en présence d'OP2113 à diminuer la production de ROS. Enfin la production de ROS en présence de myxothiazol ne varie pas en fonction des différentes concentrations d'OP2113. Ces résultats démontrent que OP2113 diminue significativement (approximativement de 80%) la production de ROS dans des conditions où le complexe I est le site majeur de production de ROS (en absence de roténone).

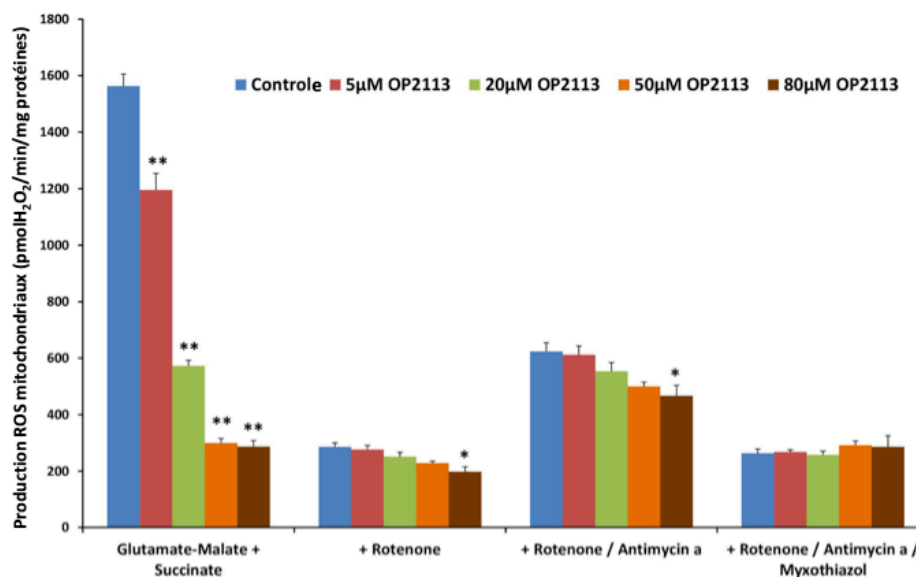


Figure 63 Étude de la production de ROS au niveau des différents sites de la chaîne respiratoire mitochondriale en fonction de la concentration d'OP2113

Le taux de production de ROS sur des mitochondries isolées de cœur de rat a été étudié en présence de 3 substrats : glutamate malate et succinate. En absence d'inhibiteur, la production de ROS est maximale et est principalement due au transport reverse des électrons au niveau du site IQ.

\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,005$  par rapport au groupe contrôle (Figure provenant Detaillé et al, 2019).

Pour une étude plus spécifique de l'effet de la molécule sur les sites de production de ROS de la chaîne respiratoire, nous nous sommes basés sur l'étude de Quinlan (Quinlan et al., 2013).

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 64, OP2113 inhibe spécifiquement et significativement la production de ROS du site I<sub>Q</sub> de la chaîne respiratoire mitochondriale. On ne remarque aucune différence au niveau des autres sites de production et notamment le site III qui est considéré comme le deuxième site principal producteur de ROS. L'IC<sub>50</sub> de la molécule OP2113, qui correspond à la concentration de molécule responsable d'une inhibition de 50% in vitro, est de 10,2 ± 0,9µM dans nos conditions expérimentales.

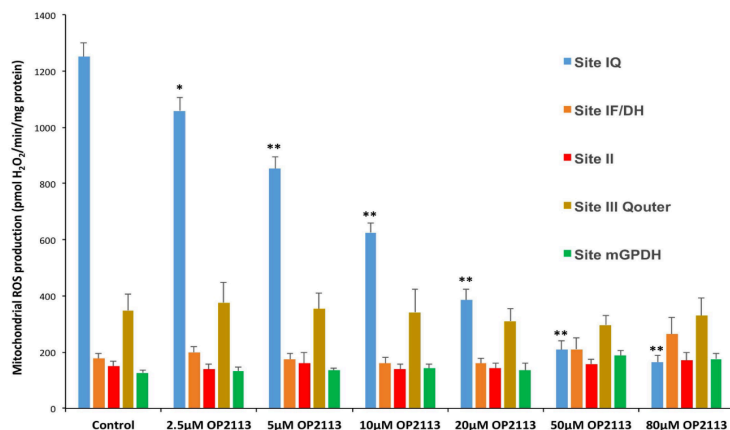


Figure 64 Effet spécifique de la molécule OP2113 sur les différents sites de production des ROS mitochondriaux

Le taux de production de ROS a été mesuré sous les conditions spécifiques décrits par (Quinlan et al., 2013), ce qui nous permet d'identifier spécifiquement les différents sites de production de la mitochondrie (voir le Matériel & Méthodes pour plus de détails). L'augmentation de la concentration d'OP2113 (de 2,5µM à 80µM) a été testée pour toutes les conditions de production de ROS. \*  $p < 0,01$  ; \*\*  $p < 0,005$  par rapport au groupe contrôle (Figure provenant Detaille et al, 2019).

### Étude du métabolite principal d'OP2113 : OP2116

Le terme de métabolisation fait référence à la transformation, par une réaction enzymatique d'un médicament, ici OP2113, en un ou plusieurs autres composés actifs ou inactifs au plan pharmacologique. Le foie est le site principal de la métabolisation des médicaments. Bien que la métabolisation inactive généralement les médicaments, certains métabolites sont pharmacologiquement actifs, parfois même plus actifs que la molécule initiale. Il était donc indispensable d'étudier les effets du principal métabolite de la molécule OP2113 qui a été nommé OP2116, lors du dépôt de brevet par OP2drugs.

L'ensemble des résultats sont reportés sur la Figure 65. Dans un premier temps nous avons étudié la production de ROS comme présenté dans la Figure 65-A, en présence de différentes concentrations d'OP2116 (10, 20, 50 et 80µM). On remarque que comme la molécule principale OP2113, le métabolite inhibe spécifiquement la production de ROS en condition succinate, et donc au niveau du complexe I par transport reverse des électrons. Cette inhibition est significative par rapport aux mitochondries en condition contrôle quelle que soit la concentration du métabolite utilisée. Nous avons pu remarquer également qu'en présence de roténone et d'antimycine la production de ROS aurait tendance à augmenter avec la concentration d'OP2116.



Par la suite nous avons déterminé l'IC<sub>50</sub> de l'effet de la molécule OP2116 sur la production de ROS au niveau du complexe I (condition succinate), qui est égale à 10µM (Figure 65-B) donc similaire à l'IC<sub>50</sub> d'OP2113. Enfin nous avons également mesuré l'impact de la molécule OP2116 sur la consommation d'oxygène sur des mitochondries isolées (Figure 65-C). Contrairement à OP2113, son métabolite aurait une légère tendance à diminuer la consommation d'oxygène en présence d'ADP, et à l'accélérer lors de l'ajout d'ATR.

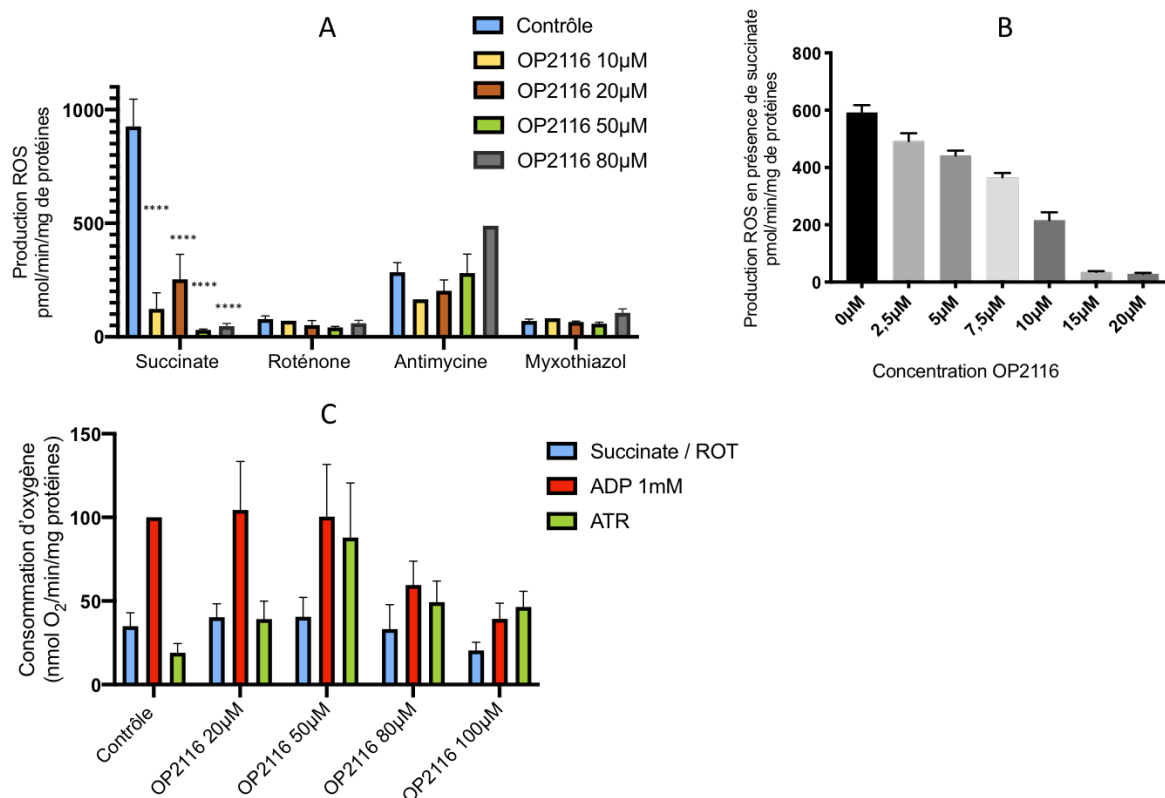


Figure 65 Étude de la production de ROS en présence de OP2116, principal métabolite de OP2113

A : Étude de la production de ROS au niveau des différents sites de la chaîne respiratoire mitochondriale en fonction de la concentration d'OP2116.

B : Étude de la production de ROS en présence de succinate pour déterminer l'IC<sub>50</sub> de la molécule OP2116

C : Étude de l'effet d'OP2116 sur la phosphorylation oxydative

L'ensemble de ces résultats ont donné lieu à la création de la startup OP2drugs, de 2 brevets (OP2113 et OP2116) et à une publication en 2019 (Detaillé et al, 2019).

En annexe, le papier qui a été publié dans Plos One en 2019. En plus des expérimentations présentées ici, l'équipe a également réalisé des expérimentations sur la protection d'OP2113 chez le modèle d'ischémie-reperfusion dans le cœur de rat ainsi qu'une étude préliminaire sur l'infarctus *in vivo* chez la brebis.

### Production de ROS dans notre modèle en présence d'OP2113

Sans surproduction de ROS (contrôle), nous n'avons pas noté de changement significatif pour les différentes doses d'OP2113 testées, peut-être peut-on relever une légère tendance à la diminution de la production de ROS mitochondriaux à partir de 30µM d'OP2113 (Figure 66).

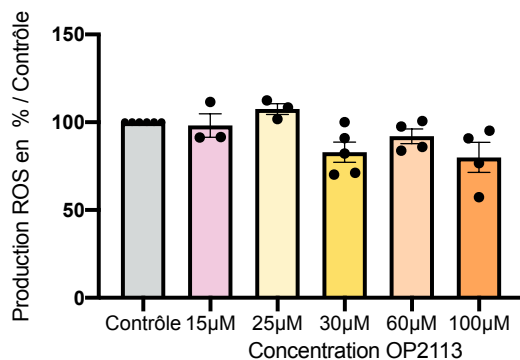


Figure 66 Production de ROS en fonction de la concentration d'OP2113 en condition contrôle

Moyenne des valeurs en pmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéines: contrôle = 91,7; 30µM = 77; 60µM=89,5; 100µM= 66,42  
N=4 ; n= 3-5;

Des concentrations d'OP2113 de 15 à 100µM ont donc été testées sur notre modèle de surproduction de ROS (Figure 67). Nous avons obtenu une diminution largement significative de la production de ROS en présence d'OP2113, particulièrement à partir de 30µM de concentration d'OP2113.

A partir de 15µM d'OP2113 nous avons obtenu une diminution de 14% de la production de ROS, cette diminution ne cessera de s'accroître jusqu'à notre concentration maximale 100µM qui entraîne une diminution maximale de plus de 80% par rapport aux conditions de surproduction de ROS. Nous pouvons tenter d'estimer la surproduction de ROS au niveau du complexe I en présence de succinate en considérant qu'en condition contrôle l'ajout de 100µM d'OP2113 supprime 25pmol d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg de protéines<sup>-1</sup> des ROS produits dans les cardiomyocytes et qu'en présence de succinate il en est de 672,41 pmol d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéines. Ce calcul rapide montre l'importance de la surproduction de ROS spécifiquement par le complexe I en présence de succinate (production multipliés par 26), ainsi que l'efficacité de la molécule OP2113.

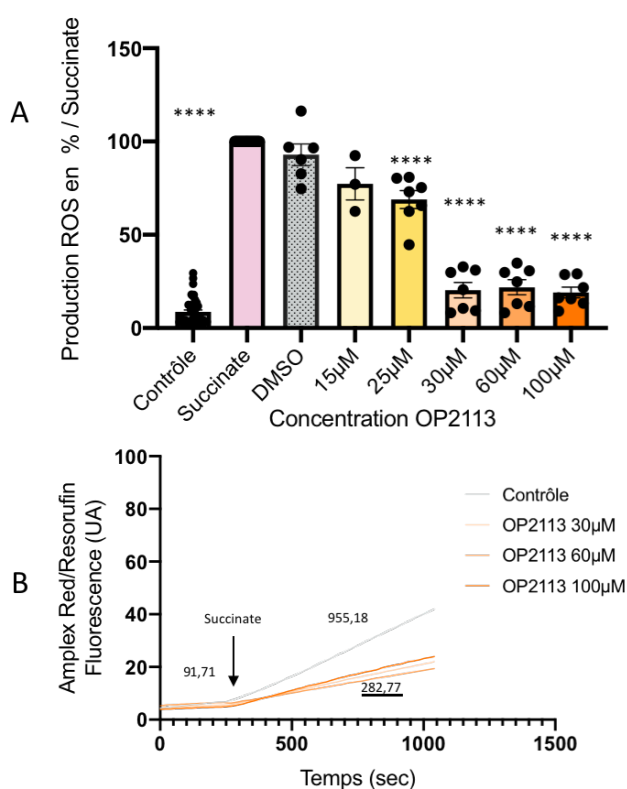


Figure 67 Production de ROS en présence de différentes concentrations d'OP2113

A- Résultats de la production de ROS en présence des différentes concentrations d'OP2113

B- Trace directement extraite de l'appareil de mesure le Safas ; elle correspond à un exemple de tracés obtenus dans cette expérience. Les chiffres représentent la moyenne des valeurs en pmol d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par min par mg de protéines dans nos différentes conditions de l'ensemble de nos expérimentations. La valeur soulignée correspond à la moyenne des valeurs de la plus faible concentration d'antioxydant.

N=4 ; n= 7 ; test statistique ANOVA \*\*\*\* p<0,0001 par rapport au succinate ;



Nous avons donc décidé pour nos futures expérimentations d'utiliser la concentration d'OP2113 à partir de laquelle on observe une diminution significative (75%) à savoir 30 $\mu$ M (Figure 67).

### III. L'effet de la modulation des ROS sur le couplage excitation-contraction

#### 1) Introduction

De nombreuses études ont montré le rôle des ROS dans le couplage excitation-contraction (Köhler *et al.*, 2014) ;(Zima & Blatter, 2006) ;(Santos *et al.*, 2011). Dans la plupart des cas, les cardiomyocytes étaient soumis à un stress oxydant par incubation en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Oda *et al.*, 2015) ;(Zhang *et al.*, 2019) ; (Wang, He, *et al.*, 2019). La majorité de ces travaux suggèrent que les ROS oxydent les groupements cystéine et méthionine présents dans les canaux cellulaires (Zima & Blatter, 2006). Les ROS modulent également différentes protéines kinases, notamment CamKII, PKA, PKC, qui vont à leur tour perturber la libération ou la recapture du calcium lors de la contraction et de la relaxation respectivement, ou agir au niveau des myofilaments du sarcomère (Santos *et al.*, 2011). En fonction du temps d'exposition et de la concentration de ROS présents ces modifications peuvent devenir irréversibles (Santos *et al.*, 2011). Les ROS les plus souvent impliqués dans les régulations pathologiques du couplage excitation-contraction sont ceux provenant de la NADPH oxydase, ou de la xanthine oxydase (Santos *et al.*, 2011). Néanmoins, la contribution des ROS d'origine mitochondriale dans la régulation des différents acteurs de la contraction n'est encore pas clairement définie.

#### 2) Objectifs

C'est dans l'objectif d'évaluer l'éventuelle implication des ROS mitochondriaux dans le couplage excitation-contraction que nous avons élaboré un protocole d'induction d'une surproduction mitochondriale de ROS par le succinate qui induit l'induction d'un flux réverse d'électrons. Ainsi, en utilisant cette stratégie expérimentale il devient possible d'étudier l'impact des ROS provenant du compartiment mitochondrial sur les acteurs du couplage excitation-contraction. C'est à cette fin que nous avons étudié le raccourcissement des sarcomères de cardiomyocytes dans différentes conditions de surproduction de ROS et sa modulation au moyen d'antioxydants, spécifiques ou non, des sites de production mitochondriaux.

#### 3) Mesure du raccourcissement des sarcomères

Dans ce chapitre nous tenterons d'établir comment les ROS modifient les paramètres du couplage excitation-contraction par enregistrement et analyse de la contraction et de la relaxation des cardiomyocytes isolés de cœur de rat battant contre une charge nulle. Pour rappel les paramètres étudiés avec le logiciel IONWIZARD sont détaillés dans la Figure 68 (voir Matériel & Méthodes). Nous avons constaté que l'analyse du cycle contraction relaxation effectuée par le logiciel IONWIZARD présente certaines limites. C'est la raison pour laquelle nous avons développé un script Python afin d'approfondir l'analyse de l'activité contractile des cardiomyocytes (Figure 69) (cf Matériel & Méthodes).

Nous disposons ainsi de deux méthodes pour mesurer la vitesse de contraction et de relaxation. La première (dérivée minimale du raccourcissement en contraction, ou maximale d'allongement en relaxation) ne tire parti que d'une information limitée dans le temps. La seconde (mesure de la vitesse au point d'inflexion de la courbe de relaxation) est plus délicate à mettre en œuvre mais apporte plus d'information et permet une analyse plus fine de la relaxation.

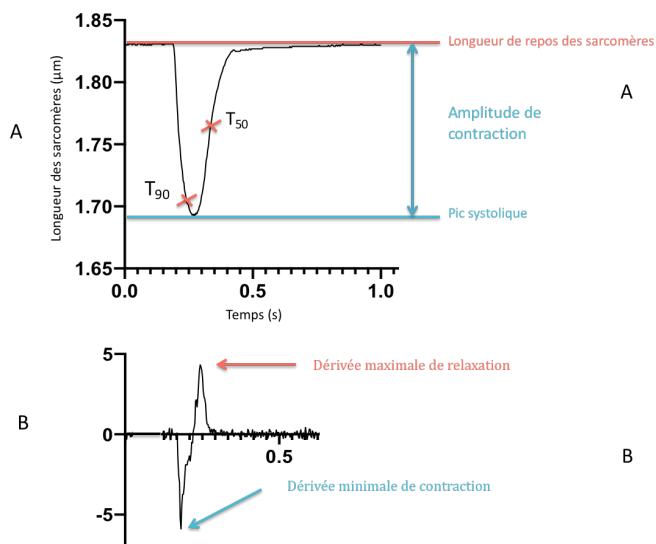


Figure 68 Analyse des paramètres de la contraction d'un cardiomyocyte isolé  
 A- Représentation des tracés montrant le raccourcissement d'un sarcomère ainsi que les paramètres mesurés.  
 B- Représentation des tracés de dérivées maximales et minimales obtenues à partir de la courbe présentée en A.

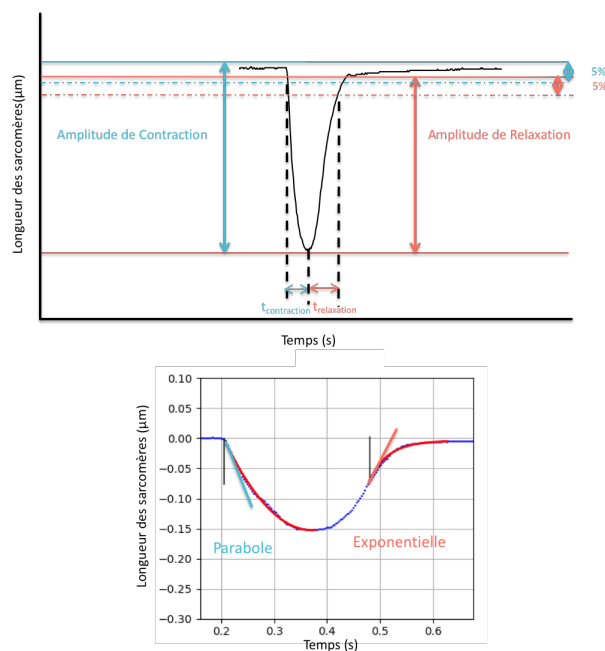


Figure 69 Analyse des paramètres contractiles d'un cardiomyocyte isolé avec PYTHON  
 A- Représentation des tracés montrant le raccourcissement d'un sarcomère ainsi que les paramètres mesurés  
 B- Représentation des fits paraboliques et exponentiels calculés respectivement sur le raccourcissement et la relaxation de la courbe A. Les tracés rouges reproduisent les fits paraboliques et exponentiels utilisés pour déterminer la constante de temps tau-1 ( $\tau$ ).

a. *Choix de la fréquence de contraction des cardiomyocytes*

Dans le cadre de la mise au point des conditions expérimentales, nous avons tout d'abord déterminé la fréquence de stimulation la plus adaptée pour l'étude de la contraction des cardiomyocytes. Notre objectif était d'obtenir l'amplitude de contraction la plus grande possible afin de créer les conditions les plus favorables à la mise en évidence d'un éventuel effet des ROS et/ou des antioxydants.

La Figure 70 montre que l'amplitude maximale de raccourcissement des cardiomyocytes a été obtenue pour une stimulation à la fréquence de 1 Hertz et une amplitude de 70V suffisante

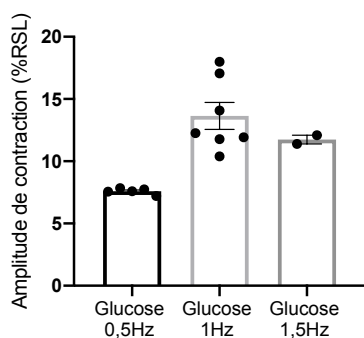


Figure 70 Mesure de la contraction de cardiomyocytes isolés à différentes fréquences de stimulation (Hertz) L'amplitude maximale de raccourcissement des cardiomyocytes incubés en présence de glucose à 37°C est obtenue à une fréquence de stimulation 1 Hz; N=3 ; n= 2-7

pour capturer les cardiomyocytes et déclencher leur contraction. Le voltage lors des expérimentations n'a pas été soumis à différents essais et la fréquence de 1 Hertz a été conservée dans le but de pouvoir comparer nos expérimentations avec celles réalisées au laboratoire.

*b. Influence d'une surproduction de ROS mitochondriaux sur les paramètres de la contraction*

Effet des médicaments sur la contraction et la relaxation des cardiomyocytes

La première étape de cette étude a été de vérifier l'effet de nos différentes molécules antioxydantes sur la contraction de cardiomyocytes isolés en l'absence de surproduction de ROS (condition contrôle). Ces

données sont représentées Figure 71 A-B.

On peut observer (Figure 71-A), qu'aucune des différentes molécules étudiées, qu'elle soit ou non spécifique du compartiment mitochondrial, ne provoque de modification de l'état de repos (diastole) des sarcomères évalués sur la base de leur longueur en fin de relaxation.

En revanche, en ce qui concerne la contraction (Figure 71-B) nous pouvons remarquer une discrète tendance de la molécule OP2113 (à la concentration de 30µM) à augmenter l'amplitude de contraction des cardiomyocytes isolés. Le Trolox, NAC et MitoTEMPO n'ont aucun effet mesurable sur l'amplitude du raccourcissement en conditions contrôle.

En revanche on observe qu'en présence de l'antioxydant EUK l'amplitude du raccourcissement est significativement plus faible que celle des cellules contrôles. Comme nous le verrons par la suite lors des mesures en présence de EUK les cellules ont eu tendance à développer des épisodes arythmiques.

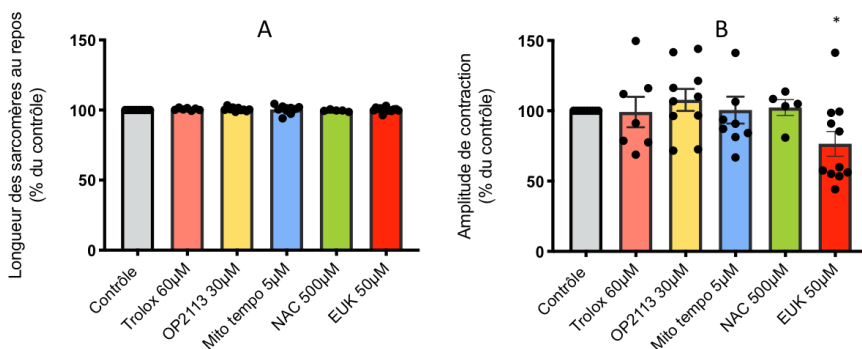


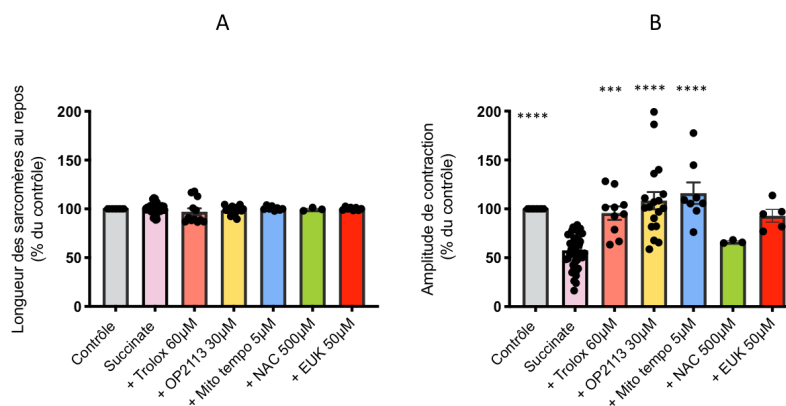
Figure 71 Paramètres de la fonction contractile des cardiomyocytes isolés de cœur de rat en condition contrôle

Le raccourcissement des sarcomères de cardiomyocytes isolés stimulés à 1 Hertz a été enregistré à 37°C. A : étude des antioxydants sur la longueur diastolique des sarcomères. B : étude de l'amplitude du raccourcissement des sarcomères ; logiciel IONWIZARD N=4 ; n= 5-11 ; Kruskal-Wallis.

Effet d'une surproduction de ROS sur la contraction et la relaxation des cardiomyocytes isolés de ventricule de rat

Figure 72 Paramètres de la fonction contractile des cardiomyocytes isolés du ventricule de rat en présence de succinate et des antioxydants

Le raccourcissement des sarcomères est enregistré à 37°C dans des cardiomyocytes stimulés à 1Hertz. Les effets des antioxydants sur la longueur diastolique des sarcomères (A) ainsi que sur l'amplitude de contraction des sarcomères ont été mesurés en présence de succinate, donc en condition de surproduction mitochondriale de ROS. logiciel IONWIZARD \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  par rapport au succinate; N = 20; n=3-44; Kruskal-Wallis.



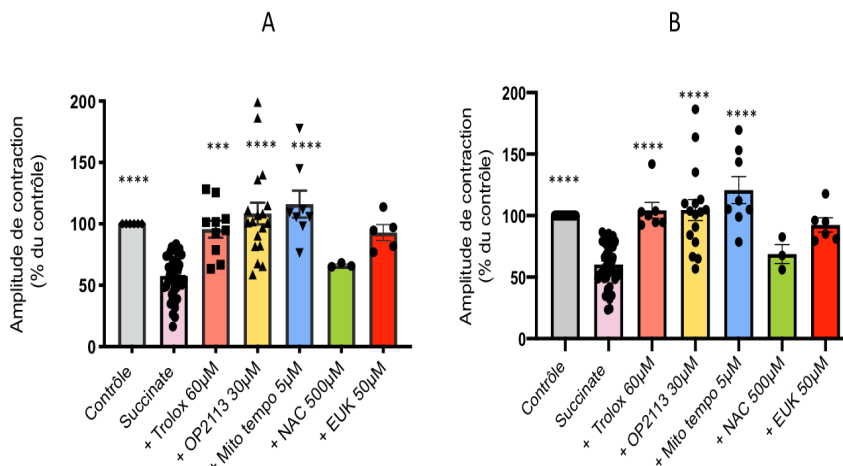
La Figure 72-A expose les résultats obtenus sur des cardiomyocytes soumis à une surproduction de ROS par ajout de succinate. Nous observons que ni le succinate seul, ni les différents antioxydants employés après induction de la surproduction mitochondriale de ROS par le succinate ne modifient la longueur de repos des sarcomères.

Les cardiomyocytes ont ensuite été stimulés en présence de succinate. Nous observons que la surproduction mitochondriale de ROS induite par le succinate est associée à une diminution de 40% de l'amplitude du raccourcissement (Figure 72-B). Cet effet est totalement aboli par le MitoTEMPO et OP2113. Ce résultat suggère que la diminution de l'amplitude de contraction induite par le succinate est dépendante de la production mitochondriale de ROS. Le Trolox, qui ne s'accumule pas dans les mitochondries, inhibe également la diminution de l'amplitude de contraction induite par le succinate. Cette observation suggère que l'inhibition de l'amplitude de contraction induite par les ROS d'origine mitochondriale requiert que ces derniers diffusent du compartiment mitochondrial vers le cytosol. L'antioxydant NAC, quant à lui, n'abolit pas l'effet du succinate. Ce résultat est surprenant. Il suggère que, dans nos conditions expérimentales, la NAC ne pénètre pas suffisamment au sein du cardiomyocyte isolé pour produire un effet ou que les effets délétères des ROS d'origine mitochondriale sur les différents acteurs du couplage excitation-contraction ne sont pas sensibles aux propriétés antioxydantes de la NAC. Pour finir, EUK induit une abolition partielle de l'effet du succinate. Nous verrons plus loin que cet effet partiel peut être expliqué, au moins en partie, par un effet proarythmogène d'EUK.

Des résultats similaires ont été obtenus lorsque les données ont été traitées par le logiciel IONWIZARD ou par le code PYTHON (Figure 73).

En présence de succinate, donc lors d'une surproduction mitochondriale de ROS, l'amplitude du raccourcissement est significativement diminuée et cet effet est aboli par l'ajout des différents antioxydants, à l'exception de NAC.

Figure 73 Comparaison de l'amplitude de contraction calculée grâce au logiciel IONWIZARD ou via notre propre méthode de mesure. L'amplitude de contraction est calculée dans le cas de IONWIZARD (A) en % par rapport à la longueur de l'état de repos du sarcomère. Avec le script PYTHON l'amplitude de contraction est calculée en faisant la différence entre le pic de contraction et la longueur de repos des sarcomères. \*\*\*  $p < 0,0007$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; par rapport au succinate N = 20; n=3-44; Kruskal-Wallis.



Afin d'illustrer directement l'effet du succinate et des antioxydants nous avons superposé sur une même figure (Figure 74) les trois amplitudes de contraction d'un cardiomyocyte.

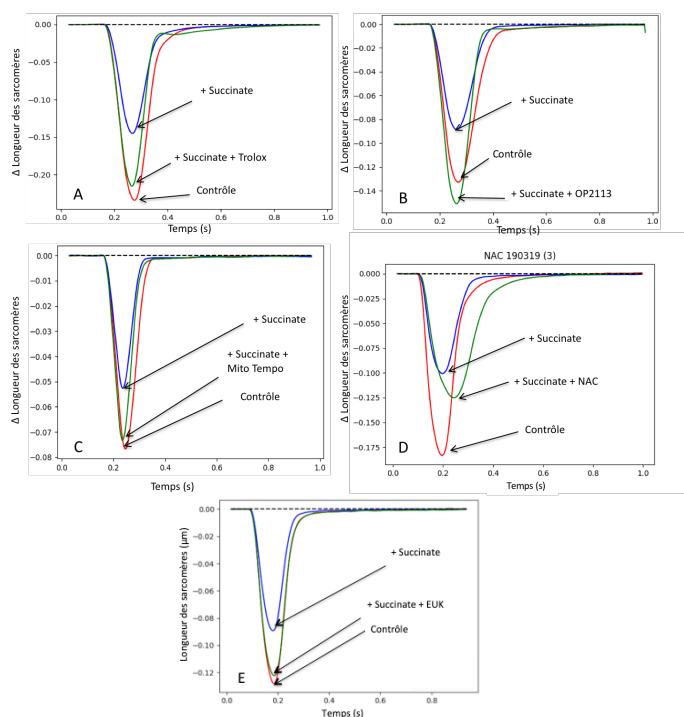


Figure 74 Raccourcissement des sarcomères en présence de succinate et des différents antioxydants

Pour rappel l'amplitude de contraction des sarcomères de cardiomyocytes isolés stimulés à 1Hertz est enregistrée à 37°C. Les traces ont été obtenues grâce au code PYTHON que nous avons créé. Pour une meilleure compréhension des effets des antioxydants les courbes ont été superposées, lissées et normalisées à la ligne de base (valeur 0) afin d'optimiser la visualisation des effets des différentes conditions expérimentales sur la contraction des cardiomyocytes isolés. Les cinq antioxydants sont présentés : A, Trolox; B, OP2113; C, MitoTEMPO; D, NAC; E, EUK. Chaque trace est représentative de l'ensemble des traces que nous avons pu obtenir. En rouge l'état contrôle; les cellules sont incubées dans une solution physiologique de Tyrode supplémentée par 10 mM de D-Glucose; en bleu les cellules sont incubées dans la solution Tyrode supplémentée par 5 mM de succinate; en vert les cellules sont incubées dans la solution de Tyrode supplémentée par 5 mM de succinate en présence des différents antioxydants.

Analyse des profils de contraction et de relaxation

Par la suite des mesures ont été réalisées pour calculer le temps pour atteindre 90% du pic de contraction ( $T_{pic}$ ), ainsi que 50% du retour à l'état de base des sarcomères ( $T_{50}$ ).

Une analyse plus approfondie des cinétiques de raccourcissement et de relaxation a été réalisée par des mesures du délai d'obtention de 90% du pic de contraction ( $T_{90}$ ) et du délai d'obtention de 50% du retour à la longueur maximale des sarcomères lors de la relaxation ( $T_{50}$ ).

Pour ce qui concerne  $T_{90}$  (Figure 75-A), on observe qu'il décroît ( $p=0,0567$ ) en condition de surproduction mitochondriale de ROS (en présence de succinate). Il convient de noter que l'effet de la surproduction de ROS sur  $T_{90}$  est moins marqué que celui observé sur l'amplitude

de contraction et que MitoTEMPO et OP2113, qui corrigent la diminution de l'amplitude de contraction induite par la surproduction mitochondriale de ROS, n'ont pas d'effet sur la cinétique de la contraction. Ces résultats suggèrent que les ROS, possiblement *via* une diminution de la libération de calcium lors de la systole, diminuent la formation de ponts actine-myosine (diminution de l'amplitude du raccourcissement).

Pour ce qui concerne  $T_{50}$  (Figure 75-B) on observe également sa décroissance en condition de surproduction mitochondriale de ROS (en présence de succinate). Cet effet est le témoin d'une relaxation plus rapide. À l'exception de NAC et de EUK (qui ne corrigent pas la diminution du raccourcissement induite par le succinate), les antioxydants maintiennent une vitesse de relaxation rapide.

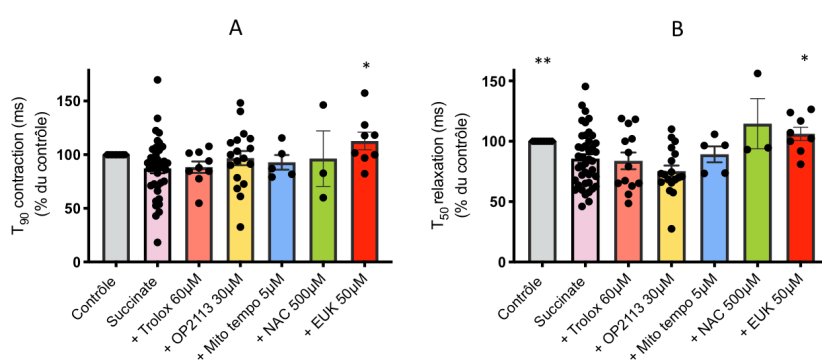


Figure 75 Paramètres de la fonction contractile classiquement étudiés lors d'une stimulation d'un cardiomyocyte de ventricule de rat avec IONWIZARD. Deux paramètres ont été analysés lors de la contraction des sarcomères stimulés à 1H. A: délai d'obtention de 90% du pic de contraction des sarcomères. B: délai de retour à 50% de la longueur de repos des sarcomères. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p = 0,007$  par rapport au succinate.  $N = 20$ ;  $n = 3-44$ ; Kruskal-Wallis.

Nous avons ensuite étudié plus en détail la cinétique de la contraction et de la relaxation des cardiomyocytes par le calcul des vitesses minimales ( $dI/dt_{min}$ ) et maximales ( $dI/dt_{max}$ ) des phases de contraction et de relaxation respectivement. On observe que la dérivée minimale (vitesse de raccourcissement) et la dérivée maximale (vitesse de relaxation) décroissent significativement en condition de surproduction mitochondriale de ROS induite par ajout de succinate (Figure 76). Ces effets sont abolis en présence de OP2113 et de MitoTEMPO, deux antioxydants ciblant les ROS mitochondriaux. Le Trolox, quant à lui, dont on a vu qu'il restaurait l'amplitude de contraction préalablement réduite par le succinate, ne restaure ni la vitesse de raccourcissement, ni la vitesse de relaxation. Les résultats obtenus sur la dérivée minimale suggèrent que, au-delà de la diminution de la formation des ponts actine-myosine évoquée

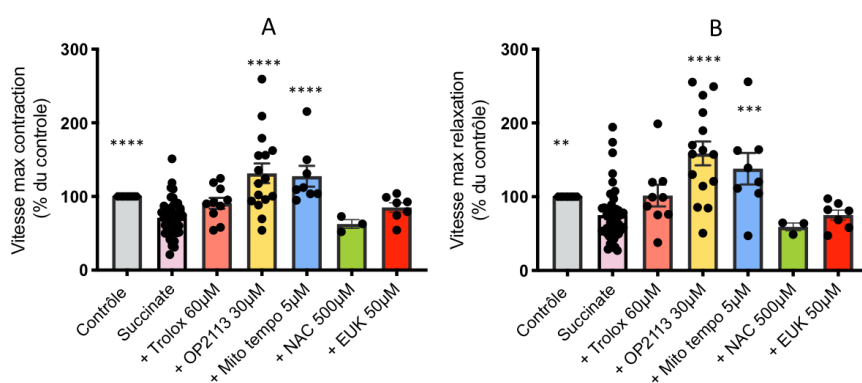


Figure 76 Vitesses maximales de contraction et de relaxation IONWIZARD

Le logiciel nous donne accès aux dérivées dans le temps du raccourcissement et de la relaxation des cardiomyocytes isolés ( $-dI/dt_{max}$  lors de la phase de raccourcissement, dérivée min (A) et  $dI/dt_{max}$  lors de la relaxation, dérivée max (B)) obtenues à partir des traces de contraction-relaxation dont des exemples sont donnés figure 80. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparé au valeur de succinate.  $N = 20$ ;  $n = 3-44$ ; ANOVA.

plus haut, les ROS diminuent également la vitesse du cycle actine myosine, et que ces effets sont corrigés par les antioxydants ciblant les ROS mitochondriaux. Les résultats obtenus sur la dérivée maximale suggèrent quant à eux que les ROS d'origine mitochondriale ralentissent la recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique et/ou le détachement des ponts actine-myosine. Ces effets peuvent faire intervenir des effets directs au niveau des ATPases ou des effets indirects *via* une diminution de la disponibilité en ATP ou une diminution de l'énergie libre de l'hydrolyse de l'ATP. Tous ces effets seraient, *a priori*, corrigés par les antioxydants ciblant la production mitochondriale de ROS.

La Figure 77 présente les estimations des vitesses de contraction et de relaxation ( $\tau^{-1}$ ) calculées à partir des « fits » réalisés par notre script. On remarque que les résultats sont semblables à ceux de la vitesse de relaxation, à deux exceptions près. En effet, on observe une diminution significative de la vitesse de contraction en condition de surproduction de ROS en présence de succinate (Figure 77-A). OP2113 restaure totalement la vitesse de contraction. On observe également une diminution significative de  $\tau^{-1}$  en condition de surproduction de ROS (en présence de succinate) (Figure 77-B). Cette altération de la vitesse de relaxation induite par le succinate est corrigée après ajout d'un antioxydant, à l'exception de NAC. Notre script semble donc être plus précis que l'analyse réalisée avec Ionwizard et nous donne donc des informations importantes pour la compréhension du mécanisme d'action des ROS mitochondriaux sur le couplage excitation-contraction.

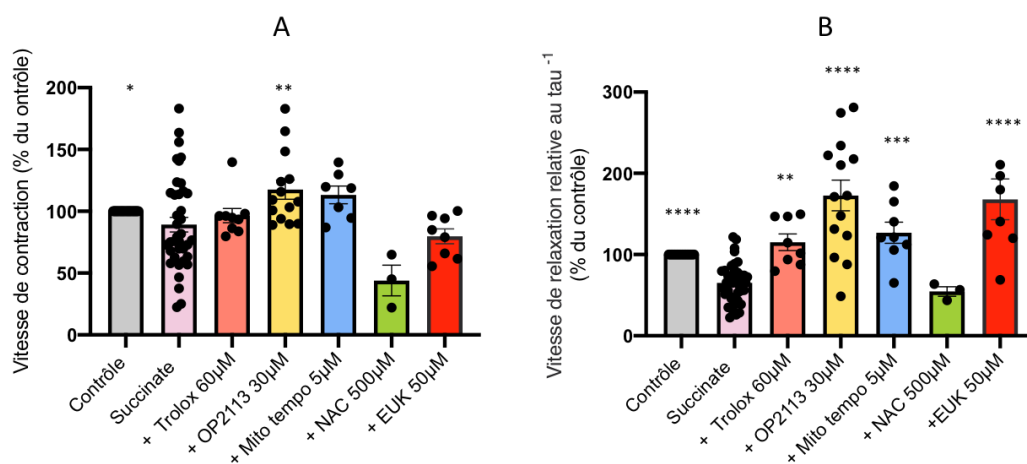


Figure 77 Vitesses de contraction et relaxation obtenues avec le script Python

Le script établi au laboratoire nous permet d'avoir les estimations des vitesses de contraction (A) et de relaxation ( $\tau^{-1}$ ) (B) calculées à partir des fits (cf. M&M). \* $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  par rapport aux valeurs de succinate

N=20 ; n=3-44 ; Kruskal-Wallis



*c. Probabilité de développer un événement arythmique en présence de nos différents antioxydants*

En utilisant l'antioxydant EUK nous avons remarqué une augmentation de l'occurrence d'arythmie des cardiomyocytes ventriculaires (Figure 78). Nous avons donc étudié la probabilité de développer des arythmies en présence des différents antioxydants. Cette étude indique que nos conditions de surproduction de ROS ne déclenchent que très peu d'arythmies (-50%). Nous n'enregistrons aucun épisode arythmique après ajout de Trolox et OP2113 ou de NAC. En revanche, la probabilité d'occurrence d'une arythmie augmente considérablement après ajout d'EUK, condition dans laquelle elle atteint 0,6. Nous avons également observé qu'EUK induisait également des arythmies en l'absence de succinate (données non montrées ici).

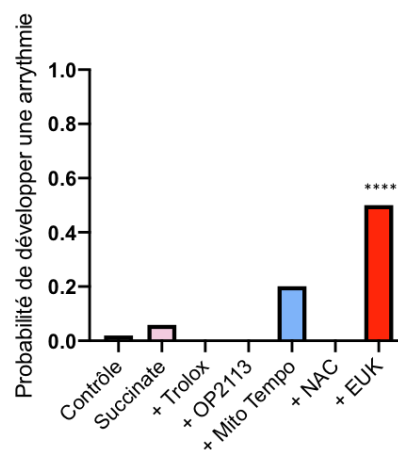


Figure 78 Probabilité de développer des arythmies en conditions de surproduction de ROS

Au cours des expérimentations, nous avons pu observer ponctuellement l'apparition d'événements arythmiques. Ces événements ont été comptabilisés, puis la probabilité d'apparition d'un événement arythmique a été calculée (N=20 ; n = 3-44 ; Kruskal-Wallis)

4) Mesure du transitoire calcique

Afin d'analyser les résultats obtenus via l'acquisition de traces de contraction-relaxation, nous avons poursuivi notre étude par l'étude du transitoire calcique lors de la contraction dans nos différentes conditions expérimentales. En effet, les expériences dont nous venons de présenter les résultats montrent que la stimulation de la production mitochondriale de ROS s'accompagne de modifications de la fonction mécanique des cardiomyocytes. Ainsi, la suite logique de ce travail a consisté en l'étude des effets de la production de ROS sur l'homéostasie calcique intracellulaire des cardiomyocytes. Pour rappel, les paramètres étudiés avec le logiciel IONWIZARD ainsi qu'avec notre script PYTHON sont représentés dans la Figure 79 (voir Matériel & Méthodes).

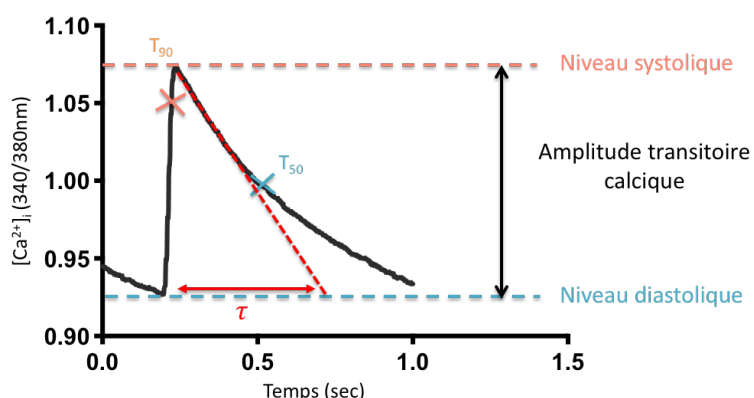


Figure 79 Paramètre étudié pour la mesure du transitoire calcique sur IONWIZARD et PYTHON

De nouvelles expérimentations ont été réalisées pour étudier l'impact des ROS mitochondriaux sur le transitoire calcique. Les paramètres étudiés sont les suivants : l'amplitude du transitoire calcique et donc par conséquent, le pic systolique et le pic diastolique, le temps pour atteindre 90% du pic et le temps pour atteindre 50% du retour au niveau diastolique.



*a. Préambule : Étude des effets des sondes calciques sur la contraction*

La majorité des études mesurant l'évolution du transitoire calcique pendant la contraction des cardiomyocytes isolés chez le rongeur utilise la sonde Fura2AM. Cette sonde présente l'avantage d'être ratiométrique. Cette particularité fait que l'amplitude du signal mesuré n'est pas une fonction de la qualité de la charge de la sonde fluorescente dans le compartiment cytosolique. Nous avons donc, en première approche, utilisé cette sonde pour nos expérimentations. Dans un premier temps nous avons étudié si la sonde Fura2AM induisait une production de ROS. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 80, cette sonde, lorsqu'elle est appliquée à une concentration de 2  $\mu\text{M}$  pour charger les cellules ne stimule pas la production de ROS. Il n'apparaît aucune différence significative sur la production de ROS entre des cellules contrôle et des cellules incubées en présence de Fura2AM. En revanche, alors que cette sonde présente l'avantage de ne pas avoir de toxicité cellulaire, son affinité élevée pour les ions calcium se traduit par un effet tampon significatif. Cet effet tampon se traduit expérimentalement, comme le montre la Figure 81 par une diminution significative (-40%) du raccourcissement sarcomérique préjudiciable dans le cadre de notre étude. Afin de contourner ce problème technique, nous avons finalement opté pour l'utilisation de la sonde calcique fluorescente Fura4-AM dont la constante de dissociation pour le calcium est deux fois plus faible que celle du Fura2-AM. Comme le montre la Figure 81, l'emploi de Fura4AM n'engendre pas de diminution mesurable de l'amplitude de la contraction.

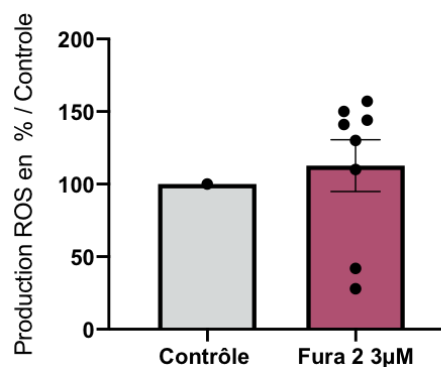


Figure 80 Étude de la production de ROS en présence de sonde calcique Fura 2AM utilisée pour les mesures du transitoire calcique La production de ROS en présence de la sonde Fura2AM a été étudiée à l'aide de la sonde Amplex red (cf. M&M) ; N=2 ; n=8

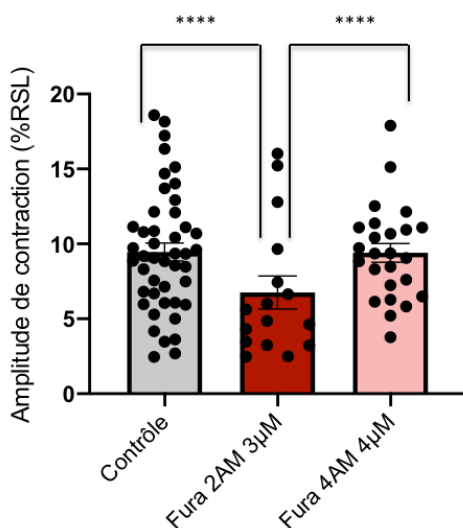


Figure 81 Comparaison de 2 sondes calciques sur le raccourcissement des sarcomères L'amplitude de contraction a été mesurée en présence de Fura2AM et Fura 4AM. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  par rapport à Fura2AM Valeurs moyenne contrôle : 9,69 $\mu\text{M}$  ; Fura 2AM 6,75 $\mu\text{M}$  ; Fura4AM 10,15 $\mu\text{M}$  N=6 ; n=16-45; Kruskal-Wallis.

Au vu de l'absence d'effet de la NAC (500µM) sur la production de ROS ainsi que sur le raccourcissement des sarcomères dans nos conditions, cet antioxydant n'a pas été étudié pour l'analyse de l'évolution du transitoire calcique.

*b. Effet des antioxydants sur le transitoire calcique en condition contrôle*

Nous avons, en première approche, étudié l'effet des différents antioxydants, utilisés seuls, sur le transitoire calcique des cardiomyocytes isolés lors de leur contraction afin de nous assurer qu'ils n'avaient pas d'effet *per se* sur ce paramètre. Les données sont représentées dans la Figure 82. On observe que les différents antioxydants employés n'ont pas d'effet significatif sur l'amplitude du transitoire calcique.

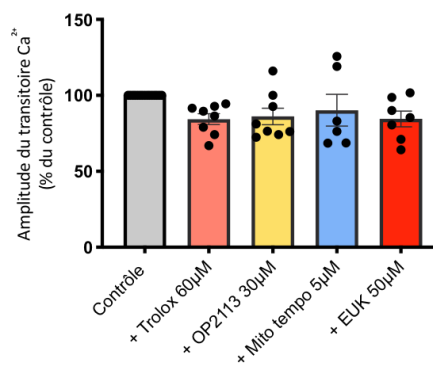


Figure 82 Amplitude du transitoire calcique en condition contrôle

Les transitoires Ca<sup>2+</sup> sont enregistrés à 37°C dans des cellules chargées au Fura-4 et stimulées à 1 Hz. Les données sont calculées à partir du logiciel IonWizard ; N=3 ;n=8

*c. Effet d'une surproduction de ROS sur le transitoire calcique*

Dans la Figure 83 est présenté l'ensemble des paramètres du transitoire calcique étudiés par le logiciel Ionwizard. On observe que l'amplitude du transitoire calcique est significativement diminuée (-30%) en condition de surproduction mitochondriale de ROS par ajout de succinate (Figure 83-A). Ce résultat est en cohérence avec la diminution du raccourcissement des sarcomères observés en présence de succinate (Figure 72-B). Néanmoins, le succinate ne modifie pas les paramètres cinétiques du transitoire, à savoir le T<sub>90</sub>, le T<sub>50</sub> ou la vitesse de décroissance du transitoire calcique (Figure 83-B,C et D).

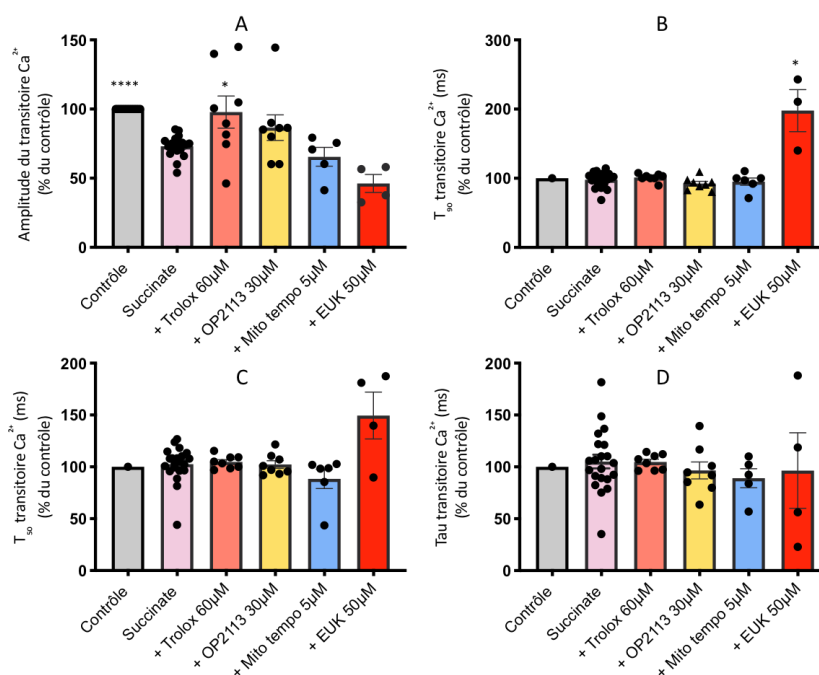


Figure 83 Paramètres des transitoires calciques des cardiomyocytes isolés du ventricule de rat calculés à partir de IONWIZARD Les transitoires Ca<sup>2+</sup> sont enregistrés à 37°C dans des cellules chargées au Fura-4 et stimulées à 1 Hz. Les données sont calculées à partir du logiciel IonWizard.

N=9 ;n=24 ; Kruskal-Wallis \*\*\*\* p<0,0001 par rapport au succinate.

On observe que Trolox et OP2113, contrairement à MitoTEMPO et EUK, corrigent la diminution de l'amplitude du transitoire induite par le succinate (Figure 83-A). Ce résultat est en cohérence avec le fait que la diminution du raccourcissement des sarcomères observés en présence de succinate est corrigée par le Trolox et OP2113 (Figure 72-B). Nous faisons l'hypothèse que l'absence d'effet de MitoTEMPO puisse être due à une interaction entre la sonde Fura4AM et MitoTEMPO qui pourrait abolir son effet d'antioxydant (*cf.* Méthodes).

A l'instar des effets d'EUK sur le raccourcissement sarcomérique déjà décrits, on observe, en présence de l'antioxydant EUK, une diminution de l'amplitude du transitoire calcique (Figure 83-A) ainsi qu'une augmentation de  $T_{90}$  (Figure 83-B) et  $T_{50}$  (Figure 83-C).

Enfin Trolox, OP2113 et MitoTEMPO n'ont aucun effet significatif sur  $T_{90}$  (Figure 83-B) ou  $T_{50}$  (Figure 83-C) et le tau (Figure 83-D).

Afin d'affiner notre analyse de l'homéostasie calcique dans nos différentes conditions expérimentales, les concentrations calciques moyennes intracytosoliques pendant les phases systoliques et diastoliques ont été calculées. La Figure 84 présente une synthèse des résultats. Cette analyse montre que la diminution de l'amplitude maximale du transitoire calcique s'accompagne d'une diminution significative de la concentration calcique systolique (Figure 84-A) dans le groupe succinate en comparaison au groupe contrôle. Cette effet semble en revanche indépendant de la concentration diastolique en  $Ca^{2+}$  intracellulaire.

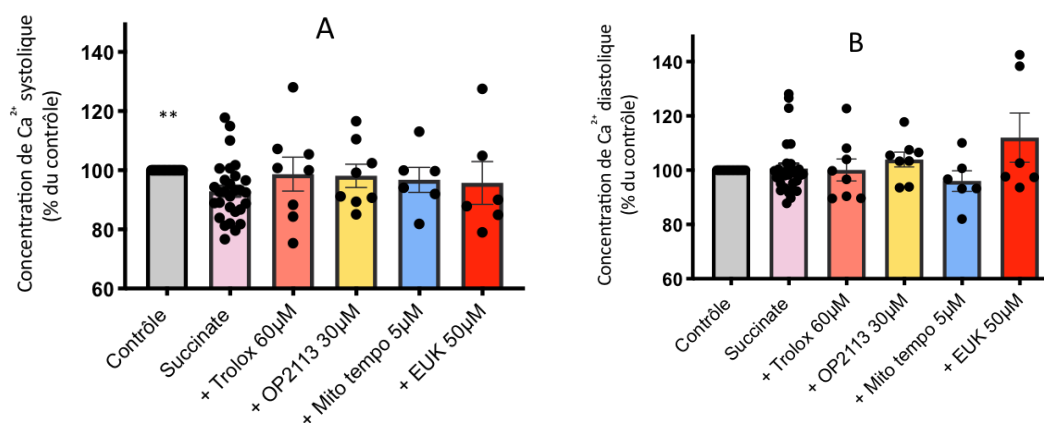


Figure 84 Étude de la concentration de calcium systolique et diastolique

Les transitoires  $Ca^{2+}$  sont enregistrés à 37°C dans des cellules chargées au Fura-4 et stimulées à 1 Hz. Les données sont calculées à partir du logiciel IonWizard. Les concentrations systolique (A) et diastolique (B) sont calculées à partir du pic systolique et diastolique respectivement N=9 ; n=24 ; Kruskal-Wallis \*\* p<0,01 par rapport au succinate.

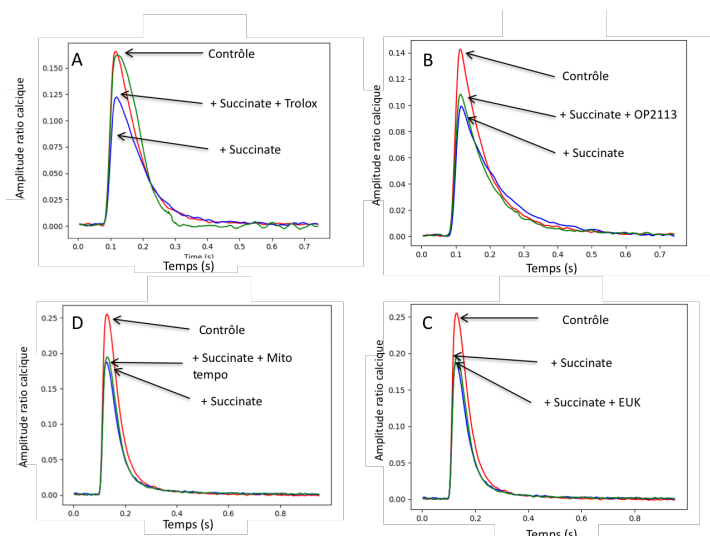
Pour mieux illustrer l'effet du succinate et des antioxydants nous avons superposé sur une même figure (voir Figure 85) les 3 transitoires calciques d'un cardiomyocyte lors de sa contraction après normalisation à la ligne de base et lissage.

Figure 85 Amplitude du transitoire calcique dans nos différentes conditions

En rouge, la trace moyenne enregistrée en condition contrôle sur des cellules incubées par une solution Tyrode supplémentée par du glucose. En bleu, la trace moyenne enregistrée dans le groupe succinate ; en vert, la trace moyenne enregistrée dans les différents groupes, sur des cellules perfusées par une solution Tyrode supplémentée par l'une des différentes drogues aux propriétés antioxydantes.

Sont représentés de gauche à droite et de haut en bas: le Trolox, OP2113, MitoTEMPO, et EUK.

Chaque figure est représentative de l'ensemble des traces que nous avons pu obtenir. Les courbes ont été lissées (par le script Python) pour permettre une meilleure lecture des différents effets.



La Figure 86 montre les résultats des mesures de l'amplitude maximale du transitoire calcique calculées soit à l'aide de IonWizard (Figure 86-A), soit par l'intermédiaire du script développé sous Python (Figure 86-B). La comparaison des résultats des deux analyses ne montre aucune différence.

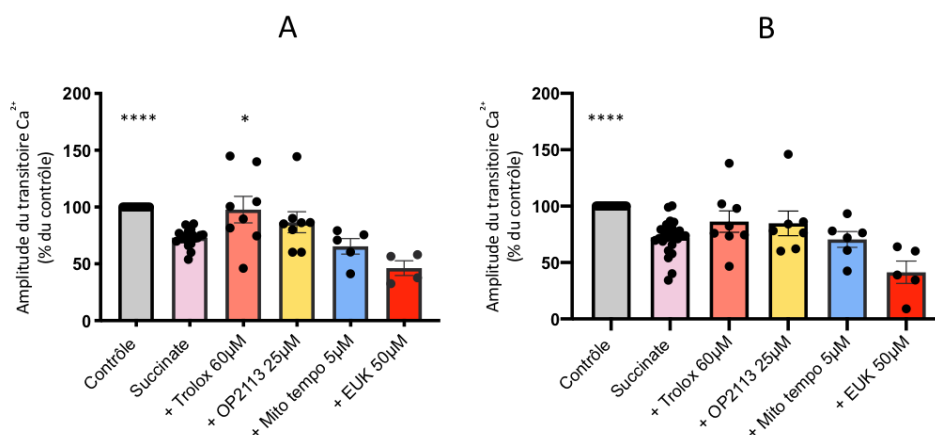


Figure 86 Comparaison de deux méthodes de mesure de la concentration du transitoire calcique

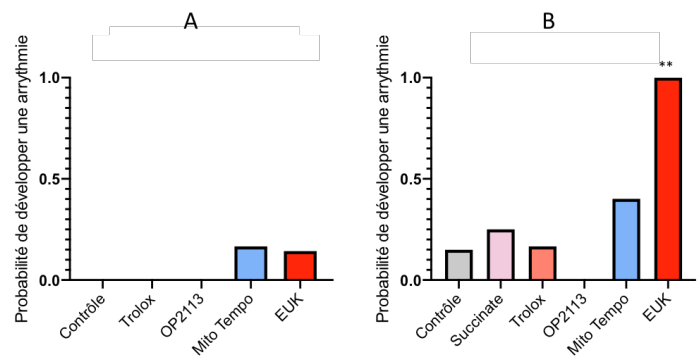
L'amplitude du transitoire calcique est mesurée à l'aide du logiciel Ionwizard (A) mais également par le script élaboré au laboratoire (B). N=9 ; n=24 ; Kruskal-Wallis \*\*\*\*  $p < 0,0001$  par rapport au groupe succinate.

#### d. Influence des ROS et des antioxydants sur la probabilité de développer un événement arythmique

Nous avons étudié la probabilité d'occurrence d'une arythmie dans nos différentes conditions, et tout d'abord en l'absence de surproduction de ROS, donc dans nos conditions contrôle (Figure 87). Aucune arythmie n'est observée en condition contrôle (Figure 87-A).

Figure 87 Probabilité de développer une arythmie chez des cardiomyocytes ventriculaires lors de la mesure du transitoire calcique avec (B) ou sans (A) surproduction de ROS

Au cours des expérimentations, nous avons pu observer ponctuellement l'apparition d'événements arythmiques. Ces événements ont été comptabilisés, puis la probabilité d'apparition d'un événement arythmique a été calculée. N9; n=6-22; Kruskal-Wallis \*\*p<0,01 en comparaison avec le groupe contrôle.



Trolox et OP2113, employé seuls, contrairement à MitoTEMPO et EUK ne sont pas arythmogènes (Figure 87-A). On observe une augmentation de l'occurrence des arythmies en condition de surproduction mitochondriale de ROS par ajout de succinate et en présence de Fura4AM (Figure 87-B). Contrairement au Trolox, OP2113 abolit l'effet arythmogène du succinate. EUK, quant à lui, l'accroît. L'ajout de MitoTEMPO a tendance lui aussi à l'accroître (p=0,14) (Figure 87-B). Un exemple de trace arythmique en présence d'EUK est présenté dans la Figure 88.

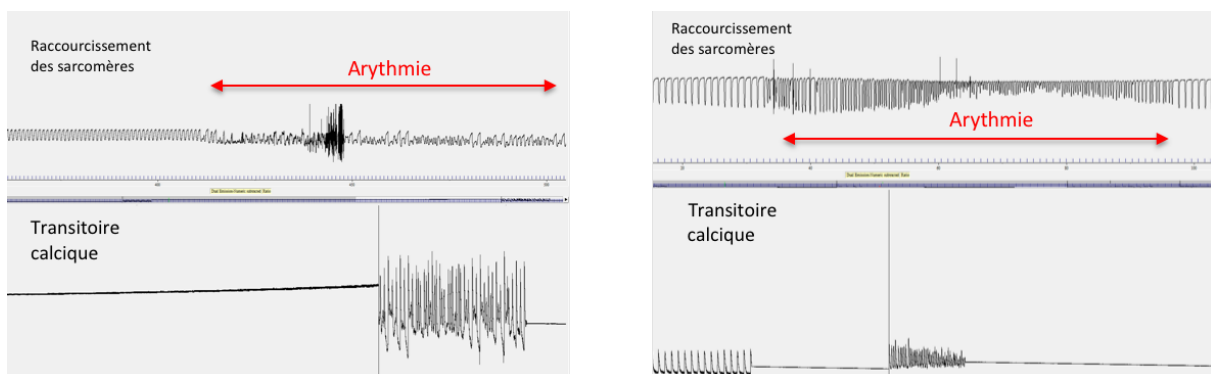


Figure 88 Exemple de développement d'arythmie en présence d'EUK

### 5) Effet de la modulation de différents modes de transport du Ca<sup>2+</sup> mitochondrial

De nombreuses études ont montré l'interaction entre la production de ROS et la concentration de calcium mitochondrial (Brookes, 2004). Après avoir montré que les ROS mitochondriaux modulent l'homéostasie calcique intra cardiomyocytaire pendant le cycle contraction relaxation, il était nécessaire d'étudier l'éventuelle implication d'acteurs du transport mitochondrial de calcium.

C'est à cette fin que nous avons testé les effets de la cyclosporine A qui est un inhibiteur de l'ouverture du mPTP (assez spécifique lorsqu'elle est utilisée à une concentration de 0.2µM chez le rongeur (Halestrap *et al.*, 1997), mais qui est aussi un inhibiteur de la calcineurine, protéine phosphatase dépendante du calcium également impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique et du rouge de ruthénium (Ru360) qui est un inhibiteur du MCU (Figure 89).

Pour rappel selon notre hypothèse et les données montrées par l'équipe (Diolez *et al.*, 2006) ; (Brandes & Bers, 1997) la mitochondrie est activée par le calcium au moment de la contraction.

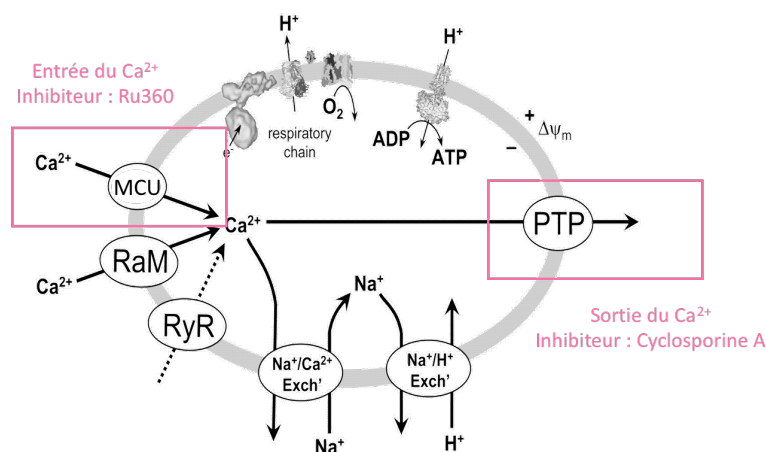


Figure 89 Mécanismes de régulation du calcium mitochondrial (adaptée de Brookes, 2004)

Nous allons étudier les deux principaux régulateurs du calcium mitochondrial : le MCU et le mPTP, tout deux inhibés par le Ru360 et la CsA respectivement.

#### a. La cyclosporine A, inhibiteur de l'ouverture du pore et donc de la sortie de calcium lors du couplage excitation-contraction

Nous avons étudié l'effet de la cyclosporine A à la fois sur la production de ROS, et sur le raccourcissement des sarcomères de cardiomyocytes stimulés à 1 Hz. Pour rappel la cyclosporine est co-perfusée avec nos différentes molécules utilisées lors de la contraction. Nous n'avons pas réalisé de pré-traitement.

#### Étude de l'inhibiteur Cyclosporine A sur des cardiomyocytes isolés en condition contrôle

Dans un premier temps nous avons étudié l'effet de l'ajout de cyclosporine A sur la production de ROS en conditions contrôle (Figure 90-A). Aucun effet significatif n'a été observé, seule une légère tendance à l'augmentation de la production de ROS en condition contrôle a été observée. De manière similaire, aucun effet significatif sur l'amplitude de contraction n'est observé (Figure 90-B).

En revanche lors de l'incubation en présence de Trolox et OP2113, qui diminuent tous deux la production de ROS lorsqu'ils sont employés seuls, la production de ROS est significativement augmentée en présence de cyclosporine A (Figure 90-A). Cet effet sera discuté ultérieurement dans le manuscrit. Nous n'observons aucun effet de la cyclosporine A sur la production de ROS en présence de MitoTEMPO et d'EUK (Figure 90-A).

Pour ce qui concerne l'amplitude de la contraction, de manière intéressante on n'observe qu'une légère diminution de l'amplitude de contraction en présence de Trolox et d'OP2113 (Figure 90-B) malgré l'effet marqué sur la surproduction de ROS (Figure 90-A).

Ainsi, pour la première fois dans ce chapitre nous avons observé un découplage entre la stimulation de la production de ROS et la diminution du raccourcissement des unités sarcomériques.

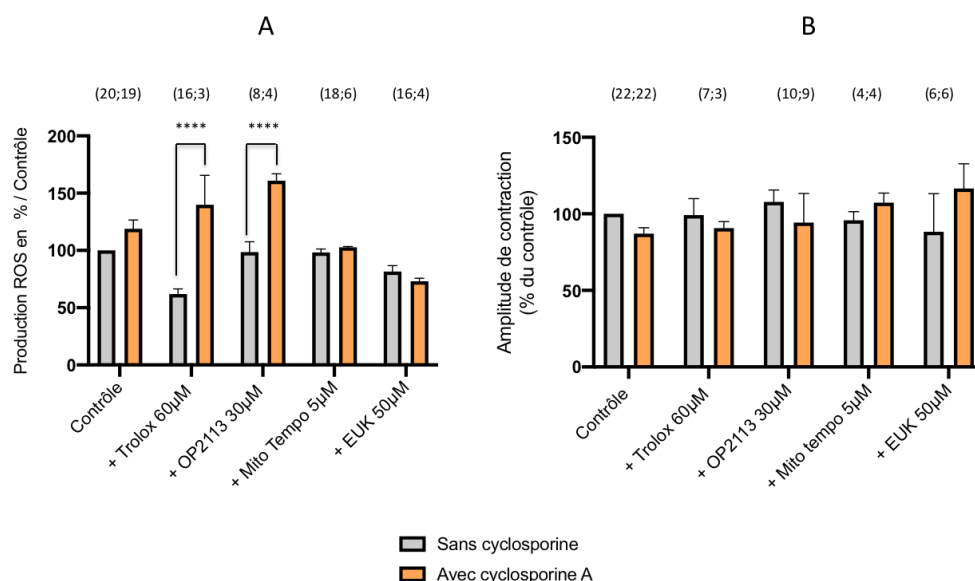


Figure 90 Effet de la cyclosporine A sur la production de ROS (A) et sur le raccourcissement des sarcomères (B) en présence des antioxydants

L'ajout de cyclosporine est étudié en condition contrôle lors de la production des ROS (A) mesurée avec la sonde Amplex Red, mais également lors de la contraction des cellules cardiaques (B).

Moyenne des valeurs (pmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéines) : Contrôle = 65,20 ; Contrôle avec cycloA : 78,92.

\*\*\*p<0,0001 par rapport au groupe sans cyclosporine.

N= 5 ; Les n sont indiqués sur la figure directement ; ANOVA 2<sup>nd</sup> rang

### Inhibition du pore de transition de perméabilité lors d'une surproduction de ROS mitochondriaux

La surproduction de ROS observée en condition contrôle après ajout de CsA, possiblement liée à une augmentation de la concentration matricielle en Ca<sup>2+</sup>, ne représente que 7% de la surproduction observée en présence de succinate seul (cf. I). La comparaison des Figure 90-A & Figure 91-A montre que l'effet de la CsA sur la production de ROS est dépendante du substrat métabolique perfusé sur les cardiomyocytes isolés.

En effet, en présence de glucose la CsA induit une augmentation de la production de ROS, alors que suite à la perfusion de succinate l'effet de la CsA est inversé. De manière surprenante, cette diminution de la production de ROS en présence de Succinate+CsA en comparaison au groupe succinate seul n'est pas accompagnée par une augmentation du raccourcissement des sarcomères (Figure 91-B). En présence de la molécule Trolox nous observons une augmentation de plus de 50% de la production de ROS liée à une diminution significative de l'amplitude de contraction par rapport au groupe Trolox sans CsA.

Cette augmentation de la production de ROS suggère que l'effet antioxydant du Trolox diminue en présence de CsA.

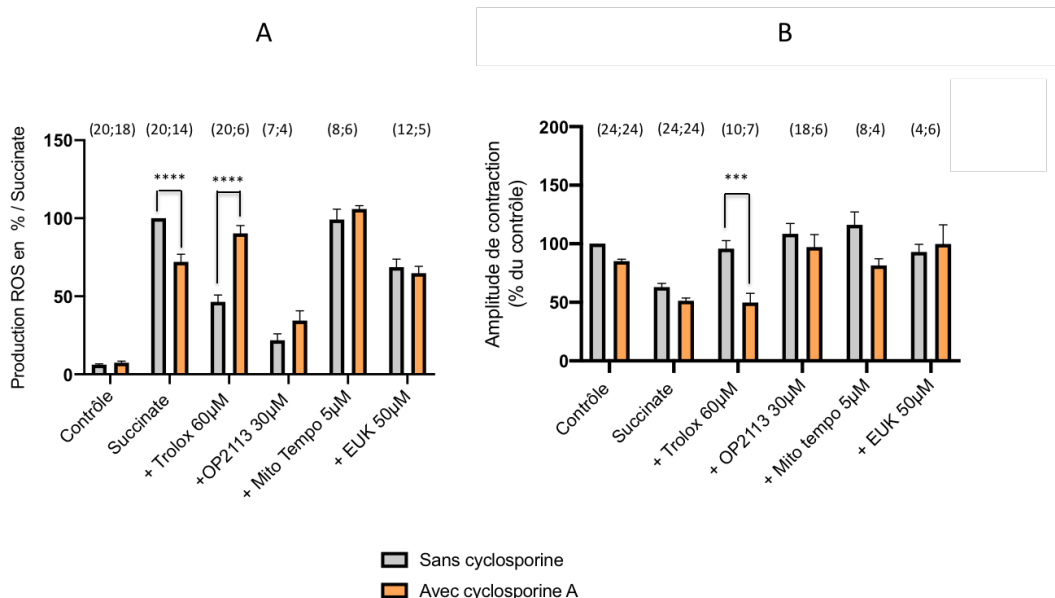


Figure 91 Effet de la cyclosporine A sur la production de ROS (A) et sur le raccourcissement des sarcomères (B) en présence de succinate et des antioxydants

L'ajout de cyclosporine est étudié en condition de surproduction de ROS mitochondriaux lors de la production des ROS (A) mais également lors de la contraction des cellules cardiaques (B).

Moyenne des valeurs (pmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéines) : Contrôle = 65,20 ; contrôle avec cycloA : 78,92 ; succinate : 1056 ; succinate et cycloA : 761,66.

\*\*\*\*p<0,0001 par rapport au groupe sans cyclosporine

N= 5 ; Les n sont indiqués sur la figure directement ; ANOVA 2<sup>nd</sup> rang

### b. Inhibition du canal calcique mitochondrial : MCU

Pour affiner notre compréhension de l'impact de la modulation de la gestion du calcium mitochondrial sur la production de ROS et les potentielles répercussions sur l'activité contractile des cardiomyocytes isolés, nous avons incubé les cellules avec du Ru360, inhibiteur spécifique de l'uniport calcique mitochondrial (MCU)(De J García-Rivas *et al.*, 2006).

Nous avons donc étudié l'effet du Ru360 à la fois sur la production de ROS et sur le raccourcissement des sarcomères de cardiomyocytes stimulés à 1 Hz. Pour rappel afin d'obtenir l'inhibition optimale du MCU, les cellules étaient incubées en présence de Ru360 pendant 30min avant de procéder à la stimulation.

#### L'inhibiteur Ru360 dans des conditions contrôle

En présence de Ru360, on distingue une légère diminution de la production de ROS (Figure 92-A), associée à une légère augmentation de l'amplitude maximale du raccourcissement des sarcomères (Figure 92-B), dans le groupe contrôle.



Néanmoins, comme précédemment observé, on remarque que la combinaison du Ru360 et de la molécule Trolox s'accompagne d'une augmentation de la production de ROS. Cet effet, également observé après ajout de CsA (Figure 90-A) entraîne également une diminution de l'amplitude maximale de raccourcissement des sarcomères.

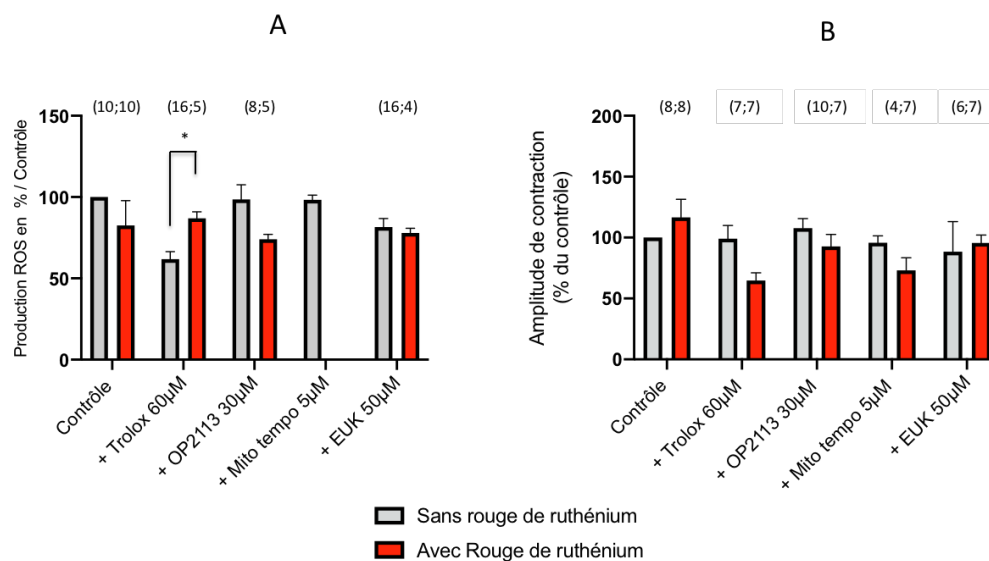


Figure 92 Effet du Ru360 sur notre modèle en présence des antioxydants

Les cellules (condition contrôle) sont directement incubées avec Ru360 avant de recevoir notre protocole de production de ROS (A) ou de mesure de l'amplitude de la contraction (B). La production de ROS en présence de MitoTEMPO + Ru360 n'a pas été réalisée puisque nous ne pouvons pas observer l'effet antioxydant du MitoTEMPO avec la sonde Amplex Red (cf. Résultats II)

Moyenne des valeurs (pmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de protéines) : Contrôle = 91,06 ; contrôle avec Ru360 : 75,16.

\* p<0,05 par rapport au groupe sans Ru360

N= 5 ; Les n sont indiqués sur la figure directement ; ANOVA 2<sup>nd</sup> rang

### Effet de l'inhibition du MCU sur la production de ROS et l'activité contractile des cardiomyocytes isolés en présence de succinate.

De manière générale, lors d'une surproduction de ROS induite par le succinate, l'inhibition du MCU ne semble pas affecter significativement la production de ROS ou l'amplitude de contraction (Figure 93-A,B) On constate en revanche que l'utilisation de la molécule Trolox combinée avec le Ru360 inhibe partiellement son effet antioxydant. En effet, on peut observer une augmentation de 35% de la production de ROS en présence de Trolox après ajout de Ru360 (Figure 93-A). Cet effet est associé à une diminution de plus de 60% de l'amplitude de contraction (Figure 93-B). En revanche, la diminution de la production de ROS en présence d'OP2113 se maintient (même si elle est légèrement atténuée) après ajout de Ru360 (Figure 93-A).

Cet effet est lié à la préservation de l'amplitude de contraction (Figure 93-B). Enfin l'utilisation du Ru360 en présence d'EUK ne modifie pas la production de ROS et donc son pouvoir antioxydant (Figure 93-A). Cet effet est associé à une augmentation de l'amplitude de contraction (Figure 93-B) qui peut être interprétée au regard de la capacité d'EUK d'augmenter la libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique (Watanabe *et al.*, 2019).

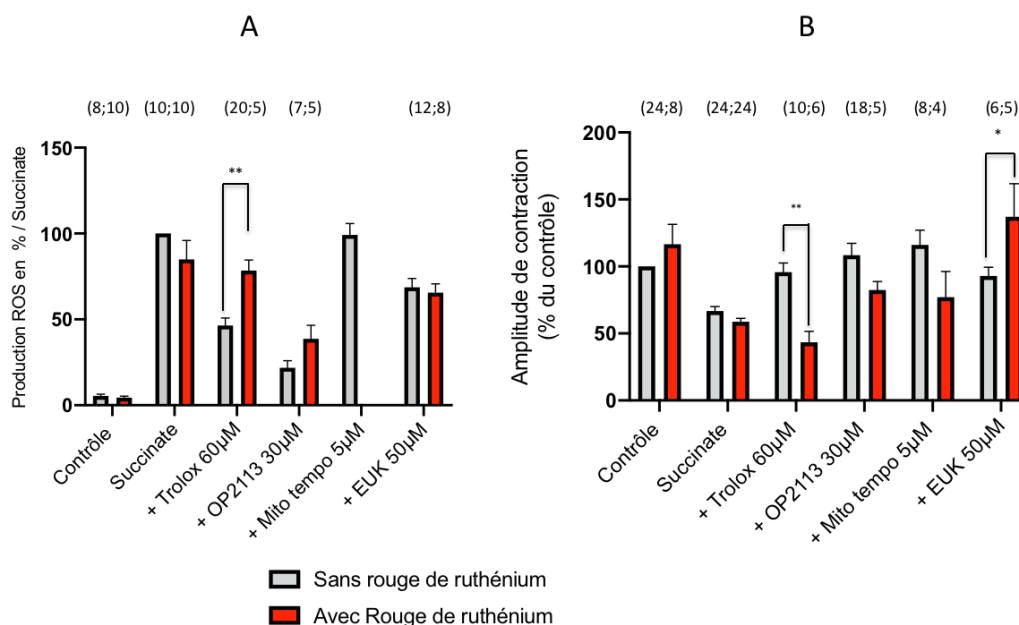


Figure 93 Effet du Ru360 sur notre modèle en présence des antioxydants et du succinate

Les cellules sont directement incubées avec Ru360 avant de recevoir notre protocole de production de ROS (A) ou de mesure de l'amplitude de la contraction (B). La production de ROS en présence de MitoTEMPO + Ru360 n'a pas été réalisée puisque nous ne pouvons pas observer l'effet antioxydant du MitoTEMPO avec la sonde Amplex Red (cf. Résultats II).

\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,001$  par rapport au groupe sans Ru360

N= 5 ; Les n sont indiqués sur la figure directement ; ANOVA 2<sup>nd</sup> rang

# DISCUSSION GENERALE

## Discussion Générale

### 1) Production mitochondriale de ROS

Les propriétés bioénergétiques de la mitochondrie sont des déterminants critiques de la sensibilité des cellules lors d'un stress oxydant aigu ou chronique (Nicholls, 2002). En effet, au-delà de leur rôle central lors de la régénération d'ATP, il a été montré que les mitochondries sont également impliquées dans la production de ROS et dans les mécanismes de défense antioxydante de l'organisme. De plus, comme l'illustre la Figure 94 et comme de nombreuses études l'ont montré (Diolez *et al.*, 2006) ; (Brandes & Bers, 1997), la mitochondrie est également impliquée dans la régulation du calcium cytoplasmique et mitochondrial. C'est dans ce contexte que notre travail s'est particulièrement appliqué à étudier l'implication de la production mitochondriale de ROS dans la régulation des différents acteurs de la contraction cardiaque.

Le calcium mitochondrial apparaît comme un élément fondamental de la régulation du métabolisme mitochondrial et plus particulièrement de la respiration.

En effet, cet ion peut moduler l'activité de différentes enzymes importantes pour le fonctionnement mitochondrial (Diolez *et al.*, 2006). Une augmentation de la concentration matricielle en calcium stimule l'activité des déshydrogénases du cycle de Krebs, ainsi que l'ATP-synthétase et participe ainsi à la stimulation de la phosphorylation oxydative (Brookes, 2004) ; (Michael Kohlhaas *et al.* 2010). De plus, l'élévation du calcium cytosolique conduit à un effet inotrope positif, notamment *via* sa fixation sur la troponine C qui est un préalable à la formation des ponts actine-myosine. Ainsi, le calcium est un acteur particulier de la contraction cardiaque dans la mesure où son élévation intra cytoplasmique augmente la production de force (donc de la demande énergétique) et que son élévation dans la matrice mitochondriale stimule la phosphorylation oxydative (donc la production d'ATP). Notre équipe a pu montrer, de manière non invasive, sur cœur battant, ce mécanisme d'activation parallèle de la contraction et de la respiration participant à la nécessaire adéquation entre demande et fourniture en ATP (Deschodt-Arsac *et al.*, 2010).

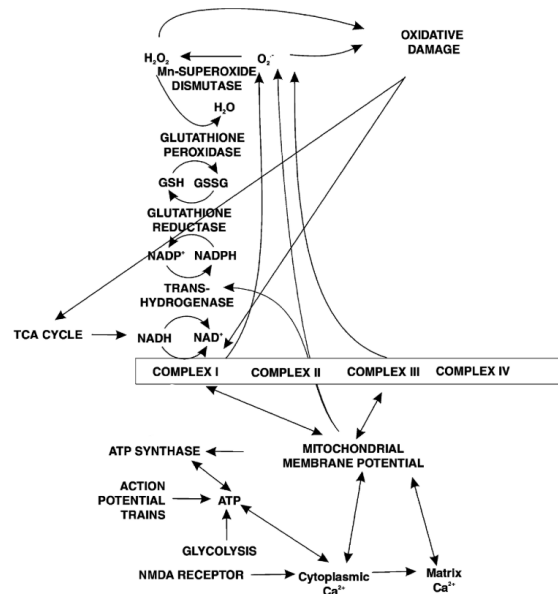


Figure 94 Diagramme illustrant la complexité des propriétés bioénergétiques de la mitochondrie (Nicholls, 2002) La figure 94 montre les principales voies bioénergétiques qui influencent la survie neuronale. Le paramètre central est le gradient de potentiel électrochimique du proton à travers la membrane mitochondriale interne, appelé la force motrice du proton. Les flèches à deux points indiquent qu'une interaction peut être bidirectionnelle.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes physiologiques et pathologiques de l'implication de la production mitochondriale de ROS dans le couplage excitation-contraction. Ce travail s'inscrit dans la conduite du projet ANR « MITOCARD ». Ce projet explore l'implication des mitochondries dans la signalisation intracellulaire lors couplage excitation contraction *via* sa participation à l'homéostasie calcique intracellulaire et à la production de ROS. Il est donc susceptible d'ouvrir des perspectives sur l'implication des mitochondries dans les phénomènes de production de force lors de la contraction, de relaxation et d'excitation des cellules cardiaques. A terme, ces connaissances pourraient trouver des domaines d'application dans les domaines de l'insuffisance cardiaque et des arythmies cardiaques.

Le projet MITOCARD vise plus particulièrement à tester une hypothèse (illustrée Figure 95) d'implication des mitochondries dans les différentes étapes du couplage excitation-contraction selon une séquence liant la production mitochondriale de ROS ; le taux de réduction des quinones de la chaîne respiratoire ; la dynamique calcique et la dynamique du potentiel de membrane mitochondrial ; la sensibilité à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP). Selon notre hypothèse, l'élévation du calcium intracytoplasmique lors de la systole (conséquence de sa libération depuis le réticulum sarcoplasmique) conduit à une élévation du calcium au sein de la matrice mitochondriale activant la respiration et la production mitochondriale de ROS. Ces deux phénomènes augmentent la sensibilité à l'ouverture du mPTP qui favoriserait la libération de calcium de la mitochondrie vers le cytosol lors de la phase de relaxation.

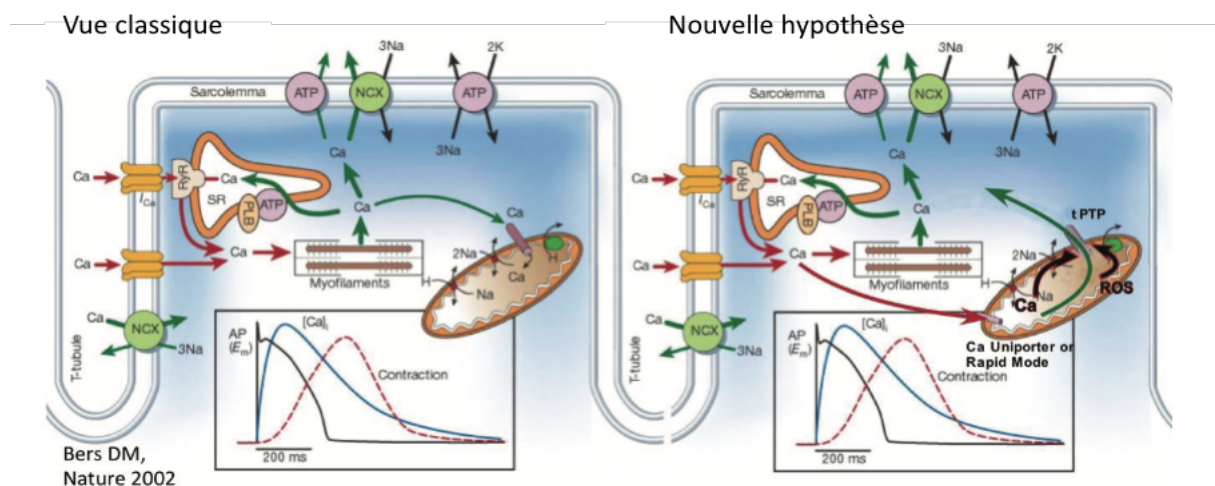


Figure 95 Nouvelle hypothèse suite aux travaux de l'équipe du Dr Diolez (adaptée de Bers)

Les radicaux libres sont « une arme à double tranchant » au niveau cardiovasculaire. En premier lieu, les ROS ont de longue date été reconnus comme des sous-produits toxiques du métabolisme normal de l'oxygène et impliqués dans de nombreuses pathologies. Cependant depuis plusieurs années la production de ROS apparaît comme un mécanisme essentiel de la signalisation cellulaire de la cardioprotection, notamment dans le contexte de l'ischémie-reperfusion (Köhler *et al.*, 2014). Cette dualité est sans doute une des raisons pour lesquelles les stratégies thérapeutiques visant à protéger le myocarde dans différents contextes

pathologiques, comme l'ischémie-reperfusion, n'ont pas été couronnées de succès. Sans conteste, il est nécessaire de mieux identifier le type de ROS à cibler par les antioxydants, leur site de production, ainsi que le moment et les modalités optimales de la délivrance des antioxydants pour un bon emploi à visée thérapeutique. Comme nous l'avons déjà exposé, les ROS ont des origines diverses : NADPH oxydases, xanthine oxydase, NO synthase et enfin la chaîne respiratoire mitochondriale.

La mitochondrie est une source majeure des ROS cellulaires (Sanmartín *et al.*, 2017) et une première problématique est de mieux identifier le type de ROS ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  ou  $OH^{\cdot}$ ) plus particulièrement impliqués dans la régulation des différents acteurs du couplage excitation-contraction. Le principal site mitochondrial de production de ROS en présence de succinate est le site  $I_Q$  (Brand, 2016) (Figure 96). En effet, la succinate déshydrogénase (complexe II) est capable de réduire très fortement le pool de quinone ce qui, lorsque le potentiel de membrane mitochondrial est élevé, favorise le transport réverse des électrons à travers le complexe I et la production de ROS au niveau du site  $I_Q$ . Ces conditions sont en notament réunies au cours de la reperfusion après ischémie et la production mitochondriale de ROS qui en résulte a été incriminée dans la production des lésions cellulaires causées par l'ischémie-reperfusion (Chouchani *et al.*, 2014).

A côté de ces effets toxique d'une production massive de ROS, il a été montré qu'une production continue de ROS, en faible quantité, est impliquée dans l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Les ROS interviennent dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (croissance, différenciation, apoptose...), de la production d'énergie, du fonctionnement des canaux ioniques et de la réponse inflammatoire (Sena & Chandel, 2012).

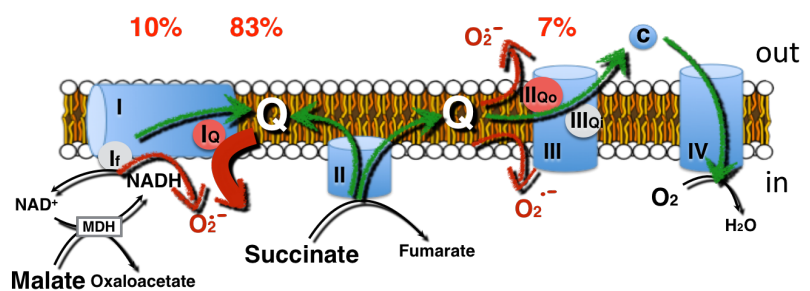


Figure 96 Production de ROS mitochondriale (adapté de Detaille *et al.*, 2019)

Les % sont ceux estimés par l'équipe de M.Brand (Quinlan *et al.*, 2013) pour des mitochondries isolées de muscle au repos. Les flèches vertes correspondent au trajet des électrons, et les flèches rouges à la production de ROS.

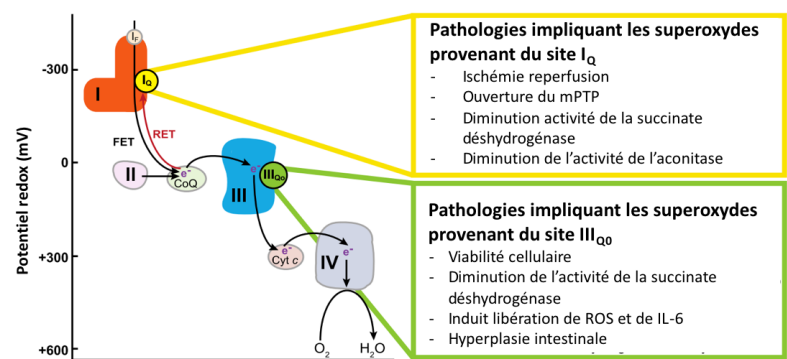


Figure 97 Pathologies conduisant à une production de ROS du site  $I_Q$  ou  $III_{QO}$  de la mitochondrie (adapté de Watson *et al.*, 2019)

RET : Transport réverse des électrons ; FET : transport normal des électrons ; I à IV : complex mitochondriaux du transport des électrons ; CoQ : coenzyme Q ; cyt c : cytochrome c

La toxicité des ROS (stress oxydant) résulte donc d'un excès de production des ROS ou d'un défaut de la capacité antioxydante. Des changements dans la production de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène mitochondriaux contribuent au développement de nombreuses pathologies ainsi qu'au vieillissement cellulaire (Watson *et al.*, 2019)(Figure 97).

Afin d'étudier et de caractériser les sites d'origine de la production mitochondriale des ROS mais également de cibler des cibles thérapeutiques précises, il est indispensable de trouver des molécules très spécifiques afin de ne pas perturber l'ensemble de la chaîne de transport des électrons et la production aux autres sites mitochondriaux.

En 2013 l'équipe de Martin Brand (Buck Institute) a découvert le premier inhibiteur de la production de ROS au niveau du site I<sub>Q</sub> de la mitochondrie CN-POBS (Orr *et al.*, 2013) ;(Watson *et al.*, 2019). Cette molécule permet d'inhiber plus de 50% de la production de ROS au niveau du site I<sub>Q</sub> de la mitochondrie à une concentration d'environ 0,07μM.

Le repositionnement d'OP2113 en 2015 est donc venu rajouter une molécule dans cette famille de composés aux propriétés uniques d'inhibiteur spécifique de la production de ROS par le site I<sub>Q</sub> (ubiquinone binding-site) du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce qui est particulièrement intéressant est que OP2113, comme nous avons pu le démontrer, n'a aucun effet sur les autres sites mitochondriaux de production de ROS mais aussi cytoplasmiques. En effet une étude réalisée par l'équipe a permis de mettre en évidence que OP2113 n'inhibe pas la production de ROS cytosolique de la NAD(P)H oxydase, qui est le site de production majoritaire en dehors de la mitochondrie (Detaille *et al.*, 2019). Enfin nos résultats permettent également de montrer que, sur mitochondries isolées de cœur de rat, OP2113 n'altère pas la phosphorylation oxydative (Figure 99).

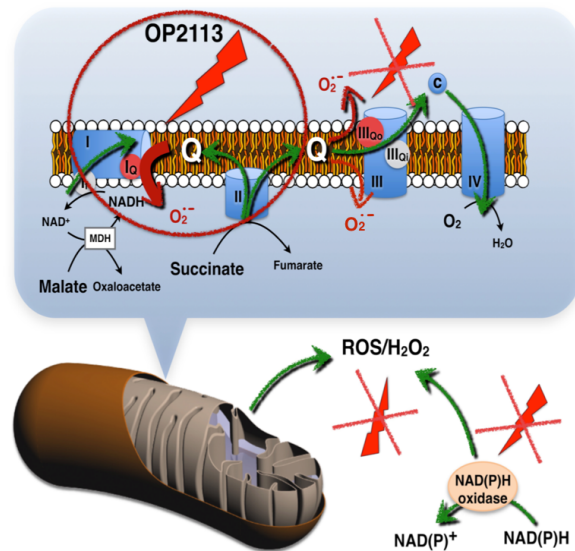


Figure 99 Schéma récapitulatif de l'effet de OP2113 sur la production de ROS mitochondriale (Detaille *et al.*, 2019)

Ces molécules, qui permettent l'inhibition spécifique de la production de ROS du site I<sub>Q</sub> mitochondrial sont donc des outils uniques pour cibler le site I<sub>Q</sub> dans des pathologies telles que l'ischémie reperfusion et peuvent donc conduire à la naissance de futures thérapies dans ce contexte. Des études sont actuellement en cours à ce sujet par la société OP2 drugs.

Enfin nos résultats sur le principal métabolite OP2116, nous permettent de conclure que cette molécule inhibe également la production de ROS au niveau du site I<sub>Q</sub> de la mitochondrie

## 2) Étude des ROS produits en conditions contrôle

Différents antioxydants ont été testés sur notre modèle, des antioxydants cytosoliques (Trolox & NAC) et mitochondriaux (OP2113, MitoTEMPO & EUK). Dans un premier temps nous avons étudié en conditions contrôle (glucose) la production de ROS, puis l'amplitude de contraction et enfin l'amplitude et l'évolution des transitoires calciques de cardiomyocytes isolés de cœur de rat.

Les différents antioxydants que nous avons employés ciblent des catégories différentes de ROS. En présence d'OP2113, le plus spécifique, les ROS ciblés sont spécifiquement ceux issus du site I<sub>Q</sub> du complexe I mitochondrial. MitoTEMPO est un SOD-mimétique qui, comme nous l'avons vu, agit de la même manière que la superoxyde dismutase et conduit donc à une diminution d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et une production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le Trolox quant à lui est un analogue de la vitamine E. Il ne rentre pas dans le compartiment mitochondrial et cible donc spécifiquement les ROS cytosoliques ou les ROS d'origine mitochondriale relargués dans le cytosol. EUK et NAC, comme nous l'avons vu, ne sont pas pertinents pour notre étude au vu des difficultés que nous avons rencontrées au cours de nos expérimentations. Pour rappel nous n'avons pas pu mesurer la production de ROS en présence de NAC en raison d'une interaction avec le système de mesure Amplex Red. Concernant EUK, qui est à la fois SOD et catalase mimétique, donc qui transforme O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous avons rencontré des problèmes dus à l'apparition ponctuelle d'arythmies au cours de nos mesures.

Nous avons toutefois pu étudier dans nos conditions l'origine des ROS produits en conditions contrôle. Les expériences réalisées en présence des différents antioxydants en conditions contrôle nous permettent de proposer que les ROS produits dans ces conditions sont principalement d'origine cytosolique. En effet, en présence d'OP2113 nous n'observons aucune diminution de la production de ROS. Afin de vérifier la nature des ROS produits en condition contrôle nous avons analysé la production de ROS lors de l'utilisation d'EUK qui, pour rappel, transforme l'anion superoxyde en eau dans la mitochondrie. Ce dernier n'inhibe que 37% des ROS présents dans les cardiomyocytes. Le Trolox n'inhibe également pas la totalité des ROS produits en conditions contrôle (diminution de 40% de la production). Il reste donc possible qu'une proportion non négligeable des ROS produits en conditions contrôle puisse provenir d'un autre site mitochondrial. Comme il apparaît dans plusieurs études que les NADPH oxydases sont les principales sources de ROS dans les cardiomyocytes, nous pouvons avancer que dans nos conditions contrôle les NADPH oxydases pourraient être fortement impliquées.

### 3) Modèle de surproduction mitochondriale de ROS

Le stress oxydant apparaît lors d'une augmentation de la production de ROS, mitochondriaux ou non, incontrôlable par les systèmes de défense de la cellule. Pour provoquer ce stress oxydant de nombreuses études procèdent par addition de divers composés comme l'hydroperoxyde de cumène ou encore du t-butyl hydroperoxide (Zima & Blatter, 2006). L'originalité de notre étude a été d'induire une surproduction interne de ROS dans des cardiomyocytes isolés.



Nous avons donc étudié dans un premier temps deux systèmes de mort cellulaire par induction d'un dysfonctionnement mitochondrial : le céramide et les LPS.

Il a été montré par notre équipe que le céramide induit l'apoptose ainsi qu'un gonflement mitochondrial de manière insensible à la CsA (Leducq *et al.*, 2002) et plus tard par un autre groupe que ce gonflement est associé à une augmentation de la production de ROS (Galadari *et al.*, 2013). Les résultats présentés ici montrent que cette augmentation n'est que transitoire, ce qui laisse supposer qu'elle est associée au gonflement et cesse après rupture de la membrane externe mitochondriale et déclenchement de l'apoptose (Leducq *et al.*, 2002). De plus, nous avons pu observer que la viabilité cellulaire était diminuée de moitié par rapport aux conditions contrôles. Le céramide n'est donc pas utilisable pour notre protocole de surproduction de ROS.

Nous avons ensuite testé les effets du LPS (endotoxine présente sur la paroi des bactéries gram-), couramment utilisé comme modèle d'inflammation. Le LPS induit lui aussi des dommages mitochondriaux conduisant à l'apoptose (Wang, Mao, *et al.*, 2019). Dans nos conditions, le LPS n'a toutefois pas provoqué d'augmentation de la production de ROS par les cardiomyocytes.

Finalement, nous sommes parvenus à induire une production endogène de ROS par l'ajout de succinate, un des principaux substrats utilisés par la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 49). En présence de succinate la quantité de ROS produits augmente de plus de 10 fois par rapport à nos conditions contrôle. Plusieurs études ont proposé que les dommages oxydatifs résultant de l'ischémie-reperfusion cardiaque étaient causés par une accumulation de succinate au cours de l'ischémie qui entrainerait la production de ROS au niveau du site  $I_0$  par le transport réverse des électrons au niveau du complexe I au moment de la reperfusion, lors du rétablissement de l'apport en oxygène (Chouchani *et al.*, 2014) ; (Brand *et al.*, 2016). En effet lors de l'ischémie l'apport d'oxygène est interrompu, la chaîne mitochondriale cesse de fonctionner et d'oxyder le succinate qui peut alors s'accumuler (Chouchani *et al.*, 2014). Très rapidement, au moment de la reperfusion, l'apport soudain d' $O_2$  et l'oxydation du succinate en excès provoquent une production mitochondriale de ROS importante (à rapprocher des résultats présentés plus loin). L'utilisation d'une molécule telle que OP2113 serait donc particulièrement intéressante pour diminuer cette production de ROS et ainsi minimiser les conséquences néfastes des ROS lors de la reperfusion (Figure 100).

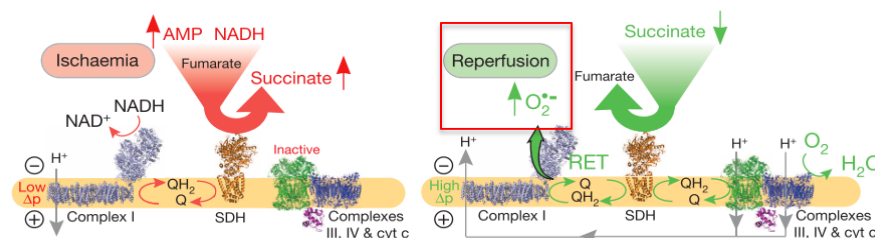


Figure 100 Formation de ROS due à l'accumulation du succinate au cours de l'ischémie reperfusion (Chouchani *et al.*, 2014)

Dans notre publication (Detaille *et al.*, 2019) sont exposés les résultats concernant la molécule OP2113 dans le contexte d'une ischémie-reperfusion sur cœur de rat (donné en

annexe). Il apparaît ainsi qu'un prétraitement de 10 minutes en présence de 10 $\mu$ M de la molécule OP2113 augmente significativement la récupération de la fonction contractile après reperfusion et diminue de plus de 50% la taille de l'infarctus. Actuellement, l'équipe participe à une étude préclinique des effets d'OP2113 sur une ischémie-reperfusion *in vivo* chez la brebis.

Nous avons donc créé un modèle de surproduction de ROS dans les cardiomyocytes par le succinate. Nos résultats sur la production de ROS indiquent que la supplémentation en succinate (5mM) provoque une situation comparable à celle de l'ischémie-reperfusion avec une concentration intracellulaire de succinate sûrement très supérieure à la concentration physiologique. Il pourrait être intéressant de tenter de moduler cette concentration de succinate pour moduler la production de ROS.

Nous avons ensuite testé une série d'antioxydants afin de préciser l'origine des ROS produits dans ce modèle de supplémentation des cardiomyocytes par du succinate. Nous avons utilisé deux antioxydants à action cytoplasmique (le Trolox et la NAC) pour étudier si la production de ROS était d'origine cytosolique. Le Trolox est un des antioxydants les plus utilisés dans le cas d'une comparaison avec des antioxydants spécifiquement mitochondriaux tel que mitoVitE ou MitoQ du fait de sa localisation non mitochondriale (Echtay *et al.*, 2002). Notre étude montre que le Trolox, à la concentration de 100 $\mu$ M, diminue la production de ROS de plus de 70%. La N-acetyl-cystéine, bien que très utilisée dans la littérature, n'est pas suffisamment efficace et doit être utilisée à de fortes concentrations pendant de longues incubations, ce qui est dommageable pour les cardiomyocytes. Cependant une récente étude de (Mustroph *et al.*, 2018) a montré sur cardiomyocytes isolés que la NAC prévient l'effet inotrope négatif et lusitrope positif que peut induire un stress oxydant.

Les trois antioxydants ciblant les ROS mitochondriaux utilisés dans notre étude sont OP2113, le MitoTEMPO et l'EUK. L'utilisation de MitoTEMPO, qui transforme les anions superoxydes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ne permet pas la mesure de la production de ROS par la méthode utilisée. Cependant, dans la mesure où des études ont montré que le MitoTEMPO induit une diminution des ROS mitochondriaux (Ni *et al.*, 2016), nous avons voulu confirmer son effet lors des expériences de contraction. La molécule EUK - qui convertit les superoxydes en eau - a par contre permis d'observer une diminution de l'ordre de 40% de la production mitochondriale de ROS induite par le succinate bien qu'il n'ait pas une grande spécificité et qu'il piège également les ROS d'origine cytosolique. OP2113 n'est pas un antioxydant à proprement parler mais un inhibiteur spécifique de la production d'espèces radicalaires de l'oxygène au niveau du site I<sub>Q</sub> (Detaille et al, 2019), principal site mitochondrial de production de ROS (Quinlan *et al.*, 2013) (*cf.* Résultats-II). L'étude des effets de OP2113 nous permet de conclure sur l'origine des ROS produits dans notre modèle. OP2113, à la concentration maximale testée, inhibe de plus de 80% la production de ROS dans nos conditions, confirmant que cette surproduction de ROS provient essentiellement du complexe I<sub>Q</sub> mitochondrial. On peut faire l'hypothèse que les 20% restants proviennent soit du cytosol soit du complexe III mitochondrial. Pour cela il serait intéressant de tester des molécules qui inhibent la production de ROS au niveau de la NADPH oxydase (site principal de production de ROS dans les cardiomyocytes en condition

physiologique) et du complexe III, à savoir l'apocynin (Hashad *et al.*, 2018) et S3QELs (Watson *et al.*, 2019), respectivement.

L'inhibition de plus de 80% des ROS produits en présence de succinate par OP2113 nous permet de conclure que les ROS produits dans ces conditions sont d'origine mitochondriale et proviennent plus spécifiquement du site I<sub>Q</sub> du complexe I. L'efficacité du Trolox, relativement importante, s'explique par le piégeage de ces ROS dans le cytosol, probablement sous forme de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En présence d'OP2113, la majeure partie des superoxydes produits dans nos conditions de surproduction sont supprimés. Ces résultats sont en parfait accord avec les conclusions des travaux du groupe de M. Murphy sur l'implication du succinate et des ROS dans les dommages liés à l'ischémie-reperfusion (Chouchani *et al.*, 2014).

#### 4) Effets de la surproduction mitochondriale de ROS sur la fonction contractile des cardiomyocytes

Au vu de l'ensemble des résultats présentés dans cette thèse sur le raccourcissement des sarcomères de cardiomyocytes ventriculaires de rat, nous pouvons conclure que la surproduction mitochondriale de ROS exerce une influence sur la contraction des cardiomyocytes.

Dans un premier temps nous avons constaté qu'aucune de nos conditions (contrôle ou succinate) n'affectait la longueur de repos des sarcomères ( $1,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ). En cohérence avec cette observation, la concentration diastolique en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire n'est modifiée ni par les ROS ni par les antioxydants en condition contrôle ou succinate. Nous avons montré que le Trolox, le Mito Tempo et la NAC n'ont pas d'effet sur l'amplitude du raccourcissement en condition contrôle. Néanmoins, en présence d'OP2113, on observe une tendance à l'augmentation de l'amplitude de contraction, possiblement liée à une diminution de la production de ROS.

Dans un deuxième temps, nous avons montré qu'une surproduction mitochondriale de ROS par ajout de succinate entraîne une diminution d'au moins 40% de l'amplitude du raccourcissement des cardiomyocytes. L'ensemble des antioxydants utilisés (à l'exception de la NAC) corrige la diminution de l'amplitude de raccourcissement des cardiomyocytes secondaire à la surproduction mitochondriale de ROS. Pour ce qui concerne le cas particulier de la NAC, plusieurs études ont montré que ses effets, pour s'exprimer, requièrent que les cellules soient incubées en présence de NAC au minimum 1h avant les mesures (Redpath *et al.*, 2013) ; (Ayaz & Yanardag, 2018). En ce qui concerne l'EUK nous avons montré une légère correction de la diminution de l'amplitude de raccourcissement des cardiomyocytes secondaire à la surproduction mitochondriale de ROS, mais que cet effet est contrebalancé par son arythmogénicité. De surcroît, l'effet antioxydant de l'EUK est moindre que celui des autres molécules utilisées dans la mesure où, à sa concentration maximale de 100μM, il ne diminue la production mitochondriale de ROS que de 40% alors que les autres antioxydants la diminuent d'environ 80%. Nous constatons enfin que les deux antioxydants les plus efficaces au regard de leur capacité à corriger la diminution de l'amplitude de raccourcissement des cardiomyocytes secondaire à la surproduction mitochondriale de ROS sont OP2113 et le MitoTEMPO, deux

antioxydants spécifiques de la production mitochondriale de ROS. L'ensemble de ces résultats tend à montrer que les ROS sont impliqués dans la modulation de la contraction et que, dans notre modèle expérimental, les ROS impliqués sont bien d'origine mitochondriale.

Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus par l'équipe de J. Fauconnier (Fauconnier *et al.*, 2007) qui a montré que l'ajout du substrat palmitate induisait une augmentation de la production de ROS, inhibée par la NAC et que, dans ces conditions, l'amplitude de contraction des cardiomyocytes était diminuée de plus de 20%. D'autres études ont montré que l'augmentation de la concentration d' $O_2^{\cdot -}$  par un ajout direct de radicaux oxygénés ralentit la contraction ainsi que la relaxation (Rueckschloss *et al.*, 2010) ;(MacFarlane & Miller, 1992).

Au-delà d'une diminution de l'amplitude du raccourcissement, on constate également que la surproduction mitochondriale de ROS diminue également la vitesse du raccourcissement. Les effets observés sur l'amplitude du raccourcissement et sur sa vitesse peuvent naturellement être liés l'un à l'autre : une plus grande vitesse de raccourcissement résulte « naturellement » en une plus grande amplitude de raccourcissement, cela d'autant plus que, rappelons-le, les cardiomyocytes se contractent ici contre une charge nulle. On peut aussi émettre l'hypothèse que ces deux effets résultent de deux mécanismes distincts. L'effet des ROS sur l'amplitude de contraction pourrait plutôt procéder d'un effet (une diminution en l'occurrence) sur le nombre de molécules de troponine C fixant le calcium qui pourrait avoir plusieurs origines, aux premier rang desquels on peut évoquer une diminution de la libération de calcium depuis le réticulum sarcoplasmique ou une diminution de l'affinité de la troponine C pour le calcium. L'effet observé sur la vitesse de raccourcissement des cardiomyocytes qui, rappelons-le une nouvelle fois, se contractent ici contre une charge nulle, est indépendant du nombre de ponts actifs mais relèverait plutôt d'une diminution de la vitesse intrinsèque du turnover des ponts actine-myosine dont l'origine serait plutôt à rechercher au niveau d'un effet sur l'activité ATPasique de la myosine. A ce titre, il convient de relever que le Trolox qui induit, comme OP2113 et le Mito Tempo, une augmentation de l'amplitude de contraction, ne semble pas avoir d'effet sur la vitesse de contraction. Cette observation suggère que l'effet des antioxydants sur l'amplitude du raccourcissement procède de mécanismes différents de celui observé sur sa vitesse. Il serait nécessaire, pour les explorer plus en profondeur ces hypothèses, de procéder en première approche à des mesures de force de contraction contre une post-charge variable, en isométrie et en isotonie.

Enfin on observe une augmentation de la vitesse de relaxation (augmentation de  $\tau^{-1}$ ) en présence d'OP2113 ou de Mito Tempo. Cet effet évoque en premier lieu une augmentation de la vitesse de recapture du calcium vers le réticulum sarcoplasmique *via* un effet au niveau de la calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique, ou une diminution de l'affinité de la troponine C pour le calcium. A ce titre, le Trolox qui induit, comme OP2113 et le MitoTEMPO, une augmentation de l'amplitude de contraction, ne semble pas avoir d'effet sur la vitesse de la relaxation. Cette observation suggère que l'effet des ROS sur la relaxation relève essentiellement de leur production mitochondriale.

Étonnamment en présence d'EUK nous avons remarqué une augmentation significative de la probabilité d'occurrence d'épisodes d'arythmie (Figure 78). Il est difficile d'interpréter ce phénomène en profondeur. L'EUK pourrait, par exemple perturber (en le relevant) le potentiel de la membrane sarcolemmale *via* des effets directs sur des canaux ioniques ou plus probablement favoriser la libération de calcium depuis le réticulum sarcoplasmique subsarcolemmal *via* un effet au niveau de RyR<sub>2</sub> comme cela a été montré dans l'étude (Watanabe *et al.*, 2019).

### 5) Étude du mode d'action des ROS sur la contraction

L'événement déclenchant de la contraction musculaire est une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Au repos, cette concentration est d'environ 0,1 µM. Lors d'une stimulation, cette concentration peut augmenter jusqu'à 0,1 mM localement dans les microdomaines, soit une augmentation d'un facteur 1 000. Il existe deux sources de calcium qui contribuent au transitoire calcique intracellulaire. Il s'agit d'une part du calcium extracellulaire qui pénètre au sein du cardiomyocyte *via* le LTCC et qui contribue à hauteur de 10 à 30% au transitoire calcique systolique, d'autre part la libération du calcium depuis le réticulum sarcoplasmique qui compte pour la majeure partie du transitoire calcique systolique.

La quantité de calcium libérée est le déterminant essentiel, *via* sa fixation sur la troponine C, du nombre de ponts actine-myosine qui vont se former, et donc de la force de contraction.

L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire ne dure que quelques millisecondes. Le retour à la situation

initiale est rapidement obtenu par l'action convergente de la recapture du calcium vers le réticulum sarcoplasmique par la SERCA, et son expulsion vers le milieu extracellulaire par le transporteur NCX et la calcium ATPase de la membrane plasmique. Dans la Figure 101 nous pouvons voir les différentes phases (1 à 7) de la contraction, et donc les sites potentiels d'action des ROS en lien direct avec le calcium.

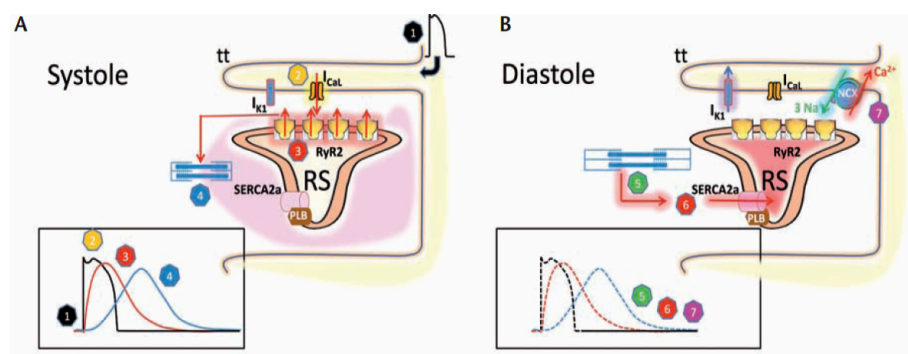


Figure 101 Sites potentiels d'action des ROS au moment du couplage excitation-contraction

Les numéros 1 à 7 correspondent aux différentes phases du couplage excitation-contraction. 1 : prolongation du potentiel d'action le long de la membrane plasmique ; 2 : ouverture des canaux de type L par la dépolarisation, entrée du calcium extracellulaire dans la cellule ; 3 : calcium induced calcium released *via* l'ouverture des canaux RyR<sub>2</sub>, augmentation du transitoire calcique ; 4 : activation de la contraction ; 5 : calcium libéré des protéines contractiles ; 6 : recapture du calcium par la SERCA (stocké dans le RS) ; 7 : sortie du calcium dans le milieu extracellulaire *via* NCX pour un retour à l'état diastolique (J.L.Pasquié ; S. Richard ; 2008).

Le canal à la ryanodine est un complexe tétramérique constitué de 89 résidus de cystéines. Sa conformation est influencée par la concentration en calcium cytosolique, le contenu calcique du RS, la protéine de liaison FK506BP et de nombreuses protéines kinases et phosphatases (Lim *et al.*, 2008) ;(Zima & Blatter, 2006). Le RyR est co-localisé avec un site de la NADPH oxydase qui est susceptible de générer localement des ROS en faible quantité. Cependant, même si elle est faible, cette quantité de ROS, parce que sa production a lieu à proximité immédiate du RyR, régule les signaux cellulaires et module le RyR (Zima & Blatter, 2006). Par ailleurs, il a été montré qu'une surproduction de ROS oxyde les groupes thiols du canal RyR2 et augmente ainsi sa probabilité d'ouverture au moment de la diastole (Köhler *et al.*, 2014) ;(Zima & Blatter, 2006) ;(Santos *et al.*, 2011) ;(Boraso & Williams, 1994). Ces changements (dépendants de la dose et du temps d'exposition des ROS ) induisent donc une diminution du contenu en  $Ca^{2+}$  du RS ainsi qu'une diminution du transitoire calcique systolique (Zhang *et al.*, 2014).

Un deuxième facteur clé du couplage excitation-contraction est l'activité de la SERCA. La SERCA possède 25 résidus cystéines (Zima & Blatter, 2006). Selon leur concentration les ROS vont activer ou inhiber l'activité de la SERCA (Köhler *et al.*, 2014). Une étude récente (Mustroph *et al.*, 2019) a montré qu'un stress oxydant induit par l'éthanol sur des cardiomyocytes stimule la CaMKII qui peut à son tour phosphoryler les différents acteurs de l'ECC. Cette étude montre notamment que la surproduction de ROS va à l'encontre de la fonction SERCA (en favorisant les fuites calciques du réticulum par le RyR<sub>2</sub>), ce qui participe à la diminution du transitoire calcique et donc de la contraction des cellules.

Dans notre modèle de surproduction mitochondriale de ROS, la diminution de l'amplitude de contraction est directement associée à une diminution de l'amplitude du transitoire calcique, due à une diminution de la concentration de calcium systolique. Cependant on ne constate pas d'allongement du  $T_{50}$  ou de la constante de temps de décaissement du transitoire calcique qui dépendent de l'activité de la SERCA. En effet dans l'étude de (Balderas-Villalobos *et al.*, 2013) un allongement du  $T_{50}$  a été observé et traduirait une fonction SERCA plus lente chez des cellules stressées. Nous pouvons supposer que la fuite du RyR<sub>2</sub> en période diastolique, diminue le contenu du RS et donc moins de calcium est disponible dans le réticulum sarcoplasmique pour la systole suivante. Il sera intéressant d'évaluer le contenu du RS en calcium et la fonction SERCA dans notre modèle par application de caféine et d'évaluer la réversibilité de ces changements en présence des antioxydants. En effet la caféine libère le calcium du réticulum sarcoplasmique si bien que l'amplitude du transitoire calcique induit en présence de caféine est un marqueur indirect de la recapture du calcium par la SERCA (Benoist *et al.*, 2012) ;(Zhang *et al.*, 2014) ;(Yang *et al.*, 2018) ;(Balderas-Villalobos *et al.*, 2013). Des expérimentations complémentaires de microscopie confocale pourraient également permettre de mettre en évidence et de quantifier la fuite de calcium par les RyR<sub>2</sub>.

Concernant les effets des antioxydants, il s'est avéré qu'une interaction entre MitoTEMPO et Fura4AM (sonde calcique utilisée pour nos mesures) perturbait, en les inhibant, les propriétés antioxydantes du MitoTEMPO.

Sur la base de ces considérations, nos résultats les plus pertinents sont donc ceux obtenus en présence de Trolox et d'OP2113. Trolox, et OP2113 corrigent la diminution de l'amplitude du transitoire calcique induite par le succinate transitoire calcique d'origine (Figure 83). L'effet du Trolox sur la contraction cardiaque a été démontré dans l'étude de (Distelmaier *et al.*, 2012). On peut donc inférer, sur la base de nos résultats et de cette étude, que le Trolox exerce un effet sur la SERCA en augmentant la recharge en calcium du réticulum sarcoplasmique lors de la relaxation qui est altérée par le stress oxydant induit par le succinate. Cela a pour effet de rétablir la recharge en calcium du réticulum sarcoplasmique lors de la relaxation et, en retour, l'amplitude du transitoire calcique déclenché par la stimulation cellulaire (Figure 102). L'effet du Trolox sur mitofusin2 permet de proposer un mécanisme pour expliquer cet effet. En effet, le Trolox stimule la production de mitofusin2, ce qui diminue la distance entre le réticulum sarcoplasmique et la mitochondrie facilitant l'augmentation de calcium mitochondrial via le couplage entre le canal IP<sub>3</sub> et RyR<sub>1</sub>. L'augmentation du calcium intra-mitochondrial stimule la respiration mitochondriale, donc la synthèse d'ATP, ce qui améliore la fonction de la SERCA (Figure 102).

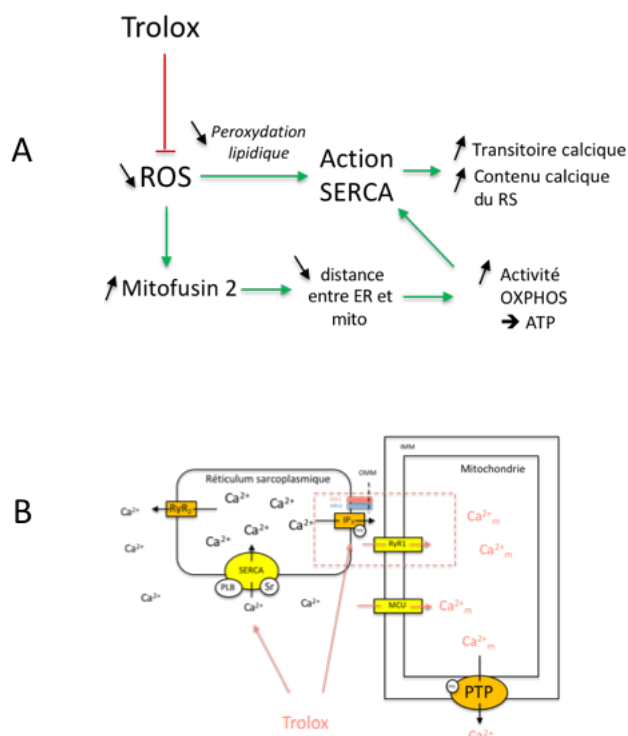


Figure 102 Régulation du transitoire calcique par le Trolox (adapté de Distelmaier *et al.*, 2012)

A- Le Trolox diminue la production de ROS et donc par la même occasion diminue la peroxydation lipidique cellulaire. Cela conduit à une augmentation de la quantité de mitofusine, et donc diminue la distance entre le réticulum sarcoplasmique et la mitochondrie. Cette réduction d'espace est associée à une activité accrue de la phosphorylation oxydative, de la consommation d'oxygène et donc de la formation d'ATP indispensable pour le bon fonctionnement de la SERCA. La flèche rouge représente une inhibition, alors que les flèches vertes une activation.

Le schéma B représente l'effet du Trolox sur la contraction cardiaque à partir des données établies par Distelmaier. Les modifications suite à l'ajout de Trolox sont représentées en orange, on constate une stimulation des micro domaines mitochondriaux entraînant une augmentation de la production de calcium mitochondrial.

Nous avons ensuite cherché à moduler la concentration de calcium mitochondrial pour compléter cette étude de l'impact des ROS mitochondriaux sur le couplage excitation-contraction dans les cellules cardiaques. Pour rappel nous avons utilisé deux inhibiteurs, la cyclosporine A qui inhibe l'ouverture du mPTP, et le Ru360 (analogue du Rouge de Ruthénium) qui inhibe le principal canal d'entrée du calcium dans la mitochondrie, le MCU (Figure 89).

Nous observons une certaine similarité des effets de CsA et de Ru360, que ce soit en conditions contrôle ou en conditions de surproduction mitochondriale de ROS, et que ce soit sur la production de ROS ou sur la contraction.

En conditions contrôle, CsA et de Ru360 n'affectent pas significativement la contraction. En revanche, de manière surprenante, CsA et de Ru360 augmentent la production de ROS en présence de Trolox et d'OP2113 uniquement (Figure 90 & Figure 92). Nous avons donc ici une condition expérimentale particulière dans laquelle, « exceptionnellement », une augmentation de la production de ROS n'est pas associée à une altération de la fonction contractile. Il est possible que l'absence d'effet mesurable sur la fonction contractile soit liée au fait que, même si les effets sur les ROS sont « significatifs » en valeur relative, ils ne sont pas « signifiants » en valeur absolue puisqu'ils demeurent bas en conditions contrôle, que ce soit en présence ou en l'absence de Trolox ou d'OP2113. Curieusement, cette augmentation n'est pas observée en présence de MitoTEMPO (ni EUK) qui ne modifie pas la production globale de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les cellules. Le même effet (augmentation de ROS en conditions contrôle) est obtenu après addition de Ru360 en présence de Trolox alors que nous n'observons qu'une tendance non significative à la baisse des ROS en présence d'OP2113 (Figure 92).

L'augmentation de calcium mitochondrial par la cyclosporine A *via* la fermeture du mPTP, est connue depuis maintenant de nombreuses années (Fournier *et al.*, 1987) et devrait, en suivant le raisonnement de Brookes (Brookes, 2004) augmenter la production mitochondriale de ROS. La cyclosporine A agit également sur les cyclophilines A et D cytosoliques. Le complexe CsA-CypA inhibe la calcineurine au niveau cytoplasmique. La calcineurine est une serine thréonine phosphatase calcium/calmoduline dépendante (Gennai *et al.*, 2013). Il a été également montré que la cyclophiline D régule le canal IP<sub>3</sub> présent au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique et impliqué dans des micro domaines mitochondriaux (Rieusset *et al.*, 2013).

En conditions de surproduction mitochondriale de ROS par le succinate nous observons que la cyclosporine A diminue significativement la surproduction de ROS. L'étude (Rieusset *et al.*, 2013) a montré qu'une inhibition de la cyclophiline D par la cyclosporine A entraîne un stress du réticulum sarcoplasmique en modifiant la composition protéique des MAM (Association Mitochondrie et Membrane du réticulum sarcoplasmique) altérant ainsi le transfert calcique entre le réticulum sarcoplasmique et la mitochondrie. Cette altération a pour conséquence une diminution du calcium mitochondrial (Rieusset *et al.*, 2013), et donc une diminution de la production de ROS mitochondriaux. Le groupe de Chen a aussi montré que, dans certaines conditions, l'ajout de la cyclosporine A pouvait provoquer une diminution de la production de ROS induite par un ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chen *et al.*, 2002). Ces effets non-mitochondriaux de la CsA au niveau de la régulation du canal IP<sub>3</sub> pourraient être à l'origine des résultats observés en présence de succinate. Il serait donc particulièrement intéressant de tester un inhibiteur du mPTP qui n'ait pas d'effet immunosuppresseur et qui n'inhiberait pas la calcineurine, par exemple le Nim811 (Javadov *et al.*, 2009).

De manière surprenante cette diminution de la production de ROS par la cyclosporine A n'est pas accompagnée d'une amélioration mesurable de la fonction contractile. Cela peut faire supposer que le calcium piégé dans la mitochondrie par la cyclosporine A n'est plus disponible pour la cellule lors de la contraction. Cette hypothèse est en parfait accord avec le fait que



comme l'a démontré l'équipe, le calcium mitochondrial est impliqué dans le couplage excitation- contraction cardiaque.

Un autre résultat marquant et de prime abord surprenant concerne l'effet du Trolox en présence de CsA. En effet, en condition de surproduction mitochondriale de ROS par le succinate et en présence de Trolox, on constate que la cyclosporine A induit une augmentation (un quasi doublement) de la production de ROS associée à une diminution de la contraction (Figure 91). Une étude de Distelmaier (Distelmaier *et al.*, 2012) suggère que le Trolox pourrait, *via* son action sur les ROS, améliorer l'interaction entre le RS et la mitochondrie, ce qui favoriserait l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial et la production de ROS (Brookes, 2004). Ceci pourrait expliquer qu'en présence de Trolox et de cyclosporine A, nous observions une production plus importante de ROS en comparaison avec l'absence de CsA (voir Figure 103).

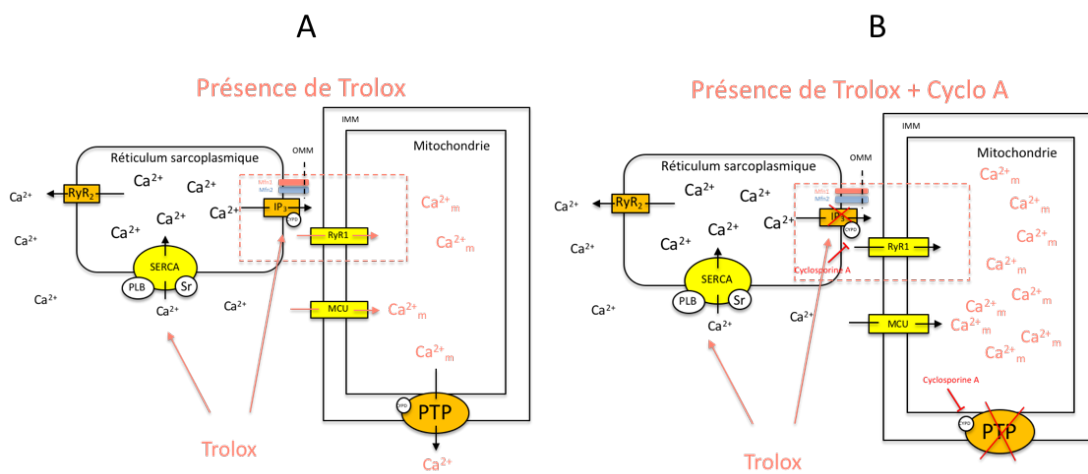


Figure 103 Couplage excitation-contraction en présence de Trolox et de cyclosporine A

A- Effets du Trolox sur la contraction cardiaque avec la stimulation de la SERCA, et la diminution de l'espace entre la mitochondrie et le réticulum sarcoplasmique favorisant leur communication et donc le transport de calcium à l'intérieur de la mitochondrie. On distingue donc dans ce cas une accumulation de calcium dans la mitochondrie qui est expulsé par l'ouverture transitoire du pore de perméabilité.

B- En présence de cyclosporine l'ouverture du pore est inhibée, donc le calcium ne peut plus s'échapper de la mitochondrie. Cependant le Trolox continue de stimuler l'accumulation de calcium par le réticulum. On obtient donc une surcharge calcique mitochondriale qui entraîne une augmentation de la production de ROS mitochondriaux.

# CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVE

## Conclusion Générale

En conclusion, ce travail de thèse apporte de nouveaux éclairages sur l'impact des radicaux libres mitochondriaux dans le couplage excitation-contraction.

Nous avons dans un premier temps réussi à établir un modèle de surproduction de ROS spécifiquement d'origine mitochondriale par supplémentation en succinate des cardiomyocytes. Comme résumé dans la Figure 104, nous avons utilisé une série d'antioxydants (couleur orange sur la Figure 104) qui agissent à différents niveaux de la production cellulaire de ROS ainsi que de l'élimination des ROS mitochondriaux :

- OP2133 inhibe spécifiquement la production de ROS directement au niveau du site IQ de la chaîne respiratoire mitochondriale.
- MitoTEMPO s'accumule dans les mitochondries et mime l'effet de la superoxyde dismutase en transformant les anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène
- L'EUK s'accumule lui-aussi dans la mitochondrie et mime l'effet de la SOD et de la catalase.
- Le Trolox quant à lui cible les ROS présents dans le cytosol, qu'ils soient d'origine mitochondriale ou non. Il ne rentre pas dans la mitochondrie.

Grace à l'utilisation de l'ensemble de ces antioxydants nous avons pu cibler spécifiquement les effets des ROS mitochondriaux au niveau du couplage excitation-contraction. Ce qui nous a d'abord permis de montrer que l'essentiel des ROS produits par les cardiomyocytes en présence de succinate sont d'origine mitochondriale

Des études précédentes réalisées en conditions de stress oxydant, ont déjà montré qu'une surproduction de ROS perturbe la fonction contractile des cardiomyocytes. Notre étude fait la même observation dans des conditions où la surproduction de ROS est spécifiquement mitochondriale. Nous avons donc montré qu'en présence d'une surproduction de ROS mitochondriaux de l'ordre d'un facteur 10, l'amplitude de contraction des cardiomyocytes est diminuée de 40%, et que les vitesses de raccourcissement et de relaxation sont significativement ralenties. Cette diminution du raccourcissement des sarcomères est associée à une diminution de la concentration de calcium en systole. Par oxydation du RyR<sub>2</sub>, les ROS peuvent augmenter la fuite calcique depuis le réticulum et donc participer à la baisse du contenu calcique du réticulum. En conséquence, une surproduction de ROS mitochondriaux est susceptible d'induire une surcharge calcique intracellulaire et une baisse du transitoire calcique. Comme nous l'avons vu dans la discussion, il serait intéressant d'étudier si cette surcharge calcique est associée à une inhibition de l'activité SERCA et/ou à une diminution de l'affinité de la troponine C pour le calcium (flèche pointillé rouge sur la Figure 104) . Nous pourrions également utiliser un agent pharmacologique pour restaurer l'activité de la SERCA lors de la surproduction de ROS mitochondriaux (Qaisar *et al.*, 2019).

Ce travail précurseur soulève un certain nombre de questions et ouvre sur de nombreuses perspectives d'étude. Par exemple, nous pourrions également étudier CaMKII pour comprendre si la modification qu'entraîne les ROS mitochondriaux est directe ou indirecte

(Braun *et al.*, 2019). Pour comprendre le mode d'action du Trolox en présence de cyclosporine A, il serait intéressant d'analyser la concentration du calcium mitochondrial en utilisant Mitycam, une protéine fluorescente sensible au calcium mitochondrial (Bertero & Maack, 2018).

Comme nous l'avons vu, une surcharge de ROS mitochondriaux altère directement l'électrophysiologie et la machinerie contractile des cardiomyocytes en modifiant les protéines essentielles au couplage excitation-contraction.

Il est essentiel maintenant de comprendre les mécanismes impliqués lors des pathologies cardiaques et de cibler ceux impliquant la mitochondrie. Sur la base de l'observation selon laquelle les défenses antioxydantes sont diminuées pendant l'insuffisance cardiaque, une revue a analysé plus de 31 études expérimentales et cliniques ciblant les ROS cellulaires, et utilisant des antioxydants pour contrer la surproduction de ROS obtenue après une insuffisance cardiaque (van der Pol *et al.*, 2019). Cependant il apparaît qu'aucune de ces études n'a ciblé spécifiquement les ROS mitochondriaux. Nos travaux pourraient ainsi contribuer au développement de stratégies préventives et/ou thérapeutiques innovantes ciblant les mécanismes que nous avons identifiés, et surtout la production de ROS mitochondriale.

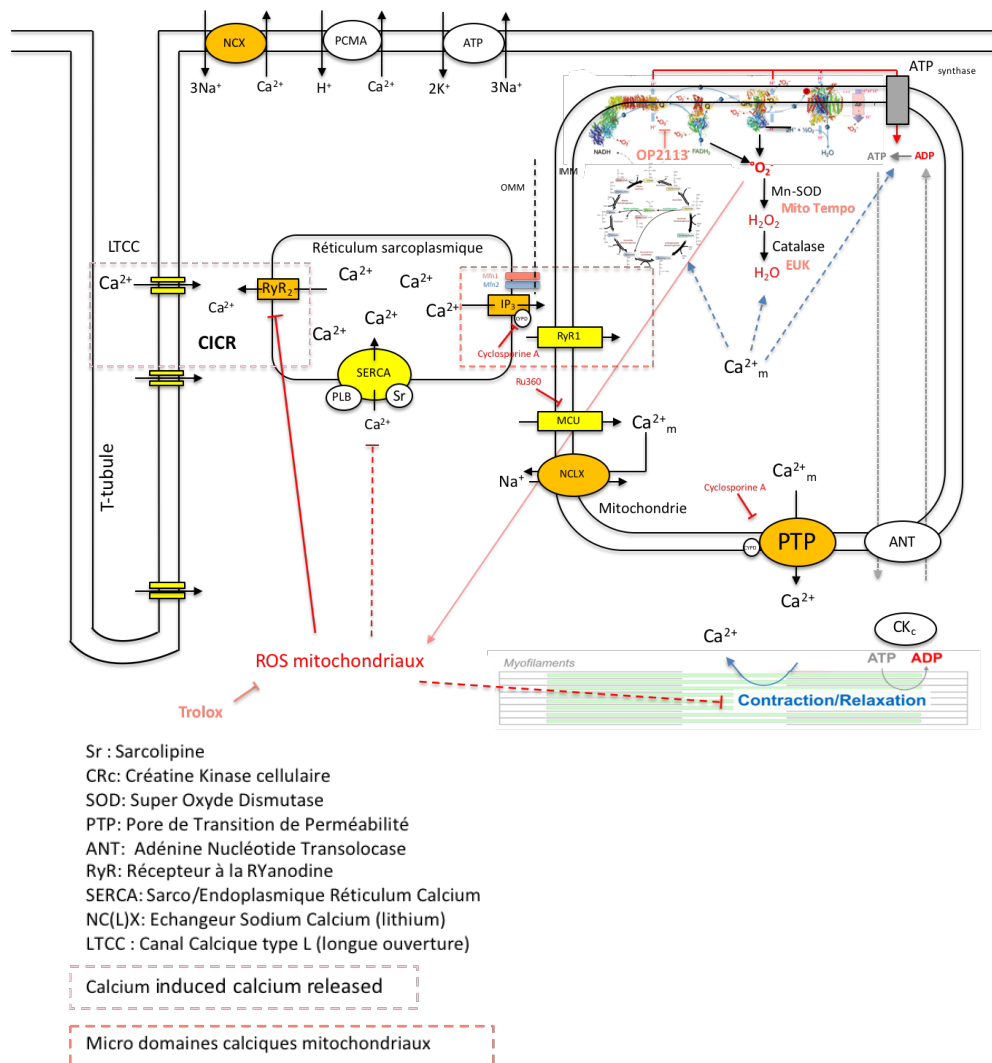


Figure 104 Schéma général de l'implication des ROS mitochondriaux dans le couplage ECC

Le couplage excitation-contraction se produit dans le T-tubule des cardiomyocytes. Après la décharge du potentiel d'action se produit une entrée de calcium dans la cellule. Cette augmentation de calcium intracellulaire stimule le réticulum sarcoplasmique qui a son tour libère le calcium du réticulum « CICR ». Une fois la contraction passée, le calcium sera recapturé par la SERCA dans le réticulum (régulée par le phospholamban et la sarcopiline) ou sorti de la cellule à travers les canaux: NCX, PCMA (présentés ici sur le haut de la cellule).

La mitochondrie et le canal IP3 du réticulum sarcoplasmique sont étroitement liés par les mitofusins (on parle de micro-domaines mitochondriaux). Ce canal IP3 est régulé par la cyclophiline D sensible à la cyclosporine A. Le calcium traverse la membrane mitochondriale à travers deux principaux canaux: le MCU (sensible au Ry360) et le RyR1. Une fois à l'intérieur de la mitochondrie le calcium stimule le cycle de Krebs, la production de ROS, et la phosphorylation oxydative. La chaîne de transport des électrons est composée de différents complexes qui comme nous l'avons vu sont à l'origine de la production d'espèces radicalaires de l'oxygène. Les systèmes de défense de la mitochondrie (Mn SOD et Catalase, principalement) permettent la régulation de la concentration de ROS physiologique. Sur le schéma apparaissent également les différents antioxydants utilisés, ainsi que leur mode d'action et leur cible (Trolox, OP2113, EUK, Mito Tempo)

Lors de la contraction des cardiomyocytes le calcium s'accumule dans la mitochondrie. L'augmentation de calcium intra-mitochondrial et la production d'espèces radicalaires de l'oxygène participent tous deux à l'ouverture transitoire du pore de transition de perméabilité, afin de libérer le calcium pour qu'il soit à nouveau stocké dans le réticulum pour la contraction suivante. Le mPTP est régulé entre autre par la cyclophiline D sensible à la cyclosporine A. Nous avons montré qu'une surproduction de ROS spécifiquement mitochondriaux diminue la concentration de calcium lors de la systole, et l'amplitude de la contraction. Pour ne pas surcharger le schéma la membrane externe mitochondriale n'a été représentée qu'au niveau des micros-domaines mitochondriaux.

# BIBLIOGRAPHIE

## Bibliographie

- Ajith, T.A. (2014) Mitochondria-targeted agents: Future perspectives of mitochondrial pharmaceuticals in cardiovascular diseases. *World J. Cardiol.*, **6**, 1091.
- Ayaz, M. & Yanardag, S. (2018) SAH-Induced Electrophysiological Changes of Ventricular Myocytes and Role of N-acetylcysteine Protection. *J. Neurol. Surg. Part A Cent. Eur. Neurosurg.*,
- Balderas-Villalobos, J., Molina-Munoz, T., Mailloux-Salinas, P., Bravo, G., Carvajal, K., & Gomez-Viquez, N.L. (2013) Oxidative stress in cardiomyocytes contributes to decreased SERCA2a activity in rats with metabolic syndrome. *AJP Hear. Circ. Physiol.*, **305**, H1344–H1353.
- Belaud-Rotureau, M.A., Leducq, N., Macouillard Poulletier de Gannes, F., Diolez, P., Lacoste, L., Lacombe, F., Bernard, P., & Belloc, F. (2000) Early transitory rise in intracellular pH leads to Bax conformation change during ceramide-induced apoptosis. *Apoptosis*, **5**, 551–560.
- Belaud-Rotureau, M., Macouillard-Poulletier de Gannes, F., Diolez, P., Canioni, P., Belloc, F., Voisin, P., & Leducq, N. (1998) Flow cytometric analysis of mitochondrial activity in situ: Application to acetylceramide-induced mitochondrial swelling and apoptosis. *Cytometry*, **33**, 333–339.
- Benoist, D., Stones, R., Drinkhill, M.J., Benson, A.P., Yang, Z., Cassan, C., Gilbert, S.H., Saint, D.A., Cazorla, O., Steele, D.S., Rernus, O., & White, E. (2012) Cardiac arrhythmia mechanisms in rats with heart failure induced by pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, **302**.
- Bers, D.M. (2002a) Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, **415**, 6868:198-205.
- Bers, D.M. (2002b) Cardiac excitation–contraction coupling **415**.
- Bertero, E. & Maack, C. (2018) Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. *Circ. Res.*, **122**, 1460–1478.
- Beutner, G., Sharma, V.K., Giovannucci, D.R., Yule, D.I., & Sheu, S.S. (2001) Identification of a Ryanodine Receptor in Rat Heart Mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **276**, 21482–21488.
- Boraso, A. & Williams, A.J. (1994) Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>- release channel by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and dithiothreitol. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, **267**.
- Bradford (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.

- Brand, M.D. (2016) Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, **100**, 14–31.
- Brand, M.D., Goncalves, R.L.S., Orr, A.L., Vargas, L., Gerencser, A.A., Borch Jensen, M., Wang, Y.T., Melov, S., Turk, C.N., Matzen, J.T., Dardov, V.J., Petrassi, H.M., Meeusen, S.L., Perevoshchikova, I. V., Jasper, H., Brookes, P.S., & Ainscow, E.K. (2016) Suppressors of Superoxide-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production at Site IQ of Mitochondrial Complex I Protect against Stem Cell Hyperplasia and Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab.*, **24**, 582–592.
- Brandes, R. & Bers, D.M. (1997) Intracellular Ca<sup>2+</sup> increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. *Circ. Res.*, **80**, 82–87.
- Braun, J.L., Hamstra, S.I., Messner, H.N., & Fajardo, V.A. (2019) SERCA2a tyrosine nitration coincides with impairments in maximal SERCA activity in left ventricles from tafazzin-deficient mice **7**, 1–9.
- Braz, J.C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., Kimball, T.F., Lorenz, J.N., Nairn, A.C., Liggett, S.B., Bodi, I., Wang, S., Schwartz, A., Lakatta, E.G., DePaoli-Roach, A.A., Robbins, J., Hewett, T.E., Bibb, J.A., Westfall, M. V, Kranias, E.G., & Molkenin, J.D. (2004) PKC- $\alpha$  regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat. Med.*, **10**, 248–254.
- Brette, F. & Orchard, C. (2007) Resurgence of cardiac T-tubule research. *Physiology*, **22**, 167–173.
- Brookes, P.S. (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *AJP Cell Physiol.*, **287**, C817–C833.
- Chance, B. & Williams, G.R. (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, **17**, 65–134.
- Chen, H.W., Chien, C.T., Yu, S.L., Lee, Y.T., & Chen, W.J. (2002) Cyclosporine A regulate oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: Mechanisms via ROS generation, iNOS and Hsp70. *Br. J. Pharmacol.*, **137**, 771–781.
- Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S.Y., Robb, E.L., Logan, A., Nadtochiy, S.M., Ord, E.N.J., Smith, A.C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C.H., Dare, A.J., James, A.M., Rogatti, S., Hartley, R.C., Eaton, S., Costa, A.S.H., Brookes, P.S., Davidson, S.M., Duchon, M.R., Saeb-Parsy, K., Shattock, M.J., Robinson, A.J., Work, L.M., Frezza, C., Krieg, T., & Murphy, M.P. (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, **515**, 431–435.
- Dai, P., Mao, Y., Sun, X., Li, X., Muhammad, I., Gu, W., Zhang, D., Zhou, Y., Ma, J., Ni, Z., & Huang, S. (2017) Attenuation of Oxidative Stress-Induced Osteoblast Apoptosis by Curcumin is Associated with Preservation of Mitochondrial Functions and Increased Akt-



- GSK3 $\beta$  Signaling. *Cell. Physiol. Biochem.*, **41**, 661–677.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.*, **52**, 601–623.
- De Giusti, V.C., Caldiz, C.I., Ennis, I.E., Pérez, N.G., Cingolani, H.E., & Aiello, E.A. (2013) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) as signaling molecules of intracellular pathways triggered by the cardiac renin-angiotensin II-aldosterone system (RAAS). *Front. Physiol.*, **4 MAY**, 1–9.
- De J García-Rivas, G., Carvajal, K., Correa, F., & Zazueta, C. (2006) Ru 360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, **149**, 829–837.
- De la Fuente, S. & Sheu, S.S. (2019) SR-mitochondria communication in adult cardiomyocytes: A close relationship where the Ca<sup>2+</sup> has a lot to say. *Arch. Biochem. Biophys.*, **663**, 259–268.
- Deschodt-Arsac, V., Calmettes, G., Gouspillou, G., Rouland, R., Thiaudiere, E., Miraux, S., Franconi, J.-M., & Diolez, P. (2010) System analysis of the effect of various drugs on cardiac contraction energetics. *Biochem. Soc. Trans.*, **38**, 1319–1321.
- Detaille, D., Pasdois, P., Semont, A., Dos Santos, P., Diolez, P. (2019) An old medicine as a new drug to prevent mitochondrial complex I from producing oxygen radicals. *PLoS One*, 1–19.
- Di Paola, M., Cocco, T., & Lorusso, M. (2000) Ceramide interaction with the respiratory chain of heart mitochondria. *Biochemistry*, **39**, 6660–6668.
- Diolez, P., Deschodt-Arsac, V., Calmettes, G., Gouspillou, G., Arsac, L., Dos Santos, P., Jais, P., & Haissaguerre, M. (2015) Integrative methods for studying cardiac energetics. *Methods Mol. Biol.*, **1264**, 289–303.
- Diolez, P., Deschodt-Arsac, V., Raffard, G., Simon, C., Santos, P. Dos, Thiaudière, E., Arsac, L., & Franconi, J.-M. (2006) Modular regulation analysis of heart contraction: application to in situ demonstration of a direct mitochondrial activation by calcium in beating heart. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.*, **293**, R13–R19.
- Diolez, P., Deschodt-Arsac, V., Raffard, G., Simon, C., Santos, P.D., Thiaudiere, E., Arsac, L., & Franconi, J.-M. (2007) Modular regulation analysis of heart contraction: application to in situ demonstration of a direct mitochondrial activation by calcium in beating heart. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **293**, R13–R19.
- Distelmaier, F., Valsecchi, F., Forkink, M., van Emst-de Vries, S., Swarts, H.G., Rodenburg, R.J.T., Verwiel, E.T.P., Smeitink, J.A.M., Willems, P.H.G.M., & Koopman, W.J.H. (2012) Trolox-Sensitive Reactive Oxygen Species Regulate Mitochondrial Morphology, Oxidative

Phosphorylation and Cytosolic Calcium Handling in Healthy Cells. *Antioxid. Redox Signal.*, **17**, 1657–1669.

Echtay, K.S., Murphy, M.P., Smith, R.A.J., Talbot, D.A., & Brand, M.D. (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side: Studies using targeted antioxidants. *J. Biol. Chem.*, **277**, 47129–47135.

Egea, J., Fabregat, I., Frapart, Y.M., Ghezzi, P., Görlach, A., Kietzmann, T., Kubaichuk, K., Knaus, U.G., Lopez, M.G., Olaso-Gonzalez, G., Petry, A., Schulz, R., Vina, J., Winyard, P., Abbas, K., Ademowo, O.S., Afonso, C.B., Andreadou, I., Antelmann, H., Antunes, F., Aslan, M., Bachschmid, M.M., Barbosa, R.M., Belousov, V., Berndt, C., Bernlohr, D., Bertrán, E., Bindoli, A., Bottari, S.P., Brito, P.M., Carrara, G., Casas, A.I., Chatzi, A., Chondrogianni, N., Conrad, M., Cooke, M.S., Costa, J.G., Cuadrado, A., My-Chan Dang, P., De Smet, B., Debelec-Butuner, B., Dias, I.H.K., Dunn, J.D., Edson, A.J., El Assar, M., El-Benna, J., Ferdinandy, P., Fernandes, A.S., Fladmark, K.E., Förstermann, U., Giniatullin, R., Giricz, Z., Görbe, A., Griffiths, H., Hampl, V., Hanf, A., Herget, J., Hernansanz-Agustín, P., Hillion, M., Huang, J., Ilikay, S., Jansen-Dürr, P., Jaquet, V., Joles, J.A., Kalyanaraman, B., Kaminsky, D., Karbaschi, M., Kleanthous, M., Klotz, L.O., Korac, B., Korkmaz, K.S., Koziel, R., Kračun, D., Krause, K.H., Křen, V., Krieg, T., Laranjinha, J., Lazou, A., Li, H., Martínez-Ruiz, A., Matsui, R., McBean, G.J., Meredith, S.P., Messens, J., Miguel, V., Mikhed, Y., Milisav, I., Milković, L., Miranda-Vizueté, A., Mojović, M., Monsalve, M., Mouthuy, P.A., Mulvey, J., Münzel, T., Muzykantov, V., Nguyen, I.T.N., Oelze, M., Oliveira, N.G., Palmeira, C.M., Papaevgeniou, N., Pavićević, A., Pedre, B., Peyrot, F., Phylactides, M., Pircalabioru, G.G., Pitt, A.R., Poulsen, H.E., Prieto, I., Rigobello, M.P., Robledinos-Antón, N., Rodríguez-Mañas, L., Rolo, A.P., Rousset, F., Ruskovska, T., Saraiva, N., Sasson, S., Schröder, K., Semen, K., Seredenina, T., Shakirzyanova, A., Smith, G.L., Soldati, T., Sousa, B.C., Spickett, C.M., Stancic, A., Stasia, M.J., Steinbrenner, H., Stepanić, V., Steven, S., Tokatlidis, K., Tuncay, E., Turan, B., Ursini, F., Vacek, J., Vajnerova, O., Valentová, K., Van Breusegem, F., Varisli, L., Veal, E.A., Yalçın, A.S., Yelisyeyeva, O., Žarković, N., Zatloukalová, M., Zielonka, J., Touyz, R.M., Papapetropoulos, A., Grune, T., Lamas, S., Schmidt, H.H.H.W., Di Lisa, F., & Daiber, A. (2017) European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biol.*, **13**, 94–162.

Fournier, N., Ducet, G., & Crevat, A. (1987) Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **19**, 297–303.

Ga, J.B., Gea, J., Barreiro, E., & Sa, D. (2005) N-acetylcysteine increases manganese superoxide dismutase activity in septic rat diaphragms. *Antioxid. Redox Signal.*, **26**, 1032–1039.

Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., Galadari, A., & Thayyullathil, F. (2013) Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms: MedSök Region Skåne 1–16.

- Gennai, S., Pison, C., & Briot, R. (2013) Cyclosporine A: From immunomodulation to prevention of ischemia-reperfusion injuries. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*, **32**, 886–887.
- Gill, J.S., McKenna, W.J., & Camm, A.J. (1995) Free radicals irreversibly decrease Ca<sup>2+</sup> currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, **292**, 337–340.
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015) Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.*, **6**, 260–271.
- Griffiths, E.J., Balaska, D., & Cheng, W.H.Y. (2010) The ups and downs of mitochondrial calcium signalling in the heart. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1797**, 856–864.
- Halestrap, A.P., Connern, C.P., Griffiths, E.J., & Kerr, P.M. (1997) 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, A.P. & Pasdois, P. (2009) The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1402–1415.
- Hamilton, S., Terentyeva, R., Kim, T.Y., Bronk, P., Clements, R.T., O-Uchi, J., Csordás, G., Choi, B.-R., & Terentyev, D. (2018) Pharmacological Modulation of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Content Regulates Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Release via Oxidation of the Ryanodine Receptor by Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species. *Front. Physiol.*, **9**.
- Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., & Cadenas, E. (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.*, **278**, 5557–5563.
- Hashad, A.M., Sancho, M., Brett, S.E., & Welsh, D.G. (2018) Reactive Oxygen Species Mediate the Suppression of Arterial Smooth Muscle T-type Ca<sup>2+</sup> Channels by Angiotensin II. *Sci. Rep.*, **8**, 1–11.
- HILL, A. V (1949) The abrupt transition from rest to activity in muscle. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.*, **136**, 399–420.
- Javadov, S., Karmazyn, M., & Escobales, N. (2009) Mitochondrial permeability transition pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **330**, 670–678.
- Jeremy Fauconnier, Daniel C. Andersson, Shi-Jin Zhang, Johanna T. Lanner, Rolf Wibom, Abram Katz, Joseph D. Bruton, and H.W. (2007) Effects of Palmitate on Ca<sup>2+</sup> and ob/ob Cardiomyocytes Handling. *Diabetes*, **56**, 1136–1142.
- Kai-Chien Yanga, Marcelo G. Boninia, c, d, and S.C.D.J.. aLifespan (2014) Mitochondria and Arrhythmias. *Free Radic Biol Med.* 2014, **71**, 3831–3840.
- Kim, H., Bae, S., Kim, Y., Cho, C.H., Kim, S.J., Kim, Y.J., Lee, S.P., Kim, H.R., Hwang, Y. Il, Kang,

- J.S., & Lee, W.J. (2013) Vitamin C prevents stress-induced damage on the heart caused by the death of cardiomyocytes, through down-regulation of the excessive production of catecholamine, TNF- $\alpha$ , and ROS production in Gulo(-/-) Vit C-Insufficient mice. *Free Radic. Biol. Med.*, **65**, 573–583.
- Kogot-Levin, A. & Saada, A. (2014) Ceramide and the mitochondrial respiratory chain. *Biochimie*, **100**, 88–94.
- Köhler, A.C., Sag, C.M., & Maier, L.S. (2014) Reactive oxygen species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **73**, 92–102.
- Kohlhaas, M. & Maack, C. (2013) Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovasc. Res.*, **98**, 259–268.
- Kohlhaas, M., Nickel, A.G., & Maack, C. (2017) Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart. *J. Physiol.*, **595**, 3753–3763.
- Kwong, J.Q. (2017) The mitochondrial calcium uniporter in the heart: energetics and beyond. *J. Physiol.*, **595**, 3743–3751.
- Leducq, N., Macouillard, F., Belaud, M.A., Belloc, F., Voisin, P., Canioni, P., Dioloz, P. (2002) Top down analysis ceramide-induced mitochondrial dysfunctions: role of mitochondrial swelling. *Mol. Biol. Rep.*, **29**, 47–50.
- Lee, H.B., Yu, M.R., Song, J.S., & Ha, H. (2004) Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.*, **65**, 1170–1179.
- Lim, G., Venetucci, L., Eisner, D.A., & Casadei, B. (2008) Does nitric oxide modulate cardiac ryanodine receptor function? Implications for excitation-contraction coupling. *Cardiovasc. Res.*, **77**, 256–264.
- Lu, X., Kwong, J.Q., Molkenin, J.D., & Bers, D.M. (2016) Individual cardiac mitochondria undergo rare transient permeability transition pore openings. *Circ. Res.*, **118**, 834–841.
- MacFarlane, N.G. & Miller, D.J. (1992) Depression of peak force without altering calcium sensitivity by the superoxide anion in chemically skinned cardiac muscle of rat. *Circ. Res.*, **70**, 1217–1224.
- MacLennan, D.H. & Kranias, E.G. (2003) Phospholamban: A crucial regulator of cardiac contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 566–577.
- Madreiter-Sokolowski, C.T., Gottschalk, B., Parichatikanond, W., Eroglu, E., Klec, C., Waldeck-Weiermair, M., Malli, R., & Graier, W.F. (2016) Resveratrol Specifically Kills Cancer Cells by a Devastating Increase in the Ca<sup>2+</sup> Coupling between the Greatly Tethered Endoplasmic Reticulum and Mitochondria. *Cell. Physiol. Biochem.*, **39**, 1404–1420.

- Maier, L.S. & Bers, D.M. (2007) Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc. Res.*, **73**, 631–640.
- Mallia, A.K., Frovenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Olson, B.J., Klenk, D.C., & Company, P.C. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid ' **85**, 76–85.
- Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., & Fritsch, P. (2004) Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Medecine/Sciences*, **20**, 458–463.
- Michael Kohlhaas, PhD, Ting Liu, PhD, Andreas Knopp, PhD, Tanja Zeller, PhD, Mei Fang Ong, PhD, Michael Böhm, MD, Brian O'Rourke, PhD, and Christoph Maack, M. (2010) Elevated Cytosolic Na<sup>+</sup> Increases Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species in Failing Cardiac Myocytes. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, **13**, 1606–1613.
- Mills, E.L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A.S.H., Varma, M., Bryant, C.E., Turlomousis, P., Däbritz, J.H.M., Gottlieb, E., Latorre, I., Corr, S.C., McManus, G., Ryan, D., Jacobs, H.T., Szibor, M., Xavier, R.J., Braun, T., Frezza, C., Murphy, M.P., & O'Neill, L.A. (2016) Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*, **167**, 457-470.e13.
- Mills, E.L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A.S.H.H., Varma, M., Bryant, C.E., Turlomousis, P., Däbritz, J.H.M., Gottlieb, E., Latorre, I., Corr, S.C.S.C., McManus, G., Ryan, D., Jacobs, H.T., Szibor, M., Xavier, R.J., Braun, T., Frezza, C., Murphy, M.P., O'Neill, L.A., Däbritz, J.H.M., Gottlieb, E., Latorre, I., Corr, S.C.S.C., McManus, G., Ryan, D., Jacobs, H.T., Szibor, M., Xavier, R.J., Braun, T., Frezza, C., Murphy, M.P., & O'Neill, L.A. (2016) Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*, **167**, 457-470.e13.
- Moris, D., Spartalis, M., Tzatzaki, E., Spartalis, E., Karachaliou, G.-S., Triantafyllis, A.S., Karaolani, G.I., Tsilimigras, D.I., & Theocharis, S. (2017) The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation. *Ann. Transl. Med.*, **5**, 324–324.
- Munshi, N., Fernandis, A.Z., Cherla, R.P., Park, I.-W., & Ganju, R.K. (2002) Lipopolysaccharide-Induced Apoptosis of Endothelial Cells and Its Inhibition by Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Immunol.*, **168**, 5860–5866.
- Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.*, **417**, 1–13.
- Mustroph, J., Lebek, S., Maier, L.S., & Neef, S. (2019) Mechanisms of cardiac ethanol toxicity and novel treatment options. *Pharmacol. Ther.*, **197**, 1–10.
- Mustroph, J., Wagemann, O., Lebek, S., Tarnowski, D., Ackermann, J., Drzymalski, M., Pabel, S., Schmid, C., Wagner, S., Sossalla, S., Maier, L.S., & Neef, S. (2018) SR Ca<sup>2+</sup>-leak and

- disordered excitation-contraction coupling as the basis for arrhythmogenic and negative inotropic effects of acute ethanol exposure. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **116**, 81–90.
- Nerbonne, J.M. & Kass, R.S. (2005) Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol. Rev.*, **85**, 1205–1253.
- Nesterenko, C.A. and V.J.C.S. and S.R.Y.S.L.B. (2014) *The Role of Late INa in Development of Cardiac Arrhythmias*, Handbook of experimental pharmacology.
- Ni, R., Cao, T., Xiong, S., Fan, G., Lacefield, J.C., Lu, Y., Tissier, S. Le, Peng, T., Sciences, M., Health, L., Centre, S., & Biophysics, M. (2016) Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med.*, 12–23.
- Nicholls, D.G. (2002) Mitochondrial function and dysfunction in the cell: Its relevance to aging and aging-related disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **34**, 1372–1381.
- Oda, T., Yang, Y., Uchinoumi, H., Thomas, D.D., Chen-izu, Y., Kato, T., Yamamoto, T., Yano, M., Cornea, R.L., & Donald, M. (2015) Oxidation of Ryanodine Receptor (RyR) and Calmodulin enhance Ca release and pathologically alter RyR structure and Calmodulin affinity. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **85**, 240–248.
- Orr, A.L., Ashok, D., Sarantos, M.R., Shi, T., Hughes, R.E., & Brand, M.D. (2013) Inhibitors of ROS production by the ubiquinone-binding site of mitochondrial complex i identified by chemical screening. *Free Radic. Biol. Med.*, **65**, 1047–1059.
- Periasamy, M. & Kalyanasundaram, A. (2007) SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle and Nerve*, **35**, 430–442.
- Piot, C. (2010) Applications cliniques du pré- et du post-conditionnement myocardiques.
- Pucheu, S., Boucher, F., & Sulpice, T. (1996) EUK-8 a Synthetic Catalytic Scavenger of Reactive Oxygen Species Protects Isolated Iron-Overloaded Rat Heart from Functional and Structural Damage Induced by Ischemia / Reperfusion 331–339.
- Qaisar, R., Bhaskaran, S., Ranjit, R., Sataranatarajan, K., Premkumar, P., Huseman, K., & Van Remmen, H. (2019) Restoration of SERCA ATPase prevents oxidative stress-related muscle atrophy and weakness. *Redox Biol.*, **20**, 68–74.
- Quinlan, C.L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., Orr, A.L., & Brand, M.D. (2013) Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol.*, **1**, 304–312.
- Rajesh, K.G., Sasaguri, S., Suzuki, R., & Maeda, H. (2003) Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability transition pore and upregulates Bcl-2 expression. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, **285**, 2171–2178.

- Redpath, C.J., Bou Khalil, M., Drozdzal, G., Radisic, M., & McBride, H.M. (2013) Mitochondrial Hyperfusion during Oxidative Stress Is Coupled to a Dysregulation in Calcium Handling within a C2C12 Cell Model. *PLoS One*, **8**.
- Rieusset, J., Fauconnier, J., Paillard, M., Belaidi, E., Tubbs, E., Chauvin, M., Durand, A., Bravard, A., Teixeira, G., Bartosch, B., Michelet, M., Theurey, P., Vial, G., Demion, M., Blond, E., Zoulim, F., Gomez, L., Vidal, H., Lacampagne, A., & Ovize, M. (2013) Retraction statement: Disruption of cyclophilin D-mediated calcium transfer from the endoplasmic reticulum to mitochondria contributes to hepatic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance. *Hepatology*, **58**, 1195.
- Rueckschloss, U., Villmow, M., & Klöckner, U. (2010) NADPH oxidase-derived superoxide impairs calcium transients and contraction in aged murine ventricular myocytes. *Exp. Gerontol.*, **45**, 788–796.
- Sag, C.M., Wagner, S., & Maier, L.S. (2013) Role of oxidants on calcium and sodium movement in healthy and diseased cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, **63**, 338–349.
- Salvemini, D., Doyle, T.M., & Cuzzocrea, S. (2006) Superoxide , peroxynitrite and oxidative / nitritative stress in inflammation 965–970.
- Sanmartín, C.D., Veloso, P., Adasme, T., Lobos, P., Bruna, B., Galaz, J., García, A., Hartel, S., Hidalgo, C., & Paula-Lima, A.C. (2017) RyR2-mediated Ca<sup>2+</sup> release and mitochondrial ROS generation partake in the synaptic dysfunction caused by amyloid  $\beta$  peptide oligomers. *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 1–17.
- Santos, C.X.C., Anilkumar, N., Zhang, M., Brewer, A.C., & Shah, A.M. (2011) Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, **50**, 777–793.
- Sena, L.A. & Chandel, N.S. (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell*, **48**, 158–167.
- Smith, R.A.J. & Murphy, M.P. (2011) Mitochondria-targeted antioxidants as therapies. *Discov. Med.*, **11**, 106–114.
- Sovari, A.A. & Dudley, S.C. (2012) Reactive oxygen species-targeted therapeutic interventions for atrial fibrillation. *Front. Physiol.*, **3 AUG**, 1–14.
- Taherian, R., Stigliani, S., Carra, E., Monteghirfo, S., Longo, L., Daga, A., Dono, M., Zupo, S., Giaretti, W., & Castagnola, P. (2014) NAC, tiron and trolox impair survival of cell cultures containing glioblastoma tumorigenic initiating cells by inhibition of cell cycle progression massimiliano monticone1. *PLoS One*, **9**.
- Turrens, J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, **552**, 335–344.
- van der Pol, A., van Gilst, W.H., Voors, A.A., & van der Meer, P. (2019) Treating oxidative stress

- in heart failure: past, present and future. *Eur. J. Heart Fail.*, **21**, 425–435.
- Villagrasa, V., Cortijo, J., & Martlcahrer, M. (1997) Inhibitory Effects of N-acetylcysteine on Superoxide Anion Generation in Human Polymorphonuclear Leukocytes 525–529.
- Wagner, S., Rokita, A.G., Anderson, M.E., & Maier, L.S. (2013) Redox Regulation of Sodium and Calcium Handling. *Antioxid. Redox Signal.*, **18**, 1063–1077.
- Wang, S., He, F., Li, Z., Hu, Y., Huangfu, N., & Chen, X. (2019) Y B I protects cardiac myocytes against H2O2-induced injury via suppression of PIAS3 mRNA and phosphorylation of STAT3. *Mol. Med. Rep.*, **19**, 4579–4588.
- Wang, S.Q., Lakatta, E.G., Cheng, H., & Zhou, Z.Q. (2002) Adaptive mechanisms of intracellular calcium homeostasis in mammalian hibernators. *J. Exp. Biol.*, **205**, 2957–2962.
- Wang, Y., Mao, X., Chen, H., Feng, J., Yan, M., Wang, Y., & Yu, Y. (2019) Dexmedetomidine alleviates LPS-induced apoptosis and inflammation in macrophages by eliminating damaged mitochondria via PINK1 mediated mitophagy. *Int. Immunopharmacol.*, **73**, 471–481.
- Watanabe, D., Aibara, C., & Wada, M. (2019) Treatment with EUK-134 improves sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release but not myofibrillar Ca<sup>2+</sup> sensitivity after fatiguing contraction of rat fast-twitch muscle. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **316**, R543–R551.
- Watson, M.A., Wong, H., & Brand, M.D. (2019) Use of S1QELs and S3QELs to link mitochondrial sites of superoxide and hydrogen peroxide generation to physiological and pathological outcomes 1–9.
- Xie, W., Santulli, G., Reiken, S.R., Yuan, Q., Osborne, B.W., Chen, B.X., & Marks, A.R. (2015) Mitochondrial oxidative stress promotes atrial fibrillation. *Sci. Rep.*, **5**, 1–11.
- Yamada, K.P., Yasuda, S., Yamashita, H., Sunagawa, K., Nishimura, S., Katoh, M., Hisada, T., Saeki, Y., Nagai, R., & Sugiura, S. (2004) Single cell mechanics of rat cardiomyocytes under isometric, unloaded, and physiologically loaded conditions. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, **287**, H196–H202.
- Yang, Z., Song, T., Truong, L., & Reyes-, J. (2018) Title of article : Important role of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release via ryanodine receptor - 2 channel in hypoxia - induced Rieske iron - sulfur protein - mediated mitochondrial ROS generation in pulmonary artery smooth muscle cells 1–33.
- Yeong-Renn Chen and Jay L. Zweier (2014) CARDIAC MITOCHONDRIA AND ROS GENERATION. *NIH Public Access*, **114**, 524–537.
- Zhang, C., Mo, M., Ding, W., Liu, W., Yan, D., Deng, J., Luo, X., & Liu, J. (2014) High-mobility group box 1 (HMGB1) impaired cardiac excitation-contraction coupling by enhancing the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca<sup>2+</sup> leak through TLR4-ROS signaling in cardiomyocytes. *J.*



*Mol. Cell. Cardiol.*, **74**, 260–273.

Zhang, Y.E., Huang, G.Q., Wu, B., Lin, X.D., Yang, W.Z., Ke, Z.Y., & Liu, J. (2019) Hydrogen sulfide protects H9c2 cardiomyoblasts against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **52**, 1–7.

Zima, A. V. & Blatter, L.A. (2006) Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc. Res.*, **71**, 310–321.

Zorov, D.B., Juhaszova, M., & Sollott, S.J. (2006) Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1757**, 509–517.

Zuo, L., Zhou, T., Pannell, B.K., Ziegler, A.C., & Best, T.M. (2015) Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol.*,.

Ajith, T.A. (2014) Mitochondria-targeted agents: Future perspectives of mitochondrial pharmaceuticals in cardiovascular diseases. *World J. Cardiol.*, **6**, 1091.

Ayaz, M. & Yanardag, S. (2018) SAH-Induced Electrophysiological Changes of Ventricular Myocytes and Role of N-acetylcysteine Protection. *J. Neurol. Surg. Part A Cent. Eur. Neurosurg.*,.

Balderas-Villalobos, J., Molina-Munoz, T., Mailloux-Salinas, P., Bravo, G., Carvajal, K., & Gomez-Viquez, N.L. (2013) Oxidative stress in cardiomyocytes contributes to decreased SERCA2a activity in rats with metabolic syndrome. *AJP Hear. Circ. Physiol.*, **305**, H1344–H1353.

Belaud-Rotureau, M.A., Leducq, N., Macouillard Poullétier de Gannes, F., Diolez, P., Lacoste, L., Lacombe, F., Bernard, P., & Belloc, F. (2000) Early transitory rise in intracellular pH leads to Bax conformation change during ceramide-induced apoptosis. *Apoptosis*, **5**, 551–560.

Belaud-Rotureau, M., Macouillard-Poullétier de Gannes, F., Diolez, P., Canioni, P., Belloc, F., Voisin, P., & Leducq, N. (1998) Flow cytometric analysis of mitochondrial activity in situ: Application to acetylceramide-induced mitochondrial swelling and apoptosis. *Cytometry*, **33**, 333–339.

Benoist, D., Stones, R., Drinkhill, M.J., Benson, A.P., Yang, Z., Cassan, C., Gilbert, S.H., Saint, D.A., Cazorla, O., Steele, D.S., Rernus, O., & White, E. (2012) Cardiac arrhythmia mechanisms in rats with heart failure induced by pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, **302**.

Bers, D.M. (2002a) Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, **415**, 6868:198-205.

Bers, D.M. (2002b) Cardiac excitation–contraction coupling **415**.

- Bertero, E. & Maack, C. (2018) Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. *Circ. Res.*, **122**, 1460–1478.
- Beutner, G., Sharma, V.K., Giovannucci, D.R., Yule, D.I., & Sheu, S.S. (2001) Identification of a Ryanodine Receptor in Rat Heart Mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **276**, 21482–21488.
- Boraso, A. & Williams, A.J. (1994) Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>- release channel by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and dithiothreitol. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, **267**.
- Bradford (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Brand, M.D. (2016) Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, **100**, 14–31.
- Brand, M.D., Goncalves, R.L.S., Orr, A.L., Vargas, L., Gerencser, A.A., Borch Jensen, M., Wang, Y.T., Melov, S., Turk, C.N., Matzen, J.T., Dardov, V.J., Petrassi, H.M., Meeusen, S.L., Perevoshchikova, I. V., Jasper, H., Brookes, P.S., & Ainscow, E.K. (2016) Suppressors of Superoxide-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production at Site IQ of Mitochondrial Complex I Protect against Stem Cell Hyperplasia and Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab.*, **24**, 582–592.
- Brandes, R. & Bers, D.M. (1997) Intracellular Ca<sup>2+</sup> increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. *Circ. Res.*, **80**, 82–87.
- Braun, J.L., Hamstra, S.I., Messner, H.N., & Fajardo, V.A. (2019) SERCA2a tyrosine nitration coincides with impairments in maximal SERCA activity in left ventricles from tafazzin-deficient mice **7**, 1–9.
- Braz, J.C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., Kimball, T.F., Lorenz, J.N., Nairn, A.C., Liggett, S.B., Bodi, I., Wang, S., Schwartz, A., Lakatta, E.G., DePaoli-Roach, A.A., Robbins, J., Hewett, T.E., Bibb, J.A., Westfall, M. V, Kranias, E.G., & Molkentin, J.D. (2004) PKC- $\alpha$  regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat. Med.*, **10**, 248–254.
- Brette, F. & Orchard, C. (2007) Resurgence of cardiac T-tubule research. *Physiology*, **22**, 167–173.
- Brookes, P.S. (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *AJP Cell Physiol.*, **287**, C817–C833.
- Chance, B. & Williams, G.R. (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, **17**, 65–134.
- Chen, H.W., Chien, C.T., Yu, S.L., Lee, Y.T., & Chen, W.J. (2002) Cyclosporine A regulate oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: Mechanisms via ROS generation, iNOS and Hsp70. *Br. J. Pharmacol.*, **137**, 771–781.

- Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E., Akseptijević, D., Sundier, S.Y., Robb, E.L., Logan, A., Nadtochiy, S.M., Ord, E.N.J., Smith, A.C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C.H., Dare, A.J., James, A.M., Rogatti, S., Hartley, R.C., Eaton, S., Costa, A.S.H., Brookes, P.S., Davidson, S.M., Duchon, M.R., Saeb-Parsy, K., Shattock, M.J., Robinson, A.J., Work, L.M., Frezza, C., Krieg, T., & Murphy, M.P. (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, **515**, 431–435.
- Dai, P., Mao, Y., Sun, X., Li, X., Muhammad, I., Gu, W., Zhang, D., Zhou, Y., Ma, J., Ni, Z., & Huang, S. (2017) Attenuation of Oxidative Stress-Induced Osteoblast Apoptosis by Curcumin is Associated with Preservation of Mitochondrial Functions and Increased Akt-GSK3 $\beta$  Signaling. *Cell. Physiol. Biochem.*, **41**, 661–677.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.*, **52**, 601–623.
- De Giusti, V.C., Caldiz, C.I., Ennis, I.E., Pérez, N.G., Cingolani, H.E., & Aiello, E.A. (2013) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) as signaling molecules of intracellular pathways triggered by the cardiac renin-angiotensin II-aldosterone system (RAAS). *Front. Physiol.*, **4 MAY**, 1–9.
- De J García-Rivas, G., Carvajal, K., Correa, F., & Zazueta, C. (2006) Ru 360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, **149**, 829–837.
- De la Fuente, S. & Sheu, S.S. (2019) SR-mitochondria communication in adult cardiomyocytes: A close relationship where the Ca<sup>2+</sup> has a lot to say. *Arch. Biochem. Biophys.*, **663**, 259–268.
- Deschodt-Arsac, V., Calmettes, G., Gouspillou, G., Rouland, R., Thiaudiere, E., Miraux, S., Franconi, J.-M., & Diolez, P. (2010) System analysis of the effect of various drugs on cardiac contraction energetics. *Biochem. Soc. Trans.*, **38**, 1319–1321.
- Detaille, D, Pasdois, P, Semont, A, Dos Santos, P, Diolez, P (2019) An old medicine as a new drug to prevent mitochondrial complex I from producing oxygen radicals. *PLoS One*, 1–19.
- Di Paola, M., Cocco, T., & Lorusso, M. (2000) Ceramide interaction with the respiratory chain of heart mitochondria. *Biochemistry*, **39**, 6660–6668.
- Diolez, P., Deschodt-Arsac, V., Calmettes, G., Gouspillou, G., Arsac, L., Dos Santos, P., Jais, P., & Haissaguerre, M. (2015) Integrative methods for studying cardiac energetics. *Methods Mol. Biol.*, **1264**, 289–303.
- Diolez, P., Deschodt-Arsac, V., Raffard, G., Simon, C., Santos, P. Dos, Thiaudière, E., Arsac, L., & Franconi, J.-M. (2006) Modular regulation analysis of heart contraction: application to

in situ demonstration of a direct mitochondrial activation by calcium in beating heart. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.*, **293**, R13–R19.

Diolez, P., Deschodt-Arsac, V., Raffard, G., Simon, C., Santos, P.D., Thiaudiere, E., Arsac, L., & Franconi, J.-M. (2007) Modular regulation analysis of heart contraction: application to in situ demonstration of a direct mitochondrial activation by calcium in beating heart. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **293**, R13–R19.

Distelmaier, F., Valsecchi, F., Forkink, M., van Emst-de Vries, S., Swarts, H.G., Rodenburg, R.J.T., Verwiél, E.T.P., Smeitink, J.A.M., Willems, P.H.G.M., & Koopman, W.J.H. (2012) Trolox-Sensitive Reactive Oxygen Species Regulate Mitochondrial Morphology, Oxidative Phosphorylation and Cytosolic Calcium Handling in Healthy Cells. *Antioxid. Redox Signal.*, **17**, 1657–1669.

Echtay, K.S., Murphy, M.P., Smith, R.A.J., Talbot, D.A., & Brand, M.D. (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side: Studies using targeted antioxidants. *J. Biol. Chem.*, **277**, 47129–47135.

Egea, J., Fabregat, I., Frapart, Y.M., Ghezzi, P., Görlach, A., Kietzmann, T., Kubaichuk, K., Knaus, U.G., Lopez, M.G., Olaso-Gonzalez, G., Petry, A., Schulz, R., Vina, J., Winyard, P., Abbas, K., Ademowo, O.S., Afonso, C.B., Andreadou, I., Antelmann, H., Antunes, F., Aslan, M., Bachschmid, M.M., Barbosa, R.M., Belousov, V., Berndt, C., Bernlohr, D., Bertrán, E., Bindoli, A., Bottari, S.P., Brito, P.M., Carrara, G., Casas, A.I., Chatzi, A., Chondrogianni, N., Conrad, M., Cooke, M.S., Costa, J.G., Cuadrado, A., My-Chan Dang, P., De Smet, B., Debelec-Butuner, B., Dias, I.H.K., Dunn, J.D., Edson, A.J., El Assar, M., El-Benna, J., Ferdinandy, P., Fernandes, A.S., Fladmark, K.E., Förstermann, U., Giniatullin, R., Giricz, Z., Görbe, A., Griffiths, H., Hampl, V., Hanf, A., Herget, J., Hernansanz-Agustín, P., Hillion, M., Huang, J., Ilikay, S., Jansen-Dürr, P., Jaquet, V., Joles, J.A., Kalyanaraman, B., Kaminsky, D., Karbaschi, M., Kleanthous, M., Klotz, L.O., Korac, B., Korkmaz, K.S., Koziel, R., Kračun, D., Krause, K.H., Křen, V., Krieg, T., Laranjinha, J., Lazou, A., Li, H., Martínez-Ruiz, A., Matsui, R., McBean, G.J., Meredith, S.P., Messens, J., Miguel, V., Mikhed, Y., Milisav, I., Milković, L., Miranda-Vizuete, A., Mojović, M., Monsalve, M., Mouthuy, P.A., Mulvey, J., Münzel, T., Muzykantov, V., Nguyen, I.T.N., Oelze, M., Oliveira, N.G., Palmeira, C.M., Papaevgeniou, N., Pavićević, A., Pedre, B., Peyrot, F., Phylactides, M., Pircalabioru, G.G., Pitt, A.R., Poulsen, H.E., Prieto, I., Rigobello, M.P., Robledinos-Antón, N., Rodríguez-Mañas, L., Rolo, A.P., Rousset, F., Ruskovska, T., Saraiva, N., Sasson, S., Schröder, K., Semen, K., Seredenina, T., Shakirzyanova, A., Smith, G.L., Soldati, T., Sousa, B.C., Spickett, C.M., Stancic, A., Stasia, M.J., Steinbrenner, H., Stepanić, V., Steven, S., Tokatlidis, K., Tuncay, E., Turan, B., Ursini, F., Vacek, J., Vajnerova, O., Valentová, K., Van Breusegem, F., Varisli, L., Veal, E.A., Yalçın, A.S., Yelisyeyeva, O., Žarković, N., Zatloukalová, M., Zielonka, J., Touyz, R.M., Papapetropoulos, A., Grune, T., Lamas, S., Schmidt, H.H.H.W., Di Lisa, F., & Daiber, A. (2017) European contribution to the study of ROS: A summary of

- the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biol.*, **13**, 94–162.
- Fournier, N., Ducet, G., & Crevat, A. (1987) Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **19**, 297–303.
- Ga, J.B., Gea, J., Barreiro, E., & Sa, D. (2005) N -acetylcysteine increases manganese superoxide dismutase activity in septic rat diaphragms ´ **26**, 1032–1039.
- Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., Galadari, A., & Thayyullathil, F. (2013) Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms: MedSök Region Skåne 1–16.
- Gennai, S., Pison, C., & Briot, R. (2013) Cyclosporine A: From immunomodulation to prevention of ischemia-reperfusion injuries. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*, **32**, 886–887.
- Gill, J.S., McKenna, W.J., & Camm, A.J. (1995) Free radicals irreversibly decrease Ca<sup>2+</sup> currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, **292**, 337–340.
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015) Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.*, **6**, 260–271.
- Griffiths, E.J., Balaska, D., & Cheng, W.H.Y. (2010) The ups and downs of mitochondrial calcium signalling in the heart. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1797**, 856–864.
- Halestrap, A.P., Connern, C.P., Griffiths, E.J., & Kerr, P.M. (1997) 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, A.P. & Pasdois, P. (2009) The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1402–1415.
- Hamilton, S., Terentyeva, R., Kim, T.Y., Bronk, P., Clements, R.T., O-Uchi, J., Csordás, G., Choi, B.-R., & Terentyev, D. (2018) Pharmacological Modulation of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Content Regulates Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Release via Oxidation of the Ryanodine Receptor by Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species. *Front. Physiol.*, **9**.
- Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., & Cadenas, E. (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.*, **278**, 5557–5563.
- Hashad, A.M., Sancho, M., Brett, S.E., & Welsh, D.G. (2018) Reactive Oxygen Species Mediate the Suppression of Arterial Smooth Muscle T-type Ca<sup>2+</sup> Channels by Angiotensin II. *Sci. Rep.*, **8**, 1–11.
- HILL, A. V (1949) The abrupt transition from rest to activity in muscle. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.*, **136**, 399–420.
- Javadov, S., Karmazyn, M., & Escobales, N. (2009) Mitochondrial permeability transition pore

- opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **330**, 670–678.
- Jeremy Fauconnier, Daniel C. Andersson, Shi-Jin Zhang, Johanna T. Lanner, Rolf Wibom, Abram Katz, Joseph D. Bruton, and H.W. (2007) Effects of Palmitate on Ca<sup>2+</sup> and ob/ob Cardiomyocytes Handling. *Diabetes*, **56**, 1136–1142.
- Kai-Chien Yanga, Marcelo G. Boninia, c, d, and S.C.D.J.. aLifespan (2014) Mitochondria and Arrhythmias. *Free Radic Biol Med.* 2014, **71**, 3831–3840.
- Kim, H., Bae, S., Kim, Y., Cho, C.H., Kim, S.J., Kim, Y.J., Lee, S.P., Kim, H.R., Hwang, Y. Il, Kang, J.S., & Lee, W.J. (2013) Vitamin C prevents stress-induced damage on the heart caused by the death of cardiomyocytes, through down-regulation of the excessive production of catecholamine, TNF- $\alpha$ , and ROS production in Gulo(-/-) Vit C-Insufficient mice. *Free Radic. Biol. Med.*, **65**, 573–583.
- Kogot-Levin, A. & Saada, A. (2014) Ceramide and the mitochondrial respiratory chain. *Biochimie*, **100**, 88–94.
- Köhler, A.C., Sag, C.M., & Maier, L.S. (2014) Reactive oxygen species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **73**, 92–102.
- Kohlhaas, M. & Maack, C. (2013) Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovasc. Res.*, **98**, 259–268.
- Kohlhaas, M., Nickel, A.G., & Maack, C. (2017) Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart. *J. Physiol.*, **595**, 3753–3763.
- Kwong, J.Q. (2017) The mitochondrial calcium uniporter in the heart: energetics and beyond. *J. Physiol.*, **595**, 3743–3751.
- Leducq, N. et al (2002) Top down analysis ceramide-induced mitochondrial dysfunctions: role of mitochondrial swelling. *Mol. Biol. Rep.*, **29**, 47–50.
- Lee, H.B., Yu, M.R., Song, J.S., & Ha, H. (2004) Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.*, **65**, 1170–1179.
- Lim, G., Venetucci, L., Eisner, D.A., & Casadei, B. (2008) Does nitric oxide modulate cardiac ryanodine receptor function? Implications for excitation-contraction coupling. *Cardiovasc. Res.*, **77**, 256–264.
- Lu, X., Kwong, J.Q., Molkenin, J.D., & Bers, D.M. (2016) Individual cardiac mitochondria undergo rare transient permeability transition pore openings. *Circ. Res.*, **118**, 834–841.
- MacFarlane, N.G. & Miller, D.J. (1992) Depression of peak force without altering calcium

- sensitivity by the superoxide anion in chemically skinned cardiac muscle of rat. *Circ. Res.*, **70**, 1217–1224.
- MacLennan, D.H. & Kranias, E.G. (2003) Phospholamban: A crucial regulator of cardiac contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 566–577.
- Madreiter-Sokolowski, C.T., Gottschalk, B., Parichatikanond, W., Eroglu, E., Klec, C., Waldeck-Weiermair, M., Malli, R., & Graier, W.F. (2016) Resveratrol Specifically Kills Cancer Cells by a Devastating Increase in the Ca<sup>2+</sup> Coupling between the Greatly Tethered Endoplasmic Reticulum and Mitochondria. *Cell. Physiol. Biochem.*, **39**, 1404–1420.
- Maier, L.S. & Bers, D.M. (2007) Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc. Res.*, **73**, 631–640.
- Mallia, A.K., Frovenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Olson, B.J., Klenk, D.C., & Company, P.C. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid ' **85**, 76–85.
- Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., & Fritsch, P. (2004) Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Medecine/Sciences*, **20**, 458–463.
- Michael Kohlhaas, PhD, Ting Liu, PhD, Andreas Knopp, PhD, Tanja Zeller, PhD, Mei Fang Ong, PhD, Michael Böhm, MD, Brian O'Rourke, PhD, and Christoph Maack, M. (2010) Elevated Cytosolic Na<sup>+</sup> Increases Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species in Failing Cardiac Myocytes. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, **13**, 1606–1613.
- Mills, E.L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A.S.H., Varma, M., Bryant, C.E., Turlomousis, P., Däbritz, J.H.M., Gottlieb, E., Latorre, I., Corr, S.C., McManus, G., Ryan, D., Jacobs, H.T., Szibor, M., Xavier, R.J., Braun, T., Frezza, C., Murphy, M.P., & O'Neill, L.A. (2016) Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*, **167**, 457-470.e13.
- Mills, E.L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A.S.H.H., Varma, M., Bryant, C.E., Turlomousis, P., Däbritz, J.H.M., Gottlieb, E., Latorre, I., Corr, S.C.S.C., McManus, G., Ryan, D., Jacobs, H.T., Szibor, M., Xavier, R.J., Braun, T., Frezza, C., Murphy, M.P., O'Neill, L.A., Däbritz, J.H.M., Gottlieb, E., Latorre, I., Corr, S.C.S.C., McManus, G., Ryan, D., Jacobs, H.T., Szibor, M., Xavier, R.J., Braun, T., Frezza, C., Murphy, M.P., & O'Neill, L.A. (2016) Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*, **167**, 457-470.e13.
- Moris, D., Spartalis, M., Tzatzaki, E., Spartalis, E., Karachaliou, G.-S., Triantafyllis, A.S., Karaolani, G.I., Tsilimigras, D.I., & Theocharis, S. (2017) The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation. *Ann. Transl. Med.*, **5**, 324–324.
- Munshi, N., Fernandis, A.Z., Cherla, R.P., Park, I.-W., & Ganju, R.K. (2002) Lipopolysaccharide-

- Induced Apoptosis of Endothelial Cells and Its Inhibition by Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Immunol.*, **168**, 5860–5866.
- Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.*, **417**, 1–13.
- Mustroph, J., Lebek, S., Maier, L.S., & Neef, S. (2019) Mechanisms of cardiac ethanol toxicity and novel treatment options. *Pharmacol. Ther.*, **197**, 1–10.
- Mustroph, J., Wagemann, O., Lebek, S., Tarnowski, D., Ackermann, J., Drzymalski, M., Pabel, S., Schmid, C., Wagner, S., Sossalla, S., Maier, L.S., & Neef, S. (2018) SR Ca<sup>2+</sup>-leak and disordered excitation-contraction coupling as the basis for arrhythmogenic and negative inotropic effects of acute ethanol exposure. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **116**, 81–90.
- Nerbonne, J.M. & Kass, R.S. (2005) Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol. Rev.*, **85**, 1205–1253.
- Nesterenko, C.A. and V.J.C.S. and S.R.Y.S.L.B. (2014) *The Role of Late INa in Development of Cardiac Arrhythmias*, Handbook of experimental pharmacology.
- Ni, R., Cao, T., Xiong, S., Fan, G., Lacefield, J.C., Lu, Y., Tissier, S. Le, Peng, T., Sciences, M., Health, L., Centre, S., & Biophysics, M. (2016) Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med.*, 12–23.
- Nicholls, D.G. (2002) Mitochondrial function and dysfunction in the cell: Its relevance to aging and aging-related disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **34**, 1372–1381.
- Oda, T., Yang, Y., Uchinoumi, H., Thomas, D.D., Chen-izu, Y., Kato, T., Yamamoto, T., Yano, M., Cornea, R.L., & Donald, M. (2015) Oxidation of Ryanodine Receptor (RyR) and Calmodulin enhance Ca release and pathologically alter RyR structure and Calmodulin affinity. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **85**, 240–248.
- Orr, A.L., Ashok, D., Sarantos, M.R., Shi, T., Hughes, R.E., & Brand, M.D. (2013) Inhibitors of ROS production by the ubiquinone-binding site of mitochondrial complex i identified by chemical screening. *Free Radic. Biol. Med.*, **65**, 1047–1059.
- Periasamy, M. & Kalyanasundaram, A. (2007) SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle and Nerve*, **35**, 430–442.
- Piot, C. (2010) Applications cliniques du pré- et du post-conditionnement myocardiques.
- Pucheu, S., Boucher, F., & Sulpice, T. (1996) EUK-8 a Synthetic Catalytic Scavenger of Reactive Oxygen Species Protects Isolated Iron-Overloaded Rat Heart from Functional and Structural Damage Induced by Ischemia / Reperfusion 331–339.
- Qaisar, R., Bhaskaran, S., Ranjit, R., Sataranatarajan, K., Premkumar, P., Huseman, K., & Van



- Remmen, H. (2019) Restoration of SERCA ATPase prevents oxidative stress-related muscle atrophy and weakness. *Redox Biol.*, **20**, 68–74.
- Quinlan, C.L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., Orr, A.L., & Brand, M.D. (2013) Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol.*, **1**, 304–312.
- Rajesh, K.G., Sasaguri, S., Suzuki, R., & Maeda, H. (2003) Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability transition pore and upregulates Bcl-2 expression. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, **285**, 2171–2178.
- Redpath, C.J., Bou Khalil, M., Drozdal, G., Radisic, M., & McBride, H.M. (2013) Mitochondrial Hyperfusion during Oxidative Stress Is Coupled to a Dysregulation in Calcium Handling within a C2C12 Cell Model. *PLoS One*, **8**.
- Rieusset, J., Fauconnier, J., Paillard, M., Belaidi, E., Tubbs, E., Chauvin, M., Durand, A., Bravard, A., Teixeira, G., Bartosch, B., Michelet, M., Theurey, P., Vial, G., Demion, M., Blond, E., Zoulim, F., Gomez, L., Vidal, H., Lacampagne, A., & Ovize, M. (2013) Retraction statement: Disruption of cyclophilin D-mediated calcium transfer from the endoplasmic reticulum to mitochondria contributes to hepatic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance. *Hepatology*, **58**, 1195.
- Rueckschloss, U., Villmow, M., & Klöckner, U. (2010) NADPH oxidase-derived superoxide impairs calcium transients and contraction in aged murine ventricular myocytes. *Exp. Gerontol.*, **45**, 788–796.
- Sag, C.M., Wagner, S., & Maier, L.S. (2013) Role of oxidants on calcium and sodium movement in healthy and diseased cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, **63**, 338–349.
- Salvemini, D., Doyle, T.M., & Cuzzocrea, S. (2006) Superoxide, peroxynitrite and oxidative / nitritative stress in inflammation 965–970.
- Sanmartín, C.D., Veloso, P., Adasme, T., Lobos, P., Bruna, B., Galaz, J., García, A., Hartel, S., Hidalgo, C., & Paula-Lima, A.C. (2017) RyR2-mediated Ca<sup>2+</sup> release and mitochondrial ROS generation partake in the synaptic dysfunction caused by amyloid  $\beta$  peptide oligomers. *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 1–17.
- Santos, C.X.C., Anilkumar, N., Zhang, M., Brewer, A.C., & Shah, A.M. (2011) Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, **50**, 777–793.
- Sena, L.A. & Chandel, N.S. (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell*, **48**, 158–167.
- Smith, R.A.J. & Murphy, M.P. (2011) Mitochondria-targeted antioxidants as therapies. *Discov. Med.*, **11**, 106–114.
- Sovari, A.A. & Dudley, S.C. (2012) Reactive oxygen species-targeted therapeutic interventions

for atrial fibrillation. *Front. Physiol.*, **3 AUG**, 1–14.

- Taherian, R., Stigliani, S., Carra, E., Monteghirfo, S., Longo, L., Daga, A., Dono, M., Zupo, S., Giaretti, W., & Castagnola, P. (2014) NAC, tiron and trolox impair survival of cell cultures containing glioblastoma tumorigenic initiating cells by inhibition of cell cycle progression massimiliano monticone1. *PLoS One*, **9**.
- Turrens, J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, **552**, 335–344.
- van der Pol, A., van Gilst, W.H., Voors, A.A., & van der Meer, P. (2019) Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur. J. Heart Fail.*, **21**, 425–435.
- Villagrasa, V., Cortijo, J., & Martlcaabr, M. (1997) Inhibitory Effects of N-acetylcysteine on Superoxide Anion Generation in Human Polymorphonuclear Leukocytes 525–529.
- Wagner, S., Rokita, A.G., Anderson, M.E., & Maier, L.S. (2013) Redox Regulation of Sodium and Calcium Handling. *Antioxid. Redox Signal.*, **18**, 1063–1077.
- Wang, S., He, F., Li, Z., Hu, Y., Huangfu, N., & Chen, X. (2019) Y B I protects cardiac myocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury via suppression of PIAS3 mRNA and phosphorylation of STAT3. *Mol. Med. Rep.*, **19**, 4579–4588.
- Wang, S.Q., Lakatta, E.G., Cheng, H., & Zhou, Z.Q. (2002) Adaptive mechanisms of intracellular calcium homeostasis in mammalian hibernators. *J. Exp. Biol.*, **205**, 2957–2962.
- Wang, Y., Mao, X., Chen, H., Feng, J., Yan, M., Wang, Y., & Yu, Y. (2019) Dexmedetomidine alleviates LPS-induced apoptosis and inflammation in macrophages by eliminating damaged mitochondria via PINK1 mediated mitophagy. *Int. Immunopharmacol.*, **73**, 471–481.
- Watanabe, D., Aibara, C., & Wada, M. (2019) Treatment with EUK-134 improves sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release but not myofibrillar Ca<sup>2+</sup> sensitivity after fatiguing contraction of rat fast-twitch muscle. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **316**, R543–R551.
- Watson, M.A., Wong, H., & Brand, M.D. (2019) Use of S1QELs and S3QELs to link mitochondrial sites of superoxide and hydrogen peroxide generation to physiological and pathological outcomes 1–9.
- Xie, W., Santulli, G., Reiken, S.R., Yuan, Q., Osborne, B.W., Chen, B.X., & Marks, A.R. (2015) Mitochondrial oxidative stress promotes atrial fibrillation. *Sci. Rep.*, **5**, 1–11.
- Yamada, K.P., Yasuda, S., Yamashita, H., Sunagawa, K., Nishimura, S., Katoh, M., Hisada, T., Saeki, Y., Nagai, R., & Sugiura, S. (2004) Single cell mechanics of rat cardiomyocytes under isometric, unloaded, and physiologically loaded conditions. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, **287**, H196–H202.

- Yang, Z., Song, T., Truong, L., & Reyes-, J. (2018) Title of article : Important role of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release via ryanodine receptor - 2 channel in hypoxia - induced Rieske iron - sulfur protein - mediated mitochondrial ROS generation in pulmonary artery smooth muscle cells 1–33.
- Yeong-Renn Chen and Jay L. Zweier (2014) CARDIAC MITOCHONDRIA AND ROS GENERATION. *NIH Public Access*, **114**, 524–537.
- Zhang, C., Mo, M., Ding, W., Liu, W., Yan, D., Deng, J., Luo, X., & Liu, J. (2014) High-mobility group box 1 (HMGB1) impaired cardiac excitation-contraction coupling by enhancing the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca<sup>2+</sup> leak through TLR4-ROS signaling in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **74**, 260–273.
- Zhang, Y.E., Huang, G.Q., Wu, B., Lin, X.D., Yang, W.Z., Ke, Z.Y., & Liu, J. (2019) Hydrogen sulfide protects H9c2 cardiomyoblasts against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **52**, 1–7.
- Zima, A. V. & Blatter, L.A. (2006) Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc. Res.*, **71**, 310–321.
- Zorov, D.B., Juhaszova, M., & Sollott, S.J. (2006) Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1757**, 509–517.
- Zuo, L., Zhou, T., Pannell, B.K., Ziegler, A.C., & Best, T.M. (2015) Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol.*,

# ANNEXES

## Annexes

- 1) Script Python établi au laboratoire
- 2) Publication PLOS ONE: An old medicine as a new drug to prevent mitochondrial complex I from producing oxygen radicals

## ANNEXE 1:Script Python établi au laboratoire

```
# Script parameters

# Number of points used to compute rolling mean of data at smoothing step
nbMeanPts = 5

# Times used to compute the length before contraction ( timeBaseLenContraction1 < t < timeBaseLenContraction2)
# and after relaxation (timeBaseLenRelaxation1 < t < timeBaseLenRelaxation2)
timeBaseLenContraction1 = 0.
timeBaseLenContraction2 = 0.05
timeBaseLenRelaxation1 = 0.60
timeBaseLenRelaxation2 = 0.80

# Choose fit strategy for relaxation here
# 1. "Fixed" position and number of fit points after minimum length
# 2. Between 90% and 5% relaxation length
# 3. Part of the curve after inflexion point (i.e. with same curvature as exponential), using nbFitPtsForRelaxation
fitStrategy = 3

# Relaxation fit parameters
nbFitPtsForRelaxation = 50
pointsAfterMinForRelaxationFit = 5

# =====

if (len(sys.argv)<2):
    print("Please provide an input file after script name: python3 extractSignalData_Audrey.py <inputFile.xlsx>")
    exit
inputFile = sys.argv[1]

# Load the whole excel file, except first sheet
wb = load_workbook(inputFile,read_only=True)
ifn = str.join('_',inputFile.split('.')[0].split('_')[2:])
sheetNames = wb.sheetnames[1:]
nSheets = len(sheetNames)

# Substrates string to build file names or plots
subStringsLong = ["Glucose","Succinate","Drug"]
subStringsShort = ["Glu","Suc","Drg"]

# Offset of columns to extract in xlsx file, for each substrate
xlsxColOffset = [0,3,6]

# Initialize data arrays. They will be indexed by sheetNumber, then substrate, then 0 for times and 1 for length
rawData = [[[[] for j in range(3)] for i in range(nSheets)]]
smoothData = [[[[] for j in range(3)] for i in range(nSheets)]]

# Extract data from xlsx sheets
print("Importing xlsx data")
for iCell in range(nSheets):
    for iSub in range(3):
        sheet = wb[sheetNames[iCell]]
```

```

rawData[iCell][iSub].append(np.array([row[xlsxColOffset[iSub]].value for row in sheet.iter_rows(min_row=3)]))
rawData[iCell][iSub].append(np.array([row[xlsxColOffset[iSub]+1].value for row in sheet.iter_rows(min_row=3)]))
rawData[iCell][iSub] = np.asarray(rawData[iCell][iSub]).astype(float)
rawData[iCell][iSub] = rawData[iCell][iSub][:,-1] # Remove last point which can be problematic

# Smooth data
print("Smoothing data for all cells")
for iCell in range(nSheets):
    for iSub in range(3):
        # Copy original data to get a numpy array with times already set
        smoothData[iCell][iSub] = rawData[iCell][iSub][:,nbMeanPts:-nbMeanPts].copy()
        for i in range(nbMeanPts,rawData[iCell][iSub].shape[1]-nbMeanPts):
            smoothData[iCell][iSub][1,i-nbMeanPts] = np.mean(rawData[iCell][iSub][1,i-nbMeanPts:i+nbMeanPts+1])

# =====
# Basic data extraction
# =====

print("Extracting basic data")
# Compute base lines before contraction and after relaxation
baseLenBefore = np.zeros((nSheets,3))
baseLenAfter = np.zeros((nSheets,3))
for iCell in range(nSheets):
    for iSub in range(3):
        mask = (smoothData[iCell][iSub][0]>timeBaseLenContraction1)*(smoothData[iCell][iSub][0]<timeBaseLenContraction2)
        baseLenBefore[iCell][iSub] = np.mean(smoothData[iCell][iSub][1][mask])
        mask = (smoothData[iCell][iSub][0]>timeBaseLenRelaxation1)*(smoothData[iCell][iSub][0]<timeBaseLenRelaxation2)
        baseLenAfter [iCell][iSub] = np.mean(smoothData[iCell][iSub][1][mask])

# Minimum detection (index of min, length at min, time at min)
iMin = np.zeros((nSheets,3),dtype=int)
lMin = np.zeros((nSheets,3))
tMin = np.zeros((nSheets,3))
# Contraction/relaxation lengths
lCon = np.zeros((nSheets,3))
lRel = np.zeros((nSheets,3))
# Contraction/relaxation times measured starting from 5% contraction/relaxation length to minimum
tCon = np.zeros((nSheets,3))
tRel = np.zeros((nSheets,3))
# Contraction/relaxation times measured starting from 5% contraction/relaxation length to minimum
sConAtHalf = np.zeros((nSheets,3))
sRelAtHalf = np.zeros((nSheets,3))
# Contraction/relaxation speed estimated with finite differences at half of contraction/relaxation
for iCell in range(nSheets):
    for iSub in range(3):
        t = smoothData[iCell][iSub][0]
        l = smoothData[iCell][iSub][1]
        iMin[iCell][iSub] = np.argmin(l)
        lMin[iCell][iSub] = l[iMin[iCell][iSub]]
        tMin[iCell][iSub] = t[iMin[iCell][iSub]]
        lCon[iCell][iSub] = baseLenBefore[iCell][iSub] - lMin[iCell][iSub]
        lRel[iCell][iSub] = baseLenAfter [iCell][iSub] - lMin[iCell][iSub]
        # Index when data crosses 5% of contraction/relaxation length

```

```

i5Con = np.argmin(np.abs(|[:iMin[iCell][iSub]]-(baseLenBefore[iCell][iSub]-0.05*ICon[iCell][iSub])))
i5Rel = np.argmin(np.abs(|[:iMin[iCell][iSub]:]-(baseLenAfter [iCell][iSub]-0.05*IRel[iCell][iSub]))) + iMin[iCell][iSub]
tCon[iCell][iSub] = tMin[iCell][iSub] - t[i5Con]
tRel[iCell][iSub] = t[i5Rel] - tMin[iCell][iSub]
# Measuring speed
ih = 1.e0/(t[1]-t[0])
iHalfCon = np.argmin(np.abs(|[:iMin[iCell][iSub]]-(baseLenBefore[iCell][iSub]-0.5*ICon[iCell][iSub])))
sConAtHalf[iCell][iSub] = (-|[:iHalfCon+2]+8*|[:iHalfCon+1]-8*|[:iHalfCon-1]+|[:iHalfCon-2])/-12.*ih
iHalfRel = np.argmin(np.abs(|[:iMin[iCell][iSub]:]-(baseLenAfter [iCell][iSub]-0.5*IRel[iCell][iSub]))) + iMin[iCell][iSub]
sRelAtHalf[iCell][iSub] = (-|[:iHalfRel+2]+8*|[:iHalfRel+1]-8*|[:iHalfRel-1]+|[:iHalfRel-2])/-12.*ih

# =====
# Plotting data
# =====

print("Creating data plots")
for iCell in range(nSheets):

    subLines = ['-r','-b','-g']
    cellName = sheetNames[iCell]

    # Raw data, baseline brought to 0
    fig,ax = plt.subplots(1,1)
    for i in range(3):
        ax.plot(rawData[iCell][i][0],rawData[iCell][i][1]-baseLenBefore[iCell][i],subLines[i],label=subStringsLong[i])
    ax.plot([rawData[iCell][i][0,0],rawData[iCell][i][0,-1]],[0,0],'-k')
    ax.legend()
    ax.set_xlabel('Time (s)')
    ax.set_ylabel('Length variation (um)')
    ax.set_title(ifn+' '+cellName)
    fig.savefig("raw_zero_"+ifn+"_"+cellName+".png")

    # Raw data
    fig,ax = plt.subplots(1,1)
    for i in range(3):
        ax.plot(rawData[iCell][i][0],rawData[iCell][i][1],subLines[i],label=subStringsLong[i])
    ax.legend()
    ax.set_xlabel('Time (s)')
    ax.set_ylabel('Length variation (um)')
    ax.set_title(ifn+' '+cellName)
    fig.savefig("raw_notzero_"+ifn+"_"+cellName+".png")

    # Smooth data
    fig,ax = plt.subplots(1,1)
    for i in range(3):
        ax.plot(smoothData[iCell][i][0],smoothData[iCell][i][1]-baseLenBefore[iCell][i],subLines[i],label=subStringsLong[i])
    ax.legend()
    ax.set_xlabel('Time (s)')
    ax.set_ylabel('Length variation (um)')
    ax.set_title(ifn+' '+cellName)
    fig.savefig("smooth_notzero_"+ifn+"_"+cellName+".png")

    # Smooth data, baseline brought to 0
    fig,ax = plt.subplots(1,1)

```



```

for i in range(3):
    ax.plot(smoothData[iCell][i][0],smoothData[iCell][i][1]-baseLenBefore[iCell][i],subLines[i],label=subStringsLong[i])
    ax.plot([smoothData[iCell][i][0,0],smoothData[iCell][i][0,-1]], [0,0], '--k')
    ax.legend()
    ax.set_xlabel('Time (s)')
    ax.set_ylabel('Length variation (um)')
    ax.set_title(ifn+' '+cellName)
    fig.savefig("smooth_zero_"+ifn+"_"+cellName+".png")
    plt.close('all')
# =====
# Fitting
# =====
# =====
# Contraction
# =====
''' We tried with a gaussian
# The function to be fitted
def f_gaussian(t,baseValue,A,t0,sigma):
    return baseValue-A*np.exp(-(t-t0)**2/sigma)
# Flags to remember if fit was ok or not
conFitOk = np.ones((nSheets,3),dtype=bool)
conFitT0 = np.zeros((nSheets,3))
conFitA = np.zeros((nSheets,3))
conFitB = np.zeros((nSheets,3))
relFitOk = np.ones((nSheets,3),dtype=bool)
relFitT0 = np.zeros((nSheets,3))
relFitTau = np.zeros((nSheets,3))
for iCell in range(nSheets):

    cellName = sheetNames[iCell]
    # Open a figure to generate fit plots
    fig,axes = plt.subplots(1,3,sharey=True,figsize=(12,4))

    for iSub in range(3):

        # Plot raw data
        t = rawData[iCell][iSub][0]
        l = rawData[iCell][iSub][1]
        bl = baseLenBefore[iCell][iSub]
        axes[iSub].plot(t,l-bl,'+b',markersize=2)

        # We recompute the 5% crossing from raw data, using the min position from smooth data
        # Shift by offset used to computed rolling mean
        iMin[iCell][iSub] += nbMeanPts
        lMin[iCell][iSub] = l[iMin[iCell][iSub]]
        tMin[iCell][iSub] = t[iMin[iCell][iSub]]
        lCon[iCell][iSub] = bl - lMin[iCell][iSub]
        lRel[iCell][iSub] = baseLenAfter [iCell][iSub] - lMin[iCell][iSub]
        # Index when data crosses 5% of contraction/relaxation length
        i5Con = np.argmin(np.abs(l[:iMin[iCell][iSub]]-(bl-0.05*lCon[iCell][iSub])))
        i5Rel = np.argmin(np.abs(l[iMin[iCell][iSub]:]-(baseLenAfter [iCell][iSub]-0.05*lRel[iCell][iSub]))) + iMin[iCell][iSub])

        # The function to fit
        def f_parabolic(t,a,b,t0):

```

```

return a+b*(t-t0)**2

# The data to fit with
extraPts = 5 # Points added after min
tFit = t[i5Con:iMin[iCell][iSub]+extraPts]
lFit = l[i5Con:iMin[iCell][iSub]+extraPts]
tPlot0 = tFit[0]

# First estimation of parabole parameters
# for that we use what we already computed!
a0 = lMin[iCell][iSub]
b0 = sConAtHalf[iCell][iSub]**2/(-4*(bl-a0))
t00 = tMin[iCell][iSub]
p0 = [a0,b0,t00]
try:
    params,cov = scipy.optimize.curve_fit(f_parabolic,tFit,lFit,p0)
    conFitA[iCell][iSub],conFitB[iCell][iSub],conFitT0[iCell][iSub] = params
except:
    conFitOk[iCell][iSub] = False

# Plot the fit if possible, with a line indicating where slope is measured
if conFitOk[iCell][iSub]:
    #ts = np.linspace(tFit[0]-0.005,tFit[-1]+0.005,100)
    ts2 = np.linspace(tFit[0],tFit[-1],100)
    #ys = f_parabolic(ts,*params)
    ys2 = f_parabolic(ts2,*params)
    #axes[iSub].plot(ts ,ys -bl,'-r',linewidth=1)
    axes[iSub].plot(ts2,ys2-bl,'-r',linewidth=2)
    tb = params[2]-np.sqrt(np.abs((bl-params[0])/params[1]))
    axes[iSub].plot([tb,tb],[0,-0.5*lCon[iCell][iSub]],'-k',linewidth=1)

# =====
# Relaxation
# =====
# The function to fit
def f_expo(tt,tau):
    return (baseLenAfter[iCell][iSub]-l[iStart])*(1-np.exp(-(tt-t[iStart])/tau))
def computeDerivative(u):
    """ unscaled derivative. Centered finite differences,order 4"""
    d = np.zeros(u.shape)
    # Decentered for extremities
    d[0] = -3*u[0]+4*u[1]-u[2]
    d[-1] = 3*u[-1]-4*u[-2]+u[-3]
    # Centered order 2 for next points
    d[1] = u[2]-u[0]
    d[-2] = u[-1]-u[-3]
    # Centered order 4
    d[2:-2] = (-u[4:]+8*u[3:-1]-8*u[1:-3]+u[:-4])/6.
    return 0.5*d
# Select fit points
# Fixed points
if fitStrategy==1:
    extraPts = pointsAfterMinForRelaxationFit
    iStart = iMin[iCell][iSub] + extraPts

```

```

iEnd = iStart + nbFitPtsForRelaxation

# The data to fit with: we fit the part of the curve that is between 90 and 5% of relaxation
elif fitStrategy==2:
    iStart = np.argmin(np.abs(l[iMin[iCell]][iSub:]-(baseLenAfter[iCell][iSub]-0.90*IRel[iCell][iSub]))) + iMin[iCell][iSub]
    iEnd = i5Rel
    if (iEnd<=iStart):
        extraPts = pointsAfterMinForRelaxationFit
        iStart = iMin[iCell][iSub] + extraPts
        iEnd = iStart + nbFitPtsForRelaxation

# Detect inflexion point and use points after that
elif fitStrategy==3:
    # Compute signal derivative (no need to scale by 1/h), I need to used smooth data though
    dl = computeDerivative(smoothData[iCell][iSub][1])
    iStart = np.argmax(dl) + nbMeanPts-1
    iEnd = iStart + nbFitPtsForRelaxation

tFit = t[iStart:iEnd]
lFit = l[iStart:iEnd]-l[iStart]

# First estimation of parabole parameters
# t00 = t[iStart]
tau0 = -sRelAtHalf[iCell][iSub]/2.
p0 = [tau0]
try:
    params,cov = scipy.optimize.curve_fit(f_expo,tFit,lFit,p0)
    #relFitT0[iCell][iSub],
    relFitTau[iCell][iSub] = params
except:
    relFitOk[iCell][iSub] = False

# Plot the fit if possible, with a line indicating where slope is measured
if conFitOK[iCell][iSub]:
    ts2 = np.linspace(tFit[0],tFit[-1],100)
    ys2 = f_expo(ts2,params[0]) + l[iStart]
    axes[iSub].plot(ts2,ys2-bl,'-r',linewidth=2)
    axes[iSub].plot([ts2[0],ts2[0]], [ys2[0]-bl,ys2[0]+0.5*IRel[iCell][iSub]-bl], '-k',linewidth=1)

axes[iSub].grid()
axes[iSub].set_xlim([tPlot0-0.05,tFit[-1]+0.05])
axes[iSub].set_xlabel('Time (s)')
axes[iSub].set_ylabel('Length variation (um)')
title = subStringsLong[iSub]
if (iSub==2):
    title = title + " " + cellName
axes[iSub].set_title(title)

axes[0].set_ylim([-0.3,0.1])
fig.tight_layout()
fig.savefig("fits_"+ifn+"_ "+cellName+".png")
plt.close('all')

```