



**HAL**  
open science

# Effet protecteur du préconditionnement pharmacologique vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion myocardique: Approche mécanistique et clinique

Romain Rozier

► **To cite this version:**

Romain Rozier. Effet protecteur du préconditionnement pharmacologique vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion myocardique: Approche mécanistique et clinique. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2021. Français. NNT: 2021COAZ6005 . tel-03249713

**HAL Id: tel-03249713**

**<https://theses.hal.science/tel-03249713v1>**

Submitted on 4 Jun 2021

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

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



# THÈSE DE DOCTORAT

**Effet protecteur du préconditionnement pharmacologique  
vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion myocardique :**  
*Approche mécanistique et clinique*

**Romain ROZIER**

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire  
Equipe 3 : Métabolisme, Cancers et Réponses immunes

**Présentée en vue de l'obtention**

**du grade de docteur en** Sciences de la Vie et de  
la Santé

Spécialité : Interactions moléculaires et  
cellulaires

d'Université Côte d'Azur

**Dirigée par** : Dr Jean-Ehrland RICCI / Pr Michel  
CARLES

**Soutenue le** : 12 février 2021 à Nice

**Devant le jury, composé de :**

Pr Giulia CHINETTI, Présidente du jury, C3M

Dr Muriel PRIAULT, Rapporteur, IBGC

Pr Romain PIRRACCHIO, Rapporteur, ZSFG  
Hospital and Trauma center

Dr Pascal CHIARI, Examineur, HCL

Pr Michel CARLES, Co-directeur de thèse, C3M

Dr Jean-Ehrland RICCI, Co-directeur de thèse,  
C3M

**Effet protecteur du préconditionnement pharmacologique  
vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion myocardique :**  
*Approche mécanistique et clinique*

Jury :

Présidente du jury :

Pr Giulia CHINETTI , Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire – Université Côte d'Azur

Rapporteurs :

Dr Muriel PRIAULT ; Institut de Biochimie et Génétiques cellulaires – Université de Bordeaux  
Pr Romain PIRRACCHIO ; Zuckerberg San Francisco General Hospital and Trauma Center

Examineurs :

Dr Pascal CHIARI ; Hospices Civils de Lyon – Hôpital Louis Pradel

## Effet protecteur du préconditionnement pharmacologique vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion myocardique : approche mécanistique et clinique

---

Les lésions d'ischémie-reperfusion régionale (myocardique) ou d'emblée systémique (ACR) représentent une menace omniprésente en anesthésie-réanimation et sont à l'origine d'une morbi-mortalité majeure. De nombreuses stratégies ont été mises au point pour les limiter et/ou les prévenir. Malgré les preuves de l'efficacité du préconditionnement pharmacologique (PPc) notamment par les agents volatils halogénés (AVH), appelé préconditionnement anesthésique (APc) ; divers points de discordance en termes d'efficacité (inter-individuelle, nature de la recherche (clinique ou pré-clinique), types de chirurgie pratiquée (cardiaque ou non-cardiaque)) témoignent du manque de compréhension de ses mécanismes, et d'autre part que l'intérêt de son intégration au sein d'une prise en charge globale de cardioprotection reste encore à confirmer. Ainsi, afin d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans l'effet protecteur présumé du PPc, nous avons entrepris dans un premier temps une approche fondamentale et mécanistique visant à identifier les effecteurs de la cardioprotection induite par l'APc. Nous avons donc mis en évidence que les AVH tels que le sévoflurane (SEV) étaient capables d'induire, *in vitro*, une voie de signalisation protectrice impliquant les espèces réactives de l'oxygène (ROS), la protéine kinase de survie Akt et la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. De manière intéressante, nous avons reproduit l'effet protecteur induit par le SEV et supporté par cette voie de signalisation au sein de différents modèles cellulaires d'origine myocardique dont des cardiomyocytes humains différenciés à partir de cellules souches embryonnaires pluripotentes. De plus, nous avons également démontré que cette voie de signalisation protectrice induite par le SEV pouvait être stimulée par l'agent antidiabétique Metformine (MET), justifiant son utilisation comme agent potentiel de PPc pour prévenir des lésions d'IR.

Forts de ces résultats, nous avons cherché à vérifier la pertinence clinique de l'effet protecteur de la MET. Nous avons donc émis l'hypothèse que, grâce à ses effets pléiotropes et potentiellement cardioprotecteur, la MET était capable de protéger vis-à-vis de l'IR globale et massive induite par l'arrêt cardio-respiratoire (ACR). L'analyse rétrospective menée sur plus de 500 patients admis en soins critiques pour ACR a montré que la MET est associée de manière indépendante à une amélioration de la survie à J28 post-ACR apportant ainsi une première preuve clinique de l'effet protecteur de la MET contre l'IR la plus sévère rencontrée :

l'ACR.

Compte tenu de l'incidence croissante des patients à haut risque cardio-vasculaire rencontrés en chirurgie et en soins critiques en lien avec le vieillissement de la population dans les pays développés, il devient donc nécessaire de poursuivre et d'approfondir notre approche expérimentale afin d'améliorer la compréhension des mécanismes du PPC et de légitimer la pertinence clinique de son effet protecteur dans le but de limiter la morbi-mortalité liée à l'IR.

**Mots clés :** ischémie-reperfusion ; préconditionnement pharmacologique ; apoptose ; protéines de la famille Bcl-2 ; espèce réactives de l'oxygène ; sévoflurane ; metformine

## Protective effect of pharmacologic preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury: mecanistic and clinical approach

---

Regional (myocardial) or systemic (cardiac arrest) ischaemia-reperfusion (IR) injuries are an omnipresent threat in perioperative medicine and intensive care, and are the leading cause of major morbidity and mortality. Numerous strategies have been developed to limit and/or prevent them. Despite evidence of the effectiveness of pharmacological preconditioning (PPc), particularly by volatile halogenated agents (VHAs), known as anaesthetic preconditioning (APc); various points of discordance in terms of effectiveness (inter-individual, nature of research (clinical or pre-clinical), types of surgery (cardiac or non-cardiac)) testify to the lack of understanding of its mechanisms, and on the other hand that the interest of its integration within a global cardioprotection management remains to be confirmed. Thus, in order to improve the understanding of the mechanisms involved in the presumed protective effect of PPc, we first undertook a fundamental and mechanistic approach aimed at identifying the effectors of the cardioprotection induced by PPc. We thus demonstrated that halogenated VHAs such as sevoflurane (SEV) were able to induce, *in vitro*, a protective signaling pathway involving reactive oxygen species (ROS), the survival protein kinase Akt and the anti-apoptotic protein Bcl-xL. Interestingly, we have reproduced the protective effect induced by SEV and supported by this signaling pathway in different cell models of myocardial origin including human cardiomyocytes differentiated from pluripotent embryonic stem cells. In addition, we have also shown that this protective signaling pathway induced by SEV can be stimulated by the antidiabetic agent Metformin (MET), justifying its use as a potential PPc agent to prevent IR damage.

On the basis of these results, we sought to verify the clinical relevance of the protective effect of Metformin. We therefore hypothesised that, thanks to its pleiotropic and potentially cardioprotective effects, MET was able to protect against global and massive IR induced by cardiac arrest (CA). Retrospective analysis of more than 500 patients admitted to critical care for CA showed that MET was independently associated with improved post-CA survival at D28, providing the first clinical evidence of the protective effect of MET against the most severe IR encountered: CA.

Given the increasing incidence of high-risk cardiovascular patients encountered in surgery and critical care in connection with the ageing population in developed countries, it therefore becomes necessary to pursue and deepen our experimental approach in order to improve the understanding of the mechanisms of PPc and to legitimize the clinical relevance of its protective effect with the aim of limiting the morbidity and mortality linked to IR.

**Key words** : ischemia-reperfusion ; pharmacologic preconditioning ; apoptosis ;Bcl-2 family proteins ; reactive oxygen species ; sevoflurane ; metformin

## REMERCIEMENTS

---



## REMERCIEMENTS

---

Je tiens d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse

J'aimerais remercier le **Docteur Muriel Priault** et le **Professeur Romain Pirracchio** pour leur temps consacré à l'évaluation de ce manuscrit, le **Docteur Pascal Chiari** d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail de thèse et enfin le **Professeur Giulia Chinetti** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement le **Docteur Jean-Ehrland Ricci**, mon co-directeur de thèse qui m'a accompagné tout au long de parcours scientifique depuis 5 ans. Tu as toujours été présent dans les bons comme dans les mauvais moments. Tu n'as cessé de m'aider, de m'écouter, de me corriger, de me bousculer mais surtout de m'encourager à donner le meilleur de moi-même. Je te remercie sincèrement de m'avoir guidé jusqu'ici. Tu es un chef remarquable et j'espère que nous pourrons continuer à travailler d'une manière ou d'une autre, ensemble. Merci pour tout JER.

Je tiens également à remercier mon co-directeur de thèse, le **Professeur Michel Carles**, qui malgré la distance est resté bienveillant et attentif à l'égard de mon évolution clinique et scientifique. A chaque fois, je me réjouis de nos discussions, tant tes approches de la médecine, de la recherche et de la vie sont pertinentes. Toi qui es à l'origine de ce projet, tu m'as aidé à le concrétiser et je te remercie de m'avoir soutenu et fait confiance, même dans les pires moments. Je sais que tu es très occupé ces temps-ci...mais j'espère que l'on pourra interagir et tout simplement se voir plus souvent dans un futur le plus proche possible. Un grand Merci Michel.

### A LA TEAM 3 :

*Aux membres passés...*

**Elodie**, ma Lulu, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir initié et « drivé » dans mes premiers pas en sciences dans notre labo. Grâce à toi, je me suis dit : « Tiens, c'est vraiment sympa la Science...et si je faisais une thèse... ? » Si seulement jamais su... et pourtant tu m'avais prévenu !!! Tu as surtout toujours été là pour m'aider, me supporter. Tu es en train de vivre un parcours incroyable. Je suis tellement fier de toi et de tout ce que tu as pu accomplir depuis ton arrivée à Chicago. Bref, tu m'impressionnes et tu m'impressionneras toujours. Tu es BEYOND Elu.

**Rana**, merci de m'avoir accompagné durant ces années de thèse. Tu as toujours eu les bons mots pour me remotiver, m'encourager à ne jamais lâcher. Tout comme Elo, tu es un véritable exemple à suivre. Tu étais lumineuse dans ce labo ma Ranini. Ton départ a laissé un grand vide, mais la relève est là (oui Adri c'est de toi que je parle...).

**Rana**, merci de m'avoir accompagné durant ces années de thèse. Tu as toujours eu les bons mots pour me remotiver, m'encourager à ne jamais lâcher. Tout comme Elo, tu es un véritable exemple à suivre. Tu étais lumineuse dans ce labo ma Ranini. Ton départ a laissé un grand vide, mais la relève est là (oui Adri c'est de toi que je parle...).

**Jozsef**, mon dupeczka, quelle ambiance tu as pu mettre dans ce labo ! Désormais, réunis avec Mawawa à New York, je vous souhaite tout le bonheur du monde. A très vite mon ami.

**Camila**, le rayon de soleil de Baranquilla ! Que de bons moments passés au labo et en dehors. Je vous souhaite à toi et Nico un bonheur sans fin. Muchos besos !!

**Emma**, Mamacita, merci de m'avoir accueilli au labo ! Au-delà de m'avoir guidé dans mes premières manips, tu m'as fait vivre de sacrés fous rires que je ne suis pas prêt d'oublier. Ce n'est pas Elo qui dira le contraire.

**Ashaïna**, merci pour toute ton aide et ton écoute. Même si nous n'étions pas souvent à nos places, j'ai vraiment apprécié de t'avoir comme voisine de bureau !

**Florian**, oui Floflo, toi aussi tu as été un super voisin de bureau ! J'espère que tout va bien de ton côté !

*Aux membres présents...*

**Rachel**, sans ton aide précieuse je n'aurai jamais pu en arriver là. Je remercie mille fois JER de t'avoir mis sur le projet. Tu m'as accompagné, coucouné, supporté. Tu as fait preuve d'une patience monumentale. Et même si par moment, on piétinait, tu as toujours eu la force pour nous faire aller de l'avant. Je pense que nous avons vécu une véritable aventure humaine avec ses soucis, ses doutes et ses galères, mais surtout avec son lot de bonnes surprises, de joie, de rires et de bonheur. Merci Rachel pour tout ton investissement et ton affection et ta générosité.

**Sandrine**, merci pour ta sensibilité pédagogique sans limite. Tu as toujours su répondre à mes questions avec une telle délicatesse. A chaque fois que tu as pu te pencher sur le projet, tu as permis de le faire avancer en toute simplicité et humilité. Emma et Sonia ont bien de la chance d'être entre mains. Merci pour tout Sandrine.

**Johanna**, Jojo, merci pour ton regard éclairé sur l'ensemble du projet et de m'avoir aidé pour les manips souris. Ta rigueur et ton investissement sont toujours aussi exemplaires même depuis l'arrivée de ton petit Axel.

**Blandine**, merci pour ta bonne humeur permanente dans le labo. Tu es totalement solaire. Je te remercie encore de ton expertise sur les IPS qui ont permis d'apporter une autre dimension à nos résultats. Bon vent vers Sophia où tu retrouveras Ashaïna ! et profitez bien de ton beau petit Yenam.

**Els**, merci pour tes précieux conseils et ton inébranlable pédagogie (surtout au FACS). Chacune de tes interventions sur le projet ont permis de dénouer un bon nombre de situations compliquées.

**Adriana**, la spontanéité à l'état pur ! Même si je n'ai pas été présent ces derniers temps au labo et je tenais à vous souhaiter à toi et **Manu** plein de courage pour la fin de votre thèse. Vous êtes toujours à fond que ce soit un bon ou un mauvais résultat. Foncez droit devant los amigos !

**Manu** le rayon de soleil de Baranquilla ! Que de bons moments passés au labo et en dehors. Je vous souhaite à toi et Nico un bonheur sans fin. Muchos besos !!

**Adrien** la relève est là ! Tu vas tout déchirer. Tranquillement mais sûrement, tu vas finir par faire une thèse incroyable (C'est mon Pari !) Courage et ne lâche rien !

**Husein** profite à fond du climat rigoureux de la TEAM 3. A l'occasion, je ne serai pas contre de partager une petite viande grillée dans ton resto libanais préféré.

**Pauline** le rayon de soleil ! Toujours souriante et d'humeur égale. J'ai vraiment apprécié tous les moments au cours desquels nous avons travaillé ensemble.

**Emma**, merci d'avoir les bons mots et de rassurer à ta manière...que toute cette thèse c'est la « petite cerise sur le gâteau »... A part la science...J'ai un travail !!! Je te souhaite surtout pleins de courage pour la fin de ta thèse. Je ne suis pas inquiet, t'es une passionnée.

**Sonia** , bon c'est peut-être pas le mieux placé, mais tu verras on cogite pas mal sur ce bureau. Bienvenu dans l'équipe Sonia et je te souhaite de mener tous tes projets à leur concrétisation.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au projet, du C3M et ailleurs, en y apportant leurs avis et expériences. Plus particulièrement, je tenais à remercier :

Le **Professeur Marc Roucoules** qui grâce à son engagement et sa confiance, m'a permis de travailler dans des conditions saines et durables tout au long de ma thèse.

**Philippe Juin** qui a permis d'apporter un regard nouveau sur le projet et de nous orienter vers de nouvelles perspectives mécanistiques.

Le **Professeur Jean Dellamonica** qui m'a toujours soutenu et encouragé dans ma démarche clinique et scientifique.

**Nathalie Mazure** qui m'a fait profiter de son expertise sur l'hypoxie, notamment dans la gestion capricieuse des enceintes.

**Fred Bost** , pour ses précieux conseils concernant les conditions d'utilisation de la metformine dans nos modèles.

**Seb**, pour ta disponibilité et réactivité sans faille. Merci de m'avoir sensibilisé à cette approche translationnelle de notre discipline. C'est toujours un plaisir d'interagir avec toi. Il faudrait d'ailleurs songer à renouveler l'expérience plus souvent.

**Laulau**, et oui, souviens toi...tu as participé à un data ! Merci ma Laulau d'être toujours aussi présente. Ton soutien et ton amitié sont devenus indispensables. Merci pour tout Laulau.

Un grand merci à mon **équipe d'anesthésie viscérale** et à tous ses membres passés et présents qui ont joué le jeu et m'ont toujours soutenu dans ma démarche en m'accordant le temps nécessaire pour mener cette thèse jusqu'à son dénouement.

Sincèrement MERCI **Philippe, Olivier, Mona, Andréa, Hanta, François, Babou, Mathilde, Nicoletta, Titi, VB.**

#### [A MES AMIS :](#)

Merci à mes amis de tous les horizons de m'avoir supporté pendant ces 4 dernières années :

*La troupe* et sa première génération : **Auré, Ludo et Romy ; Juju, JB et Arthur ; Alex, Marco et Augustin ; Raphik, Fanny et Malo ; Marin, Thom et Ella ; Célin et Vincent** c'est pour bientôt ; et **Soniach et Adelin** vous avez les cartes en mains ...Je vous embrasse tous très fort !

**Max, Thom, Abdi** , je vous promets un Mont Chauve d'ici avril ...Laisser mon juste le temps de me remettre un peu en conditions.

**Couz, Rhouj, Jeffouille** tellement hâte qu'on puisse se retrouver et de prendre le temps de vivre au rythme du chant des cigales.

## A MA FAMILLE :

**Maman**, merci d'être aussi présente pour nous et pour ta petite-fille. C'est bon de te voir sourire comme ça et d'être autant épanoui. Profitons à fond de tous ces moments, ça passe tellement vite. Tu es une maman et désormais une grand-mère incroyable. Je t'aime maman.

**Papa**, merci de toujours autant me soutenir dans mes projets. Que c'est bon à chaque fois de se retrouver autour de votre bon feu de cheminée autour d'un bon repas. Imagine quand Zoé va commencer à apprécier la neige !!!! Au-delà d'être un papa formidable, tu es un Papy géniale et Zoé n'a pas tardé à s'en rendre compte.

**Fréro**, mon fréro d'amour. Je suis tellement fier de tout le chemin que tu as accompli. Tu ne lâches rien. Et avec Bérangère vous êtes en train d'écrire une sacrée jolie histoire. Hâte de venir vous visiter sur Paris. Je t'embrasse fort.

**Mamie**, merci pour ton soutien sans faille. Merci pour toutes les fois où tu m'as accueilli en lendemain de garde pour manger de bon repas suivi de la fameuse sieste plus ou moins réparatrice avant de retourner cravacher au labo. Je t'aime Mamie, merci d'être là.

**Bibi**, merci de prendre aussi bien de nous (oui la petite fricassée du dimanche midi, c'est important...) que de ta petite-fille chérie. Hâte de fêter les 1 an de Zoé et que nous puissions profiter enfin du moment. Je t'embrasse fort Bibi.

**Pierre, Nat, Nico, Rémi** merci pour votre soutien et vos encouragements infatigables. Hâte que nous puissions enfin nous retrouver comme une vraie famille.

## A Clémentine et Zoé

Je tiens à te dire ma Bibiou que tu es une femme époustouflante. Je sais que j'ai mis ta patience à rude épreuve, que ces derniers temps ont été plus que difficiles. Mais tu es toujours resté bienveillante, bienfaitante, aimante... tu t'es pliée en 4 pour m'offrir tout ce dont j'avais besoin. Je t'en suis absolument reconnaissant et je répondrai par des actes. Je t'entends déjà dire : « OUi, Ouiiiii » Merci d'avoir pris soins de moi comme ça. Je t'aime tant.

Alors, si en plus, on ajoute au boulet de trente ballets (un peu plus ...) une petite mignonnerie de 1 an, agitée du bocal ; on commence à être à un certain niveau d'investissement personnel.

Merci pour tout mon amour, merci pour la perle que tu nous as donné et qui nous comble chaque jour de bonheur et de joie. Continuons de penser à nous et ne nous oublions jamais.

## TABLE DES MATIERES

---

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>6</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>10</b>
<b>I. Le métabolisme énergétique du cardiomyocyte .....</b>	<b>10</b>
1) Généralités.....	10
2) Utilisation des substrats.....	11
3) Production d'énergie .....	15
<b>II. Ischémie-Reperfusion .....</b>	<b>21</b>
1) Contexte historique et première description .....	21
2) Généralités.....	21
3) Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion.....	22
4) Ischémie-reperfusion en médecine péri-opératoire et réanimation .....	27
<b>III. Les espèces réactives de l'oxygène .....</b>	<b>33</b>
1) Généralités.....	33
2) Production des ROS .....	33
3) Système anti-oxydant .....	38
4) Lésions induites par le stress oxydant .....	39
5) Conséquences péri-opératoires du stress oxydant.....	39
6) Rôle ambivalent des ROS .....	41
<b>IV. La mort cellulaire .....</b>	<b>44</b>
1) Généralités.....	44
2) Apoptose.....	45
3) Morts indépendantes des caspases.....	50
<b>V. Les protéines de la famille Bcl-2 .....</b>	<b>56</b>
1) Contexte historique et généralités .....	56
2) Structures et fonctions.....	57
3) Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) .....	60
4) Activation Bax-Bak .....	61
5) Régulation des protéines des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 .....	61
6) Régulation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL .....	64
<b>VI. Méthode de protection vis-à-vis de l'IR .....</b>	<b>67</b>
1) Généralités et définitions.....	67
2) Stratégies de Préconditionnement non pharmacologiques .....	69
3) Stratégies de preconditionnement pharmacologiques en anesthésie .....	70
4) Mécanismes de l'IPC et l'APC.....	76
5) Metformine et preconditionnement pharmacologique .....	82
<b>RESULTATS.....</b>	<b>88</b>
<b>ARTICLE 1.....</b>	<b>89</b>
<b>ARTICLE 2.....</b>	<b>90</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>92</b>
• <b>Modèles in vitro d'IR et de PPC .....</b>	<b>93</b>

- *IR et protéines de la famille Bcl-2* ..... 94
- *Implication de la protéine Bcl-xL dans l'effet protecteur du PPc*..... 95
- *Régulation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL par le PPc*..... 96
- *Voie de signalisation identifiée dans notre modèle de PPc*..... 98
- *Mitochondrie: point de départ de la cardioprotection induite par le PPc* ..... 100
- *Etats des lieux sur la pertinence clinique du PPc* ..... 102
- *Perspectives thérapeutiques du PPc* ..... 106

**CONCLUSION**..... 112

**BIBLIOGRAPHIE** ..... 115

**RESUME** ..... 144

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

A1	Bcl-2-related gene A1
AAA	Anévrisme de l'aorte abdominale
AAR	Aire à risque
ACR	Arrêt Cardio-Respiratoire
ADP	Adénosine Di-Phosphate
AG	Acides gras
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AMP	Adénosine Mono-Phosphate
APAF-1	Apoptotic Peptidase Activating Factor-1
APc	Préconditionnement Anesthésique (par les AVH)
ASA	American Society of Anesthesiologists
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
AVH	Agents anesthésiques volatils halogénés
Bad	Bcl-2 Associated Death promotor
Bak	Bcl-2 Antagonist Killer 1
Bax	Bcl-2 Associated X protein
Bcl-2	Bcl-2 Lymphoma-2
Bcl-xL	Bcl-2 related gene long isoform
BH	Bcl-2 Homology
Bid	BH3 Interacting-domain Death agonist
Bik	Bcl-2 Interacting Killer
Bim	Bcl-2 like protein 11
Bok	Bcl-2-related Ovarian Killer
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /calmoduline-dépendent protein Kinase II
CEC	Circulation Extra-Corporelle
CI	Cardiopathie ischémique
CoA	Coenzyme A
CoQ	Ubiquinone
CTE	Chaîne de transport d'électrons
DES	Desflurane
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DRP1	Dynamin-1-like protein
ERK1/2	Extracellular signal-regulated Kinases ½
FADH <sub>2</sub>	Flavine Adénine Dinucléotide
FBW7	F-box et WD40 domain-containing 7
FET	Forward Electron Transport
FMN	Falvine MonoNucleotide
FoxO	Forkhead Box protein
GP	Glycogène Phophorylase
GSK-3β	Glycogen Synthase 3 Beta
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF1α	Hypoxia Inductible Factor 1 alpha
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IAP 2	Inhibitor of Apoptosis Proteins 2

IDM	Infarctus du myocarde
IDMP	Infarctus du myocarde péri-opératoire
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
IL-6	InterLeukine-6
IL-8	InterLeukine-8
IMP	Acide inosinique
IPSC	Induced Pluripotent Stem Cells
IR	Ischémie-Reperfusion
ISO	Isoflurane
IVA	Artère interventriculaire (coronaire)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKAPK-2	MAPK-activated protein kinase-2
Mcl-1	Myeloid cell Leukemia 1
MEK1	MAP/ERK Kinase 1
MET	Metformine
MET	Metformine
MINS	Souffrance myocardique en chirurgie non cardiaque
MLKL	Mixed-Lineage Kinase domain-Like pseudokina
MnTBAP	Manganese Tetrakis 4-Benzoic Acid Porphyrin
MOMP	Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale
MPc	Préconditionnement à la MET
MPG	N-[2-mercaptopropionyl]-glycine
mPTP	Pore de transition de la perméabilité mitochondriale
mTORC2	Mammalian Target Of Rapamycin Complex 2
NAC	N-acetyl Cystéine
NADH, NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NFκB	Nuclear Factor kappa B
OMM	Membrane externe mitochondriale
PDK-1	Phosphatidyl-inositol-dependent-kinase 1
PFK1	PhosphoFructoKinase 1
PHE	Phosphate de haute énergie
PI3K	Phosphoinositide 3 Kinase
PIP2	Phosphatidyl-inositol-diphosphate
PIP3	Phosphatidyl-inositol-triphosphate
PKC	Protéine Kinase C
PLK	Polo-Like Kinase
PPc	Préconditionnement Pharmacologique
RCP	Réanimation Cardio-Pulmonaire
RET	Reverse Electron Transport
RIP1	Receptor Interacting Protein Kinase-1
RIP3	Receptor Interacting Protein Kinase-3
RIPc	Préconditionnement Ischémique à distance
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinases
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SAFE	Survivor Activating Factor Enhancement
SCA	Syndrome coronarien aigu



SDH	Succinate Déshydrogénase
SEV	Sevoflurane
STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
TIVA	Total Intravenous Anesthesia
TNFR	TNF $\alpha$ Récepteur 1
TNFR 2	TNF $\alpha$ Récepteur 1
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
$\beta$ TrCP	$\beta$ -transducin repeat-containing protein
ECMO	ExtraCorporal Membrane Oxygenation

## LISTE DES FIGURES

---

<i>Figure 1: Représentation du métabolisme énergétique cardiaque</i> .....	10
<i>Figure 2 : Représentation du métabolisme glucidique</i> .....	13
<i>Figure 3 : Représentation de la fermentation lactique</i> .....	14
<i>Figure 4 : Représentation de la chaîne de transport d'électron mitochondriale</i> .....	17
<i>Figure 5 : Représentation du métabolisme énergétique dans le cœur sain</i> .....	18
<i>Figure 6 : Représentation des lésions induites par l'ischémie et la reperfusion</i> .....	26
<i>Figure 7 : Représentation des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la souffrance myocardique périopératoire lié à l'IR</i> .....	29
<i>Figure 8 : Représentation du transport conventionnel des électrons (FET) sur la CTE</i> .....	34
<i>Figure 9 : Représentation du transport inverse des électrons (RET) sur la CTE</i> .....	35
<i>Figure 10 : Caractérisation des ROS et du système anti-oxydant</i> .....	38
<i>Figure 11 : Caractérisation morphologiques de l'apoptose</i> .....	45
<i>Figure 12 : Représentation de l'apoptose</i> .....	47
<i>Figure 13 : Caractérisation morphologiques de la nécrose</i> .....	51
<i>Figure 14 : Représentation des voies canoniques et non canoniques de la nécroptose</i> .....	53
<i>Figure 15 : Domaines BH des membres de la famille Bcl-2</i> .....	58
<i>Figure 16 : Structure repliée des membres de la famille Bcl-2</i> .....	59
<i>Figure 17 : Représentation des différents timings des stratégies de conditionnement cardioprotectrices pharmacologiques et non pharmacologiques</i> .....	69
<i>Figure 18 : L'APC diminue la libération de la troponine en post-opératoire d'une chirurgie cardiaque à cœur arrêté</i> .....	71
<i>Figure 19 : Représentation des phases précoce et tardif de l'APc</i> .....	72
<i>Figure 20 : Voie principale d'activation d'Akt par les récepteurs membranaires</i> .....	78
<i>Figure 21 : Implication des ROS dans le mécanisme de l'APC</i> .....	81
<i>Figure 22 : Représentation de la voie de signalisation cardioprotectrice induite par l'APc et le MPc in vitro</i> .....	113

## AVANT-PROPOS

---

## AVANT-PROPOS

---

L'ischémie-reperfusion (IR) fait partie, avec l'inflammation, des deux grands mécanismes lésionnels physiopathologiques observés en anesthésie et en réanimation. Elle est rencontrée dans diverses pathologies aiguës et intéresse divers organes. Parmi celles-ci, on retrouve l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux, les insuffisances circulatoires aiguës ou encore les arrêts cardio-circulatoires. Ce phénomène d'ischémie-reperfusion est également très fréquent en chirurgie programmée, en rapport avec des techniques chirurgicales nécessitant des clampages artériels telles que la chirurgie cardiaque à cœur arrêté, la chirurgie vasculaire, la transplantation d'organe mais aussi la chirurgie de membre réalisée sous garrot pneumatique.

Le vieillissement de la population et la forte prévalence des maladies cardio-vasculaires participent à l'incidence croissante des patients à risque cardio-vasculaire élevé, rencontrés en chirurgie. Malgré les efforts déployés dans le développement de multiples stratégies de cardioprotection, tant sur le plan expérimental que clinique, l'IR myocardique reste la première cause de morbi-mortalité péri-opératoire en chirurgie programmée toute spécialité confondue. Ce constat fait écho au défi stimulant et passionnant de la recherche translationnelle : comprendre les mécanismes fondamentaux et traduire ces connaissances en de meilleures stratégies pour améliorer la prise en charge et le pronostic de nos patients. Le préconditionnement pharmacologique est au cœur de ce challenge de la médecine péri-opératoire.

A partir des bases physiologiques du métabolisme du cardiomyocyte, je me suis intéressé dans un premier temps aux conséquences physiopathologiques de l'IR sur l'évolution des cardiomyocytes vers la mort cellulaire notamment l'apoptose. Nous avons donc accordé une attention particulière aux protéines de la famille Bcl-2, déterminantes dans le déclenchement et la régulation de ce type de mort cellulaire. Enfin, mon travail de thèse s'est attaché à comprendre les mécanismes capables d'induire l'effet protecteur anti-apoptotique du préconditionnement pharmacologique.

## INTRODUCTION

---

# INTRODUCTION

## I. Le métabolisme énergétique du cardiomyocyte

### 1) Généralités

Le métabolisme énergétique du cœur est complexe. Il fait intervenir trois composants majeurs : l'utilisation des substrats, la production d'énergie et le transport et l'utilisation d'énergie (**Figure 1**).

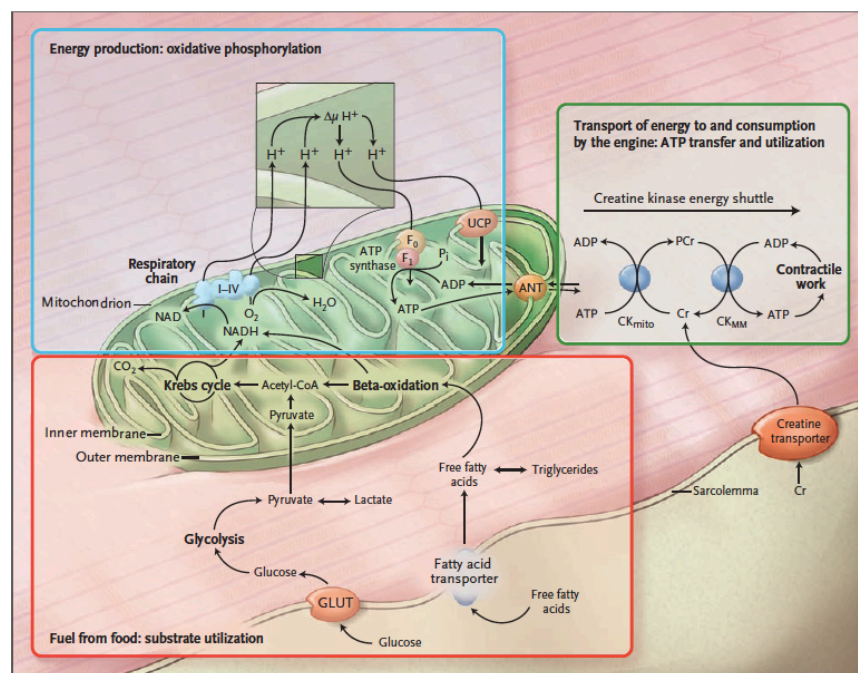


Figure 1: Représentation du métabolisme énergétique cardiaque

(Neubauer S., N Engl J Med, 2007)<sup>1</sup>

Le métabolisme énergétique comporte 3 grandes parties. La première est l'utilisation des substrats (cadre en rouge) dont le glucose et les acides gras libres. Au cours de cette étape, le glucose entre dans la cellule grâce à un transporteur spécifique et va être utilisé pour produire de l'énergie grâce à la glycolyse. Les acides gras libres entrent dans la cellule par un transporteur puis vont être catabolisés par la β-oxydation. La deuxième partie est la production d'énergie par la phosphorylation oxydative (cadre en bleu). La troisième partie est le transfert d'énergie et son utilisation (cadre en vert).

L'utilisation des substrats comprend l'entrée du glucose et des acides gras dans la cellule, leur transformation en intermédiaires pendant la glycolyse et la β-oxydation respectivement, ainsi que l'entrée de ces intermédiaires dans le cycle de Krebs. Le deuxième composant est la phosphorylation oxydative par la chaîne respiratoire mitochondriale qui permet la production

d'ATP (Adénosine Tri Phosphate), source d'énergie pour toutes les réactions nécessaires au maintien des fonctions cellulaires et d'une homéostasie normale. Le troisième composant comprend le transfert de l'énergie par le système de navette mettant en jeu la créatine kinase et sa consommation par les différentes ATPases que nous ne détaillerons pas dans ce travail<sup>1</sup>. En condition physiologique, 90% de l'énergie produite par la cellule (ATP produit par les mitochondries des cardiomyocytes) sert, à la contraction cardiaque. Les 10% restants sont utilisés pour accomplir toutes les autres fonctions du cardiomyocyte telle que l'homéostasie cellulaire<sup>2</sup>.

Le métabolisme énergétique cellulaire est défini par l'ensemble des réactions chimiques intracellulaires permettant la production d'énergie chimique (ATP) directement utilisable par la cellule<sup>3</sup>. La plupart de ces réactions sont des réactions d'oxydo-réduction au cours desquelles les nutriments (sources d'énergie prélevés dans le milieu extracellulaire) sont oxydés. Ces oxydations cataboliques conduisent d'une part à la production de coenzymes réduits (NADH,H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>) dont l'oxydation permanente est indispensable pour la pérennité du système et d'autre part à la production d'ATP dont l'hydrolyse libère l'énergie nécessaire aux réactions chimiques<sup>4</sup>. Au repos, le myocarde consomme le glucose, des acides gras libres et du lactate selon les disponibilités. Ces substrats participent chacun à la dépense énergétique : glucose (15%), lactate (15%), acides gras (65%), acides aminés et corps cétoniques (5%). Les lipides représentent donc le substrat majoritaire du cœur<sup>2</sup>.

L'oxygène est fourni au myocarde par la circulation coronaire. Il diffuse depuis le capillaire jusqu'au mitochondries du myocyte. Il est utilisé presque en totalité dans la chaîne respiratoire mitochondriale<sup>2</sup>. L'oxygène consommé est destiné à la formation d'ATP. Dans les cellules cardiaques, la production d'ATP est dépendante de trois voies métaboliques : la glycolyse, la bêta-oxydation des acides gras ainsi que les phosphorylations oxydatives<sup>4</sup>. Quant aux co-enzymes (NADH,H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>) , leur réduction est assurée par la glycolyse, la beta-oxydation des acides gras et par le cycle de Krebs<sup>4</sup>. Il existe d'autres voies métaboliques mineures permettant la production d'ATP et la réduction des co-enzymes : la voie des pentoses phosphates et l'oxydation des acides aminés (glutamine, glycine, aspartate...) que je n'aborderai pas ici.

## 2) Utilisation des substrats

### a. Glycolyse

La glycolyse est l'une des voies cataboliques du glucose qui se déroule dans le cytoplasme de la cellule indépendamment de la présence d'oxygène<sup>4</sup>. En premier lieu, l'entrée du glucose dans le cardiomyocyte se fait grâce à des transporteurs car le glucose est hydrophobe et par conséquent la membrane plasmique lui est imperméable. Il existe deux classes de transporteurs de glucose dans les cardiomyocytes : les GLUTs (GLUcose Transporter, transporteur facilitant), et les SGLTs (co-transporteurs sodium-glucose). Au cours de la glycolyse, le glucose (molécule à 6 atomes de carbone) est oxydé en deux molécules d'acide pyruvique (3 atomes de carbone)<sup>5</sup>. La glycolyse comprend 10 réactions successives dont les enzymes clefs sont l'héxokinase (HK), la phosphofructokinase 1 (PFK1), et la pyruvate kinase (PK) qui sont responsables du caractère limitant et irréversible de la réaction<sup>6</sup>. Le bilan énergétique net de la glycolyse est la production de deux moles d'ATP pour l'oxydation d'une mole de glucose oxydée.

De plus, la glycolyse ne peut exister qu'en présence de deux moles de co-enzymes oxydées  $\text{NAD}^+$ . Ainsi, deux molécules de NADH (pouvoir réducteur) par molécule de glucose sont formées au cours de la glycolyse. En contexte aérobie, ces molécules de NADH donnent leurs électrons à la chaîne de transport en électrons (CTE) mitochondriale. Les électrons sont transmis le long de cette chaîne jusqu'à l'oxygène moléculaire, formant de l'eau, et le  $\text{NAD}^+$  formé à partir du NADH est réutilisé pour la glycolyse. En revanche en condition anaérobie, le NADH abandonne ses électrons et est reconverti en  $\text{NAD}^+$ , ce qui est indispensable pour que les réactions de la glycolyse puissent continuer à se produire. Cette production de co-enzymes oxydés  $\text{NAD}^+$  se fait donc grâce à la fermentation lactique ou via la chaîne respiratoire mitochondriale en fonction de l'état d'oxygénation de la cellule<sup>5</sup>. De même, le devenir du pyruvate, produit final de la glycolyse, dépend également de l'état d'oxygénation de la cellule qui est utilisé soit pour la fermentation lactique en l'absence d'oxygène ; soit pour la production d'électrons riches en énergie lors du cycle de Krebs destinés secondairement à la CTE mitochondriale où se produiront les phosphorylations oxydatives en présence d'oxygène<sup>7</sup>(**Figure 2**).



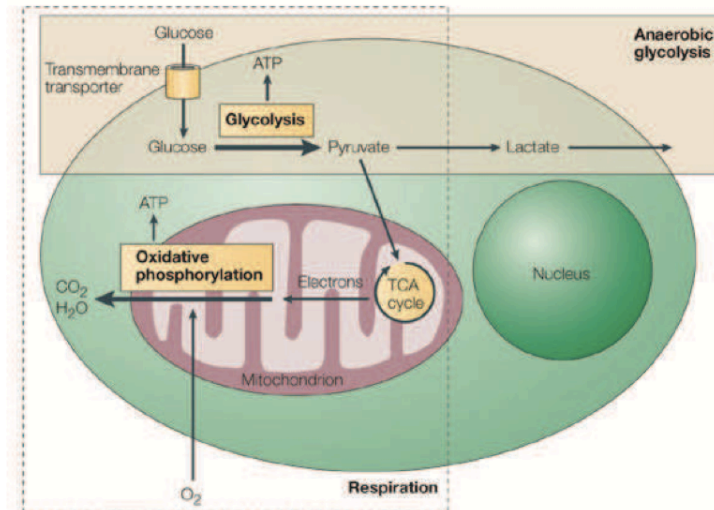


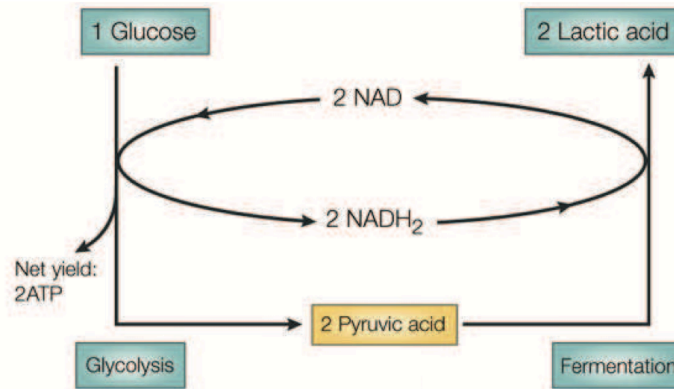
Figure 2 : Représentation du métabolisme glucidique

(Stanley et al., *Physiol Rev*, 2005)<sup>8</sup>

La glycolyse qui transforme une mole de glucose en 2 moles de pyruvate avec la production de 2 moles d'ATP. Selon les conditions d'oxygénation, le pyruvate est soit fermenté en lactate, processus appelé fermentation lactique (glycolyse anaérobie), ou soit transformé en acétyl-CoA pour être incorporé au cycle de Krebs (TCA) dans la mitochondrie et permettre la production de 34 moles d'ATP par la phosphorylation oxydative.

#### b. Fermentation lactique

En l'absence d'oxygène, la fermentation lactique est une simple réaction d'oxydo-réduction entre le pyruvate et la co-enzyme réduite (NADH, H<sup>+</sup>) permettant la régénération du (NAD<sup>+</sup>) indispensable pour la pérennisation de la glycolyse<sup>9</sup>. Ainsi, la réduction du pyruvate en lactate, grâce à l'action de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH), permet donc de régénérer le NAD<sup>+</sup> dont le stock est limité (**Figure 3**)<sup>4,10</sup>. Compte tenu de la faible différence de potentiel redox entre le (NAD<sup>+</sup>/NADH, H<sup>+</sup>) et pyruvate/lactate, cette réaction produit une oxydation partielle du glucose et est donc responsable d'un faible rendement énergétique. Le bilan énergétique net de la fermentation lactique est le même que celui de la glycolyse : deux moles d'ATP pour l'oxydation d'une mole de glucose oxydée<sup>11</sup>.



**Figure 3 : Représentation de la fermentation lactique**  
(Depré et al., Eur J Biochem, 1998)<sup>9</sup>

La fermentation lactique a un rendement énergétique très faible avec la production deux moles d'ATP pour une mole de glucose oxydée en l'absence d'oxygène. Elle permet uniquement la régénération du (NAD<sup>+</sup>) pour pérenniser la glycolyse au prix d'une acidification.

### c. Beta-oxydation des acides gras (AG)

La contribution de la  $\beta$ -oxydation des acides gras (AG) au métabolisme oxydatif global du cœur est très variable et dynamique<sup>5</sup>. En effet, d'une contribution mineure elle peut représenter jusqu'à presque 100 % des besoins énergétiques totaux du cœur<sup>12,13,14</sup>. L'utilisation des AG par le cœur est contrôlée à de nombreux niveaux et dépend de la source, de la concentration, du type d'AG délivrés ainsi que de la concurrence avec les substrats énergétiques en présence.

Une fois admis dans le cytosol des cardiomyocytes (diffusion/transport membranaire), les AG sont estérifiés en acyl CoA gras par l'acyl CoA synthase. Le métabolisme oxydatif de l'acyl-CoA a ensuite lieu au sein de la matrice mitochondriale. Quatre enzymes existant sous différentes isoformes sont impliquées dans le métabolisme séquentiel de l'acyl-CoA: l'acyl-CoA déshydrogénase, l'énoyl-CoA hydratase, la L-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et la 3-cétoacyl-CoA thiolase<sup>15</sup>. Chaque cycle d'oxydation des AG aboutit au raccourcissement de deux carbones issus du motif acyl-, induisant ainsi la production d'acétyl CoA, de flavinadénine dinucléotide (FADH<sub>2</sub>) et de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH).

La  $\beta$ -oxydation des AG est finement régulée à chaque étape de la voie métabolique, y compris au niveau de la lipoprotéine lipase (enzyme permettant la conversion des AG plasmatiques, sous forme de lipoprotéines, en AG libres capables de pénétrer dans le cardiomyocyte), de l'absorption par le cardiomyocyte, de l'estérification en CoA, de

l'absorption et de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. Le rendement de la  $\beta$ -oxydation des AG dépend aussi fortement de la demande métabolique et de l'activité du cycle de l'acide citrique et de la chaîne de transport en électrons mitochondriale, mis en jeu lors de la phosphorylation oxydative.

Au total, La  $\beta$ -oxydation est la principale voie de dégradation des AG qui sont transformés en acyl-CoA en présence d'ATP. Ainsi, l'acyl-CoA pénètre dans la mitochondrie pour être transformé en acetyl-CoA et rejoindre le cycle de Krebs (**Figure 5**). Cette voie énergétique est plus énergétique que la dégradation du glucose (130 ATPs produits pour un AG comme le palmitate) mais elle est plus lente et nécessite la consommation initiale d'ATP.

### 3) Production d'énergie

#### a. Cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs)

A l'issue de la glycolyse, le pyruvate est internalisé dans la mitochondrie, organe spécialisé dans la production énergétique, pour subir une carboxylation oxydative en acetyl-CoA qui permet le transfert du groupe « acetyl » sur l'oxalo-acétate (produit final du cycle de Krebs) pour reconstituer le citrate. Le reste du cycle de Krebs consiste en une série de 8 réactions chimiques d'oxydo-réduction et de carboxylation responsables de la régénération des co-enzymes réduites ( $\text{NADH, H}^+$ ) et ( $\text{FADH}_2$ ) et de l'oxydation complète du pyruvate en  $\text{CO}_2$ <sup>16</sup>. Le  $\text{CO}_2$ , issu de l'oxydation complète des atomes de carbone du groupement acétyle de l'acetyl-CoA est libéré en tant que déchet tandis que les électrons riches en énergie du NADH sont transmis à la CTE située sur la membrane interne mitochondriale, et finissent par se combiner avec l' $\text{O}_2$  pour former de l' $\text{H}_2\text{O}$ . Bien que le cycle de l'acide citrique n'utilise pas lui-même l'oxygène, il a besoin d' $\text{O}_2$  pour se poursuivre car il n'y a pas d'autre moyen efficace pour débarrasser le NADH de ses électrons et régénérer le  $\text{NAD}^+$  dont le cycle a besoin.

L'énergie emmagasinée par les électrons riches en énergie du NADH et du  $\text{FADH}_2$  sera ensuite utilisée pour produire de l'ATP au décours de multiples phosphorylations oxydatives, seules étapes du catabolisme des substrats énergétiques à utiliser directement l' $\text{O}_2$  moléculaire.

## b. Phosphorylations oxydatives

Les phosphorylations oxydatives se déroulent au niveau de la CTE ou chaîne respiratoire mitochondriale, située en de nombreux exemplaires au niveau de la membrane interne mitochondriale. La CTE mitochondriale est constituée d'une succession de 4 complexes (3 complexes (C-I, III et IV) transmembranaires enchâssés dans la membrane interne de la mitochondrie et le complexe II membranaire à la face matricielle) au potentiel d'oxydo-réduction croissant dont les complexes I, III et IV forment des pompes à protons (**Figure 4**)<sup>17</sup>. Les protéines de la chaîne respiratoire guident les électrons de manière à ce qu'il se déplacent successivement d'un complexe enzymatique à l'autre sans court-circuit qui leur permettrait de sauter un complexe. Chaque transfert d'électrons est une réaction d'oxydo-réduction : la molécule ou l'atome donneur d'électron devient oxydé, alors que la molécule ou l'atome receveur devient réduit. Les électrons vont passer spontanément d'une molécule dont l'affinité pour ses électrons disponibles est faible, et qui peut donc les perdre facilement, à des molécules qui ont une forte affinité pour ses électrons. Par exemple, le NADH qui possède des électrons riches en énergie, mais une faible affinité pour ses électrons, les transfère facilement au complexe I. Ainsi, les complexes I et II sont respectivement oxydés par les co-enzymes réduites (NADH, H<sup>+</sup>) et (FADH<sub>2</sub>) issues du cycle de Krebs entraînant la création d'un gradient transmembranaire de protons ainsi qu'une libération d'électrons pris en charge par la suite par différents transporteurs (CoQ, complexe III, cytochrome c). Les réactions d'oxydo-réduction se poursuivent aux complexes III et IV. Le complexe IV ou cytochrome oxydase reçoit les électrons provenant du cytochrome c et catalyse la réduction d'un O<sub>2</sub> (accepteur final d'électrons) en 2 H<sub>2</sub>O, ce qui constitue la respiration<sup>18</sup>. En effet, quatre électrons du cytochrome c et quatre protons de l'environnement aqueux sont ajoutés à chaque molécule d'O<sub>2</sub> au cours de la réaction  $4e^- + 4H^+ + O_2 \Rightarrow 2 H_2O$ . De plus, quatre protons supplémentaires sont pompés à travers la membrane pendant le transfert d'électrons, créant le gradient électro-chimique de protons. Le pompage des protons est provoqué par des changements allostériques de conformation de la protéine, qui sont produits par l'énergie libérée par le transport d'électrons. C'est à ce niveau que presque tout l'oxygène que nous respirons est utilisé, servant de receveur final aux électrons donnés par le NADH au début de la chaîne respiratoire.

Au total, un puissant gradient transmembranaire de proton de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie est créé. Le complexe V, appelé ATP synthase ( $F_0F_1$  ATP<sub>ase</sub>), est un canal à proton convertissant l'énergie osmotique du gradient électrochimique à proton en énergie mécanique de transconformation permettant la synthèse d'ATP à partir de l'ADP<sup>19</sup>. Le bilan énergétique net de la phosphorylation oxydative est de 36 moles d'ATP à partir de l'oxydation complète d'une mole de glucose, responsable d'un rendement énergétique maximal (20 fois supérieur à la fermentation lactique)<sup>20</sup>.

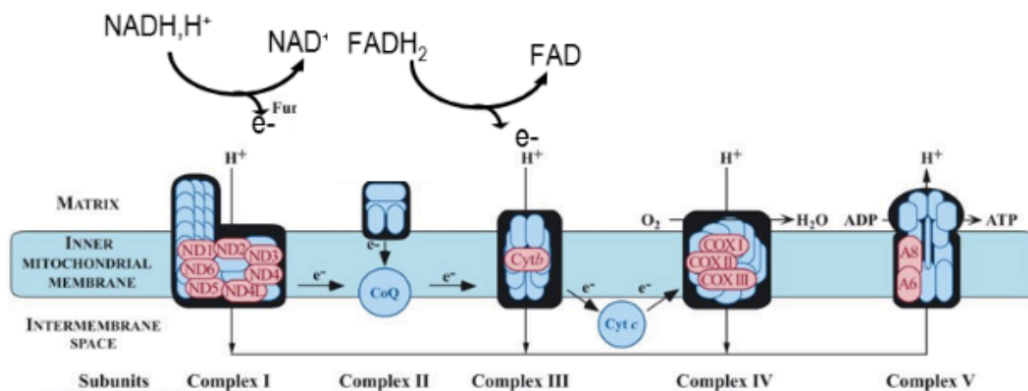


Figure 4 : Représentation de la chaîne de transport d'électron mitochondriale

(DiMauro et al., *Biochim Biophys Acta*, 2004)<sup>21</sup>

La CTE comprend 4 complexes impliqués dans le transport d'électrons par l'intermédiaire de réaction d'oxydo-réduction selon un potentiel redox croissant jusqu'à l'oxygène qui est l'accepteur final d'électrons formant ainsi de l'eau en présence de protons. Ces réactions d'oxydo-réduction permettent la création d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie, participant au potentiel mitochondrial. Ainsi le complexe V ou ATPsynthase ( $F_0F_1$  ATPase) qui est un canal à protons peut utiliser le gradient de proton comme source d'énergie pour produire de l'ATP à partir de l'ADP par transconformation.

En conclusion, la production d'ATP au sein du myocarde sain est majoritairement assurée par l'oxydation des AG et du glucose. La glycolyse et la  $\beta$ -oxydation des AG convergent vers la formation d'acetyl-CoA qui est intégré et oxydé dans le cycle de Krebs, permettant ainsi le renouvellement des co-enzymes réduits NADH et FADH<sub>2</sub>, qui seront utilisés par la chaîne respiratoire mitochondriale. Les électrons de haute énergie ainsi formés et supportés par le NADH et le FADH<sub>2</sub> vont représenter le carburant de la CTE mitochondriale. La principale synthèse d'ATP cellulaire a lieu dans la mitochondrie, où l'oxygène représente l'accepteur final d'électrons de la cascade enzymatique (**Figure 5**)

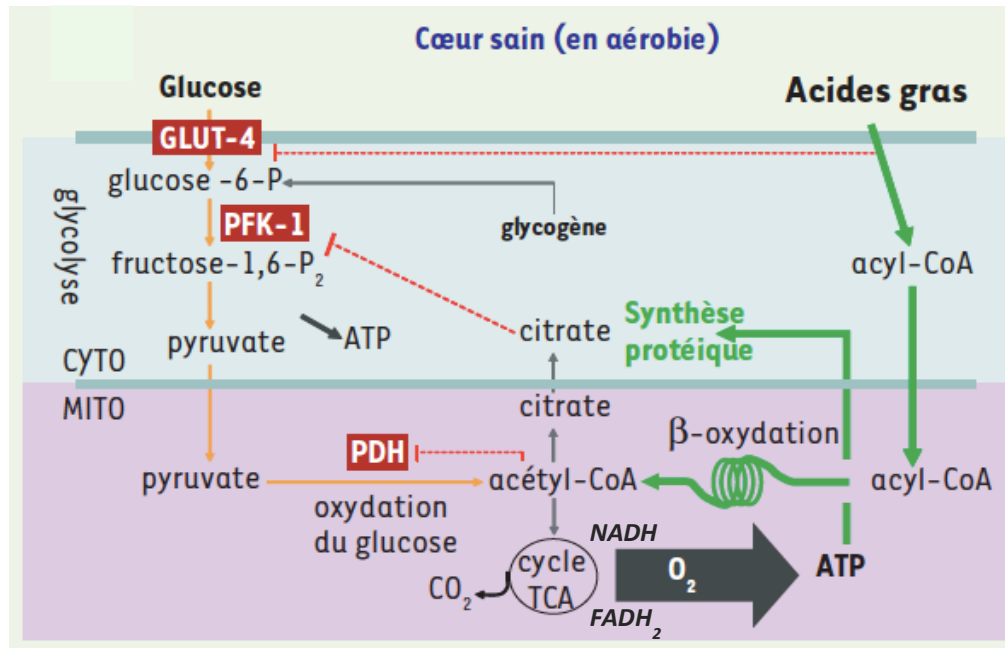


Figure 5 : Représentation du métabolisme énergétique dans le cœur sain

(Foretz et al, Med Sci, 2006)<sup>22</sup>

La production d'ATP par le cœur sain est assurée en condition d'aérobie par l'oxydation de différents substrats comme les acides gras et le glucose, le substrat préférentiel étant les acides gras (70 %). Le glucose et les acides gras convergent vers une voie finale commune : la fourniture d'équivalents réduits (nicotinamide adénine dinucléotide [NADH] ou flavine adénine dinucléotide dihydrogénée [FADH<sub>2</sub>]) qui seront utilisés par la chaîne respiratoire mitochondriale. L'acétylcoenzyme A est situé au carrefour des deux grandes voies métaboliques (glycolyse et β-oxydation). À ce niveau, les différents substrats entrent en compétition pour la fourniture d'énergie, ceci expliquant l'existence d'étapes régulatrices importantes (pyruvate déshydrogénase par exemple). Le cycle de Krebs est une voie métabolique particulière qui libère peu d'énergie sous forme de liaison phosphate (un seul ATP) mais qui permet l'oxydation complète de l'acétylcoenzyme A. L'énergie ainsi libérée est transférée sous forme de potentiel redox (NADH ou FADH<sub>2</sub>) qui va représenter le véritable carburant de la chaîne respiratoire. C'est dans la mitochondrie qu'a lieu la principale synthèse d'ATP cellulaire, l'oxygène qui représente le comburant n'intervient qu'au niveau de la fin de la cascade enzymatique.



## Résumé Partie I

- La contraction des cardiomyocytes requière 90% des ressources énergétiques cellulaires dont les substrats majoritaires sont les lipides.
- La production d'ATP est dépendante de 3 voies métaboliques : la glycolyse, la bêta-oxydation et les phosphorylations oxydatives
- La réduction des co-enzymes (NADH et FADH<sub>2</sub>) est assurée par la glycolyse, la bêta-oxydation et le cycle de Krebs. Ces co-enzymes sont chargés en électrons de haute énergie et représentent les véritables moteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale
- En l'absence d'oxygène, la fermentation lactique permet la régénération des co-enzymes oxydés (NAD<sup>+</sup>) indispensables pour la pérennisation de la glycolyse.
- En présence d'oxygène, les phosphorylations oxydatives se produisant au niveau de la CTE mitochondriale permettent la régénération des co-enzymes oxydés (NAD<sup>+</sup>) réutilisables pour l'entretien de la glycolyse.
- Au sein des complexes de la CTE mitochondriale, une réaction d'oxydo-réduction se produit libérant suffisamment d'énergie pour pomper des protons de la matrice vers l'espace inter-mitochondrial à l'origine de la génération du gradient transmembranaire électrochimique à protons indispensable pour la production finale d'ATP.
- Le bilan énergétique net de la fermentation lactique est le même que celui de la glycolyse : deux moles d'ATP pour l'oxydation d'une mole de glucose oxydée.
- Le bilan énergétique net de la phosphorylation oxydative à partir de l'oxydation complète du glucose est la production de 36 moles d'ATP pour 1 mole de glucose.



## II. Ischémie-Reperfusion

### 1) Contexte historique et première description

Pour la première fois en 1960, Jennings et son équipe firent les premières observations montrant que la reperfusion post-ischémique était associée à des lésions propres myocardiques<sup>23</sup>. Ils réalisèrent des occlusions coronaires de différentes durées sur des chiens, suivies ou non de reperfusion. Ils montrèrent alors que les dommages histologiques (gonflement des cellules, contracture des myofibrilles, perturbation du sarcolemme et l'apparition de particules intra-mitochondriales de phosphate de calcium) apparaissant après 30 à 60 minutes d'ischémie suivi de reperfusion étaient comparables à ceux révélés après 24 heures d'occlusion coronaire unique permanente sans reperfusion.

En 1985, Braunwald et Kloner proposèrent dans un éditorial resté célèbre que la reperfusion pouvait être une « épée à double tranchant »<sup>24</sup>. En effet, la reperfusion constitue l'intervention nécessaire et évidente pour sauver le myocarde ischémique. Paradoxalement, bien qu'ayant un rôle salvateur, la reperfusion est également responsable de la survenue de la mort cellulaire par nécrose, apoptose ou encore autophagie.

### 2) Généralités

Dans la pratique clinique courante, la prise en charge d'une ischémie tissulaire implique également de traiter les lésions de reperfusion qui lui sont associées. Bien qu'il soit communément admis que la durée de l'ischémie soit un déterminant majeur de l'intensité des lésions d'IR, reperfusion dans un délai rapide n'est pas toujours possible. Peu importe la nature de la situation responsable de l'IR (transplantation d'organes, chirurgie cardiaque et hépatique, ainsi que l'utilisation de garrots et de clamps vasculaires); plusieurs facteurs humains (ex : délai de mobilisation des équipes médico-chirurgicales), et techniques (ex : temps nécessaire au prélèvement et au conditionnement des greffons) vont contribuer à la gravité des lésions impactant directement sur le pronostic de la chirurgie. Même dans un scénario idéal avec une durée minimale d'ischémie, la reperfusion sera malgré tout systématiquement à l'origine d'un stress cellulaire.

L'ischémie-reperfusion (IR) est un terme utilisé pour décrire les changements structuraux et fonctionnels du tissu d'intérêt lors de la restauration du flux sanguin après une période d'ischémie. La reperfusion est néanmoins une « épée à double tranchant » puisque des lésions apparaissent spécifiquement lors de cette phase malgré la correction de l'ischémie<sup>25</sup>. Elle génère des effets néfastes considérables tels que l'accélération de la nécrose des cellules irréversiblement endommagées lors de l'ischémie, un gonflement cellulaire majeur et entraîne la restauration d'un flux tissulaire hétérogène et chaotique. Expérimentalement, sur un modèle de cœur isolé-perfusé, la réoxygénation du myocarde s'accompagne de dommages cellulaires beaucoup plus importants que si l'ischémie avait été maintenue<sup>26</sup>. Le phénomène de reperfusion, est donc le résultat d'un cercle vicieux faisant intervenir de multiples mécanismes tels que la génération massive de radicaux libres de l'oxygène (ROS), une surcharge calcique intracellulaire, des altérations du métabolisme myocardique ainsi qu'une dysfonction endothéliale et mitochondriale.

### 3) Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion

Sur le plan physiopathologique, l'ischémie-reperfusion se décompose en 2 phases successives : l'ischémie puis la reperfusion<sup>27</sup>.

#### a. Ischémie

L'ischémie cardiaque correspond à un déséquilibre entre l'apport d'oxygène et de nutriment, et les besoins myocardiques. L'ischémie myocardique apparaît lorsque le débit sanguin coronaire est diminué par une occlusion partielle ou totale et qu'il devient inadéquat pour répondre à la demande du myocarde. Cette inadéquation aura notamment un certain nombre de conséquences physiologiques, biochimiques, électriques, mécaniques, morphologiques et moléculaires pour le myocarde.

La sévérité de l'ischémie va dépendre de ses caractéristiques et notamment du degré et de la durée de l'ischémie. Une courte durée de l'ischémie n'induit généralement que peu de conséquences néfastes et peut présenter un bénéfice tel qu'il est illustré par le préconditionnement. A l'opposé, si l'ischémie est maintenue pendant une durée suffisamment longue, les conséquences sont irréversibles et conduisent à la mort cellulaire.

La première phase, d'ischémie, est définie par une diminution de l'apport en sang artériel d'un tissu ou d'un organe. Ceci est donc responsable d'une baisse de l'oxygénation, appelée

hypoxie puis anoxie, associée à un défaut d'apport en substrats énergétiques (glucose, lactate, pyruvate, acides gras libres) et une suppression des échanges électrolytiques (calcium, potassium, proton...). L'ensemble de ces privations conduit à une altération voire un arrêt du fonctionnement du tissu et de l'organe. L'arrêt du débit sanguin artériel, responsable de l'ischémie, peut être secondaire à diverses étiologies. Les causes les plus fréquemment retrouvées sont soit une obstruction directe de la lumière de l'artère par un thrombus (appelé thrombose ou embolie), soit une compression extrinsèque de l'artère (garrot pneumatique, clampage artériel chirurgical, tumeur...) ou soit par une baisse ou un arrêt direct du débit cardiaque (insuffisance circulatoire aiguë, arrêt cardio-circulatoire).

A l'échelle cellulaire, les cardiomyocytes nécessitent une importante production d'ATP pour maintenir l'homéostasie cellulaire et permettre l'activité contractile. Cette production d'énergie est assurée principalement par la phosphorylation oxydative (OXPHOS) dont le fonctionnement est dépendant de la présence d'oxygène.

En situation d'ischémie, dès les premières minutes, l'absence d'apport en oxygène a pour conséquence un arrêt de l'OXPHOS. Les stocks préexistants de phosphate de haute énergie (PHE) sous forme d'ATP et de phosphocréatine sont relativement faibles. La glycolyse devient alors la principale source de production d'ATP tandis que l'oxydation du pyruvate et la bêta-oxydation des acides gras décroissent. Cette levée de l'inhibition de l'utilisation du glucose provient de la stimulation de la phosphofructokinase (PFK), enzyme clé de la glycolyse, qui est stimulée par la chute de l'ATP (effet Pasteur) et l'augmentation concomitante d'ADP et d'AMP consécutifs à l'hypoxie. Le glucose métabolisé pendant la glycolyse provient à la fois de la dégradation des réserves en glycogène du myocarde (stimulation de la glycogénolyse par activation de la glycogène phosphorylase (GP)) et de la captation du glucose à partir du sang. L'ischémie entraîne une forte augmentation de la captation du glucose sanguin, ce qui reflète une meilleure capacité de transport du glucose à travers la membrane du sarcolemme. Ainsi, la baisse de glucose engendrée par l'ischémie est en partie compensée par une meilleure conductance membranaire en raison d'une multiplication du nombre de transporteurs GLUT-1 et GLUT-4. Malheureusement, on comprend facilement qu'en raison de l'absence de stock d'ATP intra-cellulaire et que cette voie énergétique soit peu rentable et rapidement épuisable après consommation du glycogène intracellulaire, l'ischémie soit responsable d'une déplétion profonde en ATP<sup>28</sup>. En cas d'ischémie sévère, l'oxydation du glucose et la  $\beta$ -oxydation des acides gras cessent pratiquement. En effet, l'apport de glucose sanguin s'effondre du fait de

la chute du débit coronaire. Le glycogène intracellulaire devient alors la source principale de production d'ATP. L'oxydation du pyruvate, qui est classiquement transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH), cesse, ce qui aboutit donc à l'accumulation de 2 protons  $H^+$  pour chaque molécule de pyruvate formé (découplage entre la glycolyse anaérobie et l'oxydation du pyruvate). De plus, la baisse du débit sanguin empêche l'élimination des produits de la glycolyse anaérobie. Ainsi, la glycolyse est suivie par la fermentation lactique. Dans ces conditions, la production de lactate augmente, ce qui entraîne une augmentation de la quantité de lactate intra-myocardique et une surcharge cellulaire en protons.

Afin de limiter l'acidose intracellulaire, les protons sont expulsés hors de la cellule par l'intermédiaire des échangeurs  $Na^+/H^+$  (NHE) entraînant une surcharge sodique à l'origine d'un œdème cellulaire<sup>29</sup>. Compte tenu de la déplétion en ATP, les pompes ioniques  $Na^+/K^+$  et  $Ca^{2+}$  ATP-dépendantes sont déficientes et les échangeurs  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) assurent l'expulsion du sodium provoquant un influx cellulaire en calcium.

Au total, l'ensemble de ces troubles métaboliques intracellulaires (chute ATP + acidose + surcharge calcique) induit un arrêt de l'activité contractile myocardique et une initiation de la mort cellulaire par apoptose et nécrose (**Figure 6**).

#### b. Reperfusion

La seconde phase, de reperfusion, est définie par une restauration de l'apport en sang artériel d'un tissu après la phase d'ischémie. Ceci est donc responsable d'une restauration de l'oxygénation « normale » du tissu mais aussi des apports en substrats énergétiques et de l'homéostasie électrolytique. Malheureusement, la restauration complète des apports physiologiques chez des cellules qui se sont adaptées au métabolisme en anaérobie, provoque des lésions propres dites de reperfusion<sup>30</sup>. La reperfusion survient le plus souvent après une intervention médicale par désobstruction de l'artère (angioplastie endoluminale, déclampage artériel) ou par la normalisation du débit cardiaque (reprise activité circulatoire après un arrêt cardiaque).

A l'échelle cellulaire, la réintroduction brutale d'oxygène induit une reprise de fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale qui a été endommagée lors de la phase d'ischémie (notamment par la fuite de cytochrome c). Les réactions d'oxydo-réduction sont alors incomplètes au sein de la chaîne de transport d'électron aboutissant à une

production massive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au lieu de la production d'ATP. Selon le niveau de production de ROS, le système anti-oxydant peut être dépassé empêchant alors la neutralisation des ROS excédentaires.

Parallèlement, la réactivation des pompes ioniques ATP-dépendantes permet une correction rapide du pH intracellulaire par expulsion des protons, au prix d'une surcharge calcique persistante<sup>29</sup>. Ce retour au pH physiologique constitue singulièrement un événement délétère pour la cellule que l'on qualifie de « pH paradoxe »<sup>31</sup>.

L'ensemble de ces troubles métaboliques (excès de ROS + surcharge calcique + normalisation du pH) induit une hyper-contraction myocardique (sidération myocardique) et un stress oxydant majeur. Ce stress oxydant est à l'origine des lésions propres dites de reperfusion pouvant conduire à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). Il est maintenant admis que le mPTP est fermé en conditions normales, et s'ouvre lors d'une souffrance intense de la mitochondrie<sup>32</sup>. Cette ouverture représente pour la cellule un point de non-retour vers la mort cellulaire qu'elle soit de nature nécrotique ou apoptotique (**Figure 6**)<sup>25,33,30</sup>. Il a été de plus rapporté que l'apoptose contribuait de manière indépendante à la génération de lésions irréversibles du myocarde, notamment lors de la phase de reperfusion<sup>34</sup>. En effet, le gonflement de la matrice induit par l'ouverture du mPTP provoque une rupture de la membrane externe mitochondriale, à l'origine d'une fuite dans le cytoplasme de molécules dont le cytochrome c et l'AIF (Apoptosis Inducing-Factor), des agents pro-apoptotiques qui activent les caspases chargées d'exécuter la voie finale de l'apoptose. De plus, l'inflammation induite par l'ischémie-reperfusion participe à l'aggravation des lésions notamment lors de la reperfusion<sup>35,36</sup>.

Au total, l'ensemble des lésions d'ischémie puis de reperfusion altère le métabolisme cellulaire et induit la mort cellulaire par nécrose ou apoptose, qui représente le stade ultime du phénomène d'ischémie-reperfusion<sup>33</sup>. A l'échelle d'un organe, on observe des lésions d'ischémie-reperfusion hétérogènes. Au sein d'une zone globale de souffrance, appelée aire à risque (AAR : area at risk), on retrouve donc des cellules en nécrose, en nécroptose ou en apoptose selon leur degré de suppléance vasculaire résiduelle. La mort de ces groupes cellulaires forme l'infarctus tissulaire, appelé infarctus.

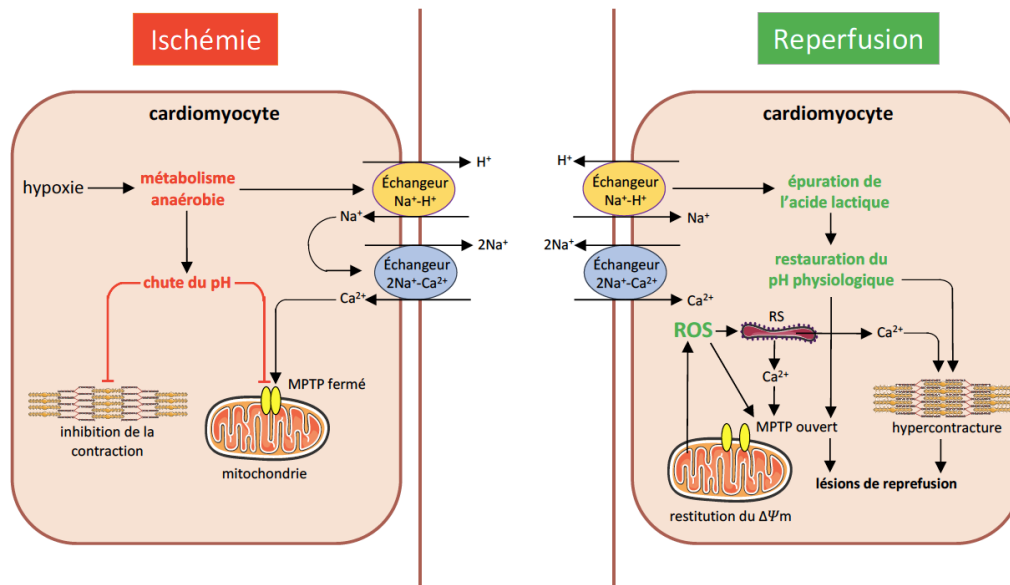


Figure 6 : Représentation des lésions induites par l'ischémie et la reperfusion

(Hausenloy et al., JCI, 2013<sup>33</sup>)

En situation d'ischémie, l'absence d'apport en oxygène, a pour conséquence un arrêt de l'O<sub>2</sub>PHOS basculant les cardiomyocytes vers un métabolisme anaérobie. La fermentation lactique conduit à la production d'acide lactique entraînant une surcharge cellulaire en proton. Afin de limiter l'acidose intracellulaire, les protons sont expulsés hors de la cellule par l'intermédiaire des échangeurs Na<sub>+</sub>/H<sup>+</sup> (NHE) entraînant une surcharge sodique. Compte tenu de la déplétion en ATP, les pompes ioniques Na<sub>+</sub>/K<sup>+</sup> et Ca<sub>2+</sub> ATP-dépendantes sont déficientes et les échangeurs Na<sub>+</sub>/Ca<sub>2+</sub> (NCX) assurent l'expulsion du sodium au prix d'une surcharge calcique intracellulaire. L'ensemble de ces troubles métaboliques (chute ATP + acidose + surcharge calcique) induit un arrêt de l'activité contractile myocardique et prévient l'ouverture du pore de transition mitochondrial (MPTP). En situation de reperfusion, la réintroduction brutale d'oxygène induit une reprise du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale préalablement endommagée par l'ischémie. Les réactions d'oxydoréduction sont alors incomplètes au sein de la chaîne du transport d'électron aboutissant à une production massive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au lieu de la production d'ATP. Parallèlement, la réactivation des pompes ioniques ATP-dépendantes permet une correction rapide du pH intracellulaire par expulsion des protons, au prix d'une surcharge calcique persistante. Cette dernière est également entretenue par le dysfonctionnement du réticulum sarcoplasmique (RS) induit par les ROS. L'ensemble de ces troubles métaboliques (excès de ROS + surcharge calcique + normalisation du pH) induit une hypercontracture myocardique et un stress oxydant. Ce dernier engendre alors des lésions propres dites de reperfusion pouvant conduire à la mort cellulaire par apoptose.

### c. Concepts émergents

Dorénavant, il est clairement admis que l'ischémie contrecarre le fonctionnement des pompes et transports ioniques ATP-dépendants et perturbe les mécanismes de régulation du volume cellulaire, conduisant à la lyse des organites intracellulaires et à la perméabilisation des membranes plasmiques. De plus, de nombreuses études récentes ont permis de faire la

lumière sur de « nouvelles » modalités de mort cellulaire induite par l'I/R dont la plupart suivent des séquences programmées d'événements, les sensibilisant à de potentielles interventions pharmacologiques<sup>37</sup>. Les différents types de mort cellulaires seront traités dans le IV chapitre de ce manuscrit.

La reperfusion, quant à elle, entraîne une production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote à l'origine de lésions cellulaires paradoxales. L'ensemble de ces événements convergent vers l'ouverture du pore de transition de la perméabilité mitochondriale (mPTP) suivi de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, étape finale commune de la mort des cellules induites par l'I/R. Par ailleurs, le stress oxydant déclenche une inflammation majeure par le recrutement de l'ensemble des acteurs de l'immunité cellulaire (médiateurs humoraux, cytokines, voies du complément, polynucléaires neutrophiles...) ainsi que le stress du réticulum endoplasmique au sein des tissus ischémiques. Cette accumulation lésionnelle peut provoquer un phénomène de non-revascularisation (*no-reflow*) capillaire post-ischémique concourant à l'amplification des lésions tissulaires.

En dehors de ces mécanismes, l'attention s'est plus récemment portée sur l'influence du microbiome intestinal, de l'exposition foetale aux facteurs de stress, des modifications épigénétiques de l'expression des gènes (méthylation de l'ADN, régulation par les histones et les ARN non codants tels que les microARNs), de la perturbation des systèmes de protéolyse intracellulaire (système ubiquitine-protéasome, métalloprotéases), des microparticules et de la contribution génomique-métabolomique-lipidomique dans la pathogénèse de l'I/R<sup>38,39,40,41,42,43,44,45</sup>.

#### 4) Ischémie-reperfusion en médecine péri-opératoire et réanimation

##### a. En chirurgie cardiaque

Le phénomène d'ischémie-reperfusion, notamment myocardique, représente la première cause de mortalité péri-opératoire en chirurgie programmée non-cardiaque<sup>46</sup>. Le vieillissement de la population et la forte prévalence des maladies cardio-vasculaires participent à l'incidence croissante des patients à risque cardio-vasculaire élevé rencontrés en chirurgie<sup>47</sup>. Ceci explique l'intérêt majeur de la prise en charge spécifique de ces patients et la nécessité du développement de moyens de protection vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion.

Par ailleurs, certaines interventions chirurgicales nécessitent l'exclusion vasculaire d'un organe ou d'un territoire pour permettre la réalisation d'un acte chirurgical. C'est notamment le cas en chirurgie cardiaque à cœur arrêté pour la réparation ou le remplacement valvulaire. Cet acte chirurgical nécessite un arrêt temporaire des battements cardiaques et une ouverture vidange des cavités cardiaques. Pour ce faire, il est mis en place une circulation extra-corporelle (CEC) afin d'assurer la perfusion de l'organisme, et un clampage aortique pour exclure le cœur. Après clampage aortique, l'arrêt cardiaque est obtenu par une injection intra-coronaire d'une solution de cardioplégie froide riche en potassium permettant un arrêt cardiaque en phase de relaxation. A l'issue de l'acte chirurgical, l'activité cardiaque est rétablie et le clampage aortique est levé pour permettre la reprise de l'activité circulatoire spontanée du patient, sous couvert d'une assistance par une CEC.

Ainsi la chirurgie cardiaque à cœur arrêté représente un véritable modèle d'ischémie-reperfusion myocardique clinique avec une phase d'ischémie lors du clampage aortique suivie d'une phase de reperfusion lors du clampage aortique.

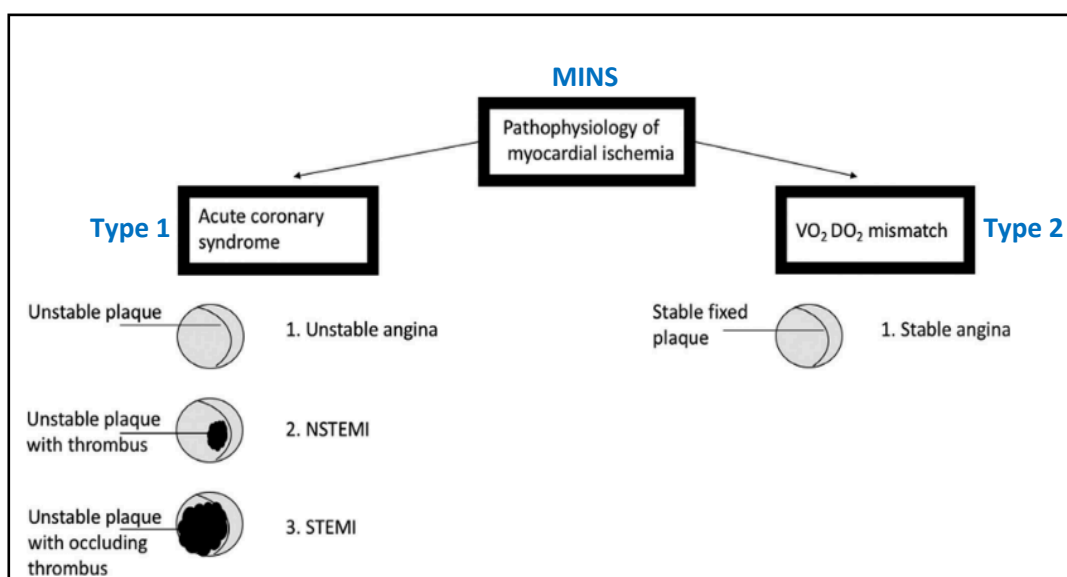
#### b. En chirurgie non cardiaque

L'IR est au cœur du mécanisme lésionnel de la cardiopathie ischémique (CI)<sup>33</sup>. Il s'agit de la principale cause de morbidité et de mortalité dans le monde<sup>48,49,50</sup>. En outre, les patients atteints de CI programmés pour une chirurgie non cardiaque présentent une morbi-mortalité périopératoire cardio-vasculaire élevée et caractérisée par un risque accru de complications myocardiques péri-opératoires telles que la souffrance myocardique ischémique péri-opératoire, l'infarctus, l'insuffisance cardiaque et les arythmies<sup>51,52</sup>. De plus, le nombre de patients atteints de coronaropathie stentée et/ou pontée sous traitement cardioprotecteur, éligible à une intervention chirurgicale, augmente en raison du vieillissement de la population<sup>53</sup>. Enfin, le degré d'occlusion coronarienne, le volume du myocarde ischémique, l'étendue de la circulation collatérale, la réserve énergétique myocardique préexistante (capable de tolérer le stress chirurgical) ainsi que les facteurs génétiques détermineront conjointement la présentation clinique spécifique de l'ischémie myocardique.

Dans le contexte péri-opératoire de la chirurgie non cardiaque de risque modéré à majeur, il existe essentiellement deux mécanismes lésionnels distincts responsables du développement de l'ischémie myocardique<sup>54</sup>. Le premier est le syndrome coronarien aigu



(SCA), également connu sous le nom d'infarctus du myocarde de type 1 (avec (STEMI) ou sans sus-décalage du segment ST (NSTEMI)). Il est le résultat d'une rupture de plaque d'athérome (instable) ou d'une ulcération de l'endothélium coronarien. Le second est le résultat d'un déséquilibre prolongé entre les apports ( $mDO_2$  : délivrance myocardique en  $O_2$ ) et les besoins ( $mVO_2$  : consommation myocardique en oxygène  $O_2$ ) dans le myocarde en présence d'une CI stable (infarctus de type 2) (**Figure 7**). L'infarctus de type 2 semble plus fréquent, dans le contexte péri-opératoire, que le type 1.



**Figure 7 : Représentation des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la souffrance myocardique périopératoire lié à l'IR**

(Smit et al, JCVA, 2020)<sup>54</sup>

Mécanismes physiopathologiques (Type 1 et Type 2) responsables de la souffrance myocardique péri-opératoire (MINS).  $DO_2$ : Délivrance en oxygène; NSTEMI: IDM sans sus-décalage du segment ST ; STEMI : IDM avec sus-décalage du segment ST ;  $VO_2$  : Consommation en oxygène ; MINS : Souffrance myocardique péri-opératoire en chirurgie non-cardiaque.

Selon le groupe de travail réunissant la Société européenne de cardiologie, l'American College of Cardiology Foundation (ACC), l'American Heart Association (AHA) et l'Organisation mondiale de la Santé, la quatrième définition universelle de l'infarctus du myocarde (IDM) parue en 2018 est la suivante : tout événement clinique (ou pathologique) en rapport avec une souffrance myocardique ischémique au cours duquel il existe des preuves de la mort des cellules myocardiques (symptômes ischémiques telles que la douleur thoracique, modifications électrocardiographiques, intervention sur les artères coronaires, anomalie *de novo* de la cinétique pariétale du cœur, ou de *mismatch* scintigraphiques)<sup>55</sup>.

Par ailleurs, la souffrance myocardique est définie par une augmentation de la troponine Ic (troponine I cardiaque) au-delà de la valeur supérieure limite de référence du 99e percentile. La souffrance myocardique périopératoire en chirurgie non cardiaque (MINS) se caractérise par une atteinte myocardique d'allure ischémique au cours des 30 premiers jours suivant une chirurgie non cardiaque. Cette entité lésionnelle inclut les patients souffrant d'un infarctus (symptomatique ou non) et présentant donc une élévation postopératoire de la troponine de manière symptomatique ou non, associée à des anomalies électrocardiographiques ou d'autres critères qui répondent à la définition universelle sus-citée.

A l'échelle mondiale, 200 millions d'adultes sont pris en charge chaque année au bloc opératoires en chirurgie non cardiaque majeure, et environ 8 millions d'entre eux souffriront de MINS<sup>56</sup>. Une récente étude observationnelle a rapporté que l'infarctus du myocarde périopératoire (IDMP) se produit chez 0,9 % des patients bénéficiant d'une chirurgie majeure non cardiaque et qu'il existe une association forte entre l'infarctus du myocarde péri-opératoire et la mortalité hospitalière<sup>57</sup>. L'incidence de MINS estimée à partir des études ayant évalué les conséquences de l'élévation post-opératoire de la troponine varie de 8 à 19 % dont 20 à 40 % d'infarctus péri-opératoire, que la troponine mesurée soit ultra-sensible ou non<sup>58,59,60</sup>. L'IDMP et la MINS sont considérés comme des lésions myocardiques lourdes de conséquences sur le plan du pronostic. En effet, l'élévation isolée et significative de la troponine après une chirurgie non cardiaque est prédictive de la mortalité à 30 jours post-opératoires<sup>61,62,60</sup>. Parmi l'ensemble de la population susceptible de subir une chirurgie non cardiaque majeure, les patients coronariens traités plus ou moins porteurs de stents et/ou de pontages aorto-coronariens restent les plus vulnérables à l'ischémie myocardique périopératoire. Malgré l'identification des facteurs déclenchants impliqués dans l'ischémie myocardique périopératoire (agressions tissulaires, gestion des agents anesthésiques, la manipulation des voies aériennes, les fluctuations hémodynamiques et de la température corporelle, la douleur, les saignements et le jeûne préopératoire) et de leurs conséquences (inflammation périopératoire, coagulopathie, défaillances hémodynamiques, hypothermie, hypoxie et anémie) la physiopathologie de l'ischémie myocardique périopératoire reste encore mal connue et fait encore débat<sup>63,54</sup>.

Ainsi, en tant que médecin assurant la gestion des soins de la période péri-opératoire, l'enjeu majeur est d'améliorer la compréhension des mécanismes lésionnels de l'IR (type 1 – type 2) liée à la souffrance myocardique péri-opératoire afin d'en optimiser la prévention et

la prise en charge grâce au déclenchement précoce de stratégies thérapeutiques ciblées. Cette approche permettrait d'en limiter l'incidence et d'en réduire la morbi-mortalité.

### c. Arrêt cardio-respiratoire (ACR)

L'arrêt cardiaque est un problème de santé universel, au cours duquel l'IR représente le principal facteur de mauvais pronostic<sup>64,65,66</sup>. La durée d'ischémie, caractérisée par la durée de No Flow (délai entre ACR et le début de la réanimation cardio-pulmonaire (RCP)) et la durée de Low Flow (délai entre le début de la RCP et le retour à une activité cardiaque spontanée), est déterminante dans le pronostic de l'ACR<sup>67</sup>.

La réanimation cardiopulmonaire (RCP) est incontournable dans l'algorithme recommandé pour permettre au cœur de reprendre une activité spontanée<sup>68</sup>. Ainsi, en rétablissant la perfusion des organes après un arrêt brutal du débit cardiaque plus ou moins prolongé, une RCP efficace provoque une situation d'IR massive et disséminée à l'ensemble des organes.

Les traitements médicamenteux pris au moment de l'arrêt cardiaque peuvent avoir des conséquences sur le pronostic, notamment ceux possédant des propriétés protectrices contre l'IR. C'est le cas par exemple des patients sous statines avant leur admission en soins intensifs-réanimation<sup>69</sup>. Ces dernières années, les principales améliorations du pronostic de l'arrêt cardiaque sont dues à la réduction des délais de sauvetage permettant de limiter les périodes de No et Low Flow ainsi qu'au contrôle ciblé de la température (hypothermie thérapeutique) à visée neuroprotectrice<sup>67,70,71</sup>. Malgré le fort engouement suscité ces dernières années par les méthodes d'assistance circulatoire de type ECMO veino-artérielle (ECMO-VA)<sup>72</sup>; dont le principe est d'assurer l'oxygénation et la perfusion des organes en attendant la restauration de la fonction myocardique post-ACR<sup>73,74</sup>; leur place dans les algorithmes de prise en charge des ACR intra et/ou extra-hospitaliers restent encore à préciser<sup>75</sup>. L'ECMO-VA serait d'autant plus efficace en cas d'ACR d'origine rythmique avec une courte durée de réanimation (inférieure à 35 minutes) et en cas d'implantation précoce (inférieure à 1 heure)<sup>76</sup>. En revanche, à ce jour, aucun agent pharmacologique n'a encore fait la preuve de son efficacité en termes d'amélioration de la survie à court terme dans l'ACR.

## *Résumé Partie II*

- L'IR représente la 1<sup>ère</sup> de morbi-mortalité péri-opératoire toute chirurgie confondue
- L'IR est composée de phases successives : l'ischémie puis la reperfusion.
- La reperfusion est considérée comme une « épée à double tranchant » en raison des lésions spécifiques induites malgré la correction de l'ischémie.
- L'ischémie myocardique associe une chute de l'ATP, acidose et surcharge calcique au sein des cardiomyocytes.
- La reperfusion myocardique associe normalisation du pH intra-cellulaire, persistance de la surcharge calcique et un stress oxydant majeur conduisant à la mort cellulaire par nécrose, la nécroptose et apoptose des cardiomyocytes.
- La chirurgie cardiaque à cœur arrêté représente un véritable modèle d'ischémie-reperfusion myocardique clinique.
- La MINS est une entité regroupant l'ensemble des manifestations lésionnelles liées à l'IR (infarctus de type 1 et 2) dans le contexte péri-opératoire de la chirurgie non cardiaque
- La souffrance myocardique péri-opératoire liée à l'IR est associée à un risque accru de morbi-mortalité toute chirurgie confondue
- L' ACR suivie d'une RCP efficace représente un véritable modèle d'IR généralisée à l'ensemble de tous les organes

### III. Les espèces réactives de l'oxygène

#### 1) Généralités

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) appartiennent à la famille des radicaux libres qui sont des composés chimiques avec un ou plusieurs électrons non appariés sur une orbitale externe. Ces molécules sont donc très instables et hautement réactives avec de nombreux composés impliqués dans des processus non spécifiques et expliquant leurs demi-vies très courtes. Cette réactivité des radicaux libres est responsable de réaction d'oxydation avec les différents composés cellulaires : protéines, ADN et lipides.

Parmi les radicaux libres, on distingue les radicaux primaires dérivés, soit de l'oxygène appelés espèces réactives de l'oxygène (ROS), soit de l'azote appelés espèces réactives oxygéné-azotées (RONS) et les radicaux secondaires formés par la réaction des radicaux primaires avec des composés biochimiques de la cellule, comme la peroxydation lipidique.

#### 2) Production des ROS

##### a. En situation physiologique

Chez tous les organismes vivants en aérobie, la cellule produit de façon physiologique des ROS en faible quantité sous forme d'anion superoxyde principalement ( $O_2^{\bullet-}$ ) représentant 2% de la consommation d'oxygène de la cellule. Cette production, maîtrisée par un système anti-oxydant, joue un rôle dans de nombreux mécanismes physiologiques, tel que la transmission du signal ou la phagocytose par les macrophages.

Donc en situation physiologique, la cellule possède un certain état redox avec un équilibre de la balance oxydant/anti-oxydant permettant son fonctionnement optimal. En cas de rupture de l'équilibre, la cellule subit un stress oxydant responsable de nombreuses lésions perturbant son métabolisme et pouvant conduire à la mort cellulaire.

La chaîne de transport d'électron (ECT) dans la mitochondrie représente la principale source de production de ROS de la cellule. L'ECT est composée de 5 complexes dont 4 complexes représentent une succession de réactions d'oxydo-réduction avec l'oxygène comme accepteur final d'électron, pour former de l'eau.

En situation physiologique, les complexes I (NADH-Ubiquinone réductase) et III (Ubiquinone-Cytochrome C réductase) de la CTE produisent la totalité des ROS par une réaction d'oxydo-réduction incomplète de l'oxygène.

Le complexe I produit des ions superoxyde dans deux conditions<sup>77,78,79</sup>. La première se produit pendant le transport conventionnel d'électrons (FET : Forward Electron Transport) et survient lorsque la Flavine Mononucléotide (FMN) qui accepte les électrons du NADH se réduit<sup>80</sup>(Figure 8).

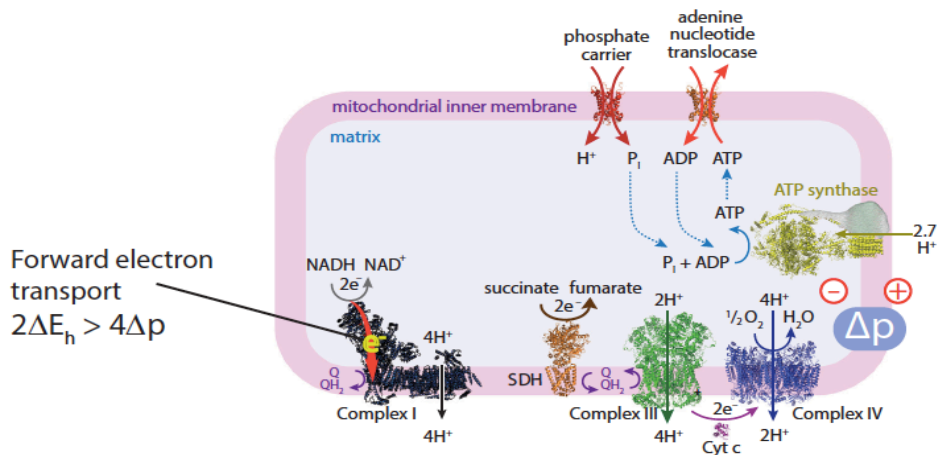
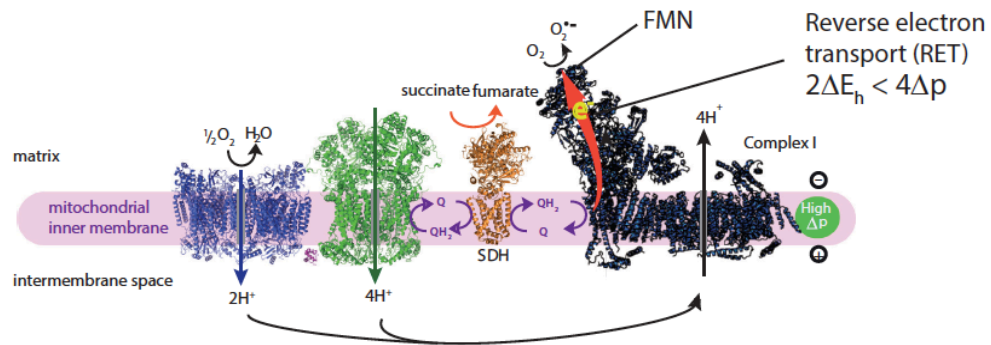


Figure 8 : Représentation du transport conventionnel des électrons (FET) sur la CTE (Chouchani et al. Cell Met 2016)<sup>81</sup>

Le complexe I fonctionne dans le sens conventionnel (FET) de la CTE en oxydant le NADH afin de générer un gradient de protons ( $\Delta p$ ) qui sera utilisé pour synthétiser l'ATP. Pour enclencher le FET, il faut que la différence de potentiel de réduction entre le  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  et le pool de Coenzyme Q (CoQ) à travers le complexe I ( $\Delta E_h$ ) soit suffisamment supérieure au potentiel de réduction imposé par le gradient de protons ( $\Delta p$ ) pour pomper les protons à travers la membrane interne de la mitochondrie. Comme quatre protons sont pompés tous les deux électrons qui traversent le complexe I,  $2\Delta E_h > 4\Delta p$  est la condition nécessaire pour que le transport conventionnel se produise. La flèche rouge dans le complexe I indique le transport conventionnel des électrons (« vers l'avant »). SDH, succinate déshydrogénase.

L'autre mode de production d'ions superoxyde par le complexe I est celui associé au transport inverse d'électrons (RET : Reverse Electron Transport)<sup>82,83,84,85</sup> (Figure 9). Le RET se produit lorsque les électrons sont forcés à retourner en arrière sur la CTE vers le complexe I (Figure 9), contrairement au FET. Dans le cas du FET, deux électrons sont transférés du NADH pour réduire le CoQ en CoQH<sub>2</sub>, et la différence d'énergie redox entraîne le pompage de quatre protons à travers la membrane interne de la mitochondrie pour maintenir le gradient de proton ( $\Delta p$ ) qui conditionne la synthèse de l'ATP (Figure 8). Au cours du FET, le gradient redox ( $\Delta E_h$ ) qui pousse deux électrons du NADH au CoQ doit être supérieur au potentiel de réduction

imposé par le gradient de proton ( $\Delta p$ ) nécessaire pour pomper quatre protons à travers la membrane interne mitochondriale :  $2\Delta E_h > 4\Delta p$  (**Figure 8**). Toutefois, comme cette réaction globale reste proche de l'équilibre thermodynamique, la direction du transport des électrons peut être inversée si le  $\Delta p$  est élevée et/ou si le pool de CoQ est réduit de sorte que  $4\Delta p > 2\Delta E_h$  (**Figure 9**)<sup>78</sup>.



**Figure 9 : Représentation du transport inverse des électrons (RET) sur la CTE**

(Chouchani et al. Cell Met 2016)<sup>81</sup>

Lorsque le  $\Delta p$  est important et/ou que la  $\Delta E_h$  à travers le complexe I est faible, de sorte que  $4\Delta p > 2\Delta E_h$ , les électrons peuvent être repoussés du pool de CoQ vers la FMN du complexe I, réduisant ainsi la FMN qui peut donner une paire d'électrons au  $NAD^+$  pour former du NADH, ou donner un électron à l'oxygène pour générer du superoxyde. La flèche rouge du complexe I indique le RET.

Si ces conditions sont réunies, les électrons, traversent le complexe I en sens inverse et se dirigent vers la FMN où ils peuvent réduire le  $NAD^+$  en NADH et produire des ions superoxyde<sup>78</sup>.

En outre, la production physiologique d'ions superoxyde par le complexe I pendant le RET nécessite d'une part un gradient de protons élevé et un pool de CoQ réduit d'autre part ; faisant du RET un mécanisme plausible de production d'ions superoxyde in vivo.

#### b. En situation d'ischémie-reperfusion

Les cellules contractiles du cœur, les cardiomyocytes, sont des cellules différenciées en phase terminale, qui se retirent du cycle cellulaire pendant la période périnatale et s'arrêtent en grande partie en phase G1. Par conséquent, la mort des cardiomyocytes induite au décours d'une situation d'IR aura un impact majeur sur la fonction cardiaque car les cardiomyocytes éliminés ne seront pas renouvelés. L'une des principales agressions à l'origine de la mort des cardiomyocytes induite par l'IR est le stress oxydant.

La reperfusion du tissu ayant préalablement subi l'ischémie par du sang oxygéné favoriserait l'accumulation de composants mitochondriaux réduits et endommagés sur différents sites de l'ECT. Ces derniers participeraient au transfert massif et inapproprié d'électrons sur l'oxygène pour aboutir *in fine* à la production d'ion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ). En effet, en cas de stress oxydant induit par l'IR ; la membrane externe mitochondriale est perméabilisée par l'activation Bax-Bak, entraînant la libération du cytochrome C de l'espace inter-membranaire vers le cytosol. Ainsi, le transport d'électron dans l'ECT serait interrompu au niveau du complexe III induisant une oxydation incomplète de l'oxygène responsable d'une production d'ion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) lors de la reprise du fonctionnement du cycle de Krebs et de l'ECT à la reperfusion<sup>25,33</sup>.

Bien que l'hypothèse de la production non spécifique d'ion superoxyde, issue de plusieurs sites dans les mitochondries (complexes I et III), soit séduisante; il existe désormais de nombreuses preuves qui indiquent que le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale serait la principale source d'ion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) lors de la reperfusion<sup>81</sup>. Le complexe I est le point d'entrée des électrons à haut potentiel de transfert du NADH dans la chaîne respiratoire mitochondriale (**figure 3**) et représente une source majeure d'ion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) *in vitro*<sup>78</sup> notamment en cas de lésions mitochondriales par le biais d'un transfert conventionnel ou inverse des électrons sur l'oxygène. Le RET au niveau du complexe I semble être la principale source d'ions superoxyde lors de la reperfusion de tissu ischémique<sup>81</sup>. Le RET, induit par la reperfusion, est à l'origine de la plus forte production d'ions superoxyde que la mitochondrie est capable de fournir.<sup>78</sup> La preuve directe que le complexe I demeure la source principale d'ion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) lors de la reperfusion vient du fait que son inhibition pharmacologique sélective protège des lésions de reperfusion<sup>86,87</sup>.

La roténone est un composé organique d'origine végétale utilisée dans des pesticides et insecticides. Elle exerce son activité inhibitrice sur le complexe I en empêchant la liaison spécifique de l'ubiquinone sur le complexe I de l'ECT diminuant ainsi son activité. Il en résulte une augmentation de la production de ROS (ions superoxyde) par transfert conventionnel d'électrons (FET) qui survient lorsque la Flavine Mononucléotide (FMN) qui accepte les électrons du NADH est réduit<sup>88</sup>.

De plus, il a été montré que la Metformine (MET), anti-diabétique orale de la famille des biguanides, et les agents anesthésiques halogénés (sévoflurane, isoflurane, desflurane) possèdent les mêmes propriétés inhibitrices de l'activité du complexe I de l'ECT responsable d'une production de ROS<sup>89,90,91,92,93,94,95,96</sup>.



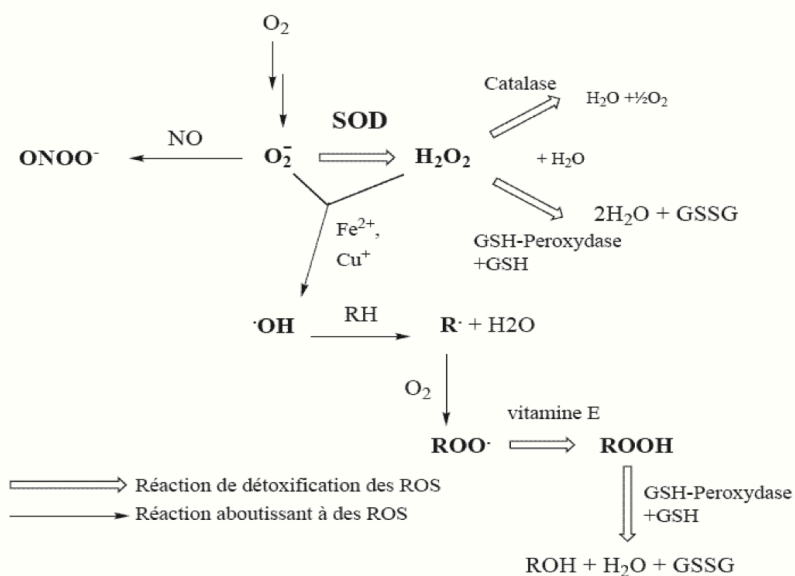
La quantité majeure d'ions superoxyde produite par RET au niveau du complexe I est la principale source lésionnelle de l'IR. Il est donc important de noter qu'en situation d'IR, lors du RET, le complexe I subit une modification structurale considérable en passant d'un état actif (A) à inactif (D) lors de la phase d'ischémie, puis d'un état inactif (D) à actif (A) lors de la reperfusion. Il s'agit de la transition active(A)/non active (D : désactivée ou « dormante ») du complexe I<sup>97</sup>. Lorsque le complexe I n'oxyde pas le NADH et ne pompe pas de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie, il bascule progressivement vers un état "inactif" en modifiant sa conformation<sup>98,99</sup>. Le rôle physiologique de la transition A/D n'est pas clair. En revanche, dans le contexte de l'IR, l'aspect le plus intéressant est que le complexe I devient inactif (D) pendant l'ischémie avec une demi-vie de désactivation d'environ 10-12 min<sup>100,101,102</sup>. Lors de la reperfusion, le complexe I est rapidement réactivé et peut favoriser la production d'ions superoxyde par le RET<sup>102</sup>.

Ainsi, la transition A/D du complexe I semble représenter une piste séduisante pour de nombreuses interventions thérapeutiques visant à réduire les lésions causées par l'IR.

Chez les mammifères, à l'échelle d'un organisme, il existe également une production de ROS extracellulaire par l'intermédiaire de l'hypoxanthine oxido-réductase dans le sérum et une production de ROS par les polynucléaires neutrophiles recrutés via la NAPH oxydase<sup>103</sup>. En situation de stress énergétique, du fait de la diminution des réserves en phosphate de haute énergie (PHE) et du rythme inadapté de la glycolyse anaérobie, de l'ADP est produit en excès et s'accumule dans le tissu. L'ADP issu de l'hydrolyse de l'ATP, est à son tour hydrolyser en AMP pour maintenir la production d'ATP. L'AMP est alors catabolisée en adénosine et IMP (acide inosinique) qui sont expulsés dans le milieu extracellulaire de manière irréversible, diminuant ainsi le stock en phosphate intracellulaire. La synthèse *de novo* d'AMP prend ensuite plusieurs heures, voire plusieurs jours en condition aérobie, du fait du ralentissement de la synthèse de la ribose-1-phosphate, maillon de base pour la synthèse des adénines nucléotides. Dans le milieu extracellulaire, l'IMP et l'adénosine sont dégradés en inosine, hypoxanthine et xanthine qui peuvent franchir les barrières endothéliales des vaisseaux sanguins. Lors de la reperfusion, l'hypoxanthine, qui s'est accumulée durant l'ischémie, réagit avec l'eau et l'oxygène pour produire l'acide urique et des ROS par l'intermédiaire de la xanthine oxydo-réductase<sup>104</sup>.

### 3) Système anti-oxydant

La cellule dispose d'un système complexe de détoxification contre les ROS comprenant des enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase...) et des petites molécules (vitamine E, vitamine C...) (**Figure 10**).



**Figure 10 : Caractérisation des ROS et du système anti-oxydant**

(Stevens et al., *Anesth Analg*, 2019)<sup>105</sup>

L'ion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$  est le principal radical libre primaire produit à partir de l'oxygène au niveau de la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie. Le système anti-oxydant comprend plusieurs protéines et enzymes permettant la neutralisation des ROS. La superoxyde dismutase permet la transformation de l' $\text{O}_2^{\bullet-}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui est ensuite transformé en eau par la catalase et le glutathion. L' $\text{O}_2^{\bullet-}$  peut réagir avec le NO produit par la NO synthase et former des espèces réactives oxygène-azotées (ONOO<sup>•</sup>).

Les superoxydes dismutase (SOD) sont des métalloprotéines (Cuivre-Zinc, Manganèse) avec une activité enzymatique qui catalyse la dismutation de l'ion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) en dioxygène  $\text{O}_2$  et peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Elles sont localisées dans le cytosol, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale pour permettre une neutralisation rapide des ROS produits par la mitochondrie. La catalase est également une métalloprotéine (Fe) qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  en eau  $\text{H}_2\text{O}$  et dioxygène  $\text{O}_2$ . Elle est localisée dans le cytosol et les péroxysomes.

Le glutathion existe dans le cytosol à l'état réduit (GSH) et oxydé (GSSG) formant un couple d'oxydo-réduction important permettant un échange d'électron. Il permet l'élimination du peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  et des hydroperoxydes en eau  $\text{H}_2\text{O}$  et dioxygène  $\text{O}_2$ . L'enzyme

glutathion peroxydase (GPx) accélère de détoxification. Le glutathion oxydé est réduit grâce à l'enzyme glutathion réductase afin de maintenir la détoxification.

Au total, les SOD et les peroxydases (GPx et catalase) sont complémentaires et constituent un système anti-oxydant performant. Malheureusement, dans certaines situations physiopathologiques, telle que l'ischémie-reperfusion, le système de détoxification peut être dépassé, empêchant la neutralisation des ions superoxyde produits qui sont sources de lésions cellulaires.

#### 4) Lésions induites par le stress oxydant

Les ROS, non neutralisées par le système anti-oxydant, sont capables de réagir rapidement avec de nombreux composés cellulaires qui vont altérer le métabolisme et l'intégrité cellulaire pouvant conduire à la mort cellulaire. Les ROS induisent une réaction d'oxydation de l'ensemble des constituants de la cellule : lipides, protéines, glucides, ADN.

La peroxydation lipidique correspond à une réaction d'oxydation en chaîne des acides gras (AG) polyinsaturés par les ROS, entraînant la formation de radicaux peroxylés (ROO<sup>\*</sup>) qui sont des radicaux secondaires. La peroxydation des lipides provoque la fluidification la membrane plasmique et de l'ensemble des organites intracellulaires avec pour conséquence une inactivation des enzymes membranaires, une oxydation des groupements thiol et une perméabilisation des membranes, notamment mitochondriale.

L'oxydation de l'ADN par les ROS entraîne la formation de bases oxydées, de sites abasiques, d'adduits intra-caténaires, de cassures de brins et de pont qui altèrent la transcription de l'ADN en ARNm.

L'oxydation des protéines par les ROS induit la formation de groupements sulfhydryle (SH), de ponts, de coupures et d'amas protéiques qui conduisent à une inactivation des protéines par une modification de leur conformation spatiale. L'ensemble des lésions induites par les ROS peut conduire à la mort cellulaire par apoptose<sup>106</sup>.

#### 5) Conséquences péri-opératoires du stress oxydant

La chirurgie représente un événement lésionnel aigu retentissant non seulement au niveau tissu lui-même mais aussi de manière généralisée et systémique. L'inflammation et l'IR

sont les deux composantes majeures de ce processus, et les ROS y jouent un rôle modulateur prépondérant.

Les lésions d'IR sont classiquement associées à la transplantation d'organes, à la chirurgie cardiaque et hépatique, ainsi qu'à l'utilisation de garrots pneumatiques et de clamps vasculaires. Pendant la phase ischémique, la respiration anaérobie prévaut, entraînant un état d'acidose et une déplétion profonde de l'ATP ; accompagnée d'une accumulation de cofacteurs réduits au sein de l'ECT mitochondriale. La moindre disponibilité voire l'épuisement des réserves énergétiques limite la fonction des pompes ioniques ATP-dépendantes au niveau des membranes cellulaires, entraînant une surcharge calcique intracellulaire conduisant finalement à la mort cellulaire. L'expulsion extracellulaire d'ATP, couplée à la libération de marqueurs pro-inflammatoires, sont les éléments précurseurs de la libération massive de ROS pendant la phase de reperfusion<sup>107</sup>. En effet, paradoxalement, la réintroduction de l'oxygène provoque un stress oxydant majeur à partir des sources enzymatiques courantes (ECT mitochondriale, xanthine oxydoréductase, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (NOX),) responsable de lésions propres de reperfusion<sup>108</sup>. La reperfusion est un phénomène très dynamique, et les lésions qui en découlent peuvent se poursuivre pendant des jours. De plus, la prolongation du stress oxydatif est responsable du développement d'un certain nombre de maladies chroniques et de comorbidités contribuant à fragiliser davantage les patients et à augmenter leur risque périopératoire<sup>109</sup>.

Le lien entre les ROS, l'homéostasie de l'oxygène et le dysfonctionnement mitochondrial est au cœur du mécanisme pathologique du stress oxydant périopératoire. L'intensité du stress oxydant per-opératoire en réponse à une intervention chirurgicale est fortement influencée par l'ampleur de la chirurgie (risque modéré à majeur), la technique utilisée et les lésions séquellaires de l'inflammation et de l'IR subies. De nombreuses études ont rapporté une élévation des niveaux de stress oxydatif à la suite de techniques chirurgicales plus invasives par rapport à leurs homologues moins invasives. Tel est le cas lors de la réparation d'anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) réalisée par voie ouverte conventionnelle ou endovasculaires, lors de chirurgies abdominales ouvertes ou coelioscopiques ou lors de pontages cardio-pulmonaires avec ou sans pompe<sup>110,111,112</sup>.

La durée de l'IR semble également être un facteur déterminant le degré d'intensité du stress oxydatif. Dans une étude portant sur 132 patients bénéficiant d'une ventilation uni-

pulmonaire, la durée de la ventilation uni-pulmonaire était corrélée au degré de stress oxydant mesuré<sup>113</sup>. Ces effets peuvent également être observés en chirurgie orthopédique. En effet, il a été décrit que le recours au garrot pneumatique afin de contrôler le saignement per-opératoire était responsable d'une libération de ROS à la suite du dégonflement du garrot, entraînant des dommages tissulaires localisés, un retard de cicatrisation et d'autres complications postopératoires liées à l'ischémie du membre opéré<sup>114</sup>.

Par ailleurs, il convient de noter que toutes les formes d'IR ne sont pas systématiquement délétères. En effet, le préconditionnement ischémique (IPc) est une méthode de protection tissulaire qui consiste en une succession de phases d'IR courtes et répétées préalables à une IR soutenue et prolongée. Décrit pour la première fois par Murry et Jennings en 1986, l'application sur modèle canin de brefs épisodes d'IR par clampage/déclampage de l'artère coronaire précédant son occlusion soutenue, a montré une réduction significative de la taille de l'infarctus dans le groupe préconditionné par rapport au groupe témoin<sup>115</sup>; ce qui démontre qu'une brève période d'ischémie peut protéger un organe ou un tissu contre une ischémie ultérieure plus prolongée.

Quant aux ROS, leur présence dans la période terminale de récupération post-reperfusion jouerait un rôle opposé à celui de la phase aiguë. Ils fonctionneraient comme des molécules de signalisation intracellulaire essentielles dans le processus de cicatrisation post-perfusion par la stimulation de l'angiogenèse et du remodelage tissulaire<sup>108</sup>.

## 6) Rôle ambivalent des ROS

Les agents antioxydants peuvent neutraliser les ROS et donc inactiver ces radicaux libres. En raison de cette fonction bien définie des antioxydants. Ainsi, ils pourraient potentiellement prévenir, ou du moins limiter, le développement des maladies chroniques les plus répandues telles que le cancer, le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires ainsi que la démence. Toutefois, cette hypothèse a trop rarement été confirmée par des essais cliniques robustes. En effet, les agents antioxydants (Vitamine E, N-acetylcystéine...) censés neutraliser les ROS, n'ont pas fait la preuve de leur efficacité en terme de protection vis-à-vis de la mort cellulaire induite par l'ischémie-reperfusion<sup>116,117</sup>.

Les ROS sont bien connus pour leur effet toxique sur la cellule mais il existe un nombre croissant de preuve démontrant un effet bénéfique des ROS. Ils agiraient comme des seconds

messagers et seraient impliqués dans de nombreuses voies de signalisation et d'activation de la transcription<sup>118,119</sup>. En effet, toutes les conditions d'oxydoréduction conduisant à une production de ROS ne sont pas forcément préjudiciables pour le cœur<sup>120</sup>. Depuis plusieurs décennies, il a été démontré que des concentrations excessives de ROS détruisaient de manière irréversible les structures cellulaires, tandis que plus récemment, des études ont montré que de faibles concentrations sembleraient protectrices en déclenchant des mécanismes de défense qui empêcheraient les dommages cellulaires<sup>121,122</sup>. Cela implique que des concentrations différentes d'un même agent, en l'occurrence les ROS, peuvent exercer une réponse non linéaire, connue depuis les années 1950 sous le nom de « hormesis »<sup>122</sup>. Étant donné qu'à l'état physiologique, les ROS sont principalement formés par les mitochondries, la réponse non linéaire à la formation de ROS mitochondriaux a été appelée « hormesis » mitochondriale ou « mitohormesis »<sup>122</sup>. Ce concept s'oppose à la vision traditionnelle des ROS comme étant invariablement des sous-produits nocifs et indésirables du métabolisme mitochondrial ; et encourage plutôt l'affirmation selon laquelle les ROS seraient des molécules de signalisation essentielles et bénéfiques pour la santé<sup>121,122</sup>.

### *Résumé Partie III*

- La cellule produit de façon physiologique des ROS en faible quantité sous forme d'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) dont la principale source est l'ECT mitochondriale (complexes I et III).
- Le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale serait la principale source d'ion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) lors de la reperfusion par le biais d'un transfert conventionnel (FET : Forward Electron Transport) ou inverse (RET : Reverse Electron Transport) des électrons sur l'oxygène
- Les SOD et les peroxydases (GPx et catalase) sont complémentaires et constituent un système anti-oxydant performant afin de détoxifier les ROS
- Les ROS induits par le stress oxydant touchent l'ensemble des constituants de la cellule (lipides, protéines, glucides, ADN) générant des dégâts cellulaires irréversibles conduisant à la mort cellulaire par apoptose
- En dehors de leur effet délétère, les ROS mitochondriaux induits par l'IR présentent également un rôle cytoprotecteur précoce (préconditionnement ischémique) ou plus tardif (hormesis) pour les cardiomyocytes

## IV. La mort cellulaire

### 1) Généralités

La mort cellulaire est un événement qui survient en condition physiologique pour maintenir l'homéostasie tissulaire ou en situation de stress physique ou chimique. Elle est divisée en deux groupes : d'une part la mort cellulaire programmée, appelée apoptose, qui permet l'élimination d'une cellule sans endommager son environnement, et d'autre part la mort cellulaire non programmée, appelée nécrose qui résulte d'une rupture de la membrane cytoplasmique contaminant le milieu extracellulaire induisant une réaction inflammatoire délétère<sup>123</sup>. Ces dernières années, de nombreux mécanismes de mort cellulaire ont été identifiés et regroupés dans une classification par la NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death)<sup>124</sup>.

Durant de nombreuses années, la nécrose a été considérée comme le mode principal de mort cellulaire induite par l'IR<sup>125</sup>. Il est dorénavant reconnu que les cellules soumises à l'IR meurent également de manière programmée par apoptose et autophagie, processus régulés par des mécanismes de signalisation cellulaire coordonnés<sup>126,124</sup>. De plus, il a été plus récemment décrit que le caractère aléatoire et irréversible de la nécrose induite par l'IR était vraisemblablement régulé, dans certaines circonstances, par des mécanismes de signalisation spécifiques au sein d'une autre voie de mort cellulaire appelée « nécrose programmée » ou nécroptose<sup>127,128</sup>. Ainsi, diverses stratégies de protection ont été développées en ciblant spécifiquement les voies de signalisation impliquées dans le processus des morts cellulaires « programmées » induites par l'IR<sup>129</sup>.

Au décours de la phase de reperfusion, l'inflammation locale et la production massive de ROS entraînent des lésions cellulaires secondaires plus ou moins réversibles. La réponse de la cellule va dépendre de la gravité de la lésion tissulaire totale<sup>130</sup>. Schématiquement, une lésion modérée d'IR aura plutôt tendance à provoquer un dysfonctionnement cellulaire à l'origine d'une activation de l'autophagie et des systèmes de sauvetage afin de favoriser la survie cellulaire. En revanche, si les lésions sont plus graves, la réponse cellulaire va évoluer défavorablement vers un processus apoptotique ou nécrotique<sup>131</sup>.

Dans les sous-sections ci-dessous, je détaillerai les mécanismes de base qui sous-tendent les principales modalités de mort cellulaire ainsi que les évidences qu'elles contribuent à la pathogenèse des lésions IR myocardique.



## 2) Apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort programmée se produisant normalement au cours de développement et du vieillissement, et indispensable au maintien de l'homéostasie tissulaire par élimination des cellules surnuméraires et des cellules potentiellement dangereuses. L'apoptose peut aussi être un mécanisme de défense comme par exemple pour limiter la réplication virale d'une cellule infectée ou encore en réponse à des agents endommageant la cellule. De ce fait l'apoptose peut être induite par une grande variété de signaux. Ce type de mort fut décrit par Kerr et al. en 1972 après observations de modifications morphologiques différentes de la nécrose<sup>123</sup>.

L'apoptose se caractérise morphologiquement par un arrondissement de la cellule, la condensation du cytoplasme, la condensation de la chromatine et la fragmentation du noyau suivi d'un bourgeonnement de la membrane plasmique avec la formation de bulles, appelées corps apoptotiques, qui seront phagocytées par les cellules avoisinantes<sup>123</sup> (**Figure 11**).

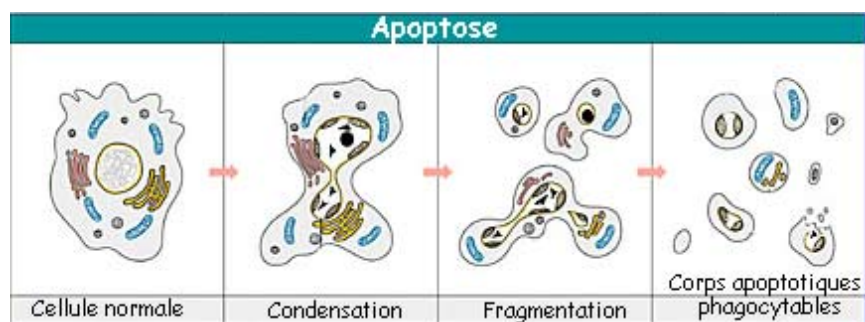


Figure 11 : Caractérisation morphologiques de l'apoptose

(Kerr et al., Br J Cancer, 1972)<sup>132</sup>

De plus, l'apoptose se caractérise par de nombreux processus biochimiques spécifiques :

- Au niveau mitochondrial : par une perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie responsable de la libération du cytochrome C et d'autres protéines inductrices de l'apoptose (Smac/Diablo, AIF...), une chute du potentiel membranaire mitochondrial et une perte des fonctions mitochondriales empêchant la survie de la cellule.

- Au niveau cytoplasmique : par une activation des caspases qui sont des protéases responsables du clivage des protéines majeures impliquées dans la survie et la mort cellulaire. Leur activation induit une cascade de réaction qui est irréversible.
- Au niveau membranaire : par une externalisation des phosphatidylsérines de la membrane plasmique responsable de l'initiation de la phagocytose par les cellules environnantes.
- Au niveau nucléaire : par une fragmentation internucléosomale de l'ADN responsable d'une abolition de la transcription des gènes de survie.

Ainsi une cellule mourante par apoptose doit regrouper l'ensemble des critères morphologiques et biochimiques. Dans le cas contraire, il s'agit d'une mort non apoptotique dite mort indépendante des caspases.

Chez les mammifères, l'apoptose regroupe 2 mécanismes d'initialisation, la voie intrinsèque faisant intervenir la mitochondrie et la voie extrinsèque faisant intervenir les récepteurs de mort transmembranaires<sup>133</sup>.

#### a. Voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort, est induite par un signal de stress extracellulaire qui est détecté et transmis par des récepteurs spécifiques.

Elle peut être initiée par la liaison de ligand de mort tels que Fas/CD95 ligand (FasL/CD95L), TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et les ligands de la famille TNF (comme TRAIL), à différents récepteurs : Fas/CD95, TNFR1 (récepteur à TNF $\alpha$ ), récepteurs à TRAIL... Ces récepteurs contiennent un domaine de mort cytoplasmique dit DD (Death Domain) qui est nécessaire pour l'activation directe de la cascade apoptotique.

Après liaison du ligand, le récepteur de mort se trimérise puis recrute, par l'intermédiaire de son DD, des protéines adaptatrices spécifiques pour former le DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Le DISC active la procaspase 8 qui à son tour active et clive la caspase 3 induisant ainsi l'apoptose (voie de signalisation de type 1).

Pour des faibles niveaux de caspase 8 active, le signal de mort peut être amplifié par le clivage de Bid par la caspase 8 (voie de signalisation de type 2). La forme tronquée de Bid, dite tBid,

permet sa translocation dans la mitochondrie où il est capable d'interagir avec Bax et Bak et ainsi activer la voie intrinsèque de l'apoptose (Figure 12).

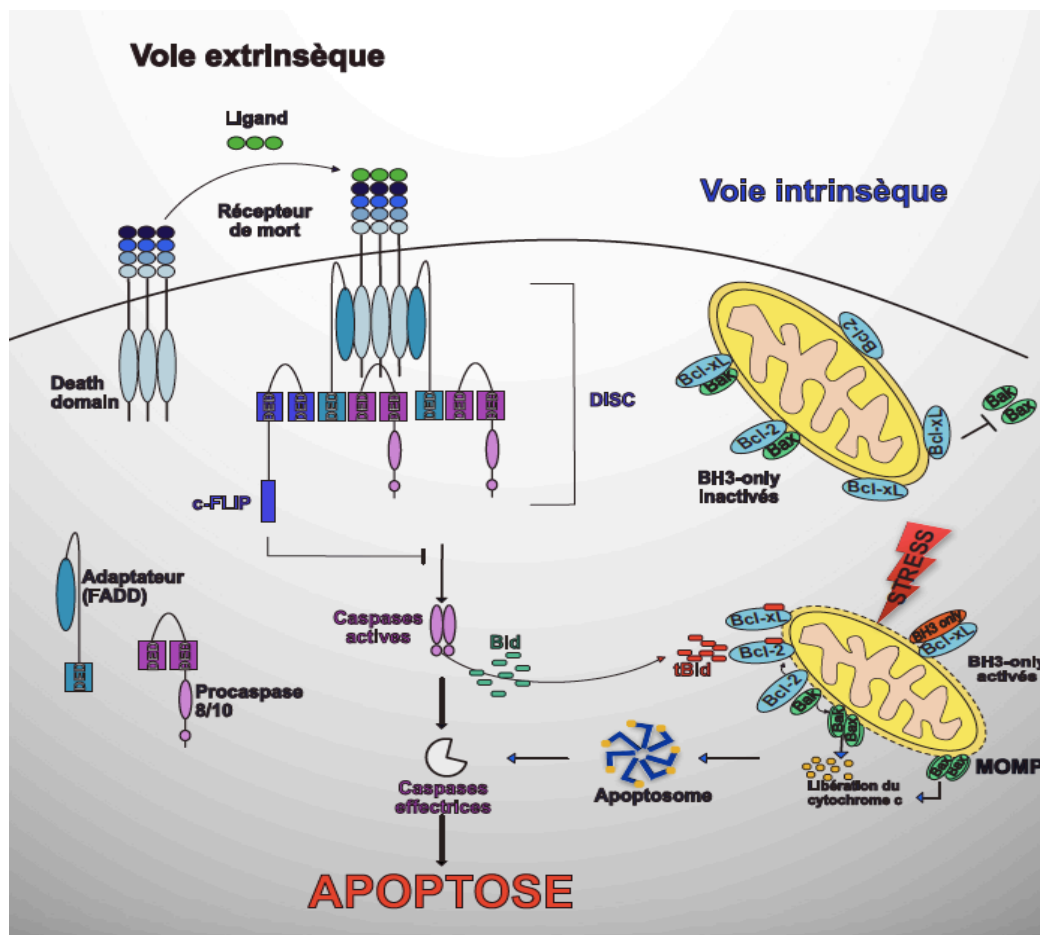


Figure 12 : Représentation de l'apoptose

(Galluzzi et al., Cell Death Differ, 2018)<sup>124</sup>

La voie extrinsèque met en jeu les récepteurs de mort (Fas/CD95, TNFR...) contenant un domaine de mort cytoplasmique dit DD (Death Domain) qui sont activés par la liaison à des ligands, tels que TNF $\alpha$  et Fas-ligand. Après liaison du ligand, le récepteur de mort se trimérise puis recrute, par l'intermédiaire de son DD, des protéines adaptatrices spécifiques (FADD) pour former le DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Le DISC active la procaspase 8 qui à son tour active et clive la caspase 3 responsable du processus de mort. Pour des faibles niveaux de caspase 8 active, le signal de mort peut être amplifié par le clivage de Bid par la caspase 8. La forme tronquée de Bid (tBid) permet sa translocation dans la mitochondrie où elle est capable d'agir avec Bax et Bak et ainsi activer et amplifier la voie intrinsèque. En l'absence de signal de mort, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL) empêchent la perméabilisation de la membrane mitochondriale en inhibant l'oligodimérisation de Bax et Bak. En réponse à un stress, tel que l'IR, la voie intrinsèque est induite et met en jeu la mitochondrie dont la membrane externe se perméabilise (MOMP) par oligodimérisation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax et Bak), responsable d'une libération du cytochrome C dans le cytosol. Le cytochrome C cytosolique permet la formation de l'apoptosome (complexe protéique composé de la procaspase 9, APAF-1, du cytochrome c) et l'activation de la caspase 9 qui sont responsables de l'activation de la caspase 3. Les protéines pro-apoptotiques BH3-only, sont activées et sont responsables d'une activation de Bax-Bak soit directement, soit indirectement par séquestration de protéines anti-apoptotiques Bcl-2.

## b. Voie intrinsèque de l'apoptose

L'apoptose intrinsèque impliquant la mitochondrie est la voie d'induction la plus fréquente. Elle peut être déclenchée par divers stress intracellulaires : dommages à l'ADN, choc thermique, UV, agents chimiothérapeutiques, stress oxydatif, surcharge calcique, accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique...

Ces stimuli sont intégrés au niveau de la mitochondrie par les protéines de la famille Bcl-2 aboutissant à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP pour Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization). La MOMP est dépendante de l'oligodimérisation de Bax et Bak (membres pro-apoptotiques effecteurs de la famille Bcl-2) qui forment un pore dans la membrane externe mitochondriale conduisant à la libération des protéines de l'espace inter-membranaire vers le cytosol. Parmi ces protéines, le cytochrome C s'associe avec Apaf-1 et la procaspase 3 pour former un complexe nommé apoptosome. Ce complexe permet une amplification du signal de mort par une auto-activation de la caspase 9 qui à son tour active les caspases effectrices (caspase 3, 6, 7)<sup>134</sup>. En l'absence de signal de mort, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 empêchent la perméabilisation de la membrane mitochondriale en inhibant l'oligodimérisation de Bax et Bak (**Figure 12**).

## c. Les caspases

Les caspases (Cysteine-dépendant ASpartate-specific proteASES) sont des protéases à cystéine constituant la famille de protéines composée de 12 membres (caspases 1 à 10, 12 et 14). Elles sont essentielles dans les processus d'apoptose, d'inflammation et de différenciation. Elles sont présentes dans le cytosol sous leur forme pro-enzyme inactive.

Les caspases impliquées dans l'apoptose se distinguent en 2 groupes : les caspases initiatrices (caspase 8, 9 et 10) et les caspases effectrices (caspase 3, 6 et 7).

Les caspases initiatrices 8 et 10 sont recrutées au niveau du DISC des récepteurs de mort de la voie extrinsèque. Leur activation au sein du DISC permet le clivage de Bid qui amplifie ainsi le signal par l'intermédiaire de la mitochondrie (voie de signalisation de type 2) et/ou l'activation directe des caspases effectrices (voie de signalisation de type 1). La caspase initiatrice 9 est recrutée, grâce à Apaf-1 et au cytochrome c, au sein de l'apoptosome. Ce dernier est un complexe protéique constitué par Apaf-1, le cytochrome c et la procaspase 9 ; qui est essentiel au déroulement du processus apoptotique de la voie intrinsèque. En l'absence

de cytochrome c, Apaf-1 est sous forme monomérique dans le cytosol et ne peut pas activer la procaspase 9. Lorsque le cytochrome c est libéré dans le cytosol, il se fixe à Apaf-1 qui change de conformation, permettant son heptamérisation en présence d'ATP. Ainsi, la procaspase 9 est recrutée et activée pour amplifier le signal par auto-activation et pour activer les caspases effectrices.

Les caspases effectrices 3, 6 et 7 sont les principaux effecteurs du signal apoptotique. Après activation par les caspases initiatrices, elles sont responsables du clivage de la majorité des substrats au cours de l'apoptose. Les substrats des caspases effectrices sont impliqués dans le maintien de l'intégrité structurale de la cellule, dans la réparation de l'ADN, dans la régulation du cycle cellulaire, dans la signalisation cellulaire, dans les fonctions mitochondriales, dans la fragmentation de l'ADN ou dans l'exécution de l'apoptose (caspases, Bid). Le clivage de ces substrats induit un gain ou une perte de fonction, permettant de réguler ou de favoriser la mort cellulaire<sup>135</sup>.

Le processus d'activation des caspases est irréversible et finement contrôlé pour éviter une induction accidentelle de l'apoptose par des protéines inhibitrices. Parmi celle-ci, les protéines des IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) sont connues pour leur effet anti-apoptotique par liaison et séquestration des caspases. Bien que les différents IAPs peuvent tous se lier aux caspases, seul XIAP a réellement montré un effet inhibiteur<sup>136</sup>.

#### d. Mort apoptotique induite par l'IR myocardique

Tout d'abord, les cardiomyocytes représentent environ 30% de la population cellulaire cardiaque totale<sup>137</sup>. Ainsi, cette hétérogénéité cellulaire souligne les limites de l'étude de l'apoptose à l'échelle du cœur entier. En effet, en raison des faibles niveaux d'expression d'Apaf1 et de caspases au sein des cardiomyocytes, les cellules autres que les cardiomyocytes du cœur semblent davantage sensibles à l'apoptose<sup>138</sup>.

Dans les cœurs de rats, l'apoptose est maximale à l'issue de 4,5 heures d'occlusion coronarienne tandis que la nécrose le devient après 24 heures<sup>139</sup>.

De plus, la reperfusion semble accélérer l'apparition des lésions apoptotiques comparativement à une phase d'ischémie isolée (ex : occlusion coronaire seule sans reperfusion)<sup>140,141</sup>. En effet, en 2000, Zhao et al. confirme ce phénomène sur un modèle canin, en montrant que la proportion de cellules apoptotiques au sein de la zone péri-nécrotique (aire à risque (AAR)) est multipliée par 4 après 1 heure d'occlusion suivie de 6 heures de

reperfusion par rapport à une occlusion coronarienne permanente pendant 7 heures<sup>142</sup>. La zone péri-nécrotique est définie comme la zone à risque du myocarde recouvrant immédiatement la zone nécrotique. Depuis, de nombreux travaux supplémentaires reproductibles au sein d'organes différents, utilisant divers modèles d'IR globale ou régionale ont également confirmé que la reperfusion était responsable du déclenchement et/ou de l'accélération des lésions apoptotiques liée à l'IR<sup>143,144,145</sup>.

Que ce soit au dépens des cellules d'origine myocardique ou non, les caspases restent les acteurs indispensables de l'apoptose en situation de souffrance myocardique notamment d'IR<sup>146,147</sup>. Condorelli et al. ont montré que des souris transgéniques surexprimant la caspase 3 spécifique du tissu cardiaque, soumises à une IR myocardique, présentaient une taille de l'infarctus accrue et une plus forte susceptibilité à la mort comparativement aux souris contrôle<sup>148</sup>. Au contraire, la surexpression d'IAP2 induirait une réduction de la souffrance myocardique dans un modèle de coeur isolé-perfusé de souris<sup>149</sup>.

Concernant l'implication de la voie extrinsèque de l'apoptose, les souris dépourvues de FAS (souris *lpr*) présentent une diminution de l'apoptose des cardiomyocytes ainsi qu'une réduction marquée de la taille de l'infarctus à la suite de l'IR<sup>150</sup>. Quant à TNFR1 ou TNFR2, leurs absences d'expression isolées n'affectent pas la taille de l'infarctus. En revanche, leur suppression couplée entraîne des infarctus significativement plus importants à la suite d'une occlusion coronarienne soutenue<sup>151</sup>.

Enfin, la voie intrinsèque mitochondriale est également impliquée puisque l'inhibition de Bax ou la surexpression de Bcl-2 spécifiques des cardiomyocytes murins réduit leur apoptose, la taille de l'infarctus et le dysfonctionnement cardiaque après une IR<sup>152,153</sup>.

Au total, ces données témoignent du rôle majeur joué de l'apoptose et de ces différents mécanismes dans la mort cellulaire induite par l'IR.

### 3) Morts indépendantes des caspases

Les morts indépendantes des caspases représentent un ensemble de mécanismes de mort caractérisée par l'absence d'activation des caspases. Des processus de mort distincts répondant à ce critère ont pu être caractérisés : nécrose, nécroptose, autophagie, CICD...

### a. Nécrose et nécroptose

La nécrose se caractérise morphologiquement par une absence de condensation de la chromatine, absence de fragmentation de l'ADN, une augmentation du volume cytoplasmique, un gonflement des organelles, la rupture précoce de la membrane plasmique, et par conséquent la perte du contenu intracellulaire (**Figure 13**).

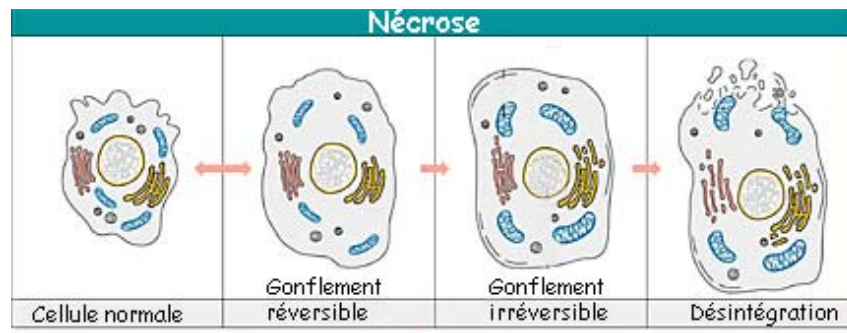


Figure 13 : Caractérisation morphologiques de la nécrose

(Kroemer et al., *Cell Death Differ*, 2009)<sup>154</sup>

Pendant de nombreuses années la nécrose a été définie comme une mort accidentelle et incontrôlée, cependant la nécrose peut être régulée par des voies de signalisation et des mécanismes cataboliques<sup>124</sup>. Le terme nécroptose désigne l'une des formes régulée de la nécrose. Elle est observée en présence de stimuli apoptotiques de la voie extrinsèque de l'apoptose par l'intermédiaire des récepteurs de mort et des Toll-like récepteurs (TLR), et en présence d'inhibiteur de caspases, avec les caractéristiques morphologiques de la nécrose et s'effectue selon une cinétique plus rapide que l'apoptose<sup>155</sup>.

La nécroptose est généralement considéré comme un mode hautement pro-inflammatoire de la mort cellulaire, en raison de la libération de « signaux de danger » (DAMPs, Damage Associated Molecular Patterns) intracellulaires qui favorisent l'inflammation<sup>156</sup>. Bien qu'elle soit impliquée dans des pathologies à forte signature inflammatoire (pancréatite, maladie de Crohn), elle jouerait également un rôle dans la pathogénèse de la mort cellulaire induite par l'IR<sup>157,158</sup>.

Les mécanismes impliqués dans le processus nécroptotique restent encore mal connus. Cependant, l'activation des Ser/Thr kinases RIP1 et RIP3 (Receptor Interacting Protein Kinase-1 et 3) est essentielle pour induire la rupture nécroptotique de la membrane cellulaire consécutive à la relocalisation membranaire de MLKL (Mixed-Lineage Kinase domain-Like

pseudokinase)<sup>159</sup>(**Figure 14**). En conséquence, la majorité des études portant sur les lésions d'IR myocardiques aiguës et chroniques évoluant vers une insuffisance cardiaque indiquent que l'axe de signalisation membranaire RIP1-RIP3-MLKL est central dans le développement des lésions nécroptotiques<sup>160</sup>. Ces dernières sont à l'origine d'une altération de la fonction myocardique et d'un remodelage cardiaque défavorable<sup>161</sup>.

Par ailleurs, seul un nombre très limité d'études s'est intéressé ont étudié au rôle des mitochondries dans ce processus. Néanmoins, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique allostérique sélectif du RIP1, la nécrostatine-1 (Nec-1), permet de réduire la taille de l'infarctus de souris contrôle. En revanche, la Nec-1 n'est pas en mesure de protéger le myocarde de souris inhibée pour la cyclophiline D (souris CypD<sup>-/-</sup>), suggérant que cette protéine essentielle au maintien de la fermeture du mPTP, pourrait être impliqué dans la signalisation de la nécroptose<sup>162,163</sup>.

De plus, l'activation RIP-3 dépendante de la CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendante protein Kinase II), régulatrice du mPTP, est susceptible de déclencher son ouverture au cours de la nécroptose induite par l'IR<sup>164</sup>.

Enfin, des analyses des compartiments cellulaires réalisées en situation d'hypoxie-réoxygénation ont révélé que RIP3 était soit localisée d'emblée soit relocalisée au niveau des mitochondries afin d'interagir avec la protéine de fission mitochondriale DRP1 (Dynamin-1-like protein); mais pas avec RIP1 et MLKL<sup>161,165</sup>. Outre les protéines RIP1, RIP3 et MLKL, les niveaux d'expression de PGAM5 (PhosphoGlycerate mutase family Member 5) ; une Ser/Thr phosphatase atypique qui déphosphoryle et active DRP1 ; sont également augmentés en cas de nécroptose induite par l'IR<sup>166</sup>. Ainsi, ces résultats fournissent la preuve que le processus de nécroptose peut être activé de manière canonique mais aussi non canonique (**Figure 14**).



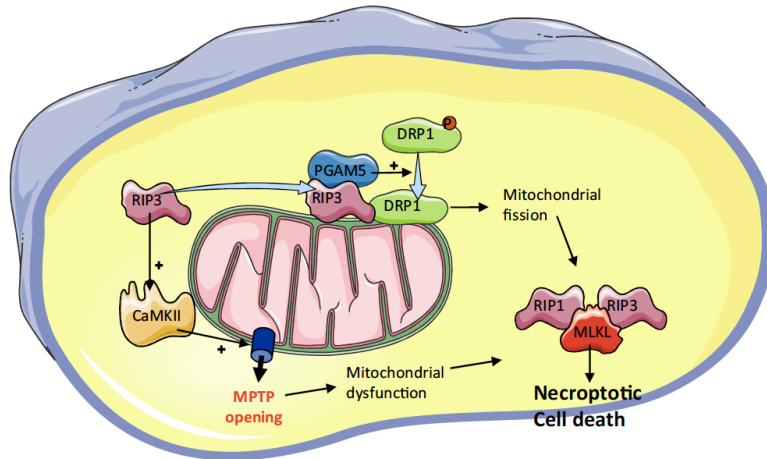


Figure 14 : Représentation des voies canoniques et non canoniques de la nécroptose

(Davidson et al. J Cell Mol Med 2020)<sup>167</sup>

L'IR provoque une augmentation des niveaux ou une phosphorylation activatrice de RIP1 et RIP3, MLKL (voie canonique) et PGAM5. RIP3 est transloquée dans les mitochondries et interagit avec PGAM5 et DRP1. PGAM5 déphosphoryle et active DRP1, ce qui entraîne la fission et le dysfonctionnement des mitochondries. De plus, l'activation RIP3-dépendante de CaMKII peut déclencher la nécroptose par le biais du MPTP (voie non canonique). Le dysfonctionnement mitochondrial conduit finalement à la formation du nécroptosome constitué de RIP1, RIP3 et MLKL activées, conduisant à la mort cellulaire par nécroptose.

#### a. Autophagie

La mort cellulaire autophagique est un concept très débattu. En effet, l'autophagie est souvent décrite comme un processus accompagnant la mort cellulaire et peu comme un mécanisme directement responsable de mort cellulaire. Il serait plus juste de la considérer comme une voie de recyclage afin de souligner son rôle dans la physiologie cellulaire.

Pour être qualifiée de mort autophagique, la cellule mourante doit présenter les critères suivants : mort cellulaire non apoptotique indépendante des caspases, augmentation des marqueurs de l'autophagie (vacuolisation cytoplasmique, lipidation LC3/ATG8, dégradation p62/SQSTM1, formation d'autophagosomes) et une prévention de la mort cellulaire autophagique par une approche pharmacologique (inhibiteur) ou génétique (siRNA)<sup>168,169</sup>.

Ce processus est également activé lors des conditions associées à l'IR (privation d'énergie, stress oxydatif...) afin de tendre *in fine* vers la survie cellulaire en générant d'une part des acides aminés et des acides gras pour le maintien de la fonction cellulaire ; ou en éliminant d'autre part les organites endommagés, les protéines oxydées ainsi que les agrégats protéiques<sup>170</sup>.

### *b. CICD (Caspase Independent Cell Death)*

La CICD est une mort cellulaire indépendante des caspases en réponse à un stimulus induisant normalement l'apoptose, qui présente certains critères d'apoptose comme la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP) et l'absence d'autres critères d'apoptose comme l'externalisation des phosphatidylsérines. La CICD a lieu avec une cinétique plus lente que l'apoptose et pourrait constituer un mécanisme de secours permettant l'élimination des cellules lorsque la voie apoptotique est déficiente<sup>171</sup>.

### *Résumé Partie IV*

- La mort cellulaire la mieux caractérisée est l'apoptose, orchestrée par une famille de protéases appelées les caspases.
- Il existe d'autres types de mort indépendants de l'activation des caspases comme la nécroptose et la mort cellulaire indépendante des caspases (CICD)
- En dehors de la nécrose, les lésions d'IR induisent la mort cellulaire par apoptose située majoritairement au sein de la zone péri-nécrotique ou « aire à risque ».
- L'apoptose est initiée lors de la phase d'ischémie et est accélérée et amplifiée lors de la phase de reperfusion.

## V. Les protéines de la famille Bcl-2

### 1) Contexte historique et généralités

Les connaissances moléculaires sur l'apoptose sont nées dans les années 1980 et 1990 grâce à la remarquable convergence entre les progrès cytogénétiques et biochimiques en matière de lutte contre le cancer chez les mammifères et les études génétiques pionnières sur la mort cellulaire programmée dans le développement du nématode *Caenorhabditis elegans*. Le gène BCL-2, jusqu'alors inconnu, a été identifié à partir de la région du point de rupture d'une translocation chromosomique récurrente dans un lymphome folliculaire humain<sup>172</sup>. Depuis une vingtaine d'année, la famille des protéines Bcl-2 est reconnue comme un élément régulateur majeur du processus de mort cellulaire<sup>173</sup>. Compte tenu de ses effets favorisant la survie cellulaire, BCL-2 a été identifiée comme un oncogène. D'autres études ont identifié un certain nombre d'autres protéines ayant jusqu'à quatre régions d'homologie avec Bcl-2. Ces régions sont qualifiées de domaines d'homologie de Bcl-2 (BH). Les différents membres de la famille Bcl-2 sont impliqués dans la régulation de l'apoptose. Certaines protéines déclenchent un signal anti-apoptotique (par exemple, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1) tandis que d'autres protéines favorisent le processus de mort cellulaire (par exemple, Bad, Bak, Bax, Bid, Bim, Bik). Les fonctions de ces protéines se sont pendant longtemps avérées insaisissables, notamment en raison de leur capacité à agir de manière indépendante et/ou à interagir avec les autres membres de la famille Bcl-2. Le site d'action principal des protéines de la famille Bcl-2 est la mitochondrie, où elles régulent la libération du cytochrome c et d'autres protéines induisant l'apoptose de l'espace intermembranaire mitochondrial. Cependant, Bcl-2 est également localisée au niveau de l'ER et des membranes nucléaires et peut influencer la mort cellulaire inhérentes à ces organites<sup>174,175</sup>.

Dans un premier temps, après avoir détaillé la structure et la fonction des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, je m'intéresserai à leurs interactions conduisant à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP), étape cruciale de l'apoptose. Puis, je détaillerai les modes de régulations des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que Bcl-xL, Bcl-2 et Mcl-1 ainsi que leur implication au sein du myocarde. Enfin, j'accorderai une attention particulière à la protéine anti-apoptotique Bcl-xL que j'ai étudié plus précisément pendant ma thèse.

## 2) Structures et fonctions

Les membres de la famille Bcl-2 (B-cell CLL / Lymphoma-2) régulent l'intégrité de la membrane mitochondriale externe. Ils sont constitués de domaines BH qui les divisent en 3 catégories (**Figure 15**) :

- Bcl-2 anti-apoptotiques qui possèdent 4 domaines BH (BH1 à BH4) Bcl-2, Bcl-xL (Bcl-2-related gene long isiform), Bcl-w (également connu sous le nom de BCL2L2), A1 (Bcl-2-related gene A1, également appelée BFL1 chez l'homme), BCL-B (également appelée BCL2L10), Mcl-1 (Myeloid Cell Leukemia 1), sont des protéines inhibitrices qui interagissent avec les protéines pro-apoptotiques pour empêcher la MOMP.

- Bcl-2 pro-apoptotiques effectrice qui possèdent eux aussi 4 domaines BH : Bax (Bcl-2 Associated X protein), Bak (Bcl-2 Antagonit Killer 1) et Bok (Bcl-2-related Ovarian Killer), sont des protéines effectrices qui induisent directement la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) par oligodimérisation.

- Bcl-2 pro-apoptotique BH3-only (Bid, Bad, Bim, Bik, Noxa, Puma, Hrk, Bmf) sont caractérisés par leur capacité à interagir avec les protéines pro-apoptotiques effectrices et les protéines anti-apoptotiques.

La survie ou la mort cellulaire dépend donc de l'interaction entre les différents membres anti-apoptotiques (empêchant la MOMP) et les membres pro-apoptotiques (favorisant la MOMP).

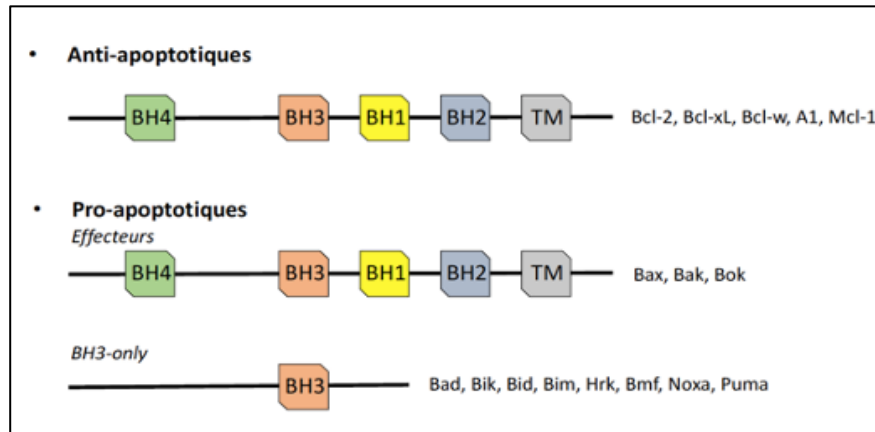


Figure 15 : Domaines BH des membres de la famille Bcl-2

(Martinou et Youle, Dev Cell 2011)<sup>176</sup>

Les protéines de la famille Bcl-2 se divisent en trois groupes selon leur domaine BH3. Les protéines pro-apoptotiques effectrices qui induisent directement la MOMP. Les protéines pro-apoptotiques BH3-only qui sont capables d'interagir avec les protéines proapoptotiques effectrices et les protéines anti-apoptotiques. Les protéines antiapoptotiques empêchent la MOMP en inhibant l'activité des protéines pro-apoptotiques. Les membres anti-apoptotiques et les effecteurs contiennent un domaine transmembranaire (TM) leur permettant l'ancrage dans la membrane externe mitochondriale.

Les protéines de la famille Bcl-2 existent sous deux états conformationnels : un monomère soluble cytosolique inactif et un monomère acif lié à la membrane. Compte tenu de leur homologie de structure et de séquence, il est désormais clairement admis que les six membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 : lui-même, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 et Bcl-B ; ainsi que les protéines effectrices pro-apoptotiques Bax, Bak et Bok partagent quatre domaines BH<sup>177</sup> et adoptent des structures globulaires similaires composée de neuf hélices  $\alpha$  formant un faisceau hélicoïdal entourant une hélice centrale hydrophobe ( $\alpha 5$ ) (**Figure 16A et 16B**)<sup>178</sup>. Ce domaine comprend les régions BH1 ( $\alpha 4$ - $\alpha 5$ ) et BH2 ( $\alpha 7$ - $\alpha 8$ ) d'un côté, et la région BH3 ( $\alpha 2$ - $\alpha 3$ ) de l'autre côté. Cette région hydrophobe sert de site de liaison avec le domaine BH3 des protéines Bcl-2 pro-apoptotiques et est nécessaire à leur activation, en particulier lors de la dimérisation et de l'oligomérisation<sup>179</sup>. Ce sillon hydrophobe sert également de site de liaison pour l'hélice C-terminale  $\alpha 9$  (domaine transmembranaire) de Bax et Bak (site BC), dans leur conformation inactive cytosolique (**Figure 16B**)<sup>180,181</sup>. En plus du site BC, un nouveau site de liaison a été découvert sur Bax (mais pas encore identifié sur Bak). Il est opposé au site BC et est appelé site « arrière » (*the « rear » groove*)<sup>182</sup>. Il implique les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 6$ , et interagit avec la

protéine tBid BH3 uniquement pour activer Bax<sup>182</sup>. Le processus d'activation de Bax se poursuit dès le déplacement et l'insertion de l'hélice  $\alpha 9$  dans la membrane mitochondriale.

De manière identique aux membres pro-apoptotiques, l'hélice  $\alpha 9$  du domaine transmembranaire de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL est liée à son site hydrophobe BC dans sa forme inactive cytosolique<sup>178</sup>. Une fois activée après son ancrage dans la membrane externe mitochondriale, Bcl-xL empêche le recrutement de tBid et de Bax cytosolique sur la membrane et inhibe ainsi l'activation et l'oligomérisation de Bax<sup>183</sup>.

Bcl-xL exerce son activité anti-apoptotique au sein de divers types de cellules<sup>184</sup>. Les souris déficientes en Bcl-xL meurent vers le 14e jour de l'embryogenèse en raison d'une érythropoïèse foetale défectueuse et de dégénérescence neuronale<sup>185</sup>. De plus, la perte d'un seul allèle issu du gène *Bcl2l1* (Bcl-2 like 1) codant pour Bcl-xL entrave la spermatogenèse et induit une thrombopénie<sup>186,187</sup>. La perte des deux allèles est fatale pour les hépatocytes et est à l'origine d'une fibrose hépatique<sup>188</sup>.

Bien que leur structure soit globalement similaire, les propriétés du site hydrophobe contenu dans Bcl-2 et Bcl-xL diffèrent de manière significative dans la composition des acides aminés qui tapissent le sillon. Ainsi, cette différence retentit sur le plan fonctionnel notamment en terme d'interaction avec les résidus hydrophobes et également en terme de distribution de charge. On peut donc en déduire qu'en cas de dimérisation, Bcl-2 et Bcl-xL privilégieraient des interactions avec des partenaires spécifiques<sup>189</sup>.

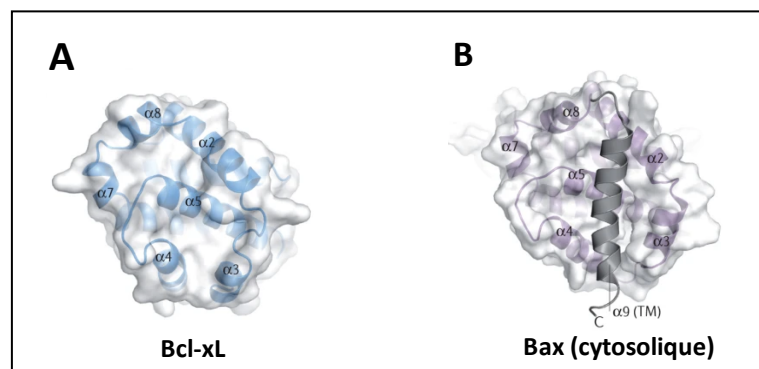


Figure 16 : Structure repliée des membres de la famille Bcl-2

(Czabotar et al. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014<sup>184</sup>)

La structure repliée des protéines de la famille Bcl-2 est constituée de sept hélices  $\alpha$ -amphipathiques regroupées autour d'une hélice hydrophobe centrale ( $\alpha 5$ ). Cette structure est partagée par les membres anti-apoptotiques de la famille, illustrés ici par Bcl-xL (A), et par les membres pro-apoptotiques sous leur forme inactive, représentés ici par Bax cytosolique (B) dont le domaine transmembranaire ( $\alpha 9$ ) est séquestré au niveau du site BC.

### 3) Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP)

La MOMP est l'événement clé associé à la voie intrinsèque de l'apoptose<sup>184,190</sup>. L'intégrité et la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOM) sont fortement régulées et contrôlées par les interactions entre les différentes protéines de la famille Bcl-2 et la membrane mitochondriale.

Bien que les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 se trouvent à la fois dans le cytosol (Bax) ou ancrées au niveau de la membrane externe mitochondriale (Bak), elles sont recrutées à la OMM, après activation par des stimuli pro-apoptotiques (hypoxie, rayons UV, agents de chimiothérapie...), afin d'induire la perméabilisation de la membrane. Pour comprendre le mécanisme par lequel les protéines de la famille Bcl-2 induisent la MOMP, des travaux se sont intéressés aux changements morphologiques de la membrane mitochondriale induits par la famille Bcl-2 en utilisant l'imagerie par fluorescence sur des mitochondries natives et des modèles de membranes mitochondriales. Un certain nombre de modèles ont été décrits incluant la modulation par les protéines de la famille Bcl-2 du complexe de pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). Le mPTP est constitué d'un assemblage multiprotéique dans lequel interviennent l'ANT (transporteur des nucléotides adényliques), cyclophiline D, la porine (Voltage-Dependent Anion Channel ou VDAC), la créatine Kinase (CK), l'hexokinase, le récepteur des benzodiazépines ainsi que des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bax<sup>191</sup>. Des études antérieures ont montré que la délétion des composants du mPTP n'a aucun effet sur le MOMP et l'apoptose, indiquant que l'interaction avec le mPTP n'est pas nécessaire pour la MOMP<sup>192</sup>. De plus, les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont également capables d'interagir avec les sphingolipides membranaires impliqués dans la formation de canaux céramides afin d'induire la MOMP ou en formant des canaux de libération de cytochrome c sur la OMM fonctionnellement lié à l'interaction Bax/Bak<sup>193,194</sup>.

Au total, l'activation de Bax/Bak suivi de leur oligodimérisation reste l'étape indispensable dans la formation du pore apoptotique induisant la MOMP<sup>195</sup>.



#### 4) Activation Bax-Bak

Les protéines Bax et Bak sont responsables de la MOMP. Ces deux protéines sont quasi-redondantes mais de localisation différente : Bax est cytosolique et Bak est intégrée à la membrane mitochondriale externe.

Après un signal de mort, Bax et Bak interagissent pour former des dimères et conduire ainsi à la formation d'un pore dans la membrane mitochondriale externe mesurant 25-100 nm<sup>1</sup>. La nature de ce pore n'est pas clairement déterminée mais sa formation est responsable de la fuite du contenu de l'espace inter-membranaire mitochondriale, notamment une libération du cytochrome c et dissipation du potentiel mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ). D'autres protéines sont également libérées : Smac/Diablo, AIF, Omi/HtrA2 favorisant la mort cellulaire par apoptose en inhibant la fonction des protéines inhibant les caspases.

Les protéines Bax et Bak sont présentes dans la cellule sous forme inactive et leur activation après un signal de mort est régulée par les autres membres de la famille Bcl-2<sup>181</sup>. Bax et Bak peuvent être activées de manière indirecte. Les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) séquestrent Bax et Bak pour empêcher la MOMP. Après un signal de mort, les protéines BH3-only induites vont interagir et être séquestrées par les protéines anti-apoptotiques pour permettre la libération de Bax et Bak qui deviendront alors actifs (**Figure 12**)<sup>197</sup>.

Bax et Bak peuvent également être activées de manière directe par interaction avec les protéines « BH3-only ».

#### 5) Régulation des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1

##### a. Généralités

Les membres de la famille Bcl-2 sont régulés par différents mécanismes au niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel (clivage, phosphorylation, dégradation, séquestration...) pour déclencher ou empêcher le signal apoptotique. A l'état basal, les membres Bcl-2 sont localisés dans différents compartiments subcellulaires. Suite à un signal de mort, ils sont relocalisés à la membrane mitochondriale externe pour induire ou inhiber la MOMP.

Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont principalement phosphorylés au niveau de leurs résidus Serine (Ser) ou Thréonine (Thr) au sein des hélices  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  (domaines BH4-BH3). Or, ces modes de régulation (souvent sur les mêmes résidus) sont responsables soit d'une diminution soit d'une augmentation de leur activité anti-apoptotique, de la modulation de leur stabilité, d'un blocage du cycle cellulaire, de modifications de leur capacité d'association avec d'autres protéines et de leur localisation subcellulaire<sup>198,199</sup>. Par exemple, des données récentes montrent que la phosphorylation du Bcl-2 au niveau de Ser70, ou de plusieurs autres résidus de l'anse, entraîne une modification de la conformation de l'anse, intensifiant la liaison de Bcl-2 avec Bak et Bim, rendant ainsi les cellules plus résistantes aux agents de chimiothérapie<sup>200</sup>. On peut donc supposer que la modulation de la conformation des boucles de Bcl-2 influence son niveau d'association avec d'autres protéines.

Mcl-1 est soumise à une régulation stricte en termes de transcription, de traduction et de renouvellement des protéines en raison de sa très courte demi-vie (inférieure à 30 minutes)<sup>201,202</sup>. Mcl-1 est dégradé soit par une voie indépendante du système ubiquitine-protéasome soit par le protéasome une fois ciblée par différentes ubiquitines ligases (telles que MULE (également connu sous le nom de HUWEI),  $\beta$ TrCP ( $\beta$ -transducin repeat-containing protein), FBW7 (F-box et WD40 domain-containing 7; également connu sous le nom de FBXW7)<sup>202</sup>. Au contraire, Mcl-1 est stabilisée par la déubiquitylase USP9X<sup>203</sup>. La région N-terminale de Mcl-1 régule également sa stabilité ; la coupure du segment N-terminal de Mcl-1 génère un isoforme situé dans la matrice mitochondriale, impliqué dans la structure et les fonction mitochondriales<sup>201,204</sup>.

#### b. Au niveau du myocarde

De nombreuses protéines de la famille Bcl-2 sont exprimées dans le myocarde. Comme prévu, Bcl-2 et Bcl-xL sont détectées au sein de la fraction mitochondriale de la cellule. Quant à Bad, Bax et Bid; leurs localisations alternent entre la fraction soluble de la cellule et les mitochondries<sup>205,206,207</sup>. Au cours du développement postnatal, l'expression des membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL est augmentée par rapport à la quantité totale de protéines dans le cœur, tandis que l'expression des membres pro-apoptotiques Bad et Bax diminue<sup>205</sup>. En effet, l'augmentation de taille de chaque cardiomyocytes dans lesquels l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL augmente en parallèle, contribue à la croissance globale post-natale du cœur. Ceci

est probablement une conséquence de l'augmentation du contenu mitochondrial requis pour la croissance des cardiomyocytes<sup>189</sup>. En revanche, Bad et Bax semblent absents des mitochondries et moins exprimées par rapport à la quantité de protéine cellulaire totale. De la même manière que dans les autres types cellulaires, les protéines de la famille Bcl-2 interviennent dans la modulation de l'apoptose des cardiomyocytes. Chez l'homme, divers processus pathologiques d'installation chronique tels que la cardiomyopathie dilatée et la cardiopathie ischémique<sup>208,209</sup>, ou plus aigus comme l'infarctus de myocarde ont montré une prédominance de l'expression des protéines Bcl-2 pro-apoptotiques par rapport aux protéines anti-apoptotiques<sup>210</sup>.

De plus, il a été montré que la protéine pro-apoptotique Bax est activée dans les cardiomyocytes en réponse au stress oxydatif<sup>211</sup>. L'atteinte mitochondriale et la taille de l'infarctus seraient également diminuées sur des modèles *in vivo* de myocarde de souris Bax-déficientes comparées à des souris contrôle de phénotype sauvage soulignant le rôle prépondérant de Bax dans le phénomène de l'IR<sup>212</sup>.

Par ailleurs, les protéines anti-apoptotiques représenteraient une cible thérapeutique prometteuse dans la prise en charge des cardiopathies surtout depuis la mise en évidence de leur potentiel cardioprotecteur vis-à-vis de divers stress cellulaires. Par exemple, la surexpression de Bcl-2 protège les cardiomyocytes de l'apoptose induite par p53 ou par hypoxie/ré-oxygénation<sup>213,214,215</sup>. Il a également été montré que Bcl-2 exerce son effet cardioprotecteur en augmentant le seuil calcique intracellulaire nécessaire à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale au sein des cardiomyocytes<sup>216</sup>.

Contrairement aux autres membres de la famille Bcl-2, l'inhibition de l'expression de Mcl-1 dans les cardiomyocytes provoque une cardiomyopathie et une insuffisance cardiaque d'installation rapide, confirmant son rôle essentiel dans le développement cardiaque embryonnaire<sup>217</sup>. Cette atteinte lésionnelle est probablement attribuable à l'apoptose des cardiomyocytes car cette dernière est prévenue par l'inhibition concomitante des effecteurs pro-apoptotiques Bax et Bak<sup>217</sup>. Cependant, compte tenu de la persistance de certaines anomalies morphologiques et fonctionnelles mitochondriales, Mcl-1 pourrait jouer un rôle supplémentaire au niveau de la mitochondrie, non lié à la mort cellulaire<sup>184</sup>.

## 6) Régulation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL

### a. Généralités

Parmi les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques, la protéine Bcl-xL est connue pour son effet anti-apoptotique en inhibant l'activation Bax-Bak par séquestration. Bcl-xL peut être régulée à différents niveaux :

- Au niveau transcriptionnel, l'expression de Bcl-xL est régulée par plusieurs facteurs de transcription, tels que NFκB<sup>218</sup>, STAT5, HIF1α<sup>219</sup>, les facteurs de transcription de la famille Ets et la voie PI3K/Akt via la phosphorylation inhibitrice de FoxO et de Bcl-6<sup>220</sup>. En effet, la voie PI3K/Akt régule l'activation des facteurs de transcription de la famille FoxO. Akt inhibe FoxO par phosphorylation. FoxO phosphorylé est séquestré dans le cytoplasme. Il ne peut donc plus activer la transcription de plusieurs gènes dont Bcl-6 lui-même répresseur transcriptionnel de Bcl-xL<sup>221</sup>.

- Au niveau post-transcriptionnel, le pré-ARNm subit un épissage alternatif donnant soit une forme courte de Bcl-xL : Bcl-xS capable d'induire l'apoptose ; et une forme longue : Bcl-xL qui inhibe l'apoptose.

- Au niveau post-traductionnel, la protéine Bcl-xL peut subir des modifications telles qu'une phosphorylation qui modifie son interaction avec les protéines pro-apoptotiques, induisant dans la plupart des cas une inhibition de son activité anti-apoptotique. La phosphorylation de Bcl-xL peut aussi être contrôlée par la phosphatase PP2A<sup>223</sup>. Dans certaines circonstances, Bcl-xL peut être la cible des caspases et être clivée aboutissant à la formation de fragments ayant une fonction pro-apoptotique<sup>224</sup>. Elle peut subir également une ubiquitination<sup>225,226</sup> entraînant sa dégradation, une déamidation<sup>227,228</sup>, une désamination<sup>229</sup> ou une méthylation modifiant son interaction avec les protéines BH3-only.

### b. Au niveau du myocarde

La mort des cardiomyocytes par apoptose est impliquée dans la plupart des atteintes lésionnelles du myocarde telles que la cardiopathie ischémique et l'insuffisance cardiaque<sup>230</sup>. En tant que membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2, Bcl-xL participe à la régulation fine du processus apoptotique au sein du myocarde, notamment en situation d'IR<sup>231</sup>. Plusieurs facteurs de croissance capables d'induire l'augmentation de l'expression de Bcl-xL présentent des effets cardioprotecteurs dans des modèles expérimentaux d'IR. Par exemple, Nakamura

et al. ont rapporté que l'administration d' HGF (Hepatocyte Growth Factor), puissant mitogène à la fois pour les hépatocytes et les cellules endothéliales, réduit la taille de la zone d'infarctus et améliore la fonction cardiaque en empêchant l'apoptose des cardiomyocytes dans un modèle murin d'IR<sup>232</sup>. En outre, ils ont montré que l'expression de Bcl-xL était augmentée après administration d'HGF dans le myocarde lésé et en ont conclu que Bcl-xL contribue aux effets cardioprotecteurs de l'HGF. L'IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) a également des effets cardioprotecteurs contre les lésions d'IR. En effet, Yamamura et al. ont démontré qu'un traitement par IGF-1 préalablement à l'IR inhibe la libération de cytochrome c et de créatine kinase et améliore la fonction ventriculaire gauche en induisant une augmentation de l'expression de Bcl-xL parallèlement à une diminution de l'expression de Bax au sein de la fraction mitochondriale de cardiomyocytes de rat<sup>233</sup>. Ainsi, ceci suggère que la balance quantitative entre les membres pro/anti-apoptotiques en faveur des protéines anti-apoptotiques (Bcl-xL) est un déterminant majeur de la survie des cardiomyocytes.

De plus, la surexpression de Bcl-xL induite par transfection ou par transduction de son peptide actif BH4 protège des lésions générées par l'IR sur modèle in vivo et ex vivo de cardiomyocytes de rat<sup>234,235</sup>. La littérature rapporte également que l'augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL au niveau du myocarde serait majoritairement due à une régulation transcriptionnelle en activant le promoteur du gène codant pour cette protéine d'intérêt<sup>236,237</sup>. En revanche, la phosphorylation de Bcl-xL en Ser14 au sein du domaine BH4 dépendante de l'activation de Mst1 (voie de signalisation Hippo) en situation d'IR empêche la séquestration de Bax. Le maintien de l'activation de Bax conduit à la mort cellulaire par apoptose<sup>238</sup>.

Fort de ces constats, Bcl-xL pourraient jouer un rôle crucial dans la protection vis-à-vis des lésions d'apoptose induite par l'IR myocardique. Son effet cardioprotecteur en fait une potentielle cible de choix pour des stratégies thérapeutiques visant à réguler son expression.

## *Résumé Partie V*

- Les protéines de la famille Bcl-2 agissent tels des baromètres de la mort cellulaire par apoptose. L'homéostasie cellulaire est assurée par l'équilibre entre les membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de cette famille de protéines.
- Il existe d'autres types de mort indépendants de l'activation des caspases comme la nécroptose et la mort cellulaire indépendante des caspases (CICD)
- L'activation de Bax/Bak suivi de leur oligodimérisation reste l'étape indispensable dans la formation du pore apoptotique induisant la MOMP.
- Les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 séquestrent Bax et Bak pour empêcher la MOMP.
- Les domaines BH3 et BH4, site de phosphorylation privilégié des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, sont déterminants dans la régulation de leur fonction anti-apoptotique.
- Bcl-xL semble jouer un rôle crucial dans la protection vis-à-vis des lésions d'apoptose induite par l'IR myocardique.

## VI. Méthode de protection vis-à-vis de l'IR

### 1) Généralités et définitions

En clinique, l'ischémie-reperfusion est responsable d'une forte mortalité ou de lourdes séquelles. En chirurgie programmée toute spécialité confondue, l'ischémie-reperfusion myocardique représente la première cause de morbi-mortalité peri-opératoire. Ainsi, de nombreuses techniques pour limiter ou prévenir les lésions induites par l'ischémie-reperfusion ont été développées.

Parmi elles, l'hypothermie thérapeutique est la technique la plus anciennement connue et la plus utilisée actuellement notamment pour son effet neuroprotecteur prouvé en situation d'ischémie-reperfusion cérébrale au décours d'un arrêt cardio-circulatoire ressuscité<sup>70,71</sup>. Sur le plan biologique, l'hypothermie permet de réduire les lésions induites par l'ischémie et par la reperfusion. Durant la phase d'ischémie, l'hypothermie permet le maintien de l'homéostasie électrolytique en stabilisant les lipides membranaires, qui limitent les flux ioniques transmembranaires, et en réduisant le métabolisme cellulaire qui permet de diminuer les besoins en ATP de la cellule au profit des pompes ioniques. Durant la phase de reperfusion, l'hypothermie réduit la production d'espèces réactives de l'oxygène et la réponse inflammatoire immune, limitant ainsi les lésions protéiques, lipidiques et nucléaires. Malheureusement, l'hypothermie n'est pas toujours applicable et n'est pas dénuée d'effets secondaires graves (trouble du rythme, trouble de l'hémostase, risque infectieux).

A l'état physiologique, tous les organismes vivants en aérobiose produisent des ROS. Ainsi, il existe, dans la cellule, un système anti-oxydant composé de molécules et d'enzymes anti-oxydantes neutralisant les ROS produits et empêchant ainsi la génération des lésions d'ADN, des lipides et des protéines. Les molécules anti-oxydantes sont le glutathion, la vitamine C, la vitamine E, l'acide alpha-lipoïque..., et les enzymes anti-oxydantes sont la superoxyde dismutase, la catalase, la peroxydase... Cependant, en situation d'ischémie-reperfusion l'apport exogène de molécules anti-oxydantes, comme le N-acetyl-cystéine, la vitamine C ou E n'ont pas fait la preuve formelle de leur efficacité<sup>239,240</sup>.

L'approche thérapeutique traditionnelle de l'ischémie du myocarde vise à rétablir un équilibre dans la balance entre les besoins et les apports en oxygène du myocarde. Sur le plan pharmacologique, une abondante littérature a notamment discuté l'intérêt des bêta-

bloquants durant la phase péri-opératoire<sup>241</sup>. Une autre façon d'aborder cette problématique consiste à analyser les désordres mécaniques, métaboliques et électrophysiologiques induits par l'IR, et à tenter d'enrayer ces phénomènes par l'application de techniques de cardioprotection tel que le préconditionnement agissant sur les mécanismes intimes de l'IR<sup>242</sup>.

Le préconditionnement est basé sur le principe d'adaptation cellulaire où lorsqu'une cellule est soumise à un stress subléta (courte durée et faible intensité), celle-ci est capable secondairement de résister à une nouvelle exposition à ce stress mais à une dose qui lui est normalement létale.

L'anesthésiste-réanimateur est en première ligne afin d'assurer la protection des organes par le préconditionnement puisqu'il sait, d'après la programmation des interventions prévues ; en chirurgie cardiaque ou non cardiaque (vasculaire, hépatique, orthopédique) ; quand se produira l'ischémie myocardique et/ou des autres organes d'intérêt. En revanche chez les patients victimes d'un infarctus du myocarde, en période péri-opératoire ou non, l'ischémie myocardique se produit avant qu'une intervention de préconditionnement puisse être effectuée. Dans ces circonstances, il est également possible d'effectuer une manœuvre de conditionnement ischémique ou pharmacologique après le début de l'événement ischémique, appelé postconditionnement. On parle de postconditionnement ischémique lorsque de brefs épisodes d'ischémie/reperfusion sont effectués au début de la reperfusion et protègent l'organe d'intérêt contre les lésions d'IR<sup>243</sup>.

Ainsi, je ne détaillerai que les différentes stratégies de préconditionnement, pharmacologiques et non pharmacologiques rencontrées dans le contexte péri-opératoire (**Figure 17**). Parmi ces stratégies de cardioprotection, je me focaliserai davantage sur l'étude des mécanismes du préconditionnement pharmacologique (PPc) par les agents anesthésiques volatils de la famille des éthers halogénés (AVH), appelé préconditionnement anesthésique (APc) que j'ai plus particulièrement étudié durant ma thèse.



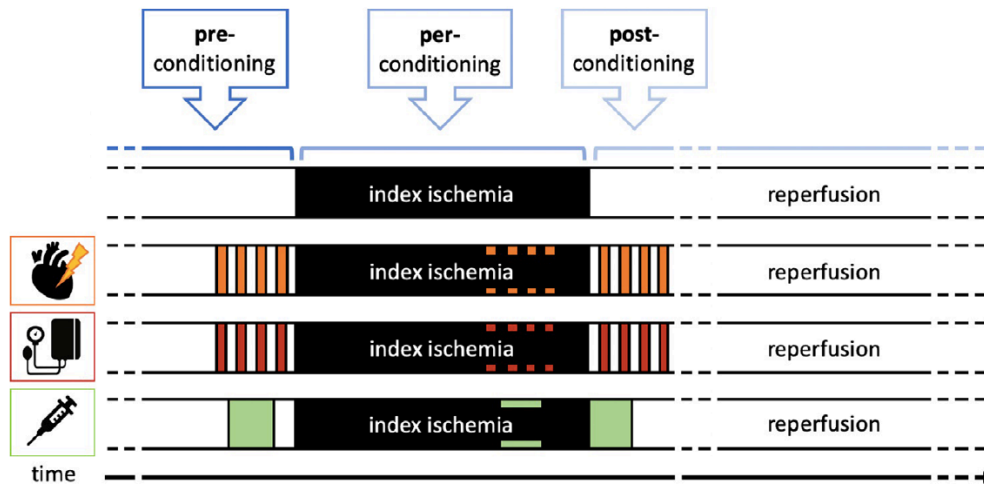


Figure 17 : Représentation des différents timings des stratégies de conditionnement cardioprotectrices pharmacologiques et non pharmacologiques

(Torregroza et al., *Anesth Analg*, 2020)<sup>244</sup>

Les manœuvres de conditionnement précédant l'ischémie sont appelés préconditionnement. L'intraconditionnement décrit le traitement pendant l'ischémie indicielle et le postconditionnement comprend toutes les stratégies appliquées après l'ischémie pendant la phase de reperfusion. Deuxième ligne = conditionnement ischémique directement au niveau du cœur. Troisième ligne = conditionnement ischémique à distance. Quatrième ligne = conditionnement pharmacologique.

## 2) Stratégies de Préconditionnement non pharmacologiques

### a. Pré-conditionnement ischémique (IPc)

Murry et Jennings ont appliqué le concept de préconditionnement vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion myocardique et ils ont montré l'efficacité du préconditionnement dit ischémique sur la réduction de la taille finale de l'infarctus du myocarde (de 50 à 75%) au décours d'une occlusion coronaire réalisé chez le chien<sup>115</sup>. Depuis cet article référence, il a été montré aussi bien expérimentalement que cliniquement, que l'IPc est le phénomène protecteur connu le plus puissant pour limiter les lésions induites par l'IR<sup>115,245</sup>.

L'IPc est un phénomène résultant du déclenchement d'une protection endogène intra-tissulaire qui consiste en la réalisation d'une succession de brèves séquences d'ischémie de 5 minutes espacées de courtes séquences de reperfusion de 5 minutes (trop courtes pour induire une nécrose myocytaire) avant la survenue d'une occlusion coronaire prolongée (de durée suffisante pour provoquer un infarctus du myocarde) (**Figure 17**). Cette découverte expérimentale est d'ailleurs superposable à une réalité clinique, à savoir qu'un certain nombre

de patients présentent des épisodes itératifs d'angor (cardiopathie ischémique instable) ou d'ischémie silencieuse dans les heures ou les jours précédents un infarctus du myocarde. On sait depuis que les infarctus survenant chez des patients préalablement atteints d'une angine de poitrine sont moins étendus que lorsqu'il survient de façon inaugurale<sup>246</sup>.

Malheureusement, les applications cliniques de l'IPC ne sont pas sans danger et ne sont pas toujours réalisables. C'est pourquoi, il a été développé d'autres méthodes non-invasives de pré-conditionnement ischémique tel que le préconditionnement ischémique à distance, ou de préconditionnement pharmacologique tel que le préconditionnement anesthésique par les agents anesthésiques volatils de la famille des éthers halogénés.

#### b. Préconditionnement ischémique à distance (RIPc : Remote Ischemic Preconditioning)

Plus récemment décrit, le RIPc consiste à induire des ischémies plus ou moins répétées dans un organe (ex : masse musculaire squelettique) en vue d'augmenter la résistance d'un autre organe de manière systémique par voie neurogène ou humorale (**Figure 17**). La cardioprotection ne se limite donc pas à un seul organe. Quelques études cliniques démontrent un bénéfice avec cette technique simple, inoffensive et peu coûteuse. Le gonflement d'un brassard à pression au bras gauche avant la CEC (3-4 épisodes itératifs de 5 minutes à 200 mmHg) diminue le taux de troponin I postopératoire ainsi que les complications cardiaques et la mortalité<sup>247</sup>. Cependant, les résultats de grands essais cliniques randomisés alimentent la controverse concernant la réalité de l'effet protecteur de ce type de préconditionnement<sup>248,249</sup>.

De manière remarquable, la durée du RIPc et la période de reperfusion diffèrent selon l'organe cible, les espèces respectives soulignant que le protocole de RIPc idéal n'a pas encore été déterminé<sup>250</sup>.

### 3) Stratégies de préconditionnement pharmacologiques en anesthésie

#### a. Pré-conditionnement anesthésique (APC)

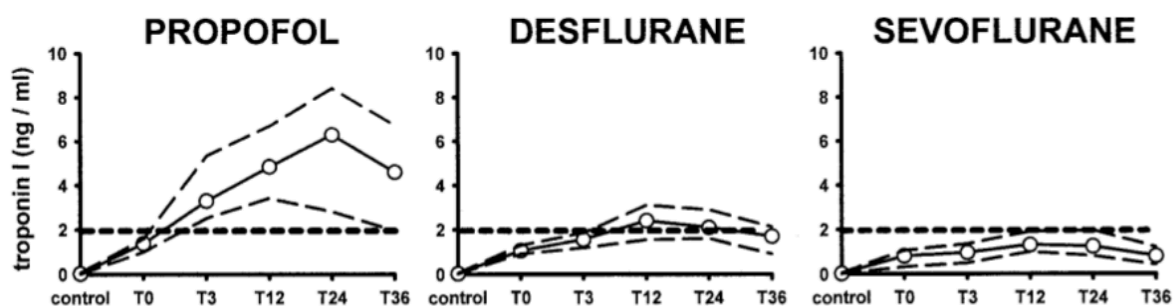
- *Définitions et première description*

Les éthers halogénés (AVH) sont des agents hypnotiques utilisés quotidiennement au bloc opératoire pour l'induction et l'entretien d'une anesthésie générale. On distingue plusieurs

molécules ayant les mêmes propriétés : sévoflurane (SEV), isoflurane (ISO), desflurane. Il s'agit de composés très volatiles dont l'administration est réalisée par voie respiratoire par l'intermédiaire d'un ventilateur spécifique associé à un vaporisateur. Ils sont également très liposolubles ce qui leur confère la propriété de diffusion passive à travers la membrane plasmique et la membrane des organites cellulaires.

Depuis le milieu des années 70, l'étude des effets bénéfiques potentiels des agents anesthésiques halogénés est au coeur de la recherche en anesthésie, en particulier leur rôle sur le myocarde ischémique. L'intérêt s'est porté successivement sur leurs effets indirects sur les déterminants de l'équilibre entre les apports et les besoins en oxygène du myocarde (diminution des conditions de charge et de contractilité du myocarde), leurs effets directs sur le réseau vasculaire coronarien (vasodilatation et sténose coronariennes), puis leur capacité à mimer le mécanisme cardioprotecteur intrinsèque de l'IPC.

Ainsi, Bland et Lowenstein<sup>251</sup> ont rapporté pour la première fois une diminution des anomalies électrocardiographiques (analyse du segment ST) durant une ischémie myocardique par l'occlusion de l'artère interventriculaire antérieure (IVA) chez des chiens ayant bénéficiés d'une exposition préalable à l'halothane. Depuis la publication de cet article référence, de très nombreuses études ont fait la preuve de l'effet cardioprotecteur de l'APC vis-à-vis de l'IR myocardique aussi bien chez l'animal<sup>252</sup> que chez l'homme<sup>253,254</sup> (**Figure 18**).



*Figure 18 : L'APC diminue la libération de la troponine en post-opératoire d'une chirurgie cardiaque à cœur arrêté*

*(De Hert et al., Anesthesiology, 2003)<sup>253</sup>*

*Dosage de la troponine I en pré-opératoire et durant les 36 heures post-opératoire d'une chirurgie cardiaque à cœur non battant pour pontage aorto-coronaire. L'étude inclut 15 patients par groupe qui sont appariés sur âge, sexe, IMC, FEVG, antécédents et prémédications. Les valeurs sont exprimées en moyennes et intervalles de confiance de 95%. Une valeur seuil de troponine I > 2 ng/mL est considérée comme une valeur positive de souffrance myocardique.*

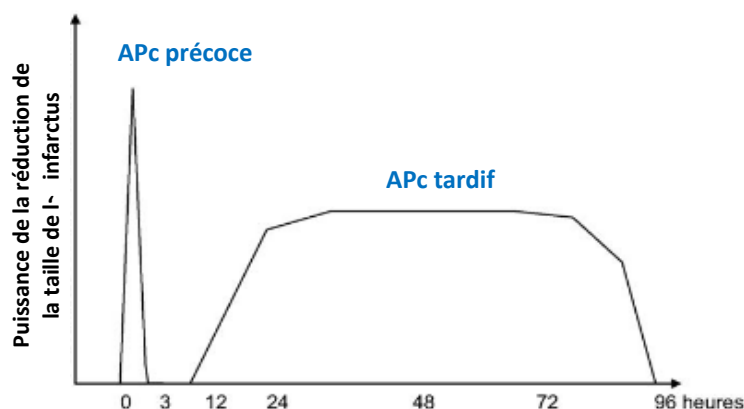
- *Phases de l'APc*

Deux phases de protection, de différents délais, ont été identifiées au sein de l'IPC : la phase précoce et la phase tardive.

La phase précoce débute quelques minutes avant le stimulus ischémique et protège le myocarde pendant 1 à 2 heures avec une intensité considérable. La phase tardive se produit 24 heures après l'initiation de l'IPC, sans qu'il soit nécessaire de le répéter, et induit une protection moins importante mais plus durable dans le temps (environ 72 heures)<sup>255,256</sup>.

Les phases de protection décrites dans l'APc sont superposables à celles de l'IPC<sup>257</sup> (**Figure 19**). La phase précoce impliquerait les canaux potassiques mitochondriaux ATP-dépendants<sup>258</sup>, la PKC (protéine kinase C)<sup>259</sup> ainsi que les récepteurs à l'adénosine<sup>260</sup>.

La phase tardive ou de "seconde fenêtre" serait liée à la synthèse des protéines médiatrices cytoprotectrices et dure de 24 à 72 heures après l'exposition aux gaz halogénés<sup>261</sup>. En 2013, Qiao et al ont rapporté les mécanismes fondamentaux de la phase tardive de l'APc dans les cœurs de rats. Ces mécanismes comprennent l'activation de NFκB, la régulation de l'autophagie et l'atténuation de l'expression de TNFα, IL-1β et de la caspase 3<sup>262</sup>.



*Figure 19 : Représentation des phases précoce et tardif de l'APc*

*(Chiari et al., Ann Fr Anesth Reanim)<sup>263</sup>*

*Deux fenêtres de préconditionnement anesthésique (APc) mettant en jeu des mécanismes différents ont été décrits : une fenêtre précoce qui dure de une à deux heures, et une fenêtre tardive qui apparaît entre 24 et 72 heures. La fenêtre définit l'espace de temps entre le signal déclenchant (arrêt de l'inhalation de l'halogéné) et l'ischémie longue.*

- *Application clinique de l'APc*

Les AVH tels que le sévoflurane, l'isoflurane ou le desflurane sont considérés comme cardioprotecteurs car ils activent ou amorcent des voies de signalisation cellulaires similaires à celles de l'IPc et du RIPc<sup>264</sup>.

Les premiers essais cliniques objectivant un effet protecteur de l'APc se traduisent essentiellement par une amélioration des critères de jugement secondaires en rapport avec la souffrance myocardique (ex : la réduction de la libération de troponine)<sup>265,266,267</sup>. D'autres études menées majoritairement en chirurgie cardiaque (pontage aorto-coronarien) ont confirmé le bénéfices des agents anesthésiques volatils en terme de cardioprotection<sup>268</sup>. Ceci a conduit à l'élaboration de recommandations de l'American College of Cardiology et de l'American Heart Association ainsi que de l'Association européenne de chirurgie cardiothoracique dans le but de favoriser le recours aux agents volatils en cas d'anesthésie en chirurgie cardiothoracique<sup>269,270</sup>. Une méta-analyse plus récente a conclu que le SEV réduit la concentration de troponine Ic post-opératoire par rapport à une anesthésie au propofol et qu'il est associé à une incidence plus faible d'événements cardiaques majeurs, une diminution du recours aux agents inotropes ainsi qu' à une amélioration de l'index cardiaque dans les suites d'une chirurgie cardiaque<sup>271</sup>.

Toutefois, de nombreux essais évaluant l'effet protecteur de l'APc se sont également avérés négatifs et n'ont montré aucune réduction des biomarqueurs de souffrance myocardique après chirurgie cardiaque ou non cardiaque par l'utilisation d'agents volatils<sup>272,273,274</sup>. Uhlig et al. ont comparé l'effet protecteur des AVH (SEV, ISO, DES) avec les agents intra-veineux en chirurgie cardiaque et non-cardiaques, incluant 7104 patients regroupés dans 68 essais clinique randomisés. Les AVH étaient associés, seulement en chirurgie cardiaque, à une réduction de la mortalité et à moins de complications pulmonaires postopératoires<sup>275</sup>. Il n'y a pas eu de différence statistiquement significative en terme de durée de séjour en soins critiques ou à l'hôpital indépendamment du type de chirurgie.

La plus grande méta-analyse a été publiée par An et al. 2017, qui ont analysé 27 ECR portant sur 35 340 patients et comparant la mortalité et l'incidence d'évènements cardiaques majeurs entre le sévoflurane et le propofol, l'anesthésie par agents inhalés nitrés ou non et entre anesthésie générale et neuroaxiale dans le cadre d'une chirurgie non cardiaque. Ils ont conclu que les patients recevant une anesthésie par sévoflurane présentaient une troponine Ic et

l'incidence de l'ischémie myocardique significativement réduites par rapport au patient sous propofol. En revanche, ils n'ont pas trouvé de différences concernant le taux de mortalité à 30 jours post-opératoires<sup>276</sup>. Malgré ces résultats hétérogènes, l'American College of Cardiology/American Heart Association (AHA) de 2007 recommandent le recours aux anesthésiques volatils afin de promouvoir la cardioprotection en chirurgie non cardiaque<sup>277</sup>.

Dans un essai clinique pragmatique et multicentrique récemment publié dans le *New England Journal of Medicine*, portant sur 5400 patients bénéficiant d'une chirurgie de pontage aorto-coronarien isolé, l'utilisation d'anesthésiques volatils (SEV, ISO, DES) au cours de l'anesthésie par rapport à une anesthésie intraveineuse totale au propofol ne montre pas de différence significative en terme de mortalité à un an post-opératoire<sup>278</sup>. Il n'y avait pas non plus de différence significative concernant l'incidence d'évènements cardio-vasculaires majeurs<sup>278</sup>.

Par conséquent, à ce jour, il n'y a pas de réponse formelle favorisant l'effet cardioprotecteur des anesthésiques volatils en pratique clinique.

#### b. Autres agents de préconditionnement connus en anesthésie

- *Gaz nobles*

Les gaz nobles tels que le xénon et l'hélium ont été reconnus comme de puissants agents de conditionnement pharmacologique au cours des deux dernières décennies. Bien que tous les gaz nobles soient définis comme des gaz "inertes", il a été démontré qu'ils sont capables d'induire un effet protecteur majeur au niveau du cœur et des autres organes chez différentes espèces animales et chez l'homme<sup>279,280</sup>. En tant que gaz mono-atomique, leur couche de valence n'est constituée d'aucun électron de valence pour former une liaison chimique, réduisant considérablement leur capacité d'agir avec d'autres composés.

Néanmoins, leurs propriétés cardioprotectrices sont présentes lorsque ces gaz sont appliqués avant et/ou pendant et/ou après l'ischémie<sup>279</sup>. Chez des volontaires sains, l'hélium protège l'endothélium contre les lésions causées par l'IR<sup>281</sup>. En revanche, l'application d'un mélange gazeux contenant 70% hélium pendant 3 périodes successives de 5 minutes avant (préconditionnement) ou en fin du clampage aortique croisé (post-conditionnement) ou une combinaison des deux, en chirurgie cardiaque pour des pontages aorto-coronariens n'a pas d'effet sur la libération postopératoire de troponine<sup>282</sup>. L'anesthésie au xénon est non-

inférieure à une anesthésie au SEV mais supérieure à une anesthésie intraveineuse totale avec du propofol en terme de prévention de la souffrance myocardique post-opératoire (déterminée par la libération de troponine) chez des patients à faible risque bénéficiant d'un pontage aorto-coronarien<sup>283</sup>. Dans le contexte de l'arrêt cardiaque extra-hospitalier, l'inhalation de xénon combinée à l'hypothermie (par rapport à l'hypothermie seule) pourrait protéger le myocarde comme en témoigne la réduction significative de la libération de troponine T<sup>284</sup>. Cependant, il n'existe pas encore d'étude de grande envergure, sur des effectifs plus importants de patients, afin d'évaluer la protection cardiaque induite par les gaz nobles.

Les mécanismes en cause dans leur effet protecteur mettraient en jeu la phosphorylation de la PKC (isoforme  $\epsilon$ ) et l'activation de ses cibles d'aval (p38-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ; MAPKAPK-2 (MAPK-activated protein kinase-2)) et la régulation des cavéolines<sup>285,286</sup>

- *Propofol*

Le rôle de cet hypnotique intra-veineux d'usage classique en anesthésie dans les stratégies cardioprotection a été longuement débattu en raison de sa position plutôt contradictoire. Comme pour les anesthésiques volatils, il a été démontré que le pré- et le post-conditionnement par le propofol était capable de protéger le cœur contre les lésions d'IR<sup>287</sup>. Ses propriétés « conditionnantes » seraient dues à la réduction de la production des ROS et à la régulation de la surcharge en  $Ca^{2+}$  par différents canaux (canaux  $Ca^{2+}$  de type L et T) pendant la reperfusion<sup>288</sup>, ainsi qu'à la régulation de l'expression des ARN non codants (microARNs)<sup>289</sup>.

Paradoxalement, bien que le propofol possède ses propres propriétés cardioprotectrices, il serait responsable de l'inhibition de l'effet protecteur des autres méthodes de préconditionnement (APc, IPc, RIPc) en cas d'administration au cours des manœuvres d'IPc/RIPc ou de co-administration avec les AVH. Les mécanismes exacts de cet effet antagoniste majeur sont encore mal connus. Compte tenu de sa nature anti-oxydante (dérivé de la vitamine E), il pourrait neutraliser les ROS nécessaires à l'activation des voies de signalisation cardioprotectrices<sup>287</sup>.

- *Opioides*

Des preuves solides issues d'études in vitro et in vivo sur modèle animal démontrent que les opioïdes protègent le myocarde contre l'IR<sup>290</sup>. L'activation des récepteurs opioïdes endogènes jouent un rôle important dans la cardioprotection notamment les récepteurs opioïdes  $\kappa$  et  $\Delta$ <sup>291</sup>. Cependant, les preuves cliniques sont rares. En chirurgie cardiaque, les opioïdes couramment utilisés, tels que le sufentanil ou le rémifentanil, diminueraient l'étendue de la souffrance myocardique définie par une réduction de la libération des biomarqueurs cardiaques<sup>292</sup>. Les mécanismes à l'origine de leur effet cardioprotecteur font intervenir une multitude de voies de signalisation avec leurs seconds messagers et effecteurs terminaux (PKC, MAPKs, mTOR, NOS inductible...) dont le point de départ classiquement décrit demeure les récepteurs couplés à la protéine G<sup>293</sup>. Plus récemment, Melo et al. ont également décrit le rôle des ARN non codants (microARNs) dans la cardioprotection induite par les opioïdes<sup>294</sup>.

#### 4) Mécanismes de l'IPC et l'APC

##### a. Généralités

Bien que l'IPC et l'APC soient connus depuis de longue date, les mécanismes d'action et les voies de signalisation sont encore mal connus. Les mécanismes responsables de la protection myocardique par les agents anesthésiques ressemblent partiellement à ceux impliqués dans l'IPC<sup>244</sup>. La plupart de ces mécanismes ont été largement étudiés expérimentalement dans des modèles animaux. L'activité des récepteurs couplés aux protéines G, la fonction des canaux ioniques, les kinases de signalisation intracellulaire, la régulation de l'apoptose, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), l'expression génique et la physiologie mitochondriale ont montré jouer un rôle important dans l'effet protecteur de l'APC vis-à-vis de l'IR myocardique<sup>295,296,297</sup>. Plus récemment, de nouvelles voies de signalisation dépendante du récepteur au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)<sup>298</sup>, de la modulation du stress du réticulum endoplasmique<sup>299</sup> et de la régulation de l'expression d'ARN non codants (microARNs)<sup>300</sup> ont également été décrites.

En l'état actuel des connaissances, aucun mécanisme décrit fait consensus en dehors des ROS qui se comporteraient comme des initiateurs des voies de signalisation et des effecteurs intracellulaires responsables de l'effet cardioprotecteur de l'APC par les agents anesthésiques



volatils<sup>301,302,96,95</sup>. Parmi les kinases activées au sein des diverses voies de signalisation initiées, la voie des kinases induites en réponse aux lésions de reperfusion (RISK : Reperfusion Injury Salvage Kinases), représentée notamment par la sérine/thréonine kinase Akt, reste incontournable en terme de cardioprotection induite par l'APc<sup>303,304,244</sup>.

Il semble très probable que les AVH soient capables d'induire plusieurs voies de signalisation et plusieurs effecteurs convergeant in fine vers la protection mitochondriale, dont l'effet global soit cardioprotecteur de manière synergique<sup>305,303</sup>.

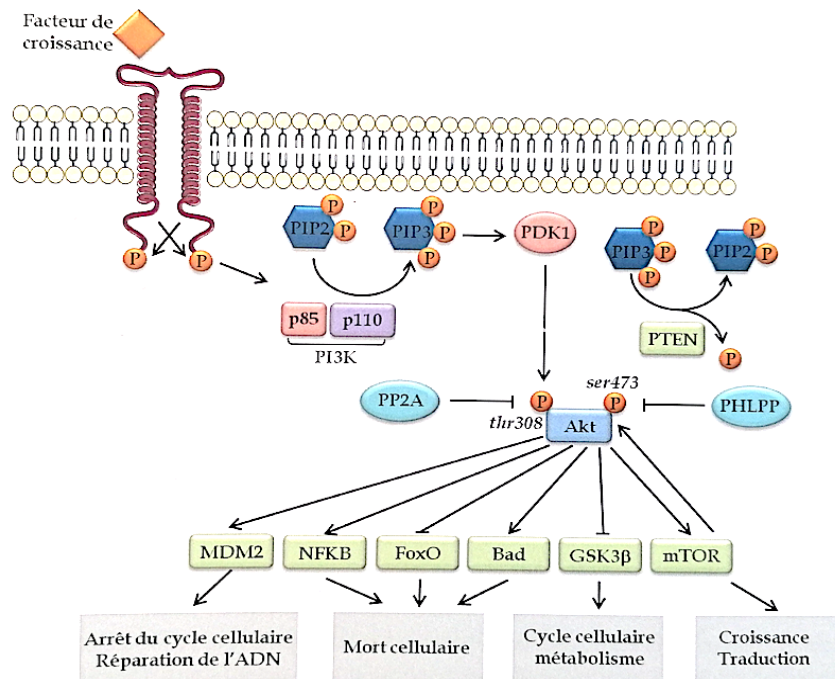
#### b. Protéine kinase impliquée dans la voie des RISK : Akt

En 2002, le groupe de travail mené par Yellon décrit pour la première fois la « Reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway » en évaluant les mécanismes sous-jacents de la protection induite par les facteurs de croissance telle que l'urocortine<sup>306</sup>. Cette nouvelle approche pharmacologique, visant à empêcher le processus apoptotique, nécessite l'activation de protéines de survie telles que le couple de kinases PI3K/Akt<sup>307</sup>. La voie des RISK est en fait une combinaison de deux cascades parallèles : PI3K-Akt et MEK1-ERK1/2. Elle est considérée comme une cascade de signalisation universelle, partagée par la plupart des thérapies cardioprotectrices<sup>308</sup>.

Avant cela, la sérine/thréonine kinase Akt a été décrite comme une protéine oncogène et des études approfondies ont révélé que l'activité d'Akt est augmentée dans de nombreux types tumorales, contribuant à diminuer la mort des cellules par apoptose et à favoriser la croissance tumorale<sup>309,310</sup>. Au niveau du myocarde, Akt participe à la régulation du métabolisme cellulaire, en parallèle de ses effets sur la survie, la prolifération et la croissance cellulaire<sup>311</sup>. Nos cellules contiennent trois gènes qui codent pour trois isoformes d'Akt, appelés Akt1 (PKB $\alpha$ ), Akt2 (PKB $\beta$ ) et Akt3 (PKB $\gamma$ ). Tous ces isoformes sont exprimés dans le cœur, mais Akt1 et Akt2 sont les plus abondants dans le myocarde<sup>312</sup>.

De manière conventionnelle, Akt est principalement régulée en amont par la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) en réponse à la stimulation des récepteurs tyrosine kinases et des récepteurs couplés aux protéines G dans le cœur. Une fois activée la PI3K phosphoryle les lipides membranaires PIP2 (Phosphatidyl-inositol-diphosphate) en PIP3 (Phosphatidyl-inositol-triphosphate) provoquant le recrutement de PDK-1 (Phosphatidyl-inositol-dependent-kinase 1) à la membrane. Une fois activée, la kinase PDK-1 phosphoryle Akt sur sa thréonine 308. Pour être complètement active, Akt doit également être

phosphorylée sur sa sérine 473 par mTORC2 (mammalian Target Of Rapamycin 2)<sup>313,314</sup> (**Figure 19**). Au niveau du cytosol, Akt phosphoryle des cibles d'aval telles que mTOR, GSK-3 $\beta$  et FOXO impliquées dans la transcription, la dégradation des protéines et le métabolisme cellulaire<sup>312,315,316</sup> (**Figure 19**). Cependant, une fois activée, Akt n'est pas seulement active dans le cytosol des cardiomyocytes. En effet, sa relocalisation vers les mitochondries garantit le respect de leur intégrité, élément clef de la protection et la survie cellulaire<sup>317</sup>.



**Figure 20 : Voie principale d'activation d'Akt par les récepteurs membranaires**

(Hennessy et al., *Nat Rev Drug Discov*, 2005)<sup>318</sup>

La fixation des facteurs de croissance entraîne l'autophosphorylation des récepteurs. La PI3K est alors activée et phosphoryle les lipides membranaires PIP2 (phosphatidyl-inositol-diphosphate) en PIP3 (phosphatidyl-inositol-triphosphate) permettant le recrutement de PDK1 à la membrane. La phosphatase lipidique PTEN catalyse la réaction inverse. Une fois activée, la kinase PDK1 phosphoryle Akt sur sa thréonine 308. Pour être complètement active, Akt doit également être phosphorylée sur sa sérine 473 par mTOR. PP2A et PHLPP sont les phosphatases responsables de la déphosphorylation et l'inactivation d'Akt. Akt phosphoryle de nombreuses cibles impliquées dans l'arrêt du cycle et la réparation de l'ADN, la mort cellulaire, le cycle cellulaire, le métabolisme, la croissance cellulaire et la traduction.

En terme de cardioprotection, il a été montré que la voie des RISK suit un schéma d'activation biphasique dont la première phase se déroule au cours d'une manœuvre d'IPC. Akt est activée dès les cycles de préconditionnement précédant la phase de reperfusion<sup>319</sup>.

L'IPC conduit à la réduction de la taille de l'infarctus dépendante de PDK-1, conduisant vraisemblablement à une activation en aval d'Akt<sup>320</sup>.

Plus récemment, il a été démontré que les kinases PI3K/Akt étaient également impliquées dans l'effet protecteur de l'APc aussi bien sur modèle animal que chez l'homme<sup>321,322</sup>.

De plus, Akt est capable de réguler l'expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. En situation d'APc par l'isoflurane, l'activation d'Akt induit une augmentation de l'expression de Bcl-2 par phosphorylation inhibitrice de Bad parallèlement à une diminution de l'expression de Bax<sup>323</sup>.

Au total, de nombreuses preuves convergent vers le fait qu'Akt exerce un contrôle transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel des protéines de la famille Bcl-2 qui en réponse assurent la préservation de l'intégrité mitochondriale contre des stress à court et à long terme tel que l'IR<sup>304</sup>.

#### c. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs majeurs de l'apoptose cellulaire. En raison de leur activité anti-apoptotique, le rôle de la famille Bcl-2 dans la cardioprotection induite par l'APc a été largement étudié<sup>324</sup>. Les membres de la famille Bcl-2 régulent l'intégrité de la membrane mitochondriale externe et sont modulés par différents mécanismes au niveau transcriptionnel, traductionnel, ou post-traductionnel (clivage, phosphorylation, dégradation, séquestration...) pour déclencher ou empêcher le signal apoptotique. Lazou et al. ont rapporté que la modulation de l'expression de Bcl-xL, connue pour son effet anti-apoptotique en inhibant l'activation Bax-Bak par séquestration, serait impliquée dans l'effet cardioprotecteur de l'IPC<sup>325</sup>. Il a également été démontré que l'IPC (qui active Akt) prévient la diminution du niveau d'expression de Bcl-2 induite par l'IR<sup>326</sup>.

Raphael et al.<sup>323</sup> et Lu et al.<sup>327</sup> ont montré que l'APc produisait un effet anti-apoptotique vis-à-vis des lésions d'IR en induisant une augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 respectivement par l'intermédiaire de la voie PI3K/Akt et la voie NFκB. De plus, ce mécanisme est en cohérence avec les résultats expérimentaux rapportés par Wang et al. dans une étude sur l'APc avec le SEV dans laquelle l'augmentation de l'expression de Bcl-2 protège le myocarde et est corrélée à une diminution de l'activation de la caspase-3 et donc de l'apoptose<sup>328</sup>.

#### d. Protection mitochondriale par les ROS mitochondriaux

Les espèces réactives de l'oxygène sont libérées massivement au niveau intracellulaire en cas de stress oxydatif induit par l'IR. Cette surproduction de ROS va toucher de nombreuses cibles intracellulaires indispensables à l'homéostasie cellulaire (protéines, lipides, acides nucléiques...) faisant ainsi évoluer défavorablement les cardiomyocytes vers l'apoptose, causant de lourdes séquelles tissulaires, conduisant au développement de la plupart des maladies cardio-vasculaires<sup>329,330</sup>.

En revanche, de manière intéressante, de faibles quantités de ROS libérées par les mitochondries pourraient induire un effet « préconditionnant » et contribuer à la cardioprotection<sup>305</sup>. Kevin et al. montre qu'un protocole classique d'IPC pratiqué sur des cœurs isolés de cochon d'Inde, induit une augmentation mineure à modérée de la formation de ROS durant la succession de cycles courts d'IR précédant la phase plus longue d'ischémie<sup>331</sup>. La cardioprotection qui en découle semble se traduire par une réduction ultérieure de la libération de ROS pendant la reperfusion<sup>332</sup>. Le caractère ROS-dépendant de la cardioprotection induite par l'IPC a été confirmé par approche pharmacologique inhibitrice en utilisant des agents neutralisateurs de ROS ou ROS scavenger (empêchant la production des « ROS préconditionnant »)<sup>333</sup>.

Forts de leur résultat obtenu en situation d'IPC, Kevin et al. sont parvenus à reproduire sur le même modèle animal leurs résultats au cours de l'APC<sup>94</sup>. Ils ont montré que le SEV induit une production faible et transitoire de ROS, dont l'abolition par l'utilisation de ROS scavenger (MnTBAP : Manganese Tetrakis 4-Benzoic Acid Porphyrin) inhibe l'effet protecteur de l'APC **(Figure 20)**.

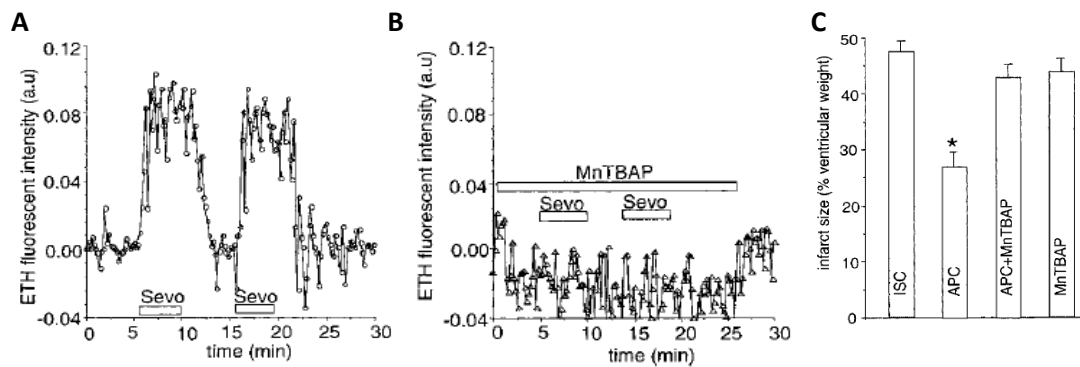


Figure 21 : Implication des ROS dans le mécanisme de l'APC

(Kevin et al., *Anesth Analg*, 2003<sup>94</sup>)

Mesure de la quantité de ROS par fluorescence (sonde de dihydroéthidium ETH) en présence de sévoflurane seul (A) ou avec un ROS scavenger (MnTBAP) (B). Mesure de la taille de l'infarctus du myocarde (C). ISC, ischémie ; APC ; MnTBAP, ROS scavenger.

De plus, il a été démontré que l'ISO avait la capacité de moduler cette production de ROS dans des cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches embryonnaires<sup>334</sup>. De manière intéressante, ce mécanisme a également été montré sur du tissu myocardique humain puisque l'exposition au SEV (2 %) ou au DES (7 %) préalable à une période d'hypoxie de 30 minutes améliore la récupération de la contractilité myocardique auriculaire. L'abolition pharmacologique de l'effet protecteur par l'application d'un ROS scavenger (MPG : N-[2-mercaptopropionyl]-glycine) confirme le rôle déterminant des ROS dans la cardioprotection induite par l'APC<sup>95</sup>.

Cette production de faible quantité de ROS induite par les agents anesthésiques volatils semblent donc être l'élément déclencheur d'une cascade de signalisation intracellulaire visant à protéger le myocarde des lésions myocardiques induites par l'IR<sup>335</sup>.

Parmi les cibles potentielles impliquées dans cette cascade de signalisation, les canaux potassiques mitochondriaux ATP-sensibles (canaux mitoK<sub>ATP</sub>) ont été rapportés comme des effecteurs potentiels de l'IPc et de l'APc. Les canaux mitoK<sub>ATP</sub> sont présents dans la membrane interne de la mitochondrie et participent à l'homéostasie mitochondriale, notamment dans la régulation du calcium matriciel et le potentiel mitochondrial pour préserver la fonction mitochondriale. Toller et al. ont montré une implication des canaux mitoK<sub>ATP</sub> dans l'APc où l'utilisation d'inhibiteurs des canaux mitoK<sub>ATP</sub> (5-HD) aboli partiellement l'effet protecteur du

DES chez le chien après une occlusion de l'IVA<sup>336</sup>. Tanaka et al. ont confirmé le rôle des canaux mitoK<sub>ATP</sub> dans l'APc par l'ISO et que leur activation était ROS-dépendante<sup>337</sup>.

De manière plus indirecte, on peut également citer la protéine kinase Akt. En effet, que ce soit dans le cadre de l'IPc ou de l'APc<sup>338,339</sup>, il a été montré que les ROS sont capables d'activer la protéine kinase C (PKC), située en amont dans la cascade activatrice d'Akt<sup>340</sup>. Ainsi, PKC induit dans un premier temps la phosphorylation activatrice de PDK-1 qui à son tour phosphoryle Akt<sup>341</sup>. Par ailleurs, il a été également décrit que les ROS ont la capacité d'activer directement Akt<sup>342,343</sup>.

De leur côté, Hirata et al. se sont penchés sur l'origine potentielle de ce « pool » protecteur de ROS. Ainsi, ils ont étudié l'effet de l'ISO sur des mitochondries isolées de rat et ont montré que l'ISO est capable de moduler la production de ROS par la mitochondrie en diminuant l'activité du complexe I de l'ECT. Cette diminution de l'activité du complexe I induit une production modérée de ROS. En conséquence, l'inhibition du flux inverse d'électrons du complexe III vers le complexe I est responsable d'une diminution de la production de ROS lors de la reperfusion<sup>96</sup>. Les AVH sont connus pour inhiber le complexe I de l'ECT<sup>93</sup>. De plus, en provoquant une dissipation partielle du potentiel de la membrane mitochondriale l'ISO induit un meilleur rendement de la chaîne respiratoire mitochondriale, une diminution de l'absorption mitochondriale de Ca<sup>2+</sup> ainsi qu'une production atténuée de ROS<sup>344</sup>.

En dehors des AVH, d'autres agents pharmacologiques tels que la roténone et surtout la metformine sont capables d'inhiber le complexe I de l'ECT afin d'en tirer de potentielles propriétés cardioprotectrices.

## 5) Metformine et préconditionnement pharmacologique

### a. Rationnel cardioprotecteur

La metformine (MET) est le traitement pharmacologique de première ligne du diabète de type 2 et le médicament le plus couramment prescrit dans le monde pour cette maladie (chez plus de 120 millions de patients), soit seul, soit en combinaison avec l'insuline ou d'autres thérapies hypoglycémiantes. La metformine est un biguanide (1,1-dimethylbiguanide), une classe de médicaments d'origine végétale (lilas français, *Galega officinalis*), qui est largement utilisée pour traiter le diabète depuis les années 1950 dans le monde<sup>345,346</sup>. Ses effets sont

multiples : elle favorise l'action hypoglycémiant de l'insuline par réduction de l'insulinorésistance ; elle augmente l'utilisation et le stockage du glucose dans le muscle sous forme de glycogène; elle diminue l'absorption intestinale de glucose, la production intestinale de glucose et la glycogénolyse hépatique<sup>347</sup>. A la suite de son retrait du marché américain en raison des préoccupations liées à l'acidose lactique, la MET a été finalement réintroduite en 1995. En effet, contrairement aux autres biguanides (phenformine), son utilisation s'est révélée plus sûre et efficace pour contrôler les niveaux de glucose, avec des effets secondaires très limités<sup>348</sup>.

Par ailleurs, deux grands essais cliniques menés sur des patients atteints de diabète de type 2 ont montré que la MET permet une amélioration de la fonction cardio-vasculaire ainsi qu'une réduction du taux de la morbi-mortalité d'origine cardio-vasculaire avec une meilleure tolérance vis-à-vis des effets indésirables<sup>349,350</sup>. Il est important de noter que l'essai de l'UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) a démontré que la MET réduit de 42 % les décès liés au diabète (intervalle de confiance de 95 %, 9-63 % ; P=0,017) et de 36 % la mortalité toutes causes confondues (intervalle de confiance de 95 %, 9-55 % ; P=0,011). De manière intéressante dans cette étude, la MET a été utilisée comme prévention primaire et son effet bénéfique a été rapidement observé après une durée médiane de traitement de 10,7 ans. Ces résultats ont été confirmés plus tardivement dans d'autres études cliniques ou épidémiologiques<sup>351,352</sup>. Ainsi, l'utilisation de la MET comme traitement antidiabétique de première ligne chez les patients atteints de DT2 est non seulement justifiée par son effet anti-hyperglycémique, mais aussi par la réduction du taux de mortalité dans cette population.

Les mécanismes d'un tel effet bénéfique ne sont pas encore totalement compris. Cependant, en raison de ses effets pléiotropes, la MET présenterait des propriétés cardioprotectrices indépendantes de ses effets sur le métabolisme du glucose<sup>353</sup>. L'effet cardioprotecteur de la MET serait notamment lié à la promotion du préconditionnement myocardique, la réduction de l'apoptose des cardiomyocytes induite par l'IR, l'adaptation du métabolisme des cardiomyocytes pendant l'IR ou encore à la prévention du développement de l'insuffisance cardiaque.

## b. Stratégies cardioprotectrices de conditionnement

### • *Données expérimentales*

L'administration de MET, soit avant l'ischémie (MPc : préconditionnement) ou au moment de la reperfusion coronaire (postconditionnement), réduit profondément la taille de l'infarctus dans les modèles murins du myocarde infarctus. Déjà en 1988, Charlon et al. ont montré que l'administration orale de MET pourrait réduire la taille de l'infarctus chez le rat<sup>354</sup>. Solskov et al. ont également montré sur un modèle de cœur-isolé perfusé de rat que l'administration d'une dose unique de metformine 24 heures avant l'occlusion transitoire d'une artère coronaire était responsable d'une réduction significative de la taille de l'infarctus<sup>355</sup>. Dans des études ultérieures sur des cœurs de rat isolés-perfusés, la perfusion coronaire de MET pendant les 15 premières minutes de la phase reperfusion réduit la taille de l'infarctus d'environ 40-50 % et limite la séquelle fonctionnelle ischémique de ventricule gauche<sup>356,357</sup>. Cela a également été confirmé par d'autres études in vivo sur des rats et des souris<sup>358,90</sup>. Il est également intéressant de noter que l'effet cardioprotecteur de la metformine vis-à-vis des lésions d'IR a été démontré à la fois sur des modèles murins diabétiques<sup>359</sup> et non diabétiques<sup>90,360,355</sup>.

### • *Données cliniques*

Compte tenu de ses effets cardioprotecteurs théoriques, la metformine a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. De nombreuses études prospectives et rétrospectives ont montré l'efficacité de la metformine pour réduire les événements cardiovasculaires, la mortalité et les taux de réadmission à l'hôpital chez les patients diabétiques souffrant d'insuffisance cardiaque<sup>361,362</sup> et de coronaropathie<sup>363,364</sup>. Chez les patients atteints d'un syndrome métabolique, un traitement par MET (250 mg, 3 fois par jour) débuté 7 jours avant revascularisation coronarienne permet de réduire significativement, à court terme, (50%) la libération des biomarqueurs de souffrance cardiaque au décours de l'intervention et de réduire la survenue d'évènements cardio-vasculaires majeurs à un an<sup>365</sup>. En revanche, les patients non diabétiques traités par MET ne semble pas en tirer autant de bénéfices que les patients diabétiques<sup>366,367</sup> suggérant l'efficacité de la MET en traitement chronique par rapport à une administration unique (avant le début d'une étude par exemple)<sup>368</sup>.



### c. Mécanismes potentiellement impliqués

La MET est principalement impliquée dans l'inhibition de la gluconéogenèse hépatique et agit par une grande variété de mécanismes qui peuvent être soit AMPK-dépendants ou AMPK-indépendants<sup>369</sup>. Il a été établi dans ce dernier cas (mécanisme AMPK-indépendant) que le MET peut agir comme un inhibiteur du complexe I de l'ECT mitochondriale<sup>369</sup>.

- *PI3K/Akt*

Il a été démontré que l'administration de MET lors de la reperfusion entraîne l'activation de plusieurs kinases de la voie RISK, dont la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) et Akt, qui peuvent à leur tour empêcher l'ouverture du mPTP. Dans un modèle isolé de coeur de rat, Bhamra et al. rapporte que l'administration de MET pendant les 15 premières minutes de la reperfusion réduit la taille de l'infarctus chez des rats Wistar non diabétiques et des rats Goto-Kakizaki diabétiques de type 2<sup>356</sup>. La MET induit une augmentation significative de la phosphorylation d' Akt au décours de la phase de reperfusion. L'administration concomitante de LY294002, un inhibiteur de PI3K, empêchant la phosphorylation d'Akt abolit l'effet protecteur sur le tissu myocardique. De plus, au sein des cardiomyocytes de rats isolés, l'exposition à la MET empêche également l'ouverture du mPTP par activation de la voie PI3K/Akt<sup>356</sup>.

Ainsi, les auteurs ont conclu que l'effet protecteur de la MET contre les lésions myocardiques d'IR est dépendant de la PI3K, et que l'effet de la MET sur la phosphorylation d'Akt est similaire chez les rats non diabétiques et diabétiques.

- *AMPK (AMP-activated protein Kinase)*

Outre la voie des RISK, l'effet cardioprotecteur de la metformine pourrait également dépendre de l'activation de l'AMPK. L'AMPK figure comme le senseur central du métabolisme énergétique cellulaire permettant une régulation fine des besoins et disponibilités en énergie intracellulaire<sup>370</sup>. Le stress environnemental, notamment l'exercice, le jeûne, l'inflammation et l'hypoxie, augmente son activité intracellulaire. Chez les mammifères, les cellules doivent maintenir une balance énergétique positive et stable, caractérisée par un rapport ATP/ADP élevé (10/1). En cas de perturbation de la balance énergétique par un stress (déprivation en

glucose, hypoxie, ischémie), la concentration en ATP chute, le rapport ATP/AMP augmente par l'intermédiaire de l'adénylate kinase et ainsi l'AMPK est active (sous sa forme phosphorylée)<sup>371</sup>.

Calvert et al. ont montré que l'effet protecteur de la MET est dépendant de l'AMPK<sup>90</sup>. Immédiatement après le début de l'ischémie myocardique (occlusion de l'artère coronaire), l'AMPK est phosphorylée et reste active pendant plus de 24 heures après la reperfusion dans un modèle murin. La phosphorylation de l'AMPK augmente dans les cœurs préconditionnés par la MET avant l'ischémie et après la phase de reperfusion. De plus aucune protection induite par la MET n'est observée dans les souris transgéniques inhibées pour l'AMPK (sous-unité active  $\alpha 2$ ), démontrant dans ce modèle, que l'activation de l'AMPK est essentielle pour la protection induite par la MET.

- *Cibles mitochondriales*

Outre son rôle dans le maintien de l'homéostasie du glucose, la MET participerait également à la régulation de fonctions mitochondriales telles que la production de ROS et la modulation de la mort cellulaire par apoptose<sup>372,373</sup>. La plupart de ces effets ont été attribués à l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale pour deux raisons principales. Premièrement, au cours des 20 dernières années, plusieurs équipes ont observé de manière reproductible que la metformine inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale<sup>374</sup>. Deuxièmement, ces effets pléiotropes ont été reproduits par des inhibiteurs du Complexe I bien identifiés (ex : roténone) [néoglucogenèse hépatique<sup>375</sup>, mort cellulaire<sup>376,377</sup>].

Les effets cytoprotecteurs de la MET ont été associés à la phosphorylation activatrice d' Akt et à l'inhibition consécutive de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale<sup>356</sup>. D'autres travaux ont également évalué l'effet anti-apoptotique de la MET sur le myocarde vis-à-vis des lésions induites par l'IR<sup>378</sup>. Enfin, une étude récente montre que le post-conditionnement par la MET protège les cellules de cardiomyoblastes de rats (lignée H9c2) des lésions induites par l'IR en modulant l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille telles que Bcl-xL et Bcl-2<sup>379</sup>.

## Résumé Partie VI

- Le préconditionnement permet de préparer le myocarde à résister à une IR en l'exposant préalablement à ce même stress, mais de moindre intensité.
- Le préconditionnement est dit ischémique (IPc) lorsque la manœuvre de protection réalisée précédant l'IR consiste en une succession de phases d'IR courtes et de faible intensité. Cette séquence induit l'activation de voie de signalisation favorisant la survie des cardiomyocytes.
- Le préconditionnement est dit pharmacologique (PPc) lorsque la manœuvre de protection myocardique précédant l'IR consiste en une exposition du myocarde à un agent pharmacologique particulier tel que les AH (APc) ou la MET (MPc).
- IPc et PPc partagent des voies de signalisation communes impliquées dans leur effet cardioprotecteur vis-à-vis de l'IR.
- De manière superposable à l'IPc, deux phases de protection ont été identifiées au sein de l'APc : la phase précoce et la phase tardive.
- Malgré la preuve de son efficacité chez l'animal et chez l'homme, l'effet cardioprotecteur de l'APc en pratique clinique reste controversé, toute chirurgie confondue.
- Parmi les différents mécanismes protecteurs induit par l'APc, l'induction par les AVH de faibles niveaux de ROS « préconditionnants » en lien avec l'activation de la protéine kinase Akt serait capable de moduler l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2
- Les AVH sont probablement capables d'induire plusieurs voies de signalisation et plusieurs effecteurs convergeant in fine vers la protection mitochondriale, dont l'effet global soit cardioprotecteur de manière synergique.
- La MET semble partager un mécanisme d'action commun avec les AVH : l'inhibition partielle du complexe I de l'ECT, en faisant un agent prometteur de cardioprotection.

## RESULTATS

---

## ARTICLE 1


---

## Le préconditionnement pharmacologique protège de l'apoptose induite par l'ischémie-reperfusion en modulant l'expression de Bcl-xL selon un mécanisme ROS-dépendant

---

Les lésions d'ischémie-reperfusion myocardique (IR) représentent une menace périopératoire permanente, et de nombreuses stratégies ont été mises au point pour les limiter et/ou les prévenir. Parmi les axes de recherche s'intéressant à la protection myocardique, l'hypothèse du préconditionnement anesthésique (APc) par les agents halogénés (tel que le sévoflurane, SEV) reste pertinente. Cependant, le mode d'action de l'APc est encore mal compris et l'utilisation des anesthésiques halogénés comme agents de préconditionnement demeure strictement limitée au bloc opératoire. Au cours de mon travail de thèse, nous avons identifié *in vitro* sur des cardiomyoblastes de rats lignées H9C2 (non différenciés et différenciés en cardiomyocytes) que l'APc induit par le SEV est médié par une induction mineure d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) capable de promouvoir la phosphorylation activatrice de la protéine kinase Akt conduisant à l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL, protégeant ainsi les cardiomyocytes de la mort induite par l'IR. Nous avons étendu ces résultats aux cardiomyocytes humains (dérivés de cellules souches pluripotentes induites, IPS). Il est important de noter que nous avons également démontré que cette voie de signalisation protectrice induite par le SEV pouvait être stimulée par l'agent antidiabétique Metformine (MET), soulignant les propriétés cardioprotectrices et préconditionnantes de cette molécule. Au total, notre étude a identifié une voie de signalisation contribuant à l'effet cardio-protecteur de l'APc ainsi qu'une justification pour l'utilisation de la MET comme agent de préconditionnement pharmacologique pour prévenir les lésions myocardiques d'IR.

# Pharmacological preconditioning protects from ischemia/reperfusion-induced apoptosis by modulating Bcl-xL expression through a ROS-dependent mechanism

Romain Rozier<sup>1,2</sup>, Rachel Paul<sup>1,2</sup>, Blandine Madji Hounoum<sup>1,2</sup>, Elodie Villa<sup>1,2</sup>, Rana Mhaidly<sup>1,2</sup>, Johanna Chiche<sup>1,2</sup>, Els Verhoeven<sup>1,2</sup>, Sandrine Marchetti<sup>1,2</sup>, Ashaina Vandenberghe<sup>1,2</sup>, Marc Raucoules<sup>3</sup>, Michel Carles<sup>1,2,3,4</sup> and Jean-Ehrland Ricci<sup>1,2</sup> 

1 INSERM, C3M, Université Côte d'Azur, Nice, France

2 Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer Nice, France

3 Anesthésie Réanimation, Centre Hospitalier Universitaire, Nice, France

4 Réanimation, Faculté des Antilles, Centre Hospitalier Universitaire, Guadeloupe, France

## Keywords

Akt; anesthetic preconditioning; Bcl-xL; cell death; IPS; metformin; myocardial ischemic; reperfusion; ROS

## Correspondence

J. -E. Ricci, Inserm U1065, équipe 3, 151 route de St Antoine de Ginestière, BP 23194, 06204 Nice Cedex 03, France  
Tel: +33 4 89 06 43 04  
E-mail: ricci@unice.fr

(Received 6 July 2020, revised 2 December 2020, accepted 16 December 2020)

doi:10.1111/febs.15675

Myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury is a frequent perioperative threat, with numerous strategies developed to limit and/or prevent it. One interesting axis of research is the anesthetic preconditioning (APc) agent's hypothesis (such as sevoflurane, SEV). However, APc's mode of action is still poorly understood and volatile anesthetics used as preconditioning agents are often not well suited in clinical practice. Here, *in vitro* using H9C2 cells lines (in myeloblast state or differentiated toward cardiomyocytes) and *in vivo* in mice, we identified that SEV-induced APc is mediated by a mild induction of reactive oxygen species (ROS) that activates Akt and induces the expression of the anti-apoptotic protein B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL), therefore protecting cardiomyocytes from I/R-induced death. Furthermore, we extended these results to human cardiomyocytes (derived from induced pluripotent stem - IPS - cells). Importantly, we demonstrated that this protective signaling pathway induced by SEV could be stimulated using the antidiabetic agent metformin (MET), suggesting the preconditioning properties of MET. Altogether, our study identified a signaling pathway allowing APc of cardiac injuries as well as a rationale for the use of MET as a pharmacological preconditioning agent to prevent I/R injuries.

## Introduction

Myocardial ischemia/reperfusion injury (I/R) contributes to patient condition's worsening in a wide range of clinical settings. Ischemic heart disease is of primary concern, particularly resulting in increased perioperative morbidity and mortality [1]. According to VISION study, almost 10% of patients over 45 have suffered a myocardial injury, and of these, one in

10 died within 30 days [2]. In scheduled surgery of all specialties, myocardial I/R is the leading cause of morbidity and mortality [3]. It is characterized by the functional and structural changes occurring when ischemia in the myocardial tissue is followed by restoration of perfusion and simultaneous reoxygenation (reperfusion) [4]. This damage can occur in all types of

## Abbreviations

APc, anesthetic preconditioning; Bcl-2, B-cell lymphoma-2; Bcl-xL, B-cell lymphoma-extra large; Bor, bortezomib; I/R, ischemia/reperfusion; IPS, induced pluripotent stem cells; ISO, isoflurane; Mcl-1, myeloid cell leukemia-1; MEF, mouse embryonic fibroblast; MET, metformin; MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization; NAC, N-acetyl cysteine; ROS, reactive oxygen species; SEV, sevoflurane; Smac, second mitochondria-derived activator of caspases.

surgery, both cardiac (on-pump surgery) and noncardiac vascular and hepatic (arterial clamping/declamping) or orthopedic surgeries (inflation/deflation of the pneumatic tourniquet).

In the heart, at the cellular level (cardiomyocyte), the first damaging event upon reperfusion is a burst of reactive oxygen species (ROS) production, mainly arising from mitochondrial complex I of the electron transport chain [5,6]. Hypoxic stress and nutrient starvation during ischemic injury followed by a major mitochondrial oxidative stress in reperfusion injury trigger cardiomyocyte cell death [7]. Different mechanisms of cell death may be induced based on different pathogenesis pathways of I/R injury and may lead to apoptosis, autophagy, necrosis, and necroptosis [8]. The cell response depends mainly on the severity and duration of total tissue injury [9]. If the damage is severe, cell death is essentially proceeding through apoptotic and necrotic pathways [10]. While apoptosis is known to play an important role in the observed cell death, it is still not yet clear whether it is initiated as early as in the ischemic phase or rather accelerated during reperfusion. Indeed, a random but non-negligible percentage of cardiomyocytes die from apoptosis [10]. Apart from its morphological features, apoptosis is characterized by many specific biochemical processes [11] such as permeabilization of the outer membrane of the mitochondria (MOMP) that is orchestrated by the B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) family members composed of anti-apoptotic [mainly Bcl-2, B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL), and myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1)] as well as of pro-apoptotic members (mainly Bcl-2-associated X protein, Bcl-2 antagonist killer). It is clear that proteins of the Bcl-2 family play a central role in the regulation of apoptosis in myocardial tissue. Indeed, the overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL in a mouse model protects against I/R-generated lesions [12,13]. Thus, the significance of I/R-induced ROS production and apoptosis in the myocardium and their complex regulation continues to make it a key target for cardioprotective pharmacological interventions. Once permeabilized, several proteins are released from the mitochondrial intermembrane space. Among them, cytochrome c binds to apoptotic peptidase-activating factor 1 and to caspase-9 to form apoptosome leading to the activation of a family of pro-apoptotic proteases, named caspases (cysteine-dependent aspartate-specific proteases) [11]. Caspase is responsible for the cell's dismantling the cleaving numerous substrates. Second mitochondria-derived activator of caspases, (Smac)/DIABLO, an inhibitor of apoptosis protein-binding protein, is also released upon MOMP and quickly degraded by the proteasome

[14]. However, the significance of apoptosis in the myocardium is still unclear but it represents a major objective for cardioprotective pharmacological interventions [15]. The role of ROS in cell death, and more specifically in cardiac tissue injury upon I/R, is highly complex as it mainly depends on the duration and the amount of the ROS produced. While high ROS production induces tissue injury during reperfusion after prolonged ischemia, moderate ROS production can protect, as it can act as secondary messengers of many pro-survival signaling pathways [16].

Preconditioning interventions, either using pharmacological agents such as using volatile anesthetics (sevoflurane, SEV, or isoflurane, ISO) leading to anesthetic preconditioning (APc) or short cycles of nonlethal myocardial ischemia and reperfusion, were developed to reduce infarct size following a prolonged ischemic period [17]. Cellular and molecular mechanisms of I/R, particularly those involved in the production of ROS and cell death, seem to have a potential common origin [18], but the leading mechanisms of myocardial protection are not consensual. Anesthetic agents induce multiple signaling pathways and multiple effectors whose overall effect is synergistically cardioprotective. Most of these mechanisms have been extensively studied experimentally in animal models. The activity of G protein-coupled receptors, ion channel function, intracellular signaling kinases, apoptosis regulation, production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species, gene expression, and mitochondrial physiology has been shown to be involved in the protective effect of APc against myocardial I/R [19]. However, in the current state of knowledge, there is no consensus on any described mechanism other than the crucial role of ROS. Indeed, a small amount of ROS produced either during APc or upon short cycles of nonlethal myocardial ischemia behave as signaling pathway initiators and intracellular effectors responsible for the cardioprotective effects [20,21].

We investigated in the present study the molecular mechanism underlying APc and identified a pharmacological way to induce preconditioning that is compatible with its clinical use.

## Results

### APc protects cells from IR-induced apoptosis through Bcl-xL induction

To uncover the downstream signaling molecules and mechanisms responsible of APc of SEV-mediated cardioprotection, we treated rat myeloblast H9C2 cells [22]



with SEV following the procedure described by Zitta *et al.* [23]. This procedure allows to characterize the effect of SEV on cell signaling and response to stress in cell culture. Cells were then incubated in ischemia (90 min) and reperfusion (60 min) conditions, and cell death was determined (Fig. 1A). Treatment of H9C2 myeloblast with SEV did not induce any significant toxicity, as measured by flow cytometry using noncell-permeant DNA-binding probe (DAPI). Cells exposed to I/R died, and pretreatment with SEV limited the death induced by I/R (Fig. 1B). We observed that I/R-induced death involves caspase activation as demonstrated by DEVDase activity measurements (Fig. 1C) and by caspase-3 cleavage (Fig. 1D) but was not ROS-dependent (Fig. 1E). SEV-induced protection from I/R-mediated apoptosis is associated with a reduction in caspase activation (Fig. 1C,D) and a decrease in MOMP, as judged by Smac expression levels. Indeed, following MOMP, Smac is released from the mitochondrial and quickly degraded by the proteasomal pathway (Fig. 1F) and [14].

As MOMP is tightly regulated by the Bcl-2 family members, H9C2 myeloblasts were incubated in the presence or absence of the BH3-mimetic ABT-737, a Bcl-2, Bcl-xL, and Bcl-w inhibitor [24] in association or not with SEV and I/R. We then determined the ability of cells to form colonies. The clonogenic assay represents the most stringent way to determine whether a cell is really protected from dying and not only delayed in cell death [25]. Figure 2A indicates that I/R-induced cell death limits colony formation and that pretreatment with SEV-protected H9C2 myeloblasts. SEV-induced protection from I/R-induced death was abrogated when cells were grown in the presence of ABT-737. Those results were further supported by measuring cell death using Annexin V/DAPI staining (Fig. 2B) as well as upon measurement of DEVDase activity (Fig. 2C), altogether suggesting that SEV-induced protection from I/R-induced death was mediated by the anti-apoptotic members of the Bcl-2 family. We therefore investigated the level of expression of the main anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family targeted by ABT-737. We observed a rapid increase in Bcl-xL expression within a few minutes after exposure to SEV, while Bcl-2 expression was not modulated over the same kinetic (Fig. 2D,E). This result was confirmed in H9C2-derived cardiomyocytes (Fig. 3A–E). We then established that the use of ABT-737 or of a specific Bcl-xL inhibitor (WEHI-539, [26]) was impairing SEV-induced protection from I/R-induced death (Fig. 2A–C). We observed that SEV-dependent increase in Bcl-xL expression was not mediated by an increase in its mRNA transcription

(Fig. 4A). We then verified that Bcl-xL overexpression in H9C2 myeloblasts (Fig. 4B) efficiently reduced I/R-induced caspase activation (Fig. 4C), further underlining the ability of Bcl-xL to protect cells from I/R-induced death, as already suggested [27].

To determine the physiological relevance of our observation, we exposed wild-type (WT) mice 30 min at 1 MAC (minimal alveolar concentration) of ISO (a closely related analog of SEV that can be used in mice) and then harvested the heart tissue. In agreement with our *in vitro* models, Bcl-xL expression increases in cardiomyocytes of mice exposed to ISO, while expression levels of Bcl-2 and Mcl-1 are unchanged (Fig. 4D,E).

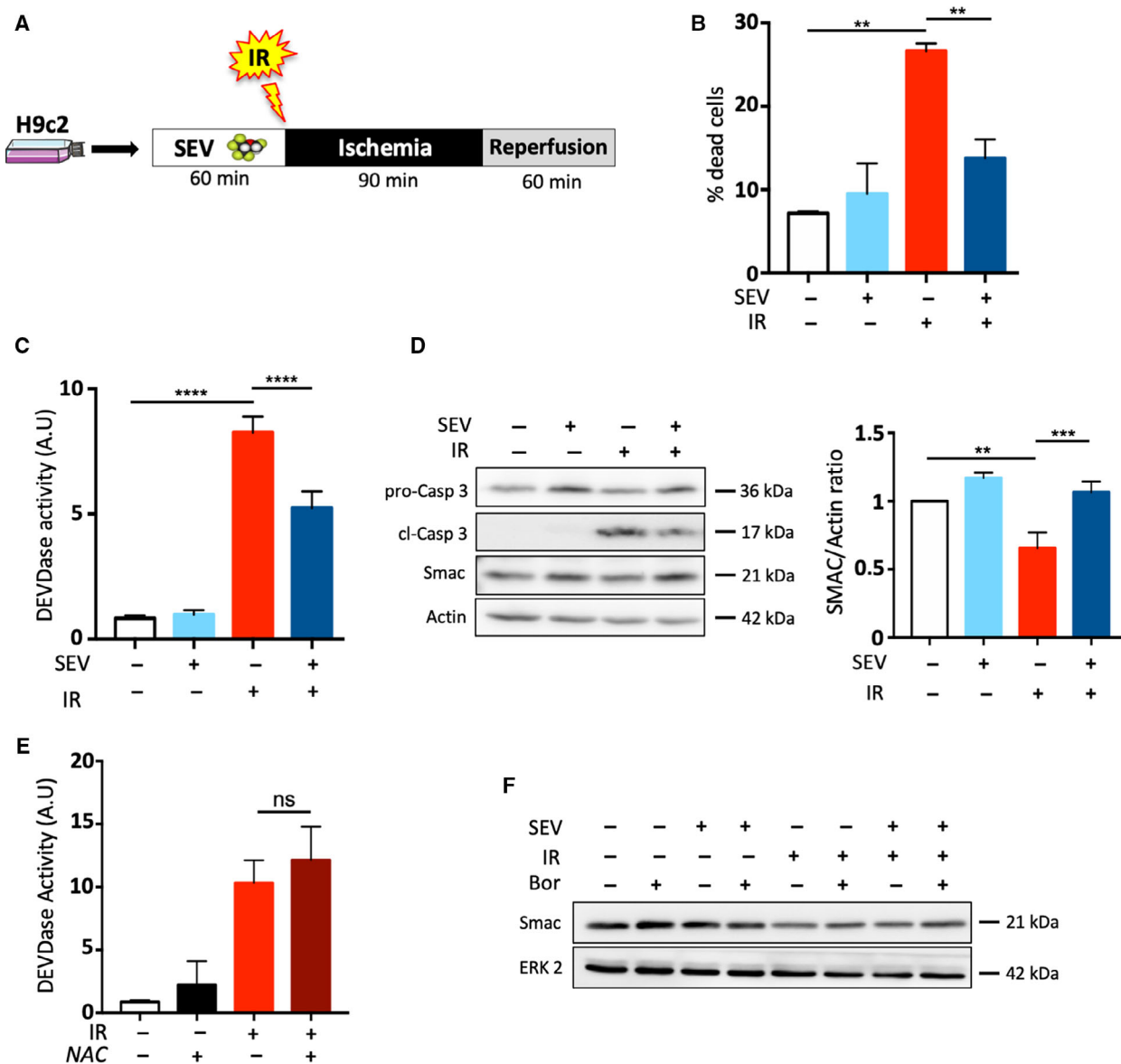
Thus, we concluded that SEV could protect cardiomyocytes from I/R-induced death, at least in part, through an increased protein expression of Bcl-xL.

### SEV-induced expression of Bcl-xL is regulated by an Akt- and ROS-dependent mechanism

The implication of AMPK in APC and more precisely in SEV-induced APC is controversial [28,29]. To address this question, we used AMPK  $\alpha/\beta$  double KO mouse embryonic fibroblasts (MEFs) [30,31]. SEV induces AMPK activation in control MEFs as shown by an increased expression phosphorylation of AMPK and of its main target ACC (Fig. 5A,B). This activation correlates with increased Bcl-xL expression in those cells. However, Bcl-xL expression was increased to a similar extent in AMPK-deficient MEFs, arguing that these kinases are not involved in SEV-induced Bcl-xL upregulation and therefore unlikely to be part of the protective effect of APC.

The Ser/Thr kinase Akt is known to be involved in ischemic preconditioning [32] and in the regulation of Bcl-xL expression [33]. To uncover how SEV could induce Bcl-xL expression, we treated H9C2 myeloblasts with SEV for indicated times and measured Akt activation by immunoblots looking at the appearance of its phosphorylated (active) form over time (Fig. 6A, B). Akt activation was rapid and stable upon SEV exposure. Importantly, SEV-induced Akt activation was also observed in H9C2-differentiated toward cardiomyocytes (Fig. 3D,E) as well as *in vivo* in cardiomyocytes isolated from ISO-treated mice, a result correlating with Bcl-xL induction (Fig. 6C,D).

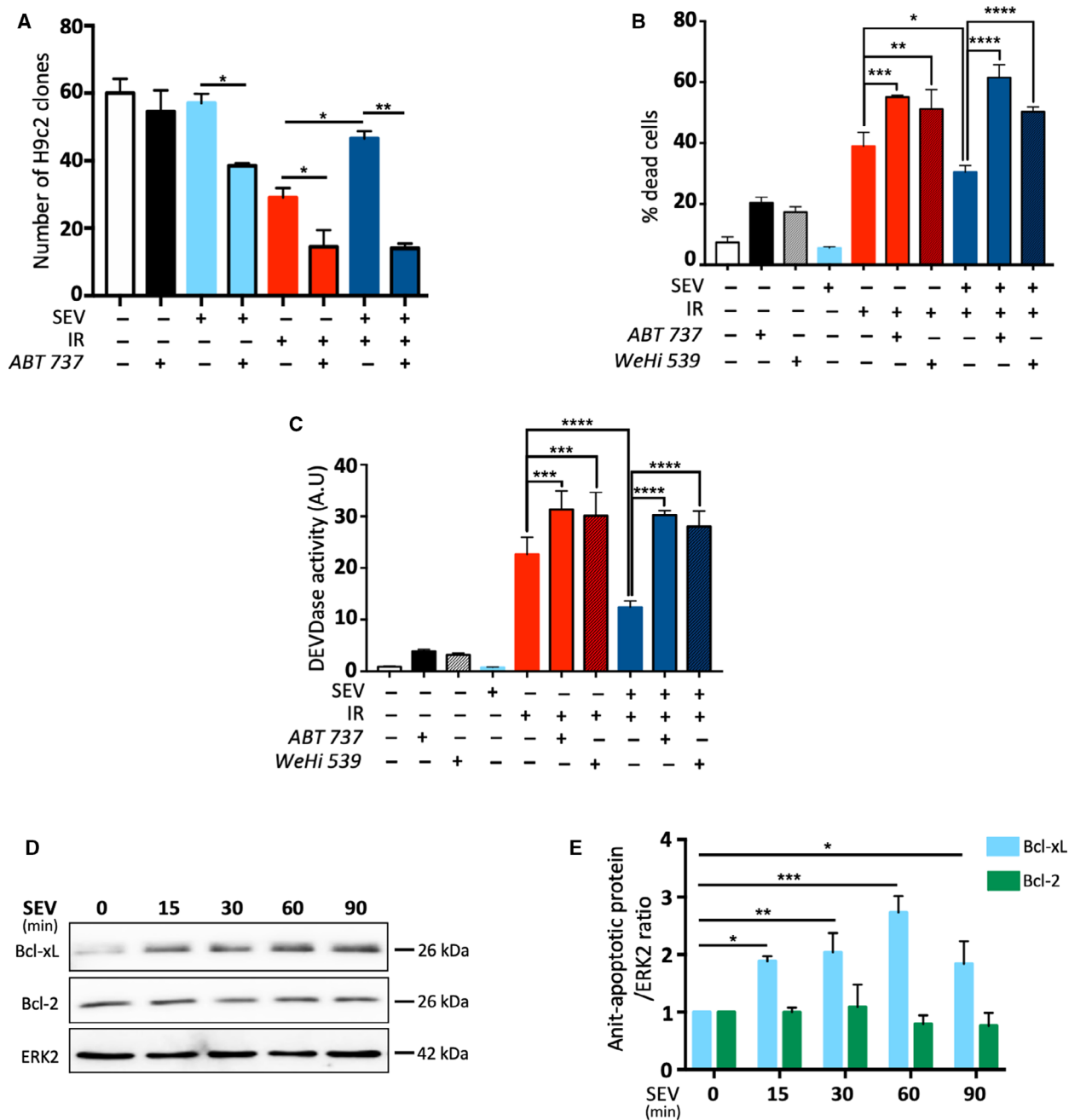
To determine whether Akt activation contributes to SEV-induced Bcl-xL expression and cell protection, we treated H9C2 differentiated toward cardiomyocytes with a specific Akt inhibitor (Akti, [34]) in presence or absence of SEV. Akti very efficiently prevented Akt phosphorylation (activation) as well as SEV-induced



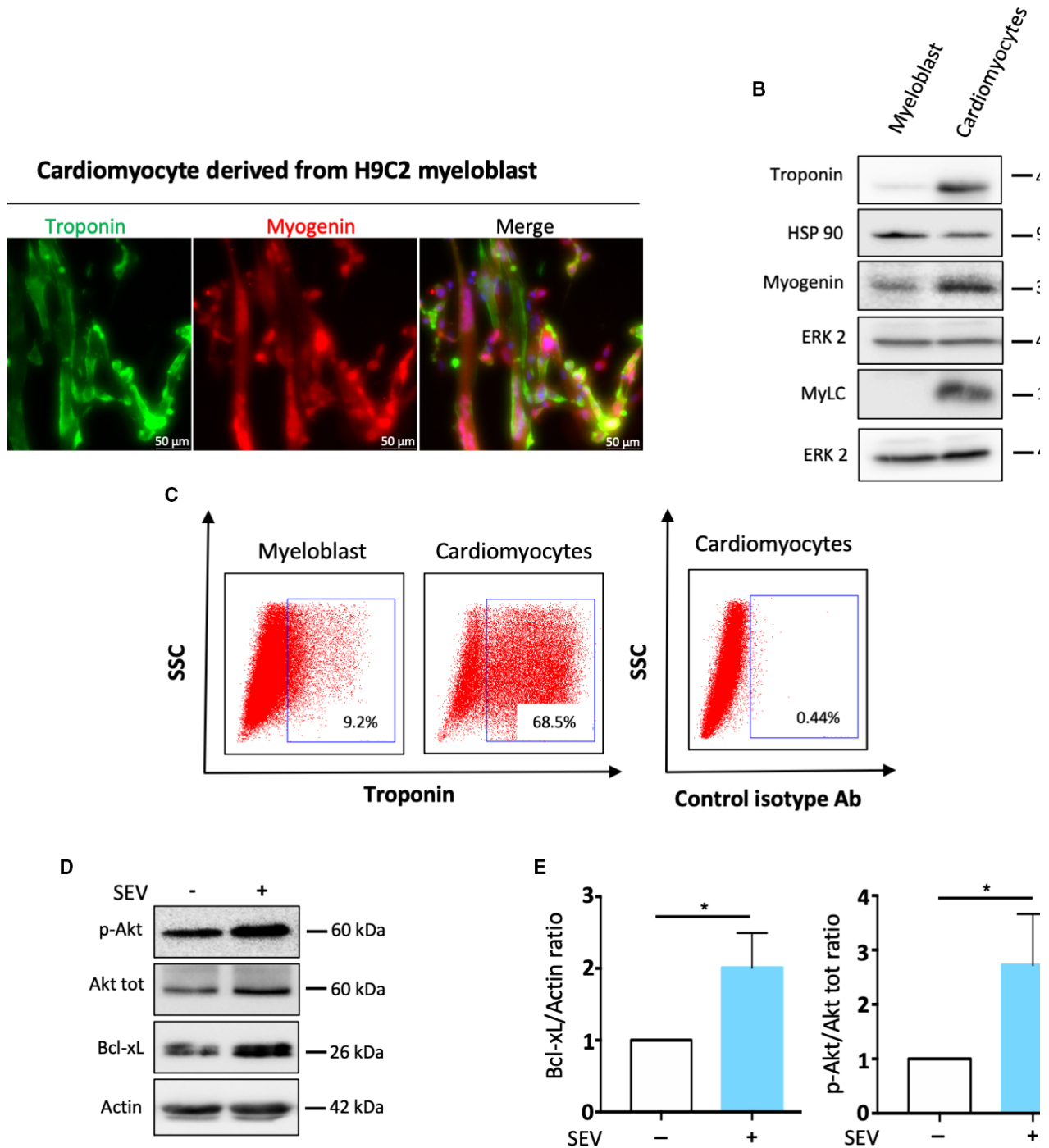
**Fig. 1.** APC protects from IR-induced apoptosis. (A) Schematic representation of APc. H9C2 cells are first treated with SEV at 20  $\mu$ M during 60 min then exposed to ischemia (90 min) and then reperfusion (for 60 min). (B) H9C2 myeloblasts were treated as indicated in panel A and cell death was measured by FACs using DAPI staining. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (C) H9C2 myeloblasts were treated as previously and DEVDase activity was measured. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (D) Western blot analysis of H9C2 myeloblasts treated as in panel A. The zymogene (inactive) pro-caspase 3 as well as the active (cleaved) caspase-3 and Smac expression is visualized by immunoblots. Actin is used as a loading control. Quantification of expression levels of Smac expressed as a ratio to actin protein is presented below. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (E) H9C2 myeloblasts were incubated with NAC (2 mM for 1 h) and incubated or not in I/R condition (as described in panel A). DEVDase activity was then quantified. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (F) H9C2 myeloblasts were treated as panel D. When indicated cells were incubated with Bor (proteasome inhibitor, 2 nM for 24 h). Smac expression was visualized by immunoblots. ERK2 is used as a loading control. Immunoblots are representative of two independent experiments. \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001; \*\*\*\* $P$  < 0.0001 according to a one-way ANOVA.

Bcl-xL expression (Fig. 6E,F). Finally, we established that Akti alone did not induce a significant toxicity in

H9C2 myeloblasts but prevented SEV-induced protection from I/R-induced apoptosis (Fig. 6G).



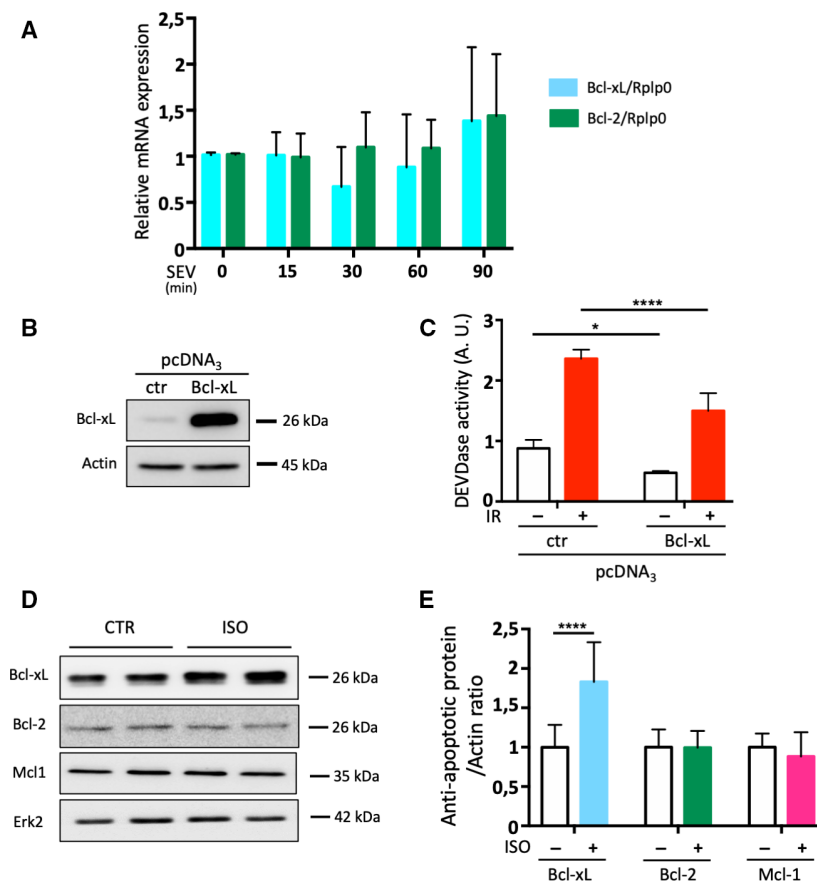
**Fig. 2.** Bcl-xL is involved in APC-protective effect. (A) Quantification of the number of H9C2 myeloblasts having proliferated upon I/R and APc conditions with or without ABT 737 (10  $\mu$ M; 16 h). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. (B) H9C2 myeloblasts were treated in I/R and APc conditions with or without ABT-737 (10  $\mu$ M; 16 h) or WeHi 539 (Bcl-xL inhibitor, 10  $\mu$ M; 16 h). Cell death was measured by flow cytometry using Annexin V/DAPI staining. Data are shown as the mean of death cells  $\pm$  SEM of two independent experiments. (C) as in panel B measuring caspase activity. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. (D) Western blot analysis of the expression of anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xL) after an exposure kinetics of H9C2 myeloblasts to SEV (20 mM). ERK2 is used as a loading control. Immunoblots are representative of four independent experiments. (E) Quantification of expression levels of anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xL) expressed as a ratio to ERK2 protein. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments performed as in panel D. \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001; \*\*\*\* $P$  < 0.0001 according to a one-way ANOVA.



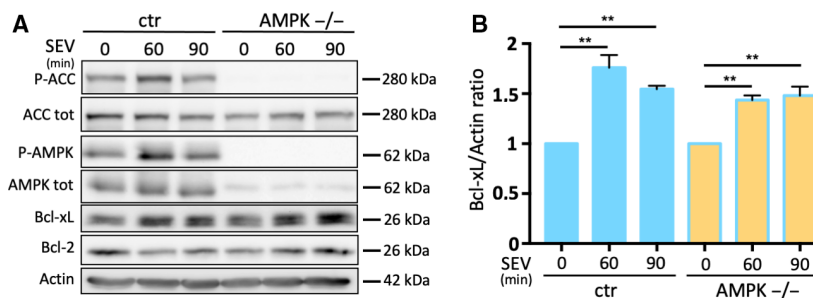
Volatile anesthetic agents (such as SEV or ISO) have properties to inhibit mitochondrial electron transport chain complex I activity (ECT: electron chain transport), the latter being responsible for a moderate production of ROS that are important for the

cardioprotective effect of APC [21]. Interestingly, ROS can lead to Akt activation in several models [35], including cardiomyocytes [36]. We therefore measured ROS production by flow cytometry in H9C2 myeloblasts (Fig. 7A,B) and in H9C2-differentiated toward

**Fig. 3.** SEV-induced Akt activation and Bcl-xL increase are also observed in H9C2-derived cardiomyocytes. (A) H9C2 myeloblasts were differentiated into cardiomyocytes as described in the method section. Five days later, expression of cardiomyocyte-specific proteins (Troponin, Myogenin) was investigated by immunofluorescence (magnification 20 $\times$ ). Pictures are representative of three independent experiments. (B) Expression of cardiomyocyte-specific proteins (Troponin, MyLC, Myogenin) was investigated by immunoblots in H9C2 myeloblasts or H9C2-derived cardiomyocytes. ERK2 or HSP90 was used as loading controls. Immunoblots are representative of three independent experiments. (C) Troponin expression was further measured by FACS in H9C2 myeloblasts or H9C2-derived cardiomyocytes. Right, a control isotype antibody is used in H9C2-derived cardiomyocytes to show the specificity of the troponin staining. Results are representative of two independent experiments. (D) H9C2-derived cardiomyocytes were incubated with SEV (20 mM–60 min), and then, the expression of indicated protein was determined by immunoblots (representative of three independent experiments). (E) Quantification of expression levels of Bcl-xL (as a ratio to actin) and of p-Akt (as a ratio to Akt) presented in panel D. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P < 0.05$ ; according to an unpaired  $t$ -test.



**Fig. 4.** SEV does not modulate the mRNA expression of Bcl-xl and Bcl-xL can prevent I/R-induced death. (A) H9C2 myeloblasts were exposed to SEV for indicated times. Then, mRNA levels of *bcl-xL* and *bcl-2* over *Rplp0* (that is used as a housekeeping gene) were determined. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of five independent experiments. (B) Bcl-xL overexpression in H9C2 myeloblasts is visualized by immunoblot. Actin is used as a loading control. Immunoblots are representative of two independent experiments. (C) H9C2 myeloblasts overexpressing or not Bcl-xL were treated upon I/R condition as described in Fig. 1A and DEVDase activity is then measured. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. (D) WT C57Bl/6 mice ( $n = 2$  in each group) were treated or not with ISO (30-min exposure at 1 MAC), then Bcl-xL, Bcl-2, and Mcl-1 protein expressions were evaluated by immunoblots in cardiomyocytes harvested from those mice. Actin is used as a loading control. (E) Quantification of expression levels of anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) expressed as a ratio to actin protein. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed as in panel F ( $n = 10$  mice per group in total). \* $P < 0.05$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$  according to two-way ANOVA (panel C) or to an unpaired  $t$ -test (panel E).



**Fig. 5.** Bcl-xL overexpression is not AMPK-dependent. (A) Immunoblot analysis of indicated proteins and corresponding quantification of Bcl-xL over actin expression in MEFs (WT) and MEFs (AMPK  $\alpha/\beta$  KO) after SEV exposure. Actin is used as a loading control. Immunoblots are representative of two independent experiments. (B) Quantification of Bcl-xL expression over actin. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of two independent experiments.  $**P < 0.01$  according to a one-way ANOVA.

cardiomyocytes (Fig. 7C). We used the mitochondrial complex I inhibitor rotenone, as a positive control of ROS production in those cells. H9C2 myeloblasts treated with rotenone induce ROS that can be scavenged by N-acetyl cysteine, NAC [37], Fig. 7A. We then showed that SEV-induced Akt activation and subsequent Bcl-xL expression were blunted upon ROS scavenging using NAC (Fig. 7D,E). Finally, we established that NAC could prevent SEV-induced protection from I/R-induced caspase activation (Fig. 7F,G).

To further support our conclusions, we derived human cardiomyocytes from induced pluripotent stem cells (IPS; Fig. 8A–C). We observed that SEV treatment was inducing Akt activation as well as Bcl-xL increased expression (Fig. 8D) in human cardiomyocytes. We then established that SEV was preventing I/R-induced caspase activation and I/R-induced cell death of human cardiomyocyte (Fig. 8E,F).

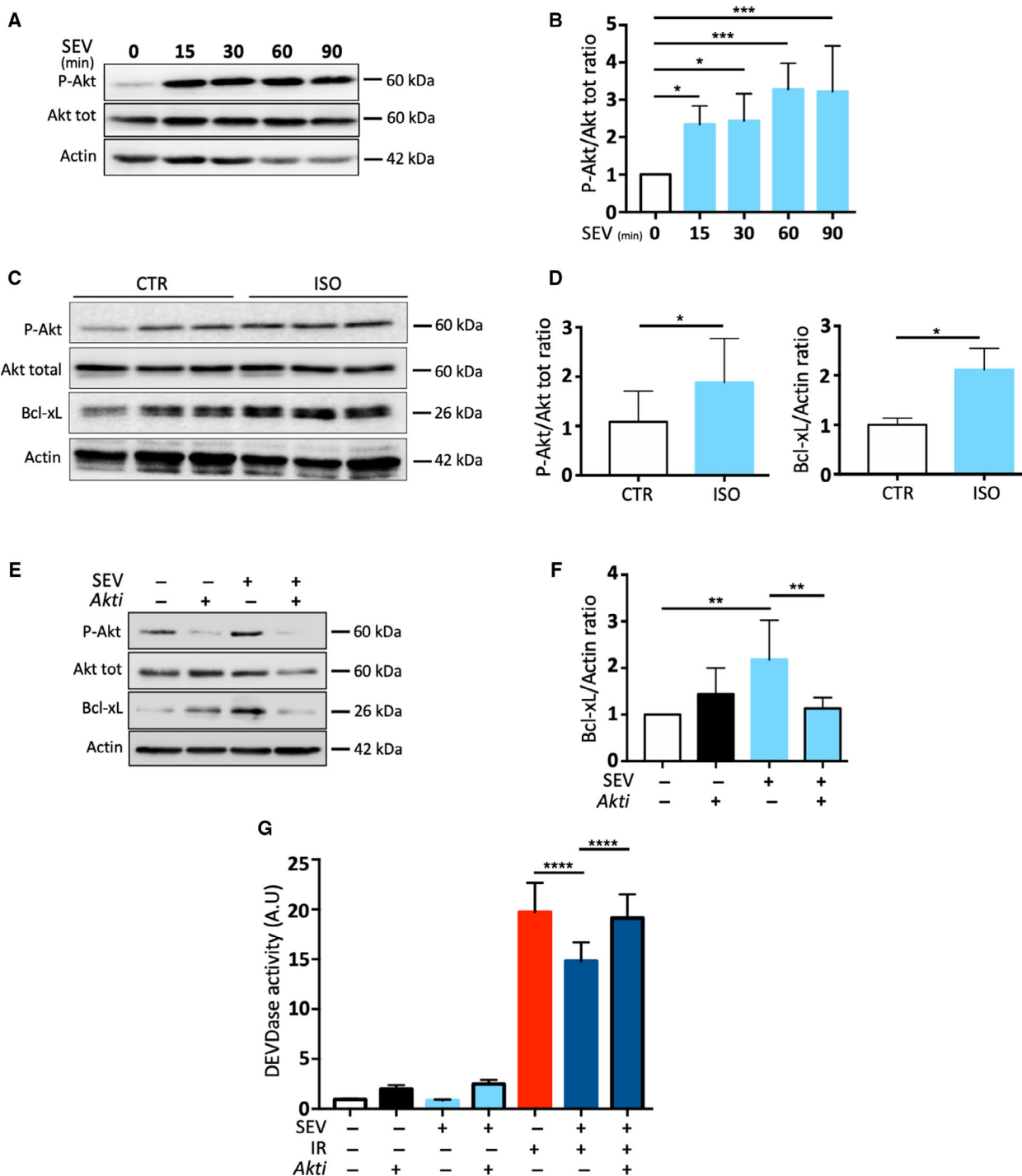
Overall, we concluded that SEV induces a burst of ROS production in cardiomyocytes that activates Akt and increases Bcl-xL expression, altogether

contributing to the protection of those cells from I/R-induced apoptosis.

### Metformin induces Akt activation, Bcl-xL expression, and protection from I/R-induced apoptosis

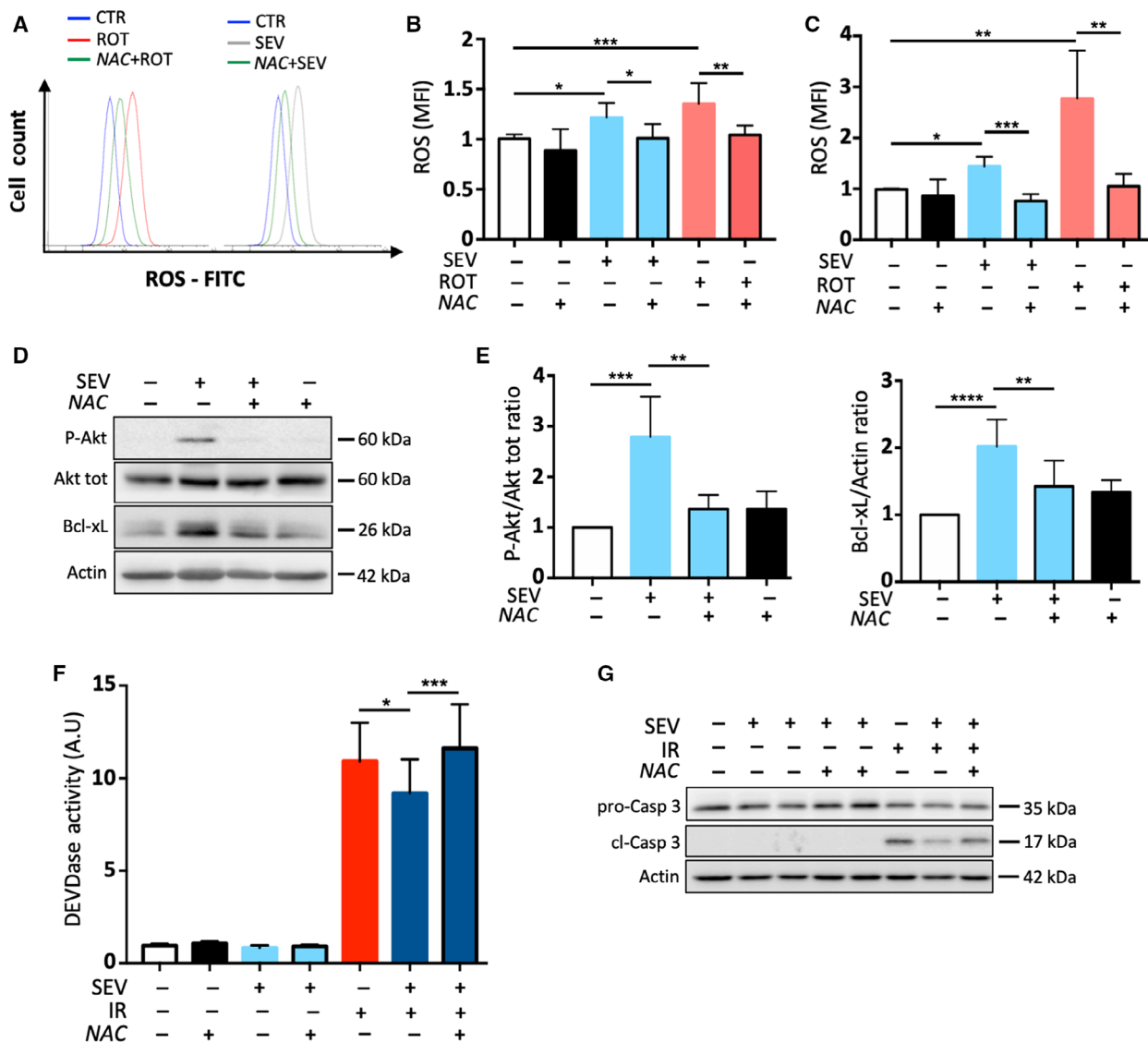
To strengthen our results, we use another pharmacological inhibitor of the mitochondrial complex I, as a positive control of the reported mechanism. Metformin (MET) is used as an antidiabetic agent in more than 120 million patients worldwide with very limited side effects [38]. This antidiabetic drug involves inhibition of hepatic gluconeogenesis and acts through a wide variety of mechanisms that can be either AMPK-dependent or AMPK-independent [39]. It was established latter that MET can act as a mitochondrial complex I inhibitor [39]. We observed that H9C2 myeloblasts treated with MET induced ROS production (that can be scavenged by NAC) to similar extent than upon rotenone treatment (Fig. 9A). Met induces Akt

**Fig. 6.** SEV-induced overexpression of Bcl-xL is Akt-dependent. (A) H9C2 myeloblasts were incubated with 20 mM SEV for indicated times, and Akt activation (P-Akt) and expression (Akt tot) were determined by immunoblots. Actin was used as a loading control. Immunoblots are representative of six independent experiments. (B) Quantification of Akt phosphorylation expression levels expressed as a ratio to total protein. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of six independent experiments performed as in panel A. (C) WT C57Bl6 mice ( $n = 3$  in each group) were treated or not with ISO (30-min exposure at 1 MAC), then Akt activation and total Akt as well as Bcl-xL expression were determined by immunoblots in cardiomyocytes harvested from those mice. Actin is used as a loading control. Immunoblots are representative of three independent experiments. (D) Quantification of Akt phosphorylation expression levels expressed as a ratio to total protein. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed as in panel C (total of  $n = 10$  mice per group). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. (E) Western blot analysis of Bcl-xL expression after inhibition of Akt using Akti (2.5  $\mu$ M for 30 min) on H9C2-differentiated toward cardiomyocytes exposed to SEV (20 mM; 60 min). Actin is used as a loading control. Immunoblots are representative of five independent experiments. (F) Quantification of expression levels of anti-apoptotic protein Bcl-xL expressed as a ratio to actin protein. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of five independent experiments performed as in panel E. If not otherwise specified, variation is not significant. (G) When indicated, H9C2 myeloblasts were pretreated for 30 min with Akti (2.5  $\mu$ M for 30 min) and then treated with SEV for 60 min. I/R was induced for 150 min, and DEVDase activity was then measured. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments.  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ;  $****P < 0.0001$  according to a one-way ANOVA (panels B–F–G) and to unpaired *t*-test (panel D).



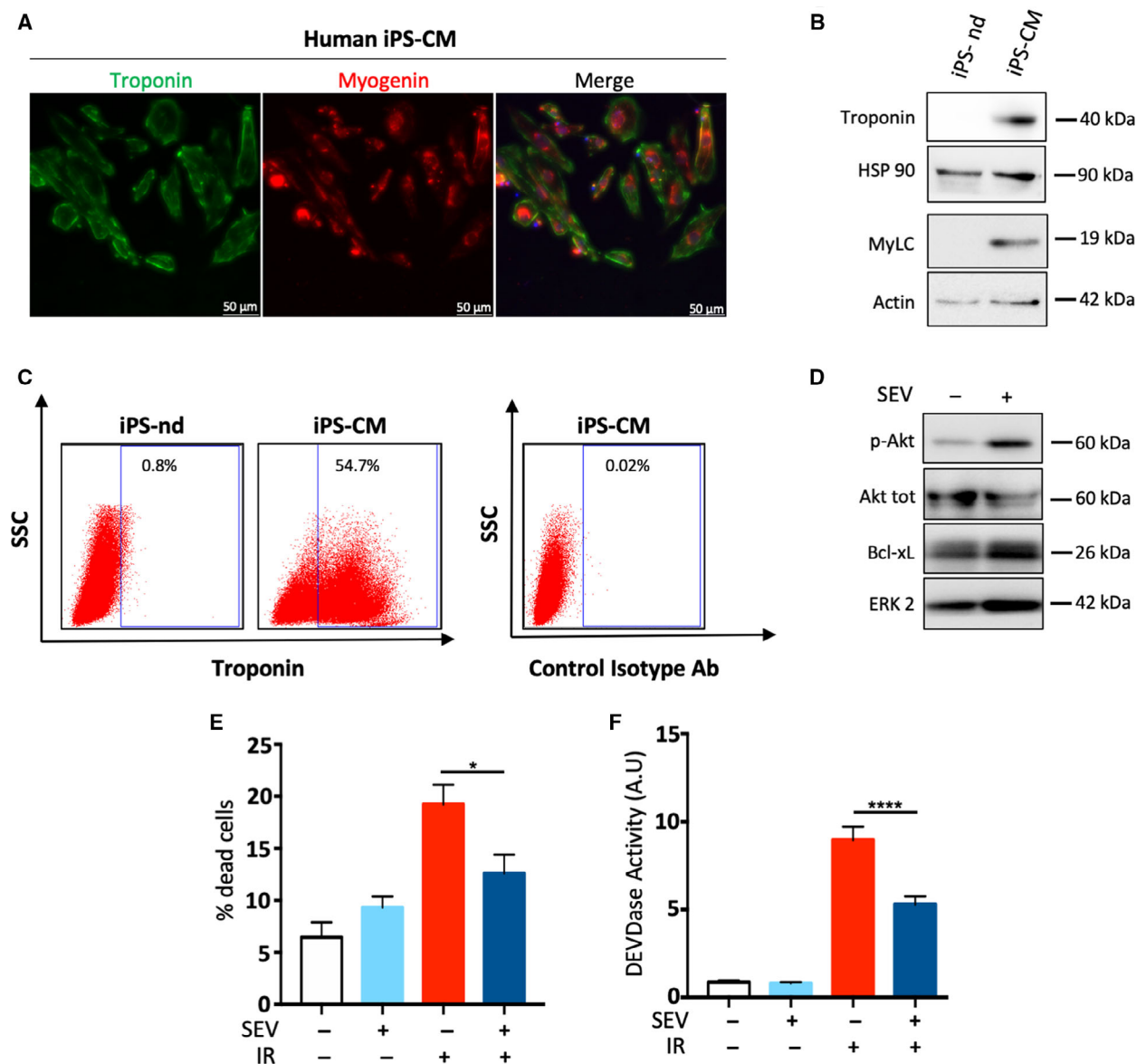
activation and Bcl-xL induction (but not Bcl-2) in H9C2 cells (Fig. 9B,C). MET-induced Bcl-xL expression was reduced upon Akt inhibition (Fig. 9D,E), suggesting that the same signaling pathway initiated by a mild burst of ROS production that activates Akt

and increases Bcl-xL expression was occurring. Finally, to demonstrate the physiological relevance of this observation, mice received 350 mg.kg<sup>-1</sup> of MET intraperitoneally and hearts were harvested 4 h later. To validate that MET treatment was efficient *in vivo*,



**Fig. 7.** SEV-induced Akt activation is ROS-dependent. (A) H9C2 myeloblasts were treated by SEV (20  $\mu$ M, 60 min); rotenone (ROT) (10  $\mu$ M, 120 min)  $\pm$  NAC (2 mM, 60 min). The figure shows representative profile of ROS production obtained by flow cytometry staining using CellROX green staining. Rotenone is used as a positive control of ROS induction. Histograms are representative of six independent experiments. (B) H9C2 myeloblasts were treated as in Fig. 4A and ROS production was measured by FACS (MFI: mean fluorescence intensity). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of six independent experiments performed as in panel A. (C) H9C2-derived cardiomyocytes were treated by SEV (20  $\mu$ M, 60 min); rotenone (ROT) (10  $\mu$ M, 180 min)  $\pm$  NAC (2 mM, 60 min). ROS production was measured by flow cytometry using CellROX green staining. Rotenone is used as a positive control of ROS induction. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of six independent experiments. (D) H9C2 myeloblasts were exposed to SEV (20  $\mu$ M, 60 min)  $\pm$  NAC (2 mM, 60 min) and Akt (activated and total) as well as Bcl-xL protein levels were determined by immunoblots. Actin is used as a loading control. Immunoblots are representative of six independent experiments. (E) Quantification of expression levels of anti-apoptotic protein Bcl-xL and Akt phosphorylation expressed, respectively, as a ratio to actin protein and to total protein. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of six independent experiments performed as in panel D. (F) H9C2 myeloblasts are preconditioned by SEV and then subjected to I/R stress with or without prior inhibition of ROS induction using NAC as indicated in panel A. DEVDase activity is then measured in each condition. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (G) H9C2 myeloblasts were treated as in panel F, and inactive (pro) as well as active (cleaved, cl) caspase 3 was visualized by immunoblots. Actin is used as a loading control. Immunoblots are representative of three independent experiments. \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001; \*\*\*\* $P$  < 0.0001 according to a one-way ANOVA.

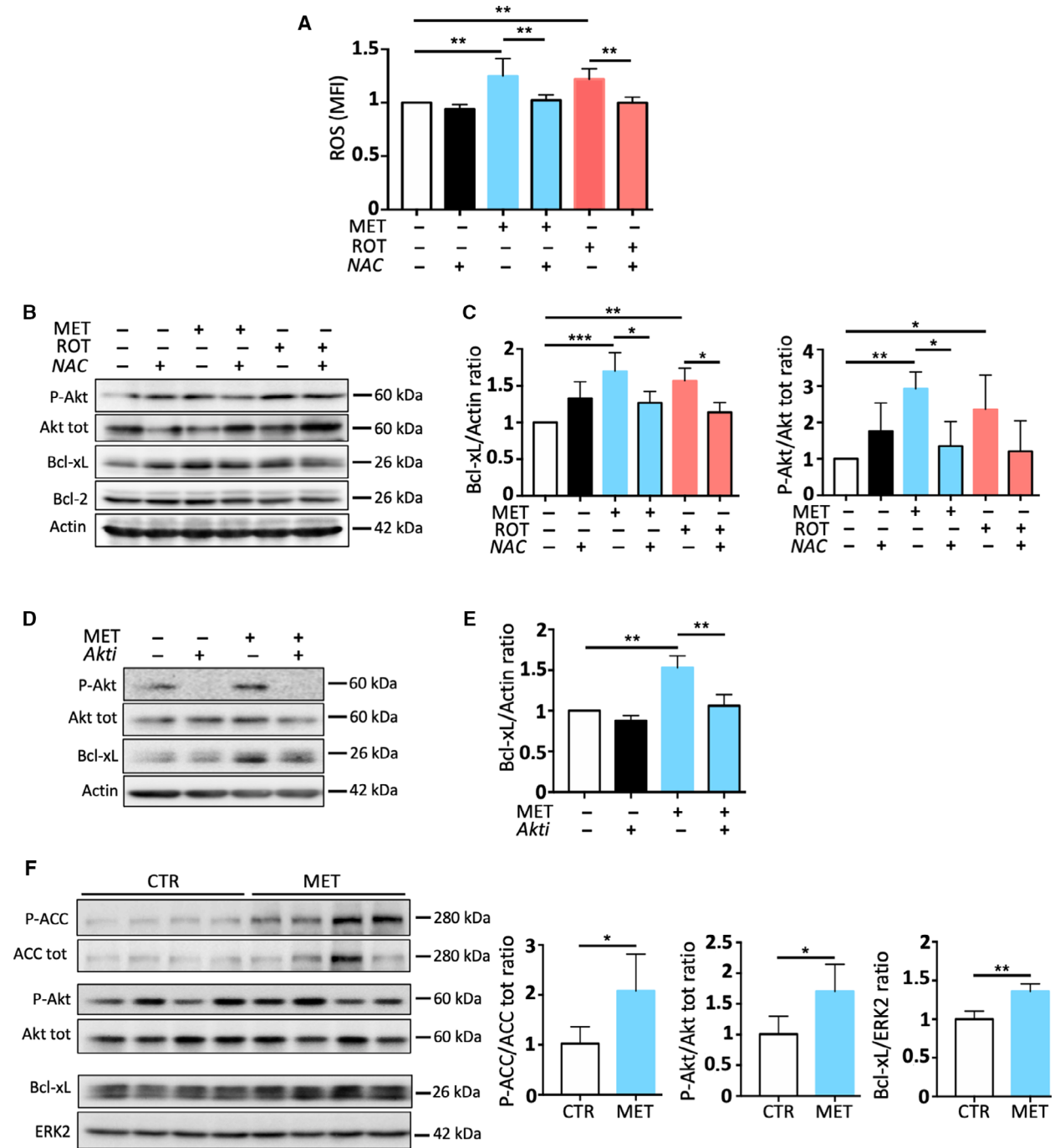




**Fig. 8.** APC protects from IR-induced apoptosis in human cardiomyocytes. (A) Human cardiomyocytes were derived from IPS (human iPS-CM). The expression of cardiomyocytes-specific proteins (myogenin, troponin) was analyzed by immunofluorescence (magnification 20 $\times$ ). Results are representative of two independent experiments. (B) As in panel A investigating cardiomyocytes-specific proteins (myogenin, MyLC, troponin) expression by immunoblots in nondifferentiated IPS (iPS-nd) or in IPS-derived cardiomyocytes (iPS-CM). Results are representative of two independent experiments. (C) Troponin expression was further measured by FACS in nondifferentiated IPS (iPS-nd) or in IPS-derived cardiomyocytes (iPS-CM). Right, a control isotype antibody is used in iPS-CM to show the specificity of the troponin staining. Results are representative of two independent experiments. (D) IPS-derived human cardiomyocytes were incubated with 20 mM SEV for 60 min, and then, the expression of indicated protein was evaluated by immunoblots. ERK2 is used as a loading control. Immunoblots are representative of three independent experiments. (E) IPS-derived human cardiomyocytes were incubated with 20 mM SEV for 60 min and then treated or not upon I/R condition as in Fig. 1. 150 min later, the proportion of dead cells were analyzed by FACS using Annexin V/DAPI staining. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (F) as in E measuring caspase activation. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P < 0.05$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$  according to a one-way ANOVA.

we measured AMPK activation in cardiomyocytes by looking at the induction of phospho-ACC (Fig. 9F). We observed that MET treatment resulted in a

significant increase in Akt activation and Bcl-xL induction in the cardiomyocytes of treated mice compared to control mice treated with PBS (Fig. 9F).



Ultimately, we established that MET-treated H9C2 myeloblasts were significantly protected from I/R-induced apoptosis, as judged by the reduction in the proportion of Annexin V/DAPI-positive cells (Fig. 10A), the decrease in caspase activity

(Fig. 10B), or the ability of MET to allow clonogenic growth of I/R-treated H9C2 cells. We then established that this protective effect was prevented by the use of a ROS scavenger (NAC, Fig. 10D,E).

**Fig. 9.** MET induces Akt activation and Bcl-xL overexpression in a ROS-dependent manner. (A) Quantification of ROS induction by FACS in H9C2 myeloblasts exposed to MET (100  $\mu\text{M}$ ; 60 min); ROT (10  $\mu\text{M}$ , 120 min)  $\pm$  NAC (2 mM, 60 min) (MFI). Rotenone is used as a positive control of ROS induction. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of five independent experiments. (B) Immunoblot analysis of Akt activation and anti-apoptotic protein (Bcl-xL; Bcl-2) expression after inhibition of ROS production by NAC (2 mM, 60 min) on H9C2 myeloblasts exposed to MET (100  $\mu\text{M}$ , 60 min) and ROT (10  $\mu\text{M}$ , 120 min)  $\pm$  NAC (2 mM, 60 min). Actin is used as a loading control. Immunoblots are representative of five independent experiments. (C) Quantification of expression levels of anti-apoptotic protein Bcl-xL and Akt phosphorylation expressed, respectively, as a ratio to actin protein and to total protein. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of five independent experiments performed as in panel B. (D) Immunoblot analysis of Bcl-xL expression after inhibition of Akt using Akti (2.5  $\mu\text{M}$  for 30 min) on H9C2 myeloblasts exposed to MET (100  $\mu\text{M}$ , 60 min). Actin is used as a loading control. Immunoblots are representative of three independent experiments. (E) Quantification of expression levels of anti-apoptotic protein Bcl-xL expressed as a ratio to actin protein. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed as in panel D. (F) WT C57Bl6 mice ( $n = 4$  per group) were either IP injected with PBS (control group, CTR) or IP injected with MET (350  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). 4 h later, cardiomyocytes were harvested from those mice and ACC (active and total) as well as Akt (active and total) and Bcl-xL expression were visualized by immunoblots. Immunoblot analysis and corresponding quantifications are shown as the mean  $\pm$  SEM of four independent mice per group. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  according to a one-way ANOVA in (panels A-C-E) and to unpaired  $t$ -test (panel F).

## Discussion

In recent years, significant developments have been made in understanding the mechanisms of I/R injury and in developing strategies to make myocardial tissue more resistant to ischemia or to limit reperfusion injuries [4]. Among these cardioprotection strategies, APC with halogenated agents, of which SEV, has proven its effectiveness in both animals [40] and humans [41,42]. However, the way in which APC contributes to the reported myocardial protection remains largely unknown. Here, we demonstrated that SEV, via its ability to inhibit ETC complex I, leads to a mild burst of ROS resulting in Akt activation and Bcl-xL expression and therefore protecting cardiomyocytes from I/R-induced cell death (Fig. 10F). We demonstrated that this protective effect could also be obtained with the use of a well-tolerated pharmacological agent MET, therefore giving a strong rationale for the use of MET as a pharmacological preconditioning agent.

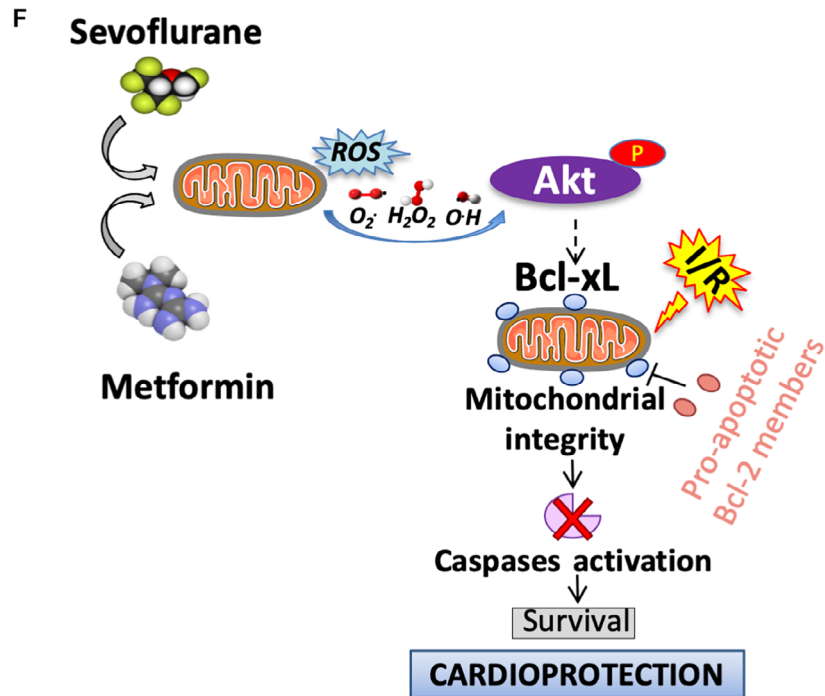
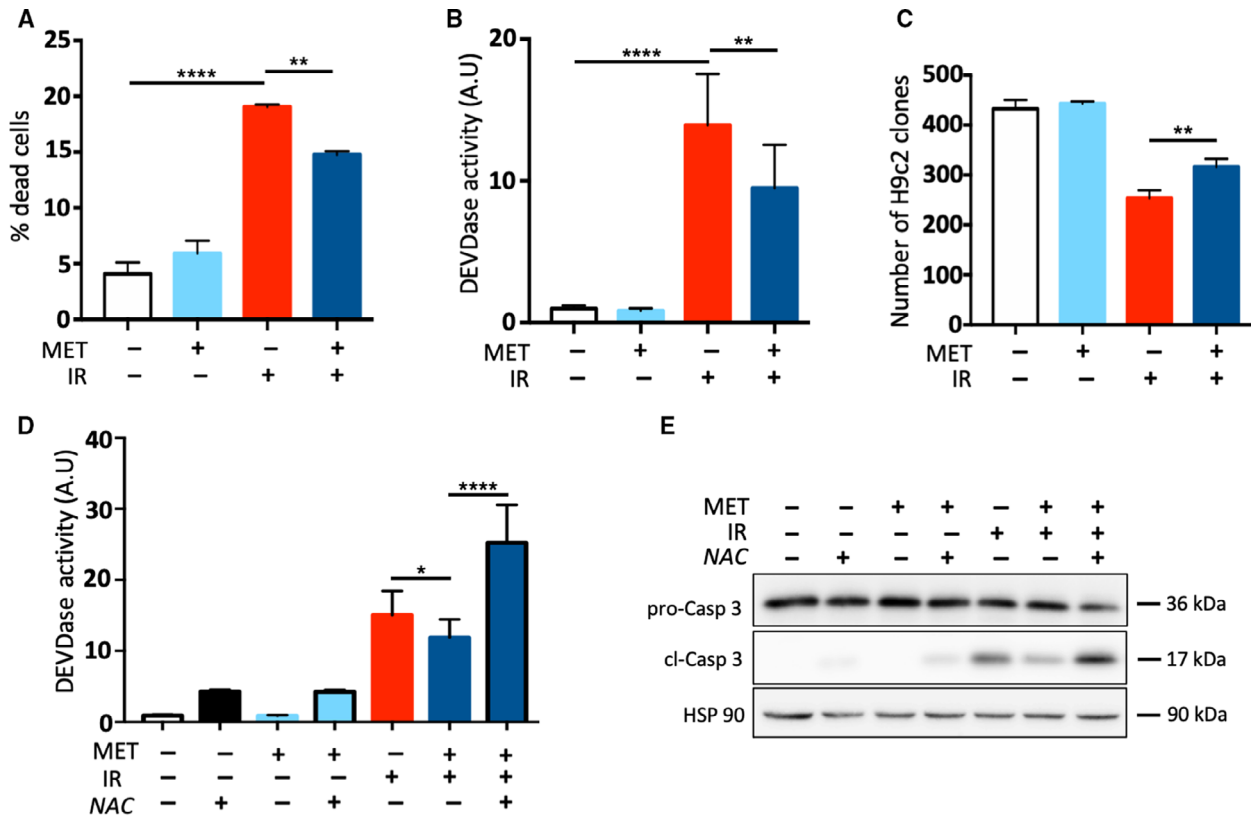
For a long time, it was thought that cell death of cardiomyocytes following a severe I/R sequence was exclusively due to a necrotic phenomenon. However, it is now well admitted that cardiomyocytes can also undergo several forms of death, including apoptosis,

that are linked to ROS production [43]. Indeed, I/R is able to trigger the intrinsic pathway of apoptosis by disrupting the homeostasis of pro- and anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family, thus leading to cell death following MOMP [44]. Mechanistically, MOMP is a trigger event of several forms of apoptotic and non-apoptotic deaths [11], therefore SEV-induced Bcl-xL in cardiomyocytes limits MOMP and therefore results in a reduction of apoptosis but it may also present some forms of regulated necrosis that remains to be characterized.

Upon APC, only Bcl-xL appeared to be significantly modulated *in vitro* and *in vivo* among the different anti-apoptotic members of the Bcl-2 family (Bcl-2, Mcl-1). This result is consistent with the work of Gallogly *et al.* in which knockdown of Bcl-2 alone had no effect on oxidant-induced apoptosis in H9C2 cells, whereas diminution of Bcl-xL alone (or in combination with Bcl-2 knockdown) increased oxidant-induced apoptosis [45].

How SEV or MET induces increased Bcl-xL expression at the protein levels remains to be determined. We excluded that AMPK activation was linked to SEV-induced Bcl-xL increase (Fig. 5) in our model, as suggested by others in different tissues [46]. We did

**Fig. 10.** MET reproduces SEV-cardioprotective effect. (A) H9C2 myeloblasts are preconditioned by MET (100  $\mu\text{M}$ ; 24 h) and then subjected or not to I/R stress. Cell death was measured by FACS using Annexin V/DAPI staining. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (B) as in A measuring DEVDase activity. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (C) Cells were treated as in A. The number of H9c2 myeloblasts clones having proliferated following the signified treatment is indicated. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. (D) H9C2 myeloblasts are preconditioned by MET (100  $\mu\text{M}$ ; 24 h) and then subjected to I/R stress with or without prior inhibition of ROS using 2 mM NAC. DEVDase activity is then measured in each condition. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (E) H9C2 myeloblasts were treated as previously and caspase 3 activation was visualized by immunoblot. HSP90 is used as a loading control. Immunoblots are representative of three independent experiments. (F) Schematic representation of both APC and metformin preconditioning (MPC) *in vitro* protective pathway. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$  according to a one-way ANOVA.



not measure any significant modification in Bcl-xL mRNA level (Fig. 4A), indicating a regulation at the transcriptional and/or posttranscriptional level. We did not either observe a modification of Bcl-xL Ser/Thr phosphorylation upon SEV treatment (not shown). The main hypothesis one can propose is that following Akt activation, Bcl-xL was not further degraded by the proteasome and/or by lysosomal pathway, as it was already suggested for Bcl-2 [47]. ApC has been shown to modulate protein expression levels, in particular complexes involved in the mitochondrial respiratory chain, by inducing protein stabilization or degradation rather than acting on protein synthesis [48–50]. Bienengraeber *et al.* [50] performed a quantitative characterization of changes in the cardiac mitochondrial proteome during ApC. They established by mass spectral analysis that the NADH dehydrogenase 75-kDa subunit of complex I involved in ETC was modulated upon ApC treatment. This interaction between halogenated agents and complexes of the ETC could be the first event triggering a small amount of ROS required for the protective effect of ApC.

Protein kinase Akt consists of two isoforms Akt1 and Akt2 strongly expressed within the myocardium [51]. It belongs to the reperfusion injury salvage kinase (RISK) signaling pathway which is involved in various cardioprotective mechanisms [52]. Interestingly, although it has been shown that ROS, such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, induces Akt activation in different cell models including cardiomyocytes [36]; no study in the context of cardioprotection by ApC has so far described a mechanism that combines ROS induction, Akt activation, and modulation of Bcl-2 family protein expression. Our results suggest that mitochondrial complex I inhibition by SEV induces ROS that behaved as signaling pathway initiators and intracellular effectors responsible for the cardioprotective effect of ApC. In addition to its role in glucose homeostasis, MET also participates in the production of ROS and in the modulation of cell death processes [53,54]. This pleiotropic effect of MET would be related to the inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain. However, the mechanism by which the MET succeeds in inhibiting the complex I remains poorly understood and is very much depending on the dose used and the cell type studied [55]. Here, we used a concentration of MET that is compatible with a clinical application and may therefore induce only a partial inhibition of mitochondrial complex I activity [55].

There is a strong controversy surrounding the use of anesthetic agents for cardioprotection mainly because

of the mismatch between preclinical and clinical results [56]. In addition, the hypnotic effect of those compounds limits their use before the patient is hospitalized. As we demonstrated that SEV-mediated ROS production was the initial trigger of the protection from I/R-induced apoptosis, we looked for another pharmacological agent that could lead to a similar protective effect and that could be easily prescribed before any I/R-risk surgeries. Recent clinical data show evidence that MET-pre-operative protective properties are independent of its role in glycemic control [57], highlighting the growing interest in its pleiotropic effects, in particular in cardioprotection [38]. MET seems to be protective against I/R injuries; however, data are still controversial. Although it has been widely shown that MET protects from I/R in various rodent models [58], it fails to protect in swine models [59]. The mechanisms involved in such protective properties are still largely unknown. Here, we show that the ROS-dependent MET protective mechanism is AMPK-independent [60]. Furthermore, despite different pharmacokinetic characteristics, we have shown that MET and SEV are activating a ROS/Akt/Bcl-xL-dependent protecting pathway. However, it remains to be determined whether MET acts as a preconditioning agent short time before the I/R event [61] or as a protective treatment in the setting of a chronic intake before the I/R event [58]. Furthermore, we report that a single MET injection was protective under normoglycemic culture conditions. This is an interesting result because almost all the protective effects of MET in nondiabetic subjects were rather disappointing [62,63] in contrast to those in diabetic subjects with chronic exposure [64]. Thus, it would be relevant to verify in clinical practice, in the context of I/R (i.e. cardiac arrest), whether the cardioprotective properties of MET are more pronounced in diabetic hearts. Finally, the strategy of organ protection and in particular cardioprotection will probably have to evolve toward a management integrating both the consideration of confounding factors (glycemic control, optimization of oxygenation, hemodynamic management, transfusion thresholds, etc.) and a multimodal approach combining several protection strategies in order to achieve clinically significant efficacy [65].

## Materials and methods

### Products/Reagents

Product and reagents used are listed in Table 1.

**Table 1.** List of reagents used.

Reagent	Reference
ABT 737	197333; Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
All-trans-retinoic acid (ATRA)	0695-50; Bio-Techne (Minneapolis, USA)
Akti	A6730; Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Annexin V-FITC	130-093-060; Miltenyi Biotec SAS (Paris, France)
Bortezomib (Bor)	S1013; Selleckchem (Euromedex-Souffelweyersheim, France)
CellROX™ Green Reagent	C10444; ThermoFisher scientific (Courtaboeuf, France)
DAPI	D9542 Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
DEVD-AMC	3171; Pepta Nova (Sandhausen, Germany)
DEVD-CHO	3172; Pepta Nova (Sandhausen, Germany)
Lipofectamine™ 2000	(#11668-019), ThermoFisher Scientific (Courtaboeuf, France)
MET (1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride)	D150959; Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
NAC	A9165; Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
N-Acetyl-L-cysteine	
Rotenone	R8875; Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
SEV	Baxter® Guyancourt, France
ISO	Vetflurane, Virbac® Carros, France
WeHi 539	A3935; ApexBio (CliniSciences-Nanterre, France)
L-Ascorbic Acid	A8960; Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Chir-99021	S1049; Selleckchem (Euromedex-Souffelweyersheim, France)
IWP2	S7085; Selleckchem (Euromedex-Souffelmeyersheim, France)
B27 Supplement	17504-044; Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France)
B27 Supplement, minus Insulin	A1895601; Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France)
TrypLE Express	12604-021; Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France)
Geltrex	Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France)
Triton X-100	Acros Organics (Massachusetts, USA)
Fluoromount G	SouthernBiotech (Birmingham, AL)
BSA	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)
Cytofix/Cytoperm kit	BD Biosciences (California, USA)

## Cell culture

H9C2 cells were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA: CRL 1446). Immortalized MEFs and H9C2 cells

were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FCS, 1 mM D-glucose, 100 units per mL penicillin, 100 µg·mL<sup>-1</sup> streptomycin, and 1 mM pyruvate in a humidified incubator (5% CO<sub>2</sub>/95% air).

In most experiments, H9C2 was used in their myeloblast state. When indicated, H9C2 was differentiated toward cardiomyocytes. For that matter, cell cardiac differentiation was initiated by decreasing the percentage of serum in the media followed by retinoic acid supplementation. For cell-differentiated conditions, H9c2 cells were plated at a density seven times greater than those of undifferentiated H9c2 cells. Addition of retinoic acid (1 µM) to media containing 1% serum was performed daily in the dark for 5 days. All-trans-retinoic acid was prepared in DMSO and stored at -20 °C in the dark to avoid degradation [66].

AMPK KO MEFs and related control MEFs were a kind gift from B. Viollet. All cell lines were tested for mycoplasma contamination. When the cells have reached 70% confluence, they are reseeded after suspension with trypsin/EDTA 0.05% (Gibco®, Alsace, France). Depending on the experiments, the cells were inoculated either in 25-cm<sup>2</sup> culture flasks with a 0.2-µm filter cap, at a density of 5000 cells per cm<sup>2</sup>; or in 6-well plates at a density of 30 000 cells per well. After 4 days, the cells reached the confluence allowing the experiments to be carried out.

## Induced pluripotent stem cells (iPS) differentiated into human cardiomyocytes

Human iPSC clone used in this paper was the same as used in our previous study [67]. It was generated from human skin fibroblasts (69-year-old woman) and characterized as previously described [67].

To produce human cardiomyocytes from pluripotent stem cells (hiPSC-CMs), human iPSCs were differentiated into hiPSC-CMs using a small-molecule cardiac differentiation protocol [68]. Briefly, iPSCs were plated on 6-well plates coated with Geltrex (Life Technology, Courtaboeuf, France) and cultured in TeSR-E8 medium (StemCell Technology, Grenoble, France). For hiPSC-CMs differentiation, we used RPMI 1960 medium (Life Technology) containing ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and B-27 Minus Insulin (Life Technology) (CDM). At 80% iPSC confluency, on Day 0 (D0), differentiation was initiated with the addition of the CDM medium supplemented with 6 µM CHIR-99021 (Selleckchem, Euromedex-Souffelmeyersheim, France). After 24 h of exposure to CHIR-99021, medium was changed to CDM (D1). On D3, medium was changed to 1 : 1 mix of spent and fresh CDM with 5 µM IWP-2 (Selleckchem). On D5, after 48 h of exposure to IWP-2, the medium was changed to CDM. On D7, medium was changed to RPMI 1960 with ascorbic acid and B-27 Supplement 50X (CCM). Afterward, CCM was

changed every 2 days until further analysis. Contracting cells were noted from d7.

For flow cytometry analysis, on day 23 of differentiation, iPSC-CMs were detached and dissociated with TrypLE Express, centrifuged 5 min at 200 *g*, then fixed, and permeabilized using a Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), in accordance with the manufacturer's recommendations. The cells were stained with antiscardiac troponin T-APC 1 : 100, recombinant human IgG1, clone REA400 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) or CTL-I APC 1 : 100, monoclonal REA control (I) antibody human, clone REA293 (Miltenyi Biotec) and were collected on MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec).

### Immunofluorescence

For immunofluorescence analysis, on day 23, hiPSC-CMs were dissociated with TrypLE Express (Life Technologies) and reseeded on Geltrex-coated plates for 5 days. Cells were fixed with 3.7% formaldehyde for 15 min at RT, permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Acros Organics, Alsace, France) for 3 min at RT, blocked in 3% BSA (Sigma-Aldrich) for 1 h at RT, and stained with 1 : 50 mouse monoclonal cardiac troponin (13-11; Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) and 1 : 50 rabbit monoclonal myogenin (M-225 Santa Cruz, Heidelberg, Germany) overnight at 4 °C in 1% BSA. Cells were washed with PBS and then incubated for 1 h at RT in the dark with secondary antibodies 1 : 1000 Alexa Fluor 488 goat anti-mouse, 1 : 1000 Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit (all Life Technologies), and DAPI (0.5 µg·mL<sup>-1</sup>; Molecular Probes, Courtaboeuf, France) in 1% BSA. Cells were washed, mounted with Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA), and imaged with an inverted microscope (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France).

### Ischemia/Reperfusion (IR) *in vitro* model

When H9C2 cells reached confluence, they were placed in a hypoxic enclosure at 94.9% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 0.1% O<sub>2</sub> (Don Whitley Scientific® Hypoxystation H35, Bingley, England) and were cultured in an ischemia mimicking medium (125 mM NaCl; 8 mM KCl; 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.25 mM MgSO<sub>4</sub>; 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>; 6.25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 5 mM sodium lactate; 20 mM HEPES; pH 6, 6 adjusted to NaOH). After 90 min of simulated ischemia, the culture medium is replaced with a preincubated Krebs/Henseleit normoxic medium (110 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.25 mM MgSO<sub>4</sub>; 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 11 mM D-glucose; 20 mM HEPES; pH 7.4 adjusted by NaOH) and the H9C2 cells were placed again in a classical humidified incubator at 5% CO<sub>2</sub>/95% ambient air, at 37 °C for 60 min before analysis.

### Anesthesia preconditioning (APc) *in vitro* model

SEV (Baxter®, Guyancourt, France) was directly added in the culture medium at an initial concentration of 20 mM as described by Zitta *et al.* [23] Then, the culture flasks were hermetically closed by a cap without filter to avoid evaporation of the anesthetic agent and placed again in a classical humidified incubator at 5% CO<sub>2</sub>/95% ambient air, at 37 °C for 60 min. This results in a rapid equilibration between the gas phase and the liquid phase to ~0.4 mM and 3%, respectively, if the liquid / gas volume ratio is 1 : 5 (i.e., a volume of medium of 10 mL for a T25 flask). APc was stopped after a 60-min period by opening the cap allowing the evaporation of SEV and cells were submitted to I/R.

### Mice

C57Bl6/J female WT mice were purchased from Envigo, Gannat, France. They were housed under specific pathogen-free conditions and fed with standard laboratory food and used at 8–10 weeks of age.

All mice were maintained in specific pathogen-free conditions, and all experimental procedures were approved by the National Animal Care and Use Committee and the regional ethics committee (agreement number 05111.02 from Direction Générale de la Recherche et de l'Innovation). Experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures.

### Isoflurane exposure and tissue collection

Animals receiving ISO treatment were placed in an induction chamber and induced with 5% ISO/97% medical grade air (vol/vol) until loss of painful (no reaction to pinching the hind leg) and palpebral reflexes. Anesthesia was then maintained at 1% ISO/98% air ~1.5 minimum alveolar concentration a 30-min exposure period. Body temperature was maintained at 37 °C. Animals were observed in order to maintain > 95% oxygen saturation at all times. At the end of the anesthetic exposure, test animals (ISO) were immediately sacrificed by cervical dislocation. Samples from heart ventricle were collected, washed with PBS (three times), and frozen in nitrogen then stored at –80 °C. In order to avoid any stress that might influence gene expression and protein synthesis, control animals were maintained in their cages until the time of death. Each control animal was handled gently and then rapidly sacrificed by cervical dislocation. Tissue was processed in the same manner as for test animals. In order to respect the time required for recovery of the mouse hearts after sacrifice, the mice are not induced simultaneously. They are induced

with a lag time of  $\pm 10$  min. All animals were killed during the same daily 1-h window in order to diminish confounding factors from diurnal variations in gene expression [69].

### Metformin exposure and tissue collection

All the mice were fasted overnight (18 h) prior to the experiment. Mice from MET group ( $n = 4$ ) received intraperitoneal (ip) injection of  $350 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  of MET hydrochloride dissolved in PBS at a concentration of  $30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . In parallel, control animals ( $n = 4$ ) received ip injection of PBS. We made sure to administer the same volumes (100  $\mu\text{L}$ ) of solutions (either MET hydrochloride or PBS) to each mouse. Blood glucose levels in each animal were measured prior to the injection of METs or PBS ( $T_0$ ) and after 4 h of exposure to MET ( $T_{\text{er}}$ ) prior to the sacrifice of the mice. Each animal was handled gently and then rapidly sacrificed by cervical dislocation. Samples from heart ventricle were collected, washed with PBS (three times), and frozen in nitrogen then stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

### Protein extraction and quantification

After trypsination, cell pellets were resuspended in 70  $\mu\text{L}$  of lysis buffer (50 mM Tris pH8; 0.5% nonidet P-40; 200 mM NaCl; 0.1 mM EDTA; protease inhibitors [ $20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  leupeptin, 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF),  $20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  aprotinin]), and protein amount was determined by Bradford method (Bio-Rad, Marnes, France). Samples are stored at  $-20^\circ\text{C}$ .

After trypsination, cell pellets were resuspended in 70  $\mu\text{L}$  of lysis buffer Laemmli 1.5X (150 mM Tris/HCl pH 6.8; 3.75% SDS ; 30% glycerol).

Samples are stored at  $-20^\circ\text{C}$ .

### Western blotting

Proteins were separated on polyacrylamide gels and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. After nonspecific binding sites saturation, the membranes were incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with a primary antibody in blocking buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Tween-20, 3% BSA, 0.5% gelatin). The membranes were washed three times in TNA-1% NP-40 (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40) and incubated with the HRP-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature. The immunoblots were visualized using an enhanced chemiluminescence detection kit (Pierce, Thermo fisher scientific Courtaboeuf, France).

### Antibodies

The list of used antibodies is presented in Table 2.

### Cell death measurement

Cell death was analyzed either by DEVDase activity or by Annexin V/DAPI staining. To assess DEVDase activity, H9C2 cells were lysed in caspase lysis buffer (Hepes 10 mM pH 7.4; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM; 1% NP-40;  $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  aprotinin; 1 mM PMSF; 10  $\mu\text{M}$  leupeptin) during 15 min in ice. The lysates are then centrifuged for 10 min at  $16\,000 \text{ g}$  at  $+4^\circ\text{C}$ . The supernatant is recovered and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Lysates were standardized for protein content and 20  $\mu\text{g}$  loaded into a black 96-well plate (CellStar) in duplicate in 50  $\mu\text{L}$  of caspase buffer. At the last moment, 50  $\mu\text{L}$  of reagent (47.5  $\mu\text{L}$  of caspase buffer; 2  $\mu\text{L}$  of Ac-DEVD-AMC 10 mM; 0.5  $\mu\text{L}$  DTT 1 M) is added to each protein sample and analyzed by fluorimetry (Fluoroskan Ascent™ Thermo Scientific: Excitation 390 nm—Transmission 460 nm—Kinetic: 30 measurements spaced 3 min apart). Caspase activity was determined both with and without the presence of 1  $\mu\text{M}$  of the caspase 3 inhibitor Ac-DEVD-CHO, and the specific activity was expressed as the change in absorbance per minute per milligram of protein. In parallel, cell viability of the treated cells was assessed by looking at the externalization of plasma membrane phosphatidylserine using Annexin V staining and the plasma membrane permeabilization using DAPI staining and then analyzed by flow cytometry (Miltenyi Biotec).

### Clonogenic assay

After stimulation in T25 flask at optimal confluence, the H9C2 cells are trypsinized and then inoculated in 6-well plates at a rate of one 6-well plate per condition. For each condition, the cell suspension is diluted in a decreasing manner: from the most concentrated (well containing 1 mL of cell suspension) to the least concentrated (well containing 10  $\mu\text{L}$  of cell suspension) for a total solution volume of 2 mL per well. The cells are cultured for 3 days in DMEM 10% SVF medium. Once colonies formation was observed, cells were stained with crystal violet (0.4% violet crystal, 20% EtOH; Sigma-Aldrich) and counted.

### Mitochondrial Reactive oxygen species measurement

To quantify mitochondrial-ROS induction, Molecular Probes® fluorogenic reagent as CellROX® Green (Ex: 485 nm/ Em: 520 nm) was added to H9C2 cells for a 30-min incubation at  $37^\circ\text{C}$ . CellROX® Green reagent is a DNA dye, and upon oxidation, it binds to DNA; thus, its signal is localized primarily in the nucleus and mitochondria. The cell-permeable reagents are nonfluorescent while in a reduced state and upon oxidation exhibit strong fluorogenic signal. Upon completion of CellROX® Green Reagent incubation, H9C2 cells were collected and washed



**Table 2.** References and dilution used for each indicated antibody.

Recognized protein	MW (kDa)	Host and isotype	Dilution	Reference
Acetyl-CoA carboxylase	280	Monoclonal rabbit IgG	WB: 1/1000	3676; Cell Signaling Technology (Ozyme-Saint-Cyr-L'École, France)
Actin	43	Monoclonal mouse IgG1	WB: 1/1000	sc 47778; Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)
Akt2	60	Monoclonal mouse IgG1	WB: 1/1000	5239; Cell Signaling Technology (Ozyme-Saint-Cyr-L'École, France)
AMPK $\alpha$	62	Polyclonal rabbit	WB: 1/1000	2332; Cell Signaling Technology (Ozyme-Saint-Cyr-L'École, France)
Bcl-2	26	Monoclonal rabbit IgG	WB: 1/1000	2870; Cell Signaling Technology (Ozyme-Saint-Cyr-L'École, France)
Bcl-xL	30	Monoclonal rabbit IgG	WB: 1/1000	2764; Cell Signaling Technology (Ozyme-Saint-Cyr-L'École, France)
Cleaved-caspase 3	17	Polyclonal rabbit IgG	WB: 1/1000	ab2302; AbCam (Paris, France)
ERK2	42	Monoclonal mouse IgG2b	WB: 1/1000	sc 1647; Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)
Hsp 90	90	Monoclonal mouse IgG1	WB: 1/1000	orb97461; Biorbyt Ltd (Cambridge, UK)
Mcl-1	37	Monoclonal rabbit IgG	WB: 1/1000	ab32087; AbCam (Paris, France)
MyL2	19	Polyclonal rabbit IgG	WB: 1/1000 IF: 1/50	10906-1-AP; Proteintech (Manchester, UK)
Myogenin	34	Polyclonal rabbit IgG	WB: 1/1000 IF: 1/50	sc-576, Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)
Phospho-acetyl-CoA carboxylase (Ser 79)	280	Polyclonal rabbit IgG	WB: 1/1000	3661; Cell Signaling Technology (Ozyme-Saint-Cyr-L'École, France)
Phospho-AMPK (Thr 172)	62	Monoclonal rabbit IgG	WB: 1/1000	2535, Cell Signaling Technology (Ozyme-Saint-Cyr-L'École, France)
Phospho-Akt	60	Monoclonal rabbit IgG	WB: 1/1000	4060; Cell Signaling Technology (Ozyme-Saint-Cyr-L'École, France)
Caspase 3	17;19;35	Polyclonal rabbit IgG	WB: 1/1000	9662; Cell Signaling Technology (Ozyme-Saint-Cyr-L'École, France)
Smac/Diablo	21	Monoclonal rabbit IgG	WB: 1/1000	15108; Cell Signaling Technology (Ozyme-Saint-Cyr-L'École, France)
Cardiac troponin T	40	Monoclonal mouse IgG1	WB: 1/1000 IF: 1/50	MA5-12960; Invitrogen (Courtaboeuf, France)
Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody		Horse	WB: 1/10 000	7076, Cell Signaling Technology (Ozyme-Saint-Cyr-L'École, France)
Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody		Goat	WB: 1/10 000	7074, Cell Signaling Technology (Ozyme-Saint-Cyr-L'École, France)
Anti-rabbit IgG (conformation specific) (L27A9) mAb (HRP conjugate)		Mouse	WB: 1/5000	5127, Cell Signaling Technology (Ozyme-Saint-Cyr-L'École, France)
Anticardiac troponin T-APC		Monoclonal human IgG1	Cyto : 1/100	Clone REA400; Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)
Control-I APC		Monoclonal human IgG1	Cyto: 1/100	Clone REA400; Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)
Alexa Fluor 488		Mouse	IF: 1/1000	A-11037; Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France)
Alexa Fluor 594		Rabbit	IF: 1/1000	A-11037; Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France)

with PBS. Then, cells were trypsinized and washed again two times in PBS. After aspiration of the supernatant, cells are resuspended in 150  $\mu$ L of PBS and plated in a 96-well plate for flow cytometry analysis.

### Plasmid transfection

Twenty-four hours prior transfection, H9C2 cells were seeded at  $1 \times 10^4$  cells per  $\text{cm}^2$  in 100-mm plates and then transfected with pcDNA3-Bcl-xL plasmid DNA (6  $\mu$ g) using following manufacturer's instructions.

### RNA extractions and qPCR assessments

Total RNA extraction from cells and reverse transcription were performed using RNeasy Mini Kit and Omniscript RT kit (Qiagen, Thermo fisher scientific Courtaboeuf, France), respectively, according to the manufacturer protocols.

For Bc-xL and Bcl-2 amplification, the following are deposited in a 96-well plate dedicated to qPCR for a final volume of 10  $\mu$ L: 8 ng of cDNA primers, the oligonucleotides (Taqman<sup>®</sup> assay mix containing the sense and antisense oligonucleotides (20 $\times$ )), the Taq polymerase enzyme contained in the Taqman<sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mix (2 $\times$ ), No AmpErase<sup>®</sup> UNG.

The qPCR is performed and analyzed in an automated manner by the Real Time PCR System Thermal cycling Block, Applied Biosystems<sup>®</sup> Step One Plus<sup>™</sup> device from Life Technologies.

### Statistical analysis

The number of animals used in each experiment is described in the figure legends. Each stimulus condition is considered as an independent group. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. To compare means between two groups, the unpaired two-tailed Student *t*-test was used. To compare means between three or more groups, the one-way ANOVA followed by a *post hoc* test with Tukey or Dunnett's correction was applied. Differences observed with values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant. (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ ). All statistical analyses were performed in GRAPHPAD PRISM software (GraphPad, version 7, San Diego, CA, USA).

### Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire facilities. We thank Conseil General des AM et la région PACA et Corse for their financial support. We thank Dr. Benoit VIOLLET for the kind gift from AMPK KO MEFs (and related control MEFs) and Dr. Philippe P. JUIN for scientific

inputs. This work was supported by the Fondation ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), by the French Government (National Research Agency, ANR) through the 'Investments for the Future' programs LABEX SIGNALIFE ANR-11-LABX-0028-01 and IDEX UCAJedi ANR-15-IDEX-01. EV was supported by La Ligue contre le Cancer. BMH was supported by ANR ANR-16-CE16-0024-01 and then by la Ville de Nice.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Author contributions

RR and RP performed most experiments. BM-H performed IPS-derived cardiomyocytes experiments. EV, RM, JC, EV (Verhoeven), SM, AV performed experiments. MR and MC contributed to the scientific input. MC and J-ER supervised research, secured funding, and interpreted data. RR, JER, and MC wrote the manuscript.

### Peer Review

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/febs.15675>.

### References

- 1 Devereaux PJ & Szczeklik W (2019) Myocardial injury after non-cardiac surgery: diagnosis and management. *Eur Heart J* **41**, 3083–3091.
- 2 Botto F, Alonso-Coello P, Chan MT, Villar JC, Xavier D, Srinathan S, Guyatt G, Cruz P, Graham M, Wang CY *et al.* (2014) Myocardial injury after noncardiac surgery: a large, international, prospective cohort study establishing diagnostic criteria, characteristics, predictors, and 30-day outcomes. *Anesthesiology* **120**, 564–578.
- 3 Lienhart A, Auroy Y, Pequignot F, Benhamou D, Warszawski J, Bovet M & Jouglé E (2006) Survey of anesthesia-related mortality in France. *Anesthesiology* **105**, 1087–1097.
- 4 Eltzschig HK & Eckle T (2011) Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med* **17**, 1391–1401.
- 5 Zweier JL, Flaherty JT & Weisfeldt ML (1987) Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 1404–1407.
- 6 Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**, 1–13.

- 7 McCully JD, Wakiyama H, Hsieh YJ, Jones M & Levitsky S (2004) Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H1923–H1935.
- 8 Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY & Li CJ (2018) Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem* **46**, 1650–1667.
- 9 Gottlieb RA (2011) Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **16**, 233–238.
- 10 Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ & Doevendans PA (2004) Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **61**, 414–426.
- 11 Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW *et al.* (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* **25**, 486–541.
- 12 Imahashi K, Schneider MD, Steenbergen C & Murphy E (2004) Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* **95**, 734–741.
- 13 Chen M, Won DJ, Krajewski S & Gottlieb RA (2002) Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J Biol Chem* **277**, 29181–29186.
- 14 MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB & Cohen GM (2002) Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination *in vitro*. *J Biol Chem* **277**, 36611–36616.
- 15 Davidson SM, Adameova A, Barile L, Cabrera-Fuentes HA, Lazou A, Pagliaro P, Stenslokken KO, Garcia-Dorado D & Action E-CC (2020) Mitochondrial and mitochondrial-independent pathways of myocardial cell death during ischaemia and reperfusion injury. *J Cell Mol Med* **24**, 3795–3806.
- 16 Andreadou I, Schulz R, Papapetropoulos A, Turan B, Ytrehus K, Ferdinandy P, Daiber A & Di Lisa F (2020) The role of mitochondrial reactive oxygen species, NO and H<sub>2</sub>S in ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection. *J Cell Mol Med* **24**, 6510–6522.
- 17 Xia Z, Li H & Irwin MG (2016) Myocardial ischaemia reperfusion injury: the challenge of translating ischaemic and anaesthetic protection from animal models to humans. *Br J Anaesth* **117**(Suppl 2), ii44–ii62.
- 18 Chouchani ET, Pell VR, James AM, Work LM, Saeb-Parsy K, Frezza C, Krieg T & Murphy MP (2016) A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury. *Cell Metab* **23**, 254–263.
- 19 Pagel PS & Crystal GJ (2018) The discovery of myocardial preconditioning using volatile anesthetics: a history and contemporary clinical perspective. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **32**, 1112–1134.
- 20 Kevin LG, Novalija E, Riess ML, Camara AK, Rhodes SS & Stowe DF (2003) Sevoflurane exposure generates superoxide but leads to decreased superoxide during ischemia and reperfusion in isolated hearts. *Anesth Analg* **96**, 949–955, table of contents.
- 21 Hirata N, Shim YH, Pravdic D, Lohr NL, Pratt PF Jr, Weihrauch D, Kersten JR, Warltier DC, Bosnjak ZJ & Bienengraeber M (2011) Isoflurane differentially modulates mitochondrial reactive oxygen species production via forward versus reverse electron transport flow: implications for preconditioning. *Anesthesiology* **115**, 531–540.
- 22 Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W & Schultz G (1991) Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res* **69**, 1476–1486.
- 23 Zitta K, Meybohm P, Bein B, Ohnesorge H, Steinfath M, Scholz J & Albrecht M (2010) Cytoprotective effects of the volatile anesthetic sevoflurane are highly dependent on timing and duration of sevoflurane conditioning: findings from a human, in-vitro hypoxia model. *Eur J Pharmacol* **645**, 39–46.
- 24 van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, Willis SN, Scott CL, Day CL, Cory S *et al.* (2006) The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* **10**, 389–399.
- 25 Colell A, Ricci JE, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, Fitzgerald P, Guio-Carrion A, Waterhouse NJ, Li CW *et al.* (2007) GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome C release in the absence of caspase activation. *Cell* **129**, 983–997.
- 26 Lessene G, Czabotar PE, Sleebs BE, Zobel K, Lowes KN, Adams JM, Baell JB, Colman PM, Deshayes K, Fairbrother WJ *et al.* (2013) Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. *Nat Chem Biol* **9**, 390–397.
- 27 Ogata Y & Takahashi M (2003) Bcl-xL as an antiapoptotic molecule for cardiomyocytes. *Drug News Perspect* **16**, 446–452.
- 28 Lamberts RR, Onderwater G, Hamdani N, Vreden MJ, Steenhuisen J, Eringa EC, Loer SA, Stienen GJ & Bouwman RA (2009) Reactive oxygen species-induced stimulation of 5'AMP-activated protein kinase mediates sevoflurane-induced cardioprotection. *Circulation* **120**, S10–S15.
- 29 Zhao J, Wang F, Zhang Y, Jiao L, Lau WB, Wang L, Liu B, Gao E, Koch WJ, Ma XL *et al.* (2013)

- Sevoflurane preconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via caveolin-3-dependent cyclooxygenase-2 inhibition. *Circulation* **128**, S121–S129.
- 30 Collodet C, Foretz M, Deak M, Bultot L, Metairon S, Viollet B, Lefebvre G, Raymond F, Parisi A, Civiletto G *et al.* (2019) AMPK promotes induction of the tumor suppressor FLCN through activation of TFEF independently of mTOR. *FASEB J* **33**, 12374–12391.
- 31 Laderoute KR, Amin K, Calaoagan JM, Knapp M, Le T, Orduna J, Foretz M & Viollet B (2006) 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol* **26**, 5336–5347.
- 32 Zhang J, Wang C, Yu S, Luo Z, Chen Y, Liu Q, Hua F, Xu G & Yu P (2014) Sevoflurane postconditioning protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling. *Sci Rep* **4**, 7317.
- 33 Jacquin MA, Chiche J, Zunino B, Beneteau M, Meynet O, Pradelli LA, Marchetti S, Cornille A, Carles M & Ricci JE (2013) GAPDH binds to active Akt, leading to Bcl-xL increase and escape from caspase-independent cell death. *Cell Death Differ* **20**, 1043–1054.
- 34 Lu Z, Yang H, Sutton MN, Yang M, Clarke CH, Liao WS & Bast RC Jr (2014) ARHI (DIRAS3) induces autophagy in ovarian cancer cells by downregulating the epidermal growth factor receptor, inhibiting PI3K and Ras/MAP signaling and activating the FOXo3a-mediated induction of Rab7. *Cell Death Differ* **21**, 1275–1289.
- 35 Wang X, McCullough KD, Franke TF & Holbrook NJ (2000) Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem* **275**, 14624–14631.
- 36 Song J, Liu Q, Tang H, Tao A, Wang H, Kao R & Rui T (2016) Activation of PI3Kgamma/Akt pathway increases cardiomyocyte HMGB1 expression in diabetic environment. *Oncotarget* **7**, 80803–80810.
- 37 Pasupathy S, Tavella R, Grover S, Raman B, Procter NEK, Du YT, Mahadavan G, Stafford I, Heresztyn T, Holmes A *et al.* (2017) Early use of N-acetylcysteine with nitrate therapy in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-segment-elevation myocardial infarction reduces myocardial infarct size (the NACIAM Trial [N-acetylcysteine in Acute Myocardial Infarction]). *Circulation* **136**, 894–903.
- 38 Varjabedian L, Bourji M, Pourafkari L & Nader ND (2018) Cardioprotection by metformin: beneficial effects beyond glucose reduction. *Am J Cardiovasc Drugs* **18**, 181–193.
- 39 Bost F, Decoux-Poullot AG, Tanti JF & Clavel S (2016) Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy? *Oncogenesis* **5**, e188.
- 40 Riess ML, Kevin LG, Camara AK, Heisner JS & Stowe DF (2004) Dual exposure to sevoflurane improves anesthetic preconditioning in intact hearts. *Anesthesiology* **100**, 569–574.
- 41 De Hert SG, ten Broecke PW, Mertens E, Van Sommeren EW, De Blier IG, Stockman BA & Rodrigus IE (2002) Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. *Anesthesiology* **97**, 42–49.
- 42 Claroni C, Torregiani G, Covotta M, Sofra M, Scotto Di Uccio A, Marcelli ME, Naccarato A & Forastiere E (2016) Protective effect of sevoflurane preconditioning on ischemia-reperfusion injury in patients undergoing reconstructive plastic surgery with microsurgical flap, a randomized controlled trial. *BMC Anesthesiol* **16**, 66.
- 43 Zhao ZQ & Vinten-Johansen J (2002) Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* **55**, 438–455.
- 44 Kroemer G, Galluzzi L & Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**, 99–163.
- 45 Gallogly MM, Shelton MD, Qanungo S, Pai HV, Starke DW, Hoppel CL, Lesnefsky EJ & Miele JJ (2010) Glutaredoxin regulates apoptosis in cardiomyocytes via NFkappaB targets Bcl-2 and Bcl-xL: implications for cardiac aging. *Antioxid Redox Signal* **12**, 1339–1353.
- 46 Cao Y, Li H, Liu H, Zheng C, Ji H & Liu X (2010) The serine/threonine kinase LKB1 controls thymocyte survival through regulation of AMPK activation and Bcl-XL expression. *Cell Res* **20**, 99–108.
- 47 Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J & Zeiher AM (1999) Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med* **189**, 1815–1822.
- 48 Johansson JS, Zou H & Tanner JW (1999) Bound volatile general anesthetics alter both local protein dynamics and global protein stability. *Anesthesiology* **90**, 235–245.
- 49 Matsuyama N, Leavens JE, McKinnon D, Gaudette GR, Aksehirli TO & Krukenkamp IB (2000) Ischemic but not pharmacological preconditioning requires protein synthesis. *Circulation* **102**, III312–III318.
- 50 Bienengraeber M, Pellitteri-Hahn M, Hirata N, Baye TM, Bosnjak ZJ & Olivier M (2013) Quantitative characterization of changes in the cardiac mitochondrial proteome during anesthetic preconditioning and ischemia. *Physiol Genomics* **45**, 163–170.
- 51 Sussman MA, Volkens M, Fischer K, Bailey B, Cottage CT, Din S, Gude N, Avitabile D, Alvarez R,

- Sundararaman B *et al.* (2011) Myocardial AKT: the omnipresent nexus. *Physiol Rev* **91**, 1023–1070.
- 52 Rossello X & Yellon DM (2018) The RISK pathway and beyond. *Basic Res Cardiol* **113**, 2.
- 53 Yu X, Mao W, Zhai Y, Tong C, Liu M, Ma L, Yu X & Li S (2017) Anti-tumor activity of metformin: from metabolic and epigenetic perspectives. *Oncotarget* **8**, 5619–5628.
- 54 Rotermond C, Machetanz G & Fitzgerald JC (2018) The therapeutic potential of metformin in neurodegenerative diseases. *Front Endocrinol* **9**, 400.
- 55 Fontaine E (2018) Metformin-induced mitochondrial complex I inhibition: facts, uncertainties, and consequences. *Front Endocrinol* **9**, 753.
- 56 Zaugg M, Lucchinetti E, Behmanesh S & Clanachan AS (2014) Anesthetic cardioprotection in clinical practice from proof-of-concept to clinical applications. *Curr Pharm Des* **20**, 5706–5726.
- 57 Reitz KM, Marroquin OC, Zenati MS, Kennedy J, Korytkowski M, Tzeng E, Koscum S, Newhouse D, Garcia RM, Vates J *et al.* (2020) Association between preoperative metformin exposure and postoperative outcomes in adults with type 2 diabetes. *JAMA Surg* **155**, e200416.
- 58 Whittington HJ, Hall AR, McLaughlin CP, Hausenloy DJ, Yellon DM & Mocanu MM (2013) Chronic metformin associated cardioprotection against infarction: not just a glucose lowering phenomenon. *Cardiovasc Drugs Ther* **27**, 5–16.
- 59 Techiryan G, Weil BR, Palka BA & Canty JM Jr (2018) Effect of intracoronary metformin on myocardial infarct size in swine. *Circ Res* **123**, 986–995.
- 60 Mohsin AA, Chen Q, Quan N, Rousselle T, Maceyka MW, Samidurai A, Thompson J, Hu Y, Li J & Lesnefsky EJ (2019) Mitochondrial complex I inhibition by metformin limits reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* **369**, 282–290.
- 61 Sauve M, Ban K, Momen MA, Zhou YQ, Henkelman RM, Husain M & Drucker DJ (2010) Genetic deletion or pharmacological inhibition of dipeptidyl peptidase-4 improves cardiovascular outcomes after myocardial infarction in mice. *Diabetes* **59**, 1063–1073.
- 62 Lexis CP, van der Horst IC, Lipsic E, Wieringa WG, de Boer RA, van den Heuvel AF, van der Werf HW, Schurer RA, Pundziute G, Tan ES *et al.* (2014) Effect of metformin on left ventricular function after acute myocardial infarction in patients without diabetes: the GIPS-III randomized clinical trial. *JAMA* **311**, 1526–1535.
- 63 El Messaoudi S, Nederlof R, Zuurbier CJ, van Swieten HA, Pickkers P, Noyez L, Dieker HJ, Coenen MJ, Donders AR, Vos A *et al.* (2015) Effect of metformin pretreatment on myocardial injury during coronary artery bypass surgery in patients without diabetes (MetCAB): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* **3**, 615–623.
- 64 Lexis CP, Wieringa WG, Hiemstra B, van Deursen VM, Lipsic E, van der Harst P, van Veldhuisen DJ & van der Horst IC (2014) Chronic metformin treatment is associated with reduced myocardial infarct size in diabetic patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther* **28**, 163–171.
- 65 Chiari P, Durand M, Desebbe O, Fischer MO, Lena-Quintard D, Palao JC, Mercier C, Samson G, Varillon Y, Pozzi M *et al.* (2019) Multimodal cardioprotective strategy in cardiac surgery (the ProCCard trial): Study protocol for a multicenter randomized controlled trial. *Trials* **20**, 560.
- 66 Branco AF, Pereira SP, Gonzalez S, Gusev O, Rizvanov AA & Oliveira PJ (2015) Gene expression profiling of H9c2 myoblast differentiation towards a cardiac-like phenotype. *PLoS One* **10**, e0129303.
- 67 Genin EC, Madji Hounoum B, Bannwarth S, Fragaki K, Lacas-Gervais S, Mauri-Crouzet A, Lespinasse F, Neveu J, Ropert B, Auge G *et al.* (2019) Mitochondrial defect in muscle precedes neuromuscular junction degeneration and motor neuron death in CHCHD10 (S59L/+) mouse. *Acta Neuropathol* **138**, 123–145.
- 68 Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ & Palecek SP (2013) Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc* **8**, 162–175.
- 69 Ronnback A, Dahlqvist P, Bergstrom SA & Olsson T (2005) Diurnal effects of enriched environment on immediate early gene expression in the rat brain. *Brain Res* **1046**, 137–144.

ARTICLE 2

---

## La metformine protège contre l'ischémie-reperfusion massive induite par l'arrêt cardio-respiratoire

---

L'arrêt cardio-respiratoire (ACR) induit une ischémie-reperfusion (IR) massive. La metformine (MET) est un médicament antidiabétique prescrit dans le monde entier et des données préliminaires suggérant un effet protecteur potentiel dans les inflammations stériles et non stériles. Notre hypothèse est que la MET, en tant que traitement quotidien avant l'admission à l'hôpital, pourrait améliorer le pronostic des patients admis pour un ACR.

Nous avons conçu une étude rétrospective monocentrique sur une période de 6 ans incluant tous les patients admis en soins critiques pour ACR intra- ou extra-hospitalier avec retour d'une circulation spontanée. Un traitement chronique par MET à l'admission au moment de l'AC permet de diviser la cohorte entre les patients sous MET et les autres (respectivement MET contre NoMET) Le critère de jugement principal est la survie à J28. Un modèle de prédiction est établi par un modèle de régression logistique et un modèle de Kaplan Meier pour interpréter l'analyse de survie. Une analyse appariée par scores de propension est effectuée, en utilisant une analyse logistique multivariée afin d'optimiser notre modèle statistique par rapport aux des facteurs de risque associés à la mortalité à J28.

Sur la période étudiée, 555 patients ont été inclus, MET n=62 contre NoMET n=493. La survie à J28 était de 32 % contre 19 % (MET contre NoMET),  $p=0,01$ . L'analyse multivariée, outre les critères associés à la mortalité, montre que la MET est associée de manière indépendante à la survie (OR 0,47 [0,234-0,944]). Les courbes de survie montre une meilleure survie dans le groupe MET, Log-rank 138  $p=0,031$ . L'appariement des scores de propension et le modèle de régression multivariée ont identifié trois critères associés à la mortalité à savoir l'asystolie, les arrêts cardiaques répétés malgré la prise en charge spécialisé et le SAPSII, tandis que le MET reste associée à une meilleure survie (RC 0,384 [0,151-0,975]).

Il s'agit d'une première preuve clinique de l'effet protecteur de la MET contre l'IR la plus sévère rencontrée : l'ACR. Ces données permettraient de valider potentiellement le bénéfice de la MET contre les conséquences de l'IR à court terme et suggère l'intérêt d'aborder cette question chez les patients non diabétiques dans les cas d'inflammation stérile et non stérile.

1 **Title**

2 Does metformin act as a protective drug against a massive ischemia reperfusion injury  
3 induced by a cardiac arrest? A survival study with a propensity score matched analysis

4

5 **Authors rank:** last name / first name / affiliation / academic degree

- 6 1. Rolle Amelie <sup>1\*</sup>, M.D.  
7 2. Rozier Romain <sup>2\*</sup>, M.D.  
8 3. Vallée Barthelemy <sup>1</sup>, M.D.  
9 4. Boucaud-Maitre Denis <sup>3</sup>, M.D.  
10 5. Pommier Jean-David <sup>1</sup>, M.D.  
11 6. Pons Bertrand <sup>1</sup>, M.D.  
12 7. Malhomme Rémi <sup>1</sup>, M.D.  
13 8. Armand Christophe <sup>3</sup>, M.D.  
14 9. Ricci Jean-Ehrland <sup>2</sup>, Ph.D.  
15 10. Martino Frédéric <sup>1</sup>, M.D.  
16 11. Carles Michel <sup>1</sup>, M.D., Ph.D.

17

18 *\* These authors equally contributed to the study*

19

20

21 **Affiliations**

- 22 1. Intensive Care Department, University Hospital, Guadeloupe, French West Indies, France  
23 2. Universite Cote d'Azur, INSERM, C3M - Nice, France  
24 3. Epidemiology and Biostatistics, University Hospital, Guadeloupe, French West Indies,  
25 France

26

27

28



29 **Corresponding author:**

30 Michel CARLES, MD, PhD

31 Intensive Care Unit

32 Guadeloupe University Hospital

33 28 route de Chauvel, Les Abymes 97159

34 Guadeloupe, French West Indies – France

35 Phone : + 33 6 37 37 74 43 / + 590 590 89 17 74

36 E-mail : [carles.michel@gmail.com](mailto:carles.michel@gmail.com) / [michel.carles@chu-guadeloupe.fr](mailto:michel.carles@chu-guadeloupe.fr)

37

38

39

40 **Short title:** protection by metformin against ischemia-reperfusion injury after cardiac arrest

41

42 **Key-words:** metformin – cardiac arrest – ischemia-reperfusion – survival – propensity score

43

44 **Word count: 3508**

45 - Title : 27

46 - Abstract : 307

47 - Introduction : 460

48 - Method : 1030

49 - Results : 464

50 - Discussion : 1220

51

52 References n=37

53 Tables n=4

54 Figure n=1

55 Appendix supplemental data: tables n=2

56 Michel CARLES, corresponding author, have full access to all the data in the study and takes  
57 responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

58 Authors' contributions:

59 **Amélie Rolle:** study design, data management, statistical expertise, interpretation of the  
60 findings, critical review of the manuscript

61 **Romain Rozier:** conception of the study, study design, interpretation of the findings, critical  
62 review of the manuscript

63 **Vallée Barthelemy:** data management, critical review of the manuscript

64 **Boucaud-Maitre Denis:** study design, data management, statistical expertise

65 **Pommier Jean-David:** interpretation of the findings, critical review of the manuscript

66 **Pons Bertrand:** interpretation of the findings, critical review of the manuscript

67 **Malhomme Rémi:** interpretation of the findings, critical review of the manuscript

68 **Armand Christophe:** data management, statistical expertise, critical review of the manuscript

69 **Ricci Jean-Ehrland:** conception of the study, critical review of the manuscript

70 **Martino Frédéric:** Interpretation of the findings, critical review of the manuscript

71 **Carles Michel:** conception of the study, study design, data management, statistical expertise,  
72 interpretation of the findings, critical review of the manuscript

73 All authors read and approved the final manuscript.

74

75 Disclosure of potential conflicts of interest, including financial interests, activities,  
76 relationships, and affiliations; sources of funding and support (over the past 3 years):

77 **Amélie Rolle:** none

78 **Romain Rozier:** none

79 **Vallée Barthelemy:** none

80 **Boucaud-Maitre Denis:** none

81 **Pommier Jean-David:** none

82 **Pons Bertrand:** none

83 **Malhomme Rémi:** none

84 **Armand Christophe:** none

85 **Ricci Jean-Ehrland:** none

86 **Martino Frédéric:** none

87 **Carles Michel:** financial support (meeting in 2019) SOS Oxygen™ company

88

89 Funding: none

90

91 **Acknowledgments:** Pr S.Jaber (Montpellier University Hospital) for its review, friendly help and  
92 advices.

93

94

95

96 **Key points**

97 **Question:** Is metformin able to protect against a massive ischemia reperfusion injury induced  
98 by a cardiac arrest?

99 **Findings:** We conducted a retrospective cohort study of 555 patients admitted for a  
100 resuscitated cardiac arrest in the Intensive Care Unit (ICU), over a 6 years period. Patients  
101 under metformin at the time of cardiac arrest exhibit a better D28 survival (Kaplan Meier with  
102 Mantel-cox model, log-rank  $p=0.031$ ), confirmed by the propensity score matching and a  
103 multivariable regression modelling.

104 **Meaning:** a chronic treatment by metformin improve survival after a cardiac arrest, allowing  
105 to explore its efficacy in various ischemia reperfusion conditions.

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117 **Abstract**

118 **Importance:** Cardiac arrest (CA) induces a massive ischemia-reperfusion (IR). Metformin (MET)  
119 is a worldwide-prescribed antidiabetic drug, with preliminary data suggesting a potential  
120 protective effect in sterile and non-sterile inflammation.

121 **Objective:** Our hypothesis is that MET, as a daily treatment before hospital admission, could  
122 improve the prognosis of patients admitted for a CA.

123 **Design:** Retrospective study of patients admitted for a resuscitated CA in the Intensive Care  
124 Unit (ICU), over a 6 years period.

125 **Setting:** Single academic ICU.

126 **Participants:** All consecutive patients admitted in the ICU after an In- or Out-of-Hospital CA  
127 with return of a spontaneous circulation.

128 **Exposure:** MET intake at the time of the CA allows splitting the cohort between patients under  
129 MET *versus* others (MET *versus* NoMET)

130 **Main Outcome and measures:** Survival at D28. A predicting model is established by a logistic  
131 regression model and Kaplan Meier estimator to compute a survival analysis. Propensity score  
132 matched analysis is performed, using a logistic multivariate analysis to obtain an optimized  
133 model of risk factors associated to the D28 mortality.

134 **Results:** Over the period study, 555 patients are included, MET n=62 *versus* NoMET n=493.  
135 Survival at D28 was 32% vs 19% (MET vs NoMET), p=0.01. The multivariate analysis, besides  
136 several mortality-associated criteria, MET is an independent criterion associated with survival  
137 (OR 0.470 [0.234-0.944]). The survival curves showed a better survival in the MET, Log-rank  
138 p=0.031. The propensity score matching and multivariable regression modelling identified  
139 three criteria associated to death (i.e. asystole on the first EKG, subsequent repeated cardiac  
140 arrest and SAPSII), while MET is associated to survival (OR 0.384 [0.151-0.975]).

141 **Conclusion and relevance:** This is a first clinical evidence of a protective effect of MET against  
142 the most severe IR, i.e. CA. These data will help to validate MET's benefit against short-term  
143 IR consequences, while this should be addressed in non-diabetic patients and in sterile and  
144 non-sterile inflammation.

145 **Introduction**

146 Ischemia-reperfusion (IR), *i.e.* tissue hypoxia (blood supply restriction) followed by  
147 reoxygenation (restored perfusion), is involved in frequent clinical circumstances, from  
148 myocardial infarction to sickle cell disease, is also a major mechanism of post-surgical morbi-  
149 mortality, and the primary factor of cardiac arrest poor prognosis<sup>1,2</sup>. Since foremost causes of  
150 worldwide mortality are ischemic heart disease and stroke (except for sub Saharan Africa), IR  
151 represents a global health challenge<sup>3</sup>. Therefore, it is a major concern for physicians and  
152 significant efforts are made to prevent and/or protect against IR deleterious consequences.

153 Cardiac arrest is an universal health issue<sup>4</sup>. Cardiopulmonary resuscitation (CPR) is the  
154 recommended algorithm allowing the heart to recover<sup>5</sup>. Thus, CPR, by restoring organ  
155 perfusion after a cardiac output breakdown, is a whole multiorgan IR condition. Medication  
156 taken at the time of the cardiac arrest could have consequences on the prognosis, mainly if  
157 they own protective properties against IR, as reported for some drugs in other critical  
158 conditions, for instance statins in ICU-admitted patients<sup>6</sup>. Main improvement of cardiac arrest  
159 prognosis overtime have been made by reducing the time to rescue but no medication has  
160 proven yet its benefit in term of short term survival.

161 Pharmacological pre- or post-conditioning aims to reduce IR injury by an exposure to a drug  
162 acting on signaling pathways involved in molecular response to IR<sup>7</sup>; several candidates have  
163 been assessed over the last 30 years, with disappointing results at the time, particularly in  
164 comparison with ischemic preconditioning<sup>7,8</sup>.

165 Metformin is a worldwide-prescribed antidiabetic drug, acting as an insulin-sensitizing agent  
166 that reduces hepatic glucose output and increases the uptake of glucose in peripheral tissues.

167 Metformin ability to be a IR preconditioning drug has been explored in animal models with  
168 equivocal results in either diabetic or non-diabetic models<sup>9,10</sup>. Potential mechanisms of action

169 and molecular targets of metformin cardio protective drug have been reviewed elsewhere<sup>11</sup>.  
170 A prospective randomized clinical studies in non-diabetic patients was unable to demonstrate  
171 a benefit of metformin, given as a postconditioning<sup>12</sup> treatment, on myocardial IR damages.  
172 However, consistent with preclinical data, several clinical reports plead for a potential  
173 protective effect of metformin in various settings of sterile and non-sterile inflammation,  
174 including IR<sup>13-16</sup>.

175 Diabetes, as well as hypertension, obesity and smoking, is a recognized global risk factor of  
176 coronary heart disease<sup>17</sup>, which is a leading cause of cardiac arrest. Retrospective data  
177 suggests that diabetes status could be associated with a decrease in survival after an in- or  
178 out-hospital cardiac arrest (IHCA or OHCA)<sup>18</sup>, but without reporting patient's treatment at the  
179 time of the cardiac arrest<sup>19</sup>.

180 The hypothesis of this study is that metformin, as a daily treatment before hospital admission,  
181 could improve the prognosis of patients admitted in the Intensive Care Unit (ICU) for a cardiac  
182 arrest, compared to patients without previous metformin treatment, regardless of diabetes  
183 status.

184

185

186

187

188

189

190

191

192 **Method**

193 *Study design and setting*

194 We performed a retrospective single academic medical center study (University Hospital of  
195 Guadeloupe UHG, French West Indies – Guadeloupe, France) including patients admitted for  
196 a resuscitated cardiac arrest in the ICU (the sole on the Island). Guadeloupe is a French island  
197 in the Leeward Islands (Lesser Antilles) and, at the administrative level, an overseas  
198 department and an outermost region of the European Union, sharing the same health system  
199 than mainland France. The population is around 400000 people, mainly Afro-Caribbean, but  
200 also white European, Indian, Middle-Eastern and Chinese.

201 The urgent medical aid service, i.e. SAMU, provides advanced emergency treatment to OHCA  
202 or IHCA in Guadeloupe, bringing each surviving patient after an initial CPR to the UHG-ICU.  
203 The most remote places from UHG over the island are less than 70 kilometers (43 miles) from  
204 the UHG, with emergency transportation by road or air (helicopter). The SAMU standard of  
205 care follows the French guidelines for cardiac arrest (SFMU, <https://www.sfm.org>).  
206 Defibrillator availability outside the UHG is unlikely, due to the under equipment of the  
207 territory.

208 Guadeloupe has in excess cardiovascular diseases and a high rate of diabetes, around two  
209 times more in comparison to mainland France, as well as a higher crude mortality rate<sup>20</sup>.

210 After approval by our institutional ethical review board (registration number  
211 11\_092019\_METAC) of all aspects of this study, including a waiver of informed consent, all  
212 patients admitted to the ICU for resuscitated cardiac arrest, no matter OHCA or IHCA, were  
213 retrospectively included, as well as those having a cardiac arrest during ICU hospitalization if a

214 minimal return of a spontaneous circulation ROSC of 20 minutes was obtained. Cardiac arrest  
215 is defined as a patient who received chest compressions or defibrillation and ROSC.

216 Data were extracted from the ICU computerized medical charts and the PMSI, a registered  
217 database driven by the French Data Protection Authority, CNIL, approval number 1371635 -  
218 v0. To note, the full pre hospital timing was not available for analysis because the lack of  
219 computerized SAMU medical chart, except No-Flow and Low-Flow times.

#### 220 *Clinical and biological data*

221 For analysis, demographics data (birthdate, sex), past medical history from the relatives,  
222 family practitioners and personal prescriptions reported in the ICU medical chart were  
223 collected. Site of cardiac arrest (OHCA or IHCA), dates of entry, discharge from ICU and death  
224 if so, were reported within 28 days (4 weeks) after hospital admission. Initial biological data  
225 are extracted from the hospital laboratory (DBSYNERGY™ software).

226 Duration of No-Flow, as time from cardiac arrest to CPR beginning and Low-Flow as times  
227 with active CPR, were systematically collected.

228 Severity scoring as SAPSII, predictive of the in-hospital mortality, and SOFA (sequential organ  
229 failure assessment score) to evaluate the multiple organ failure, were calculated for each  
230 patients.

#### 231 *Analysis and statistical method*

232 Anonymized data were entered on an Excel™ - Microsoft sheet and once completed (after  
233 exclusion of incomplete charts), transferred to IBM® – SPSS® statistics software (v 24.0.0.0)  
234 for analysis.

235 Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation or percentages. In accordance with the aim  
236 of the study, initial description of the cohort was followed by an *a posteriori* comparative



237 study. Comparison were scheduled to assess patients under metformin at the time of cardiac  
238 arrest *versus* others (MET *versus* NoMET), and survival at D28 (alive *versus* deceased groups).  
239 We derived a predicting model of mortality at the admission in the ICU after an OHCA/IHCA  
240 by using variables that are clinically relevant and available at the time of ICU admission. The  
241 model (logistic regression) was reduced using a stepwise backward elimination process based  
242 on a liberal P value of 0.20 or if the efficiency of the model was impacted as a result of the  
243 removal of the variable. Univariate comparative study used Chi-2 or Fisher exact tests  
244 (depending on data distribution) to compare categorical variables, and a Student-t test or a  
245 Mann Whitney U-test (if required) for continuous variables. For the multivariate model, data  
246 are reported as Odd ratio and 95% confidence intervals.

247 The Kaplan Meier estimator was used to compute a survival analysis between the two groups  
248 (MET *versus* NoMET). The non-parametric Log rank test (Mantel-Cox model) was associated  
249 to estimate the survival difference between groups. A secondary stratified analysis taking into  
250 account the low-flow duration (cut-off 20 min, based on previously published data<sup>21</sup>) was  
251 planned. Tests were interpreted at the significance level ( $\leq 0.05$ ).

252 Then, we performed a propensity score matched analysis; first to estimate the probability to  
253 receive metformin; second to match each patient to a control we used following methods  
254 ("exact", "nearest", "subclass"); Third to evaluate quality of matching and finally evaluate the  
255 outcome (D28 survival, express by odds ratio OR). Covariates for the propensity-score model  
256 were chosen by starting with a model including only age, sex, BNP, CRP, which were thought  
257 to be confounders for metformin treatment and outcome of interest<sup>22</sup> and then added  
258 additional clinical covariates that needed to be balanced between metformin treated and  
259 non-treated (control) groups. The following covariates were included in the final model: age

260 (years), sex, diabetes, arterial hypertension, renal insufficiency, cardiac failure, dyslipidemia,  
261 statins, obesity, tobacco, insulin therapy.

262 We finally used a logistic multivariate analysis to perform an optimized model of risk factor  
263 associated to the D28 mortality, using variables adjusted to the propensity score.

#### 264 *Sample size calculation*

265 Based on preliminary data from our ICU, we hypothesized that 30% of patients admitted in  
266 ICU are diabetic and 30% of diabetic patients are taking metformin at the time of the cardiac  
267 arrest. Based on literature data, we assumed that the overall in-hospital mortality for cardiac  
268 arrest admitted in ICU (no matter OHCA or IHCA) was roughly 80%<sup>23</sup>. Our hypothesis is that  
269 patients under metformin at the time of cardiac arrest should have a 15% hospital mortality  
270 decrease, in comparison with cardiac arrests without metformin (regardless of the diabetic  
271 status). Aiming to obtain an Odd ratio of mortality occurrence less than 1 with a 95%  
272 confidence interval not including 1 ( $p \leq 0.05$ ) for patients under metformin (as an approach of  
273 the relative risk), the minimal number of patients to be included is 510. Taking into account  
274 the admission of 91 patients in 2018 in our ICU for a resuscitated cardiac arrest, a  
275 retrospective inclusion period of 6 years was scheduled.

276

277

## 278 Results

279 The period of inclusion was December 1<sup>st</sup>, 2012 to December 1<sup>st</sup>, 2018 to achieve a minimal  
280 sample size of 510 patients, as expected (see upper). On a total of 1152 identified patients with a  
281 diagnosis of cardiac arrest (PMSI database), 597 were excluded for some reasons (no resuscitation  
282 and/or no ROSC n=256, misdiagnosis n=168, pediatric cases n=129, missing data n=36, duplicates  
283 n=8), a total of 555 patients were finally included for analysis on the study period.

284 General data are reported table 1; as reported in this table 411 IHCA are reported (74% of the  
285 total) among them 226/411 (55%) during the first 48h.

286 On purpose to assess differences between patients under metformin *versus* not (MET *versus*  
287 NoMET), comparative data are also reported table 1. The hypothesis of metformin-intoxication  
288 was evoked in 4 cases in MET (no metformin dosage), with immediate dialysis for all of them and  
289 no early death (during the first 48h of ICU admission).

290 Related to a significant decrease of crude mortality in MET *versus* NoMET, we then reported the  
291 data comparison, at D28, of living *versus* deceased patients (table 2). Besides the previously  
292 described criteria of severity of cardiac arrest, such as SAPSII and SOFA scores, NoFlow/LowFlow  
293 duration, asystole and higher lactate level, a treatment with metformin is conversely associated  
294 with a better prognosis (two times more treated patients in the survival group).

295 Comparison of patients whether they are diabetic (n=202) or not is reported in appendix, table A.  
296 Among diabetic patients (n=202), the mortality in the MET (n=62) *versus* the NoMET (n=140) was  
297 68% vs 81%, p=0.04. We then compare living (n=47) *versus* deceased (n=155) diabetic patients at  
298 D28 (see appendix, table B).

299 The multivariate analysis of the full cohort (n=555) identified independent criteria associated to  
300 D28 mortality : Asystole on the first EKG (OR 3.937 [2.314-6.666]), Number of iterative cardiac  
301 arrest (OR 1.691 [1.165-2.454], SOFA (OR 1.430 [1.197-1.707]), No-Flow (OR 1.144 [1.007-1.300]),

302 Lactate (OR 1.086 [1.026-1.149]), Low-flow (OR 1.078 [1.044-1.114], SAPSII (OR 1.019 [1.008-  
303 1.030]); treatment with metformin at the time of the cardiac arrest being an independent criterion  
304 associated with survival (OR 0.470 [0.234-0.944]).

305 The survival curves (Kaplan Meier) reported figure 1, showed a better survival in MET through 28  
306 days (panel A, log-rank test; p=0.031); we then reported survival curves of stratified data on the  
307 ischemia duration (Low-Flow cut-off = 20 minutes) combined to metformin treatment or not  
308 (panel B, stratified log-rank test; p =0.026).

309 Table 3 presents the main characteristics of MET versus NoMET, before and after matching.

310 The predicting model for D28 death-related criteria, after adjusting to the propensity score,  
311 shows that three criteria previously reported in the multivariate analysis remains significantly  
312 associated to death (i.e. Asystole on the first EKG, subsequent repeated cardiac arrest and  
313 SAPSII) while metformin remains significantly associated to survival (table 4).

314

## 315 Discussion

316 In diabetic patients, suffering of massive IR related to a resuscitated cardiac arrest, a current  
317 treatment by metformin is associated with a better survival (15% more surviving patients at  
318 D28). This benefit seems to be even more significant when the time of multiorgan hypoxia (as  
319 roughly assessed by the Low-Flow duration) is longer, strengthening our findings. Using a  
320 propensity score matching reinforces our conclusions by reducing potential selection bias and  
321 confounding. These results suggest a protective effect of metformin and are important to  
322 initiate prospective evaluations, in the way to better define how to get the clinical protective  
323 effect of metformin against IR injuries, in various settings.

324 Since patients with and without a current treatment with metformin evidenced a very similar  
325 cardiac arrest history, in terms of initial location (more than two-thirds of IHCA), duration of  
326 hypoxia during CPR, severity scoring, biological data witnessing tissue metabolic injury (as  
327 does lactate<sup>24</sup>) and etiology for the cardiac arrest, our results are based on consistent data.  
328 Because OHCA have some differences with IHCA, in term of so called “chain of survival” and  
329 survival rate<sup>25</sup>, it is important to underline that the same distribution of cardiac arrest  
330 settings (OHCA *versus* IHCA) were included in the two groups (MET *versus* NoMET).  
331 Differences between groups are in accordance with metformin use, the MET group including  
332 obviously only diabetic patients (so, associated with more hypertension, obesity and  
333 dyslipidemia<sup>25</sup>) whereas the NoMET group has only a third of diabetic patients. To note, at the  
334 time of the cardiac arrest, no difference is noticed between MET and NoMET, for cardiac  
335 arrest data and biological one (suggesting no metformin-related renal impairment or over  
336 dosage), as well as for severity scoring. Altogether, these points support a good consistency of  
337 our data and the relevance of inferred results. Lastly, we pointed out that, for obvious

338 reasons, only retrospective studies can be designed to address this issue (i.e. metformin  
339 previous treatment and cardiac arrest survival).

340 Analysis of D28 mortality-associated criteria identify some of usual and previously reported  
341 risks<sup>23</sup>, as duration of No- or Low-Flow, number of repeated cardiac arrest, higher frequency  
342 of asystole on the first EKG, and higher lactate and renal impairment on the first post cardiac  
343 arrest blood tests; the severity scoring are also consistent with the prognosis. Therapeutic  
344 hypothermia was done for less than 10% of patients, so an analysis of this criterion was not  
345 justified, besides the fact that this approach remains questionable<sup>26</sup>. Another adjunctive  
346 therapy for cardiac arrest (and still under evaluation), extracorporeal membrane oxygenation  
347 (ECMO) was not quantifiable in our study; indeed, due to the remoteness of the only ECMO-  
348 provider center in the French West Indies (University hospital, Martinique island), no patient  
349 was treated by ECMO-assisted CPR.

350 Patients in the MET has 13% supplemental survival likelihood (MET *versus* NoMET analysis)  
351 and those in the surviving group took twice time more metformin (alive *versus* deceased  
352 analysis). To note, statin treatment, a putative preconditioning drug against sterile  
353 inflammation, didn't exhibit difference between groups<sup>27</sup>. The model derived from the  
354 multivariate analysis on mortality strengthens these results, with metformin treatment  
355 showing up as the sole protective criterion in term of mortality.

356 Because, in the control group there were not only diabetic patients, we showed that in the  
357 subgroup of diabetic patients with and without metformin, survival difference and survival-  
358 related criteria were almost the same. In addition and for the same reasons, a propensity  
359 score approach was used to adjust for selection bias and confounding. Thus, the use of  
360 propensity score matching and multivariable regression modelling allow, in a robust manner,  
361 to demonstrate that three criteria are closely related to D28 mortality (asystole on the first

362 EKG, number of iterative cardiac arrest and SAPSII), while metformin remains the only  
363 protective criterion.

364 The survival curve suggests that the survival difference appears early (5 to 7 days after the  
365 cardiac arrest) and keeps stable overtime. With an overall mortality as high as 79% and the  
366 strong link between death and the Low-Flow duration<sup>21,23</sup>, we were interested to look at  
367 whereas the putative protective effect of metformin whatever the severity of ischemia. We  
368 choose the cut-off of 20 minutes of Low-Flow because it has been recognized as the relevant  
369 prognosis threshold<sup>21</sup>. After stratification on Low-Flow duration, our results suggest that the  
370 protective effect of metformin remains in the subgroup with the longest duration of ischemia.

371 Metformin appears to be protective against IR injuries, but data in the literature are  
372 controversial at different levels. First, it is not clear if metformin acts as a preconditioning or  
373 post conditioning agent short time before or right after the IR event, both hypothesis  
374 supported by preclinical data, or as a protective treatment in the setting of a chronic intake  
375 before the IR event<sup>10,28-30</sup>. Next, it is not proven that metformin could work no matter the  
376 diabetic status, data even more suggesting a restricted effect to diabetic patients<sup>31</sup>. Also, a  
377 role of the diabetic status itself in response of a IR event has been suggested<sup>32</sup>; thus the  
378 balance between a protective role of metformin and a worsening status, i.e. diabetes,  
379 remains an unresolved issue. Clinical data stay scarce, focusing on myocardial ischemia<sup>33</sup>.  
380 Prospective data remains disappointing particularly in non-diabetic patients<sup>31,34</sup>, whereas  
381 chronic metformin treatment in diabetic could be effective<sup>29</sup>. Interestingly, an article more  
382 than ten years ago in diabetic patients scheduled for surgery evaluated the postoperative  
383 events, related to the timing of the last metformin intake. The authors reported that,  
384 conversely to the recommended avoidance of preoperative metformin in scheduled surgery,  
385 closer to the surgery is the last metformin intake lower would be the occurrence of

386 postoperative events<sup>35</sup>. Finally, our data refers clearly to a protective effect of metformin  
387 under the condition of a chronic treatment.

388 Our study has some limits, mainly due to its retrospective design. If the metformin treatment  
389 was reliably reported by patients or relatives in the medical charts, we cannot report the  
390 duration of metformin treatment prior to the cardiac arrest nor the glycosylated hemoglobin  
391 of diabetic patients, because of the deficient medical follow up (for several reasons including  
392 lack of family practitioners and endocrinologists) in Guadeloupe. Thus, no data on diabetes  
393 severity before cardiac arrest can be evaluated. Even if comparisons are reassuring, mixing  
394 OHCA and IHCA could induce unexpected bias. The data regarding the delay between the loss  
395 of consciousness and the beginning of the CPR are also lacking and could be a bias, partially  
396 minimized comparable data on patient's severity (scoring, lactate, etc...).

397 The mechanisms involved in such protective properties are still under investigation: signaling  
398 pathways supporting the protective effect of metformin against IR have been extensively  
399 explored, like reactive oxygen species, HIF, apoptotic signaling and more; all were assessed  
400 with encouraging data without being able to propose a global picture<sup>9,36,37</sup>.

401

402 In conclusion, this study is the first clinical evidence of the protective effect of metformin  
403 against the most severe IR phenomenon, i.e. cardiac arrest, involving all human organs at the  
404 same time. We believe that these data will help to validate the benefit of metformin, as a  
405 chronic treatment, against IR injuries. Because of millions diabetic people around the world  
406 and the potential benefit of metformin, prospective clinical data are required to define larger  
407 indications and more precise treatment schemes of this drug. Finally, the potential benefit in  
408 non-diabetic patients and in sterile as well as non-sterile inflammation should be addressed.



409 **References**

- 410 1. Eltzschig, H. K. & Eckle, T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat.*  
411 *Med.* **17**, 1391–1401 (2011).
- 412 2. Collard, C. D. & Gelman, S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of  
413 Ischemia-Reperfusion Injury: *Anesthesiology* **94**, 1133–1138 (2001).
- 414 3. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-  
415 sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a  
416 systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Lond. Engl.* **385**,  
417 117–171 (2015).
- 418 4. Wong, C. X. *et al.* Epidemiology of Sudden Cardiac Death: Global and Regional Perspectives.  
419 *Heart Lung Circ.* **28**, 6–14 (2019).
- 420 5. Kleinman, M. E. *et al.* 2017 American Heart Association Focused Update on Adult Basic Life  
421 Support and Cardiopulmonary Resuscitation Quality: An Update to the American Heart  
422 Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular  
423 Care. *Circulation* **137**, e7–e13 (2018).
- 424 6. Huang, C.-H. *et al.* Relationship Between Statin Use and Outcomes in Patients Having  
425 Cardiac Arrest (from a Nationwide Cohort Study in Taiwan). *Am. J. Cardiol.* **123**, 1572–1579  
426 (2019).
- 427 7. Heusch, G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-,  
428 and remote conditioning. *Circ. Res.* **116**, 674–699 (2015).
- 429 8. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat. Rev.*  
430 *Cardiol.* **13**, 193–209 (2016).
- 431 9. Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M. & Viollet, B. Metformin: from mechanisms of  
432 action to therapies. *Cell Metab.* **20**, 953–966 (2014).
- 433 10. Miki, T., Itoh, T., Sunaga, D. & Miura, T. Effects of diabetes on myocardial infarct size  
434 and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc. Diabetol.* **11**, 67  
435 (2012).
- 436 11. Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M. & Viollet, B. Metformin: from  
437 mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* **20**, 953–966 (2014).
- 438 12. Lexis, C. P. H. *et al.* Effect of Metformin on Left Ventricular Function After Acute  
439 Myocardial Infarction in Patients Without Diabetes: The GIPS-III Randomized Clinical Trial.  
440 *JAMA* **311**, 1526 (2014).
- 441 13. Lexis, C. P. H. *et al.* Chronic metformin treatment is associated with reduced  
442 myocardial infarct size in diabetic patients with ST-segment elevation myocardial  
443 infarction. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **28**, 163–171 (2014).
- 444 14. Christiansen, C. *et al.* Preadmission metformin use and mortality among intensive care  
445 patients with diabetes: a cohort study. *Crit. Care Lond. Engl.* **17**, R192 (2013).
- 446 15. Liang, H. *et al.* Association of preadmission metformin use and mortality in patients  
447 with sepsis and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies.  
448 *Crit. Care Lond. Engl.* **23**, 50 (2019).

- 449 16. Li, J. *et al.* Protective Effect of Metformin on Myocardial Injury in Metabolic Syndrome  
450 Patients following Percutaneous Coronary Intervention. *Cardiology* **127**, 133–139 (2014).
- 451 17. Yusuf, S. *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial  
452 infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet Lond. Engl.*  
453 **364**, 937–952 (2004).
- 454 18. Echouffo-Tcheugui, J. B., Kolte, D., Khera, S., Bhatt, D. L. & Fonarow, G. C. Comparison  
455 of Survival After In-Hospital Cardiac Arrest in Patients With Versus Without Diabetes  
456 Mellitus. *Am. J. Cardiol.* **121**, 671–677 (2018).
- 457 19. Parry, M., Danielson, K., Brennenstuhl, S., Drennan, I. R. & Morrison, L. J. The  
458 association between diabetes status and survival following an out-of-hospital cardiac  
459 arrest: A retrospective cohort study. *Resuscitation* **113**, 21–26 (2017).
- 460 20. Filipovic-Pierucci, A., Rigault, A., Fagot-Campagna, A. & Tuppin, P. [Health status of  
461 populations living in French overseas territories in 2012, compared with metropolitan  
462 France: An analysis of the national health insurance database]. *Rev. Epidemiol. Sante  
463 Publique* **64**, 175–183 (2016).
- 464 21. Goldberger, Z. D. *et al.* Duration of resuscitation efforts and survival after in-hospital  
465 cardiac arrest: an observational study. *Lancet Lond. Engl.* **380**, 1473–1481 (2012).
- 466 22. Bergmark, B. A. *et al.* Metformin Use and Clinical Outcomes Among Patients With  
467 Diabetes Mellitus With or Without Heart Failure or Kidney Dysfunction: Observations From  
468 the SAVOR-TIMI 53 Trial. *Circulation* **140**, 1004–1014 (2019).
- 469 23. Andersen, L. W., Holmberg, M. J., Berg, K. M., Donnino, M. W. & Granfeldt, A. In-  
470 Hospital Cardiac Arrest: A Review. *JAMA* **321**, 1200–1210 (2019).
- 471 24. Gattinoni, L. *et al.* Understanding Lactatemia in Human Sepsis: Potential Impact for  
472 Early Management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2019) doi:10.1164/rccm.201812-  
473 23420C.
- 474 25. Writing Group Members *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A  
475 Report From the American Heart Association. *Circulation* **133**, e38-360 (2016).
- 476 26. Chan, P. S. *et al.* Association Between Therapeutic Hypothermia and Survival After In-  
477 Hospital Cardiac Arrest. *JAMA* **316**, 1375–1382 (2016).
- 478 27. Christensen, S. *et al.* Preadmission statin use and one-year mortality among patients in  
479 intensive care - a cohort study. *Crit. Care Lond. Engl.* **14**, R29 (2010).
- 480 28. Yin, M. *et al.* Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-  
481 MI heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**, H459-468 (2011).
- 482 29. Lexis, C. P. H. *et al.* Chronic metformin treatment is associated with reduced  
483 myocardial infarct size in diabetic patients with ST-segment elevation myocardial  
484 infarction. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **28**, 163–171 (2014).
- 485 30. Gundewar, S. *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves  
486 left ventricular function and survival in heart failure. *Circ. Res.* **104**, 403–411 (2009).
- 487 31. Lexis, C. P. H. *et al.* Effect of Metformin on Left Ventricular Function After Acute  
488 Myocardial Infarction in Patients Without Diabetes: The GIPS-III Randomized Clinical Trial.  
489 *JAMA* **311**, 1526 (2014).

- 490 32. Parry, M., Danielson, K., Brennenstuhl, S., Drennan, I. R. & Morrison, L. J. The  
491 association between diabetes status and survival following an out-of-hospital cardiac  
492 arrest: A retrospective cohort study. *Resuscitation* **113**, 21–26 (2017).
- 493 33. Nesti, L. & Natali, A. Metformin effects on the heart and the cardiovascular system:  
494 A review of experimental and clinical data. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* **27**, 657–  
495 669 (2017).
- 496 34. El Messaoudi, S. *et al.* Effect of metformin pretreatment on myocardial injury during  
497 coronary artery bypass surgery in patients without diabetes (MetCAB): a double-blind,  
498 randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **3**, 615–623 (2015).
- 499 35. Duncan, A. I. *et al.* Recent metformin ingestion does not increase in-hospital morbidity  
500 or mortality after cardiac surgery. *Anesth. Analg.* **104**, 42–50 (2007).
- 501 36. El Messaoudi, S., Rongen, G. A., de Boer, R. A. & Riksen, N. P. The cardioprotective  
502 effects of metformin. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 445–453 (2011).
- 503 37. Takiyama, Y. *et al.* Tubular injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by  
504 metformin: a possible role of HIF-1 $\alpha$  expression and oxygen metabolism. *Diabetes* **60**, 981–  
505 992 (2011).
- 506
- 507
- 508
- 509
- 510
- 511
- 512
- 513
- 514
- 515
- 516
- 517
- 518

Table 1:

	All patients n=555	NoMET n=493	MET n=62	p value
Sex ratio (male/female)	1.5	1.5	1.3	0.69
Age, mean (SD)	61.7 (15.7)	61.3 (16.2)	65.7 (10.8)	0.03
<b>Underlying condition</b>				
Diabetes, n (%)	202 (36)	140 (28)	60 (100)	<0.01
Hypertension, n (%)	318 (57)	259 (52)	59 (95)	<0.01
Obesity (IMC over 35 kg/m <sup>2</sup> ), n (%)	74 (13)	56 (11)	18 (29)	<0.01
Cardiac insufficiency, n (%)	103 (18)	93 (19)	10 (16)	0.60
Chronic renal insufficiency, n (%)	87 (16)	84 (17)	3 (5)	0.01
Dyslipidemia, n (%)	78 (14)	59 (12)	19 (31)	<0.01
Coronaropathy, n (%)	67 (12)	58 (12)	9 (15)	0.53
Cancer, n (%)	51 (9)	47 (10)	4 (6)	0.42
<b>Antidiabetic and statin treatments</b>				
Insulin, n (%)	90 (16)	76 (15)	14 (23)	0.14
Metformin, n (%)	62 (11)	0	62 (100)	<0.01
Oral antidiabetics other than Metformin, n (%)	58 (10)	34 (7)	24 (39)	<0.01
Statin, n (%)	107 (19)	80 (16)	27 (44)	<0.01
<b>Cardiac arrest features</b>				
In-hospital setting (vs Out-of-hospital), n (%)	411 (74)	363 (74)	48 (77)	0.52
No flow (min), mean (SD)	1.5 (3.2)	1.7 (3.4)	0.9 (1.8)	0.25
Low flow (min), mean (SD)	15.9 (13.2)	16.0 (12.7)	15.2 (16.6)	0.16
First EKG: asystole (vs other), n (%)	395 (71)	353 (72)	42 (68)	0.62
Etiology: cardiac, n (%)	188 (34)	165 (33)	23 (37)	0.56
Etiology: respiratory, n (%)	160 (29)	142 (29)	18 (29)	0.97
Etiology: metabolic, n (%)	67 (12)	55 (11)	12 (19)	0.06
Subsequent repeated cardiac arrests, mean (SD)	1.5 (1.1)	1.5 (0.9)	1.8 (2.0)	0.87
<b>Initial biological blood test (at ICU admission)</b>				
Leucocytes (giga/L), mean (SD)	13.2 (8.7)	13.0 (8.5)	14.7 (10.1)	0.16
Platelets (giga/L), mean (SD)	202 (130)	200 (134)	224 (96)	0.17
Hemoglobin (g/dL), mean (SD)	10.7 (2.9)	10.7 (2.9)	11.2 (2.8)	0.19
Lactate (mmol/L), mean (SD)	8.0 (5.9)	8.0 (5.9)	8.2 (5.9)	0.83
Glycemia (mmol/L), mean (SD)	11.8 (8.0)	11.5 (8.1)	13.5 (7.3)	0.02
Urea (mmol/l), mean (SD)	12.2 (10.0)	11.9 (10.0)	14.9 (10.2)	0.03
Creatininemia (μmol/L), mean (SD)	248 (261)	239 (249)	309 (333)	0.20
Bicarbonates (mmol/l), mean (SD)	17.5 (6.6)	17.6 (6.6)	17.3 (7.3)	0.79
pH, mean (SD)	7.2 (0.2)	7.2 (0.2)	7.2 (0.2)	0.88
<b>Initial scoring and follow up</b>				
SAPS II, mean (SD)	75 (23)	74 (23)	76 (22)	0.70
SOFA, mean (SD)	14 (1)	14 (1)	13 (1)	0.63
Death at D28, n (%)	440 (79)	398 (81)	42 (68)	0.01
ICU length of stay after CA (days), mean (SD)	6.5 (12.5)	6.3 (12.3)	7.8 (13.7)	0.25

Table 2:

	Alive n=115	Deceased n=440	p value
Sex ratio (male/female)	1.5	1.5	0.91
Age, mean (SD)	60.9 (15.9)	61.9 (15.7)	0.55
<b>Underlying condition</b>			
Diabetes, n (%)	47 (41)	155 (35)	0.26
Hypertension, n (%)	61 (53)	257 (58)	0.30
Obesity (IMC over 35 kg/m <sup>2</sup> ), n (%)	13 (11)	61 (14)	0.47
Cardiac insufficiency, n (%)	20 (17)	83 (19)	0.71
Chronic renal insufficiency, n (%)	14 (12)	73 (16)	0.24
Dyslipidemia, n (%)	19 (16)	59 (13)	0.39
Coronaropathy, n (%)	11 (9)	56 (12)	0.35
Cancer, n (%)	5 (4)	46 (10)	0.04
<b>Antidiabetic and statin treatments</b>			
Insulin, n (%)	14 (12)	77 (17)	0.16
Metformin, n (%)	20 (17)	42 (9)	0.01
Oral antidiabetics other than Metformin, n (%)	13 (11)	45 (10)	0.73
Statin, n (%)	28 (24)	79 (18)	0.12
<b>Cardiac arrest features</b>			
In-hospital setting (vs Out-hospital), n (%)	88 (76)	323 (73)	0.49
No flow (min), mean (SD)	0.6 (1.5)	1.8 (3.5)	<0.01
Low flow (min), mean (SD)	9.4 (8.9)	17.6 (13.6)	<0.01
First EKG: asystole (vs others), n (%)	59 (51)	336 (76)	<0.01
Etiology: cardiac, n (%)	44 (38)	144 (32)	0.26
Etiology: respiratory, n (%)	43 (37)	117 (26)	0.02
Etiology: respiratory, n (%)	43 (37)	117 (26)	0.02
Etiology: metabolic, n (%)	12 (10)	55 (12)	0.54
Subsequent repeated cardiac arrests, mean (SD)	1.2 (0.6)	1.5 (1.1)	<0.01
<b>Initial biological blood test (at ICU admission)</b>			
Leucocytes (giga/L), mean (SD)	12.5 (6.4)	13.4 (9.2)	0.28
Platelets (giga/L), mean (SD)	235 (110)	194 (134)	<0.01
Hemoglobin (g/dL), mean (SD)	11.3 (2.4)	10.6 (3.0)	0.01
Lactate (mmol/L), mean (SD)	4.9 (4.2)	8.9 (6.0)	<0.01
Glycemia (mmol/L), mean (SD)	11.7 (6.1)	11.8 (8.5)	0.89
Urea (mmol/l), mean (SD)	9.7 (7.8)	12.9 (10.5)	<0.01
Creatininemia (μmol/L), mean (SD)	199 (222)	261 (268)	<0.01
Bicarbonates (mmol/l), mean (SD)	19.9 (5.7)	16.9 (6.7)	<0.01
pH, mean (SD)	7.27 (0.14)	7.16 (0.14)	<0.01
<b>Initial scoring</b>			
SAPS II, mean (SD)	62 (23)	78 (21)	<0.01
SOFA, mean (SD)	13 (1)	14 (2)	<0.01

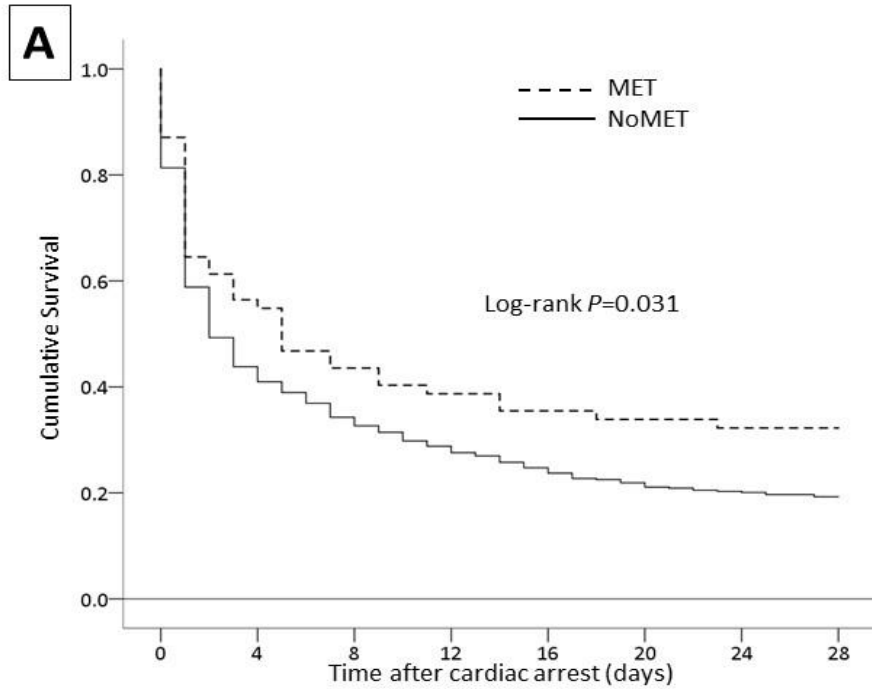
Table 3

Patients characteristics and outcomes	Unmatched groups			Propensity-matched groups		
	No Metformin (n = 493)	Metformin (n = 62)	<i>P</i>	No Metformin (n = 62)	Metformin (n = 62)	<i>P</i>
Age (years), mean (SD)	61 (16)	65 (10)	0.03	67 (12)	65 (10)	0.20
Female gender, n (%)	196 (40)	26 (41)	0.70	32 (52)	26 (42)	0.36
Diabetes, n (%)	140 (28)	62 (100)	<0.01	62 (100)	62 (100)	1
Hypertension, n (%)	259 (52)	59 (95)	<0.01	59 (95)	59 (95)	1
Obesity (IMC over 35 kg/m <sup>2</sup> ), n (%)	56 (11)	18 (29)	<0.01	13 (21)	18 (29)	0.40
Cardiac insufficiency, n (%)	93 (19)	10 (16)	0.72	9 (15)	10 (16)	1
Chronic renal insufficiency, n (%)	84 (17)	3 (5)	0.02	3 (5)	3 (5)	1
Dyslipidemia, n (%)	59 (12)	19 (30)	<0.01	14 (23)	19 (31)	0.41
Insulin, n (%)	76 (16)	14 (22)	0.22	20 (32)	14 (23)	0.31
Statin, n (%)	80 (16)	27 (44)	<0.01	22 (36)	27 (44)	0.46

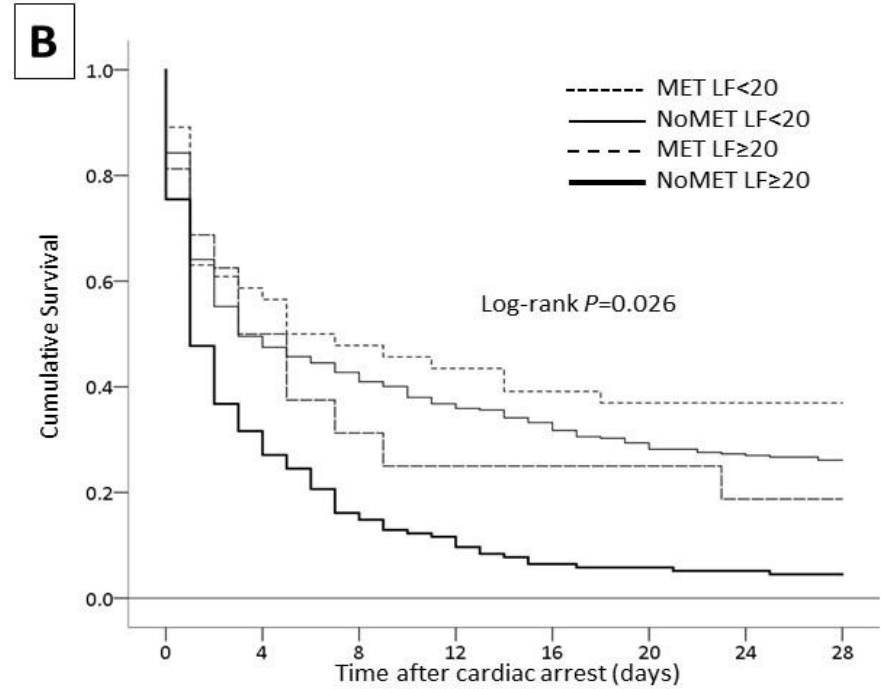
Table 4

	<b>Odd ratio</b>	Min 95CI	Max 95CI
Asystole on the first EKG	<b>5.509</b>	1.988	15.26
Number of subsequent repeated cardiac arrest	<b>1.887</b>	0.935	3.808
SAPSII	<b>1.029</b>	1.006	1.054
Metformin treatment	<b>0.384</b>	0.151	0.975

Figure 1



No. At risk	0	4	8	12	16	20	24	28
MET	62	35	27	24	22	21	20	20
NoMET	493	216	169	142	122	108	100	95



MET LF<20	46	27	22	20	18	17	17	17
NoMET LF<20	336	167	144	124	112	99	92	88
MET LF≥20	16	8	5	4	4	4	3	3
NoMET LF≥20	157	49	25	18	10	9	8	7



## Appendix: supplemental data

Table A

	No Diabetes n=353	Diabetes n=202	p value
Sex ratio (male/female)	1.8	1.1	<0.01
Age, mean (SD)	59 (17)	66 (12)	<0.01
<b>Underlying condition</b>			
Hypertension, n(%)	137 (39)	181 (90)	<0.01
Obesity (IMC over 35 kg/m <sup>2</sup> ), n(%)	29 (8)	45 (22)	<0.01
Cardiac insufficiency, n(%)	59 (17)	44 (22)	0.14
Chronic renal insufficiency, n(%)	28 (8)	59 (29)	<0.01
Dyslipidemia, n(%)	21 (6)	57 (28)	<0.01
Coronaropathy, n(%)	32 (9)	35 (17)	<0.01
Cancer, n(%)	35 (10)	16 (8)	0.43
<b>Metformin and statin treatment</b>			
Metformin, n(%)	0	62 (31)	<0.01
Statin, n(%)	33 (9)	74 (37)	<0.01
<b>Cardiac arrest features</b>			
In-hospital setting (vs Out-of-hospital), n(%)	244 (69)	167 (83)	<0.01
No flow (min), mean (SD)	1.9 (3.5)	0.9 (2.5)	<0.01
Low flow (min), mean (SD)	16.4 (12.9)	15.0 (13.5)	0.24
Initial cardiac activity : asystole (vs other), n(%)	100 (28)	60 (30)	0.73
Ascribed etiology: cardiac, n(%)	110 (31)	78 (39)	0.07
Ascribed etiology: respiratory, n(%)	109 (31)	51 (25)	0.16
Ascribed etiology: metabolic, n(%)	37 (10)	30 (15)	0.13
<b>Initial biological blood test (at ICU admission)</b>			
Leucocytes (giga/L), mean (SD)	12.7 (8.6)	14.1 (8.7)	0.08
Platelets (giga/L), mean (SD)	192 (127)	220 (134)	0.01
Hemoglobin (g/dL), mean (SD)	10.8 (3.0)	10.5 (2.7)	0.15
Lactate (mmol/L), mean (SD)	8.1 (6.0)	7.9 (5.9)	0.84
Glycemia (mmol/L), mean (SD)	10.6 (8.1)	13.8 (7.6)	<0.01
Urea (mmol/l), mean (SD)	10.5 (9.4)	15.0 (10.5)	<0.01
Creatininemia (μmol/L), mean (SD)	204 (222)	321 (302)	<0.01
Bicarbonates (mmol/l), mean (SD)	17.9 (6.8)	16.9 (6.3)	0.09
pH, mean (SD)	7.18 (0.19)	7.19 (0.19)	0.85
<b>Initial scoring and follow up</b>			
SAPS II, mean (SD)	74 (23)	77 (23)	0.18
SOFA, mean (SD)	13.9 (1.6)	14.2 (1.5)	0.01
Death at D28, n(%)	285 (81)	155 (77)	0.26

## Appendix: supplemental data

Table B

	Alive n=47	Deceased n=155	p value
Sex ratio (male/female)	0.9	1.1	0.58
Age	66.3 (13.0)	66.3 (11.8)	0.99
<b>Underlying condition</b>			
Hypertension	41 (87)	140 (90)	0.54
Obesity (IMC over 35 kg/m <sup>2</sup> )	7 (15)	38 (24)	0.16
Cardiac insufficiency	10 (21)	34 (22)	0.92
Chronic renal insufficiency	12 (25)	47 (30)	0.52
Dyslipidemia	14 (30)	43 (28)	0.78
Coronaropathy	5 (11)	30 (19)	0.17
Cancer	1 (2)	15 (10)	0.12
<b>Antidiabetic and statin treatments</b>			
Insulin	14 (30)	76 (49)	0.02
Metformin	20 (42)	42 (27)	0.04
Oral antidiabetics other than Metformin	13 (28)	45 (29)	0.85
Statin	20 (42)	54 (35)	0.33
<b>Cardiac arrest features</b>			
In-hospital setting (vs Out-hospital)	40 (85)	127 (81)	0.61
No flow (min)	0.4 (1.1)	1.1 (2.7)	0.26
Low flow (min)	9.9 (10.5)	16.6 (14.0)	<0.01
First EKG : asystole	26 (55)	116 (75)	0.01
<b>Initial biological blood test (at ICU admission)</b>			
Leucocytes (giga/L)	13.6 (7.3)	14.3 (9.1)	0.64
Platelets (giga/L)	270 (111)	205 (137)	<0.01
Hemoglobin (g/dL)	10.9 (2.4)	10.4 (2.8)	0.26
Lactate (mmol/L)	5.5 (4.5)	8.7 (6.1)	<0.01
Glycemia (mmol/L)	13.2 (6.7)	13.9 (7.9)	0.58
Urea (mmol/l)	12.1 (9.3)	16.0 (10.6)	0.02
Creatininemia (μmol/L)	273 (282)	337 (308)	<0.01
<b>Initial scoring</b>			
SAPS II	66.2 (24.8)	79.9 (21.4)	<0.01
SOFA	13.5 (1.5)	14.5 (1.5)	<0.01

## DISCUSSION

---

## DISCUSSION

---

L'ischémie-reperfusion est un mécanisme lésionnel qui contribue à la physiopathologie de nombreuses situations cliniques rencontrées en anesthésie-réanimation telles que l'arrêt cardiaque, l'infarctus du myocarde, l'ischémie aigüe de membre, l'accident vasculaire cérébral, l'insuffisance rénale aigüe, mais aussi des situations de défaillance circulatoire (choc hypovolémique, septique et cardiogénique)<sup>27,380</sup>. De plus, les complications cardio-vasculaires de l'IR péri-opératoire représentent une cause majeure de morbi-mortalité, que ce soit en chirurgie cardiaque ou non cardiaque<sup>46,381,382</sup>. Par exemple, une chirurgie non cardiaque majeure, notamment vasculaire artérielle, effectuée chez un coronarien peut se compliquer d'un infarctus péri-opératoire dont le pronostic reste redoutable<sup>383</sup>. Au cours de ces dernières années, des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes des lésions d'ischémie-reperfusion et dans le développement de stratégies pour rendre le tissu myocardique plus résistant à l'ischémie ou pour limiter les lésions de reperfusion<sup>384,385</sup>. Parmi ces stratégies de cardioprotection, le préconditionnement anesthésique (APc) par les agents volatils halogénés (AVH) dont le sévoflurane (SEV) a fait la preuve de son efficacité aussi bien chez l'animal<sup>252,386</sup> que chez l'homme<sup>253,254,387,388,389</sup>. Cependant, la manière par laquelle ce concept contribue à la protection myocardique observée, reste encore peu connue.

A partir d'un modèle *in vitro* valide permettant l'étude des mécanismes lésionnels de l'IR et du PPc, nous avons reproduit dans cette étude l'effet cardioprotecteur du SEV et de la MET vis-à-vis de l'IR dans des cardiomyocytes de rats et des cardiomyocytes humains dérivés d'IPSC. Pour la première fois, nous avons démontré que le SEV entraîne une induction de ROS faible à modérée, probablement en rapport avec ses propriétés connues d'inhibition partielle du complexe I de la CTE, qui se traduit par une activation d'Akt ainsi qu'une augmentation de l'expression de Bcl-xL et protège donc les cardiomyocytes de la mort cellulaire induite par l'IR. Nous avons également démontré que cet effet protecteur pouvait également être obtenu avec l'utilisation d'un agent pharmacologique bien toléré, la MET, ce qui justifie fortement l'utilisation de la MET comme agent de PPc. Ainsi, Bcl-xL, connue pour son effet anti-apoptotique en inhibant la perméabilisation et l'altération des mitochondries en réponse à un

signal de mort, s'impose dans cette étude comme un effecteur majeur de l'effet protecteur du SEV et de la MET vis-à-vis de l'IR.

- *Modèles in vitro d'IR et de PPC*

Le choix du modèle cellulaire de cardiomyocytes de rats (lignée H9c2) est justifié par les travaux de Hescheler et al. qui ont montré que les cellules embryonnaires H9c2 possèdent des caractéristiques morphologiques, biochimiques, et électrophysiologiques similaires aux cellules cardiaques adultes de rat et qu'elles représentent un modèle valide d'étude des cardiomyocytes, notamment pour l'étude de la transduction du signal<sup>390</sup>.

La restriction qui peut être émise, d'un point de vue physiologique (et énergétique), concernant les cellules H9c2 est l'absence d'activité contractile spontanée qui est responsable d'une augmentation de la consommation d'énergie cellulaire, particulièrement en situation d'IR. Afin de contourner cette limite méthodologique, nous avons dans un premier temps confirmé nos résultats au sein de cardiomyoblastes H9c2 différenciés en cardiomyocytes. Les cellules H9c2 différenciées semblent être un meilleur modèle de culture de cardiomyocytes primaires que les cellules non différenciées. En effet, leur faible coût de maintien en culture, l'épargne d'animaux (non-sacrifiés) ainsi que l'existence de marqueurs cardiaques spécifiques et de signatures protéiques et métaboliques superposables aux cellules cardiaques adultes, en font une lignée cellulaire de choix pour mimer la réponse du myocarde à l'IR et au PPC<sup>391</sup>. Pour étayer davantage nos conclusions, nous avons dérivé des cardiomyocytes humains de cellules souches pluripotentes induites dotés notamment d'une activité contractile spontanée. Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont des cellules reprogrammées qui présentent des caractéristiques similaires aux cellules souches embryonnaires, telles que la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en de nombreux types cellulaires, y compris les cardiomyocytes. Les cardiomyocytes dérivés des iPSC cumulent des variations phénotypiques ce qui en fait des modèles attrayants d'étude des maladies humaines en rapport avec l'IR. Ces cardiomyocytes dérivés des iPSC sont également pertinents afin de caractériser l'effet de certaines molécules au sein d'essais toxicologiques. En outre, les cardiomyocytes dérivés des iPSC peuvent aider à la stratification des patients concernant leur sensibilité aux médicaments<sup>392</sup>.

Pour étudier les phénomènes d'IR, de nombreux auteurs ont utilisés des modèles de déprivation en oxygène seul<sup>393</sup> ou de déprivation en oxygène et en glucose<sup>394</sup>, négligeant le

rôle joué par les substrats énergétiques secondaires et les autres anomalies électrolytiques observées lors de l'ischémie.

Nous avons donc choisi un modèle *in vitro* d'IR associant une déprivation en oxygène et un milieu dépourvu de substrats énergétiques, acide à 6,6 de pH par l'ajout d'acide lactique à 5 mM et riche en potassium à 8 mM afin de reproduire l'environnement cellulaire présent durant une ischémie *in vivo*. Ce modèle est efficient et mime les lésions d'IR avec une activation de l'apoptose par le clivage de la pro-caspase 3 en caspase 3 active. Nous avons déterminé les délais d'IR en fonction du pic d'activité caspase obtenu après 1 heures et demi d'ischémie et 1 heure de reperfusion, correspondant aux délais retrouvés dans la littérature sur modèle *in vitro* utilisant ce type de solution en situation d'hypoxie<sup>395,396</sup>.

Pour la réalisation de l'APc, la méthode de référence est l'administration du SEV par l'intermédiaire d'un vaporisateur associé à un analyseur de gaz, de manière similaire à la pratique clinique<sup>397</sup>. Compte tenu de son faible coefficient de partage sang/gaz à 0,6 et eau/gaz à 0,37<sup>398</sup>; le SEV s'équilibre rapidement entre les phases gazeuse et liquide à la concentration finale de 0,21 mM dans la phase liquide par % en phase gazeuse (soit 0,4 mM pour 2%)<sup>399</sup>. Une autre méthode d'administration du SEV a été mise au point par Zitta et al.<sup>401</sup> pour la culture cellulaire, qui a été validé par rapport à la méthode de référence. Cette technique consiste à ajouter directement le sévoflurane à la surface du milieu de culture dans un flacon fermé de manière hermétique. Ainsi, les phases liquide et gazeuse s'équilibrent rapidement à des concentrations similaires à la méthode de référence et à celle mesurées *in vivo*<sup>397,402</sup>. Cette méthode autorise donc l'exposition de cellules (H9c2) au SEV dans différentes conditions de culture sans la nécessité d'un vaporisateur et d'un analyseur de gaz.

- *IR et protéines de la famille Bcl-2*

Pendant longtemps, on a pensé que la mort cellulaire des cardiomyocytes, suite à une séquence d'IR sévère était exclusivement due à un phénomène nécrotique. Cependant, il est maintenant reconnu que les cardiomyocytes subissent un autre type de mort cellulaire suite à une séquence d'IR : l'apoptose<sup>30,403</sup>. En effet, l'IR est capable de déclencher la voie intrinsèque de l'apoptose en perturbant l'homéostasie des protéines pro-(Bax, Bak) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL) de la famille Bcl-2 conduisant ainsi à la mort cellulaire suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe<sup>404</sup>. Néanmoins, il a été montré que

l'APc par les AVH comme l'ISO exerce un effet protecteur vis-à-vis de l'apoptose induite par les lésions d'IR en modulant l'expression des protéines anti-apoptotiques<sup>215,323,405</sup>.

Sur le plan mécanistique, la MOMP est l'événement déclencheur de plusieurs formes de mort cellulaire qu'elle soit apoptotique et/ou non apoptotique<sup>124</sup>. En conséquence, l'induction de Bcl-xL par le SEV dans les cardiomyocytes limite la MOMP et entraîne donc une diminution du processus apoptotique mais elle pourrait également prévenir certaines formes de nécrose régulée qui restent à caractériser.

La nécroptose, un mode régulé de mort cellulaire d'aspect nécrotique, a été identifiée dans diverses pathologies cardiaques, dont l'IR myocardique<sup>406</sup>. La nécroptose a été observée à la fois dans les cardiomyoblastes H9c2 soumis à une hypoxie/réoxygénation (HR) et dans les cœurs de rats in vivo soumis à l'IR<sup>407</sup>. La mesure dans laquelle les différentes formes de mort cellulaire interagissent dans le contexte de l'ischémie-reperfusion reste mal connue. Néanmoins, le ciblage spécifique de chaque forme de mort cellulaire peut avoir un effet sur la taille de l'infarctus. Ainsi l'inhibition combinée de la nécroptose et de l'apoptose réduit la taille de l'infarctus dans les cœurs isolés de cochons d'Inde de manière plus marquée que l'inhibition de l'un ou l'autre type de mort cellulaire individuellement<sup>408</sup>. D'autre part il a été montré récemment que SEV et MET sont cardioprotecteurs vis-à-vis des lésions nécroptotiques induites par l'IR myocardique sur modèle murin<sup>409,410</sup>.

- *Implication de la protéine Bcl-xL dans l'effet protecteur du PPc*

Nous avons donc émis l'hypothèse que les protéines de la famille Bcl-2 sont modulées par le SEV et la MET et participent à l'effet cardioprotecteur du PPc. Ainsi, le but de notre étude est de participer à l'amélioration de la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la cardioprotection induite par ces agents pharmacologiques.

Malgré l'induction privilégiée de la protéine Bcl-xL nous ne pouvons pas exclure que d'autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 jouent aussi un rôle dans l'effet du préconditionnement médié par le SEV. En effet, nous rapportons la perte de l'effet protecteur de l'APc par le SEV après l'utilisation de l'ABT 737. Cet inhibiteur spécifique agit par séquestration des protéines anti-apoptotiques (Bcl-xL, Bcl-2 et Bcl-w) en mimant l'action des protéines BH3-only pro-apoptotiques. Son action inhibitrice ne va donc pas cibler uniquement la protéine Bcl-xL. Ainsi afin d'améliorer la compréhension du rôle joué par Bcl-xL dans l'APc,

nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de Bcl-xL le WeHi 539<sup>411</sup>. Dans notre modèle cellulaire, nos résultats en situation d'APc sont superposables à ceux obtenus avec l'ABT-737 confirmant la pertinence de Bcl-xL dans l'effet protecteur de l'APc.

De plus, nous montrons que parmi les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bcl-xL est induite de manière privilégiée dans un modèle murin de souris *C57BL6* exposées à l'isoflurane. En effet, les niveaux d'expression des autres membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 ne sont pas modulés par l'ISO.

Nos résultats sont cohérents avec les travaux de Gallogly et al. dans lesquels l'inhibition de Bcl-2 seul n'a eu aucun effet sur la mort cellulaire par apoptose dans les cellules H9C2, alors que la diminution de l'expression de Bcl-xL seule (ou en combinaison avec celle de Bcl-2) augmente l'apoptose induite par le stress oxydant<sup>412</sup>. Le rôle anti-apoptotique prépondérant de Bcl-xL est également en cohérence avec les conclusions de Fiebig et al., qui ont observé dans des lymphocytes T soumis à un stress oxydatif que Bcl-xL présente un pouvoir anti-apoptotique dix fois supérieur à celui de Bcl-2<sup>413</sup>.

En définitive, les effets distincts de l'inhibition de Bcl-2 et/ou de Bcl-xL dans les cellules H9c2 suggèrent des rôles cytoprotecteurs distincts mais complémentaires, dépendant du mécanisme anti-apoptotique engagé<sup>414,415,232</sup>.

- *Régulation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL par le PPc*

Nos travaux indiquent que la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL par le SEV ne serait pas due à une régulation d'origine transcriptionnelle. Ceci est cohérent avec les travaux de Seergev et al.<sup>295</sup> et d'Edmands et al.<sup>416</sup> qui n'identifient pas d'augmentation de l'ARNm des protéines anti-apoptotiques lors d'une protection du myocarde vis-à-vis de l'IR après une exposition à l'ISO.

Ainsi nos résultats suggèrent une régulation post-traductionnelle de Bcl-xL. Nous pouvons formuler plusieurs hypothèses. Il se pourrait que Bcl-xL soit phosphorylé en réponse au SEV. En effet, Bcl-xL peut être phosphorylé par des kinases de la famille PLK<sup>417,418</sup> ce qui modifie son profil d'interaction avec les autres membres de la famille Bcl-2 et ainsi son action anti-apoptotique<sup>419</sup>. Bcl-xL peut être également phosphorylé en réponse à certains agents de chimiothérapies tels que les taxanes<sup>420</sup>. Là encore, la phosphorylation de Bcl-xL est responsable de la perte de son activité anti-apoptotique<sup>421</sup>. De manière identique, la phosphorylation de



Bcl-xL est majoritairement décrite dans le contexte de l'IR comme inhibitrice. En effet, il a été montré récemment que la phosphorylation de Bcl-xL en situation d'ischémie-reperfusion induit la perte de son activité anti-apoptotique en levant la séquestration de la protéine pro-apoptotique Bax, sensibilisant ainsi les cardiomyocytes à l'apoptose<sup>422,423</sup>. Même si nous ne pouvons pas formellement l'exclure, il est peu probable que l'effet protecteur du SEV soit médié par l'augmentation de phosphorylation de Bcl-xL. Toutefois cela pourrait être testé en faisant une immuno-précipitation de la protéine, suivi d'une analyse par un anti-Phospho-Ser/Thr.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer l'accumulation de Bcl-xL serait une diminution de sa dégradation. Parmi les voies de dégradation des protéines, le système ubiquitine-protéasome a été largement décrit, notamment au niveau du myocarde<sup>424,425</sup>. Il joue un rôle clé dans le maintien de la qualité des protéines en éliminant les protéines endommagées, oxydées ou mal repliées. L'ubiquitination d'une protéine consiste en la fixation covalente d'une ou plusieurs protéines d'ubiquitine sur la protéine substrat en faisant intervenir trois grandes classes d'enzymes appelées E1, E2 et E3-ligases. Une fois poly-ubiquitinilé, la protéine cible sera dégradée par le protéasome. Ainsi, on peut supposer que le SEV pourrait empêcher l'ubiquitination de Bcl-xL ou exercer une action inhibitrice directement sur le protéasome. Compte tenu du caractère délétère de l'inhibition du protéasome dans le myocarde<sup>426</sup>, nous ne retenons pas cette hypothèse afin d'expliquer le rôle protecteur induit par le SEV. En revanche, afin de vérifier notre hypothèse concernant l'effet du SEV sur l'ubiquitination nous pourrions effectuer une immunoprécipitation de la protéine Bcl-xL après exposition des cellules H9c2 au SEV. Grâce à un anticorps reconnaissant spécifiquement les résidus ubiquitinés, nous pourrions ensuite analyser l'état d'ubiquitination des protéines Bcl-xL immunoprécipitées. En cas de diminution de l'ubiquitination de Bcl-xL potentiellement observable après exposition au SEV, nous pourrions en déduire que le SEV serait capable d'induire la stabilisation de Bcl-xL en limitant son ubiquitination et donc sa dégradation par le protéasome. Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure que la phosphorylation et l'ubiquitination soient indépendantes dans notre modèle. En effet, de manière intéressante Dimmeler et al ont montré que la phosphorylation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (par la protéine kinase Akt activée sous sa forme phosphorylée) induit une inhibition de sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome dans les cellules endothéliales représentant un véritable mécanisme de résistance contre l'apoptose<sup>427</sup>. En conséquence,

nous pouvons envisager l'hypothèse que l'action d'Akt induite par le SEV abouti à la phosphorylation de Bcl-xL, limitant ainsi son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. En effet, il a été montré que le l'APc module les niveaux d'expression des protéines, notamment les complexes impliqués dans la chaîne respiratoire mitochondriale, en induisant une stabilisation de la protéine ou leur dégradation plutôt qu'en agissant sur la synthèse protéique<sup>428,429,430</sup>.

- *Voie de signalisation identifiée dans notre modèle de PPc*

Afin de déterminer quelle kinase était impliquée dans l'induction de Bcl-xL, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la kinase AMPK, décrite comme étant importante pour l'APc<sup>431,432</sup>. Grâce à l'utilisation de MEFs invalidées pour les sous-unité  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  et de l'AMPK<sup>433</sup>, nous avons établi que le SEV permettait toujours l'induction de Bcl-xL indiquant qu'il ne semble pas exister de lien potentiel entre Bcl-xL et l'AMPK dans ce contexte. De plus, les travaux de Zhao et al.<sup>434</sup> avaient également montré une conservation de l'effet protecteur de l'APc après invalidation de l'AMPK par l'utilisation de souris AMPK-DN (surexpression AMPK $\alpha_2$ , dominant négatif, donc non active).

Parallèlement à l'AMPK, nous nous sommes également intéressés à la sérine/thréonine kinase Akt. Cette dernière est constituée de deux isoformes Akt1 et Akt2 fortement exprimées dans le myocarde<sup>311</sup>. Elle appartient à la voie de signalisation RISK (Reperfusion injury salvage kinase) qui est impliquée dans divers mécanismes cardioprotecteurs<sup>303</sup>. En effet, Akt est connue pour être impliquée dans l'IPc mais aussi dans le post-conditionnement anesthésique, une autre méthode de protection myocardique proche de l'APc consistant en une exposition de l'agent anesthésique volatile, non pas avant l'IR, mais précocement lors de la phase de reperfusion<sup>435,436</sup>. De manière intéressante, Akt a également été montrée comme impliquée dans les effets protecteurs de l'APc par le SEV contre les lésions d'IR cérébrales et intestinales<sup>437,438</sup>. Nos résultats montrent qu'en dehors de tout stress SEV et MET induisent la phosphorylation d'Akt dans notre modèle cellulaire. De plus, nos résultats sont en accord avec la littérature puisque l'ISO induit également la phosphorylation activatrice d'Akt dans notre modèle *in vivo* de souris C57BL6<sup>323</sup>. Par ailleurs, la littérature rapporte que l'APc et le post-conditionnement anesthésique pourraient induire leur effet cardioprotecteur en modulant les protéines de la famille Bcl-2 (notamment Bcl-2 et Bax) de manière Akt-dépendante<sup>439,440</sup>.

Cependant, aucune étude sur la cardioprotection induite par les AVH et/ou la MET n'a encore montré de lien entre Akt et Bcl-xL. Dans notre travail, nous montrons clairement que l'inhibition d'Akt dans notre modèle cellulaire empêche la surexpression de Bcl-xL induite par le SEV et la MET. Ce résultat serait donc en faveur d'un lien privilégié entre Akt et Bcl-xL et pourrait ainsi expliquer la perte de l'effet protecteur de l'APc par le SEV vis-à-vis des lésions d'IR après l'inhibition d'Akt par Akti.

De manière intéressante, bien qu'il ait été démontré que les ROS, tels que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, induisent l'activation d'Akt dans différents modèles cellulaires, y compris les cardiomyocytes<sup>441</sup> ; aucune étude dans le contexte de la cardioprotection par APc n'a jusqu'à présent décrit un mécanisme qui combine l'induction des ROS, l'activation d'Akt et la modulation de l'expression des protéines de la famille Bcl-2. Nos résultats suggèrent que l'inhibition du complexe I mitochondrial par le SEV induit des ROS qui se comporteraient comme des initiateurs de la voie de signalisation et des effecteurs intracellulaires responsables de l'effet cardioprotecteur de l'APc.

La contribution des espèces réactives au sein des voies de signalisation physiologiques ou à une agression délétère et pathologique dépend de la fréquence, de l'intensité et de la durée de leur disponibilité<sup>442</sup>. En effet, une augmentation faible et transitoire des niveaux de ROS est nécessaire à la transduction intracellulaire de plusieurs stimuli (physiologiques, pharmacologiques...), alors qu'une augmentation prolongée et importante est susceptible de provoquer des lésions majeures des structures cellulaires dues à des altérations oxydatives des glucides, des lipides, des protéines et des acides nucléiques.

Ainsi, parmi les multiples questions restant à résoudre afin d'améliorer la compréhension du rôle physiopathologique des ROS mitochondriaux dans les cardiomyocytes, l'identification du seuil marquant la perte de leur effet protecteur semble cruciale.

Une légère augmentation de la formation de ROS joue un rôle déterminant dans de nombreux processus physiologiques par la modulation de plusieurs voies de transduction, notamment à visée anti-apoptotique<sup>443</sup>. De plus, selon le concept hormétique, la génération de faibles niveaux de ROS semble conserver les fonctions mitochondriales contribuant ainsi au maintien de la cardioprotection<sup>120,444</sup>. En effet, il a récemment été démontré que la production de ROS mitochondriaux induite par le paraquat ciblant les mitochondries (mitoPQ) provoque la mort cellulaire à de fortes concentrations alors qu'il a un effet protecteur contre les lésions d'IR<sup>445</sup> à des doses 10 fois inférieures. Cependant, il n'existe pas à notre connaissance de méthode

quantitative capable de déterminer précisément le seuil séparant les ROS protecteurs des ROS toxiques.

Parmi les multiples mécanismes potentiellement responsables de la génération des ROS mitochondriaux pendant l'APc tels que la régulation de l'influx du potassium mitochondrial par les canaux potassiques ATP-dépendants ou activés par le  $Ca^{2+}$ <sup>446,447</sup>, le découplage<sup>448</sup> et la dépolarisation modérée mitochondriale<sup>449</sup>, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la modulation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale.

- *Mitochondrie: point de départ de la cardioprotection induite par le PPc*

Compte tenu de leur grande fraction occupée au sein des cardiomyocytes (30 à 40 %) , il n'est pas surprenant que les mitochondries y soient les principales pourvoyeuses de ROS, en faisant une cible de choix pour les ROS impliqués dans la physiopathologie de l'IR myocardique. De plus, les mitochondries sont également ciblées par les voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection<sup>18,450</sup>. Dans notre étude, malgré des caractéristiques pharmacocinétiques différentes, nous avons montré que MET et SEV activent une voie de signalisation cytoprotectrice dépendante de ROS/Akt/Bcl-xL. En effet, le PPc par les AVH et/ou la MET induit une augmentation de l'expression de Bcl-xL permettant d'empêcher la MOMP et *in fine* de protéger les mitochondries au sein de nos différents modèles cellulaires de cardiomyocytes.

Par ailleurs, il a été largement montré que les AVH tels que le SEV et l'ISO possèdent des propriétés inhibitrices de l'activité du complexe I (NADH-ubiquinone oxidoreductase) de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale responsable d'une production modérée de ROS, suffisante pour induire l'effet cardioprotecteur de l'APc<sup>96</sup>. De manière intéressante, l'effet cardioprotecteur de la MET ferait appel au même mécanisme d'inhibition du complexe I de la CTE. En effet, outre son rôle dans l'homéostasie du glucose, la MET exerce un effet pléiotrope en participant également à la production de ROS et à la modulation des processus de mort cellulaire dont l'inhibition du complexe I serait le principal mécanisme<sup>372,451</sup>. Cet effet semble dépendre de la dose de MET utilisée et du type de cellule étudié<sup>374</sup>. Dans notre travail, nous avons utilisé une concentration de MET compatible avec une application clinique n'induisant ainsi qu'une inhibition partielle de l'activité du complexe I mitochondrial<sup>374</sup>.

Cependant, le mécanisme par lequel, SEV et MET parviennent à inhiber le complexe I reste mal compris.

Il y a plus de 50 ans, il a été suggéré que les AVH pouvaient interférer avec l'activité de la NADH oxydoréductase, et il a été démontré par la suite que la concentration de NADH intracellulaire mesurée par fluorométrie augmentait en réponse aux AVH dans les cœur de rats<sup>452,453</sup>. La NADH-ubiquinone oxydoréductase représente la première étape de la CTE au cours de laquelle le NADH reçoit le don de protons et d'électrons. Cette enzyme constitue donc une source potentielle de fuite d'électrons pouvant conduire à la formation de radicaux libres<sup>93</sup>. Riess et al. suggère que la fonction du complexe I serait atténuée par les ions superoxyde formés pendant l'exposition de cœurs de cochon d'Inde sains au SEV<sup>454</sup>. De plus, la génération de ROS à partir de la CTE mitochondriale peut préserver la fonction énergétique mitochondriale indispensable pour la cytoprotection contre l'ischémie myocardique. Des perturbations modérées de l'homéostasie mitochondriale produites par des stimuli ischémiques brefs ou des agents pharmacologiques, y compris les AVH, peuvent favoriser la tolérance du myocarde au stress ischémique en réduisant la surcharge en  $Ca^{2+}$ , en empêchant l'activation des voies nécrotiques ou apoptotiques, ou en atténuant le stress oxydatif<sup>455,456</sup>. Bienengraeber et al. ont notamment réalisé une caractérisation quantitative des modifications du protéome mitochondrial cardiaque pendant l'APc. Ils ont établi par analyse spectrale de masse que l'APc module l'activité de la sous-unité NADH déshydrogénase 75-kDa du complexe I impliquée dans la CTE<sup>430</sup>. Cette interaction entre les AVH et les complexes de la CTE pourrait être le premier événement déclenchant de la production de faible quantité de ROS nécessaire à l'effet protecteur de l'APc.

De manière intéressante, Lotz et al. rapporte plus récemment que sur des mitochondries isolées à partir de cardiomyocytes de lapin, le SEV a un effet protecteur sur la chaîne respiratoire mitochondriale en préservant davantage son rendement énergétique par rapport propofol et en limitant la génération massive de ROS induite en situation d'IR<sup>457</sup>. De plus, leurs résultats suggèrent qu'une réactivation lente du complexe I contribue aux effets cardioprotecteurs du SEV, car les animaux anesthésiés par le SEV avaient un rapport A/D significativement plus faible en situation d'IR<sup>457</sup>. Ce ralentissement du changement de conformation du complexe I agit probablement comme un mécanisme intrinsèque dédié à la protection de la chaîne respiratoire mitochondriale contre l'orage oxydatif pendant la phase initiale de la reperfusion. Parallèlement à ce travail, Mohsin et al. suggèrent que le mécanisme

d'inhibition du complexe I par la MET implique une stabilisation de la forme désactivée (D) du complexe I au décours de l'agression ischémique<sup>458</sup>. En effet, le complexe I sous sa forme inactive (D) est plus sensible à l'inhibition par les biguanides<sup>459,460</sup>. De plus, les résultats obtenus par Mohsin et al. montre de manière pertinente que le mécanisme de protection induit par l'inhibition partielle du complexe I par la MET vis-à-vis de l'IR est probablement AMPK-indépendant<sup>458</sup>.

Ainsi, Il est fort probable que l'exposition au SEV et à la MET agisse sur l'état de conformation du complexe I préalablement à l'IR. L'inhibition du complexe I de la CTE induite par SEV et MET est donc au cœur de la cardioprotection induite par le PPc. En effet, de la même manière que l'ont montré Hirata et al. avec l'ISO<sup>96</sup>, l'inhibition du complexe I de la CTE induite par nos agents pharmacologiques est à la fois à l'origine de la production des ROS précurseurs des voies de signalisations cytoprotectrices et est également responsable de la diminution de la production des ROS pro-apoptotiques grâce à l'inhibition du flux inverse d'électrons au moment de la reperfusion.

- *Etats des lieux sur la pertinence clinique du PPc*

Ainsi, à partir de notre modèle expérimental valide permettant la simulation d'une part des lésions d'IR et d'autre part du PPc nous parvenons à reproduire l'effet protecteur du PPc sur nos modèles cellulaires (cardiomyoblastes de rat H9c2 différenciés et non-différenciés, cardiomyocytes humanisés dérivés de cellules souches embryonnaires) vis-à-vis de la mort cellulaire par apoptose induite par l'IR. Ce résultat constitue donc un véritable prérequis avant de poursuivre notre étude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le PPc induit par SEV et MET.

Cependant, en raison de la discordance marquée entre les études expérimentales, toutes clairement en faveur des halogénés, et les études cliniques, un véritable climat de controverse s'est installé autour de l'effet cardioprotecteur de préconditionnement<sup>461,462</sup>. A tel point que les dernières recommandations ACC/AHA pour la prise en charge cardio-vasculaire périopératoire en chirurgie non cardiaque ne se prononcent plus en faveur des agents halogénés par rapport aux agents intraveineux<sup>52</sup>.

De multiples raisons concourent à ce manque de reproductibilité entre les travaux de recherche fondamentale et les essais cliniques. Par exemple, plusieurs paramètres

physiologiques (âge avancé) ou pathologiques (diabète, hyperglycémie peropératoire, hypercholestérolémie) caractérisant une grande majorité des patients inclus dans les études sont connus pour limiter l'effet cardioprotecteur des agents halogénés sur divers modèles *in vivo*<sup>463,464,465,466</sup>. De plus, l'anesthésie générale de ces patients mêle des agents semblant capables d'interférer avec l'effet protecteur du préconditionnement tels que le midazolam, mais également le propofol<sup>467,468,297</sup>. Dans un éditorial récent paru dans *European Heart Journal* Heusch et Gersh contestent l'échec de l'effet cardioprotecteur du RIPC en chirurgie cardiaque, observé dans deux essais cliniques de grande ampleur : ERICCA et RIPHeart<sup>248,469</sup>. En effet, les auteurs considèrent le propofol, utilisé chez plus de 90% des patients anesthésiés, comme le facteur limitant la protection induite par le RIPC. En conséquence, ils proposent de renoncer au propofol au profit des agents halogénés dans les protocoles d'anesthésie futurs dans ce type de chirurgie<sup>470</sup>. De manière intéressante, une étude récente publiée par Likhvantsev et al. compare le potentiel bénéfique d'une hypnose exclusive au SEV par rapport à une anesthésie générale utilisant uniquement des agents intra-veineux dont le propofol en vue d'une chirurgie cardiaque de pontage aorto-coronarien. Les résultats montrent de manière convaincante une réduction de la durée de séjour hospitalier en faveur du groupe SEV<sup>471</sup>.

Bien que les AVH limitent la réaction inflammatoire, l'étendue des lésions myocardiques et garantissent de meilleurs résultats en matière de morbidité et de mortalité que l'anesthésie par voie intra veineuse (TIVA); il n'y a actuellement pas de consensus sur le choix d'une anesthésie par les AVH ou par TIVA afin d'améliorer la protection myocardique péri-opératoire<sup>472</sup>.

Tout d'abord, il est intéressant de noter que les méta-analyses soutiennent davantage l'hypothèse selon laquelle les AVH assurent une cardioprotection cliniquement significative, tandis que les essais cliniques randomisés rapportent des résultats plus mitigés. Cela pourrait s'expliquer par l'inclusion d'un plus grand nombre de patients afin d'obtenir la puissance appropriée nécessaire pour identifier une différence significative. En effet, les recommandations en termes de méthodes et protocoles d'anesthésie diffèrent considérablement d'un centre à l'autre, comme le montre l'étude de Landoni et al. dans laquelle une multitude de protocoles différents d'APc ont été utilisés<sup>473</sup>.

En conséquence, les données actuellement disponibles ne permettent pas de comparaison fiable de ces études car la population de patients inclus varie considérablement en termes de

tranche d'âge et de critères d'exclusion (diabète, anomalies valvulaires, gravité de la cardiomyopathie, statut ASA (American Society of Anesthesiologists), quantité d'opioïdes utilisés, proportion d'hommes par rapport aux femmes). Ainsi, des études précliniques conduites au sein modèles présentant des comorbidités associant des thérapies médicamenteuses ciblées paraissent nécessaires<sup>474</sup> pour anticiper du mieux possible ces potentiels facteurs de confusion.

Au de-là des différences moléculaires, cellulaires, anatomiques et physiologiques entre les modèles d'étude du myocarde animal (porcs, murins, canins) et les cœurs humains<sup>475</sup>, les manifestations lésionnelles myocardiques subies dans les études précliniques sont très différentes des critères de morbi-mortalité généralement évalués dans les études cliniques. De nombreuses études précliniques ont notamment évalué la taille de l'infarctus comme critère de l'effet protecteur de l'APc<sup>476,477,478</sup>. En revanche, il existe une importante variabilité au sein des études cliniques dans leur choix du critère de jugement principal en rapport avec la protection myocardique. En effet, la majorité des études cliniques portant sur l'APc ont évalué des critères de jugement biologiques tels que l'élévation des biomarqueurs spécifiques de la souffrance myocardique péri-opératoire (troponine I, troponine T ou la CKMB), la libération de médiateurs de l'inflammation (IL-6 et IL-8) et/ou des critères de jugement cliniques comme la durée du séjour à l'hôpital et la morbi-mortalité péri-opératoire<sup>479</sup>. Aucune étude clinique n'a encore analysé la taille de l'infarctus, et une seule étude a inclus une analyse écho-cardiographique de l'effet protecteur de l'APc sur la fonction myocardique<sup>480</sup>.

Enfin, la durée et la méthode d'administration des AVH diffèrent également selon les études cliniques et précliniques. Le but de l'administration des AVH dans les études cliniques est double : d'une part, assurer une cardioprotection durant l'intervention ; d'autre part, entretenir l'anesthésie générale nécessaire à la poursuite de la chirurgie. Par conséquent, les AVH sont souvent administrés de façon continue pendant toute la durée de l'opération au cours des essais cliniques, par opposition aux expositions intermittentes, avec période de « wash out » fréquemment utilisées dans les modèles expérimentaux<sup>481,482,448</sup>. Bien que quelques études cliniques ont appliqué les AVH de manière intermittente<sup>480,483,484,485</sup>, la majorité d'entre elles les ont administrés de façon continue durant la chirurgie<sup>486,471,487,278</sup>. Ainsi, l'administration intermittente des AVH pourrait induire des voies de signalisation



protectrices différentes de celles initiées par une administration continue, contribuant ainsi au manque de cohérence en termes de protection induite par l'APc dans les études cliniques.

Par ailleurs, une amélioration de la méthodologie des études précliniques s'avère également déterminante pour tenter d'optimiser la pertinence clinique de la cardioprotection induite par le PPc<sup>474</sup>. En effet, les études précliniques visent généralement à identifier un mécanisme qui, par sa nature même, induit un biais de publication des résultats positifs. De plus, la plupart des méthodes et modèles de cardioprotection en recherche préclinique n'ont pas été forcément protocolisés, et cela fait seulement depuis deux ans que des recommandations à visée méthodologique ont été proposées<sup>488,489</sup>. Ainsi, la majorité des données sur la cardioprotection en recherche préclinique sont issues de modèles de cellules in vitro, de préparations isolées de cœur perfusé et de préparations in situ d'échantillons tirés de diverses espèces, avec des protocoles de conditionnement et de durée d'occlusion coronarienne suivie de reperfusion très différents.

En outre, la quasi-totalité des études précliniques sur la cardioprotection ont été effectuées sur des animaux jeunes et sains<sup>490,384</sup>. C'est pourquoi, des protocoles standardisés ainsi que des études de reproductibilité multicentrique doivent être encouragées afin d'améliorer la robustesse des données précliniques sur la cardioprotection<sup>491,492</sup>.

De plus, afin de laisser présager d'un potentiel bénéfique chez l'homme, il faudrait idéalement recueillir des données favorisant la cardioprotection induite par le PPc à partir d'expériences menées sur des modèles porcins (porcs), qui représentent le modèle animal le plus proche de l'homme en terme d'anatomie cardiaque, d'hémodynamique et de remodelage cardiaque dans le temps et l'espace au décours d'un infarctus du myocarde<sup>493</sup>.

Enfin, il convient de noter que ; compte tenu du contexte périopératoire, un déséquilibre franc entre l'offre et la demande en oxygène, rencontré notamment au décours d'un simple épisode d'hypotension plus ou moins prolongé, va générer un état d'ischémie globale et généralisée, contrairement à un infarctus du myocarde dont la zone lésionnelle reste circonscrite au territoire de vascularisation de l'artère coronaire occluse. Par conséquent, ces discordances majeures entre l'approche fondamentale et la pratique clinique doivent être prises en compte à chaque fois qu'une stratégie de cardioprotection telle que le PPc est évaluée au cours d'un essai clinique.

- *Perspectives thérapeutiques du PPc*

A l'aide de ce travail, nous souhaitons répondre aux attentes de la recherche translationnelle en mettant en avant l'intérêt de l'approche mécanistique du PPc susceptible de contribuer à l'amélioration de son application clinique en contexte péri-opératoire. D'autant plus que l'APc par les AVH semble représenter la méthode de cardioprotection la plus pertinente afin de renforcer le lien entre les études expérimentales et cliniques<sup>494</sup>.

Cette pertinence clinique s'explique sans doute par l'accessibilité et la sécurité de l'administration des AVH. En effet, les phases successives de clampage-déclampage artériel ou de gonflement du garrot inhérentes à l'IPc provoquent un risque non négligeable de thrombose par rupture de plaque d'athérome et embolisation. De plus, contrairement à la plupart des autres agents pharmacologiques inducteurs de préconditionnement (adénosine, bradykinine, cyclosporine A), qui doivent être administrés directement dans les artères coronaires pour être efficaces sans effets secondaires graves<sup>495,496</sup>, les AVH agissent en toute sécurité de manière systémique assurant une protection diffuse du myocarde et des autres organes tels que le foie, les reins, le cerveau<sup>497,498,499</sup>.

Par ailleurs, l'administration intraveineuse de formes émulsifiées des agents halogénés est en cours de développement<sup>500,501,502</sup>. Cette voie apporterait de réels bénéfices en pratique clinique par rapport à la voie inhalée. En effet, l'absence de vaporisateur éliminerait le temps nécessaire à l'équilibration entre le vaporisateur et le circuit du respirateur puis entre les compartiments alvéolaire et sanguin, réduisant ainsi le temps de l'induction anesthésique et de réveil<sup>503</sup>. Il a été également montré que le réveil après anesthésie à l'isoflurane intraveineux émulsifié était plus rapide par rapport à celui du propofol<sup>504</sup>. De plus, il a été montré que la forme émulsifiée des agents halogénés conserve leur effet cardioprotecteurs dans un modèle in vivo de rats<sup>505</sup>. Ainsi, l'administration intraveineuse des agents halogénés pourrait représenter une véritable alternative afin d'étendre la cardioprotection des modèles expérimentaux aux études cliniques en limitant l'utilisation du propofol tout en maintenant des caractéristiques pharmacocinétiques compatibles avec la pratique clinique.

D'autre part, l'intérêt de notre approche mécanistique réside également dans l'identification de protéines susceptibles de devenir les cibles thérapeutiques de molécules, déjà existantes ou en cours de développement, capables de les activer et de reproduire voire amplifier l'effet protecteur de l'APc par le SEV.

L'utilisation d'agents anesthésiques pour la cardioprotection est très controversée, principalement en raison de la discordance entre les résultats issus des études précliniques et cliniques<sup>287</sup>. En outre, l'effet hypnotique de ces composés limite leur utilisation en amont de l'hospitalisation des patients. Comme nous avons démontré que la production de ROS médiée par le SEV était le déclencheur initial de la protection contre l'apoptose induite par l'IR, nous avons cherché un autre agent pharmacologique qui pourrait conduire à un effet protecteur similaire et qui pourrait être facilement prescrit avant toute chirurgie à risque d'IR. Parmi ces molécules, une en particulier a retenu notre attention : la metformine. Cette molécule est un médicament insulino-sensibilisateur appartenant à la classe des biguanides. Il s'agit de l'anti-diabétique oral le plus prescrit dans la prise en charge du diabète de type 2<sup>506</sup>. De manière intéressante, plusieurs études ont suggéré que la MET était capable d'induire un effet cardioprotecteur indépendamment de son effet hypoglycémiant<sup>507,359</sup>. En effet, dans un modèle de rat non-diabétique en période de remodelage myocardique post-infarctus, Yin et al. montrent une conservation de la fonction cardiaque chez les rats traités par metformine<sup>360</sup>. De plus, pour des contrôles glycémiques équivalents, les patients diabétiques traités par metformine présentent une diminution du risque de mortalité et de morbidité coronarienne par rapport à ceux traités par sulfamides ou insuline<sup>508,509</sup>. Tout comme le SEV, la MET protège également le myocarde en situation d'ischémie-reperfusion qu'elle soit administrée avant la phase d'ischémie (préconditionnement (MPc)) ou dès le début de la phase de reperfusion (postconditionnement)<sup>355,358</sup>. Dans ce contexte, la MET nous paraît d'autant plus pertinente car cette molécule semble partager des mécanismes d'action cellulaires communs avec les AVH. D'une part, il a été montré qu'elle était capable d'induire son effet cardioprotecteur en passant par la voie de signalisation PI3K/Akt conduisant au maintien de l'intégrité mitochondriale<sup>510,356</sup>. De plus, son activité anti-diabétique pourrait s'expliquer par son action inhibitrice sur le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale régulant en conséquence la production des ROS<sup>511,512</sup>. L'inhibition partielle du complexe I de la CTE est dépendante du temps (au moins une heure) et de la dose (concentrations de l'ordre du micromolaire) d'exposition de nos cellules H9c2 à la MET<sup>513,514</sup>. De manière similaire à Daille et al., nous avons donc choisi d'exposer nos cellules H9c2 à la MET à 100 µM pendant 1 à 24 heures<sup>515</sup>. Enfin, quelques études récentes montrent que la MET protège les cellules H9c2 des lésions induites par l'ischémie-reperfusion en modulant l'expression des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL et Bcl-2<sup>379,516</sup>.

Des données cliniques récentes montrent que les propriétés protectrices préopératoires de la MET sont indépendantes de son rôle dans le contrôle de la glycémie<sup>517</sup>, ce qui souligne l'intérêt croissant pour ses effets pléiotropiques, en particulier dans la cardioprotection<sup>353</sup>. La MET semble protéger contre les lésions d'IR ; cependant, les données sont encore controversées. Bien qu'il ait été largement démontré que la MET protège des lésions IR dans divers modèles de rongeurs<sup>518</sup>, elle ne protège pas dans les modèles porcins<sup>519</sup>. Malgré l'identification de la voie de protection dépendant de ROS/Akt/Bcl-xL (AMPK-indépendante) en lien avec une probable modulation directe ou indirecte du complexe I de la CTE mitochondriale, les mécanismes impliqués dans les propriétés protectrices de la MET restent encore mal connus.

Toutefois, il reste à déterminer si la MET est à considérer comme un agent de préconditionnement agissant peu de temps avant l'IR<sup>520</sup> ou comme un traitement protecteur dans le cadre d'une prise chronique précédant l'événement impliquant une IR<sup>518</sup>. En outre, nous signalons qu'une seule injection de MET induit un effet protecteur dans des conditions de culture normoglycémique. Ce résultat est intéressant car la quasi-totalité des effets protecteurs de la MET chez les sujets non diabétiques sont plutôt décevants<sup>521,367</sup>, contrairement à ceux mis en évidence chez les sujets diabétiques exposés de façon chronique<sup>363</sup>. Il serait donc pertinent de vérifier en pratique clinique, dans le cadre de l'IR, si les propriétés cardioprotectrices de la MET sont plus prononcées au sein du myocarde de sujets diabétiques. Pour se faire, nous avons évalué pour la première fois l'effet potentiellement protecteur de la MET au décours d'un ACR (IR massive...). Autrement dit, nous nous sommes demandés si les patients diabétiques traités au long cours par MET présentaient une amélioration de survie 28 jours après leur ACR par rapport aux sujets NoMET à savoir : les patients non-diabétiques d'une part et les patients diabétiques non-traités par MET d'autre part. Ainsi, sur une cohorte de 555 ACR (62 MET vs 493 NoMET) nos résultats montrent que la MET est associée à une amélioration significative de la survie à J28 (MET : 32% vs NoMET : 19%  $p < 0,01$ ). De plus, l'effet protecteur de la MET semble préservé et plus marqué en cas de durées prolongées d'ischémie. Enfin, ces résultats sont superposables également au sein du sous-groupe des patients diabétiques. Ainsi, au de-là du ou des probables mécanismes mis en jeu, nos résultats sont cohérents avec les conditions actuelles à réunir en clinique pour garantir l'effet protecteur de la MET : exposition chronique préalable à l'IR, protection du sujet diabétique (*Rolle et al. under submission*).

Enfin, la stratégie de protection des organes et en particulier de cardioprotection devra probablement évoluer vers une prise en charge intégrant à la fois la prise en compte des facteurs confondants (contrôle glycémique, optimisation de l'oxygénation, gestion hémodynamique, seuils de transfusion, etc.) et une approche multimodale combinant plusieurs stratégies de protection afin d'obtenir une efficacité synergique et cliniquement significative<sup>377,522</sup>. Une cardioprotection clinique optimale pourrait nécessiter plusieurs interventions ciblant différentes cellules, différentes voies de signalisation et différents « timings » au cours de l'IR. Récemment, des stratégies à cibles multiples ont été designées afin de réduire les lésions induites par l'IR, en recherchant une cardioprotection additive ou synergique en combinant plusieurs interventions mettant en jeu des agents différents<sup>523</sup>. Ces stratégies pourraient notamment cibler ; à l'image de nos agents pharmacologiques SEV et MET ; l'activation de kinases impliquées dans les voies de survie cellulaire (RISK, SAFE, protéine kinase G), l'inhibition des voies de mort cellulaire ainsi que la protection vis-à-vis des différentes formes de mort des cardiomyocytes (apoptose, nécroptose, autophagie, etc.)<sup>303</sup>. A titre d'exemple, Schwibert et al ont évalué les bienfaits de la protection par le xénon (ciblant les voies de transduction du signal) combinée à l'hypothermie (ciblant la nécrose et l'apoptose)<sup>524</sup>.

Une autre approche pourrait être également pertinente et consisterait en une protection combinée des cardiomyocytes et des cellules « non-cardiomyocytes », par exemple en améliorant la microcirculation coronarienne par les inhibiteurs pharmacologiques des récepteurs P2Y<sub>12</sub>. Ces agents pharmacologiques sont utilisés en routine pour la prise en charge de la phase aigüe de la coronaropathie et serait capable de mimer les effets protecteurs du conditionnement ischémique<sup>525</sup>.

La co-médication ciblée pourrait également améliorer et/ou rétablir la cardioprotection. En effet, il a été démontré que les statines sont capables de rétablir la cardioprotection chez les animaux diabétiques<sup>526</sup> et les stratégies de cardioprotection semblent moins efficaces chez les patients non traités par statines<sup>527</sup>. Contrairement à la MET, les statines n'ont pas montré, dans notre étude, de différence significative en termes de protection vis-à-vis de la mortalité liée à l'IR majeure d'un ACR (*Rolle et al. under submission*). Par ailleurs en pratique clinique, le traitement chronique par MET des patients diabétiques se présentant pour une chirurgie est arrêté par crainte d'une acidose lactique périopératoire. À l'ère de la cardioprotection périopératoire, on peut se demander si cela est encore justifié. Jusqu'à présent, aucune étude

n'a véritablement répondu à cette question<sup>368</sup>. Dans notre étude, les patients sous MET n'étaient pas plus hyperlactatémiques que les patients NoMET (*Rolle et al. under submission*). Cependant, il est intéressant de noter qu'un article publié il y a plus de dix ans, chez des patients diabétiques devant subir une intervention chirurgicale, évaluait la morbidité postopératoire, liés au moment de la dernière prise de metformine. Les auteurs ont rapporté que, contrairement aux recommandations prodiguant d'éviter la metformine préopératoire lors d'une chirurgie programmée, plus la date de la dernière prise de metformine est proche de la chirurgie, plus la survenue d'événements postopératoires est faible<sup>528</sup>.

La combinaison de stratégies de pré, per et post-conditionnement améliore dans une certaine mesure la protection des organes sur modèle animal<sup>529</sup>, les résultats des études cliniques étant contradictoires. En effet, une stratégie combinant le RIPC et le post-conditionnement ischémique chez les patients souffrant de STEMI a amélioré d'une part l'indice de récupération myocardique (mesuré par l'IRM), mais n'a eu aucun effet sur les lésions myocardiques d'IR<sup>530,531</sup>. De manière intéressante, malgré l'induction rapide (en moins de 60 min) de la voie de signalisation dépendante de ROS/Akt/Bcl-xL par MET et SEV, la fenêtre de protection de la MET (après 24 heures d'exposition) paraît plus retardée que celle du SEV. On peut donc se demander si l'utilisation combinée de ces deux agents pharmacologiques pourrait amplifier, par effet additif et/ou synergique, la protection induite par le PPc.

La combinaison de stratégies cardioprotectrices pourrait également aider à surmonter l'inhibition de la protection par des facteurs de confusion connus telles que les comorbidités (hypertension, diabète)<sup>532</sup> ou les traitements (glibenclamide, nitrates).

Une chronicisation du conditionnement dans le but d'améliorer les résultats fonctionnels à long terme chez les patients atteints de maladies chroniques comme l'insuffisance cardiaque a également donné des résultats prometteurs<sup>533</sup>.

## CONCLUSION

---

## CONCLUSION

---

Notre travail a montré pour la première fois que l'induction de la surexpression spécifique de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL participait activement à l'effet protecteur du PPc par le SEV et la MET sur modèle *in vitro* de cardiomyocytes de rats et d'humains. De manière intéressante, nous observons également cette induction de Bcl-xL dans un modèle animal confirmant *in vivo* les résultats obtenus *in vitro*. Par ailleurs, nous avons également montré que la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL était dépendante de l'activation de la voie de PI3K/Akt selon un mécanisme ROS-dépendant, faisant de la voie ROS/Akt/Bcl-xL un élément clef de l'effet protecteur induit par le PPc (**Figure 21**). Ces expériences devront être reproduites chez l'animal et chez l'homme pour confirmer l'implication de ce mécanisme dans l'effet protecteur du PPc par les AVH et la MET. A terme, l'utilisation de molécules agissant sur ces cibles thérapeutiques, comme par exemple la MET, permettrait d'étendre l'effet cardioprotecteur des AVH en dehors du bloc opératoire.

De plus, de nombreux essais randomisés de forte puissance, touchant des domaines autre que la cardioprotection péri-opératoire, sont parvenus à fournir des réponses claires et cohérentes conduisant au bouleversement de nos pratiques en terme de protection d'organe<sup>534,71,535</sup>. Ainsi, l'avènement de la personnalisation des soins critiques et de la médecine péri-opératoire tend à favoriser le développement d'indices et d'outils (biomarqueurs, signatures génomiques, *big data* et *machine learning*<sup>536,537</sup>) spécifiquement dédiés à l'optimisation de la prise en charge des patients susceptibles de répondre différemment à nos agents pharmacologiques tels que les AVH (SEV) ou la MET. Compte tenu de l'incidence croissante des patients à haut risque cardio-vasculaire et de défaillance myocardique en contexte péri-opératoire et/ou de soins critiques en lien avec le vieillissement de la population dans les pays développés, il devient crucial de poursuivre et d'approfondir, sur divers types de mort cellulaire et dans divers modèles *in vitro* et/ou *in vivo*, notre approche expérimentale du PPc et d'en tirer une application clinique adaptée afin de légitimer la pertinence de son effet protecteur à court et long terme sur la morbi-mortalité liée à l'IR.



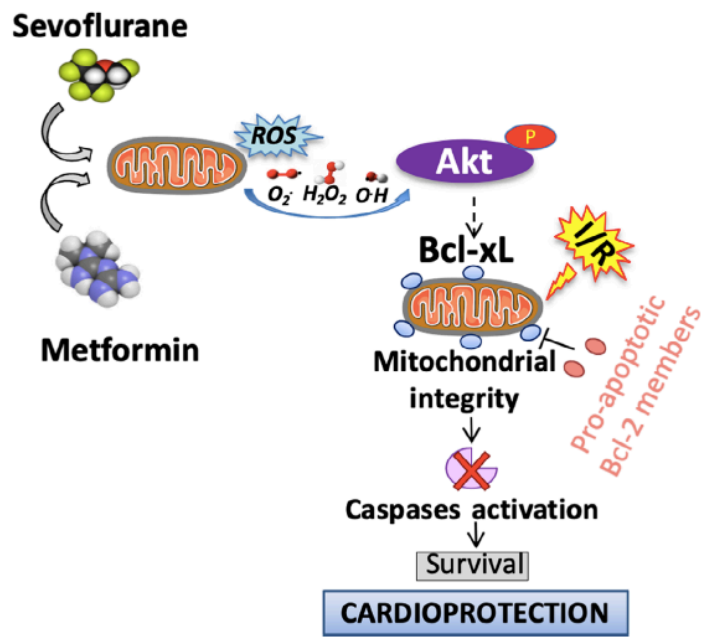


Figure 22 : Représentation de la voie de signalisation cardioprotectrice induite par l'APc et le MPC *in vitro*

(Rozier et al., FEBS, 2020<sup>538</sup>)

## BIBLIOGRAPHIE

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Neubauer, S. The failing heart--an engine out of fuel. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1140–1151 (2007).
2. Benhabbouche, S., Crola da Silva, C., Abrial, M. & Ferrera, R. [The basis of ischemia-reperfusion and myocardial protection]. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* **30 Suppl 1**, S2-16 (2011).
3. Taegtmeier, H. Metabolism--the lost child of cardiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 1386–1388 (2000).
4. Fontaine, E., Galusca, B., Péronnet, F. & Laville, M. Métabolisme énergétique. *Wwwem-Premiumcomdatatraitessgn10-68472* (2017).
5. Stanley, W. C., Recchia, F. A. & Lopaschuk, G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev.* **85**, 1093–1129 (2005).
6. Hue, L. & Rider, M. H. Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J.* **245**, 313–324 (1987).
7. Stanley, W. C., Lopaschuk, G. D., Hall, J. L. & McCormack, J. G. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc. Res.* **33**, 243–257 (1997).
8. Stanley, W. C., Lopaschuk, G. D., Hall, J. L. & McCormack, J. G. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc. Res.* **33**, 243–257 (1997).
9. Depré, C., Rider, M. H. & Hue, L. Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur. J. Biochem.* **258**, 277–290 (1998).
10. Mazer, C. D. *et al.* Myocardial metabolism during hypoxia: maintained lactate oxidation during increased glycolysis. *Metabolism.* **39**, 913–918 (1990).
11. Gertz, E. W. *et al.* Myocardial lactate metabolism: evidence of lactate release during net chemical extraction in man. *Circulation* **63**, 1273–1279 (1981).
12. Bing, R. J., Siegel, A., Ungar, I. & Gilbert, M. Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *Am. J. Med.* **16**, 504–515 (1954).
13. Opie, L. H. Metabolism of the heart in health and disease. I. *Am. Heart J.* **76**, 685–698 (1968).
14. Opie, L. H. Metabolism of the heart in health and disease. II. *Am. Heart J.* **77**, 100-122 contd (1969).
15. Schulz, H. Chapter 5 Oxidation of fatty acids in eukaryotes. in *New Comprehensive Biochemistry* vol. 36 127–150 (Elsevier, 2002).
16. Czibik, G., Steeples, V., Yavari, A. & Ashrafiyan, H. Citric acid cycle intermediates in cardioprotection. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **7**, 711–719 (2014).
17. Lesnefsky, E. J., Chen, Q., Tandler, B. & Hoppel, C. L. Mitochondrial Dysfunction and Myocardial Ischemia-Reperfusion: Implications for Novel Therapies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **57**, 535–565 (2017).
18. Murphy, E. *et al.* Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ. Res.* **118**, 1960–1991 (2016).
19. Skulachev, V. P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* **1363**, 100–124 (1998).
20. Palmer, J. W., Tandler, B. & Hoppel, C. L. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* **252**, 8731–8739 (1977).
21. DiMauro, S. Mitochondrial diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1658**, 80–88 (2004).
22. Foretz, M. *et al.* [Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]. *Med. Sci. MS* **22**, 381–

388 (2006).

23. Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A. & Linn, H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch. Pathol.* **70**, 68–78 (1960).
24. Braunwald, E. & Kloner, R. A. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J. Clin. Invest.* **76**, 1713–1719 (1985).
25. Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* **357**, 1121–1135 (2007).
26. Hearse, D. J. Reperfusion of the ischemic myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **9**, 605–616 (1977).
27. Collard, C. D. & Gelman, S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* **94**, 1133–1138 (2001).
28. Ferdinandy, P., Schulz, R. & Baxter, G. F. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol. Rev.* **59**, 418–458 (2007).
29. Avkiran, M. & Marber, M. S. Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 747–753 (2002).
30. Zhao, Z.-Q. & Vinten-Johansen, J. Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* **55**, 438–455 (2002).
31. Lemasters, J. J. *et al.* The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS* **76**, 99–114 (1996).
32. Hausenloy, D. J., Ong, S.-B. & Yellon, D. M. The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. *Basic Res. Cardiol.* **104**, 189–202 (2009).
33. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* **123**, 92–100 (2013).
34. Fliss, H. & Gattinger, D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ. Res.* **79**, 949–956 (1996).
35. Chen, G. Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 826–837 (2010).
36. Zuurbier, C. J. *et al.* Innate immunity as a target for acute cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* **115**, 1131–1142 (2019).
37. Wu, M.-Y. *et al.* Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **46**, 1650–1667 (2018).
38. Ettinger, G., MacDonald, K., Reid, G. & Burton, J. P. The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health. *Gut Microbes* **5**, 719–728 (2014).
39. Alexander, B. T., Dasinger, J. H. & Intapad, S. Fetal programming and cardiovascular pathology. *Compr. Physiol.* **5**, 997–1025 (2015).
40. Choudhuri, S., Cui, Y. & Klaassen, C. D. Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **245**, 378–393 (2010).
41. Boon, R. A. & Dimmeler, S. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nat. Rev. Cardiol.* **12**, 135–142 (2015).
42. Cui, Z., Scruggs, S. B., Gilda, J. E., Ping, P. & Gomes, A. V. Regulation of cardiac proteasomes by ubiquitination, SUMOylation, and beyond. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **71**, 32–42 (2014).
43. Rautou, P.-E. *et al.* Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ. Res.* **109**, 593–606 (2011).
44. Barth, A. S. & Tomaselli, G. F. Gene scanning and heart attack risk. *Trends Cardiovasc. Med.* **26**, 260–265 (2016).
45. Lindsey, M. L. *et al.* Transformative Impact of Proteomics on Cardiovascular Health and

- Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **132**, 852–872 (2015).
46. Lienhart, A. *et al.* Survey of anesthesia-related mortality in France. *Anesthesiology* **105**, 1087–1097 (2006).
47. Baquero, G. A. & Rich, M. W. Perioperative care in older adults. *J. Geriatr. Cardiol. JGC* **12**, 465–469 (2015).
48. Go, A. S. *et al.* Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **127**, 143–152 (2013).
49. Neri, M., Riezzo, I., Pascale, N., Pomara, C. & Turillazzi, E. Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. *Mediators Inflamm.* **2017**, 7018393 (2017).
50. Anderson, J. L. & Morrow, D. A. Acute Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* **376**, 2053–2064 (2017).
51. Kristensen, S. D. *et al.* 2014 ESC/ESA Guidelines on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management: The Joint Task Force on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Anaesthesiology (ESA). *Eur. J. Anaesthesiol.* **31**, 517–573 (2014).
52. Fleisher, L. A. *et al.* 2014 ACC/AHA guideline on perioperative cardiovascular evaluation and management of patients undergoing noncardiac surgery: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* **130**, 2215–2245 (2014).
53. Landesberg, G., Beattie, W. S., Mosseri, M., Jaffe, A. S. & Alpert, J. S. Perioperative myocardial infarction. *Circulation* **119**, 2936–2944 (2009).
54. Smit, M., Coetzee, A. R. & Lochner, A. The Pathophysiology of Myocardial Ischemia and Perioperative Myocardial Infarction. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **34**, 2501–2512 (2020).
55. Thygesen, K. *et al.* Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 2231–2264 (2018).
56. Weiser, T. G. *et al.* An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. *Lancet Lond. Engl.* **372**, 139–144 (2008).
57. Smilowitz, N. R., Gupta, N., Guo, Y., Berger, J. S. & Bangalore, S. Perioperative acute myocardial infarction associated with non-cardiac surgery. *Eur. Heart J.* **38**, 2409–2417 (2017).
58. Devereaux, P. J. *et al.* Characteristics and short-term prognosis of perioperative myocardial infarction in patients undergoing noncardiac surgery: a cohort study. *Ann. Intern. Med.* **154**, 523–528 (2011).
59. van Waes, J. A. R. *et al.* Myocardial injury after noncardiac surgery and its association with short-term mortality. *Circulation* **127**, 2264–2271 (2013).
60. Puelacher, C. *et al.* Perioperative Myocardial Injury After Noncardiac Surgery: Incidence, Mortality, and Characterization. *Circulation* **137**, 1221–1232 (2018).
61. Botto, F. *et al.* Myocardial injury after noncardiac surgery: a large, international, prospective cohort study establishing diagnostic criteria, characteristics, predictors, and 30-day outcomes. *Anesthesiology* **120**, 564–578 (2014).
62. Writing Committee for the VISION Study Investigators *et al.* Association of Postoperative High-Sensitivity Troponin Levels With Myocardial Injury and 30-Day Mortality Among Patients Undergoing Noncardiac Surgery. *JAMA* **317**, 1642–1651 (2017).
63. Devereaux, P. J. *et al.* Perioperative cardiac events in patients undergoing noncardiac surgery: a review of the magnitude of the problem, the pathophysiology of the events and methods to estimate and communicate risk. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* **173**, 627–634 (2005).
64. Wong, C. X. *et al.* Epidemiology of Sudden Cardiac Death: Global and Regional

- Perspectives. *Heart Lung Circ.* **28**, 6–14 (2019).
65. Eltzschig, H. K. & Eckle, T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat. Med.* **17**, 1391–1401 (2011).
  66. Collard, C. D. & Gelman, S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* **94**, 1133–1138 (2001).
  67. Goldberger, Z. D. *et al.* Duration of resuscitation efforts and survival after in-hospital cardiac arrest: an observational study. *Lancet Lond. Engl.* **380**, 1473–1481 (2012).
  68. Kleinman, M. E. *et al.* 2017 American Heart Association Focused Update on Adult Basic Life Support and Cardiopulmonary Resuscitation Quality: An Update to the American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* **137**, e7–e13 (2018).
  69. Huang, C.-H. *et al.* Relationship Between Statin Use and Outcomes in Patients Having Cardiac Arrest (from a Nationwide Cohort Study in Taiwan). *Am. J. Cardiol.* **123**, 1572–1579 (2019).
  70. Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N. Engl. J. Med.* **346**, 549–556 (2002).
  71. Lascarrou, J.-B. *et al.* Targeted Temperature Management for Cardiac Arrest with Nonshockable Rhythm. *N. Engl. J. Med.* (2019) doi:10.1056/NEJMoa1906661.
  72. Kagawa, E. *et al.* Should we emergently revascularize occluded coronaries for cardiac arrest?: rapid-response extracorporeal membrane oxygenation and intra-arrest percutaneous coronary intervention. *Circulation* **126**, 1605–1613 (2012).
  73. Le Gall, A. *et al.* Veno-arterial-ECMO in the intensive care unit: From technical aspects to clinical practice. *Anaesth. Crit. Care Pain Med.* **37**, 259–268 (2018).
  74. Aissaoui, N. *et al.* Understanding Left Ventricular Assist Devices. *Blood Purif.* **46**, 292–300 (2018).
  75. Bougouin, W. *et al.* Extracorporeal cardiopulmonary resuscitation in out-of-hospital cardiac arrest: a registry study. *Eur. Heart J.* **41**, 1961–1971 (2020).
  76. Stub, D. *et al.* Refractory cardiac arrest treated with mechanical CPR, hypothermia, ECMO and early reperfusion (the CHEER trial). *Resuscitation* **86**, 88–94 (2015).
  77. Hinkle, P. C., Butow, R. A., Racker, E. & Chance, B. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XV. Reverse electron transfer in the flavin-cytochrome beta region of the respiratory chain of beef heart submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* **242**, 5169–5173 (1967).
  78. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2009).
  79. St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. & Brand, M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* **277**, 44784–44790 (2002).
  80. Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I. & Stoppani, A. O. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **180**, 248–257 (1977).
  81. Chouchani, E. T. *et al.* A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab.* **23**, 254–263 (2016).
  82. Adam-Vizi, V. & Chinopoulos, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 639–645 (2006).
  83. Chance, B. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. II. General properties of adenosine triphosphate-linked oxidation of cytochrome and reduction of pyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* **236**, 1544–1554 (1961).
  84. Chance, B. & Hollunger, G. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. I. General properties and nature of the products of succinate-linked reduction of

- pyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* **236**, 1534–1543 (1961).
85. Kudin, A. P., Bimpong-Buta, N. Y.-B., Vielhaber, S., Elger, C. E. & Kunz, W. S. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**, 4127–4135 (2004).
86. Chen, Q., Moghaddas, S., Hoppel, C. L. & Lesnefsky, E. J. Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury following reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 1405–1412 (2006).
87. Niatsetskaya, Z. V. *et al.* The oxygen free radicals originating from mitochondrial complex I contribute to oxidative brain injury following hypoxia-ischemia in neonatal mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 3235–3244 (2012).
88. Pryde, K. R. & Hirst, J. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *J. Biol. Chem.* **286**, 18056–18065 (2011).
89. Cahova, M. *et al.* Metformin prevents ischemia reperfusion-induced oxidative stress in the fatty liver by attenuation of reactive oxygen species formation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **309**, G100-111 (2015).
90. Calvert, J. W. *et al.* Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. *Diabetes* **57**, 696–705 (2008).
91. El-Mir, M. Y. *et al.* Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* **275**, 223–228 (2000).
92. Andrzejewski, S., Gravel, S.-P., Pollak, M. & St-Pierre, J. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer Metab.* **2**, 12 (2014).
93. Hanley, P. J., Ray, J., Brandt, U. & Daut, J. Halothane, isoflurane and sevoflurane inhibit NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of cardiac mitochondria. *J. Physiol.* **544**, 687–693 (2002).
94. Kevin, L. G. *et al.* Sevoflurane exposure generates superoxide but leads to decreased superoxide during ischemia and reperfusion in isolated hearts. *Anesth. Analg.* **96**, 949–955, table of contents (2003).
95. Hanouz, J.-L. *et al.* Reactive oxygen species mediate sevoflurane- and desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesth. Analg.* **105**, 1534–1539, table of contents (2007).
96. Hirata, N. *et al.* Isoflurane differentially modulates mitochondrial reactive oxygen species production via forward versus reverse electron transport flow: implications for preconditioning. *Anesthesiology* **115**, 531–540 (2011).
97. Babot, M., Birch, A., Labarbuta, P. & Galkin, A. Characterisation of the active/de-active transition of mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 1083–1092 (2014).
98. Kotlyar, A. B. & Vinogradov, A. D. Slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1019**, 151–158 (1990).
99. Vinogradov, A. D. Catalytic properties of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) and the pseudo-reversible active/inactive enzyme transition. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 169–185 (1998).
100. Ciano, M., Fuszard, M., Heide, H., Botting, C. H. & Galkin, A. Conformation-specific crosslinking of mitochondrial complex I. *FEBS Lett.* **587**, 867–872 (2013).
101. Galkin, A., Abramov, A. Y., Frakich, N., Duchon, M. R. & Moncada, S. Lack of oxygen deactivates mitochondrial complex I: implications for ischemic injury? *J. Biol. Chem.* **284**, 36055–36061 (2009).
102. Gorenkova, N., Robinson, E., Grieve, D. J. & Galkin, A. Conformational change of mitochondrial complex I increases ROS sensitivity during ischemia. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 1459–1468 (2013).
103. Vinten-Johansen, J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal

- myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **61**, 481–497 (2004).
104. Terada, L. S. *et al.* Existence and participation of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic rabbit myocardium. *Am. J. Physiol.* **260**, H805-810 (1991).
105. Stevens, J. L., Feelisch, M. & Martin, D. S. Perioperative Oxidative Stress: The Unseen Enemy. *Anesth. Analg.* **129**, 1749–1760 (2019).
106. Simon, H. U., Haj-Yehia, A. & Levi-Schaffer, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **5**, 415–418 (2000).
107. Zhao, H., Kilgas, S., Alam, A., Eguchi, S. & Ma, D. The Role of Extracellular Adenosine Triphosphate in Ischemic Organ Injury. *Crit. Care Med.* **44**, 1000–1012 (2016).
108. Kalogeris, T., Bao, Y. & Korthuis, R. J. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol.* **2**, 702–714 (2014).
109. Soysal, P. *et al.* Oxidative stress and frailty: A systematic review and synthesis of the best evidence. *Maturitas* **99**, 66–72 (2017).
110. Aivatidi, C. *et al.* Oxidative stress during abdominal aortic aneurysm repair--biomarkers and antioxidant's protective effect: a review. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **15**, 245–252 (2011).
111. Arsalani-Zadeh, R., Ullah, S., Khan, S. & MacFie, J. Oxidative stress in laparoscopic versus open abdominal surgery: a systematic review. *J. Surg. Res.* **169**, e59-68 (2011).
112. Biglioli, P. *et al.* Biological effects of off-pump vs. on-pump coronary artery surgery: focus on inflammation, hemostasis and oxidative stress. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **24**, 260–269 (2003).
113. Misthos, P., Katsaragakis, S., Theodorou, D., Milingos, N. & Skottis, I. The degree of oxidative stress is associated with major adverse effects after lung resection: a prospective study. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **29**, 591–595 (2006).
114. Cheng, Y. J., Chien, C. T. & Chen, C. F. Oxidative stress in bilateral total knee replacement, under ischaemic tourniquet. *J. Bone Joint Surg. Br.* **85**, 679–682 (2003).
115. Murry, C. E., Jennings, R. B. & Reimer, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124–1136 (1986).
116. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators *et al.* Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N. Engl. J. Med.* **342**, 154–160 (2000).
117. Burns, K. E. A. *et al.* Perioperative N-acetylcysteine to prevent renal dysfunction in high-risk patients undergoing cabg surgery: a randomized controlled trial. *JAMA* **294**, 342–350 (2005).
118. Janssen-Heininger, Y. M. W. *et al.* Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 1–17 (2008).
119. Burgoyne, J. R., Oka, S., Ale-Agha, N. & Eaton, P. Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 1042–1052 (2013).
120. Ristow, M. Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nat. Med.* **20**, 709–711 (2014).
121. Sena, L. A. & Chandel, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell* **48**, 158–167 (2012).
122. Yun, J. & Finkel, T. Mitohormesis. *Cell Metab.* **19**, 757–766 (2014).
123. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257 (1972).
124. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).



125. Reimer, K. A. & Ideker, R. E. Myocardial ischemia and infarction: anatomic and biochemical substrates for ischemic cell death and ventricular arrhythmias. *Hum. Pathol.* **18**, 462–475 (1987).
126. Konstantinidis, K., Whelan, R. S. & Kitsis, R. N. Mechanisms of cell death in heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1552–1562 (2012).
127. Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. & Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 700–714 (2010).
128. Linkermann, A. *et al.* Necroptosis in immunity and ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **13**, 2797–2804 (2013).
129. Oerlemans, M. I. F. J. *et al.* Targeting cell death in the reperfused heart: pharmacological approaches for cardioprotection. *Int. J. Cardiol.* **165**, 410–422 (2013).
130. Eefting, F. *et al.* Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **61**, 414–426 (2004).
131. Gottlieb, R. A. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **16**, 233–238 (2011).
132. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257 (1972).
133. Fernald, K. & Kurokawa, M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.* **23**, 620–633 (2013).
134. Cotter, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 501–507 (2009).
135. Johnson, C. E. & Kornbluth, S. Caspase cleavage is not for everyone. *Cell* **134**, 720–721 (2008).
136. Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300–304 (1997).
137. Jugdutt, B. I. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* **108**, 1395–1403 (2003).
138. Apoptosis predominates in nonmyocytes in heart failure - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/19465551/>.
139. Kajstura, J. *et al.* Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **74**, 86–107 (1996).
140. Fliss, H. & Gattinger, D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ. Res.* **79**, 949–956 (1996).
141. Zhao, Z. Q. *et al.* Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion. *J. Surg. Res.* **94**, 133–144 (2000).
142. Zhao, Z. Q. *et al.* Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc. Res.* **45**, 651–660 (2000).
143. Freude, B. *et al.* Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**, 197–208 (2000).
144. Broughton, B. R. S., Reutens, D. C. & Sobey, C. G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* **40**, e331–339 (2009).
145. Nastos, C. *et al.* Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 906965 (2014).
146. Crow, M. T., Mani, K., Nam, Y.-J. & Kitsis, R. N. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ. Res.* **95**, 957–970 (2004).
147. Regula, K. M. & Kirshenbaum, L. A. Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **38**, 3–13 (2005).
148. Condorelli, G. *et al.* Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases

- infarct size and depresses cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9977–9982 (2001).
149. Chua, C. C. *et al.* Overexpression of IAP-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 577–583 (2007).
150. Lee, P. *et al.* Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**, H456–463 (2003).
151. Kurrelmeyer, K. M. *et al.* Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5456–5461 (2000).
152. Hochhauser, E. *et al.* Bax deficiency reduces infarct size and improves long-term function after myocardial infarction. *Cell Biochem. Biophys.* **47**, 11–20 (2007).
153. Chen, Z., Chua, C. C., Ho, Y. S., Hamdy, R. C. & Chua, B. H. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H2313–2320 (2001).
154. Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **87**, 99–163 (2007).
155. Grootjans, S., Vanden Berghe, T. & Vandenabeele, P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death Differ.* **24**, 1184–1195 (2017).
156. Pasparakis, M. & Vandenabeele, P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* **517**, 311–320 (2015).
157. Smith, C. C. T. *et al.* Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovasc. Drugs Ther.* **21**, 227–233 (2007).
158. Oerlemans, M. I. F. J. *et al.* Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic Res. Cardiol.* **107**, 270 (2012).
159. Mishra, P. K. *et al.* Guidelines for evaluating myocardial cell death. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **317**, H891–H922 (2019).
160. Szobi, A. *et al.* Cardioprotection of ischaemic preconditioning is associated with inhibition of translocation of MLKL within the plasma membrane. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 4183–4196 (2018).
161. Luedde, M. *et al.* RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **103**, 206–216 (2014).
162. Smith, C. C. T. *et al.* Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovasc. Drugs Ther.* **21**, 227–233 (2007).
163. Lim, S. Y., Davidson, S. M., Mocanu, M. M., Yellon, D. M. & Smith, C. C. T. The cardioprotective effect of necrostatin requires the cyclophilin-D component of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **21**, 467–469 (2007).
164. Zhang, T. *et al.* CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. *Nat. Med.* **22**, 175–182 (2016).
165. Hou, H. *et al.* The role of RIP3 in cardiomyocyte necrosis induced by mitochondrial damage of myocardial ischemia-reperfusion. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **50**, 1131–1140 (2018).
166. She, L. *et al.* Inhibition of Phosphoglycerate Mutase 5 Reduces Necroptosis in Rat Hearts Following Ischemia/Reperfusion Through Suppression of Dynamin-Related Protein 1. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **33**, 13–23 (2019).
167. Davidson, S. M. *et al.* Mitochondrial and mitochondrial-independent pathways of myocardial cell death during ischaemia and reperfusion injury. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 3795–3806 (2020).

168. Shen, H.-M. & Codogno, P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* **7**, 457–465 (2011).
169. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**, 1–222 (2016).
170. Matsui, Y. *et al.* Molecular mechanisms and physiological significance of autophagy during myocardial ischemia and reperfusion. *Autophagy* **4**, 409–415 (2008).
171. Tait, S. W. G. & Green, D. R. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* **27**, 6452–6461 (2008).
172. Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E. & Croce, C. M. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* **229**, 1390–1393 (1985).
173. Borner, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.* **39**, 615–647 (2003).
174. Krajewski, S. *et al.* Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* **53**, 4701–4714 (1993).
175. Lithgow, T., van Driel, R., Bertram, J. F. & Strasser, A. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **5**, 411–417 (1994).
176. Martinou, J.-C. & Youle, R. J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell* **21**, 92–101 (2011).
177. Kvansakul, M. *et al.* Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ.* **15**, 1564–1571 (2008).
178. Muchmore, S. W. *et al.* X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**, 335–341 (1996).
179. Suzuki, M., Youle, R. J. & Tjandra, N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**, 645–654 (2000).
180. Priault, M., Camougrand, N., Chaudhuri, B. & Manon, S. Role of the C-terminal domain of Bax and Bcl-XL in their localization and function in yeast cells. *FEBS Lett.* **443**, 225–228 (1999).
181. Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J. & Green, D. R. The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* **37**, 299–310 (2010).
182. Gavathiotis, E. *et al.* BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* **455**, 1076–1081 (2008).
183. Billen, L. P., Kokoski, C. L., Lovell, J. F., Leber, B. & Andrews, D. W. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol.* **6**, e147 (2008).
184. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 49–63 (2014).
185. Motoyama, N. *et al.* Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* **267**, 1506–1510 (1995).
186. Rucker, E. B. *et al.* Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **14**, 1038–1052 (2000).
187. Mason, K. D. *et al.* Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* **128**, 1173–1186 (2007).
188. Takehara, T. *et al.* Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology* **127**, 1189–1197 (2004).
189. Clerk, A. *et al.* Regulation of cardiac myocyte cell death. *Pharmacol. Ther.* **97**, 223–

261 (2003).

190. Westphal, D., Kluck, R. M. & Dewson, G. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death Differ.* **21**, 196–205 (2014).

191. Karch, J. & Molkentin, J. D. Identifying the components of the elusive mitochondrial permeability transition pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 10396–10397 (2014).

192. Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J. & Molkentin, J. D. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat. Cell Biol.* **9**, 550–555 (2007).

193. Chipuk, J. E. *et al.* Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* **148**, 988–1000 (2012).

194. Dejean, L. M. *et al.* Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2424–2432 (2005).

195. García-Sáez, A. J. The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ.* **19**, 1733–1740 (2012).

196. Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C. & Korsmeyer, S. J. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* **17**, 3878–3885 (1998).

197. Willis, S. N. *et al.* Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**, 856–859 (2007).

198. Kutuk, O. & Letai, A. Regulation of Bcl-2 family proteins by posttranslational modifications. *Curr. Mol. Med.* **8**, 102–118 (2008).

199. Wei, Y., Patingre, S., Sinha, S., Bassik, M. & Levine, B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol. Cell* **30**, 678–688 (2008).

200. Dai, H. *et al.* Contribution of Bcl-2 phosphorylation to Bak binding and drug resistance. *Cancer Res.* **73**, 6998–7008 (2013).

201. Perciavalle, R. M. & Opferman, J. T. Delving deeper: MCL-1's contributions to normal and cancer biology. *Trends Cell Biol.* **23**, 22–29 (2013).

202. Thomas, L. W., Lam, C. & Edwards, S. W. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett.* **584**, 2981–2989 (2010).

203. Schwickart, M. *et al.* Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* **463**, 103–107 (2010).

204. Perciavalle, R. M. *et al.* Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat. Cell Biol.* **14**, 575–583 (2012).

205. Cook, S. A., Sugden, P. H. & Clerk, A. Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ. Res.* **85**, 940–949 (1999).

206. Ing, D. J., Zang, J., Dzau, V. J., Webster, K. A. & Bishopric, N. H. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. *Circ. Res.* **84**, 21–33 (1999).

207. Chen, M. *et al.* Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J. Biol. Chem.* **276**, 30724–30728 (2001).

208. Di Napoli, P. *et al.* Left ventricular wall stress as a direct correlate of cardiomyocyte apoptosis in patients with severe dilated cardiomyopathy. *Am. Heart J.* **146**, 1105–1111 (2003).

209. Latif, N. *et al.* Upregulation of the Bcl-2 family of proteins in end stage heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 1769–1777 (2000).

210. Baldi, A. *et al.* Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling. *J. Mol. Cell.*

*Cardiol.* **34**, 165–174 (2002).

211. Gustafsson, A. B., Tsai, J. G., Logue, S. E., Crow, M. T. & Gottlieb, R. A. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation. *J. Biol. Chem.* **279**, 21233–21238 (2004).
212. Hochhauser, E. *et al.* Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**, H2351–2359 (2003).
213. Kirshenbaum, L. A. & de Moissac, D. The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* **96**, 1580–1585 (1997).
214. Kang, P. M., Haunstetter, A., Aoki, H., Usheva, A. & Izumo, S. Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circ. Res.* **87**, 118–125 (2000).
215. Imahashi, K., Schneider, M. D., Steenbergen, C. & Murphy, E. Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* **95**, 734–741 (2004).
216. Zhu, L., Yu, Y., Chua, B. H., Ho, Y. S. & Kuo, T. H. Regulation of sodium-calcium exchange and mitochondrial energetics by Bcl-2 in the heart of transgenic mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**, 2135–2144 (2001).
217. Wang, X. *et al.* Deletion of MCL-1 causes lethal cardiac failure and mitochondrial dysfunction. *Genes Dev.* **27**, 1351–1364 (2013).
218. Chen, C., Edelstein, L. C. & Gélinas, C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2687–2695 (2000).
219. Chen, N. *et al.* BCL-xL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1 {alpha}. *J. Biol. Chem.* **284**, 10004–10012 (2009).
220. Jacquin, M. A. *et al.* GAPDH binds to active Akt, leading to Bcl-xL increase and escape from caspase-independent cell death. *Cell Death Differ.* **20**, 1043–1054 (2013).
221. Tang, T. T.-L. *et al.* The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* **277**, 14255–14265 (2002).
222. Tamura, Y. *et al.* Polo-like kinase 1 phosphorylates and regulates Bcl-x(L) during pironetin-induced apoptosis. *Oncogene* **28**, 107–116 (2009).
223. Antony, R., Lukiw, W. J. & Bazan, N. G. Neuroprotectin D1 induces dephosphorylation of Bcl-xL in a PP2A-dependent manner during oxidative stress and promotes retinal pigment epithelial cell survival. *J. Biol. Chem.* **285**, 18301–18308 (2010).
224. Clem, R. J. *et al.* Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 554–559 (1998).
225. Niture, S. K. & Jaiswal, A. K. Inhibitor of Nrf2 (INrf2 or Keap1) protein degrades Bcl-xL via phosphoglycerate mutase 5 and controls cellular apoptosis. *J. Biol. Chem.* **286**, 44542–44556 (2011).
226. Gong, Y. *et al.* Pan-Cancer Analysis Links PARK2 to BCL-XL-Dependent Control of Apoptosis. *Neoplasia N. Y. N* **19**, 75–83 (2017).
227. Beaumatin, F., El Dhaybi, M., Bobo, C., Verdier, M. & Priault, M. Bcl-xL deamidation and cancer: Charting the fame trajectories of legitimate child and hidden siblings. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1864**, 1734–1745 (2017).
228. Beaumatin, F. *et al.* N52 monodeamidated Bcl-xL shows impaired oncogenic properties in vivo and in vitro. *Oncotarget* **7**, 17129–17143 (2016).
229. Beaumatin, F. *et al.* N52 monodeamidated Bcl-xL shows impaired oncogenic properties in vivo and in vitro. *Oncotarget* **7**, 17129–17143 (2016).
230. Jose Corbalan, J., Vatner, D. E. & Vatner, S. F. Myocardial apoptosis in heart disease: does the emperor have clothes? *Basic Res. Cardiol.* **111**, 31 (2016).
231. Ogata, Y. & Takahashi, M. Bcl-xL as an antiapoptotic molecule for cardiomyocytes. *Drug News Perspect.* **16**, 446–452 (2003).

232. Nakamura, T. *et al.* Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J. Clin. Invest.* **106**, 1511–1519 (2000).
233. Yamamura, T. *et al.* IGF-I differentially regulates Bcl-xL and Bax and confers myocardial protection in the rat heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H1191-1200 (2001).
234. Chen, M., Won, D.-J., Krajewski, S. & Gottlieb, R. A. Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* **277**, 29181–29186 (2002).
235. Huang, J. *et al.* Bcl-xL gene transfer protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 64–70 (2003).
236. Valks, D. M., Kemp, T. J. & Clerk, A. Regulation of Bcl-xL expression by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 25542–25547 (2003).
237. Xu, B., Strom, J. & Chen, Q. M. Dexamethasone induces transcriptional activation of Bcl-xL gene and inhibits cardiac injury by myocardial ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* **668**, 194–200 (2011).
238. Del Re, D. P. *et al.* Mst1 promotes cardiac myocyte apoptosis through phosphorylation and inhibition of Bcl-xL. *Mol. Cell* **54**, 639–650 (2014).
239. Burns, K. E. A. *et al.* Perioperative N-acetylcysteine to prevent renal dysfunction in high-risk patients undergoing cabg surgery: a randomized controlled trial. *JAMA* **294**, 342–350 (2005).
240. González-Montero, J., Brito, R., Gajardo, A. I. & Rodrigo, R. Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities. *World J. Cardiol.* **10**, 74–86 (2018).
241. POISE Study Group *et al.* Effects of extended-release metoprolol succinate in patients undergoing non-cardiac surgery (POISE trial): a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **371**, 1839–1847 (2008).
242. Warltier, D. C., Pagel, P. S. & Kersten, J. R. Approaches to the prevention of perioperative myocardial ischemia. *Anesthesiology* **92**, 253–259 (2000).
243. Jivraj, N., Liew, F. & Marber, M. Ischaemic postconditioning: cardiac protection after the event. *Anaesthesia* **70**, 598–612 (2015).
244. Torregroza, C. *et al.* Perioperative Cardioprotection: General Mechanisms and Pharmacological Approaches. *Anesth. Analg.* **131**, 1765–1780 (2020).
245. Carroll, R. & Yellon, D. M. Myocardial adaptation to ischaemia--the preconditioning phenomenon. *Int. J. Cardiol.* **68 Suppl 1**, S93-101 (1999).
246. Ishihara, M. *et al.* Implications of prodromal angina pectoris in anterior wall acute myocardial infarction: acute angiographic findings and long-term prognosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **30**, 970–975 (1997).
247. Thielmann, M. *et al.* Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **382**, 597–604 (2013).
248. Hausenloy, D. J. *et al.* Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1408–1417 (2015).
249. Meybohm, P. *et al.* A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1397–1407 (2015).
250. Kanoria, S., Jalan, R., Seifalian, A. M., Williams, R. & Davidson, B. R. Protocols and mechanisms for remote ischemic preconditioning: a novel method for reducing ischemia reperfusion injury. *Transplantation* **84**, 445–458 (2007).
251. Bland, J. H. & Lowenstein, E. Halothane-induced decrease in experimental myocardial ischemia in the non-failing canine heart. *Anesthesiology* **45**, 287–293 (1976).
252. Cope, D. K., Impastato, W. K., Cohen, M. V. & Downey, J. M. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* **86**, 699–709 (1997).
253. De Hert, S. G. *et al.* Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of

- myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients. *Anesthesiology* **99**, 314–323 (2003).
254. Landoni, G. *et al.* Anaesthetic drugs and survival: a Bayesian network meta-analysis of randomized trials in cardiac surgery. *Br. J. Anaesth.* **111**, 886–896 (2013).
255. Bolli, R. *et al.* The late phase of preconditioning and its natural clinical application--gene therapy. *Heart Fail. Rev.* **12**, 189–199 (2007).
256. Landoni, G., Bignami, E., Oliviero, F. & Zangrillo, A. Halogenated anaesthetics and cardiac protection in cardiac and non-cardiac anaesthesia. *Ann. Card. Anaesth.* **12**, 4–9 (2009).
257. De Hert, S. G. Cardioprotection in anesthesia. *Minerva Anesthesiol.* **74**, 259–270 (2008).
258. Hanouz, J.-L. *et al.* Mechanisms of desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesthesiology* **97**, 33–41 (2002).
259. Hu, Z.-Y. & Liu, J. Mechanism of cardiac preconditioning with volatile anaesthetics. *Anaesth. Intensive Care* **37**, 532–538 (2009).
260. Caricati-Neto, A., Errante, P. R. & Menezes-Rodrigues, F. S. Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
261. Pagel, P. S. & Hudetz, J. A. Delayed cardioprotection by inhaled anesthetics. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **25**, 1125–1140 (2011).
262. Qiao, S. *et al.* Delayed anesthetic preconditioning protects against myocardial infarction via activation of nuclear factor- $\kappa$ B and upregulation of autophagy. *J. Anesth.* **27**, 251–260 (2013).
263. Chiari, P., Bouvet, F. & Piriou, V. [Anaesthetic-induced myocardial preconditioning: fundamental basis and clinical implications]. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* **24**, 383–396 (2005).
264. Kikuchi, C., Dosenovic, S. & Bienengraeber, M. Anaesthetics as cardioprotectants: translatability and mechanism. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 2051–2061 (2015).
265. Bein, B. *et al.* The effects of interrupted or continuous administration of sevoflurane on preconditioning before cardio-pulmonary bypass in coronary artery surgery: comparison with continuous propofol. *Anaesthesia* **63**, 1046–1055 (2008).
266. Frässdorf, J. *et al.* Impact of preconditioning protocol on anesthetic-induced cardioprotection in patients having coronary artery bypass surgery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **137**, 1436–1442, 1442.e1–2 (2009).
267. De Hert, S. G. *et al.* Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology* **101**, 299–310 (2004).
268. Pagel, P. S. Myocardial protection by volatile anesthetics in patients undergoing cardiac surgery: a critical review of the laboratory and clinical evidence. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **27**, 972–982 (2013).
269. Members\*, W. C. *et al.* 2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* **124**, e652–e735 (2011).
270. Sousa-Uva, M. *et al.* 2017 EACTS Guidelines on perioperative medication in adult cardiac surgery. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **53**, 5–33 (2018).
271. Li, F. & Yuan, Y. Meta-analysis of the cardioprotective effect of sevoflurane versus propofol during cardiac surgery. *BMC Anesthesiol.* **15**, 128 (2015).
272. Kortekaas, K. A. *et al.* Cardiospecific sevoflurane treatment quenches inflammation but does not attenuate myocardial cell damage markers: a proof-of-concept study in patients undergoing mitral valve repair. *Br. J. Anaesth.* **112**, 1005–1014 (2014).

273. Lurati Buse, G. A. L. *et al.* Randomized comparison of sevoflurane versus propofol to reduce perioperative myocardial ischemia in patients undergoing noncardiac surgery. *Circulation* **126**, 2696–2704 (2012).
274. Lindholm, E. E. *et al.* The anesthesia in abdominal aortic surgery (ABSENT) study: a prospective, randomized, controlled trial comparing troponin T release with fentanyl-sevoflurane and propofol-remifentanyl anesthesia in major vascular surgery. *Anesthesiology* **119**, 802–812 (2013).
275. Uhlig, C. *et al.* Effects of Volatile Anesthetics on Mortality and Postoperative Pulmonary and Other Complications in Patients Undergoing Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *Anesthesiology* **124**, 1230–1245 (2016).
276. An, R., Pang, Q.-Y., Chen, B. & Liu, H.-L. Effect of anesthesia methods on postoperative major adverse cardiac events and mortality after non-cardiac surgeries: a systematic review and meta-analysis. *Minerva Anestesiol.* **83**, 749–761 (2017).
277. Fleisher, L. A. *et al.* ACC/AHA 2007 guidelines on perioperative cardiovascular evaluation and care for noncardiac surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation for Noncardiac Surgery): developed in collaboration with the American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Rhythm Society, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, and Society for Vascular Surgery. *Circulation* **116**, e418-499 (2007).
278. Landoni, G. *et al.* Volatile Anesthetics versus Total Intravenous Anesthesia for Cardiac Surgery. *N. Engl. J. Med.* **380**, 1214–1225 (2019).
279. Smit, K. F., Weber, N. C., Hollmann, M. W. & Preckel, B. Noble gases as cardioprotectants - translatability and mechanism. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 2062–2073 (2015).
280. Anna, R., Rolf, R. & Mark, C. Update of the organoprotective properties of xenon and argon: from bench to bedside. *Intensive Care Med. Exp.* **8**, 11 (2020).
281. Smit, K. F. *et al.* Helium induces preconditioning in human endothelium in vivo. *Anesthesiology* **118**, 95–104 (2013).
282. Smit, K. F. *et al.* Effect of helium pre- or postconditioning on signal transduction kinases in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J. Transl. Med.* **14**, 294 (2016).
283. Hofland, J. *et al.* Effect of Xenon Anesthesia Compared to Sevoflurane and Total Intravenous Anesthesia for Coronary Artery Bypass Graft Surgery on Postoperative Cardiac Troponin Release: An International, Multicenter, Phase 3, Single-blinded, Randomized Noninferiority Trial. *Anesthesiology* **127**, 918–933 (2017).
284. Arola, O. *et al.* Inhaled Xenon Attenuates Myocardial Damage in Comatose Survivors of Out-of-Hospital Cardiac Arrest: The Xe-Hypotheca Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **70**, 2652–2660 (2017).
285. Weber, N. C. *et al.* The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38 MAPK. *Br. J. Pharmacol.* **144**, 123–132 (2005).
286. Schilling, J. M., Roth, D. M. & Patel, H. H. Caveolins in cardioprotection - translatability and mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 2114–2125 (2015).
287. Zaugg, M., Lucchinetti, E., Behmanesh, S. & Clanachan, A. S. Anesthetic cardioprotection in clinical practice from proof-of-concept to clinical applications. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 5706–5726 (2014).
288. Wang, B. *et al.* Propofol Induces Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury via Suppression of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Channel. *Front.*



*Pharmacol.* **10**, 1150 (2019).

289. Li, Y.-M. *et al.* Propofol-mediated cardioprotection dependent of microRNA-451/HMGB1 against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Cell. Physiol.* **234**, 23289–23301 (2019).
290. Kwanten, L. E., O'Brien, B. & Anwar, S. Opioid-Based Anesthesia and Analgesia for Adult Cardiac Surgery: History and Narrative Review of the Literature. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **33**, 808–816 (2019).
291. Tanaka, K., Kersten, J. R. & Riess, M. L. Opioid-induced cardioprotection. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 5696–5705 (2014).
292. Zuo, Y. *et al.* Effect of aortic root infusion of sufentanil on ischemia-reperfusion injury in patients undergoing mitral valve replacement. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **28**, 1474–1478 (2014).
293. Jin, S.-Y. *et al.* Remifentanil preconditioning confers cardioprotection via c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases and extracellular signal regulated kinases pathways in ex-vivo failing rat heart. *Eur. J. Pharmacol.* **828**, 1–8 (2018).
294. Melo, Z., Ishida, C., Goldaraz, M. de la P., Rojo, R. & Echavarria, R. Novel Roles of Non-Coding RNAs in Opioid Signaling and Cardioprotection. *Non-Coding RNA* **4**, (2018).
295. Sergeev, P. *et al.* Trigger-dependent gene expression profiles in cardiac preconditioning: evidence for distinct genetic programs in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* **100**, 474–488 (2004).
296. Frässdorf, J., De Hert, S. & Schlack, W. Anaesthesia and myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Br. J. Anaesth.* **103**, 89–98 (2009).
297. Zaugg, M., Lucchinetti, E., Behmanesh, S. & Clanachan, A. S. Anesthetic cardioprotection in clinical practice from proof-of-concept to clinical applications. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 5706–5726 (2014).
298. Qian, B., Yang, Y., Yao, Y., Liao, Y. & Lin, Y. Upregulation of vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to sevoflurane preconditioning-mediated cardioprotection. *Drug Des. Devel. Ther.* **12**, 769–776 (2018).
299. Wang, Y., Ge, C., Chen, J., Tang, K. & Liu, J. GSK-3 $\beta$  inhibition confers cardioprotection associated with the restoration of mitochondrial function and suppression of endoplasmic reticulum stress in sevoflurane preconditioned rats following ischemia/reperfusion injury. *Perfusion* **33**, 679–686 (2018).
300. Huang, G., Hao, F. & Hu, X. Downregulation of microRNA-155 stimulates sevoflurane-mediated cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury by binding to SIRT1 in mice. *J. Cell. Biochem.* **120**, 15494–15505 (2019).
301. Kevin, L. G. *et al.* Sevoflurane exposure generates superoxide but leads to decreased superoxide during ischemia and reperfusion in isolated hearts. *Anesth. Analg.* **96**, 949–955, table of contents (2003).
302. Tanaka, K. *et al.* Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species. *Anesthesiology* **97**, 1485–1490 (2002).
303. Rossello, X. & Yellon, D. M. The RISK pathway and beyond. *Basic Res. Cardiol.* **113**, 2 (2018).
304. Miyamoto, S., Murphy, A. N. & Brown, J. H. Akt mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue. *J. Bioenerg. Biomembr.* **41**, 169–180 (2009).
305. Boengler, K., Lochnit, G. & Schulz, R. Mitochondria ‘THE’ target of myocardial conditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **315**, H1215–H1231 (2018).
306. Schulman, D., Latchman, D. S. & Yellon, D. M. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H1481-1488 (2002).

307. Yellon, D. M. & Baxter, G. F. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 245–249 (1999).
308. Hausenloy, D. J., Tsang, A. & Yellon, D. M. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**, 69–75 (2005).
309. Staal, S. P. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 5034–5037 (1987).
310. Staal, S. P. & Hartley, J. W. Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus. *J. Exp. Med.* **167**, 1259–1264 (1988).
311. Sussman, M. A. *et al.* Myocardial AKT: the omnipresent nexus. *Physiol. Rev.* **91**, 1023–1070 (2011).
312. Matsui, T. & Rosenzweig, A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **38**, 63–71 (2005).
313. Williams, M. R. *et al.* The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr. Biol. CB* **10**, 439–448 (2000).
314. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098–1101 (2005).
315. Morisco, C. *et al.* The Akt-glycogen synthase kinase 3beta pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by beta-adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 14466–14475 (2000).
316. Skurk, C. *et al.* The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 20814–20823 (2005).
317. Miyamoto, S., Murphy, A. N. & Brown, J. H. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ.* **15**, 521–529 (2008).
318. Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y. & Mills, G. B. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 988–1004 (2005).
319. Rossello, X. & Yellon, D. M. A critical review on the translational journey of cardioprotective therapies! *Int. J. Cardiol.* **220**, 176–184 (2016).
320. Budas, G. R., Sukhodub, A., Alessi, D. R. & Jovanović, A. 3'Phosphoinositide-dependent kinase-1 is essential for ischemic preconditioning of the myocardium. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 2556–2558 (2006).
321. Lotz, C. & Kehl, F. Volatile anesthetic-induced cardiac protection: molecular mechanisms, clinical aspects, and interactions with nonvolatile agents. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **29**, 749–760 (2015).
322. Mellidis, K. *et al.* Activation of prosurvival signaling pathways during the memory phase of volatile anesthetic preconditioning in human myocardium: a pilot study. *Mol. Cell. Biochem.* **388**, 195–201 (2014).
323. Raphael, J. *et al.* Volatile anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional ischemia and reperfusion via Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**, 186–194 (2006).
324. Deveraux, Q. L., Schendel, S. L. & Reed, J. C. Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Cardiol. Clin.* **19**, 57–74 (2001).
325. Lazou, A. *et al.* Ischemic but not mechanical preconditioning attenuates ischemia/reperfusion induced myocardial apoptosis in anaesthetized rabbits: the role of Bcl-2 family proteins and ERK1/2. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **11**, 2195–2204 (2006).
326. Uchiyama, T., Engelman, R. M., Maulik, N. & Das, D. K. Role of Akt signaling in

- mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning. *Circulation* **109**, 3042–3049 (2004).
327. Lu, X., Liu, H., Wang, L. & Schaefer, S. Activation of NF-kappaB is a critical element in the antiapoptotic effect of anesthetic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**, H1296-1304 (2009).
328. Wang, C. *et al.* Role of nuclear factor- $\kappa$ B in volatile anaesthetic preconditioning with sevoflurane during myocardial ischaemia/reperfusion. *Eur. J. Anaesthesiol.* **27**, 747–756 (2010).
329. Kumar, D. & Jugdutt, B. I. Apoptosis and oxidants in the heart. *J. Lab. Clin. Med.* **142**, 288–297 (2003).
330. Sugamura, K. & Keaney, J. F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 978–992 (2011).
331. Kevin, L. G., Camara, A. K. S., Riess, M. L., Novalija, E. & Stowe, D. F. Ischemic preconditioning alters real-time measure of O<sub>2</sub> radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**, H566-574 (2003).
332. Quarrie, R. *et al.* Ischemic preconditioning preserves mitochondrial membrane potential and limits reactive oxygen species production. *J. Surg. Res.* **178**, 8–17 (2012).
333. Skyschally, A., Schulz, R., Gres, P., Korth, H.-G. & Heusch, G. Attenuation of ischemic preconditioning in pigs by scavenging of free oxyradicals with ascorbic acid. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**, H698-703 (2003).
334. Sepac, A. *et al.* Isoflurane preconditioning elicits competent endogenous mechanisms of protection from oxidative stress in cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Anesthesiology* **113**, 906–916 (2010).
335. Agarwal, B., Stowe, D. F., Dash, R. K., Bosnjak, Z. J. & Camara, A. K. S. Mitochondrial targets for volatile anesthetics against cardiac ischemia-reperfusion injury. *Front. Physiol.* **5**, 341 (2014).
336. Toller, W. G. *et al.* Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* **92**, 1731–1739 (2000).
337. Tanaka, K. *et al.* Mitochondrial adenosine triphosphate-regulated potassium channel opening acts as a trigger for isoflurane-induced preconditioning by generating reactive oxygen species. *Anesthesiology* **98**, 935–943 (2003).
338. Kuno, A. *et al.* Infarct limitation by a protein kinase G activator at reperfusion in rabbit hearts is dependent on sensitizing the heart to A<sub>2b</sub> agonists by protein kinase C. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**, H1288–H1295 (2008).
339. Bouwman, R. A., Musters, R. J. P., van Beek-Harmsen, B. J., de Lange, J. J. & Boer, C. Reactive oxygen species precede protein kinase C-delta activation independent of adenosine triphosphate-sensitive mitochondrial channel opening in sevoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* **100**, 506–514 (2004).
340. Yang, X., Cohen, M. V. & Downey, J. M. Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **24**, 225–234 (2010).
341. Wang, Q. J. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 317–323 (2006).
342. Wang, X., McCullough, K. D., Franke, T. F. & Holbrook, N. J. Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J. Biol. Chem.* **275**, 14624–14631 (2000).
343. Kim, J.-H. *et al.* The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF-kappaB-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF-kappaB-inducing kinase pathways: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in NF-kappaB activation. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 885–896 (2008).

344. Ljubkovic, M. *et al.* Isoflurane preconditioning uncouples mitochondria and protects against hypoxia-reoxygenation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C1583-1590 (2007).
345. Rena, G., Hardie, D. G. & Pearson, E. R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* **60**, 1577–1585 (2017).
346. Inzucchi, S. E. Is It Time to Change the Type 2 Diabetes Treatment Paradigm? No! Metformin Should Remain the Foundation Therapy for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **40**, 1128–1132 (2017).
347. Li, M., Li, X., Zhang, H. & Lu, Y. Molecular Mechanisms of Metformin for Diabetes and Cancer Treatment. *Front. Physiol.* **9**, 1039 (2018).
348. Flory, J. & Lipska, K. Metformin in 2019. *JAMA* **321**, 1926–1927 (2019).
349. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet Lond. Engl.* **352**, 854–865 (1998).
350. Abbasi, F. *et al.* Effect of metformin treatment on multiple cardiovascular disease risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* **53**, 159–164 (2004).
351. Johnson, J. A., Simpson, S. H., Toth, E. L. & Majumdar, S. R. Reduced cardiovascular morbidity and mortality associated with metformin use in subjects with Type 2 diabetes. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* **22**, 497–502 (2005).
352. Johnson, J. A., Majumdar, S. R., Simpson, S. H. & Toth, E. L. Decreased mortality associated with the use of metformin compared with sulfonylurea monotherapy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **25**, 2244–2248 (2002).
353. Varjabedian, L., Bourji, M., Pourafkari, L. & Nader, N. D. Cardioprotection by Metformin: Beneficial Effects Beyond Glucose Reduction. *Am. J. Cardiovasc. Drugs Drugs Devices Interv.* **18**, 181–193 (2018).
354. El Messaoudi, S., Rongen, G. A., de Boer, R. A. & Riksen, N. P. The cardioprotective effects of metformin. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 445–453 (2011).
355. Solskov, L. *et al.* Metformin induces cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury in the rat heart 24 hours after administration. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **103**, 82–87 (2008).
356. Bhamra, G. S. *et al.* Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Basic Res. Cardiol.* **103**, 274–284 (2008).
357. Legtenberg, R. J., Houston, R. J. F., Oeseburg, B. & Smits, P. Metformin improves cardiac functional recovery after ischemia in rats. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* **34**, 182–185 (2002).
358. Paiva, M. *et al.* Metformin prevents myocardial reperfusion injury by activating the adenosine receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **53**, 373–378 (2009).
359. Whittington, H. J. *et al.* Chronic metformin associated cardioprotection against infarction: not just a glucose lowering phenomenon. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **27**, 5–16 (2013).
360. Yin, M. *et al.* Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **301**, H459–H468 (2011).
361. Andersson, C. *et al.* Metformin treatment is associated with a low risk of mortality in diabetic patients with heart failure: a retrospective nationwide cohort study. *Diabetologia* **53**, 2546–2553 (2010).
362. Aguilar, D., Chan, W., Bozkurt, B., Ramasubbu, K. & Deswal, A. Metformin Use and Mortality in Ambulatory Patients with Diabetes and Heart Failure. *Circ. Heart Fail.* **4**, 53–58 (2011).
363. Lexis, C. P. H. *et al.* Chronic metformin treatment is associated with reduced myocardial infarct size in diabetic patients with ST-segment elevation myocardial infarction.

- Cardiovasc. Drugs Ther.* **28**, 163–171 (2014).
364. Claesen, M. *et al.* Mortality in Individuals Treated With Glucose-Lowering Agents: A Large, Controlled Cohort Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 461–469 (2016).
365. Li, J. *et al.* Protective effect of metformin on myocardial injury in metabolic syndrome patients following percutaneous coronary intervention. *Cardiology* **127**, 133–139 (2014).
366. Preiss, D. *et al.* Metformin for non-diabetic patients with coronary heart disease (the CAMERA study): a randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2**, 116–124 (2014).
367. El Messaoudi, S. *et al.* Effect of metformin pretreatment on myocardial injury during coronary artery bypass surgery in patients without diabetes (MetCAB): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **3**, 615–623 (2015).
368. Momeni, M. & De Hert, S. New advances in perioperative cardioprotection. *F1000Research* **8**, (2019).
369. Bost, F., Decoux-Poullot, A.-G., Tanti, J. F. & Clavel, S. Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy? *Oncogenesis* **5**, e188 (2016).
370. Hardie, D. G. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J. Cell Sci.* **117**, 5479–5487 (2004).
371. Boyle, J. G., Salt, I. P. & McKay, G. A. Metformin action on AMP-activated protein kinase: a translational research approach to understanding a potential new therapeutic target. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* **27**, 1097–1106 (2010).
372. Yu, X. *et al.* Anti-tumor activity of metformin: from metabolic and epigenetic perspectives. *Oncotarget* **8**, 5619–5628 (2017).
373. Rotermund, C., Machetanz, G. & Fitzgerald, J. C. The Therapeutic Potential of Metformin in Neurodegenerative Diseases. *Front. Endocrinol.* **9**, 400 (2018).
374. Fontaine, E. Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Front. Endocrinol.* **9**, 753 (2018).
375. Hou, W.-L. *et al.* Inhibition of mitochondrial complex I improves glucose metabolism independently of AMPK activation. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 1316–1328 (2018).
376. Rekuviene, E., Ivanoviene, L., Borutaite, V. & Morkuniene, R. Rotenone decreases ischemia-induced injury by inhibiting mitochondrial permeability transition in mature brains. *Neurosci. Lett.* **653**, 45–50 (2017).
377. Teixeira, G. *et al.* Synergistic protective effect of cyclosporin A and rotenone against hypoxia-reoxygenation in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **56**, 55–62 (2013).
378. Elmadhun, N. Y., Sabe, A. A., Lassaletta, A. D., Chu, L. M. & Sellke, F. W. Metformin mitigates apoptosis in ischemic myocardium. *J. Surg. Res.* **192**, 50–58 (2014).
379. Ramachandran, R. & S, M. Post conditioning with Metformin attenuates apoptotic events in cardiomyoblasts associated with ischemic reperfusion injury. *Cardiovasc. Ther.* (2017) doi:10.1111/1755-5922.12279.
380. Turer, A. T. & Hill, J. A. Pathogenesis of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Rationale for Therapy. *Am. J. Cardiol.* **106**, 360–368 (2010).
381. WRITING GROUP MEMBERS *et al.* Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **121**, e46–e215 (2010).
382. Botto, F. *et al.* Myocardial injury after noncardiac surgery: a large, international, prospective cohort study establishing diagnostic criteria, characteristics, predictors, and 30-day outcomes. *Anesthesiology* **120**, 564–578 (2014).
383. Healy, D. *et al.* Preconditioning Shields Against Vascular Events in Surgery (SAVES), a multicentre feasibility trial of preconditioning against adverse events in major vascular surgery: study protocol for a randomised control trial. *Trials* **16**, 185 (2015).
384. Hausenloy, D. J. *et al.* Novel targets and future strategies for acute cardioprotection: Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of

- the Heart. *Cardiovasc. Res.* **113**, 564–585 (2017).
385. Eltzschig, H. K. & Eckle, T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat. Med.* **17**, 1391–1401 (2011).
386. Riess, M. L., Kevin, L. G., Camara, A. K. S., Heisner, J. S. & Stowe, D. F. Dual exposure to sevoflurane improves anesthetic preconditioning in intact hearts. *Anesthesiology* **100**, 569–574 (2004).
387. De Hert, S. G. *et al.* Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. *Anesthesiology* **97**, 42–49 (2002).
388. De Hert, S. G., Longrois, D., Yang, H. & Fleisher, L. A. Does the use of a volatile anesthetic regimen attenuate the incidence of cardiac events after vascular surgery? *Acta Anaesthesiol. Belg.* **59**, 19–25 (2008).
389. Claroni, C. *et al.* Protective effect of sevoflurane preconditioning on ischemia-reperfusion injury in patients undergoing reconstructive plastic surgery with microsurgical flap, a randomized controlled trial. *BMC Anesthesiol.* **16**, 66 (2016).
390. Hescheler, J. *et al.* Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ. Res.* **69**, 1476–1486 (1991).
391. Branco, A. F. *et al.* Gene Expression Profiling of H9c2 Myoblast Differentiation towards a Cardiac-Like Phenotype. *PloS One* **10**, e0129303 (2015).
392. Yoshida, Y. & Yamanaka, S. Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later: For Cardiac Applications. *Circ. Res.* **120**, 1958–1968 (2017).
393. Park, M. *et al.* Globular adiponectin, acting via AdipoR1/APPL1, protects H9c2 cells from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis. *PloS One* **6**, e19143 (2011).
394. Zhang, J. *et al.* Sulfiredoxin-1 protects against simulated ischaemia/reperfusion injury in cardiomyocyte by inhibiting PI3K/AKT-regulated mitochondrial apoptotic pathways. *Biosci. Rep.* **36**, (2016).
395. Huang, W. *et al.* Effect of *Salvia miltiorrhiza* and ligustrazine injection on myocardial ischemia/reperfusion and hypoxia/reoxygenation injury. *Mol. Med. Rep.* **14**, 4537–4544 (2016).
396. Zhai, M. *et al.* Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis. *J. Pineal Res.* (2017) doi:10.1111/jpi.12419.
397. Franks, N. P. & Lieb, W. R. Temperature dependence of the potency of volatile general anesthetics: implications for in vitro experiments. *Anesthesiology* **84**, 716–720 (1996).
398. Esper, T., Wehner, M., Meinecke, C.-D. & Rueffert, H. Blood/Gas partition coefficients for isoflurane, sevoflurane, and desflurane in a clinically relevant patient population. *Anesth. Analg.* **120**, 45–50 (2015).
399. Haseneder, R. *et al.* Isoflurane and sevoflurane dose-dependently impair hippocampal long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol.* **623**, 47–51 (2009).
400. Nishikawa, K. *et al.* The interaction of noradrenaline with sevoflurane on GABA(A) receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in the rat hippocampus. *Brain Res.* **1039**, 153–161 (2005).
401. Zitta, K. *et al.* Cytoprotective effects of the volatile anesthetic sevoflurane are highly dependent on timing and duration of sevoflurane conditioning: findings from a human, in-vitro hypoxia model. *Eur. J. Pharmacol.* **645**, 39–46 (2010).
402. Lin, T.-C., Lu, C.-C., Li, C.-Y., Chang, C.-C. & Ho, S.-T. Arterial blood concentration of sevoflurane during single-breath induction and tracheal intubation in gynecologic patients. *J. Clin. Anesth.* **20**, 496–500 (2008).
403. Gottlieb, R. A., Burleson, K. O., Kloner, R. A., Babior, B. M. & Engler, R. L. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* **94**, 1621–1628 (1994).

404. Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **87**, 99–163 (2007).
405. Jamnicki-Abegg, M. *et al.* Isoflurane inhibits cardiac myocyte apoptosis during oxidative and inflammatory stress by activating Akt and enhancing Bcl-2 expression. *Anesthesiology* **103**, 1006–1014 (2005).
406. Adameova, A. *et al.* Evidence of necroptosis in hearts subjected to various forms of ischemic insults. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **95**, 1163–1169 (2017).
407. She, L. *et al.* Inhibition of Phosphoglycerate Mutase 5 Reduces Necroptosis in Rat Hearts Following Ischemia/Reperfusion Through Suppression of Dynamin-Related Protein 1. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **33**, 13–23 (2019).
408. Koshinuma, S., Miyamae, M., Kaneda, K., Kotani, J. & Figueredo, V. M. Combination of necroptosis and apoptosis inhibition enhances cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Anesth.* **28**, 235–241 (2014).
409. Zhang, J. *et al.* Sevoflurane postconditioning reduces myocardial ischemia reperfusion injury-induced necroptosis by up-regulation of OGT-mediated O-GlcNAcylated RIPK3. *Aging* **12**, 25452–25468 (2020).
410. Li, C. *et al.* Metformin mediates cardioprotection against aging-induced ischemic necroptosis. *Aging Cell* **19**, e13096 (2020).
411. Lessene, G. *et al.* Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 390–397 (2013).
412. Gallogly, M. M. *et al.* Glutaredoxin regulates apoptosis in cardiomyocytes via NFkappaB targets Bcl-2 and Bcl-xL: implications for cardiac aging. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 1339–1353 (2010).
413. Fiebig, A. A., Zhu, W., Hollerbach, C., Leber, B. & Andrews, D. W. Bcl-XL is qualitatively different from and ten times more effective than Bcl-2 when expressed in a breast cancer cell line. *BMC Cancer* **6**, 213 (2006).
414. Gustafsson, Å. B. & Gottlieb, R. A. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **292**, C45–C51 (2007).
415. Wang, X. *et al.* Bcl-XL disrupts death-inducing signal complex formation in plasma membrane induced by hypoxia/reoxygenation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **18**, 1826–1833 (2004).
416. Edmands, S. D., Hall, A. C. & LaDow, E. Microarray Analyses of Genes Regulated by Isoflurane Anesthesia In Vivo: A Novel Approach to Identifying Potential Preconditioning Mechanisms. *Anesth. Analg.* **116**, 589–595 (2013).
417. Tamura, Y. *et al.* Polo-like kinase 1 phosphorylates and regulates Bcl-x(L) during pironetin-induced apoptosis. *Oncogene* **28**, 107–116 (2009).
418. Wang, J., Beauchemin, M. & Bertrand, R. Bcl-xL phosphorylation at Ser49 by polo kinase 3 during cell cycle progression and checkpoints. *Cell. Signal.* **23**, 2030–2038 (2011).
419. Upreti, M. *et al.* Identification of the major phosphorylation site in Bcl-xL induced by microtubule inhibitors and analysis of its functional significance. *J. Biol. Chem.* **283**, 35517–35525 (2008).
420. Basu, A. & Haldar, S. Identification of a novel Bcl-xL phosphorylation site regulating the sensitivity of taxol- or 2-methoxyestradiol-induced apoptosis. *FEBS Lett.* **538**, 41–47 (2003).
421. Du, L., Lyle, C. S. & Chambers, T. C. Characterization of vinblastine-induced Bcl-xL and Bcl-2 phosphorylation: evidence for a novel protein kinase and a coordinated phosphorylation/dephosphorylation cycle associated with apoptosis induction. *Oncogene* **24**, 107–117 (2005).
422. Nakamura, M., Zhai, P., Del Re, D. P., Maejima, Y. & Sadoshima, J. Mst1-mediated phosphorylation of Bcl-xL is required for myocardial reperfusion injury. *JCI Insight* **1**,

(2016).

423. Nakamura, M., Zhai, P., Del Re, D. P., Maejima, Y. & Sadoshima, J. Mst1-mediated phosphorylation of Bcl-xL is required for myocardial reperfusion injury. *JCI Insight* **1**, (2016).
424. Powell, S. R. The ubiquitin-proteasome system in cardiac physiology and pathology. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H1–H19 (2006).
425. Willis, M. S. *et al.* The role of ubiquitin ligases in cardiac disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **71**, 43–53 (2014).
426. Powell, S. R., Gurzenda, E. M., Teichberg, S., Mantell, L. L. & Maulik, D. Association of increased ubiquitinated proteins with cardiac apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* **2**, 103–112 (2000).
427. Dimmeler, S., Breitschopf, K., Haendeler, J. & Zeiher, A. M. Dephosphorylation Targets Bcl-2 for Ubiquitin-dependent Degradation: A Link between the Apoptosome and the Proteasome Pathway. *J. Exp. Med.* **189**, 1815–1822 (1999).
428. Johansson, J. S., Zou, H. & Tanner, J. W. Bound volatile general anesthetics alter both local protein dynamics and global protein stability. *Anesthesiology* **90**, 235–245 (1999).
429. Matsuyama, N. *et al.* Ischemic but not pharmacological preconditioning requires protein synthesis. *Circulation* **102**, III312–318 (2000).
430. Bienengraeber, M. *et al.* Quantitative characterization of changes in the cardiac mitochondrial proteome during anesthetic preconditioning and ischemia. *Physiol. Genomics* **45**, 163–170 (2013).
431. Lamberts, R. R. *et al.* Reactive oxygen species-induced stimulation of 5'AMP-activated protein kinase mediates sevoflurane-induced cardioprotection. *Circulation* **120**, S10–15 (2009).
432. Liu, Z.-Y. *et al.* Sevoflurane pretreatment inhibits the myocardial apoptosis caused by hypoxia reoxygenation through AMPK pathway: An experimental study. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **10**, 148–151 (2017).
433. Laderoute, K. R. *et al.* 5'-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Induced by Low-Oxygen and Glucose Deprivation Conditions Found in Solid-Tumor Microenvironments. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5336–5347 (2006).
434. Zhao, J. *et al.* Sevoflurane preconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via caveolin-3-dependent cyclooxygenase-2 inhibition. *Circulation* **128**, S121–129 (2013).
435. Garcia-Dorado, D. *et al.* The end-effectors of preconditioning protection against myocardial cell death secondary to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **70**, 274–285 (2006).
436. Zhang, J. *et al.* Sevoflurane postconditioning protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling. *Sci. Rep.* **4**, 7317 (2014).
437. Zhang, Y. *et al.* Sevoflurane preconditioning improving cerebral focal ischemia-reperfusion damage in a rat model via PI3K/Akt signaling pathway. *Gene* **569**, 60–65 (2015).
438. Liu, C. *et al.* Sevoflurane protects against intestinal ischemia-reperfusion injury partly by phosphatidylinositol 3 kinases/Akt pathway in rats. *Surgery* **157**, 924–933 (2015).
439. Raphael, J., Rivo, J. & Gozal, Y. Isoflurane-induced myocardial preconditioning is dependent on phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signalling. *Br. J. Anaesth.* **95**, 756–763 (2005).
440. Yu, L. *et al.* Sevoflurane postconditioning reduces myocardial reperfusion injury in rat isolated hearts via activation of PI3K/Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **11**, 661–672 (2010).
441. Song, J. *et al.* Activation of PI3K $\gamma$ /Akt pathway increases cardiomyocyte HMGB1 expression in diabetic environment. *Oncotarget* **7**, 80803–80810 (2016).



442. Andreadou, I. *et al.* The role of mitochondrial reactive oxygen species, NO and H<sub>2</sub>S in ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection. *J. Cell. Mol. Med.* (2020) doi:10.1111/jcmm.15279.
443. Janssen-Heininger, Y. M. W. *et al.* Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 1–17 (2008).
444. Kleinbongard, P. *et al.* Mitochondrial and Contractile Function of Human Right Atrial Tissue in Response to Remote Ischemic Conditioning. *J. Am. Heart Assoc.* **7**, e009540 (2018).
445. Antonucci, S. *et al.* Selective mitochondrial superoxide generation in vivo is cardioprotective through hormesis. *Free Radic. Biol. Med.* **134**, 678–687 (2019).
446. Riess, M. L. *et al.* Preconditioning with sevoflurane reduces changes in nicotinamide adenine dinucleotide during ischemia-reperfusion in isolated hearts: reversal by 5-hydroxydecanoic acid. *Anesthesiology* **98**, 387–395 (2003).
447. Redel, A. *et al.* Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning. *Anesth. Analg.* **106**, 384–391, table of contents (2008).
448. Sedlic, F. *et al.* Differences in production of reactive oxygen species and mitochondrial uncoupling as events in the preconditioning signaling cascade between desflurane and sevoflurane. *Anesth. Analg.* **109**, 405–411 (2009).
449. Sedlic, F. *et al.* Mitochondrial depolarization underlies delay in permeability transition by preconditioning with isoflurane: roles of ROS and Ca<sup>2+</sup>. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **299**, C506-515 (2010).
450. Heusch, G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ. Res.* **116**, 674–699 (2015).
451. Rotermund, C., Machetanz, G. & Fitzgerald, J. C. The Therapeutic Potential of Metformin in Neurodegenerative Diseases. *Front. Endocrinol.* **9**, 400 (2018).
452. Nahrwold, M. L., Clark, C. R. & Cohen, P. J. Is depression of mitochondrial respiration a predictor of in-vivo anesthetic activity? *Anesthesiology* **40**, 566–570 (1974).
453. Kissin, I., Aultman, D. F. & Smith, L. R. Effects of volatile anesthetics on myocardial oxidation-reduction status assessed by NADH fluorometry. *Anesthesiology* **59**, 447–452 (1983).
454. Riess, M. L. *et al.* Attenuation of mitochondrial respiration by sevoflurane in isolated cardiac mitochondria is mediated in part by reactive oxygen species. *Anesthesiology* **100**, 498–505 (2004).
455. Dzeja, P. P. *et al.* Mitochondria: gateway for cytoprotection. *Circ. Res.* **89**, 744–746 (2001).
456. Ludwig, L. M. *et al.* Preconditioning by isoflurane is mediated by reactive oxygen species generated from mitochondrial electron transport chain complex III. *Anesth. Analg.* **99**, 1308–1315; table of contents (2004).
457. Lotz, C., Stumpner, J. & Smul, T. M. Sevoflurane as opposed to propofol anesthesia preserves mitochondrial function and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **129**, 110417 (2020).
458. Mohsin, A. A. *et al.* Mitochondrial Complex I Inhibition by Metformin Limits Reperfusion Injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **369**, 282–290 (2019).
459. Bridges, H. R., Jones, A. J. Y., Pollak, M. N. & Hirst, J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem. J.* **462**, 475–487 (2014).
460. Matsuzaki, S. & Humphries, K. M. Selective inhibition of deactivated mitochondrial complex I by biguanides. *Biochemistry* **54**, 2011–2021 (2015).
461. Zaugg, M. Is protection by inhalation agents volatile? Controversies in

- cardioprotection. *Br. J. Anaesth.* **99**, 603–606 (2007).
462. Kunst, G. From coronary steal to myocardial, renal, and cerebral protection: more questions than answers in anaesthetic preconditioning? *Br. J. Anaesth.* **112**, 958–960 (2014).
463. Balakumar, P. & Sharma, N. K. Healing the diabetic heart: does myocardial preconditioning work? *Cell. Signal.* **24**, 53–59 (2012).
464. Drenger, B. *et al.* Diabetes blockade of sevoflurane postconditioning is not restored by insulin in the rat heart: phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated inhibition. *Anesthesiology* **114**, 1364–1372 (2011).
465. Zhang, F.-J. *et al.* Hypercholesterolemia abrogates sevoflurane-induced delayed preconditioning against myocardial infarct in rats by alteration of nitric oxide synthase signaling. *Shock Augusta Ga* **37**, 485–491 (2012).
466. Przyklenk, K., Maynard, M., Darling, C. E. & Whittaker, P. Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with post-conditioning. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 1393–1398 (2008).
467. Rivo, J. *et al.* Flumazenil mimics whereas midazolam abolishes ischemic preconditioning in a rabbit heart model of ischemia-reperfusion. *Anesthesiology* **105**, 65–71 (2006).
468. Smul, T. M. *et al.* Propofol inhibits desflurane-induced preconditioning in rabbits. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **25**, 276–281 (2011).
469. Meybohm, P. *et al.* A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1397–1407 (2015).
470. Heusch, G. & Gersh, B. J. ERICCA and RIPHeart: two nails in the coffin for cardioprotection by remote ischemic conditioning? Probably not! *Eur. Heart J.* **37**, 200–202 (2016).
471. Likhvantsev, V. V. *et al.* Sevoflurane Versus Total Intravenous Anesthesia for Isolated Coronary Artery Bypass Surgery With Cardiopulmonary Bypass: A Randomized Trial. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **30**, 1221–1227 (2016).
472. Lin, S., Neelankavil, J. & Wang, Y. Cardioprotective Effect of Anesthetics: Translating Science to Practice. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* (2020) doi:10.1053/j.jvca.2020.09.113.
473. Landoni, G. *et al.* Volatile Anesthetics versus Total Intravenous Anesthesia for Cardiac Surgery. *N. Engl. J. Med.* **380**, 1214–1225 (2019).
474. Heusch, G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat. Rev. Cardiol.* **17**, 773–789 (2020).
475. Lelovas, P. P., Kostomitsopoulos, N. G. & Xanthos, T. T. A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* **53**, 432–438 (2014).
476. Davis, R. F., DeBoer, L. W., Rude, R. E., Lowenstein, E. & Maroko, P. R. The effect of halothane anesthesia on myocardial necrosis, hemodynamic performance, and regional myocardial blood flow in dogs following coronary artery occlusion. *Anesthesiology* **59**, 402–411 (1983).
477. Behmenburg, F. *et al.* Extended Second Window of Protection of Sevoflurane-induced Preconditioning. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **70**, 284–289 (2017).
478. Cao, J. *et al.* Sevoflurane post-conditioning reduces rat myocardial ischemia reperfusion injury through an increase in NOS and a decrease in phosphorylated NHE1 levels. *Int. J. Mol. Med.* **36**, 1529–1537 (2015).
479. Kunst, G. & Klein, A. A. Peri-operative anaesthetic myocardial preconditioning and protection - cellular mechanisms and clinical relevance in cardiac anaesthesia. *Anaesthesia* **70**, 467–482 (2015).
480. Lavi, S., Alemayehu, M., McCarty, D., Warrington, J. & Lavi, R. One-year outcome

- of the sevoflurane in acute myocardial infarction randomized trial. *Can. J. Anaesth. J. Can. Anesth.* **62**, 1279–1286 (2015).
481. Pagel, P. S. & Crystal, G. J. The Discovery of Myocardial Preconditioning Using Volatile Anesthetics: A History and Contemporary Clinical Perspective. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **32**, 1112–1134 (2018).
482. Cason, B. A., Gamperl, A. K., Slocum, R. E. & Hickey, R. F. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* **87**, 1182–1190 (1997).
483. Lemoine, S., Zhu, L., Gérard, J.-L. & Hanouz, J.-L. Sevoflurane-induced cardioprotection in coronary artery bypass graft surgery: Randomised trial with clinical and ex-vivo endpoints. *Anaesth. Crit. Care Pain Med.* **37**, 217–223 (2018).
484. Lee, M.-C. *et al.* Isoflurane preconditioning-induced cardio-protection in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur. J. Anaesthesiol.* **23**, 841–847 (2006).
485. Meco, M., Cirri, S., Gallazzi, C., Magnani, G. & Cosseta, D. Desflurane preconditioning in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, randomised and placebo-controlled study. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **32**, 319–325 (2007).
486. Landoni, G. *et al.* Volatile compared with total intravenous anaesthesia in patients undergoing high-risk cardiac surgery: a randomized multicentre study. *Br. J. Anaesth.* **113**, 955–963 (2014).
487. Yang, X.-L., Wang, D., Zhang, G.-Y. & Guo, X.-L. Comparison of the myocardial protective effect of sevoflurane versus propofol in patients undergoing heart valve replacement surgery with cardiopulmonary bypass. *BMC Anesthesiol.* **17**, 37 (2017).
488. Lindsey, M. L. *et al.* Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **314**, H812–H838 (2018).
489. Bøtker, H. E. *et al.* Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection. *Basic Res. Cardiol.* **113**, 39 (2018).
490. Lecour, S. *et al.* ESC working group cellular biology of the heart: position paper: improving the preclinical assessment of novel cardioprotective therapies. *Cardiovasc. Res.* **104**, 399–411 (2014).
491. Jones, S. P. *et al.* The NHLBI-sponsored Consortium for preclinical assessment of cardioprotective therapies (CAESAR): a new paradigm for rigorous, accurate, and reproducible evaluation of putative infarct-sparing interventions in mice, rabbits, and pigs. *Circ. Res.* **116**, 572–586 (2015).
492. Rossello, X. *et al.* CIBER-CLAP (CIBERCV Cardioprotection Large Animal Platform): A multicenter preclinical network for testing reproducibility in cardiovascular interventions. *Sci. Rep.* **9**, 20290 (2019).
493. Heusch, G., Skyschally, A. & Schulz, R. The in-situ pig heart with regional ischemia/reperfusion - ready for translation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **50**, 951–963 (2011).
494. Bolli, R. *et al.* Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circ. Res.* **95**, 125–134 (2004).
495. Yang, X.-M., Krieg, T., Cui, L., Downey, J. M. & Cohen, M. V. NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **36**, 411–421 (2004).
496. González Arbeláez, L. F., Ciocci Pardo, A., Fantinelli, J. C. & Mosca, S. M. Cyclosporine-A mimicked the ischemic pre- and postconditioning-mediated cardioprotection in hypertensive rats: Role of PKC $\epsilon$ . *Exp. Mol. Pathol.* **100**, 266–275 (2016).
497. Li, J., Yuan, T., Zhao, X., Lv, G.-Y. & Liu, H.-Q. Protective effects of sevoflurane in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **29**, 300–307 (2016).
498. Zhang, Y. *et al.* Effects of sevoflurane on NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  expression in renal

- ischemia-reperfusion diabetic rats. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* (2017) doi:10.1007/s00011-017-1071-1.
499. Wen, X.-R. *et al.* Neuroprotection of Sevoflurane Against Ischemia/Reperfusion-Induced Brain Injury Through Inhibiting JNK3/Caspase-3 by Enhancing Akt Signaling Pathway. *Mol. Neurobiol.* **53**, 1661–1671 (2016).
500. Fast, J. P., Perkins, M. G., Pearce, R. A. & Mecozzi, S. Fluoropolymer-based emulsions for the intravenous delivery of sevoflurane. *Anesthesiology* **109**, 651–656 (2008).
501. Jee, J.-P., Parlato, M. C., Perkins, M. G., Mecozzi, S. & Pearce, R. A. Exceptionally stable fluoruous emulsions for the intravenous delivery of volatile general anesthetics. *Anesthesiology* **116**, 580–585 (2012).
502. Huang, H. *et al.* A Phase I, Dose-escalation Trial Evaluating the Safety and Efficacy of Emulsified Isoflurane in Healthy Human Volunteers. *Anesthesiol. J. Am. Soc. Anesthesiol.* **120**, 614–625 (2014).
503. Yang, X.-L. *et al.* Comparison of minimum alveolar concentration between intravenous isoflurane lipid emulsion and inhaled isoflurane in dogs. *Anesthesiology* **104**, 482–487 (2006).
504. Zhou, J.-X., Luo, N.-F., Liang, X.-M. & Liu, J. The efficacy and safety of intravenous emulsified isoflurane in rats. *Anesth. Analg.* **102**, 129–134 (2006).
505. Hu, Z.-Y., Peng, X.-Y., Liu, F. & Liu, J. Emulsified isoflurane protects rat heart in situ after regional ischemia and reperfusion. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **28**, 190–198 (2014).
506. Viollet, B. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979* **122**, 253–270 (2012).
507. Aguilar, D., Chan, W., Bozkurt, B., Ramasubbu, K. & Deswal, A. Metformin use and mortality in ambulatory patients with diabetes and heart failure. *Circ. Heart Fail.* **4**, 53–58 (2011).
508. Schramm, T. K. *et al.* Mortality and cardiovascular risk associated with different insulin secretagogues compared with metformin in type 2 diabetes, with or without a previous myocardial infarction: a nationwide study. *Eur. Heart J.* **32**, 1900–1908 (2011).
509. Jørgensen, C. H. *et al.* Effects of oral glucose-lowering drugs on long term outcomes in patients with diabetes mellitus following myocardial infarction not treated with emergent percutaneous coronary intervention--a retrospective nationwide cohort study. *Cardiovasc. Diabetol.* **9**, 54 (2010).
510. Bromage, D. I. & Yellon, D. M. The pleiotropic effects of metformin: time for prospective studies. *Cardiovasc. Diabetol.* **14**, 109 (2015).
511. Brunmair, B. *et al.* Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes* **53**, 1052–1059 (2004).
512. Rösen, P. & Wiernsperger, N. F. Metformin delays the manifestation of diabetes and vascular dysfunction in Goto-Kakizaki rats by reduction of mitochondrial oxidative stress. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **22**, 323–330 (2006).
513. Owen, M. R., Doran, E. & Halestrap, A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* **348 Pt 3**, 607–614 (2000).
514. Daille, D. *et al.* Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes* **54**, 2179–2187 (2005).
515. Daille, D. *et al.* Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes* **54**, 2179–2187 (2005).
516. Luo, T., Zeng, X., Yang, W. & Zhang, Y. Treatment with metformin prevents

- myocardial ischemia-reperfusion injury via STEAP4 signaling pathway. *Anatol. J. Cardiol.* **21**, 261–271 (2019).
517. Reitz, K. M. *et al.* Association Between Preoperative Metformin Exposure and Postoperative Outcomes in Adults With Type 2 Diabetes. *JAMA Surg.* e200416–e200416 (2020) doi:10.1001/jamasurg.2020.0416.
518. Whittington, H. J. *et al.* Chronic metformin associated cardioprotection against infarction: not just a glucose lowering phenomenon. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **27**, 5–16 (2013).
519. Techiryian, G., Weil, B. R., Palka, B. A. & Canty, J. M. Effect of Intracoronary Metformin on Myocardial Infarct Size in Swine. *Circ. Res.* **123**, 986–995 (2018).
520. Sauvé, M. *et al.* Genetic deletion or pharmacological inhibition of dipeptidyl peptidase-4 improves cardiovascular outcomes after myocardial infarction in mice. *Diabetes* **59**, 1063–1073 (2010).
521. Lexis, C. P. H. *et al.* Effect of metformin on left ventricular function after acute myocardial infarction in patients without diabetes: the GIPS-III randomized clinical trial. *JAMA* **311**, 1526–1535 (2014).
522. Chiari, P. *et al.* Multimodal cardioprotective strategy in cardiac surgery (the ProCCard trial): Study protocol for a multicenter randomized controlled trial. *Trials* **20**, 560 (2019).
523. Davidson, S. M. *et al.* Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: JACC Review Topic of the Week. *J. Am. Coll. Cardiol.* **73**, 89–99 (2019).
524. Schwiebert, C. *et al.* Postconditioning by xenon and hypothermia in the rat heart in vivo. *Eur. J. Anaesthesiol.* **27**, 734–739 (2010).
525. Cohen, M. V. & Downey, J. M. The impact of irreproducibility and competing protection from P2Y<sub>12</sub> antagonists on the discovery of cardioprotective interventions. *Basic Res. Cardiol.* **112**, 64 (2017).
526. Fan, Y., Yang, S., Zhang, X., Cao, Y. & Huang, Y. Comparison of cardioprotective efficacy resulting from a combination of atorvastatin and ischaemic post-conditioning in diabetic and non-diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **39**, 938–943 (2012).
527. Sloth, A. D. *et al.* Impact of cardiovascular risk factors and medication use on the efficacy of remote ischaemic conditioning: post hoc subgroup analysis of a randomised controlled trial. *BMJ Open* **5**, e006923 (2015).
528. Duncan, A. I. *et al.* Recent metformin ingestion does not increase in-hospital morbidity or mortality after cardiac surgery. *Anesth. Analg.* **104**, 42–50 (2007).
529. Yang, X.-M., Cui, L., Alhammouri, A., Downey, J. M. & Cohen, M. V. Triple therapy greatly increases myocardial salvage during ischemia/reperfusion in the in situ rat heart. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **27**, 403–412 (2013).
530. Eitel, I. *et al.* Cardioprotection by combined intrahospital remote ischaemic preconditioning and postconditioning in ST-elevation myocardial infarction: the randomized LIPSIA CONDITIONING trial. *Eur. Heart J.* **36**, 3049–3057 (2015).
531. Prunier, F. *et al.* The RIPOST-MI study, assessing remote ischemic preconditioning alone or in combination with local ischemic postconditioning in ST-segment elevation myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* **109**, 400 (2014).
532. Oei, G. T. M. L. *et al.* Helium-induced cardioprotection of healthy and hypertensive rat myocardium in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* **684**, 125–131 (2012).
533. Pryds, K. *et al.* Effect of long-term remote ischaemic conditioning on platelet function and fibrinolysis in patients with chronic ischaemic heart failure. *Thromb. Res.* **153**, 40–46 (2017).
534. Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N. Engl. J. Med.* **346**, 549–556 (2002).

535. Futier, E. *et al.* Effect of Individualized vs Standard Blood Pressure Management Strategies on Postoperative Organ Dysfunction Among High-Risk Patients Undergoing Major Surgery: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **318**, 1346–1357 (2017).
536. Pirracchio, R. *et al.* Mortality prediction in intensive care units with the Super ICU Learner Algorithm (SICULA): a population-based study. *Lancet Respir. Med.* **3**, 42–52 (2015).
537. Gennatas, E. D. *et al.* Expert-augmented machine learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 4571–4577 (2020).
538. Rozier, R. *et al.* Pharmacological preconditioning protects from ischemia/reperfusion-induced apoptosis by modulating Bcl-xL expression through a ROS-dependent mechanism. *FEBS J.* (2020) doi:10.1111/febs.15675.

## RESUME

---

## RESUME

---

Les lésions d'ischémie-reperfusion régionale (myocardique) ou d'emblée systémique (ACR) représentent une menace omniprésente en anesthésie-réanimation et sont à l'origine d'une morbi-mortalité majeure. De nombreuses stratégies ont été mises au point pour les limiter et/ou les prévenir. Malgré les preuves de l'efficacité du préconditionnement pharmacologique (PPc) notamment par les agents volatils halogénés (AVH), appelé préconditionnement anesthésique (APc) ; divers points de discordance en termes d'efficacité (inter-individuelle, nature de la recherche (clinique ou pré-clinique), types de chirurgie pratiquée (cardiaque ou non-cardiaque)) témoignent du manque de compréhension de ses mécanismes, et d'autre part que l'intérêt de son intégration au sein d'une prise en charge globale de cardioprotection reste encore à confirmer. Ainsi, afin d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans l'effet protecteur présumé du PPc, nous avons entrepris dans un premier temps une approche fondamentale et mécanistique visant à identifier les effecteurs de la cardioprotection induite par l'APc. Nous avons donc mis en évidence que les anesthésiques volatils halogénés (AVH) tel que le sévoflurane (SEV) était capable d'induire, *in vitro*, une voie de signalisation protectrice impliquant les espèces réactives de l'oxygène (ROS), la protéine kinase de survie Akt et la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. De manière intéressante, nous avons reproduit l'effet protecteur induit par le SEV et supporté par cette voie de signalisation au sein de différents modèles cellulaires d'origine myocardique dont des cardiomyocytes humains différenciés à partir de cellules souches embryonnaires pluripotentes. De plus, nous avons également démontré que cette voie de signalisation protectrice induite par le SEV pouvait être stimulée par l'agent antidiabétique Metformine (MET), justifiant son utilisation comme agent potentiel de PPc pour prévenir des lésions d'IR.

Forts de ces résultats, nous avons cherché à vérifier la pertinence clinique de l'effet protecteur de la MET. Nous avons donc émis l'hypothèse que, grâce à ses effets pléiotropes et potentiellement cardioprotecteur, la MET était capable de protéger vis-à-vis de l'IR globale et massive induite par l'arrêt cardio-respiratoire (ACR). L'analyse rétrospective menée sur plus de 500 patients admis en soins critiques pour ACR a montré que la MET est associée de manière indépendante à une amélioration de la survie à J28 post-ACR apportant ainsi une



première preuve clinique de l'effet protecteur de la MET contre l'IR la plus sévère rencontrée : l'ACR.

Compte tenu de l'incidence croissante des patients à haut risque cardio-vasculaire rencontrés en chirurgie et en soins critiques en lien avec le vieillissement de la population dans les pays développés, il devient donc nécessaire de poursuivre et d'approfondir notre approche expérimentale afin d'améliorer la compréhension des mécanismes du PPc et de légitimer la pertinence clinique de son effet protecteur dans le but de limiter la morbi-mortalité liée à l'IR.