



HAL
open science

Modulation pharmacologique de la fuite calcique du réticulum sarcoplasmique au sein de cardiomyocytes soumis à l'hypoxie/réoxygénation

Ribal Al-Mawla

► **To cite this version:**

Ribal Al-Mawla. Modulation pharmacologique de la fuite calcique du réticulum sarcoplasmique au sein de cardiomyocytes soumis à l'hypoxie/réoxygénation. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1125 . tel-03276303

HAL Id: tel-03276303

<https://theses.hal.science/tel-03276303>

Submitted on 2 Jul 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.



N°d'ordre NNT: 2017LYSE1125

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° accréditation

(Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS))

Spécialité de doctorat: Biologie

Discipline: (Physiologie, Biologie des organismes, populations, interactions)

Sera soutenue publiquement le 07/07/2017, par:

AL-MAWLA Ribal

**Modulation pharmacologique de la fuite calcique du réticulum
sarcoplasmique au sein de cardiomyocytes soumis à
l'hypoxie/réoxygénation**

Devant le jury composé par:

M. Michel Ovize, PU-PH, Hopital Cardiology	Président du Jury
M. Jan Parys, Pr. à l'université de Leuven	Rapporteur
Mme. Halima Ouadid, Pr. à l'université de Picardie Jules Verne	Rapporteur
M. Sébastien Roger, Pr. à l'université Francois Rabelais	Rapporteur
Mme Catherine Thollon, Dr. à l'institut de Recherche Servier	Examinatrice
M. Fabien Van Coppenolle, Pr. à l'université Claude Bernard	Directeur de thèse
Mme. Sylvie Ducreux, Dr. à l'université Claude Bernard	Co-directrice de thèse

RESUME

Le calcium est un acteur clé de la physiologie cellulaire et dans les cardiomyocytes le réticulum sarcoplasmique (RS) constitue une source principale de calcium intracellulaire. L'homéostasie calcique au sein du RS est finement régulée avec des canaux calciques, des pompes, des tampons et des canaux de fuite calcique comme le translocon. Au cours de l'infarctus du myocarde, une altération de l'homéostasie du calcium entre le RS, les mitochondries et le cytosol se produit et conduit à la mort cellulaire. Afin de limiter la toxicité du calcium, nous nous sommes orientés vers la modulation du stock calcique du RS, à l'origine de la surcharge calcique mitochondriale, en ciblant le translocon.

Ainsi nous avons pu (1) caractériser le translocon en tant que canal de fuite calcique actif localisé dans le RS longitudinal dans les cardiomyocytes de souris adultes. Nous avons également démontré que (2) l'activation pharmacologique du translocon induit une réduction partielle des réserves calciques du RS longitudinal et exerce un effet de pré-conditionnement sur le myocarde avant l'ischémie/reperfusion (3) sans altérer les réserves calciques ryanodinedépendantes. De manière importante, cela a été corrélé avec (4) une diminution de l'activation des protéines pro-apoptotiques mitochondriales, (5) une réduction de la surcharge calcique dans le cytosol pendant l'ischémie, (6) une diminution de l'activation des calpaïnes calcium-dépendantes et (7) une augmentation des mécanismes de survie: autophagie et stress du RE.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse proposent un nouveau paradigme dans la cardioprotection en découplant fonctionnellement la contraction calcium-dépendante et le sort des mitochondries calcium-dépendantes. Cette étude met l'accent sur les connaissances actuelles à propos de la dualité entre les RS jonctionnel et longitudinal dans les cardiomyocytes et ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques en proposant une stratégie thérapeutique multi-cibles contre les lésions induites par l'ischémie/reperfusion.

ABSTRACT

Calcium is a key component of cellular physiology and in cardiomyocytes the sarcoplasmic reticulum (SR) represents a major source of intracellular calcium. Calcium homeostasis in the SR is finely regulated by calcium channels, pumps, buffers and calcium leak channels such as translocon. During myocardial infarction, alteration of calcium homeostasis between the SR, mitochondria and cytosol occurs and leads to cell death. In order to limit calcium toxicity, we questioned if modulating the SR calcium stock, at the origin of the mitochondrial calcium surcharge, by targeting the translocon, might be an effective strategy.

We were thus able to (1) characterize translocon as an active calcium leak channel localized in the longitudinal SR in adult mouse cardiomyocytes. We also showed that the (2) pharmacological activation of translocon induces a partial reduction of longitudinal SR calcium stores and exerts a preconditioning effect on myocardium before ischemia/reperfusion (3) without altering the ryanodine-dependent calcium stores. Importantly, this was correlated with (4) a decrease in the activation of mitochondrial proapoptotic proteins, (5) a decrease in the rate of calcium increase in the cytosol during the ischemia duration, (6) a decrease in the calcium-dependent calpains activation and (7) an increase of pro-survival mechanisms: autophagy and ER-stress.

Results obtained during mu thesis suggest a new paradigm in cardioprotection by functionally uncoupling the calcium-dependent contraction and calcium-dependent mitochondria fate. This study emphasizes the present knowledge on the duality between junctional and longitudinal SR in cardiomyocytes and open up new therapeutic perspectives by suggesting a multi-target therapeutic strategy against ischemia/reperfusion induced injuries.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	i
ABSTRACT	ii
TABLE DES MATIERES	iii
LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	viii
THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON	ix
REMERCIEMENTS	x
ABREVIATIONS	xii
CHAPITRE I: LE CŒUR	1
1. Anatomie	1
2. Structure	1
A. Le péricarde.....	2
B. Le myocarde.....	2
i. Le myocarde: le tissu	2
ii. Le myocarde: le muscle	3
C. L'endocarde.....	5
D. La circulation coronaire	6
3. Fonctionnement.....	6
A. Conduction électrique	7
B. La contraction à l'échelle du cœur	7
C. La contraction à l'échelle des cardiomyocytes	8
i. Potentiel d'action	8
ii. Mécanisme de la contraction.....	9
iii. Relâchement et retour à l'état basal	10
4. Conclusion	10
CHAPITRE II: HOMEOSTASIE CALCIQUE AU SEIN DU CARDIOMYOCYTE.....	11
1. La membrane plasmique	11
A. Dihydropyridine receptors	12
B. Sodium/calcium exchanger	12
C. Transient receptor potential.....	13
D. Plasma membrane calcium-ATPase.....	14
E. Calcium release-activated channel	14
F. Autres acteurs.....	15
2. La mitochondrie	15
A. Voltage-dependent anion channel	15
B. Mitochondrial calcium uniporter	16
C. Mitochondrial sodium/calcium exchanger.....	17

D.	Mitochondrial ryanodine receptor.....	17
E.	Mitochondrial permeability transition pore	18
F.	Leucine-zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1	19
3.	Le réticulum	19
A.	Ryanodine receptor	20
B.	Inositol trisphosphate receptor	22
C.	Sarco/endoplasmic calcium-ATPase.....	23
D.	Canaux de fuite calcique	24
i.	Transient receptor potential	25
ii.	Mitsugumin 23	25
iii.	Pannexin.....	26
iv.	Presenilin.....	26
v.	Translocon.....	27
E.	Protéines tampon calcique.....	27
i.	Calreticulin et calnexin	27
ii.	Calsequestrin.....	28
iii.	Glucose regulated protein 78 et 94	29
iv.	Histidine-rich calcium binding protein	30
4.	Le cytosol.....	31
A.	La calpaïne	31
B.	Parvalbumin	32
C.	Sorcine.....	32
D.	Calmoduline	33
E.	Calmoduline kinase.....	34
F.	S100	34
G.	Autres protéines tampons calciques cytosoliques.....	35
5.	Les autres organites.....	35
6.	Conclusion	36
CHAPITRE III: L'ISCHEMIE/REPREFUSION CARDIAQUE		37
1.	Lésions ischémiques.....	37
2.	Lésions de reperfusion	40
3.	La mort cellulaire pendant l'ischémie/reperfusion: importance du calcium.....	41
A.	La mort par apoptose.....	43
i.	Apoptose: calcium et mitochondrie	43
ii.	Apoptose: calcium et RE.....	44
B.	La mort par nécrose.....	45
i.	Nécrose: calcium et calpaïnes	47

C.	La mort par autophagie	47
D.	Stress du RE	48
i.	La voie UPR.....	49
a)	PERK.....	50
b)	ATF6 α	51
c)	IRE1	52
ii.	La mort cellulaire suite à un stress du RE.....	53
a)	Voies de mort induites par l'UPR	53
b)	Le calcium acteur principal dans l'UPR	54
c)	Voie de mort médiée par le calcium.....	56
iii.	ER stress et ischémie/reperfusion	57
4.	Conclusion	58
CHAPITRE IV: LA CARDIOPROTECTION		59
1.	Stratégies de cardioprotection	59
A.	Pré-conditionnement	59
B.	Post-conditionnement.....	62
C.	Conditionnement ischémique à distance (remote conditioning).....	63
D.	Les voies de la cardioprotection.....	64
i.	La voie RISK	64
ii.	La voie SAFE.....	66
iii.	Cross-talk entre RISK et SAFE	67
iv.	La voie NO/GMPc	68
E.	Conditionnement et études pharmacologiques.....	69
i.	Les antagonistes β 1 adrénergique	70
ii.	Les mPTP	70
iii.	Les NHE.....	71
iv.	La voie NO/GMPc	71
v.	Les ROS	72
vi.	La Voie RISK.....	72
vii.	Les statines	73
F.	Limites de la cardioprotection.....	73
G.	Le stress réticulaire, une nouvelle cible de cardioprotection	75
2.	Rôle de GRP78 et du translocon dans l'induction du stress réticulaire	77
CHAPITRE V: TRANSLOCON		79
1.	Fonction	79
2.	Architecture du translocon	80
A.	Le pore du translocon:.....	81

B.	Régulation et dynamique de la structure et de la fonction du translocon	82
i.	Conversion du translocon fonctionnel à non fonctionnel:.....	82
ii.	Conversion du mode opératoire du translocon, de la translocation à l'intégration.....	82
C.	Les composants du complexe translocon.....	83
i.	Sec61	83
ii.	TRAP	84
iii.	OST	84
iv.	Autres protéines	85
D.	Interaction dans le complexe ribosome/translocon	85
3.	Translocon et fuite calcique	86
4.	Implication du translocon dans le stress réticulaire et la voie UPR associée	87
	HYPOTHESE DE TRAVAIL.....	89
	MATERIELS ET METHODES	91
1.	Isolation des cardiomyocytes de souris adulte	91
2.	Western Blot.....	93
A.	Préparation des échantillons.....	93
i.	Tampon de lyse	93
ii.	Extraction protéique.....	93
B.	Dosage des protéines par BC Assay	93
C.	Préparation des gels de migration	94
D.	Préparation des échantillons à déposer	94
E.	Migration et transfert.....	94
F.	Détection des protéines	95
G.	Quantification et analyse des résultats	95
3.	Immunofluorescence	95
4.	Analyse de transformée rapide de Fourier	96
5.	Anticorps utilisées pour les westerns blots et l'immunofluorescence	97
6.	Hypoxie/ré-oxygénation <i>in vitro</i>	98
7.	Mesures calciques	99
A.	Sondes utilisées	99
i.	Fura-2 AM.....	100
ii.	Mag-Fura-2 AM.....	100
iii.	Mag-Fluo-4 AM.....	101
B.	Produits	101
8.	Chirurgie <i>in vivo</i>	102
A.	Protocole chirurgical	102

B. Estimation de la taille d'infarctus	103
C. Prélèvements	104
9. Analyses des résultats et statistiques.....	104
10. Modèle animal.....	105
PUBLICATION	106
1. RESUME	107
2. DISCUSSION	161
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES.....	167
1. Vérification de la fuite réticulaire en utilisant le Mag-Fluo-4	167
2. Effet de la pactamycine, un activateur de la fuite calcique à travers le translocon vs. la cycloheximide, une molécule témoin.	168
A. Pactamycine, cycloheximide et modulation du calcium cellulaire	169
B. Pactamycine, cycloheximide et protection contre les lésions d'ischémie/reperfusion.....	171
3. Effet de l'anisomycine, un inhibiteur de la fuite calcique à travers le translocon ...	172
A. Anisomycine et modulation du calcium cellulaire.....	172
i. L'anisomycine inhibe la fuite calcique induite par la puromycine.....	172
ii. L'anisomycine réduit les stocks calciques mitochondriaux et RyR-dépendant	174
B. Anisomycine et protection contre les lésions d'ischémie/reperfusion.	176
DISCUSSION	177
1. La pactamycine	178
2. La cycloheximide	179
3. L'anisomycine.....	180
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	183
REFERENCES.....	186

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure.1: Le cœur	2
Figure.2: Le myocarde	3
Figure.3: La circulation coronaire	6
Figure.4: La conduction électrique	7
Figure.5: Le cycle de contraction cardiaque	8
Figure.6: Mécanisme de contraction des cardiomyocytes	9
Figure.7: Le calcium au sein des cardiomyocytes	11
Figure.8: Mortalité cellulaire au cours de l'ischémie/reperfusion	37
Figure.9: Lésions d'ischémie	38
Figure.10: Lésions de reperfusion	41
Figure.11: Stress du RE et signalisation cellulaire	54
Figure.12: Le pré-conditionnement	60
Figure.13: Le post-conditionnement	63
Figure.14: Voies de la cardioprotection	64
Figure.15: Translocon et synthèse protéique	79
Figure.16: Architecture du translocon	80
Figure.17: Protocole expérimental des mesures calciques cytosolique	99
Figure.18: Protocole expérimental des mesures calciques réticulaire	99
Figure.19: Protocole expérimental pré et post-conditionnement <i>in vivo</i>	102
Figure.RS.1: L'activation de la translocon par la puromycine induit une diminution du stock de calcium réticulaire	167
Figure.RS.2: Effet similaire entre la puromycine et la pactamycine sur l'activation de la fuite calcique à travers le translocon	168
Figure.RS.3: Pas d'effet cardioprotecteur de la pactamycine ou de la cycloheximide	171
Figure.RS.4: L'anisomycine inhibe l'action de la puromycine sur la fuite calcique	172
Figure.RS.5: L'anisomycine induit une diminution du stock calcique mitochondrial et RyR dependent	173
Figure.RS.6: L'anisomycine en post-conditionnement réduit la taille de la zone infarctée	176
Tableau.1: Implication du calcium dans différentes pathologies et dysfonctionnements cardiaque	36
Tableau.2: Récentes études cliniques de cardioprotection par approche pharmacologique	69
Tableau.3: Etudes de la modulation pharmacologique de la fuite calcique à travers le translocon	87
Tableau.4: Antibiotiques modulateurs du translocon	88

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

2014-2017

**Modulation pharmacologique de la fuite calcique
du réticulum sarcoplasmique au sein de
cardiomyocytes soumis à l'hypoxie/réoxygénation**

Soutenue publiquement le 07/07/2017, par:

Ribal AL-MAWLA

Dirigée par:

Pr. Fabien Van Coppenolle et Dr. Sylvie Ducreux

Réalisée au sein du laboratoire INSERM 1060, CARMEN equipe 5, IHU OPERA

Groupement Hospitalier Est, Bâtiment B13, 59 boulevard Pinel, 69500 BRON

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je remercie Dieu qui m'a béni tout au long de ma vie, qui m'a embrassé de sa miséricorde et réconforté par son amour et sa générosité, qui a gardé un regard bienveillant sur moi et qui m'a donné le courage et la patience de surmonter les moments difficiles.

Je souhaite ensuite remercier le Pr. Ovize. Votre parcours ainsi que vos succès font de vous un modèle à suivre. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir accepté dans votre laboratoire, ainsi que pour votre soutien et votre aide, sans lesquels je n'aurais pu terminer ma thèse dans de bonnes conditions.

Je souhaite aussi remercier le DR. Vidal pour m'avoir accueilli au laboratoire, pour m'avoir introduit au monde de la qualité et pour son soutien et sa sympathie.

Fabien, je te remercie chaleureusement pour m'avoir offert l'occasion de gérer ce projet. En plus de l'encadrement, tu as toujours été là, motivant et souriant pour me soutenir et me défendre. Tes conseils me seront toujours utiles dans le reste de mon parcours. Je te remercie aussi pour ta confiance en moi et d'être toujours prêt à m'apporter ton aide quand j'en ai besoin, ainsi que de me faire participer à plusieurs collaborations. J'espère que cela continue entre nous comme c'est le cas avec tes anciens étudiants.

Sylvie, merci de faire partie de ce projet et de m'avoir accompagné au début pour la partie technique. Merci aussi pour tous tes conseils sur l'avancement du projet et de ta participation à l'élaboration des plans de manips. Merci aussi pour ta bonne humeur et surtout de tes efforts pour que j'améliore mon orthographe.

Gabriel, je suis heureux d'avoir eu l'occasion de travailler avec toi. J'ai énormément apprécié ton aide et ton implication à un moment où j'en avais particulièrement besoin. Ta passion pour la science, ta rigueur et ton enthousiasme ont été un réel moteur pour finir ce travail. Tu n'as pas compté tes heures au microscope dans les moments de rush et je t'en suis réellement reconnaissant.

Abdallah, je ne serai pas capable d'expliquer ma gratitude pour ce que tu m'as ammené professionnellement et personnellement. Ton côté paternaliste m'a touché tant au labo qu'en dehors et je t'en remercie. Merci pour toutes les sorties et les invitations, pour les discussions animées et surtout pour ta personnalité et tes expressions légendaires!

Murielle, sans ton soutien et ton aide, j'aurais été beaucoup plus souvent chez Lidl (:P). En plus de tout ton travail, tu trouves toujours le temps de t'inquiéter pour nous, de nous écouter et de nous rassurer quand c'est nécessaire. Merci infiniment pour ton aide.

Noëlle, tu étais toujours souriante et rassurante, toujours prête à l'aide et à l'écoute. Merci de tout mon cœur pour tout ce que tu m'as apporté. Ta gentillesse, ta patience et ta manière de nous mater ont été un réel réconfort. Merci.

Claire, tu as été là pour écouter et discuter à chaque fois que j'en ai eu besoin, tu as été un réel soutien lors des moments plus difficiles et je t'en remercie énormément. Ta bonne humeur et ton implication dans ton travail ont été une vraie motivation. Merci.

Ludo et Mélanie, je n'ai pas eu l'occasion de vous cotoyer depuis le début, mais votre bonne humeur, le sourire constant de Mélanie et les blagues de Ludo ont été réellement rafraîchissants et agréables. Promis je serai là au Mud-day l'année prochaine, et je garde en tête la règle de la pyramide et de la bicyclette...Merci à vous deux.

A Marie-Christine, pour ta gentillesse, ta bonne humeur, tes histoires drôles, tes karaokés et surtout pour ton aide si précieuse au laboratoire, tu es la reine des gels.

Delphine, Christophe, René, Lionel, Jo, Pascal, Thomas, Sandrine, Xavier, Vincent, merci pour cette bonne ambiance au laboratoire, pour votre bonne humeur, votre aide et votre implication, pour avoir rendu les journées au labo plus agréables et les pauses café plus drôles.

A mes amis,

Rania, tu es plus qu'une amie, tu es une sœur, toujours là dans les bons et les moins bons moments, pour me motiver, m'aider, même me mettre un coup de pied si besoin, bref que ferais-je sans toi ? Je ne peux pas m'étaler ici sur tout le bien que j'ai à dire de toi, je me contenterai donc d'un grand MERCI. (Tu prends un café ? Qu'est-ce que t'as à faire ?!).

Olivier, merci de partager tes passions avec moi, de m'avoir permis de m'évader du travail avec tes discussions passionnantes. Je pense me mettre bientôt à la pêche en randonnée en fabriquant des mouches avec la cigarette électronique pour aller au ski en parapente... Merci pour ton amitié et ton soutien.

Bruno, la qualité de tes chirurgies n'a eu d'égal que ta bonne humeur (Bonsoir !!!). Même si tu es souvent caché dans ta pièce de chir, les moments de discussions avec toi ont été un vrai plaisir, surtout avec une si délicieuse tarte au citron meringuée... Plus qu'un collègue tu es pour moi un ami (qui fait des très bons macarons :P). Merci d'avoir égayé la qualité au labo !

Yves, Rizwan, Nolwenn, Alex, Sally, Zeina, Christelle, Lucille, Andréa, ce fut un vrai plaisir de travailler avec vous tous, de partager le bureau et de se soutenir.

Yves, Rizwan et Lucille, on a passé toute cette période ensemble, sans votre soutien ça n'aurait pas été la même chose. Merci de votre aide, de votre écoute et pour ces bons moments que nous avons passés ensemble.

Pour les nouveaux (plus ou moins), profitez à fond de cette expérience de thèse, enrichissez la au maximum, sachez vous entourer au laboratoire et bien sûr je serai toujours dans le coin si besoin ;)

Je ne saurai décrire ici l'importance que vous avez pour moi, et l'amitié que je ressens pour vous. J'espère avoir su vous le montrer pendant ces 3 ans. Sans aucun doute nous continuerons à nous voir et à partager de bons moments. (Nolwenn, amène ta carte :P)

A toute l'équipe de IDR-SERVIER, Catherine Thollon, Nicole Villeneuve, Philippe Gloanec, Ambroise Garry, merci tout d'abord pour le financement de ce travail, pour le suivi régulier de mon travail, vos conseils avisés et votre sympathie. Merci tout particulièrement à Catherine Thollon d'avoir été présente le jour de ma soutenance et de son réel soutien dans le jury. Merci à vous tous.

Aux rapporteurs de ma thèse, Jan Parys, Sébastien Roger et Halima Ouadid, merci d'avoir accepté et pris le temps de juger ce travail, merci de vous être déplacés pour la soutenance, merci pour vos commentaires, corrections et conseils qui m'ont permis de finaliser ce travail.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail et que j'aurai pu malencontreusement oublier, merci beaucoup. Je vous remercie, tous et toutes, pour tout ce que vous m'avez apporté humainement et scientifiquement.

A ma famille, je suis ce que je suis grâce à vous. Vous m'avez donné vos valeurs, m'avez appris ma façon de vivre, de ne jamais laisser tomber, de se battre et de mériter nos succès. Sans votre soutien je ne serai pas là où je suis maintenant. Même si vous n'étiez pas présents physiquement avec moi pendant cette période vous avez toujours été avec moi dans mon cœur. Je vous dédie ce travail et mes succès à venir.

A toi Camille, tu as donné du goût à ma vie depuis que je t'ai rencontrée au début de ma thèse. Tu me connais je ne suis pas très doué pour ça, surtout quand c'est toi qui corrige derrière :P. Tu sais tout ce que je ressens pour toi et à quel point je te suis reconnaissant. Je t'aime.

ABREVIATIONS

ATF	Activating transcription factor
ATP	Adenosine triphosphate
BAD	Bcl-2 associated death promoter
Bax	Bcl-2-associated X
Bcl	B cell lymphoma
BID	BH3 interacting domain death agonist
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calmodulin kinase II
GMPc	Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate
CHOP	C/EBP homologous protein
CICR	Calcium-induced calcium release
CNX	Calnexin
CRAC	Calcium release-activated channel
CRT	Calreticulin
CsA	Cyclosporin A
CSQ	Calsequestrin
DHPR	Dihydropyridine receptors
ECC	Couplage excitation-contraction
eIF2	Eukaryotic translation initiation factor
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
RE	Endoplasmic reticulum
ERAD	RE (endoplasmic reticulum)-associated protein degradation
HRC	Histidine-rich calcium binding protein
IP ₃ R	Inositol trisphosphate receptor
IRE	Inositol-requiring protein
LDH	Lactate dehydrogenase

LETM1	Leucine-zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1
LTCC	Long-lasting-type calcium channel
MCU	Mitochondrial calcium uniporter
MICU	Mitochondrial calcium uptake
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
NCX	Sodium/calcium exchanger
NHE	Sodium/hydrogen exchanger
OST	Oligosaccharyl-transferase
PERK	Protein kinase RNA (PKR)-like RE kinase
PMCA	Plasma membrane calcium-ATPase
PV	Parvalbumin
RISK	Reperfusion injury salvage kinase
ROS	Reactive oxygen species
RyR	Ryanodine receptor
SAFE	Salvage activating factor enhancement
SERCA	Sarco/endoplasmic calcium-ATPase
SOCE	Store-operated calcium entry
RS	Sarcoplasmic reticulum
SRP	Signal recognition particle
TRAP	translocon-associated protein complex
TRP	Transient receptor potential
UPR	Unfolded protein response
VDAC	Voltage-dependent anion channel

CHAPITRE I: LE CŒUR

1. Anatomie

Le cœur est un organe musculaire intra-thoracique, situé au niveau des vertèbres thoraciques T5 à T8, dont le rôle est de pomper le sang dans les vaisseaux sanguins afin d'approvisionner le corps en oxygène et en nutriments d'un côté et d'assister à l'élimination des déchets métaboliques de l'autre [1,2].

Chez les mammifères, le cœur est constitué de deux parties, le cœur droit et le cœur gauche, séparés par le septum. Chaque partie représente une pompe et est constituée par deux chambres, une oreillette et un ventricule, séparés par une valve atrio-ventriculaire (AV valve) qui sert à empêcher le retour du sang du ventricule dans l'oreillette. On distingue la valve tricuspide dans le cœur droit et la valve mitrale dans le gauche [1,2].

L'oreillette droite reçoit le sang pauvre en oxygène par les veines cave supérieure et inférieure et l'envoie dans le ventricule droit qui à son tour l'expulse vers les poumons par l'intermédiaire de l'artère pulmonaire. Dans les poumons, le sang s'enrichit en oxygène et continue dans la veine pulmonaire vers l'oreillette gauche qui l'envoie dans le ventricule gauche pour le distribuer à tous les organes du corps par l'aorte.

On distingue aussi deux autres valves appelées valves sigmoïdes pour empêcher le retour sanguin dans les ventricules, la valve pulmonaire entre le ventricule droit et l'artère pulmonaire, et la valve aortique entre le ventricule gauche et l'aorte [1,2] (Figure.1A).

L'ouverture et la fermeture des valves sont totalement dépendantes de la différence de pression dans les compartiments qu'elles séparent.

2. Structure

Le cœur est constitué de 3 couches (de l'extérieur à l'intérieur): le péricarde, le myocarde et

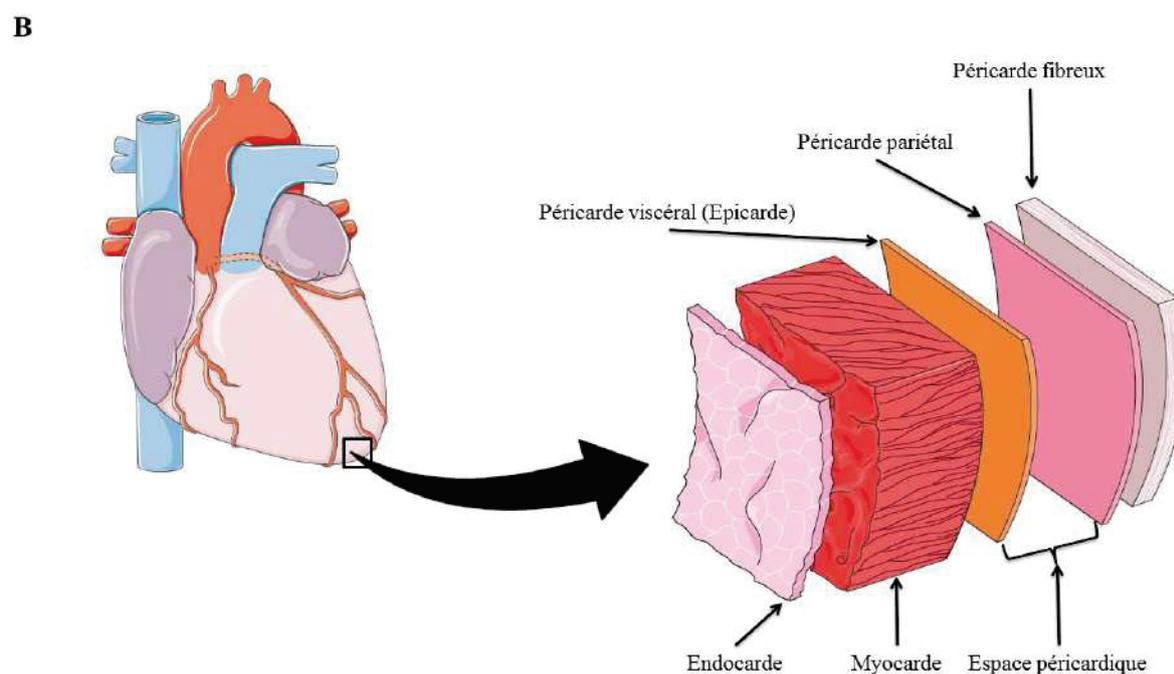
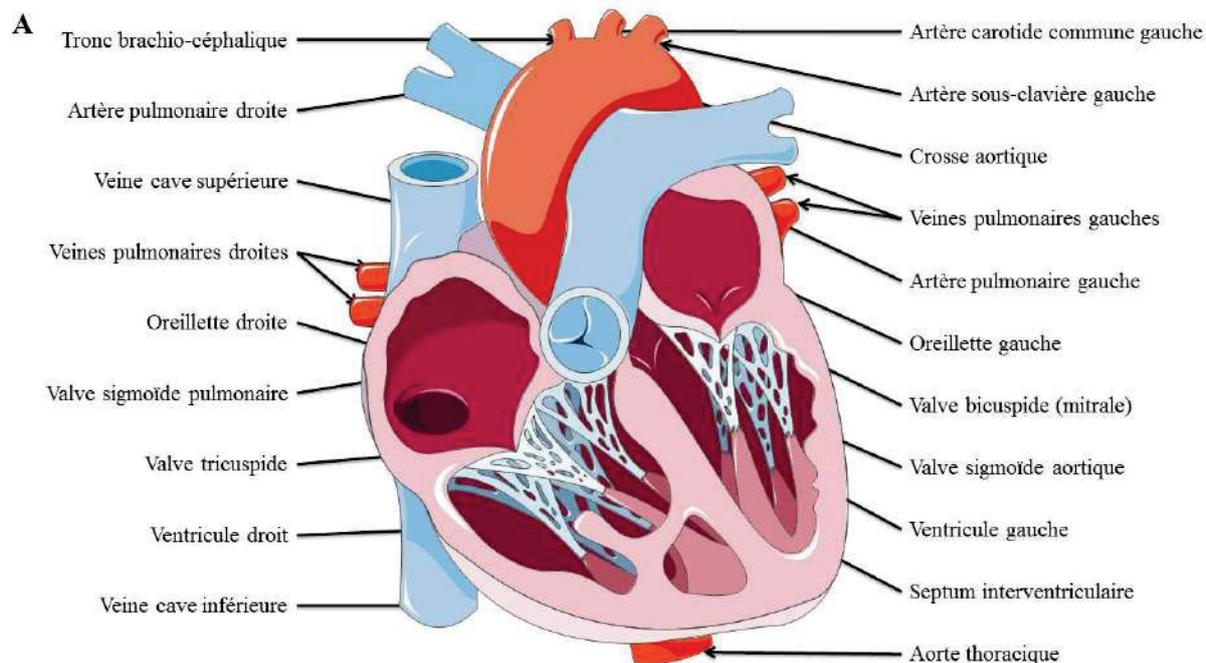


Figure.1: Le cœur

Schéma montrant l'anatomie (A) et la structure (B) cardiaque.
 (Adapté de: www.servier.fr)

l'endocarde (Figure.1B).

A. Le péricarde

Le péricarde constitue une membrane à double paroi qui enveloppe le cœur, son rôle est de protéger et maintenir en place le cœur tout en lui permettant de réaliser des contractions rapides et vigoureuses.

Il se divise en deux couches: l'une superficielle, le péricarde fibreux ou péricarde épais, et l'autre profonde, le péricarde séreux formé par deux feuillets: un feuillet viscéral appelé épicaarde qui enveloppe directement et fait partie du cœur et, un feuillet pariétal qui recouvre le feuillet viscéral et tapisse la face interne du péricarde fibreux constituant ainsi la membrane à double paroi. Les deux feuillets du péricarde séreux délimitent une cavité virtuelle, la cavité péricardique contenant un liquide similaire au liquide céphalospinal permettant la lubrification et le glissement du cœur pendant ses mouvements [1].

B. Le myocarde

i. Le myocarde: le tissu

Le myocarde constitue le muscle cardiaque. Constitué majoritairement de cardiomyocytes, de fibres de collagène, des vaisseaux sanguins et des nerfs, l'organisation complexe et élégante en tourbillon et en spirale du myocarde permet un pompage efficace du sang.

Sachant que les deux ventricules droit et gauche pompent la même quantité de sang par contraction, le ventricule gauche est formé par un muscle plus épais et développé que celui du ventricule droit. Ceci est nécessaire afin de lui permet d'exercer plus de pression pour surmonter la grande résistance nécessaire pour pomper le sang dans tout le corps *via* la circulation systémique contrairement au ventricule droit qui doit pomper le sang vers les

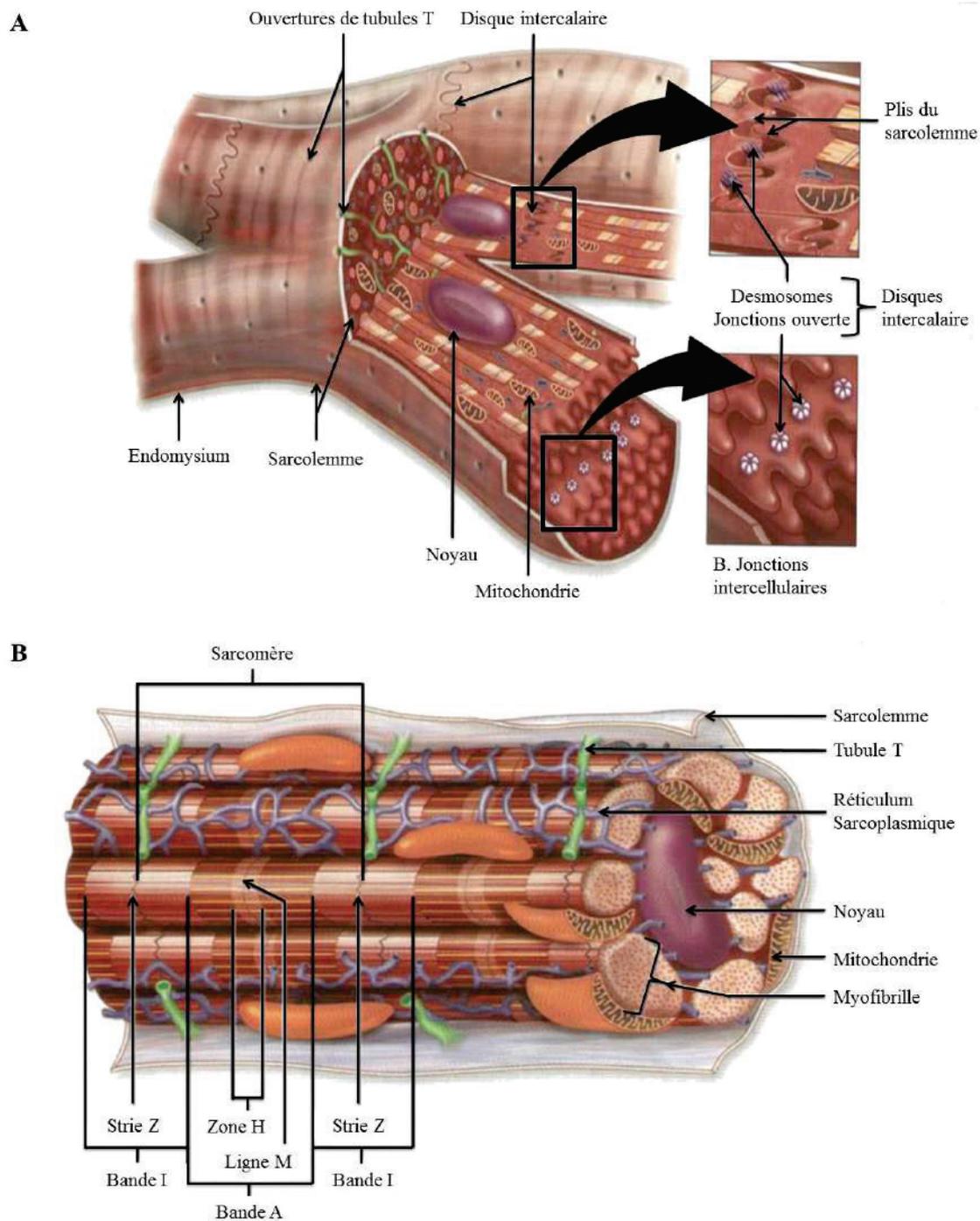


Figure.2: Le myocarde

Myocytes cardiaque: (A) coupe frontale montrant les différentes structures de liaisons et de communications intercellaire, (B) vue longitudinale représentant l'organisation intracellulaire. (Adapté de: www.coeurmaladiescoronariennes.wordpress.com)

poumons *via* la circulation pulmonaire [1].

ii. Le myocarde: le muscle

Le muscle cardiaque est un muscle strié constitué de cardiomyocytes de forme cylindrique allongée d'environ 100 μm de long et 10 μm de large avec un noyau central. Ils sont généralement polynucléés, possèdent un cytoplasme riche en protéines et ions, et une grande quantité de mitochondries, essentielles dans le processus énergétique et un compartiment intracellulaire spécialisé dans le stockage et la libération du calcium: le réticulum sarcoplasmique (RS). Les cardiomyocytes sont liés par des disques intercalaires permettant une propagation rapide du potentiel d'action d'une cellule à l'autre. L'organisation des cardiomyocytes en forme de branche assure une structure plus résistante au muscle cardiaque. Les cardiomyocytes adultes sont des cellules spécialisées, différenciées, qui ont perdu leur capacité à se diviser. Ils sont à la base de l'activité contractile du coeur, occupent environ 75% du volume myocardique, mais représentent en nombre seulement 20% des cellules cardiaques.

Comme le muscle squelettique, les fibres musculaires des cardiomyocytes sont composées des sarcomères qui présentent des stries dues à l'alignement des filaments d'actine et de myosine nécessaires à la contraction, formant ainsi les bandes I, H et A ainsi que les stries Z [1] (Figure.2).

La membrane plasmique, appelée également sarcolemme, s'invagine au niveau des stries Z pour former les tubules T, similaires à ceux présents dans le muscle squelettique. Les tubules T se relient entre eux par des tubes longitudinaux qui forment les diades en se liant avec un seul côté de la citerne du réticulum sarcoplasmique des cardiomyocytes [3]. Il a été supposé que la plupart des tubules T ne se lient pas avec les citernes du réticulum sarcoplasmique

(~80%) ce qui confirme que le couplage excitation contraction s'achève par des signaux diffusés à travers le sarcolemme [4]. Néanmoins, une étude récente montre que le réticulum sarcoplasmique connecte toutes les diades et les tubules T d'un cardiomyocyte [5].

Les sarcomères représentent l'unité de base contractile des myofibrilles. Chaque sarcomère est fait d'un faisceau de myofilaments parallèles à son grand axe. Il existe 2 types de filaments:

- Les filaments fins qui sont constitués de plusieurs protéines: l'actine, la tropomyosine et la troponine.
- Les filaments épais essentiellement constitués de la myosine.

Les filaments d'actine d'un cardiomyocyte se terminent au niveau des disques intercalaires où ils s'associent au sarcolemme et forment ainsi un trait appelé trait scalariforme, ceci est formé de structures communicantes: les desmosomes, les jonctions communicantes GAP et les *fascia adherens*, dont le rôle est de faciliter le passage de l'excitation membranaire et de petites molécules [6,7].

- Les desmosomes composés principalement par les desmoplakines et les plakoglobines sont reliées aux filaments intermédiaires de desmine (une protéine qui participe à la charpente du cytosquelette de la cellule musculaire en stabilisant le sarcomère au moment de la contraction musculaire). Les desmosomes sont présents entre deux cardiomyocytes adjacents au niveau transversal ou longitudinal. Ils permettent une forte adhésion des cardiomyocytes entre eux pour éviter leur détachement par les contractions répétées [7].
- Les jonctions GAP, aussi appelées nexus, constituées majoritairement par les connexines et les innexines, servent aux échanges des petites molécules et les signaux contractiles entre les cardiomyocytes adjacents. Elles sont présentes dans les parties longitudinales du trait scalariforme (les stries) qui lie deux cardiomyocytes à côté des

desmosomes. C'est au niveau des jonctions GAP que l'on retrouve de nombreux canaux intercellulaires et parmi eux les canaux calciques [8].

- Les *fascia adherens* sont des jonctions qui connectent les éléments du cytosquelette (dans ce cas c'est l'actine) des cardiomyocytes adjacents au niveau des disques intercalaires, comme les desmosomes. Toutefois, ce lien n'est pas établi par une protéine centrale, mais par un complexe de protéines qui joue un rôle important dans des maladies cardiaque comme la maladie de Naxos, l'arythmie, la dysplasie ventriculaire droite arythmogène, la cardiomyopathie dilatée, la myocardite... [9]

Le coeur est également composé de fibroblastes qui synthétisent la matrice extracellulaire assurant ainsi la cohésion du tissu musculaire et la transmission des forces exercées par les cardiomyocytes. Les fibroblastes représentent à eux seuls 70% des cellules cardiaques [10].

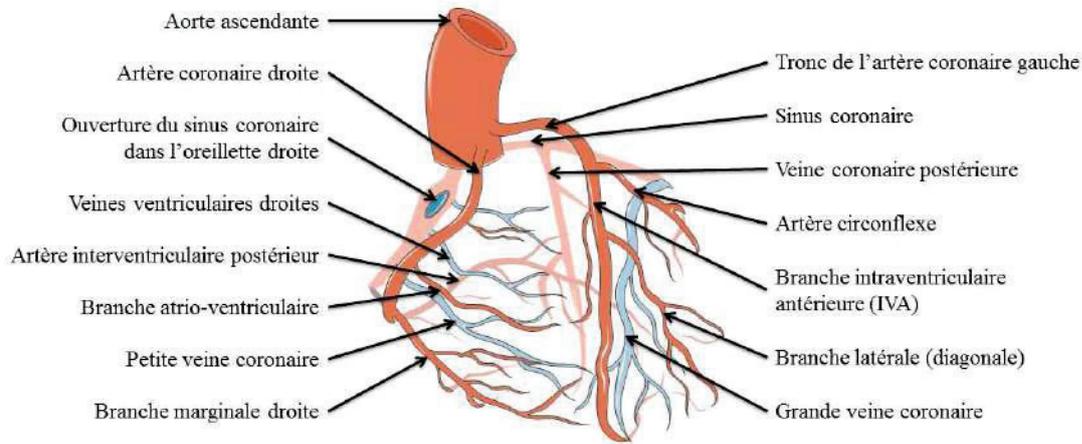
C. L'endocarde

L'endocarde est la couche interne du cœur, celle qui délimite les chambres où le sang circule. Elle est constituée d'un épithélium squameux appelé endothélium qui est continu avec le revêtement endothélial des vaisseaux sanguins [1].

Il a été démontré que l'endothélium du cœur (qui ressemble à l'endocarde et à l'endothélium des capillaires myocardique) peut jouer un rôle dans la régulation de la contraction du myocarde par l'intermédiaire de l'endothéline (un neuropeptide sécrété par l'endothélium vasculaire, ayant un effet vasoconstricteur) [11] ainsi que dans le dysfonctionnement du développement cardiaque chez les embryons et les adultes [12] et l'induction d'une hypertrophie [13].

Etant donné que l'endothélium constitue une barrière entre le sang et le cœur, il joue un rôle dans le contrôle de la composition ionique du liquide extracellulaire autour des

A



B

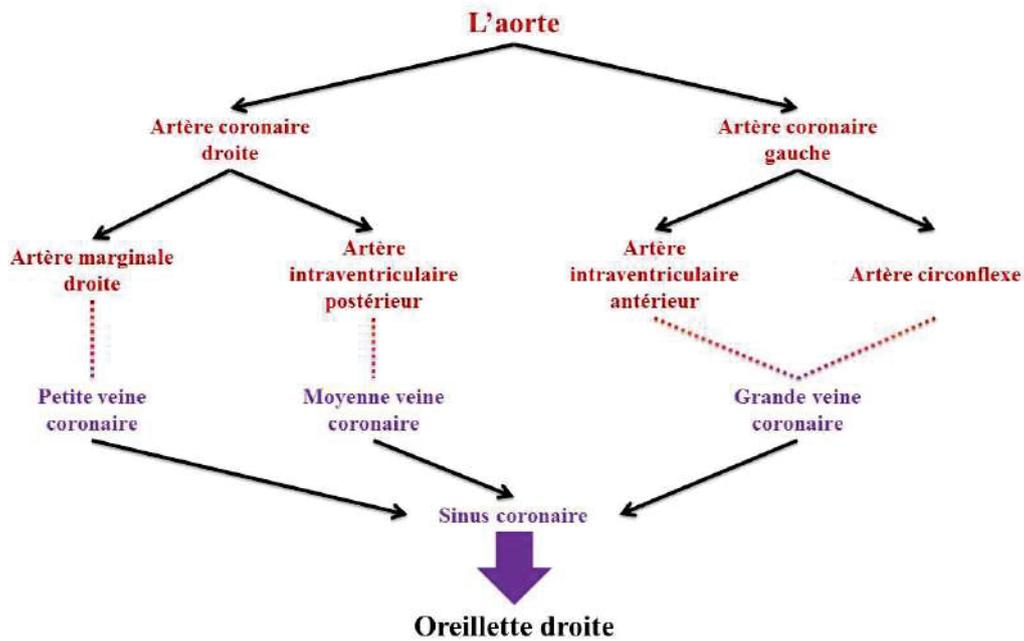


Figure.3: La circulation coronaire

Représentation des différents vaisseaux sanguins impliqués dans la circulation coronaire (A) ; Détails du circuit sanguin coronaire en partant de l'aorte jusqu'au retour dans le ventricule gauche (B). (Adapté de: www.servier.fr)

cardiomyocytes.

D. La circulation coronaire

Comme tous les organes du corps, le cœur a besoin d'être approvisionné en oxygène et en nutriments, et d'être débarrassé de ses déchets métaboliques. Cela est assuré par la circulation coronaire.

La circulation coronaire commence juste après la valve aortique et se divise en deux artères principales: l'artère coronaire droite et l'artère coronaire gauche qui se divise elle-même en deux branches: l'artère interventriculaire antérieure et l'artère circonflexe gauche.

Ces trois artères irrigent la totalité des cellules du cœur, en se divisant en des artères plus petites qui se terminent en formant quatre veines principales: la grande veine coronaire, la veine coronaire postérieure, la veine coronaire moyenne et la petite veine coronaire. Ces dernières rejoignent majoritairement le sinus coronaire.

Le sinus coronaire est une veine cardiaque qui récolte le sang venant du myocarde et des artères coronaires pour les rassembler dans la circulation sanguine en débouchant dans l'oreillette droite entre l'orifice de la valve tricuspide et l'orifice de la veine cave inférieure [1] (Figure.3).

3. Fonctionnement

Le cœur est un muscle involontaire qui se contracte de façon rythmique sans l'intervention du contrôle conscient, mais qui nécessite une synchronisation parfaite pour garantir son bon fonctionnement. Ceci est assuré grâce à plusieurs systèmes tissulaires et cellulaires que je développerai ci-après.

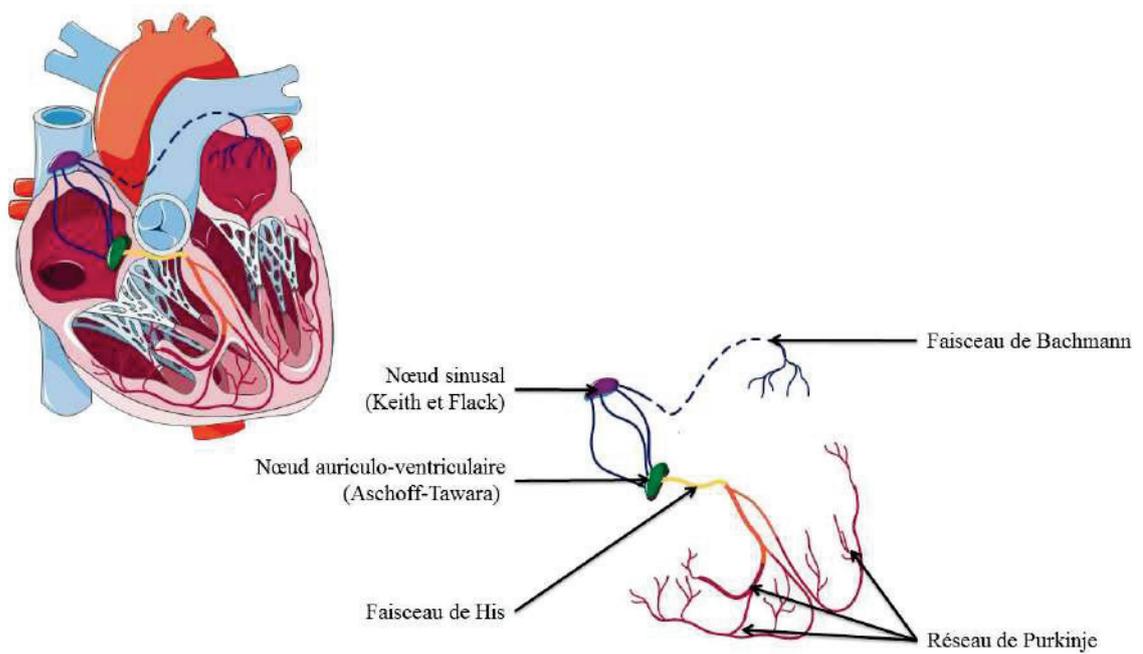


Figure.4: La conduction électrique

Schéma illustrant la position du tissu nodal au sein du cœur ainsi que ses différents acteurs.
(Adapté de: www.servier.fr)



A. Conduction électrique

La conduction électrique est orchestrée par le tronc sympathique du système nerveux autonome, dont les nerfs sont situés dans la portion T1 à T5 de la moëlle épinière. La contraction cardiaque nécessite une synchronisation parfaite pour garantir un rythme normal appelé rythme sinusal. Ceci est assuré par le nœud sinusal qui propage un signal électrique à travers le tissu nodal entraînant la contraction du muscle cardiaque.

Le tissu nodal est constitué du nœud sinusal dit de Keith et Flack, un ensemble de cellules situé dans la paroi de l'oreillette droite au niveau de l'abouchement de la veine cave supérieure, et du nœud auriculo-ventriculaire dit d'Aschoff-Tawara situé à la jonction de l'oreillette et le sommet de la partie du septum qui sépare les deux ventricules du ventricule droit, proche de la valve septale tricuspide et de l'abouchement du sinus coronaire.

Le signal électrique généré par le nœud sinusal se propage à travers le faisceau de Bachmann vers l'oreillette gauche, et par l'intermédiaire de trois faisceaux de fibres vers le nœud auriculo-ventriculaire.

Une fois que le signal atteint le nœud auriculo-ventriculaire, il se propage à travers le faisceau de His, qui à son tour se divise dans un réseau appelé réseau de Purkinje qui transmet le signal électrique aux ventricules [1,2] (Figure.4).

B. La contraction à l'échelle du cœur

La contraction est initiée par la génération d'un signal électrique dans le nœud sinusal qui se propage dans les oreillettes puis vers les ventricules, de façon indépendante du système nerveux. Pour un pompage efficace du sang il est nécessaire d'avoir une synchronisation entre la partie droite et gauche du cœur pour compléter un cycle cardiaque qui dure quelque ms [14].

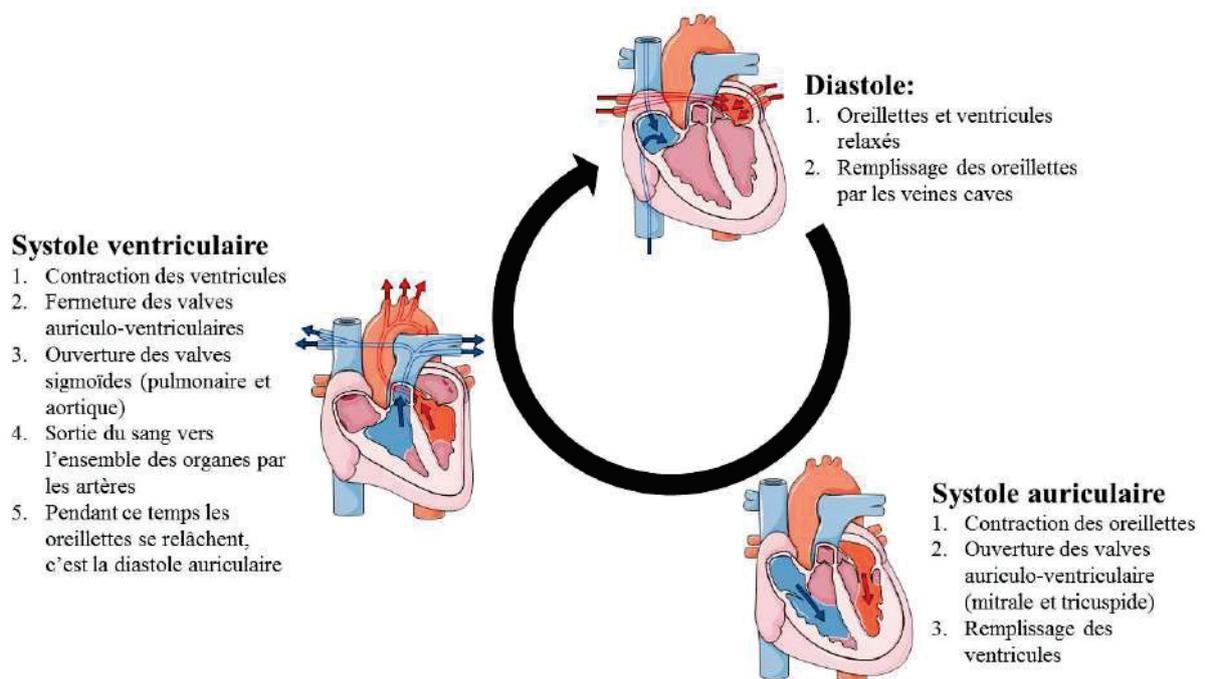


Figure.5: Le cycle de contraction cardiaque

Schéma représentant les différentes étapes du cycle de contraction cardiaque.
 (Adapté de: www.servier.fr)

Le cycle cardiaque consiste en trois phases principales (Figure.5):

- La systole auriculaire pendant laquelle les deux oreillettes se contractent simultanément en éjectant le sang dans les ventricules (remplissage actif).
- La systole ventriculaire qui intervient quelques fractions de secondes après la systole auriculaire et induit l'éjection du sang dans les artères. Pendant cette phase il y a fermeture des valves auriculo-ventriculaire (mitrale et tricuspide) et l'ouverture des valves sigmoïdes (pulmonaire et aortique).

La diastole auriculaire est généralement masquée par la systole ventriculaire et c'est pendant cette phase que le sang remplit de nouveau les oreillettes.

- La diastole ventriculaire, c'est la phase de repos des ventricules, pendant laquelle tout le muscle cardiaque se relâche, les valves sigmoïdes se ferment et les valves auriculoventriculaires s'ouvrent, permettant le remplissage passif des ventricules [2,15].

L'ensemble du cycle cardiaque dure en moyenne 0,8 seconde chez l'homme dont 0,3 seconde pour la systole ventriculaire et 0,5 seconde pour la diastole ventriculaire.

Au sein des cardiomyocytes, la contraction est induite par l'ECC (couplage excitation/contraction). L'onde de dépolarisation entraîne une augmentation de la conductance membranaire du calcium, qui stimule la libération du calcium des zones de stockage intracellulaires, surtout le réticulum, induisant la contraction.

C. La contraction à l'échelle des cardiomyocytes

i. Potentiel d'action

Les signaux électriques produits par le tissu nodal correspondent à des potentiels d'action qui induisent la dépolarisation des cardiomyocytes par l'ouverture des canaux sodique rapides

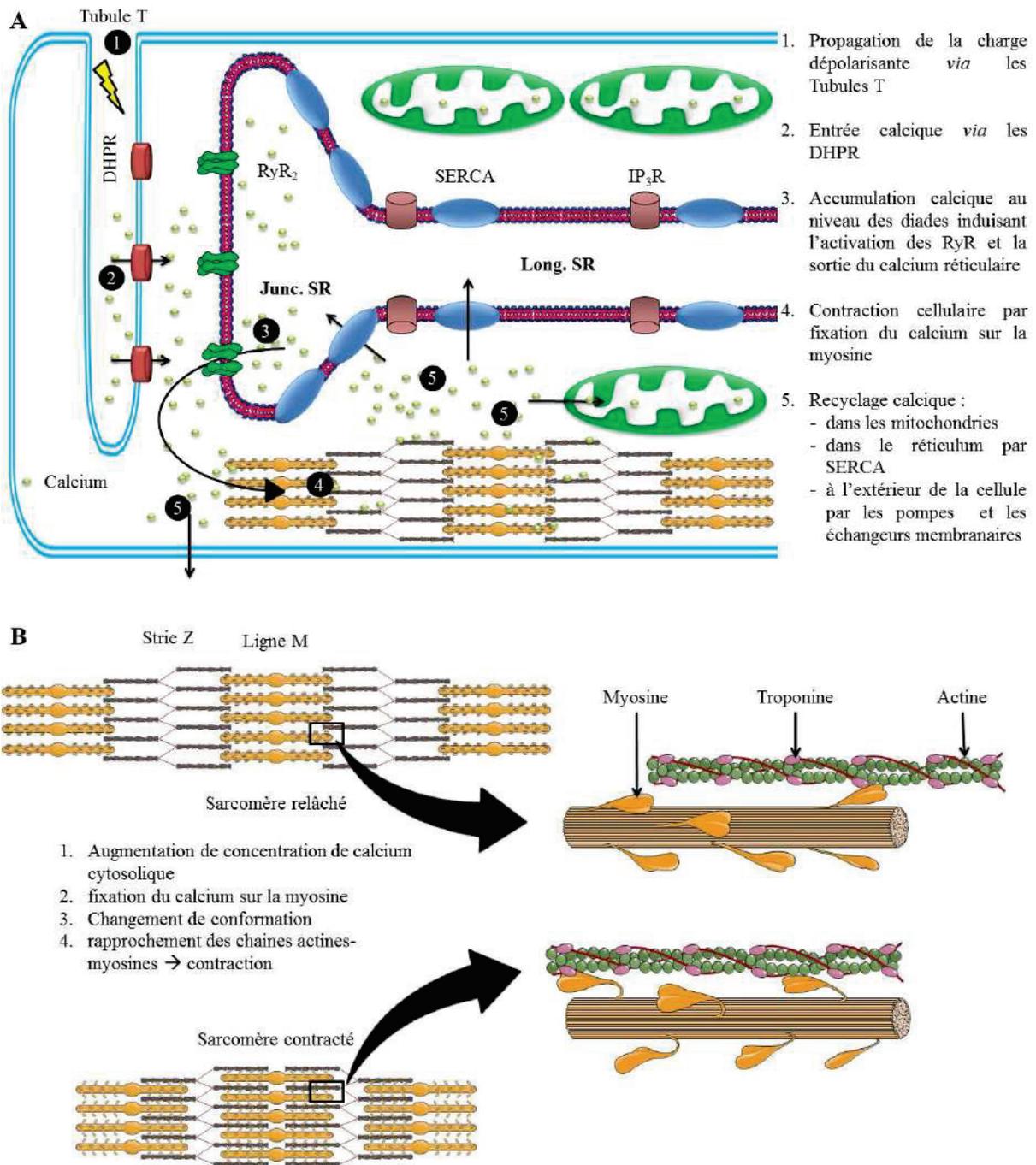


Figure.6: Mécanisme de contraction des cardiomyocytes

Schéma représentatif des différentes étapes de la contraction cellulaire des cardiomyocytes, commençant par la propagation du potentiel d'action dans les tubules T jusqu'à l'extrusion du calcium cytoplasmique accumulé suite au mécanisme du CICR (A) ; et de la dynamique de contraction expliquant l'origine du raccourcissement des sarcomères (B).

(Adapté de: www.servier.fr)

entraînant une entrée massive du cation sodium dans la cellule et leur fermeture quelques centièmes de seconde plus tard.

Le potentiel de membrane d'une fibre musculaire ventriculaire fluctue de -85 mV à +20 mV et forme un plateau qui correspond à une contraction des cardiomyocytes ventriculaire presque 15 fois plus longue que celle des myocytes. Ce plateau spécifique aux cardiomyocytes est dû à l'ouverture des canaux calciques lents de type L. Ces canaux s'ouvrent avec un léger décalage à cause de leur seuil critique de -35 mV, mais restent ouverts plus longtemps (quelques dixièmes de seconde), permettant une grande entrée du calcium dans le cytoplasme. Ce flux des ions calciques pendant cette phase de dépolarisation réduit la repolarisation en diminuant le passage des ions potassium à travers la membrane [16].

ii. Mécanisme de la contraction

L'augmentation de la concentration suite à l'excitation des cardiomyocytes par un potentiel d'action activant les canaux calciques de type L, induit une libération massive du calcium du réticulum sarcoplasmique par les canaux RyR (ryanodine receptor) *via* le système de libération du calcium induite par le calcium (encore appelée CICR de l'anglais calcium-induced calcium release). Cette augmentation du calcium cytosolique est à l'origine de la contraction myocardique (Figure.6A) [16]. La contraction cellulaire commence par l'augmentation globale du calcium intracellulaire suite au CICR et va entraîner la fixation des ions calcium à la TnC (troponine C) provoquant un changement de conformation des complexes troponine-myosine [17]. Cette phosphorylation induit un changement de conformation des protéines, nécessaire dans l'interaction entre l'actine et la myosine au cours de la contraction [18]. Des ponts se forment entre l'actine et la myosine, permettant le glissement des filaments épais sur les filaments fins. Le raccourcissement des sarcomères

induit alors une contraction cardiaque (Figure.6B).

iii. Relâchement et retour à l'état basal

Pour permettre la relaxation du muscle cardiaque, la concentration de calcium cytosolique doit diminuer rapidement. A la fin de la dépolarisation, l'entrée du calcium s'arrête. La relaxation se produit lorsque le calcium est libéré par la TnC. Une grande partie du calcium cytosolique sera pompée dans le réticulum sarcoplasmique par l'intermédiaire des SERCA (sarco/endoplasmic calcium-ATPase) et l'autre partie sera exclue en dehors de la cellule par les pompes échangeurs sodique/calciq. Le sodium de son côté sera exclu par les pompes sodique/potassique ATPase situées sur la membrane plasmique, provoquant le retour à l'état basal de concentration sodique et potassique et la fin du potentiel d'action [2,19,20] (Figure.6).

4. Conclusion

Pour conclure ce chapitre, nous avons vu que le maintien d'un fonctionnement physiologique du cœur est dépendant de plusieurs systèmes complexes et complémentaires qui s'achève par la contraction. Cela ne serait pas possible sans le contrôle du calcium cellulaire. Ce dernier est très finement régulé par l'ensemble des acteurs de l'homéostasie calcique que nous allons développer dans la prochaine partie.

A

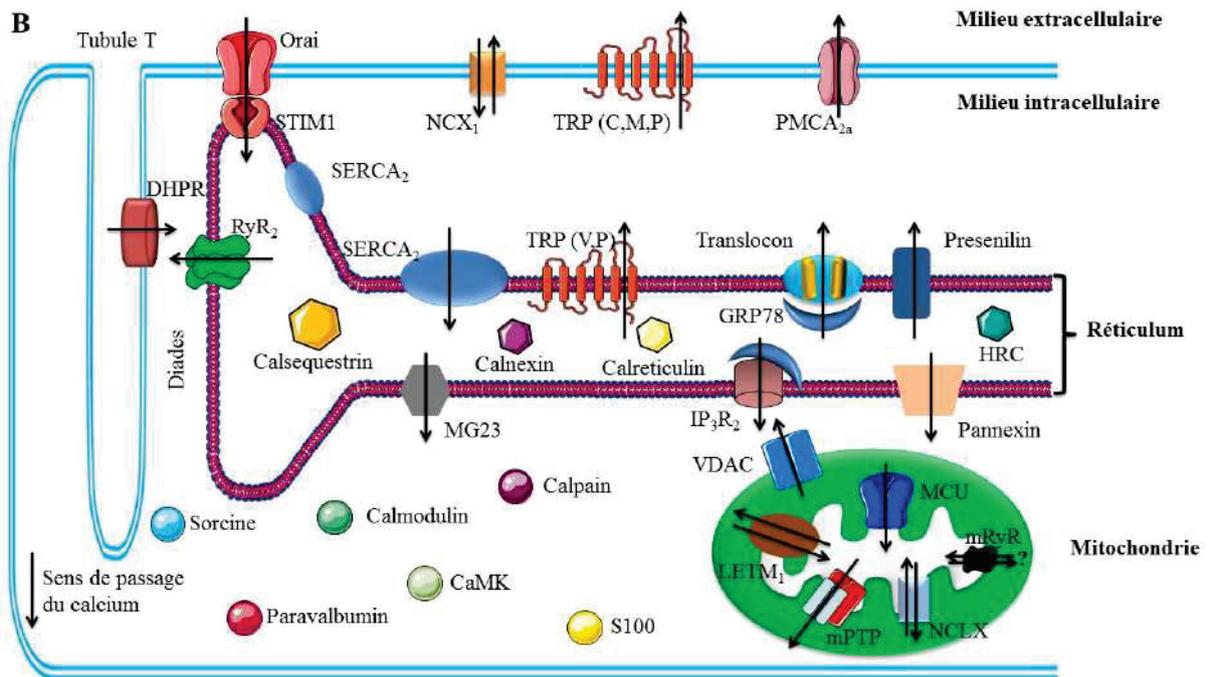
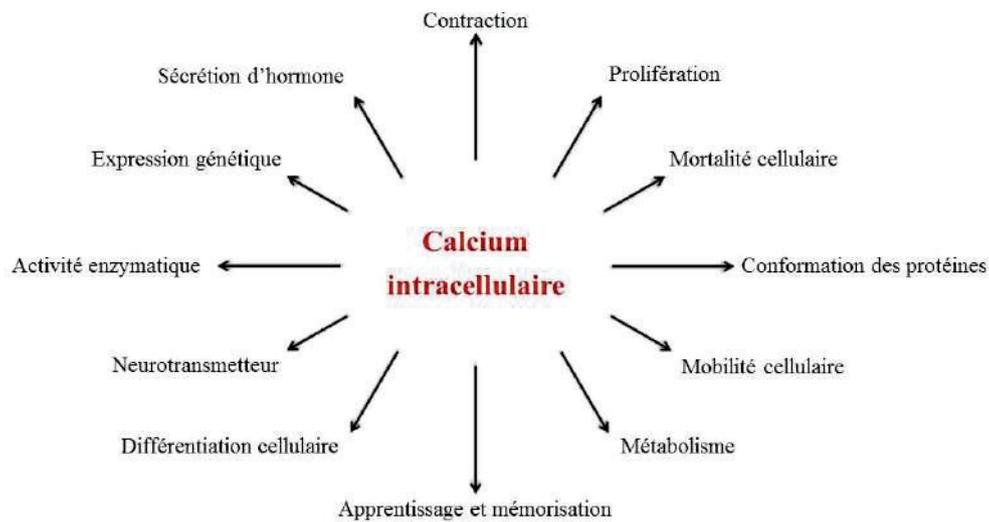


Figure.7: Le calcium au sein des cardiomyocytes

Le calcium, un acteur principal dans l'activité cellulaire (A) ; Schéma représentatif des différents acteurs de l'homéostasie calcique au sein des cardiomyocytes (B).
(Adapté de: www.servier.fr)

❁ CHAPITRE II: HOMEOSTASIE CALCIQUE AU SEIN DU CARDIOMYOCYTE

Hormis son rôle dans la contraction, le calcium est très important dans la signalisation cellulaire. Le réseau calcique de signalisation peut être divisé en 4 unités fonctionnelles [21] (Figure.7.A):

- Une signalisation déclenchée par un stimulus qui engendre différents signaux de mobilisation calcique.
- Cette dernière active un mécanisme appelé « ON » mécanisme, qui alimente le cytoplasme en calcium.
- Le calcium agit comme second messenger dans plusieurs processus cellulaires dont l'ECC.
- Enfin le « OFF » mécanisme nécessaire pour revenir à l'état basal du cytoplasme.

Le contrôle de ces multiples voies de signalisation se fait par l'intermédiaire de nombreux mécanismes impliquant le pompage, l'échange et le tamponnement du calcium au niveau des différentes composantes cellulaires [21–24] (Figure.7.B).

Dans la prochaine partie je vais développer les acteurs majeurs du métabolisme calcique dans les différentes organelles cellulaires des cardiomyocytes.

1. La membrane plasmique

La membrane plasmique des cardiomyocytes, appelée également sarcolemme, joue un rôle important dans le métabolisme calcique. Elle contient plusieurs types de canaux qui jouent un rôle important dans les flux calciques entrant et sortant dans les cellules à partir du milieu extracellulaire.

Les tubules T représentent 30 à 50% de la surface de la membrane plasmique, facilitant ainsi la conduction du potentiel d'action dans l'intérieur des cardiomyocytes. Voici une liste des

acteurs calciques majeurs du sarcolemme:

A. Dihydropyridine receptors

Les LTCC (Long-lasting-type calcium channel), aussi désignés comme DHPR (dihydropyridine receptors), sont des canaux calcique voltage dépendant qui induisent une entrée calcique suite à la dépolarisation cellulaire induite par le potentiel d'action.

Dans le cœur, les canaux $Ca_v1.2$ sont l'isoforme dominante. On les retrouve sur toute la membrane plasmique, mais majoritairement concentrés au niveau des tubules T. Ce canal est composé de 5 sous-unités, une unité $\alpha1$ formant la partie pore du canal et 4 sous-unités régulatrices, $\alpha2$, β , δ et γ . Le flux de calcium entrant se concentre majoritairement dans la partie cytoplasmique proche des diades et cette augmentation de concentration calcique de $\sim 100\text{nM}$ à $\sim 10\mu\text{M}$ induit à son tour l'ouverture des canaux RyR [25].

Le calcium libéré par les RyR active la CaM (calmodulin), qui à son tour inhibe l'entrée du calcium *via* les DHPR [26].

B. Sodium/calcium exchanger

Les NCX (sodium/calcium exchanger) sont, comme leur nom l'indique, des échangeurs des ions sodium et calcium, fonctionnant sur l'énergie qui est stockée dans le gradient électrochimique de sodium. Il existe trois isoformes de NCX, 1 à 3. Dans le cœur c'est le NCX1 qui est dominant. Ces canaux permettent d'échanger trois ions sodium contre un ion calcium et sont influencés par la concentration des ions sodium, impliquant qu'ils fonctionnent dans les deux sens. Principalement, leur rôle est de faire sortir le calcium accumulé dans le cytosol à la fin de la dépolarisation pour rétablir l'état basal. Au début de la dépolarisation, il joue aussi un rôle mineur dans l'entrée calcique étant donné la concentration

intracellulaire en sodium trop élevée [22,27].

C. Transient receptor potential

Jusqu'à présent, 28 gènes ont été identifiés pour la famille TRP (transient receptor potential) qui est divisée en six sous famille: TRPC (canonical), TRPV (vanilloïde), TRPM (melastatin), TRPA (ankyrin), TRPP (polycystic) et TRPML (mucolipin). Elles possèdent toutes une structure primaire avec six domaines transmembranaires.

La majorité des canaux TRP sont localisés sur la membrane plasmique, bien que les canaux TRPV1, TRPV2, TRPM2, TRPM7 soient aussi présent sur la membrane du réticulum, des vésicules synaptiques, et des lysosomes.

En général, les canaux TRP sont perméables au calcium d'une façon non sélective, à l'exception du TRPM4 et TRPM5 qui sont des canaux monovalent sélectifs, et du TRPV5 et TRPV6 qui sont hautement sélectifs au calcium.

Leur présence à la membrane plasmique n'est pas activée par le voltage étant donné que leur structure est dépourvue du senseur du voltage. Par contre ils sont sensibles à la température, à certains agents chimiques, aux mouvements mécaniques et aux changements dans l'environnement cellulaire tel que le pH et le stress oxydatif.

Généralement, les canaux TRP provoquent une augmentation du calcium cytosolique, induisant ainsi un signal cellulaire de régulation des fonctions cellulaires telles que la contraction, la prolifération, la différenciation et même la mort cellulaire.

Leur présence dans les cardiomyocytes a été liée à plusieurs maladies cardiaques telles que l'hypertrophie et le dysfonctionnement cardiaque pour la plupart des canaux TRPC (sur la membrane plasmique) et TRPV (sur la membrane réticulaire et au niveau des disques intercalaires), l'induction de l'apoptose après ischémie pour TRPM2, le pré-conditionnement

contre les lésions cardiaques pour TRPV1, le développement cardiaque pour les TRPP2 et TRPM7 et dans l'arythmie pour les TRPM4, TRPC3 et TRPC6 [28].

D. Plasma membrane calcium-ATPase

Les PMCA (plasma membrane calcium-ATPase) sont des pompes membranaires qui jouent un rôle crucial dans l'extrusion du calcium cytosolique. La vitesse de cette extrusion dépend des différentes isoformes existantes de PMCA et de leurs liens avec la calmoduline.

La PMCA2a est l'isoforme prédominante dans le cœur. Son affinité pour le calcium est plus forte que celle des NCX, en revanche, sa capacité de transport est plus faible. De ce fait, le maintien du calcium cytosolique est attribué aux PMCA, alors que les NCX s'activent pour contre-balancer l'effet de la grande augmentation de la concentration calcique pendant l'excitation [29,30].

E. Calcium release-activated channel

Les canaux CRAC (calcium release-activated channel) sont des canaux qui lient la membrane plasmique avec le réticulum. La protéine Orai située sur la membrane plasmique forme le pore du canal CRAC, et se lie avec la protéine STIM1 (stromal interaction molecule 1), une protéine transmembranaire présente sur la membrane du réticulum. STIM1 fonctionne comme détecteur de concentration calcique dans le réticulum. Les canaux CRAC fonctionnent alors pour éviter la vidange réticulaire du calcium en induisant une entrée calcique du milieu extracellulaire par l'oligomérisation des STIM1 qui activent Orai. Cette entrée calcique est accompagnée par l'activation des voies signalétiques de transcription impliquées dans le remodelage et le développement cardiaque [31].

Des travaux récents ont montré une interaction entre STIM1 et d'autres protéines

membranaires et réticulaires, tel que les canaux TRP, les DHPR et les pompes SERCA et PMCA [32].

F. Autres acteurs

D'autres canaux sont présents sur la membrane plasmique des cardiomyocytes, tels que les canaux potassique, les protéines NHE (sodium/hydrogen exchanger), les GPCR (G-protein coupled receptors), les canaux ligand dépendant: SCaMPRE, etc..., que je ne détaillerai pas en raison de leur lien indirect avec le calcium [33–36].

2. La mitochondrie

La mitochondrie est l'organe cellulaire responsable de la production d'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate), mais elle joue aussi un rôle de stock cellulaire calcique et dans la chélation du calcium cytosolique. Dans le cardiomyocyte, les mitochondries sont alignées avec les sarcomères et représentent presque 38% du volume de la cellule [37]. Elles se lient avec le réticulum dans des régions appelées MAM (mitochondria associated membranes), très utiles pour le transfert calcique entre ces deux organites.

A. Voltage-dependent anion channel

VDAC (voltage-dependent anion channel) est un canal de la membrane mitochondriale externe. Il reste perméable aux cations à tout moment, mais il devient imperméable aux anions et aux petites molécules à haut voltage. Trois isoformes de VDAC sont présentes d'une façon presque homogène sur les mitochondries, indiquant un rôle bien spécifique pour ces protéines [38].

Des études ont proposé que VDAC jouerai un rôle important dans la régulation d'un méga

canal de la membrane mitochondriale, le mPTP (mitochondrial permeability transition pore), responsable de la mortalité cellulaire induite par la mitochondrie [39].

Le lien entre VDAC et des protéines de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma 2) à la membrane de la mitochondrie, est suspecté de réduire l'apoptose. Toutefois, en se liant aux IP₃R (inositol trisphosphate receptor), VDAC favorise le transfert du signal calcique du réticulum aux mitochondries, induisant ainsi la mortalité cellulaire [39].

B. Mitochondrial calcium uniporter

L'entrée majeure du calcium dans la mitochondrie se fait à partir des MCU (mitochondrial calcium uniporter). MCU est un canal sélectif à l'entrée calcique qui facilite le transport calcique voltage dépendant, situé sur la membrane interne de la mitochondrie.

Ayant une faible affinité pour le calcium, le MCU nécessite une concentration cytosolique de calcium entre 10 et 100 μ M pour un transfert efficace dans la mitochondrie. Ceci est assuré par la présence des micro-domaines à forte concentration calcique, entre le réticulum et la mitochondrie, alimentés par la sortie du calcium réticulaire à travers les canaux IP₃R.

Cette entrée de calcium dans les mitochondries doit être maîtrisée afin d'assurer une réponse appropriée allant de la stimulation de la production d'ATP jusqu'à l'initiation de la mort cellulaire.

L'activité des MCU est contrôlée par des protéines régulatrices faisant partie d'un grand complexe protéique, parmi lesquels on retrouve MICU1 et MICU2 (Mitochondrial calcium uptake 1 and 2), régulés eux même par le calcium qui se lie à leurs domaines EF-hand (domaines hélice-boucle-hélice). Quand le calcium est en faible quantité dans le cytoplasme, MICU2 inhibe l'activité de MCU, alors que lors de l'augmentation de la concentration calcique, MICU1 stimule le pompage du calcium dans les mitochondries à travers MCU [40].

C. Mitochondrial sodium/calcium exchanger

Déjà décrits dans la membrane cytoplasmique, les NCLX présents sur la membrane interne mitochondriale fonctionnent en parallèle de MCU pour l'entrée du calcium dans les mitochondries. Etant dépendant de la concentration du sodium entre la mitochondrie et le cytoplasme, le NCLX peut agir de façon réversible pour l'extrusion du calcium de la matrice mitochondriale, surtout dans le cas d'une ischémie cardiaque où la concentration du sodium cytoplasmique a tendance à augmenter de manière importante [41].

Ce canal est très important pour l'activité mitochondriale étant donné que le sodium mitochondrial est échangé contre des protons H^+ par les échangeurs mNHE, et ce phénomène joue un rôle crucial dans la régulation du pH cellulaire et la production de l'ATP par la mitochondrie [42,43].

D. Mitochondrial ryanodine receptor

mRyR a été identifié sur la membrane interne mitochondriale des cardiomyocytes en 2001 [44]. RyR possède 3 isoformes, RyR₁₋₃, dont deux exprimées dans le cœur: RyR₂ sur la membrane du réticulum sarcoplasmique que je détaillerai plus loin, et RyR₁ dans les mitochondries, ici nommé mRyR.

Des études ont montré une différence dans le mode d'action de ces deux isoformes. Bien que RyR₂ de la membrane du réticulum sarcoplasmique soit très impliqué dans la contraction musculaire par le mécanisme de CICR en augmentant le taux de calcium cytosolique, mRyR joue un rôle dans la signalisation calcique indépendante de la contraction. Il a été montré que mRyR est nécessaire pour maintenir l'état métabolique basal de la mitochondrie ainsi que pour l'accélération calcium dépendante du cycle de Krebs [45]. Avec sa forte affinité au calcium, mRyR est activé sous condition physiologique de concentration de calcium, et joue

un rôle dans le pompage de ce calcium dans les mitochondries. Toutefois, l'activité des mRyR semble être inversée lorsque la concentration du calcium de la matrice mitochondriale atteint un seuil critique, afin d'éviter la surcharge calcique mitochondriale, limitant ainsi l'activation des mPTPs et l'induction de la mort cellulaire [45–49].

Les canaux RyR seront détaillés dans la partie Réticulum.

E. Mitochondrial permeability transition pore

Le mPTP est un canal transitoire de la membrane interne de la mitochondrie, qui se forme de façon non spécifique suite à une surcharge calcique dans la matrice mitochondriale surtout si cela est accompagné par un stress oxydatif et une augmentation de la concentration du phosphate intermitochondrial [50]. Son ouverture cause des dommages irréversibles menant à la mort cellulaire. La composition de ce pore reste inconnue jusqu'à présent, même si sa structure est très étudiée. On sait qu'entre autre, l'ANT (adenine nucleotide translocase), la FoF1 ATP synthase, le PiC (phosphate carrier) et la cyclophilin D pourraient faire partie de sa structure et jouer un rôle important dans la régulation de ce pore. En effet, le calcium peut se lier à ces protéines et entraîner un changement de leur configuration, favorisant la formation du pore en se liant avec VDAC de la membrane externe de la mitochondrie.

Du point de vue énergétique, la formation et l'ouverture du pore perméabilise la membrane interne de la mitochondrie. Cela permet aux protons de sortir, induisant le découplage de la chaîne respiratoire et l'arrêt de la synthèse de l'ATP d'un côté, et de l'autre, le déficit en protons provoque la réversibilité de l'activité des FoF1 ATP synthase qui hydrolysent l'ATP et cause la déplétion cellulaire d'ATP et éventuellement la mort cellulaire par nécrose.

L'ouverture du mPTP permet aussi le passage libre des petits métabolites, des protéines inférieures à 1,5 kDa et des ions entre le cytoplasme et la mitochondrie. Cela induit une

augmentation de la concentration calcique cytoplasmique, et le gonflement des mitochondries suite à l'équilibre qui va se mettre en place entre les deux compartiments. Ce dernier provoque la rupture de la membrane externe mitochondriale et la libération du cytochrome c, facteur majeur de la mort cellulaire par apoptose.

Plusieurs études ont montré que la sensibilité du mPTP pour le calcium peut être contrôlée, et que l'ouverture du pore peut être induite sans l'augmentation calcique dans la matrice, c'est le cas de la reperfusion après une période d'ischémie où le stress oxydatif, la déplétion en adénine et l'élévation de la concentration du phosphate augmentent la sensibilité du pore au calcium et entraînent son ouverture [51–53].

On suppose que d'autres protéines de la membrane externe de la mitochondrie comme les membres de la famille Bcl-2 et l'HK (hexokinase) peuvent réguler la formation et l'ouverture du mPTP à travers des interactions entre la membrane externe et interne de la mitochondrie dans des sites appelés sites de contact [50].

F. Leucine-zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1

Récemment une nouvelle protéine transmembranaire a été identifiée sur la membrane interne de la mitochondrie, LETM1 (leucine-zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1). LETM 1 est supposé être un échangeur calcium/protons, qui permet l'influx calcique dans la mitochondrie. Son rôle reste à déterminer pour savoir si son fonctionnement est réversible avec le changement du gradient électrochimique des cardiomyocytes [47].

3. Le réticulum

Le réticulum est un organe cellulaire dont la fonction principale est la synthèse des lipides et des protéines, la maturation de ses derniers et la régulation de l'homéostasie calcique.

On distingue deux formes de réticulum, un RE (endoplasmic reticulum) rugueux généralement localisé dans la continuité du noyau et recouvert de ribosomes, donc majoritairement impliqué dans la synthèse et la maturation des protéines, et un réticulum lisse responsable de l'homéostasie calcique et de la synthèse lipidique, organisé différemment selon le type cellulaire [54].

Dans les cardiomyocytes, on trouve le RS (sarcoplasmic reticulum), une forme évoluée du réticulum lisse. Il est organisé en réseau de part et d'autre de la cellule et entre en contact avec la membrane cellulaire au niveau des tubules T pour former les diades. Il forme la réserve calcique la plus importante de la cellule avec une concentration de calcium allant jusqu'au 1mM [55].

Pendant longtemps, le RS était considéré comme le seul compartiment réticulaire dans les cardiomyocytes. Des études ont proposé la présence de deux compartiments différents au sein du RS, un compartiment jonctionnel, présent à côté des diades, dont le rôle se résume par la régulation de la contraction cellulaire, et un autre compartiment longitudinal qui lui gère les autres fonctions cellulaires. Cependant, des études récentes ont proposé la présence d'un RE clairement différencié, qui communique avec le RS. Il est majoritairement situé à proximité du noyau et assure la synthèse et la maturation des protéines [37,56].

En conclusion, l'organisation réticulaire exacte dans les cardiomyocytes n'est pas encore définie, et les observations sont pas concluante [37,56]. De ce fait, la régulation de l'homéostasie calcique réticulaire entre les deux compartiments du RS dans les cardiomyocytes n'est pas très connue, ci-dessous une liste de ses acteurs principaux:

A. Ryanodine receptor

Les RyR sont les canaux calciques les plus largement connus de par leur capacité à créer une

augmentation de la concentration calcique cytoplasmique assez remarquable. Comme nous l'avons déjà évoqué, il existe trois isoformes de RyR₁₋₃. RyR₁ est l'isoforme dominante dans le muscle squelettique, RyR₂ dans le cœur. Une étude récente a montré la présence de RyR₁ et RyR₂ dans les cellules acineuses pancréatiques humaines [57]. Leur affinité à la ryanodine (un alcaloïde végétal) leur a donné ce nom, bien que la ryanodine ne se trouve pas physiologiquement chez l'animal. Tous les RyR ont une structure presque identique. Ce sont des homotétramères, formés de 4 sous-unités identiques de 560kDa, insérées dans la membrane du RS, et chaque sous-unité comporte 4 hélices transmembranaires qui, en se liant au calcium, changent de conformation et forment un canal permettant la sortie des ions calcium de la lumière du RS vers le cytoplasme [58]. Le calcium est le modulateur principal de l'ouverture des RyR. Il est activé à de faibles concentrations de calcium cytosolique (1-10 μ M) et inhibé au-delà (>10 μ M), suggérant un rôle biphasique du calcium, avec une conformation de RyR possédant deux sites de fixation du calcium: un à grande affinité qui stimule son ouverture et l'autre avec une faible affinité qui l'inhibe.

La caractérisation de RyR₂ dans les cardiomyocytes a montré qu'il forme un complexe macromoléculaire avec plusieurs autres protéines, comme par exemple la PKA (proteïn kinase A) les protéines FKBP12 (FK506 binding protein) et 12.6, la CaM et la CaMKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II), la CSQ (calsequestrin), la triadine, la jonctine, la HRC (histidine-rich calcium binding protein). Ces protéines jouent un rôle important dans la modulation et la régulation de l'activité de RyR₂ [59]. En pharmacologie, RyR est modulé par la ryanodine (activateur à forte dose et inhibiteur à faible dose), la caféine (activateur), le dantrolène (inhibiteur), et plusieurs toxines issues du scorpion [60–62].

Dans les cardiomyocytes, RyR₂ est principalement exprimé sur la partie terminale du RS face au tubule T. Ce positionnement à proximité des DHPR (CaV_{1.2}) est très important pour

l'ECC. En effet, RyR est modulé directement par les DHPR. La dépolarisation de la membrane plasmique stimule l'ouverture des $CaV_{1,2}$, induisant une entrée calcique dans le cytoplasme. Cette entrée est suffisante pour déclencher l'activation des RyR par le mécanisme de CICR et c'est cette sortie massive du calcium par les RyR qui entraîne la contraction cellulaire [63]. L'augmentation calcique par le RyR est estimée à plus de $100\mu\text{M}$ à proximité des diades, et c'est ce que l'on appelle calcium « sparks » sites.

La diffusion de ce calcium augmente la concentration cytosolique de calcium entre 500nM et $1\mu\text{M}$, permettant à la troponine C de se lier au calcium et d'induire la contraction.

Cette augmentation de la concentration calcique active CaM qui se lie au RyR et inhibe son activité.

B. Inositol trisphosphate receptor

En plus des RyR, les récepteurs IP_3 sont aussi présents sur le RS, mais contrairement aux RyR situés dans la partie jonctionnelle du RS à proximité des tubules T, les IP_3R ont été décrits au niveau des lignes Z dans la région péri-nucléaire et sur la membrane nucléaire. IP_3R existe sous trois isoforme IP_3R_{1-3} . IP_3R_2 est l'isoforme dominante dans le cœur, et son expression est beaucoup plus faible que celle des RyR ($<1:50-1:100$) [64,65].

Activés par l' IP_3 (inositol trisphosphate) et le calcium, IP_3R induisent une sortie calcique du RS, importante dans la régulation de la transcription des gènes nucléaires [66,67]. Cependant le taux et la vitesse de cette libération de calcium sont très inférieurs à celle du CICR. De plus, le potentiel d'action n'inclut pas la formation d' IP_3 . C'est pourquoi on suppose que les IP_3R ne jouent pas de rôle dans l'ECC [68–70].

L'activation des IP_3R nécessite la présence du calcium et la fixation de l' IP_3 sur leur site spécifique. Ils sont donc susceptibles d'être contrôlés par des ligands extracellulaires comme

la PLC (phospholipase C), les GPCR, et les récepteurs tyrosine kinases qui induisent la formations d'IP₃ [71].

Comme pour les RyR, le calcium a une action biphasique sur les IP₃R. Une faible concentration de calcium les active et ils sont inhibés par l'augmentation de calcium cytosolique, et ceci de manière directe par l'action du calcium sur le récepteur ou par l'action de la CaM.

L'action des IP₃R peut également être modulée par la concentration du calcium dans la lumière du RS par des protéines chaperonnes, comme la calréticuline et la calnexin, ainsi que par des voies de signalisation comme les CaMKII, PKG, PKC et PKA (cAMP-dependent protein kinase).

Plusieurs groupes ont proposé IP₃R comme second messenger qui transforme un stimulus externe en un signal calcique interne, caractérisé par des modèles de diffusion cellulaire relatifs au temps et à l'espace, comme les vagues calciques et les oscillations, nécessaires pour la régulation de plusieurs processus cellulaire tels que la prolifération, la différenciation, le métabolisme, la sécrétion, la mémoire etc... [71,72].

Une étude récente sur les cardiomyocytes a montré un lien entre les IP₃R₂ et les mRyR conduisant à la régulation bioénergétique cellulaire par le signal calcique spécifique et local des IP₃R et non par le calcium cellulaire global [73].

C. Sarco/endoplasmic calcium-ATPase

Les pompes SERCA sont un acteur majeur de la relaxation musculaire et du retour à l'équilibre calcique par son activité de pompage de calcium dans le réticulum. Elles sont responsables du pompage de 70 à 92% du calcium cytosolique des cardiomyocytes selon l'espèce (humain et murin respectivement). Le reste du calcium est pompé par les NCX et les

PMCA en dehors de la cellule, et très peu par les MCU dans les mitochondries (moins de 1%) [22].

SERCA est une ATPase qui utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter le calcium cytosolique dans le réticulum. Son activité est régulée par une protéine membranaire, le PLB (phospholamban) qui, dans son état non phosphorylé, se lie à SERCA, induisant une réduction de son affinité pour le calcium. La phosphorylation de PLB par PKA (proteïn kinase A), PKC (proteïn kinase C) ou CaMKII inhibe son interaction avec SERCA, induisant l'augmentation de l'activité de cette dernière et l'accumulation calcique dans le RS [74].

Trois isoformes de SERCA 1-3 ont été identifiées, différant par leur affinité pour le calcium, et la vitesse de l'hydrolyse de l'ATP. Dans le cœur, on retrouve SERCA_{2b}, qui est exprimé de manière ubiquitaire, et majoritairement SERCA_{2a} dans le muscle cardiaque [75]. Ils sont distribués à proximité des tubules T (SERCA_{2b}), mais surtout sur la membrane du RS, loin des RyR (SERCA_{2a}), assurant, après un cycle de contraction et de largage de calcium par les RyR, un pompage efficace du calcium dans le RS pour le préparer au prochain cycle et évitant ainsi la déplétion calcique réticulaire [76,77].

Chez l'humain, l'expression de SERCA₃ (a, d et f) a été reportée dans le cœur. Elle jouerait un rôle dans l'induction du stress réticulaire soulignée dans des cas de défaillance cardiaque [78].

D. Canaux de fuite calcique

En plus d'IP₃R et RyR, les canaux de libération majeurs du calcium réticulaire, responsables d'une libération contrôlée de calcium suite à un stimulus, 20 à 200 μM de calcium/min (selon le type cellulaire) sont libérés par des canaux de fuite calcique. Dans des conditions de repos, ces canaux de fuites contrôlent, avec les pompes SERCA, le niveau de calcium à l'état

stationnaire dans le RE [79].

i. Transient receptor potential

Déjà décrit sur la membrane plasmique, quelques membres de la famille de TRP de la membrane réticulaire ont été caractérisés comme canaux de fuite calcique [80].

- TRPV1 agirait comme un canal de fuite calcique fonctionnel du RS dans le muscle squelettique. La mobilisation calcique pourrait être directement liée à l'activation de RyR₁. Des études récentes de notre équipe de recherche (Paita *et al.*, en soumission) montrent la présence de TRPV1 dans les cardiomyocytes et leur implication dans l'homéostasie calcique en tant que canaux de fuite [81].
- Il a été suggéré que dans le RE, TRPP2 fonctionne comme un canal de libération du calcium qui peut interagir avec IP₃R, entraînant son ouverture *via* l'augmentation locale de la concentration calcique [79]. TRPP2 pourrait également être impliqué dans la protection cellulaire contre l'apoptose, en réduisant le taux de calcium du RE qui pourrait être libéré en réponse à un stimulus apoptotique [82].

ii. Mitsugumin 23

MG23 (mitsugumin 23) a été identifiée comme une protéine transmembranaire localisée sur le réticulum sarcoplasmique et la membrane nucléaire dans le muscle squelettique [83]. Peu d'informations sont disponibles sur ce canal de fuite et sa fonction reste encore peu explorée. Toutefois, il a été montré que MG23 se comporte comme un canal cationique sensible au voltage, perméable au calcium et au potassium quand il est reconstitué sur une double couche lipidique. Récemment, il a été montré que ce canal aurait pour rôle de générer un signal de mort provenant du RE pendant un stress réticulaire. Ce pourrait être un indice quant à son rôle

de canal de fuite calcique [84,85].

iii. Pannexin

La pannexin est un canal transmembranaire, existant sous trois isoformes Panx1-3. Panx1 est exprimée de façon ubiquitaire, et particulièrement dans le SNC (système nerveux central), Panx2 est exprimée dans le SNC et probablement dans le cœur, et Panx3 a été identifiée dans la peau et dans le développement des tissus comme le cartilage et les os [86,87].

La pannexin pourrait être impliquée dans la formation des jonctions GAP de par sa similarité structurale avec les connexines et les innexines. La surexpression de Panx1 entraîne la formation de jonctions GAP perméables au calcium entre cellules adjacentes, permettant ainsi une diffusion directe du calcium entre les cellules et donc une optimisation de la propagation de la vague calcique. De manière plus surprenante, Panx1 pourrait également former des canaux perméables au calcium dans le RE. Ces canaux contribuent à la fuite calcique du RE et affectent donc la charge calcique réticulaire [88,89].

Le rôle exact de Panx2 n'a pas encore été élucidé, mais il est connu que Panx1 et Panx2 forment un pore dans la jonction GAP entre les cytoplasmes de deux cellules adjacentes [90]. Hormis leur rôle de canal de fuite calcique, les pannexins jouent un rôle pré-apoptotique, et sont impliquées dans un large spectre de pathologies comme le SIDA, la maladie de Crohn, le cancer, l'épilepsie, l'inflammation intestinale chronique, les lésions de la moelle épinière et l'infarctus du myocarde. La diversité de cellules impliquées dans ces pathologies suggère que la fonction cellulaire de Panx1 est impliquée dans l'inflammation et la mort cellulaire, bien que cela reste encore à élucider [91].

iv. Presenilin

Principalement localisées dans le RE, deux isoformes de presenilin ont été décrites: PS1 et PS2 qui est la forme majoritairement exprimée dans le cœur. Il a été montré que PS2 est impliquée dans la régulation du signal calcique dans le myocarde [92]. Comme dans le cas des pannexins, les mutations des presenilins peuvent induire l'apoptose.

Les presenilins ont été décrites comme canaux de fuite calcique dans plusieurs maladies neuronales, leur rôle dans l'homéostasie calcique cardiaque restant encore à étudier [93].

v. Translocon

Le translocon sera décrit ultérieurement dans le chapitre IV.

E. Protéines tampon calcique

Les protéines tamponnant le calcium sont des protéines qui participent à la voie de signalisation calcique en se liant au calcium. Elles sont exprimées dans les milieux intra et extracellulaires. Le calcium a un rôle de second messenger et peut activer ou inhiber la transcription génique, et les protéines tamponnant le calcium peuvent indirectement réguler la transcription par phosphorylation de facteurs de transcription [94]. La majorité de ces protéines font partie de la famille des EF-hand, un motif protéique constitué de deux hélices α liées à une boucle formée d'une douzaine d'acides aminés. La fixation du calcium entre les deux hélices induit un changement de conformation de la molécule [23].

L'existence de différentes protéines tamponnant le calcium suggère leur implication dans des fonctions spécifiques et un rôle important dans la physiologie cellulaire [95].

i. Calreticuline et calnexin

CRT (calreticuline) et CNX (calnexin) sont des protéines tampon calcique majeures situées

dans la lumière du RE. Elles ont une grande capacité à fixer le calcium et participent au repliement des protéines et des glycoprotéines avant leur passage du RE à l'appareil de Golgi. Elles constituent le système de contrôle de qualité [96].

Les chaperonnes CRT et CNX peuvent réguler le pompage de calcium par les SERCA₂ de façon directe ou indirecte. La CRT peut réguler les IP₃R de manière calcium dépendante, ainsi qu'interagir avec SERCA₂ par l'intermédiaire de la protéine REp57, provoquant une diminution de son activité quand la concentration calcique réticulaire est trop élevée [97,98]. Sous les mêmes conditions, la CNX phosphorylée peut interagir et inhiber SERCA₂ [99,100]. Toutefois, à de faibles concentrations calciques réticulaires, une augmentation du calcium cytosolique peut provoquer la déphosphorylation de CNX, entraînant sa dissociation de SERCA₂, et ainsi augmenter l'activité de SERCA pour contre-balancer la déplétion calcique réticulaire.

Des études récentes ont montré la présence de la CRT dans le cytosol et dans la mitochondrie et ont suggéré un rôle de modulation calcique de la CRT expliquant son intervention dans plusieurs pathologies cardiaque [101,102].

CNX serait également impliquée dans l'induction du stress réticulaire et l'apoptose de plusieurs manières, dont la modulation d'expression des canaux calcique et l'induction des ROS (reactive oxygen species) [103–106]

ii. Calsequestrin

La CSQ (calsequestrin) est le tampon calcique majeur dans le réticulum avec une capacité de fixation allant jusqu'à 50% du calcium réticulaire. Deux isoformes existent, la CSQ1 et la CSQ2. Dans le cœur, la CSQ2 majoritairement exprimée change de conformation en se liant au calcium, et réagit avec des protéines d'ancrage de RyR₂, surtout la junctine. A faible

concentration calcique réticulaire, surtout lors du CICR, CSQ2 inhibe les RyR₂, préservant ainsi le réticulum de la déplétion calcique totale. Cette inhibition est levée une fois la concentration calcique réticulaire rétablie. Cela montre que CSQ est cruciale afin d'assurer la présence suffisante de calcium pour la contraction répétée du cardiomyocyte [107].

iii. Glucose regulated protein 78 et 94

GRP78 (glucose regulated protein of 78-kDa), également connu sous le nom de BiP/HSP5A/HSP70, est une protéine multifonctionnelle du RE appartenant à la famille HSP (Heat Shock Protein), jouant un rôle majeur dans la progression des protéines au sein du RE, dans le contrôle qualité et le repliement des protéines, dans le maintien de l'homéostasie du RE, dans le contrôle de la signalisation et dans la survie cellulaire [108,109]. GRP78 est un monomère globulaire possédant deux domaines fonctionnels, une liaison ATP et un domaine de liaison peptidique servant à libérer les protéines mal conformées vers la voie de dégradation protéique: ERAD (endoplasmic reticulum-associated protein degradation). De même, comme d'autres protéines chaperonnes, GRP78 est surexprimée pendant un stress du RE afin de lier les protéines mal conformées, et participe au contrôle de la déplétion du stock calcique et l'apoptose associée à la voie UPR (unfolded protein response) qui en découle. GRP78 est le principal régulateur du stress du RE et un marqueur caractéristique de la voie UPR [24,110].

Son activité de contrôle qualité des protéines est modulée par le calcium. Avec sa faible affinité et sa capacité pour lier le calcium, elle participe à fixer ~25% du calcium réticulaire libre [111].

GRP78 peut aussi se relocaliser vers la mitochondrie où elle peut réguler l'apoptose en diminuant le transfert de calcium du RE à la mitochondrie au niveau des MAM. Ce flux de

calcium entre le RE et la mitochondrie peut induire le dysfonctionnement mitochondrial et la mort cellulaire. Cette diminution résulte en une diminution de la production de radicaux libres et préserve la phosphorylation oxydative et le potentiel de membrane de la mitochondrie pendant le stress du RE. D'où la possibilité pour GRP78 de réguler la fonction mitochondriale, par un équilibre de la dépense énergétique et le maintien de l'homéostasie mitochondriale, particulièrement pendant le stress du RE,[112].

La diversité de ses fonctions, le fait qu'elle soit la protéine tampon calcique la plus importante et la plus conservée depuis les procaryotes, et son implication dans une multiplicité de pathologies font de la GRP78 une cible universelle dans différents pathologies humaines [113].

GRP94 est aussi une protéine chaperonne du RE avec une faible affinité et forte capacité à lier le calcium. Comme GRP78, la diminution du calcium réticulaire augmente la capacité de GRP94 à se lier aux protéines mal formées, faisant d'elle une protéine de protection contre le stress réticulaire suite à une déplétion calcique réticulaire. GRP94 joue un rôle important contre l'apoptose et la nécrose calcium dépendante [114–116].

iv. Histidine-rich calcium binding protein

HRC (histidine-rich calcium binding protein) est une protéine tampon calcique située dans la lumière du RS. Elle présente des analogies de structure avec la CSQ, suggérant un rôle similaire à la CSQ dans la régulation de l'homéostasie cellulaire calcique [117].

HRC, comme la CSQ, peut interagir avec la triadine (une protéine du complexe de RyR) pour réguler l'activité des RyR₂ en augmentant son ouverture à forte concentration calcique réticulaire et en la fermant dans le cas contraire [118].

Il a aussi été montré que HRC joue un rôle dans la régulation de SERCA₂ en l'activant à forte

concentration calcique cytoplasmique, indiquant un rôle important de HRC dans le recyclage de calcium au cours de la contraction du cœur [119,120]

4. Le cytosol

La concentration calcique cytoplasmique est d'environ 100nM. Une augmentation de cette concentration à 1µM initie la contraction et peut être toxique. Bien que le calcium cytosolique soit contrôlé par les autres organites cellulaires, il est évident que le cytosol possède un mécanisme de contrôle, mené par plusieurs protéines sensibles au calcium et des protéines tampons, indispensables pour la signalisation calcique.

A. La calpaïne

Les calpaïnes sont des hétérodimères composées d'une sous-unité catalytique de 80kDa appelée 80K, variable, et d'une sous-unité régulatrice de 30kDa commune à toutes les calpaïnes [121]. Les calpaïnes 1, 2, 5, 7, 10, 13 et 15 sont ubiquitaires alors que les calpaïnes 3, 6, 8, 9, et 12 ont une spécificité tissulaire (par exemple, la calpaïne 3a est spécifique du muscle squelettique) [122].

La calpaïne est une enzyme inactive du cytosol, qui transloque à la membrane en réponse à une augmentation de la concentration en calcium cellulaire. A la membrane, la calpaïne est activée en présence de calcium et de phospholipides [123]. En conditions physiologiques, l'activité de la calpaïne est régulée finement par un inhibiteur spécifique, la calpastatine [124]. L'activité protéolytique de la calpaïne n'est pas spécifique à une séquence d'acides aminés, mais reconnaît une conformation tridimensionnelle de son substrat. De nombreuses protéines du cytosquelette ainsi que des protéines myofibrillaires (spectrine, troponine) [125,126], des enzymes métaboliques [127], des kinases et phosphatases (PKC, calcineurine) [128], et des

protéines impliquées dans la signalisation de l'apoptose [129,130] ont été décrites comme substrats de la calpaïne. Une fois activées, les calpaïnes sont capables d'interagir et de cliver une variété de substrats, y compris des protéines cytosquelettiques, telles que la spectrine, des protéines associées à la membrane et les molécules d'adhésion cellulaire (canaux ioniques, pompes et récepteurs), des neurofilaments, des protéines associées aux microtubules, des enzymes impliquées dans la transduction du signal, des facteurs de transcription etc...

Un rôle des calpaïnes dans les voies d'apoptose et de nécrose, ainsi que dans la neuroprotection a été suggéré dans plusieurs modèles expérimentaux, par utilisation d'inhibiteurs des calpaïnes [131,132]. Lors des phénomènes de nécrose, la calpaïne dégrade la spectrine α aussi nommée fodrine α (280kDa) en deux fragments de 150 et 145kDa, que l'on ne retrouve pas dans les phénomènes de nécrose [133]. La calpaïne aurait également pour rôle de faciliter l'apoptose *via* caspase 3 et la protéolyse.

B. Parvalbumin

La PV (parvalbumin) est une protéine de ~ 12 kDa, avec trois motifs EF-hand (dont 2 fonctionnels). Grâce à sa forte affinité pour le calcium, elle intervient beaucoup dans le mécanisme de régulation du calcium dans le cytosol. Sa concentration dans les cardiomyocytes est estimée entre 10 et $100\mu\text{M}$. Il existe deux isoformes de PV, α et β , avec une affinité calcique plus importante dans le cas de l'isoforme β , lui permettant d'agir sans affecter la signalisation calcique nécessaire à la contraction, tout en facilitant le relâchement pendant la phase diastolique [134,135].

C. Sorcine

Possédant 5 domaines EF-hand, la sorcine est une importante protéine ubiquitaire tampon

calcique. Localisée généralement dans les diades entre le RS et les tubules T, elle joue un rôle important dans la modulation calcique des canaux RyR et DHPR [136].

Avec l'augmentation de la concentration calcique cytosolique, la sorcine se fixe sur les RyR et inhibe leur activité. Cette inhibition sera levée une fois la sorcine phosphorylée par PKA [59]. Sur les DHPR, la sorcine semble améliorer l'inactivation de ces canaux, en réduisant leur affinité pour le calcium [137].

Un rôle important dans l'activation des canaux NCX1 par une interaction calcium-dépendante a été reporté [136] ainsi qu'un rôle d'interaction avec les SERCA après translocation vers la membrane du RS [138].

La translocation calcium-dépendante de sorcine et sa capacité à interagir et réguler l'activité de plusieurs cibles font de cette protéine un acteur important dans différentes fonctions cellulaires, surtout sur l'homéostasie calcique du cœur et l'ECC.

D. Calmoduline

La CaM (calmoduline) est une protéine ubiquitaire multifonctionnelle et essentielle dans le processus de signalisation intracellulaire, avec une activité très dépendante du calcium. Ses 4 domaines EF-hand lui permettent, une fois liée au calcium, de changer de conformation et d'interagir avec ses protéines cibles (environ 100 protéines décrites) afin de les activer [139].

La forme de CaM liée au calcium est appelée Ca-CaM, alors que la forme libre s'appelle Apo-CaM.

La CaM joue un rôle très important dans la contraction musculaire cardiaque. Pendant la phase de dépolarisation, CaM est activée en présence de forte concentration calcique cytoplasmique et se lie aux DHPR pour inhiber leur activité. Elle participe aussi à la phase de repolarisation en se liant à des canaux potassiques et sodiques de la membrane plasmique.

En plus de son activité sur les canaux de la membrane cytoplasmique, CaM peut agir avec les canaux du RS, comme les RyR et les SERCA, en modulant leur activité, soit de façon directe ou bien en interagissant avec d'autres protéines comme la calcineurine et la CaMKII [139,140].

E. Calmoduline kinase

La CaMK est une protéine kinase dépendante de la CaM et du calcium. Elle existe sous 3 isoformes, CaMK I, II et IV, chacune possédant plusieurs isoformes avec la CaMKII δ qui est prédominante dans le cœur. C'est une protéine qui fonctionne de manière autonome par autophosphorylation, ce qui permet le maintien de son activité même après la diminution du calcium [140,141].

En plus de son activité kinase lui permettant de réguler plusieurs canaux calciques comme les DHPR, les RyR et les SERCA, ainsi que d'autres protéines effectrices dans la signalisation cellulaire, CaMKII est impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. En effet, CaMKII est capable de décoder la fréquence, l'amplitude et la durée de pic de concentration calcique dont dépend son activité [142].

Il a été montré que la phosphorylation de RyR₂ et du PLB par la CaMKII induit une fuite calcique du RS et peut aboutir à des dysfonctionnements cardiaques [143,144].

F. S100

S100 est une protéine tampon calcique appartenant à une famille de 21 membres non ubiquitaires, modulée par le calcium, contenant des domaines EF-hand. Le lien avec le calcium induit un changement de conformation de la protéine, entraînant son interaction avec d'autres protéines. Elle joue un rôle très spécifique dans plusieurs processus cellulaires,

comme la phosphorylation, l'activité enzymatique, la prolifération, la transcription, la différenciation, l'homéostasie cellulaire calcique, l'inflammation et l'apoptose [145].

Dans le cœur, on retrouve la S100A1, jouant un rôle dans la régulation de l'homéostasie calcique et la contraction, et elle a été identifiée comme marqueur de dysfonctionnement cardiaque en plus de la CK/CKMB (creatine kinase et creatine kinase MB), la myoglobine et la cTnI/cTnT (troponine cardiac I et T) [146,147].

Plusieurs études ont montré que dans le cœur, S100A1 peut moduler l'activité des RyR et des SERCA [148–150] ainsi que la production d'ATP par interaction avec la F1-ATPase mitochondriale [151], d'où son rôle important décrit dans le dysfonctionnement cardiaque [152,153].

G. Autres protéines tampons calciques cytosoliques

D'autres tampons du calcium cytosolique ont été décrits dans le cœur, mais en faible concentration, comme la calrétinine [154] et la calbindine-D28K [155].

On retrouve aussi la troponine C qui ne fait pas partie de la famille des EF-hand mais qui joue un rôle très important dans la capture du calcium cytosolique et qui est un élément clé de la contraction [156].

5. Les autres organites

D'autres organites cellulaires possèdent des concentrations calciques supérieures à celle du cytoplasme et dont ils peuvent se servir pour leur fonctionnement, ainsi que pour la signalisation calcique cellulaire. Parmi ces organites on distingue l'appareil de Golgi contenant 3 protéines tampon calcique: CALNUC [157], Cab45 [158] et NEFA [159], les peroxysomes [160] et les endosomes [161,162]. Rares sont les études qui ont été faites sur ces

Tableau.1: Implication du calcium dans différentes pathologies et dysfonctionnements cardiaque

	Dysfonctionnement ou pathologie cardiaque associé(e)s
DHPR (LTCC)	Arrhymie [163] ; Syndrome de Cantù [164] ; Fibrillation atriale [165] ; Hypertrophie cardiaque [166] ; Ischémie-reperfusion [167] ; J wave syndrom [168]
NCX	Lésions d'ischémie-reperfusion Arrhymie [169] ; Syndrome de Andersen Tawil [170] ; Tachycardie ventriculaire polymorphique catécholaminergique (CPVT) [171] ; Hypertrophie [172] ; Insuffisance cardiaque [173] ; Ischémie [174]
TRP	Hypertrophie [175] ; Hypertension [176] ; Arrhymie [177] ; Insuffisance cardiaque [178] ; Ischémie reperfusion [179] ; Cardiomyopathie dystrophique [180]
PMCA	Syndrome du QT long [181] ; Hypertension [182] ; Hypertrophie [183]
VDAC	Ischémie-reperfusion [184]
MCU	Ischémie reperfusion [185]
NCX	Fibrillation ventriculaire [186]
mPTP	Ischémie reperfusion [187] ; Hypertrophie [188]
RYR	Arrhymie ventriculaire [189] ; Insuffisance cardiaque [190] ; Cardiomyopathie dystrophique [191] ; CPVT [192] ; Syndrome QT long [192]
IP₃R	Insuffisance cardiaque [193] ; Ischémie reperfusion [194] ; Hypertrophie [195]
SERCA	Insuffisance cardiaque [74] ; Ischémie reperfusion [196] ; Dysfonction microvasculaire coronaire [197]
ParV	Hypertrophie [198] ; Dysfonction diastolique [199]
Calretinin	Myxome cardiaque [154]
GRP78	Arrhymie [200] ; Insuffisance cardiaque [201] ; Hypertrophie [202] ; Ischémie reperfusion [203] ; Cardiomyopathie autoimmune [204] ; Cardiomyopathie alcoolique [205] ; Syndrome QT long [206] ; Cardiomyopathie diabétique [207]
GRP94	Fibrillation atriale [116] ; Ischémie reperfusion [208] ; Cardiomyopathie urémique [209] ; Myocardite virale [210] ; Hypertrophie [211]
Calnexin	Cardiomyopathie dilatée [212] ; Syndrome du QT long [213] ; Insuffisance cardiaque [214] ; Bloc atrio-ventriculaire 3ème degrés [215]
Calsequestrin	CPVT [216] ; Insuffisance cardiaque [217]

Sorcin	Cardiomyopathie diabétique [218] ; Insuffisance cardiaque [219]
HRC	Arrhythmie [220] ; Insuffisance cardiaque [221] ; Ischémie reperfusion [120] ; Hypertrophie [222]
Calreticulin	Hypertrophie [223] ; Cardiomyopathie dilatée [102] ; Ischémie reperfusion [224] ; Fibrillation atriale [225] ; Pathologie valvulaire [225]
S100	Insuffisance cardiaque [226] ; Ischémie reperfusion [146] ; Hypertrophie ventriculaire [227]
Calmodulin	Insuffisance cardiaque [228] ; Arrhythmie [229] ; Tachycardie ventriculaire [230]
CamKII	Cardiomyopathie autoimmune [204]; Ischémie reperfusion [231] ; Cardiomyopathie catécholaminergique [232] ; Arrhythmie [233] ; Insuffisance cardiaque [234] ; Hypertrophie [234]
Calpaïnes	Cardiomyopathie diabétique [235] ; Hypertrophie [236]

protéines dans le cœur.

6. Conclusion

Le bon fonctionnement cellulaire est dépendant, entre autre, de la fine régulation de l'homéostasie calcique. Un dysfonctionnement ou une modification de l'activité d'un des acteurs de cette homéostasie calcique pourrait s'avérer dangereux, voire létal. En effet, ils constituent tous des cibles intéressantes dans le cadre de différentes pathologies ou dysfonctionnement cardiaque (Tableau.1).

Dans la partie suivante nous allons développer les modifications physio-pathologiques se produisant au cours de l'ischémie/reperfusion, ainsi que le rôle joué par les différents acteurs de l'homéostasie calcique.

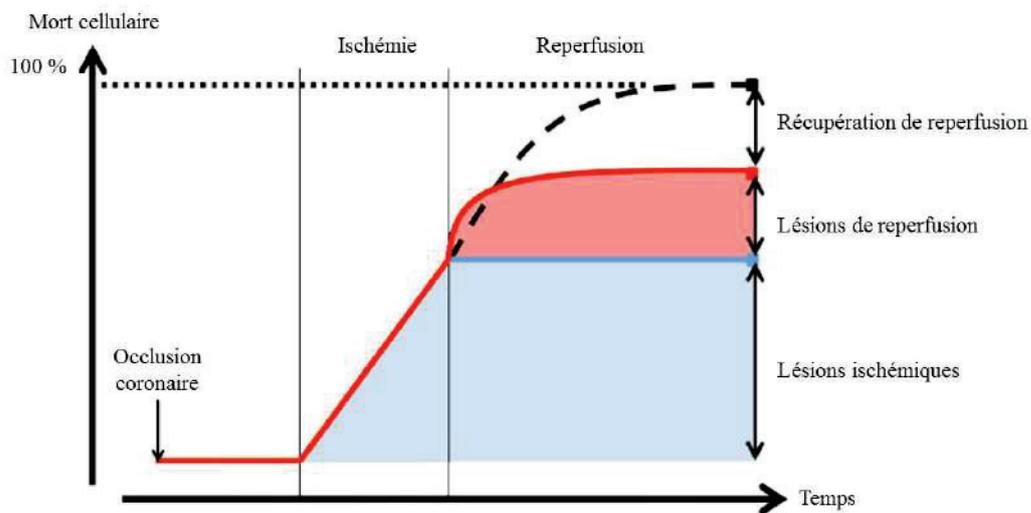


Figure.8: Mortalité cellulaire au cours de l'ischémie/reperfusion

Adapté de Hausenloy et Yellon 2013 [238]. Des dommages cellulaires irréversibles se produisent en fonction du temps pendant l'ischémie, et peuvent conduire à la mort cellulaire totale en absence de reperfusion (courbe en pointillés). Contrairement à ce que l'on pourrait penser en théorie (courbe bleue), la reperfusion n'abolit pas complètement le processus de mort cellulaire et engendre elle aussi des lésions (courbe rouge).

❁ CHAPITRE III: L'ISCHEMIE/REPREFUSION CARDIAQUE

Une des principales causes de mortalité liée au cœur est la maladie coronaire d'origine ischémique, autrement dit l'infarctus du myocarde. Celui-ci est défini par un fort déséquilibre entre l'apport et les besoins d'oxygène et de nutriments nécessaires au fonctionnement du muscle cardiaque, suite un à déficit de perfusion sanguine, causé par l'occlusion d'une grande partie du diamètre d'une artère coronaire alimentant une zone du cœur. Une longue ischémie (temps dépendant de l'espèce, ~45min chez la souris et ~6h chez l'humain) peut générer des lésions irréversibles dans le cœur qui s'étendent dans la partie irriguée par l'artère occluse, de l'endocarde jusqu'au l'épicarde [237], et les dégâts peuvent s'étendre sur tout le cœur, si l'ischémie n'est pas traitée, provoquant la mort.

Le traitement de l'ischémie se fait par le rétablissement du débit sanguin dans l'artère. Si la reperfusion survient à temps, les dommages d'une courte ischémie peuvent être réversibles. En revanche, dans le cas d'une ischémie maintenue ou d'une reperfusion tardive, les dommages deviennent irréversibles. Enfin, de manière contre-intuitive, la reperfusion peut engendrer plus de dégâts, c'est ce que l'on appelle lésions de reperfusion (Figure.8).

Dans cette partie je détaillerai le mécanisme de l'ischémie et de la reperfusion cardiaque ainsi que les stratégies de protection.

1. Lésions ischémiques

La privation prolongée de l'approvisionnement du myocarde en sang induit les lésions ischémiques. L'impact des dommages liés à l'ischémie du myocarde dépend de la durée de l'ischémie, l'aire myocardique à risque, et la présence de l'approvisionnement en sang dans la circulation collatérale du myocarde affecté.

Au niveau cellulaire, suite au manque d'oxygène et de nutriments, on remarque une réduction

de la phosphorylation oxydative, et par conséquent une réduction d'ATP. L'ATP joue un rôle crucial dans la survie cellulaire, surtout des cardiomyocytes où il intervient dans la contraction, l'homéostasie calcique, et dans l'activation des molécules chaperonnes. En effet, le cœur peut générer ~6 kg d'ATP par jour [239].

Pour compenser ce manque de production en ATP par la chaîne respiratoire, la cellule change son métabolisme oxydatif aérobie pour la glycolyse anaérobie. Ceci engendre une accumulation du pyruvate (un substrat du cycle aérobie de Krebs), pour être ensuite transformé en lactate (substrat du cycle anaérobie). Ce shift entraîne aussi l'accumulation des protons (produits durant la glycolyse) provoquant l'acidose intracellulaire. Pendant l'ischémie, le pH cellulaire peut atteindre 6,4 en quelques minutes. L'augmentation de l'acidose induit l'activation de NHE, pour rétablir le pH cellulaire en remplaçant les ions hydrogène par des ions sodium, ce qui se traduit par l'accumulation cellulaire en sodium. Ce manque d'ATP affecte aussi les canaux ioniques de la membrane cellulaire conduisant à l'accumulation de l'eau et du sodium, ainsi qu'à la perte de potassium après inhibition de l'activité ATP dépendante des canaux sodium potassium. Ceci se traduit par un gonflement cellulaire osmotique et un raccourcissement du potentiel d'action [240,241].

En outre, l'accumulation des métabolites d'acide gras, résultant de la lipolyse, conduit à une altération progressive de la structure et de la fonction de la membrane cellulaire [242].

Le NCX est l'un des plus importants mécanismes cellulaires pour éliminer le calcium accumulé dans le cytoplasme contre le sodium. Suite à la forte concentration de sodium intracellulaire, il agit dans le sens inverse, entraînant une augmentation de l'accumulation intracellulaire en calcium. Cette accumulation du calcium provenant du milieu extracellulaire à travers les canaux membranaires, ainsi que de la libération du calcium du réticulum, est considérée comme la cause principale de la transition de la lésion réversible en lésion

irréversible [243,244]. En absence d'ATP, les pompes SERCA et PMCA sont inhibées et la majorité du calcium cytoplasmique ne peut pas être exclu du cytoplasme, il est alors capté par les mitochondries. Le pompage mitochondrial du calcium conduit à une surcharge calcique dans la matrice mitochondriale, ce qui engendre une perte du potentiel de membrane conduisant à des dommages mitochondriaux [245].

De plus, l'augmentation du calcium cytosolique induit des dommages cellulaires par l'activation des phospholipases, des protéases et des calpaïnes calcium dépendantes, ce qui provoque un gonflement de la membrane, sa rupture, en plus de la contracture ischémique [246]. La contracture ischémique est la conséquence de la présence de calcium cytosolique et de l'absence d'ATP dans une cellule, ce qui se traduit par l'arrêt du cycle de détachement des ponts transversaux actine-myosine. Ceci peut conduire à des défauts du cytosquelette qui rendent les cardiomyocytes plus fragiles et sensibles aux dommages mécaniques [247].

En plus des perturbations de l'homéostasie ionique, les systèmes cellulaires sont submergés par une augmentation de la production de ROS pendant l'ischémie. Le stress oxydatif peut causer des dommages à tous les composants d'une cellule, y compris les lipides, les protéines et l'ADN, ce qui exacerbe le dysfonctionnement du myocarde et provoque à la fois des dommages irréversibles et réversibles. Les principales sources de production de radicaux libres au cours de l'ischémie comprennent la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, la xanthine oxydase et le système de la NADPH oxydase. Les ROS affectent directement les enzymes membranaires, l'oxydation lipidique ainsi que les pompes et les canaux de protéines impliqués dans la régulation du transport d'ions et qui peuvent provoquer un changement dans la perméabilité de la membrane [248]. Les ROS peuvent aussi entraîner un maintien calcique défectueux [249], et donc ajouter aux effets délétères de la déplétion en ATP sur le transport d'ions. Plus précisément, les radicaux libres peuvent affecter l'activité des SERCA et des

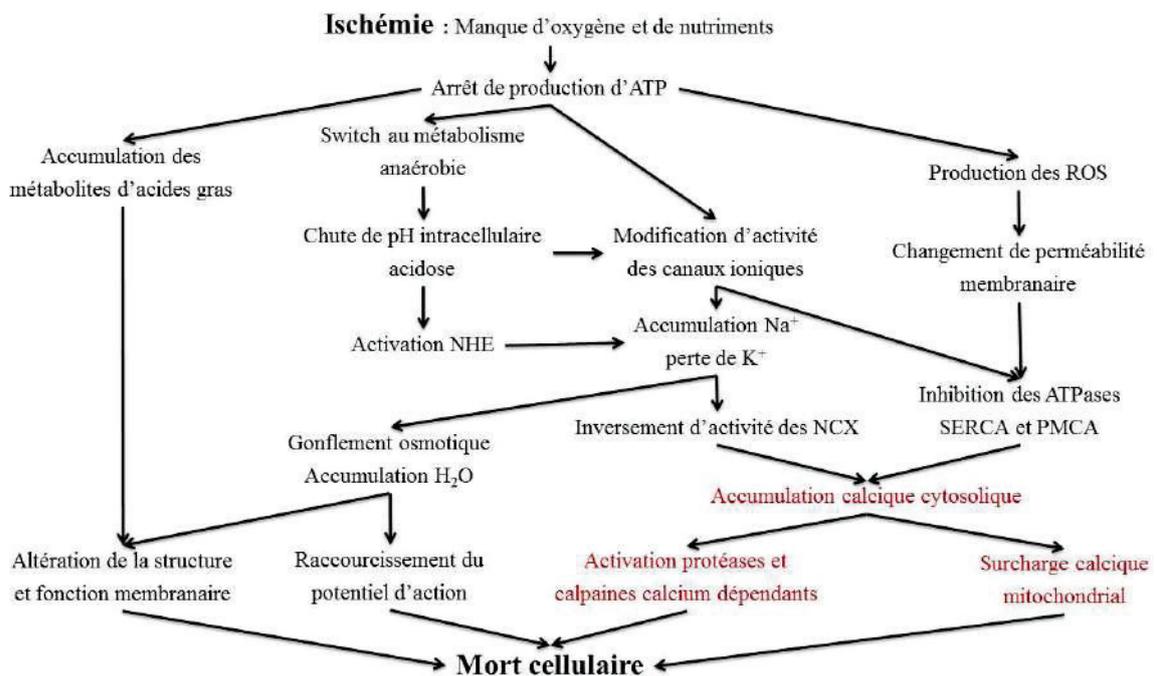


Figure.9: Lésions d'ischémie

Schéma résumant les différents changements intracellulaires induits par l'ischémie.

PMCA, réduisant ainsi le transport de calcium dans le RS ou hors de la cellule, et aggraver la surcharge calcique dans la cellule ischémique [250,251] (Figure.9).

2. Lésions de reperfusion

Pour éviter la mortalité cellulaire, les dégâts irréversibles de l'ischémie et limiter la taille de la zone infarctée, il faut recourir à la reperfusion. Cependant, la reperfusion, bien que cruciale pour la survie, va déclencher une cascade d'événements cellulaires, conduisant à d'autres dommages cellulaires et voire le décès [252]. Ce phénomène de lésion et de mort des cellules myocardiques, en raison de la restauration du flux sanguin dans un myocarde ischémié, est connu comme les lésions de reperfusion et ce sont ces lésions qui définissent la taille finale de l'infarctus.

Plusieurs dysfonctionnements cardiaques ont été décrits suite à la reperfusion: la sidération myocardique, l'arythmie, le phénomène de no-reflow et les lésions létales.

Du point de vue clinique, les arythmies de reperfusion ne représentent pas un problème important car leur incidence est très faible et elles peuvent être facilement traitées. De même pour la sidération myocardique qui n'est généralement pas un problème clinique majeur dans le contexte d'un infarctus du myocarde aigu, car elle disparaît spontanément et est très sensible aux agents inotropes. La sidération myocardique ne devient grave que si la partie affectée du myocarde est très étendue [253].

Le phénomène de no-reflow, dû à une réorganisation de la structure capillaire dans la zone ischémique ainsi qu'à la présence d'œdèmes et l'infiltration des cellules inflammatoires, est très probablement multifactoriel, et aucune utilisation d'un agent unique ne peut le prévenir ou le traiter, c'est pourquoi très peu d'études se sont penchées sur le phénomène [254,255].

Enfin, limiter les lésions de reperfusion létales reste la voie la plus intéressante afin d'atténuer

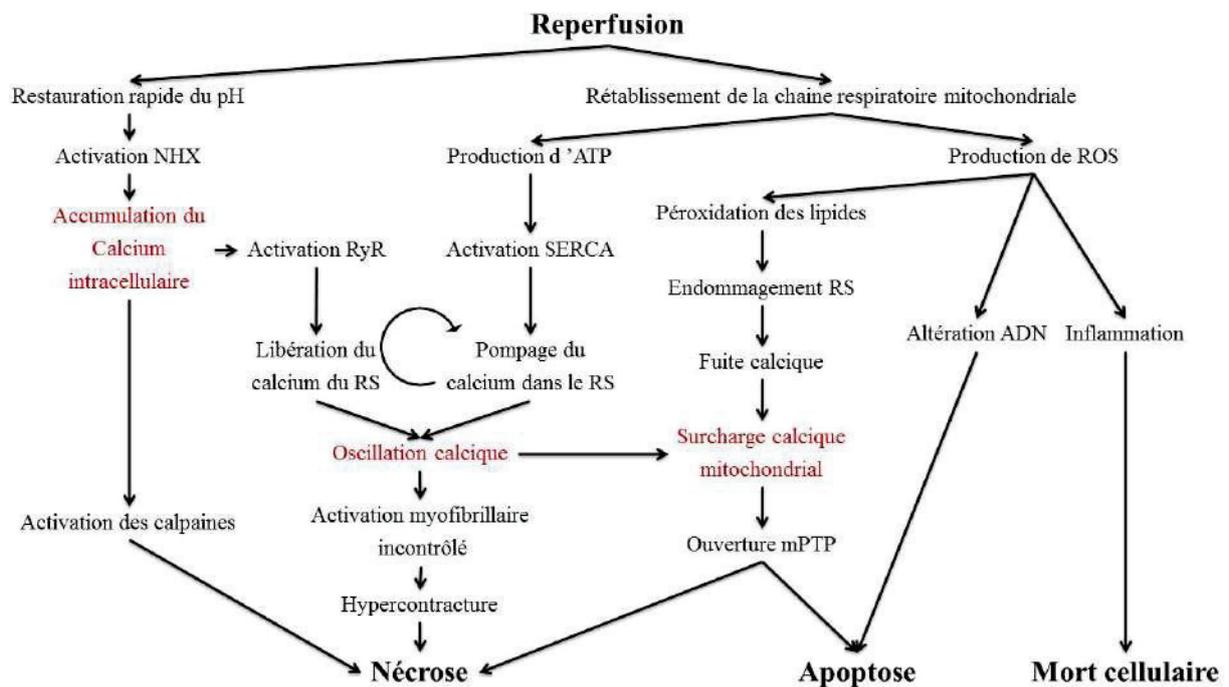


Figure.10: Lésions de reperfusion

Schéma résumant les différents changements intracellulaires induits par la reperfusion suite à une période d'ischémie.

les dégâts liés à la reperfusion. Les mécanismes cellulaires impliqués dans ces lésions ont été bien élucidés au cours des dernières années. La restauration du flux sanguin induit une restauration trop rapide du pH. Ceci provoque un enchaînement de réactions presque similaires à celui décrit pendant l'ischémie. En effet, une restauration brusque de pH est responsable d'une cytotoxicité cellulaire accrue [256]. Afin de contrôler le pH cellulaire, les canaux NHX vont être activés, conduisant à encore plus d'accumulation de sodium dans la cellule, ce qui provoque l'activation des NCX pour remplacer le sodium par le calcium [257]. Au cours de la reperfusion, les mitochondries répondent au retour de l'oxygène et reconstituent leurs réserves d'énergie qui ont été perdues lors de l'ischémie. Ceci induit une production importante de ROS à cause de la ré-oxygénation qui permet l'utilisation du succinate accumulé pendant l'ischémie [246]. Les niveaux élevés de ROS peuvent induire des dégâts cellulaires aux lipides, aux protéines et à l'ADN (acide désoxyribonucléique), pouvant provoquer l'apoptose, et endommager le RS conduisant à une fuite calcique. De plus, l'augmentation des ROS peut attirer les neutrophiles, résultant dans la signalisation des médiateurs inflammatoires. L'ensemble de ces mécanismes peut induire la mort des cardiomyocytes dans les derniers stades de reperfusion [187,258] (Figure.10).

3. La mort cellulaire pendant l'ischémie/reperfusion: importance du calcium

Le calcium joue un rôle important lors de la reperfusion. En effet, la revitalisation des transporteurs membranaires et réticulaires de calcium (PMCA et SERCA) par la reproduction d'ATP, ainsi que l'activité de NCX qui tente de réduire le taux du sodium intracellulaire en le remplaçant par le calcium, induisent une entrée brutale de calcium qui s'ajoute au calcium déjà accumulé lors de l'ischémie. Ceci provoque une activation myofibrillaire incontrôlée [187,259]. La réorganisation des protéines chaperonnes dans le RS, ainsi que le stress

réticulaire et les ROS affectant les pompes SERCA à travers la modulation du PLB, affecte le fonctionnement du RS. En fait, une fois le calcium pompé dans le RS, il est de nouveau libéré de façon rapide à cause de la grande quantité du calcium cytosolique activant RyR. Ceci nécessite l'utilisation excessive d'ATP par le RS sans vraiment atteindre l'homéostasie du calcium [187]. Ce phénomène cause les vagues calciques favorisant les arythmies, les hyper-contractions et la surcharge calcique mitochondriale.

Les niveaux de calcium cytosolique élevés prolongés peuvent causer des hyper-contractions qui peuvent se traduire par une compression de micro-vaisseaux à l'intérieur du myocarde, ce qui entraîne une perfusion réduite [247].

Les mitochondries elles aussi sont sensibles aux phénomènes produits pendant la reperfusion. Leur dysfonctionnement fait partie des lésions de reperfusion et joue un rôle crucial dans la signalisation de la mort cellulaire par nécrose et apoptose [246].

La voie principale de mort des cardiomyocytes pendant l'ischémie est la nécrose étant donné que l'apoptose est un événement dépendant de l'énergie et que l'ischémie résulte en un épuisement de l'ATP. Pendant la reperfusion, la mort cellulaire se produit principalement par la voie de nécrose avec une légère proportion d'apoptose dans les premiers stades. Une fois que les réserves d'énergie sont réapprovisionnées, la voie de l'apoptose devient dominante [246].

Un troisième mode de mort cellulaire existe, l'autophagie, et peut se produire lors de l'ischémie/reperfusion.

Bien que les mécanismes de ces trois types de mort cellulaire soient considérés être mutuellement exclusifs, dans la pratique, il existe un chevauchement important entre eux, et les cellules en souffrance de manière individuelle peuvent présenter des caractéristiques de plus d'un mécanisme de mort cellulaire au cours du temps.

A. La mort par apoptose

L'apoptose est décrite comme une voie de mort cellulaire programmée, entraînant principalement une diminution de la taille des cellules, la condensation et l'exclusion de la chromatine, le bourgeonnement et la rupture des membranes, sans provoquer de réaction inflammatoire.

Pendant l'ischémie/reperfusion, l'augmentation non physiologique des ROS libérés dans le tissu, entraînant une oxydation des protéines, des lipides et de l'ADN, la modification de l'homéostasie cellulaire pendant l'ischémie entraînant des altérations des concentrations ioniques au moment de la reperfusion, ainsi que l'implication du calcium, second messenger et médiateur apoptotique dans l'ischémie reperfusion et l'activation de certaines voies cellulaires activent la phase initiale de l'apoptose [260,261].

Dans ce processus, le cytochrome c est libéré de l'espace interne mitochondrial vers l'espace extra-mitochondrial, entraînant une série d'évènements pro-apoptotiques. La plupart de ces évènements sont liés à la perméabilisation des membranes et la perturbation de l'homéostasie cellulaire engendrées par les ROS.

i. Apoptose: calcium et mitochondrie

La voie apoptotique est dépendante de la mitochondrie et plus particulièrement de Bax (Bcl-2-associated X) ainsi que d'autres facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), régulateurs de la libération des protéines de la membrane interne de la mitochondrie. Pendant l'ischémie/reperfusion, une surcharge de calcium dans la mitochondrie, ainsi qu'une diminution du stock d'ATP associée à un découplage de la phosphorylation oxydative entraîne le dysfonctionnement mitochondrial, activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial mPTP. Ce phénomène entraîne la

translocation et la multimérisation de Bax [262], protéine cytosolique pro-apoptotique, vers la membrane externe mitochondriale. Bax initie alors un efflux de cytochrome c et de AIF (apoptosis inducing factor) lié à la dégradation nucléaire caspase-indépendante. Le cytochrome c dans le cytosol entraîne l'oligomérisation de Apaf-1 (apoptotic peptidase activating factor 1), protéine adaptatrice qui lie la pro-caspase 9.

Ensemble, Apaf-1, le cytochrome c et le dATP (dioxymadenosine triphosphate) résultant de la destruction de l'ADN, forment l'apoptosome, qui active la caspase 9, stimulant en conséquence les caspases 3, 6 et 7. En effet, il a été montré que l'activité de la caspase 3 augmente après l'ischémie/reperfusion [263]. De plus, la mitochondrie libère l'endonucléase G, une enzyme réparatrice de l'ADN qui participe à la fragmentation de l'ADN nucléaire pendant l'apoptose [264].

Une autre stimulation de l'apoptose peut se produire par la caspase 12 qui elle, active la caspase 9 et ensuite le reste de la voie des caspases. Ceci peut commencer soit par la translocation des calpaïnes du cytoplasme vers le RE pour cliver le domaine pro-caspase 12 suite à une accumulation calcique cytosolique, soit par la libération de la pro-caspase 12 après activation de TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) par la voie du stress du RE ou soit pas l'activation de caspase 7 par l'inflammation qui clive la pro-caspase 12 et induit la cascade de caspase [265].

En réponse aux lésions de l'ADN induites par AIF, le facteur suppresseur de tumeur p53 s'accumule et entraîne l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et/ou la mort cellulaire [263].

ii. Apoptose: calcium et RE

Des études ont montré qu'en condition de stress du RE, les membres anti-apoptotiques de la

famille Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-xL) diminuent la concentration de calcium du RE *via* une liaison directe à IP₃R permettant sa régulation [266,267] ou inactivent les pompes SERCA [268]. En parallèle, les membres pro-apoptotiques de Bcl-2 (BAX et BAK) transloquent à la membrane du RE et augmentent le calcium du RE en antagonisant Bcl-2 et Bcl-xL [267,269] ou facilitent le relargage du calcium du RE vers le cytoplasme, entraînant une augmentation de l'absorption du calcium par la mitochondrie [270]. Le lien entre la déplétion de calcium réticulaire, l'activation de l'apoptose et la famille Bcl-2 a été démontré par plusieurs groupes et fait le sujet de plusieurs études sur les maladies cardiovasculaires [271]. En effet, des groupes ont rapporté que l'élévation du calcium intracellulaire promeut la mort cellulaire par apoptose, induite par la déphosphorylation de BAD (Bcl-2 associated death promoter) dépendante de la calcineurine [272] ou par l'activation de cystéines-protéases-calpaïnes dépendantes du calcium, qui clivent certains membres de la famille Bcl-2 comme BID (BH3 interacting domain death agonist) et Bcl-xL [273]. D'autres études ont fait un lien direct entre l'homéostasie calcique du RE et l'apoptose de façon indépendante de la mitochondrie [274] ou l'apoptose induite par une privation en oxygène et glucose *via* l'activation de caspase 12 par la m-calpaïne [275].

B. La mort par nécrose

La nécrose se caractérise morphologiquement par un gonflement des cellules et de leurs organites suite à une entrée d'eau par hyper-osmolarité intracellulaire causée par la perte du métabolisme énergétique nécessaire au maintien de l'homéostasie ionique. La différence d'osmolarité induisant le flux d'eau dans la cellule provoque une augmentation de la pression intracellulaire. Ensemble, cette augmentation de pression associée à l'étirement du sarcolemme et à l'hyper-contraction, entraîne la destruction de la cellule par la rupture de la

membrane plasmique et la fuite du contenu cellulaire. Elle est directement liée à l'ischémie, c'est-à-dire à la privation des cellules en nutriments et en oxygène, et est accompagnée généralement par une réponse inflammatoire.

De manière générale, elle se traduit par une altération de l'ADN *via* une destruction des histones par des protéases et des nucléases. La libération par la cellule de facteurs cytosolique comme la LDH (lactate dehydrogenase), les troponines I et T et la créatine kinase sont un autre facteur caractéristique, qui entraîne une réaction inflammatoire. Contrairement à l'apoptose, la nécrose était considérée comme une forme accidentelle de mort cellulaire, jusqu'à ce que des facteurs génétiques et des processus régulant la mort cellulaire par nécrose soient découverts *in vivo*, la nécroptose [276,277]. Il a été montré qu'un stress cellulaire ou l'activation des récepteurs de mort mobilisent et activent un groupe de sérine/thréonine kinases appelées RIP (receptor interacting protein). RIP1 et 3 semblent agir en coordination comme médiateurs de la nécrose [278–280].

L'activation de RIP 1 et 3 entraîne une augmentation de la production des ROS soit *via* l'activation de NADPH oxydase [281] soit en entraînant une augmentation de l'oxydation mitochondriale [280]. Une des cibles potentielles de la nécrose médiée par RIP est le mPTP. Bien que le mPTP ait été décrit comme médiateur de l'apoptose, de récentes études génétiques ont suggéré que le mPTP serait majoritairement impliqué dans la nécrose [282,283].

Une autre voie de nécrose implique l'activation de l'enzyme de réparation de l'ADN, PARP1 (poly ADP ribose polymérase 1). Un stress provoqué par l'oxydation, par exemple, entraîne une stimulation de PARP1, qui active la cystéine protéase calpaïne en conséquence [284,285]. Cela stimule la libération de l'AIF de la mitochondrie, qui transloque vers le noyau où il dégrade l'ADN. Le lien entre les RIP kinases et le mPTP reste vague mais des indices

montrent que la mort induite par PARP1 pourrait être dépendante de RIP1 [286].

i. Nécrose: calcium et calpaïnes

Le calcium est impliqué dans le mécanisme de nécrose *via* la mitochondrie et le mPTP, mais également par son accumulation cytoplasmique. En effet, comme précédemment mentionné, les calpaïnes sont dépendantes du calcium. Une perturbation de l'homéostasie calcique durant l'ischémie-reperfusion entraîne une modification de l'activité des calpaïnes. Plus précisément, l'augmentation cytosolique du calcium durant la reperfusion entraîne une activation importante des calpaïnes qui vont ainsi dégrader la spectrine α et donc la nécrose [133].

C. La mort par autophagie

L'autophagie est le principal mécanisme cellulaire permettant à la cellule de se débarrasser d'organite défectueux ou d'agrégat protéique. C'est également un mécanisme de survie cellulaire, permettant en condition d'hypoxie, de dysfonctionnement mitochondrial ou d'infection, de produire des acides aminés et des acides gras afin de maintenir la fonction cellulaire. Toutefois, une autophagie incontrôlée entraîne la mort cellulaire et contribue aux lésions d'ischémie/reperfusion. Morphologiquement, l'autophagie commence avec l'expansion membranaire de l'organite entrant dans le processus [287–289]. La membrane enveloppe complètement l'organite et forme une vésicule appelée auto-phagosome, qui fusionne ensuite avec un lysosome afin de dégrader l'intérieur de la vésicule. L'autophagie est finement régulée par des voies spécifiques. La principale voie de contrôle est mTOR (mammalian target of rapamycin), qui inhibe l'autophagie. Toutefois, en condition de privation de nutriments ou de stress, la voie mTOR est inactivée. Cela active une kinase appelée Atg1 qui, avec Atg13 et Atg17 initie la formation du phagophore. La formation de ce

phagophore est aussi facilitée par un autre complexe composé de PI₃K de classe III appelées vps34, vps15 et beclin-1. Ce complexe peut recruter Atg12, Atg5 et Atg8 (appelé également LC3), essentiels pour l'élongation de la membrane et la mise en place de l'auto-phagosome. La fusion de l'auto-phagosome avec le lysosome est médiée par la GTPase Rab7 et la protéine membranaire du lysosome LAMP2 (lysosomal associated membrane protein).

Au cours de l'ischémie, l'autophagie peut également être induite par le stress du RE suite à l'accumulation des protéines mal conformées ou par l'augmentation du calcium intracellulaire par l'intermédiaire de la calpaïne impliquée dans le clivage de Atg5 [287–289].

D. Stress du RE

Parmi les fonctions du RE, la synthèse, la translocation et le repliement des protéines sont les plus importantes. Ceci est possible grâce à l'environnement oxydatif du RE, à l'expression importante des protéines chaperonnes et à la forte concentration calcique au sein du RE, nécessaire à l'activité de ses protéines chaperonnes. Les polypeptides nouvellement synthétisés se déplacent dans le RE à travers le TLC (translocon), où ils prendront leur structure tertiaire et quaternaire au niveau de la lumière réticulaire, ainsi que leur conformation fonctionnelle [290,291]. Les chaperonnes du réticulum se lient aux polypeptides nouvellement formés et jouent un rôle majeur dans l'homéostasie protéique, en supervisant la mise en place de la conformation des peptides, empêchant l'agrégation des protéines ou les mauvaises conformations. Elles sont également impliquées dans la translocation des protéines normalement conformées de la lumière du RE vers l'appareil de Golgi [292,293]. Ce processus s'apparente à un mécanisme de contrôle qualité du RE. Il a été montré qu'un déséquilibre entre le taux de protéines mal conformées et normalement conformées entraîne un stress du RE [294]. Ce phénomène peut être la conséquence de différents facteurs, tels que

la modification de l'homéostasie calcique, l'état redox de la cellule, la diminution de l'apport en glucose ou d'oxygène, l'altération de la glycosylation, l'exposition à des agents pharmacologiques, les mutations des protéines chaperonnes du RE ou de leur substrat, l'infection virale et l'altération du transport des protéines vers l'appareil de Golgi. La voie cellulaire UPR entre alors en jeu afin de rétablir l'homéostasie protéique et permet ainsi de limiter le stress du RE [294,295]. C'est une voie de signalisation cytoplasmique et nucléaire induite par le RE, menant à la surexpression des protéines chaperonne réticulaire, à l'arrêt de la synthèse protéique et l'activation de la dégradation.

Ce phénomène est commun à toute les cellules mammifères, dont les cardiomyocytes [296,297].

i. La voie UPR

En réponse au stress du RE, la voie UPR provoque des modifications au niveau de la traduction des protéines. L'inhibition de la traduction permet ainsi de réduire le flux de protéines nouvellement synthétisées dans le RE. A plus long terme, le taux de transcription de certains gènes peut même être réduit. En modifiant ces mécanismes cellulaires, la cellule peut alors répondre rapidement à des événements liés au stress du RE en quatre étapes:

- Une diminution de la traduction des protéines pour diminuer le taux de protéines mal formées.
- Activation de la transcription des gènes des protéines chaperonnes responsables du repliement et la correction de la formation des protéines.
- Activation de la dégradation des protéines par la voie ERAD pour rectifier l'accumulation des protéines mal formées.
- L'induction de l'apoptose pour se débarrasser des cellules défailantes et sécuriser le

reste de l'organisme.

Ces phénomènes nécessitent l'activation de trois protéines transmembranaires du RE, senseurs du stress réticulaire: PERK (protein kinase RNA (PKR)-like RE kinase), ATF6 (activating transcription factor-6) and IRE1 (inositol-requiring protein-1) [296,298]. Ces protéines forment ensemble avec GRP78, la chaperonne la plus importante du RE, la réponse primordiale du stress du RE.

En condition basale, PERK, IRE1 et ATF6 sont localisées dans la lumière du RE et associées à BiP/GRP78. Pendant le stress du RE, GRP78 se lie aux protéines mal conformées afin d'éviter leur agrégation, et libère les domaines luminaux de PERK, IRE1 et ATF6. En conséquence, ces senseurs activent leurs voies de signalisation en réponse aux différentes voies UPR. Néanmoins, PERK, ATF6 et IRE1 sont activées indépendamment dans les cellules subissant un stress du réticulum.

L'intérêt de la réponse UPR est d'essayer de rétablir l'état basal du taux de protéines mal formées dans le réticulum. En revanche, si le stress persiste, l'UPR peut induire l'autophagie et l'apoptose comme dernier recours pour résoudre le problème. Ceci peut amener à la défaillance cardiaque et la mort [296,299,300].

a) PERK

PERK est une protéine qui présente une double fonction enzymatique, sérine/thréonine kinase d'une part et endoribonucléase de l'autre. Une fois libérée de BiP/GRP78, PERK s'homodimérise spontanément, entraînant son autophosphorylation *via* sa propre activité kinase [301]. L'homodimère ainsi activé phosphoryle eIF2 (eukaryotic translation initiation factor 2) au niveau de la sérine 51 de la sous-unité α . Cette phosphorylation provoque l'inactivation d'eIF2 α et inhibe l'initiation de la traduction. Pendant cette période, seuls

quelques ARNm seront traduits, comme ATF4 grâce à sa structure possédant un autre site de traduction qui échappe à l'inhibition d'eIF2 α . De cette manière, la voie UPR empêche le transport des protéines nouvellement synthétisées vers le RE surchargé. Toutefois, l'activation de cette voie diminue la capacité de survie des cellules aux conditions provoquées par le stress du RE. En effet, ATF4 appartient à la famille de facteurs de transcription CREB (cAMP response-element binding), qui active la transcription des gènes visés par la voie UPR. L'activité d'ATF4 induit des signalisations menant à la survie cellulaire au début du stress du RE, en revanche, lors d'un stress prolongé, c'est la voie pro-apoptotique qu'elle va activer par l'intermédiaire de la protéine pro-apoptotique CHOP (C/EBP homologous protein) [302,303].

b) ATF6 α

Comme PERK, ATF6 α est une protéine maintenue sur la membrane du RE par son association avec GRP78. Lors d'un stress du RE, ATF6 α se libère de GRP78 et se déplace vers l'appareil de Golgi où elle fonctionnerait comme facteur de transcription [304]. ATF6 α subit ensuite deux clivages par les protéases S1P (site-1 protéase) et S2P, exprimées dans la lumière de l'appareil de Golgi. Le résultat de ces clivages est N-ATF6 α , une protéine contenant le domaine N-terminal d'ATF6 α . Cette dernière passe ensuite dans le noyau dans lequel elle joue un rôle de facteur de transcription appelé bZIP (basic leucine zipper) [305,306]. Dans le noyau, ATF6 active la transcription de plusieurs gènes cibles codant pour les chaperonnes du RE tel que GRP78, PDI (protein disulphide isomerase), P58^{IPK} une protéine membranaire de la famille des HSP40 (heat shock protein 40) et Grp94 ainsi que d'autres facteurs de transcription tels que CHOP et XBP1 (X-box binding protein 1) [294].

D'autre part, ATF6 α est une glycoprotéine qui interagit avec la CRT. Dans le cas du stress du RE médiée par une déplétion calcique réticulaire, une forme d'ATF α partiellement glycosylée

apparaît. Cette forme possède moins d'interaction avec la CRT et est plus rapidement déplacée vers le Golgi, résultant en une activation plus forte des cibles de N-ATF6 α [307].

L'inhibition de l'initiation de la transcription se produit environ 30min après l'exposition au stress du RE. Bien que le clivage d'ATF6 soit un processus rapide, cette partie de la voie UPR entre en jeu plus tard que la voie PERK. En effet, le temps nécessaire pour l'activation de la transcription par N-ATF6 est plus long étant donné que cela nécessite le déplacement vers le noyau et le clivage, alors que eIF2 α est un substrat direct de PERK [308].

A noter qu'il y a deux isoformes d'ATF6, ATF6 α avec une plus forte activité transcriptionnelle, contrairement à ATF6 β . Il semble y avoir une coopération des deux isoformes dans la régulation de l'amplitude et la durée de la réponse au stress [309].

c) IRE1

IRE1 est une sérine/thréonine kinase avec une activité endoribonucléase. Elle agit comme un senseur transmembranaire du RE qui active UPR afin de maintenir les fonctions du RE et de la cellule. Deux homologues d'IRE1 ont été identifiés: IRE1 α et IRE1 β [310,311]. IRE1 α est exprimée de manière ubiquitaire dans les cellules des mammifères, alors que IRE1 β est exprimée uniquement dans les cellules épithéliales de l'intestin [312]. La structure d'IRE1 est semblable à celle de PERK, leur domaine luminal est homologue et interchangeable, suggérant un mécanisme d'activation commun [313,314]. Après son détachement de GRP78 lors d'un stress du RE, IRE1 subit une homodimérisation spontanée et une auto-phosphorylation pour activer son activité kinase et endoribonucléase [301,314]. IRE1 ainsi activée inhibe la synthèse protéique en clivant, par son activité endoribonucléase, le 28S ARN, et excise un intron de 26 nucléotides de l'ARN messager de XBP1 (aussi activé par l'ATF6). Cette excision génère un variant tronqué de XBP1 appelé sXBP1 qui a un rôle de

facteur de transcription [315]. sXBP1 cible les chaperonnes du RE ainsi que p58^{IPK} [316].

ii. La mort cellulaire suite à un stress du RE

L'apoptose est un mécanisme essentiel pour la continuité et le développement des organismes, surtout pour le maintien de l'homéostasie tissulaire en permettant de se débarrasser des cellules défailtantes.

Les cardiomyocytes, comme les cellules nerveuses, ne possèdent pas un potentiel de prolifération. D'après une étude récente, leur capacité de régénération est de l'ordre 0,76% par an [317]. Ceci dit, un phénomène comme l'apoptose peut avoir de graves conséquences sur le tissu cardiaque, le cœur et l'organisme et même induire la mort.

Beaucoup de preuves démontrent que l'apoptose induite par le stress du RE est le facteur clé de la perte cellulaire dans la pathogenèse d'une série de pathologies cardiovasculaires telles que l'ischémie/reperfusion cardiaque [318].

a) Voies de mort induites par l'UPR

La voie UPR n'est pas suffisante pour protéger la cellule durant un stress du RE sévère ou prolongé. Cela peut conduire à une surexpression de plusieurs protéines qui, une fois passé un seuil, provoque la mort cellulaire par apoptose.

Durant un stress du RE prolongé, la transcription et l'expression de CHOP, normalement peu exprimée, sont augmentées, provoquées par l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α , entraînant l'arrêt du cycle cellulaire et / ou l'apoptose [302,319]. CHOP induit la formation de ROS délétères pour la cellule par un mécanisme qui reste encore inconnu [320]. De plus, CHOP régule l'expression d'un grand nombre de gènes, dont les gènes de la famille Bcl-2 [321,322] dont la voie a été précédemment détaillée. En plus de l'excision de l'ARNm de

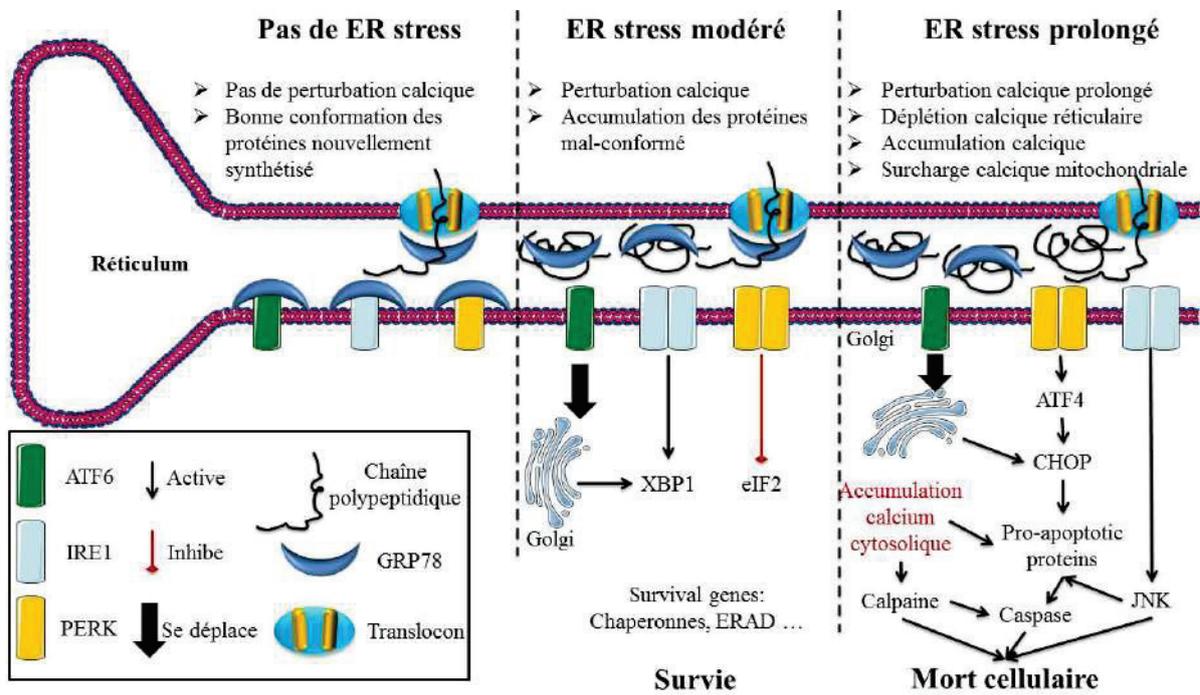


Figure.11: Stress du RE et signalisation cellulaire

Schéma représentatif de l'évolution de la réponse cellulaire face aux différentes étapes du stress du RE.

(Adapté de: www.servier.fr)

XBP1, la forme phosphorylée d'IRE1 recrute TRAF2 et ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) pour stimuler l'activation de la voie JNK jouant un rôle dans la survie cellulaire et l'apoptose. TRAF2 de son côté peut interagir avec la caspase 12 pour induire l'apoptose [323]. En effet, en condition de stress du RE, la caspase-12 est dimérisée et activée par son association à TRAF2, et peut ensuite contrôler l'expression de BAX, BAK et d'autres facteurs mitochondriaux pro-apoptotiques [323,324].

Il a aussi été montré que l'autophagie peut être directement activée par le stress du RE, suite à l'activation de la voie IRE1/JNK/p38. En effet, la protéine p38 a été identifiée comme une protéine en amont au cours de l'autophagie, qui agit en stabilisant une protéine critique liée à l'autophagie, l'Atg [325] (Figure.11).

b) Le calcium acteur principal dans l'UPR

De manière générale, la voie UPR est associée à une déplétion calcique du RE [326]. Le relargage de calcium du RE est associé à différentes pathologies telles que Alzheimer [327,328], Parkinson [329], les symptômes associés au prion [330], la démence associée au VIH [331], le diabète [332,333] et les maladies cardiovasculaires. L'implication du calcium comme second messenger a été largement démontrée dans un grand nombre de phénomènes physiopathologiques [334]. Inversement, le stress du RE induit également une déplétion chronique du calcium du RE qui, si elle est prolongée ou trop importante, entraîne la mort cellulaire [335]. Toutefois, l'implication précise du calcium dans ces phénomènes et si la déplétion du calcium du RE est une conséquence de l'accumulation de protéines mal conformées, n'ont pas encore été déterminées. Le rôle précis du calcium du RE dans l'initiation de la voie UPR n'est pas défini, ni si la dérégulation du calcium du RE est une cause ou une conséquence du stress du RE.

Dans les premières phases du stress du RE, les interactions RE/mitochondries augmentent et le réseau réticulaire se développe, provoquant un transfert plus important du calcium du RE à la mitochondrie, stimulant la phosphorylation oxydative mitochondriale et ainsi la production d'ATP [336]. Lors d'un stress réticulaire soutenu, le relargage massif de calcium par le RE et son absorption par la mitochondrie entraînent l'ouverture du mPTP, une dérégulation du relargage du calcium matriciel, une dépolarisation de la membrane mitochondriale, une importante diminution du métabolisme mitochondrial et pour finir l'apoptose [337]. Le processus d'apoptose est extrêmement complexe et sophistiqué, et implique une grande variété d'acteurs pour lesquels le calcium a un rôle de régulateur à tous les niveaux, depuis l'initiation jusqu'à la production des phagocytes.

Diminuer le calcium réticulaire réduit les transferts calciques RE/mitochondrie, et diminue ainsi la bioénergétique mitochondriale empêchant la surcharge calcique qui provoque la perméabilisation de la membrane externe, l'ouverture du mPTP et enfin la libération du cytochrome c dans le cytosol par VDAC, permettant la formation de l'apoptosome lors de la cascade des caspases [338,339].

Comme précédemment mentionné, le lien entre le calcium et le stress du RE n'est pas encore élucidé. En effet, le stress du RE peut être provoqué en traitant les cellules avec différents ionophores qui provoquent une déplétion calcique du RE, ou par des agents comme la thapsigargine qui inhibe l'activité de SERCA et provoque une déplétion calcique. La déplétion totale ou partielle du stock calcique du RE provoque un stress du RE, mais aussi l'accumulation de protéines mal conformées dans le RE [340]. Le stress du RE peut aussi être provoqué par l'altération de l'expression ou de l'activité de certaines protéines tampon calcique [341,342].

Les chaperonnes moléculaires constituent un système de contrôle de qualité des protéines

important, qui agissent comme un mécanisme de défense contre les altérations de la synthèse protéique. Elles sont régulées par le calcium et la concentration calcique du RE impacte donc directement les modifications post-traductionnelles [343,344]. Ainsi, une modification de l'homéostasie calcique elle-même provoque un stress du RE *via* ces chaperonnes et peut éventuellement impacter la survie de la cellule [345,346]. En plus de leur rôle de protéines tampon de calcium, elles peuvent aussi interagir avec différents canaux calciques et donc moduler l'homéostasie calcique cellulaire. Comme précédemment évoqué, un stress du RE prolongé, causé soit par une mauvaise conformation des protéines, une déplétion en calcium, une augmentation du calcium cytosolique ou une diminution de l'activité des chaperonnes, provoque l'apoptose *via* l'ouverture du mPTP [336,338,347].

c) Voie de mort médiée par le calcium

Pendant l'ischémie/reperfusion, la transition de perméabilité mitochondriale et les oscillations calciques ainsi que les hyper-contractions sont des voies de mort cellulaire étroitement liées. Ceci est en partie dû à la connexion physique étroite entre le RS et les mitochondries, permettant un échange préférentiel de calcium entre les deux organites. En effet, les oscillations calciques entraînées par le RS peuvent provoquer l'ouverture des mPTP. Ceci additionné au calcium accumulé dans le cytosol peut provoquer l'hyper-contraction des cardiomyocytes [348].

Le calcium est considéré comme un des seconds messagers les plus importants dans la cellule: il est indispensable à la régulation de nombreuses fonctions physiologiques cellulaires et est aussi impliqué dans les voies de mort apoptotique et nécrotique.

Plusieurs voies existent dans ces processus, parmi eux figurent les plus importants, la voie activant les protéines de la famille Bcl-2 (précédemment détaillée) et la voie de CHOP. Un

relargage de calcium prolongé par le RE active ERO1a (endoplasmic reticulum oxidase 1a), une cible de CHOP, entraînant l'amplification de la libération de calcium par le RE *via* l'activation d'IP₃R, provoquant une augmentation du calcium cytosolique *via* l'activation de CaMKII. CaMKII jouerait un rôle dans l'accélération de l'absorption du calcium par la mitochondrie, perturbant la perméabilité de la membrane externe mitochondriale par l'ouverture des mPTP et le relargage du cytochrome c [349–351].

iii. ER stress et ischémie/reperfusion

Après ischémie/reperfusion, le manque en oxygène et en nutriments, la formation des ROS et l'accumulation du calcium induisent l'expression des gènes liés à l'UPR. Ceci a été rapporté chez la souris et chez l'homme [318]. En effet, la diminution de l'apport en nutriments dans le cœur, surtout le glucose, induit l'activation des chaperonne régulées par le glucose, comme les GRP78 et GRP94. De plus, en raison du manque d'oxygène, il y a accumulation de protéines mal repliées étant donné l'importance de l'oxygène dans la formation des liaisons disulfure. Ces facteurs, additionnés à la déplétion réticulaire en calcium et son accumulation cytosolique, induisent l'activation du stress du RE par ces trois voies PERK, ATF6 et IRE1 [296].

Après une ischémie prolongée, une surexpression de GRP78, de caspase 3 et caspase 12, de CHOP et de JNK a été rapportée, ainsi qu'une perturbation de la fonction du RE par l'augmentation de l'expression de CRT, de la JNK et de la caspase 12, induisant une augmentation de l'apoptose [352].

Le facteur de transcription ATF6 est activé par l'ischémie mais inactivé lors de la reperfusion, ce qui suggère qu'il peut jouer un rôle dans l'induction des gènes en réponse au stress du RE pendant l'ischémie, qui pourrait avoir un effet de pré-conditionnement conduisant à la survie

cellulaire pendant la reperfusion [353].

ERO1 utilise l'oxygène pour produire l'énergie nécessaire à la formation de la liaison disulfure *via* la protéine chaperonne PDI (protéine disulfure isomérase). Le manque d'oxygène favorise la liaison entre ERO1 et CHOP dont l'expression est augmentée par l'activité de PERK, ce qui provoque la libération du calcium du RE et l'induction de l'apoptose [296].

Les deux principaux facteurs de transcription de l'UPR, XBP1 et ATF6, induisent la médiation des chaperonnes du RE, protégeant le cœur des lésions d'ischémie/reperfusion, tandis que l'activation de la branche PERK/ATF4/CHOP semble déclencher les signaux pro-apoptotiques [354].

4. Conclusion

Pour conclure ce chapitre, l'homéostasie ionique cellulaire est perturbée pendant l'ischémie et persiste après la reperfusion. Le calcium est un acteur majeur qui intervient dans les différents systèmes de récupération cellulaire ainsi que dans le déclenchement des voies de mort. Chacune de ces voies convergent vers un effecteur final, la mitochondrie, dont la défaillance est provoquée par la dérégulation calcique.

Dans le chapitre suivant nous allons développer les différentes stratégies de cardioprotection et les voies sous-jacentes découvertes jusqu'à présent.

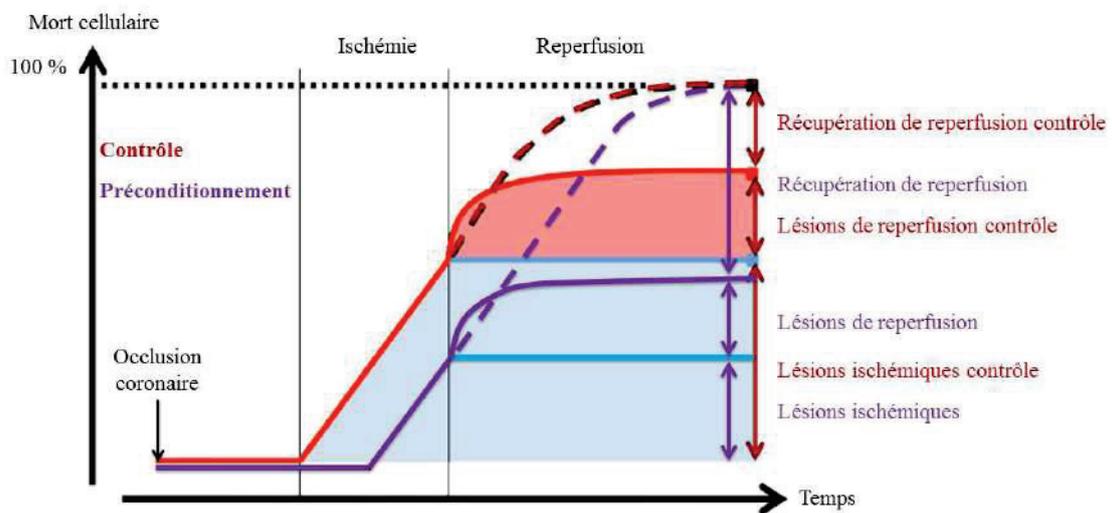


Figure.12: Le pré-conditionnement

Adaptée de Ferdinandy *et al.* 2007 [246]. Le pré-conditionnement a pour but de retarder la survenue des lésions en décalant vers la droite (courbe violette) la courbe de la cinétique d'apparition de la mort cellulaire (courbe rouge). Cela est possible en agissant en amont de l'ischémie.

CHAPITRE IV: LA CARDIOPROTECTION

1. Stratégies de cardioprotection

Au fil des années, la principale priorité dans la gestion de l'infarctus cardiaque a toujours été la restauration de l'afflux sanguin dans la zone ischémisée. Cela a conduit à la mise au point de thérapies et techniques interventionnelles plus avancées pour la restauration rapide de la reperfusion afin de limiter les lésions du myocarde liées à l'ischémie. Dans le milieu chirurgical, l'accent a été mis sur la réduction du temps d'ischémie du cœur avec une amélioration des techniques chirurgicales et des instruments pour limiter les lésions ischémiques. Cependant, un outil supplémentaire a été élaboré pour réduire d'avantage la taille de l'infarctus en limitant les lésions de reperfusion et annonçait l'ère de pré-conditionnement ischémique. De manière générale, dans le cas d'un infarctus du myocarde, la taille de la zone nécrosée dépend du temps d'ischémie et donc du temps de prise en charge du patient, ce qui entraîne inévitablement l'apparition de lésions irréversibles. Le seul moyen de limiter l'effet délétère de l'ischémie/reperfusion est de jouer sur les lésions de reperfusion qui aggravent les dégâts provoqués lors de l'ischémie. C'est ce qu'on nomme cardioprotection. La cardioprotection regroupe ainsi l'ensemble des méthodes visant à limiter les lésions de reperfusion et donc de protéger le cœur.

A. Pré-conditionnement

Le pré-conditionnement ischémique a été découvert en 1986 par Murry *et al.* qui a montré que la taille finale d'un infarctus cardiaque était dépendante de la zone à risque, du temps de l'ischémie et du réseau collatéral et qu'elle pouvait être réduite (Figure.12).

En effet, un bref épisode ischémique ralentissait le taux de consommation d'ATP lorsque le

cœur est soumis à des épisodes ultérieurs d'ischémie et le retardement de l'appauvrissement de l'ATP atténuerait le développement de la mort des cardiomyocytes [355]. C'est ce qu'on appelle le pré-conditionnement mécanique.

Cette cardioprotection résulte de la transduction du signal de protection. En effet, il a été montré que l'administration d'adénosine ou d'un agoniste sélectif du récepteur A1 a l'adénosine dans les artères coronaires pendant 5min avant l'occlusion d'une branche coronaire protégeait le cœur de manière identique à la protection apportée par un pré-conditionnement mécanique. A l'inverse, un antagoniste des récepteurs de l'adénosine bloquait la protection par pré-conditionnement, sans avoir d'effet sur un cœur non pré-conditionné [356]. Les récepteurs A1 sont des récepteurs de l'adénosine couplés à la protéine Gi. En effet, il a été montré que beaucoup de récepteurs couplés à Gi dans le cœur peuvent imiter l'effet du pré-conditionnement [357]. Quatre de ces récepteurs: adénosine, bradykinine, opioïde et sphingosine peuvent libérer des ligands pendant une brève occlusion coronaire et agissent de manière additive. Le blocage d'un seul sous-type de récepteur ne fait que diminuer l'effet de la protection plutôt que d'abolir le pré-conditionnement. Ces voies impliquent la PKC (protéine kinase C) et les canaux potassiques sensibles à l'ATP mitochondriaux [358,359].

La voie globale de signalisation n'a pas encore été complètement élucidée, mais les études montrent l'implication d'une voie importante appelée RISK (reperfusion injury salvage kinase) qui implique un groupe de kinases pro-survie, dont l'activation au moment de la reperfusion est cruciale pour le pré-conditionnement afin de protéger contre les lésions de reperfusion [360].

En réalité, cette voie est importante pour toutes les formes de conditionnement, c'est-à-dire le conditionnement pré, post, à distance et pharmacologique [361].

Une autre voie a aussi été identifiée, jouant un rôle plus important chez les grands

mammifères, la voie SAFE (salvage activating factor enhancement) qui est activée en parallèle de la voie RISK [362].

Une grande partie de la mort cellulaire dans le cœur est due à la formation des mPTP dans les membranes mitochondriales dans les premières minutes de reperfusion, et ces voies RISK et SAFE agissent en inhibant cette formation [363]. Ces deux voies de la cardioprotection feront l'objet d'un développement ultérieur (§: IV-D-i et ii).

Il a aussi été montré que la Cx43 (connexine 43), une des protéines formant les canaux de jonction entre les cardiomyocytes, se transloque à la membrane mitochondriale interne [364].

La Cx43 semble jouer un rôle dans le pompage du potassium, la régulation de la chaîne respiratoire et la production de ROS [365]. Bien que la participation de la Cx43 à la pathophysiologie de l'ischémie/reperfusion ne soit pas claire dans le détail, son absence dans les mitochondries empêche la génération de ROS pendant le pré-conditionnement ischémique et supprime la cardioprotection [366].

Bien que l'effet cardioprotecteur du pré-conditionnement ischémique ait été clairement établi, il n'est pas toujours transposable en clinique humaine. Dans le cas de transport d'organe, le pré-conditionnement ischémique serait très utile étant donné que l'organe isolé subit une ischémie dont les dégâts s'accroissent en fonction du temps entre l'isolation de l'organe et sa greffe chez le receveur. Au contraire dans le cas d'un infarctus cardiaque qui impliquerait une intervention en amont de l'obstruction coronaire, l'effet d'un pré-conditionnement serait limité. Cependant, si la voie de protection peut être activée rapidement par un médicament administré à la reperfusion (le post-conditionnement pharmacologique), cela peut limiter les dégâts et la formation et l'ouverture des mPTP et protéger le cœur contre les lésions de reperfusion. Etant donné qu'une grande partie de la voie de transduction du signal du conditionnement est maintenant connue, il a été possible d'identifier des agents efficaces pour

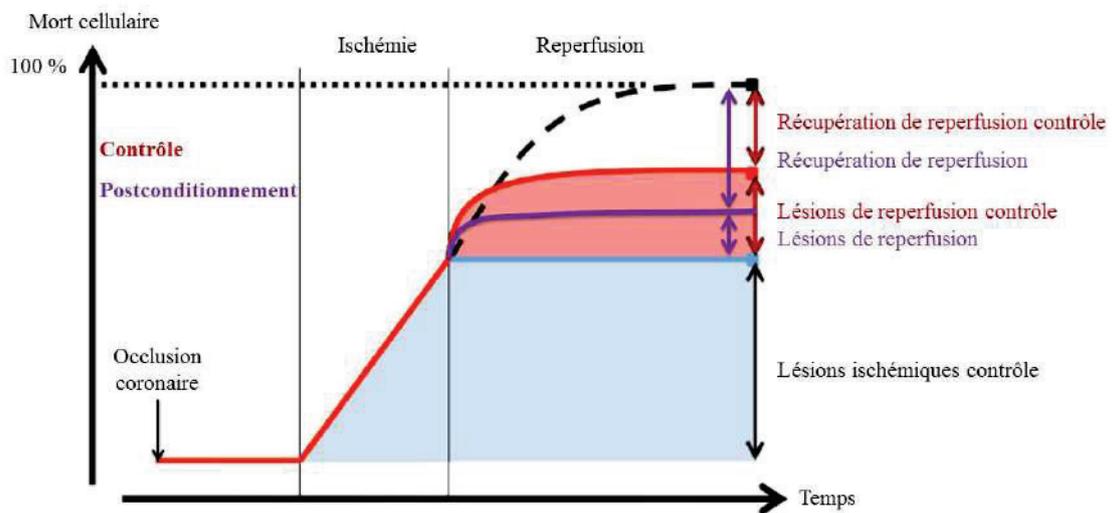


Figure.13: Le post-conditionnement

Le post-conditionnement ischémique permet de limiter les dommages survenant à la reperfusion suite à une ischémie prolongée. Ceci en diminuant la mortalité cellulaire induite par la reperfusion (courbe violette) vs. (courbe rouge).

Le post-conditionnement doit être appliqué après l'ischémie, dès les premières minutes de la reperfusion. Adaptée de Ovize *et al.* 2010 [369].

induire un post-conditionnement pharmacologique [367].

B. Post-conditionnement

Le concept de post-conditionnement ischémique repose sur la limitation de la surface du tissu destiné à mourir après le début de la reperfusion et ceci en diminuant les lésions de reperfusion (Figure.13). Cela a été rendu possible grâce à une modification des techniques de reperfusion, ainsi que par l'utilisation de molécules ciblant les voies connues de la cardioprotection.

Le principe est d'utiliser des durées de cycle de reperfusion/ré-occlusion courtes avant la reperfusion totale de la zone infarctée. Ceci a permis de réduire la taille de l'infarctus, le dysfonctionnement endothélial de l'artère coronaire, l'œdème dans la zone à risque et l'apoptose [368].

Les résultats des premiers essais de post-conditionnement étaient négatifs en raison des durées excessivement longues des cycles d'ischémie/reperfusion et du fait de l'application d'un seul cycle plutôt que des cycles multiples. D'autres études ont montré aussi que si la manœuvre avait été retardée de 60 secondes il n'y aurait pas eu d'effet cardioprotecteur du post-conditionnement, ce qui confirme que l'intervention pour éviter les dommages de la reperfusion devait être mise en place au moment, voire même avant le début de la reperfusion [370–372].

Les mécanismes par lesquels ces réactions physiologiques à la reperfusion sont atténuées incluent l'inhibition de l'ouverture du mPTP, le retardement du rétablissement brusque du pH cellulaire (qui contribue également à l'ouverture des mPTP), la réduction de l'accumulation calcique intracellulaire et intra-mitochondriale, la réduction des dommages induits par les ROS, l'atténuation du dysfonctionnement endothélial, la réduction de l'activation des cellules

pro-inflammatoires ainsi que l'activation des kinases de survie de la voie RISK [368,373–375].

Sur le plan tissulaire ceci se traduit par une réduction de l'apoptose, de l'œdème intersticiel et intracellulaire, des arythmies et de la réponse pro-inflammatoire.

Contrairement au pré-conditionnement, le post-conditionnement dans l'application clinique n'est pas limité par l'imprévisibilité des infarctus aigu du myocarde ce qui fait de lui un meilleur choix de technique de cardioprotection.

C. Conditionnement ischémique à distance (remote conditioning)

Les mécanismes de pré et post-conditionnement restent valables même quand on agit à distance du cœur, c'est le conditionnement à distance. Ce dernier reste un phénomène intrigant. Il s'agit de brèves périodes d'ischémie appliquées dans un tissu éloigné du cœur mais pouvant rendre le cœur résistant aux lésions d'ischémie/reperfusion et réduire la taille de l'infarctus du myocarde.

Le conditionnement à distance peut être appliqué en pré et en post, et les mécanismes moléculaires mis en jeu sont, sans aucun doute, complexes et restent incomplètement résolus [367,376–378]. Cela induit une réponse neuro-humorale qui, à son tour, induit une cascade d'effets en aval.

La conséquence de tout stimulus neuronal, local ou non, du membre ou des ganglions cardiaques, est la libération des substances cardio-protectrices dialysables dans le sang [379]. Il s'agit de la chimiokine SDF-1 α [380], de la ribonucléase-1 [381], des leukotriènes [382] et du micro-RNA 144 [383].

Le mécanisme exact par lequel ces effecteurs sont libérés, et leur importance relative restent à déterminer. Pourtant, l'effet ultime au niveau des cardiomyocytes est l'inhibition de

l'ouverture des mPTP et l'induction d'une réponse kinase protectrice semblable à celle observée avec le pré-conditionnement local et le post-conditionnement [384].

Contrairement au pré-conditionnement local et au post-conditionnement, le conditionnement à distance semble avoir des effets supplémentaires qui modifient les voies impliquées dans les réponses aiguës et chroniques des lésions d'ischémie/reperfusion et peuvent contribuer à ses avantages. Parmi ces voies on trouve notamment l'amélioration de la fonction endothéliale vasculaire, la diminution de l'agrégation plaquettaire ainsi qu'un effet anti-inflammatoire significatif se manifestant par une diminution de l'adhérence des neutrophiles, par une infiltration réduite des cellules inflammatoires, une réduction de l'inflammation locale et une réduction du remodelage dans les semaines après l'infarctus [377,381,385,386].

D. Les voies de la cardioprotection

Il est maintenant bien établi que le conditionnement ischémique protège le cœur contre les lésions d'ischémie/reperfusion par l'activation des voies de transduction du signal au début de la reperfusion. Ces cascades de signalisation servent de médiateur au signal cardioprotecteur induit par le conditionnement ischémique du sarcolemme aux mitochondries et incluent, entre autres, les voies RISK et les voies SAFE (Figure.14).

i. La voie RISK

La voie RISK, décrite pour la première fois par Schulman D. *et al.* en 2002, est composée des kinases pro-survie, Akt (protein kinase B) activée par la voie PI₃K (phosphatidyl inositol 3 kinase) et Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 et 2) mais également de manière moins connue par p42/p44 membre de la famille MAPK (mitogen activated protein kinases), dont l'activation au début de la reperfusion réduit la taille de l'infarctus [387].

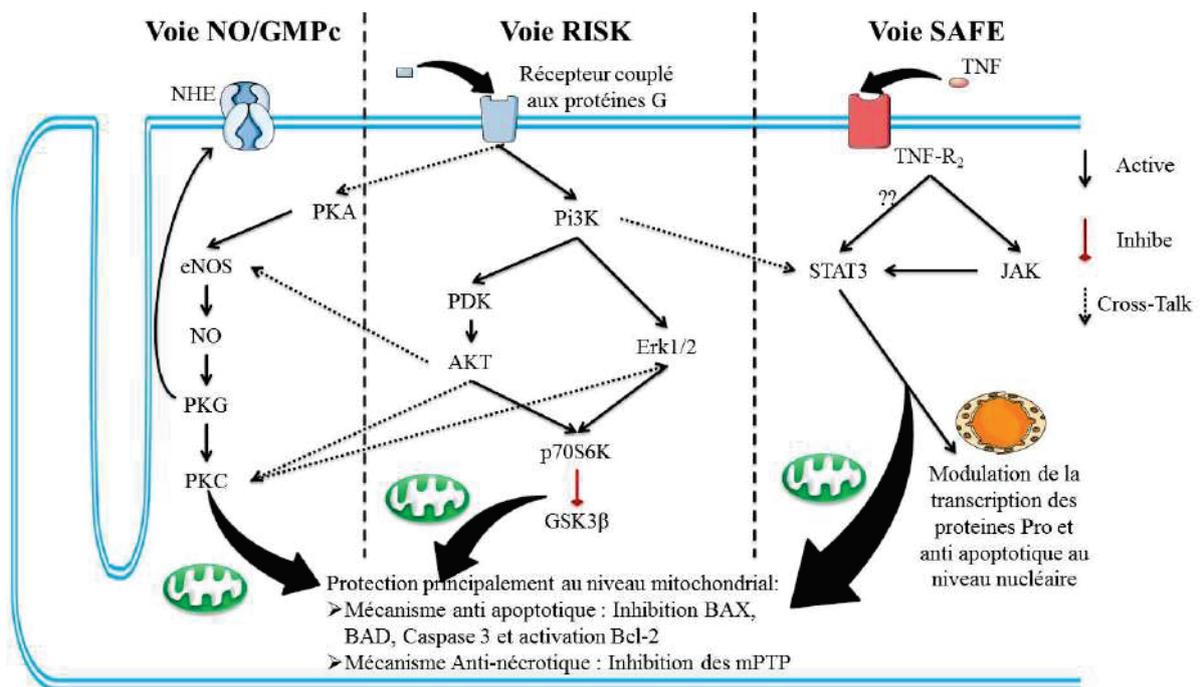


Figure.14: Voies de la cardioprotection

Schéma résumant les voies de signalisation connues de la cardioprotection: NO/GMPc, RISK et SAFE.

Après stimulation des récepteurs A1 couplés aux protéines Gi, l'activation de la voie PI₃K par l'intermédiaire de PIP₃ (phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate) active Akt, p70S6K (ribosomal protein S6 kinase), PKC et eNOS (endothelial nitric oxide synthase).

- La voie la plus connue de cardioprotection passe par l'action d'Akt sur GSK3 β . En effet, Akt phosphoryle GSK3 β et inhibe son action sur ses cibles mitochondriales, surtout VDAC et ANT. Ceci aurait comme effet l'inhibition de l'ouverture des mPTP [388].
- Akt peut agir en phosphorylant eNOS, entraînant la production de NO (nitric oxide), indispensable à l'activité des canaux potassium ATP-dépendent de la mitochondrie. L'ouverture de ces canaux par le NO se fait par l'intermédiaire de la PKG (protein kinase G) et la PKC ϵ [389].
- Erk1/2 peut être activée directement en même temps que Akt ainsi que par PKC ϵ et joue surtout un rôle pendant la reperfusion en inhibant l'ouverture de mPTP par des mécanisme encore inconnus [390]. Ceci montre un cross-talk entre les composantes Akt et Erk1/2 de la voie RISK afin d'assurer une protection maximale contre les lésions de reperfusion myocardique [390]
- JNK (c-Jun amino-terminal kinase) et p38, d'autres membres de la famille MAPK, semblent jouer également un rôle dans la cardioprotection. Activées par des signaux de stress, elles peuvent intervenir au moment de l'ischémie ainsi qu'au moment de la reperfusion, mais leur rôle reste encore peu connu [391].

Le mode d'action de la voie RISK n'est pas bien établi mais il semble agir par un mécanisme anti-apoptotique *via* l'inhibition de l'activité des protéines pro-apoptotiques BAX et BAD, l'activation de Bcl-2 anti-apoptotique et l'inhibition de la caspase 3. Un mécanisme anti-nécrotique existe aussi *via* l'inhibition des mPTP, ceci semble être possible par l'action de

GSK3 β , des canaux potassium ATP-dépendant suite à l'activation des PKC ϵ , de l'inhibition de la translocation de BAX dans la mitochondrie et de l'amélioration du flux calcique au niveau du RS [373,387,389,392]. Un rôle de RISK a également été proposé dans l'inhibition de l'autophagie suite à l'activation de la voie Akt [393].

Un grand nombre d'études expérimentales ont lié l'activation de la voie RISK à la cardioprotection induite par une diversité d'agents pharmacologiques, y compris des facteurs de croissance, des cytokines et d'autres agents comme la metformine et les statines [360,394]. La plupart des études expérimentales impliquant la voie RISK en tant que voie cardioprotectrice ont été réalisées chez les rongeurs. Les résultats ont montré que la voie RISK était impliquée dans tous les systèmes de conditionnement ischémique, suggérant qu'elle peut être une voie commune pour la cardioprotection. Toutefois, des études récentes suggèrent que la voie RISK ne semble pas être la voie induite par le post-conditionnement et le pré-conditionnement ischémique à distance sur des modèles de gros animaux. Ceci suggère des différences espèce-dépendantes dans les voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection [395,396].

ii. La voie SAFE

La voie SAFE a été découverte quelques années après la voie RISK par Lecour *et al.* [397] qui ont proposé l'implication du TNF α dans l'induction d'une nouvelle voie de survie, sans l'intervention des kinases pro-survie impliquées dans la voie RISK. En effet, le TNF α administré au début de la reperfusion du myocarde recruterait une cascade de signalisation alternative en se liant au récepteur TNF de type 2 et en activant JAK (janus kinase) et STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) *via* des mécanismes encore peu clairs mais impliquant la sphingosine kinase, et qui induisent la transcription de protéines impliquées

dans la cardioprotection [362,397–399].

La liaison du TNF α à son récepteur de type 2 induit la phosphorylation des JAK adjacentes qui à leur tour activent STAT. Les JAK sont des tyrosines kinases couplées à des récepteurs membranaires jouant un rôle majeur dans la transduction du signal vers le noyau, alors que les STAT font partie de la famille des protéines transcriptionnelles.

Parmi les STAT activées, il y a STAT3, dont le rôle dans la cardioprotection semble être indépendant de son effet transcriptionnel, bien que son activation cible la transcription des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 Bcl-xl, des facteurs pro-apoptotiques BAD, ainsi que la Cx43.

STAT3 a également été identifié dans les mitochondries, où elle module la respiration mitochondriale et cible les mPTP [400,401]. Le TNF α lui-même peut également cibler directement la fonction mitochondriale [402].

iii. Cross-talk entre RISK et SAFE

Plusieurs études ont montré que les voies RISK et SAFE interagissent, et que l'inhibition ou l'activation d'un facteur d'une voie nécessite l'activation de l'autre voie afin d'obtenir un effet cardioprotecteur. Gross *et al.* ont montré que l'activation de STAT3 dépendait de l'activité de PI₃K et que l'inhibition de la voie JAK/STAT3 inhibait la phosphorylation de l'Akt [403].

Les deux voies de signalisation RISK et SAFE convergent vers les mitochondries où elles semblent combiner leur effet cardioprotecteur en inhibant l'ouverture du mPTP. L'effet du ciblage des deux voies RISK et SAFE n'a pas été testé directement dans le cas des infarctus myocardique aigu, bien que des agents pharmacologiques tels que le peptide natriurétique auriculaire, l'érythropoïétine et les statines, qui sont connus pour activer des composants de

ces deux cascades de signalisation ont été étudiés dans un contexte clinique avec des résultats mitigés. D'autres études sont nécessaires pour déterminer si l'utilisation d'une thérapie combinée pour cibler simultanément les voies RISK, SAFE et autres est une stratégie cardioprotectrice plus efficace que la focalisation sur une seule cascade de signalisation [404].

iv. La voie NO/GMPc

Un grand nombre de preuves expérimentales indiquent que l'accumulation de GMPc (cyclic guanosine 3',5'-monophosphate) est une cible pharmacologique pour atténuer les lésions d'ischémie/reperfusion. Le GMPc est généré à partir du GTP (cytosolic purine nucleotide guanosine triphosphate) par deux enzymes distinctes, la sGC (soluble guanylyl cyclase) activée par NO et CO (carbon monoxide) et les NPR (natriuretic peptide receptor) [405]. De nombreuses études suggèrent que l'activation ou l'amélioration de la voie du GMPc, directement ou indirectement par génération de NO endogène indépendamment de PI₃K/Akt peut induire des effets cardioprotecteurs en limitant l'infarctus du myocarde que ça soit en pré-conditionnement ou en post-conditionnement. Cette activation étant possible par l'administration avant, pendant l'ischémie, ou spécifiquement au début de la reperfusion des substrats d'oxyde nitrique, des peptides natriurétiques, des inhibiteurs de la phosphodiesterase et d'autres médicaments et médiateurs tels que les inhibiteurs de la co-A réductase (statines), les inhibiteurs de la Rho-kinase et l'adrénomédulline [406].

Parmi les mécanismes putatifs de protection, figurent la régulation de PKG, de l'homéostasie calcique par la modification des mécanismes d'absorption du calcium du réticulum sarcoplasmique, l'ouverture de canaux potassium ATP-dépendent et le recrutement de la protéine anti-apoptotique bcl-2 pendant l'ischémie/reperfusion.

En effet, les ROS générées par la reperfusion provoquent une oxydation de l'oxyde nitrique

synthase (NOS) et une réduction de la signalisation de NO/GMPc/PKG. La PKG module la phosphorylation du PLB, l'absorption réticulaire du calcium et les oscillations calciques [407]. Les interactions avec les autres cascades de kinase ne sont pas claires à l'heure actuelle. L'activation de PI₃K/Akt entraîne l'activation d'eNOS et la génération de NO. Ceci peut induire l'activation subséquente de PKG par élévation de sGC et GMPc. La génération de ROS en conséquence de la stimulation de PKG peut ensuite affecter les canaux potassium ATP-dépendent mitochondriaux et conduire à l'activation de kinases distales potentiellement impliquées dans la voie RISK. Ce que ces kinases distales sont et comment elles sont impliquées dans limitation de la lésion cellulaire, soit pendant l'ischémie ou la reperfusion, est encore inconnu [406].

L'accumulation intracellulaire de GMPc et l'activation de la PKG sont associées à l'atténuation des pathologies associées aux lésions d'ischémie/reperfusion, notamment à la réduction de la taille d'infarctus. La grande majorité des études avec des modulateurs pharmacologiques de GMPc indiquent que le GMPc intracellulaire est un médiateur protecteur. La PKG, activée par le GMPc élevé, semble être le candidat le plus susceptible d'effectuer les actions cardioprotectrices médiées par le GMPc, mais des preuves directes impliquant la PKG comme une kinase de survie sont limitées à l'heure actuelle. Les défis liés à l'amélioration de ces connaissances au point où elles pourront être transposées en clinique restent importants. Cependant, avec tant d'agents expérimentaux, la signalisation par GMPc promet un développement thérapeutique [407,408].

E. Conditionnement et études pharmacologiques

L'exploitation des voies de signalisation sous-jacentes de l'ischémie/reperfusion a permis d'identifier une grande variété de cibles thérapeutiques pour la cardioprotection

Tableau.2: Récentes études cliniques de cardioprotection par approche pharmacologique

Cible	Molécule utilisée	Nom de l'étude	Type
Récepteurs β1 adrénergique	Metoprolol [409]	METOCARD-CNIC	Phase III
	Metoprolol [410]	EARLY-BAMI	Phase III
	Antagoniste β 1 adrénergique [411,412]	THEAHAT	
	Metoprolol [413]	COMMIT	
mPTP	Cyclosporine A [414]	CIRCUS	Phase III
	Cyclosporine A [415]	CYCLE	Phase II
	TRO40303 [416]	MITOCARE	Phase II
NHE	Cariporide [417]	GUARDIAN	Phase III
	Eniporide [418]	ESCAMI	Phase II
Voie NO/GMPc	GIK (Glucose-Insuline-Potassium) [419]	IMMEDIATE	
	NO [420]	NIAMI	
	Atorvastatine [421,422]	NAPLES II, ARMYDA-ACS	
ROS	MTP-131 [423]	EMBRACE STEMI	Phase IIa
Voie RISK	Delcasertib [424]	DELTA-MI	
	Delcasertib [425]	PROTECT-AMI	
	Potassium canrenoate [426]	MINIMISE	
	Sévoflurane [427]		

pharmacologique. Dans cette section, nous examinons certaines des thérapies pharmacologiques les plus récentes qui ont été étudiées dans le cadre clinique (Tableau.2).

i. Les antagonistes β 1 adrénergique

L'utilisation d'antagonistes β 1 adrénergiques a montré une réduction significative de la taille d'infarctus sur un modèle de gros animal, lors d'une injection intraveineuse avant la reperfusion [428,429]. L'étude clinique de phase III METOCARD-CNIC [409] réalisée en simple-aveugle, randomisée sans contrôle placebo a mis en évidence que l'injection de metoprolol en intraveineuse avant la reperfusion permet de diminuer la taille d'infarctus ainsi qu'améliorer la fraction d'éjection. D'autres études cliniques EARLY-BAMI [410], THEAHAT [411,412], COMMIT [413] se sont appuyées sur les résultats contradictoires obtenus en pré-clinique sur les antagonistes β 1 adrénergiques [430–433], et les résultats mitigés obtenus dans ces différentes études reflètent la disparité des résultats pré-cliniques mais aussi la variabilité des protocoles cliniques.

ii. Les mPTP

Des données expérimentales [434–436] et cliniques suggèrent que la Cyclosporin A pourrait atténuer les lésions de reperfusion et diminuer la taille d'infarctus en inhibant la cyclophilin D, composant majeur du mPTP. L'étude CIRCUS [414] de phase III a été réalisée en double-aveugle, randomisée et multicentrique avec contrôle placebo. L'injection de CsA (cyclosporin A) 2.5mg/kg avant la reperfusion n'a pas permis de diminuer le risque de mortalité, l'insuffisance cardiaque ou le remodelage du ventricule gauche. L'étude CYCLE [415] de phase II a également testé l'effet de la CsA dans les mêmes conditions que CIRCUS et a obtenu les mêmes résultats négatifs.

Les stratégies mitochondriales sont nombreuses et l'utilisation du TRO40303 qui lie le TSPO (translocator protein) inhibe l'ouverture du mPTP en diminuant la production de ROS, et réduit la taille d'infarctus chez le petit animal [437]. L'étude clinique MITOCARE n'a pas pu démontrer l'efficacité de cet agent pharmacologique à réduire la taille d'infarctus en clinique humaine [416].

iii. Les NHE

Certaines études cliniques se sont basées sur l'inhibition de l'échangeur NHE [438,439] afin de limiter l'accumulation de sodium et de calcium dans le myocyte ischémié pour prévenir la progression des cellules ischémiées vers des cellules nécrotiques. L'étude GUARDIAN [417] multi-centrique, randomisée en double-aveugle a utilisé trois dosages (20, 80 ou 120 mg) de cariporide (inhibiteur de NHE) en phase II et III combinées, se basant sur les résultats prometteurs obtenus dans l'étude pilote [440], ainsi que l'étude ESCAMI [418] de phase II qui a utilisé l'injection d'eniporide à différentes doses dans la même optique que l'étude GUARDIAN, ont échoué à démontrer un effet bénéfique des inhibiteurs de NHE sur la taille d'infarctus.

iv. La voie NO/GMPc

Une autre voie pharmacologique étudiée afin de limiter la taille d'infarctus est la voie NO/GMPc, testée dans l'étude IMMEDIATE [419]. L'activation de cette voie réduirait la taille d'infarctus après ischémie-reperfusion [441]. L'étude a montré que l'administration de GIK (Glucose-Insuline-Potassium) réduirait la taille d'infarctus chez une partie des patients souffrant d'infarctus du myocarde avec ST élevé (STEMI).

Certaines stratégies de cardioprotection se basent sur le NO (oxide nitrique), connu pour être

un médiateur important dans différentes formes de conditionnements [442]. Bien que des études expérimentales ont montré que l'injection intraveineuse de NO à la reperfusion avait un effet cardioprotecteur [443], l'étude CESAR n'a pas réussi à démontrer cet effet dans une étude multi-centrique sur petit et gros animal [444]. Deux études cliniques ont obtenus des résultats négatifs sur l'injection de NO en intraveineuse (NIAMI) [420] ou en intra-coronaire [445].

v. Les ROS

L'atténuation de la production de ROS par la mitochondrie et l'optimisation de la dépense énergétique mitochondriale est une autre voie possible de cardioprotection. Le MTP-131 remplit cette fonction en ciblant les cardiolipines de la membrane interne mitochondriale. Les études expérimentales sur petit et gros animaux ont montré que le MTP-131 administré au moment de la reperfusion permettait de réduire la taille d'infarctus et de prévenir le remodelage délétère du ventricule gauche après un infarctus du myocarde [446]. Toutefois, l'étude clinique EMBRACE STEMI n'a pas permis de valider ce mécanisme en clinique humaine [423].

vi. La Voie RISK

PKC a été identifiée comme médiateur cytosolique dans le pré-conditionnement ischémique. Le rôle de l'isoforme PKC- δ est soumis à débat, avec des études montrant que son inhibition était cardioprotectrice [447], alors que d'autres études ont découvert que PKC- δ serait un médiateur du pré-conditionnement ischémique et de la cardioprotection par les opioïdes [448]. Une première étude clinique DELTA-MI suggérait que l'injection intra-coronaire de delcasertib, inhibiteur de PKC, serait cardioprotecteur [424]. Toutefois, dans l'étude suivante

PROTECT-AMI, le delcasertib n'a pas eu l'effet escompté sur la taille d'infarctus [425].

Le rôle de l'adénosine en tant que médiateur de la cardioprotection a été bien établi [442] dans la voie RISK. Les études expérimentales montrent que l'adénosine administrée avant l'ischémie permet de diminuer la taille d'infarctus. Toutefois, son effet lors d'une administration au moment de la reperfusion reste contentieux [449,450]. De manière peu surprenante, les études cliniques se basant sur l'injection d'adénosine au moment de la reperfusion associée au post-conditionnement mécanique se sont avérées peu concluantes [426].

Les anesthésiques ont également un rôle cardioprotecteur *via* l'activation de la voie RISK. En effet, de nombreuses études ont montré un effet protecteur des anesthésiques halogénés en pré-conditionnement [451,452]. Leur effet a également été montré à la reperfusion, puisque l'administration de sevoflurane, desflurane ou isoflurane dans les 15 premières minutes de la reperfusion entraîne une réduction de la taille d'infarctus chez le lapin [453,454]. Les résultats obtenus en clinique humaine restent variables avec un effet peu significatif des anesthésiques volatiles sur la taille d'infarctus [427].

vii. Les statines

En plus de leur effet diminuant les lipides, les statines auraient également pour effet d'améliorer la fonction endothéliale, de réduire le stress oxydant. Les statines auraient un rôle cardioprotecteur *via* le NO. L'étude NAPLES II a en effet montré que l'injection d'atorvastatine permettait de réduire l'incidence de l'infarctus du myocarde [421]. Ce même résultat a été reporté dans l'étude ARMYDA-ACS [422].

F. Limites de la cardioprotection

Les patients à risque d'ischémie/reperfusion présentent souvent des comorbidités incluant le vieillissement, l'hyperlipidémie, l'hypertension artérielle et le diabète ainsi que leurs traitements associés, qui modifient en grande partie la réponse du cœur ischémique aux thérapies cardioprotectrices. La découverte et la validation des cibles ont été réalisées et continuent d'être effectuées chez des animaux jeunes et en bonne santé dans la grande majorité des études. Jusqu'à présent, l'étendue des investigations expérimentales de la cardioprotection dans les modèles représentant ces comorbidités est très limitée. Cependant, l'ignorance de la manière dont ces maladies modifient les voies de signalisation cardioprotectrices chez l'homme, peut constituer un obstacle majeur à la transposition thérapeutique des études scientifiques de base.

Bien que de nombreux efforts aient été déployés pour transposer la cardioprotection en pratique clinique, cela n'a pas été couronné de succès car aucun médicament n'est encore commercialisé et aucune intervention thérapeutique n'est disponible dans la pratique clinique courante pouvant protéger le cœur après l'infarctus cardiaque [404,455].

Les mécanismes putatifs de la cardioprotection explorés au cours des trois dernières décennies ont jusqu'à présent conduit à des cibles de médicaments potentiels qui n'étaient pas suffisamment robustes pour leur usage pharmacologique, car les essais cliniques ciblant ces patients ne présentaient, en grande partie, aucune efficacité.

Il y a deux grands problèmes de transposition clinique à surmonter à l'avenir:

- La découverte et la validation de la cible en tenant compte des facteurs confondants connus de cardioprotection.
- Une meilleure conception des études de développement clinique, avec au moins les principales comorbidités connues et leurs principales classes de traitements pharmacologiques devrait être utilisée pour valider la cible potentielle de médicament

avant d'entrer dans les essais cliniques.

Par conséquent, étant donné que le ciblage d'une voie unique pour protéger tous les patients n'est évidemment pas une approche qui peut mener au succès, une approche multi-omique, incluant transcriptomique, protéomique et métabolomique suivie d'une analyse des réseaux biologiques des systèmes, pourrait fournir de nouvelles cibles.

G. Le stress réticulaire, une nouvelle cible de cardioprotection

L'ER est l'organite principal responsable du pliage, des modifications post-traductionnelles et du transport de protéines sécrétoires. Il est aussi capable de maintenir l'homéostasie cellulaire. Ce processus est majoritairement régulé par des chaperonnes moléculaires qui peuvent initier plusieurs processus cellulaires, y compris l'apoptose et l'autophagie.

Le stress du RE est une condition qui est accélérée par l'accumulation de protéines mal repliées après une perturbation d'homéostasie cellulaire en raison de divers phénomènes physiologiques et pathologiques, tels que la privation de nutriments, la glycosylation altérée, l'appauvrissement du RE ou la surcharge cytosolique en calcium, le stress oxydatif, les lésions de l'ADN et les perturbations énergétiques.

La plupart de ces phénomènes peuvent intervenir dans le cas des maladies cardiovasculaire [456], dans le diabète [457], l'hypertension, l'obésité, le vieillissement [458], le cancer [459] l'Alzheimer et beaucoup d'autres pathologies [460].

L'intervention du stress du RE dans cette large gamme de pathologies peut faire de ce mécanisme une cible intéressante pour la cardioprotection [461].

Des études récentes montrent que le pré-conditionnement ischémique diminue le taux de stress réticulaire ainsi que l'apoptose après ischémie/reperfusion [271,354]. Plusieurs études ont été menées pour valider que le stress du RE pouvait être une cible de cardioprotection.

- L'activation de l'ATF6 *in vivo* dans le cœur résulte en une meilleure récupération fonctionnelle après l'ischémie/reperfusion avec une expression augmentée des chaperonnes GRP78 et GRP94 et une réduction de l'apoptose et de la nécrose. En revanche son inhibition réduit la fonction cardiaque et augmente le taux de mortalité. Il a été aussi montré que l'ATF6 activée induisait l'expression du gène Derlin3, qui code pour un composant important du mécanisme ERAD. La surexpression de Derlin3 améliore l'ERAD et protège les cardiomyocytes de la mort cellulaire induite par l'ischémie [462].
- La surexpression de GRP78 et GRP94 induit une réduction de la nécrose causée par la surcharge calcique pendant l'ischémie *via* la voie d'XBP1 et ATF6 [208,309,318].
- La surexpression de PDI réduit la taille de l'infarctus avec une réduction importante de l'apoptose et de la nécrose [463].
- L'inhibition de l'AMPK (AMP-activated protein kinase), qui joue un rôle dans le métabolisme énergétique, inhibe l'augmentation de CHOP et le clivage de caspase 12 induits par l'hypoxie [464]. L'AMPK est associée à des maladies cardiovasculaires, au diabète, à l'obésité et peut induire l'activation du stress du RE [465].
- L'inhibition de PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2, dont l'expression est augmentée avec le stress du RE, conduit à l'inhibition de l'apoptose et à l'amélioration de fonctions cardiaque [466].
- Les récepteurs VDR (vitamin D receptor) et LXR (liver-X-receptors) font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires connus pour être des cibles majeures dans la découverte de médicaments, et leurs modulateurs régulent le stress réticulaire afin de limiter les maladies cardiovasculaires et protéger contre les lésions d'ischémie/reperfusion. L'activation de ces deux récepteurs conduit à une réduction de

l'apoptose induite par le stress du RE à travers l'inhibition de l'expression de caspase 12 et CHOP, résultant en une réduction de l'infarctus du myocarde et une amélioration de la fonction contractile après l'ischémie/reperfusion [467,468].

- Apelin13 est un ligand endogène du récepteur de l'angiotensine de type 1, un récepteur couplé à la protéine G. Apelin13 a été identifiée comme une cible thérapeutique potentielle pour les lésions d'ischémie/reperfusion par les voies Akt/GSK3 β . L'action de l'apelin13 passe par l'inhibition de l'initiation de l'apoptose dépendante du stress du RE par les voies PI₃K/Akt, AMPK et Erk [469].
- La CsA, comme précédemment mentionné, joue un rôle très important dans l'inhibition de l'ouverture des mPTP *via* son action sur la cyclophilin D. L'effet protecteur de l'inhibition de la cyclophilin D au cours de l'ischémie/reperfusion peut ne pas être dû uniquement à l'inhibition directe de l'ouverture des mPTP, mais pourrait également impliquer l'induction d'un stress réticulaire modéré par limitation du transfert de calcium du RE à la mitochondrie pendant le reperfusion [470,471].
- Le metoprolol et le propranolol, deux inhibiteurs majeurs du récepteur β -adrénergique, suppriment l'apoptose médiée par le stress du RE en diminuant l'expression des chaperonnes GRP78, XBP1 et CaMKII ainsi que l'apoptose liée au stress du RE par la réduction de CHOP. Le metoprolol agit aussi en normalisant le taux de calcium et en diminuant l'expression de p-eIF2 α . Ainsi, le mécanisme sous-jacent des effets thérapeutiques des antagonistes des récepteurs β -adrénergique sur le myocarde pourrait passer par le stress du RE [472,473].

2. Rôle de GRP78 et du translocon dans l'induction du stress réticulaire

Comme précédemment évoqué, GRP78 est un modulateur/capteur situé au centre du stress du

RE. GRP78 est impliquée dans la détection d'une accumulation de protéines mal repliées dans le RE et en conjonction avec les trois protéines transmembranaire (ATF6, IRE1 et PERK) est responsable de l'UPR. Son expression est augmentée dans la plupart des pathologies cardiaques, surtout en ischémie/reperfusion, en raison de l'activation du stress du RE [111].

Dans la lumière du RE, GRP78 présente sur la partie luminale du translocon, est capable d'inhiber l'apoptose induite par la fuite calcique à travers le pore du translocon. En effet, GRP78, en plus de son rôle dans le mécanisme de translocation des protéines, tant pour la liaison aux protéines dépliées que pour le maintien et la prévention de leur mauvais pliage, joue surtout un rôle dans la fermeture du canal Sec61 pour maintenir la barrière de perméabilité au calcium du RE avant et après translocation [474]. Il a été montré que lors du stress du RE, la surexpression de GRP78 maintient le repliement des protéines et réduit également la perméabilité du translocon au calcium, contribuant par la suite à un équilibre entre la survie cellulaire et l'apoptose pendant le stress du RE [475].

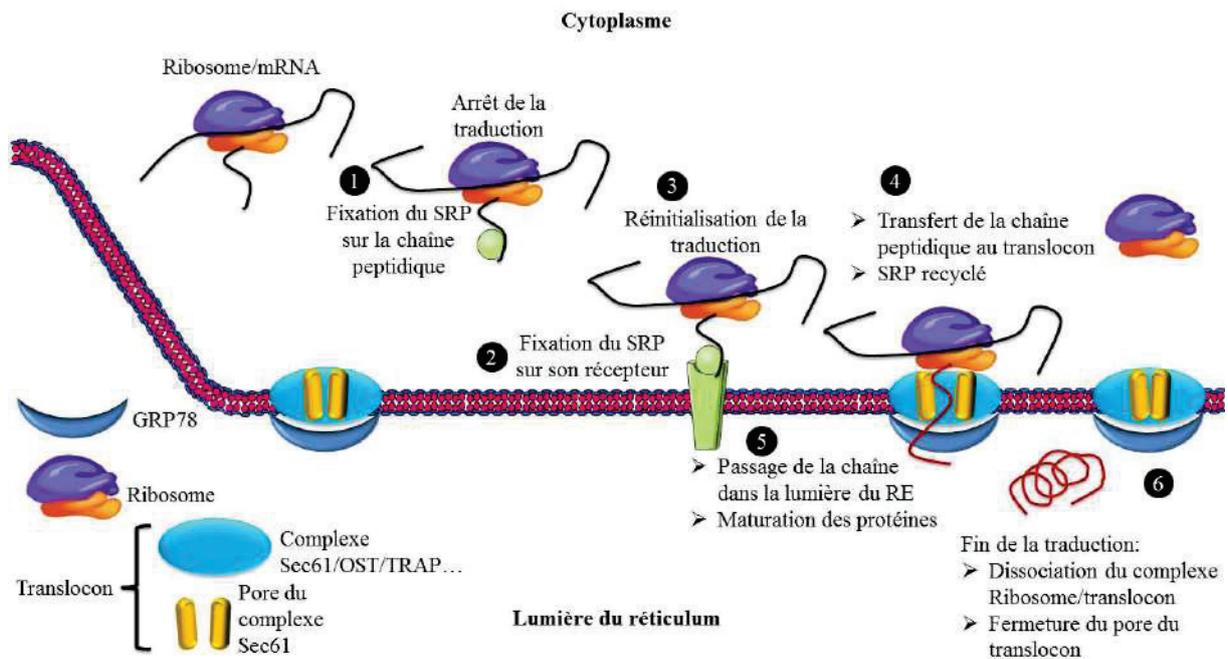


Figure.15: Translocon et synthèse protéique

Représentation de la dynamique de fonctionnement du translocon dans la synthèse protéique au sein du RE. Dans le cytoplasme, le complexe Ribosome/ARNm initie la traduction. Le SRP (Signal Recognition Peptide) fixe la chaîne naissante de la protéine et se fixe ensuite à son récepteur sur la membrane du RE. Le complexe Ribosome/ARNm est ainsi transféré au niveau du TLC, et le SRP est relargué dans le cytoplasme où il sera recyclé. La chaîne polypeptidique naissante passe à travers le pore de Sec61 afin de transloquer dans la lumière du RE. Les protéines accessoires (TRAP, TRAM, OST, SPC et Sec63) participent au transfert de la protéine dans la lumière du RE ainsi qu'à la maturation de la protéine. A la fin de la traduction, le ribosome se détache du complexe du TLC et entraîne la fermeture du pore de Sec61.

CHAPITRE V: TRANSLOCON

1. Fonction

Dans les cellules eucaryotes, certaines protéines doivent être transloquées ou insérées dans la membrane du RE. Les précurseurs de ces protéines sont caractérisés par une séquence N-terminale hydrophobe ou une hélice transmembranaire de 20 à 30 acides aminés [476]. Lors de la mise en place du tunnel de sortie du ribosome pendant la traduction, les protéines hydrophobes se lient au SRP (signal recognition particle), un complexe RNA-protéine universellement conservé abondant dans le cytosol [477]. L'association du SRP à la chaîne protéique naissante du ribosome lui permet de cibler la membrane du RE où elle lie son récepteur au niveau du translocon. Une fois la chaîne des polypeptides est transféré au translocon, le SRP est relâché dans le cytosol [478].

Le transport des protéines en parallèle de leur traduction, l'insertion à la membrane et la maturation *via* le translocon nécessite une action coordonnée de différents cofacteurs et enzymes. Le cœur fonctionnel du translocon chez les mammifères est formé par la protéine Sec61, universellement conservée, formant un canal permettant le passage des protéines à travers le RE ou leur insertion dans la membrane du réticulum. Cette fonction de base est complémentée par des composants accessoires du translocon, qui sont physiquement associés à Sec61 [477–479]. Ces composants accessoires SPC (signal peptidase complex), OST (oligosaccharyl-transférase), TRAM (translocating chain-associated membrane protein) et TRAP (translocon-associated protein complex) assistent le passage des protéines à travers le canal formé par Sec61 où elles permettent la maturation des chaînes naissantes par des modifications covalentes et leur fonction type chaperonne. Ils ne sont pas totalement conservés dans le règne vivant et varient également au sein des eucaryotes.

La chaperonne Sec63 [475,480–482] et REj1 [483,484] s'associent au translocon et recrutent

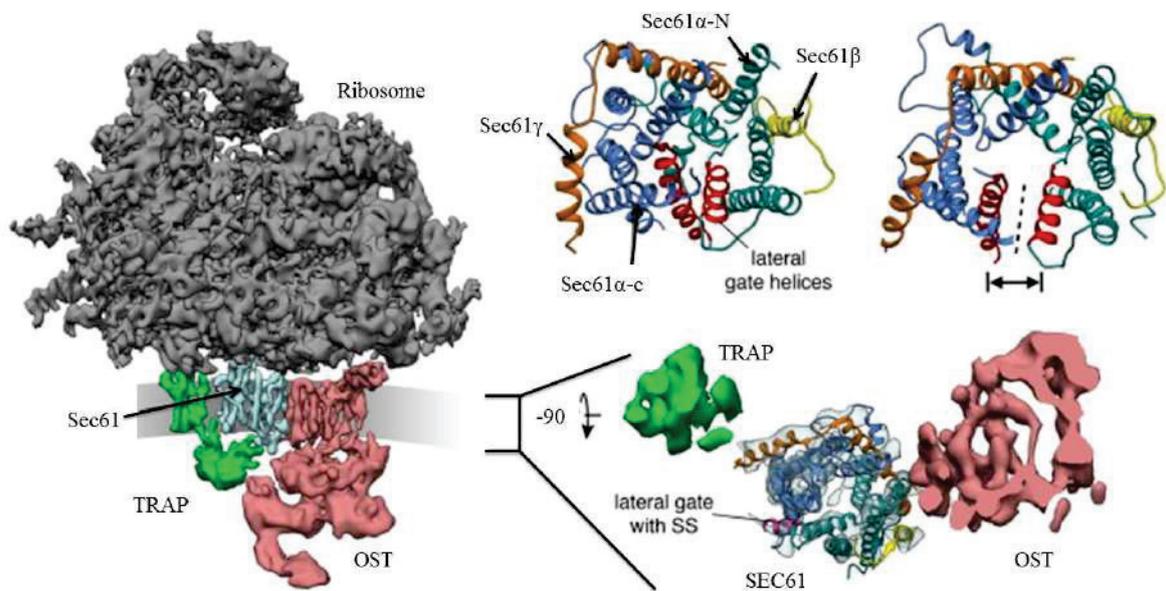


Figure.16: Architecture du translocon

Vue d'ensemble de la structure et de l'architecture du ribosome lié au translocon chez le mammifère. A) Analyse tomographique de densité du ribosome (gris) et des composants du TLC, Sec61 (bleu clair), TRAP (vert) et OST (rouge). B) Modèle atomique du complexe Sec61 fermé, vu depuis le cytosol. (Extrémités N et C term de Sec61 : vert et bleu respectivement, Sec61β : jaune, Sec61γ : orange, hélices latérales de Sec61α : rouge). C) Modèle atomique de Sec61 ouvert, vu du cytosol. D) Agrandissement de la partie transmembranaire du TLC, vu du cytosol avec la membrane du RE dans le plan de la feuille. Un modèle atomique de Sec61 a été ajouté. La position d'une séquence signal (SS) a été indiquée en rose. Adaptée de Pfeffer *et al.* 2016 [24].

la chaperonne GRP78 au niveau du complexe Sec61 et des polypeptides en synthèse, soutenant Sec61 dans son rôle de canal et le transport des protéines naissantes à travers la membrane. La calnexin, chaperonne lectine-like du RE, permet la maturation et l'oligomérisation des glycoprotéines sécrétaires et de la membrane, et pourrait s'associer avec le cœur du translocon, du moins transitoirement ou d'une manière spécifique au substrat [485–487] (Figure.15).

2. Architecture du translocon

La nature transitoire des nombreuses interactions au niveau du translocon ont rendu difficile la détermination de sa structure. Même dans le cas du cœur du translocon, la composition, l'architecture ainsi que le mécanisme de fonctionnement restent difficiles à déterminer. Toutefois, des avancées techniques, particulièrement dans le domaine de la microscopie cryo-électronique, ont permis d'avancer dans la compréhension de ce complexe (Figure.16).

Des études sur cellules humaines ont permis de montrer que les composants principaux du translocon sont Sec61, TRAP et OST [488]. Une structure secondaire peut être définie à l'échelle du sub-nanomètre, incluant la protein-conducting channel [489]. Il n'a pas encore été clairement défini si OST s'associe transitoirement avec le translocon pour une phase spécifique de la translocation ou si différents types de translocon coexistent dans la cellule. Il a récemment été montré que l'initiation de la traduction renforce l'association entre OST et Sec61 [480], ce qui tend vers la première hypothèse. Toutefois, aucun schéma concluant de ce type n'a pu être révélé *in vivo* [490].

Pour les autres composants, tels que SPC, le récepteur du SRP, le complexe Sec62/63 ou la chaperonne REj1, ils sont probablement recrutés de manière transitoire, de manière spécifique au substrat.

En résumé, Sec61 et TRAP seraient des composants strictement stœchiométriques dans le translocon du mammifère, alors que OST seraient présents en quantité variable (.

A. Le pore du translocon:

La principale caractéristique du translocon du RE est le pore aqueux qui traverse la membrane. Les pores aqueux transmembranaires de la membrane du RE ont été détectés par des mesures de conductivité, et la dépendance des ces canaux à la puromycine suggérait que la chaîne naissante devait être libérée du ribosome afin de permettre le passage d'ions transmembranaire [491]. Puisque le canal est fermé quand les ribosomes sont détachés de la membrane, le passage des ions *via* le canal est à la fois dépendant de la chaîne naissante et du ribosome.

Etant donné que la lumière du RE, et non le cytoplasme, forme un continuum avec le pore du translocon lors de la translocation, le ribosome doit lui-même former la barrière de perméabilité en liant fortement la surface cytoplasmique du translocon et sceller le pore depuis le cytoplasme [492].

De plus, comme la chaîne naissante dans le ribosome n'est pas exposée au cytoplasme, elle se déplace à-travers un tunnel aqueux dans le ribosome qui la dirige vers le translocon [492].

Une fois le translocon libéré du ribosome, BiP est requis afin de maintenir la barrière de perméabilité. Toutefois, il n'est pas encore clair si la fonction de BiP est directe ou indirecte [493]. Les expériences conduites par Hamman *et al.* [493] ont également montré que le complexe du translocon ne se dissocie pas quand le ribosome se détache. Au contraire, les composants du translocon restent assemblés et forment un pore, même en l'absence du ribosome. Toutefois, la structure du translocon est altérée dans sa conformation et sa composition au moment où le ribosome se détache.

Les expériences de cette même équipe ont également mis en évidence que le pore du translocon lié au ribosome présentait un diamètre de 40-60Å [494]. Du fait de sa taille, on parle de pore et non de canal. Le pore du translocon non lié au ribosome présente un diamètre interne de 9-15Å [494].

B. Régulation et dynamique de la structure et de la fonction du translocon

De nombreux indices tendent à montrer que le translocon n'est pas un pore statique. Les variations du diamètre du pore entre le translocon libre non fonctionnel et le translocon lié au ribosome [494] montrent que le translocon subit des réarrangements majeurs durant son cycle fonctionnel.

De plus, la composition du translocon change durant son changement d'état fonctionnel, avec une interaction transitoire avec BiP [494] et le récepteur de SRP [495].

La structure du translocon dépend donc du temps.

i. Conversion du translocon fonctionnel à non fonctionnel:

Le changement le plus remarquable est dans la variation du diamètre du pore entre le translocon libre et le translocon fonctionnel. Il apparaît que l'agencement des composants du translocon et donc le diamètre du pore, est déterminé par les interactions spécifiques qui créent une jonction serrée entre le ribosome et les composants du translocon. L'hypothèse évoquée serait que la contraction du translocon est médiée par l'hydrolyse de l'ATP dépendante de BiP à la fin de la traduction.

ii. Conversion du mode opératoire du translocon, de la translocation à l'intégration

Pour les chaînes naissantes avec une séquence signal clivable, le translocon fonctionne en mode translocation. Le système passe en intégration uniquement après qu'une séquence transmembranaire ait été synthétisée et soit reconnue par le ribosome (9230300). Le changement de fonctionnalité est initié avant que la séquence transmembranaire atteigne le translocon.

C. Les composants du complexe translocon

i. Sec61

Sec61 a une structure hétérotrimérique formant un canal permettant le passage des protéines. La sous-unité centrale Sec61 α est constituée de 10 hélices transmembranaires, arrangées en deux moitiés pseudo-symétriques N et C terminal autour d'un pore central, imperméable au flux d'ion passif. Les sous-unités Sec61 β et Sec61 γ sont localisées à la périphérie du complexe Sec61 et possèdent chacune une hélice transmembranaire [496–498].

Lors du transport et traduction des protéines, le ribosome lie la boucle cytosolique de Sec61 α . Un modèle mécanistique récent montre que Sec61 s'ouvre de manière transitoire afin de permettre l'insertion de l'hélice transmembranaire ou la séquence signal de la protéine naissante dans la membrane du RE, tout en restant imperméable au transport de protéines solubles dans la lumière du RE [499–503].

Le pore du translocon formé par Sec61 recouvre complètement la bicouche lipidique RE à travers laquelle les protéines sécrétrices nouvellement synthétisées sont transloquées [504]. Le complexe de Sec61 hétéromérique forme le noyau de ce pore, qui est bloqué par le ribosome du côté cytosolique et par GRP78 du côté luminal. Dans des conditions physiologiques, le diamètre du pore du translocon sans la fixation du ribosome est de 0,9 à 1,5nm mais pendant la translocation des chaînes protéiques naissantes, l'ouverture du pore s'élargit pour atteindre

un diamètre théorique compris entre 4 et 6nm [494].

ii. TRAP

TRAP est un complexe protéique membranaire hétérotétramérique, dont le rôle est d'assister Sec61 dans l'insertion des protéines, et plus particulièrement dans la topogénèse des protéines membranaires polytopiques [505]. Il serait constitué de trois sous-unités (α, β, δ) formant une hélice transmembranaire et un domaine luminal, alors que TRAP γ serait un ensemble de quatre hélices transmembranaires avec un petit domaine cytosolique [506]. La partie luminal de TRAP lie Sec61 α au niveau des deux moitiés N et C terminales et pourrait ainsi influencer la conformation de Sec61 α et interagir avec les protéines nouvellement synthétisées en transport vers le RE.

iii. OST

OST est un complexe constitué d'au moins sept protéines. OST catalyse la glycosylation des protéines nouvellement synthétisées [507]. Une des sous-unités d'OST est STT3. Elle se présente sous deux formes paralogues STT3A et STT3B qui sont impliquées dans la glycosylation pendant et après la traduction respectivement [508] et sont associées avec au moins six sous-unités accessoires d'OST, dont la fonction ou la structure est encore mal connue: Ribophorin I, Ribophorin II, OST48, DAD1, N33 (ou IAP) et OST4. La sous-unité N33 d'OST possède une activité oxydoréductase et permettrait d'augmenter l'efficacité de la glycosylation en ralentissant la conformation des glycoprotéines [509]. L'interaction d'OST avec le translocon reste encore à déterminer précisément. Toutefois, il a été montré qu'OST se liait à Sec61 α et pénétrait en partie dans la lumière du RE.

Tableau.3: Etudes de la modulation pharmacologique de la fuite calcique à travers le translocon

Type cellulaire	Molécules utilisées	Effets de la fuite calcique
Cellules pancréatiques murines (MIN6B1) et humaines	Puromycine	Réduction du taux calcique réticulaire indépendamment des RyR, IP ₃ R et SERCA [516]
	Puromycine et anisomycine	Participe à la sécrétion d'insuline et à la fuite calcique induite par la palmitate [522]
Cellules cancéreuses de prostate (LNCaP)	Puromycine, anisomycine, pactamycine et cycloheximide	Réduction du taux calcique réticulaire indépendamment des RyR, IP ₃ R et SERCA [520]
	Puromycine et anisomycine	Activation des canaux SOC après déplétion calcique réticulaire [517]
	Puromycine et anisomycine	Modulation du stress réticulaire et changement d'expression de la chaperonne GRP78 [110]
Microsomes de foie de rat	Puromycine	Participe à la fuite calcique réticulaire [518]
Cellules glande salivaire humaine	Puromycine, émétine et pactamycine	Modulation du stress réticulaire et de l'activité des canaux SOCE après déplétion calcique réticulaire [519]
Cellules musculaires lisses vasculaires	Puromycine, anisomycine et émétine	Réduction du taux calcique réticulaire [523]
Fibroblastes embryonnaires de souris (MEF)	Anisomycine	Participe à la fuite calcique réticulaire [524]
Cellules de carcinome cervical humain HeLaT1	Anisomycine	Participe à la fuite calcique réticulaire [524]
Ovocytes de xénope	Emétine	Participe à l'induction de l'UPR [525]
Macrophages humains	Anisomycine	Modulation du niveau calcique basal cytoplasmique [526]

iv. Autres protéines

La calnexin, protéine membranaire du RE agissant comme une chaperonne lors de la conformation de la protéine naissante [510] peut être liée aux chaînes polypeptidiques naissantes [510–512]. La calnexin apparaît donc proche du translocon, mais il n'y a encore aucune preuve de sa participation au complexe.

D'autres protéines solubles de la lumière du RE comme la calréticuline, la protéine disulfide isomérase, BiP et REp57 interagissent également transitoirement avec la chaîne naissante de protéines [512–514], mais il a arbitrairement été décidé de considérer uniquement les protéines membranaires comme associées au translocon.

Le SRP (heterodimeric signal-recognition particle) récepteur est requis pour cibler la protéine naissante du ribosome vers la membrane du RE *via* le signal SRP, mais le récepteur SRP est ensuite détaché du translocon [515]. Bien que présent uniquement de manière transitoire au translocon, le récepteur SRP pourrait jouer un rôle crucial dans la structure du translocon libéré du ribosome.

D. Interaction dans le complexe ribosome/translocon

Sec61 est localisée au centre du translocon et lie le ribosome *via* une boucle cytosolique proche du peptide de sortie du ribosome. Alors que TRAP lie spécifiquement une région de Sec61 α , OST interagirait avec Sec61 *via* une interface plus importante dans la membrane du RE. Sur la face cytosolique du translocon, les petits domaines cytosoliques de TRAP et OST interagissent avec la grande sous-unité ribosomique *via* des contacts spécifiques entre le RNA ribosomal et protéines.

Sec61, TRAP et OST ne sont bien sûr pas les seuls partenaires interagissant avec le ribosome 80S. En effet, beaucoup de protéines ou complexes du RE ou du cytosol interagissent avec le

Tableau.4: Antibiotiques modulateurs du translocon

Molécule	Spécificité ribosomique	Etape ciblée	Mode d'action
Puromycine	50S/60S	Elongation	Analogue de l'AA-ARNt
Pactamycine	30S/40S	Traduction	Interaction avec le site E du ribosome
Anisomycine	60S	Elongation	Bloque la peptidyl-transférase
Emétine	40S	Elongation	Interaction avec le site E du ribosome

ribosome et sont impliqués dans le transport des protéines vers le RE, la modification des protéines, la conformation ou le contrôle qualité. Toutefois, ceci n'est pas l'objet de notre étude [481,486,500].

3. Translocon et fuite calcique

La première identification du translocon comme un canal de fuite calcique a été proposée par Lomax *et al.* Ils ont montré une augmentation de la fuite calcique par le RE en utilisant la puromycine (un agoniste du translocon), indépendamment des canaux IP₃R et RyR en inhibant la pompe SERCA [516]. Plusieurs groupes ont proposé que la fuite de calcium basale se produit *via* le translocon [110,517–520]. Erdmann *et al* ont identifié un motif calmoduline binding sur la partie cytosolique N terminale de Sec61 α , qui lie la CaM mais pas à ApoCaM et qui jouerait un rôle dans le ciblage du translocon [475,521]. De par son importance, beaucoup d'études récentes ont été menées afin de caractériser le rôle du translocon comme canal de fuite calcique dans le stress du RE (Tableau.3). En effet, lors de l'accumulation de protéines mal repliées, le côté luminal normalement bloqué par GRP78 est libéré (en raison de la dislocation de GRP78) permettant la fuite de calcium [475].

Etant donné le rôle crucial du translocon dans la traduction, le nombre de composants et la stœchiométrie de la structure de pore, les approches visant à sur-exprimer le complexe du translocon ou l'utilisation de siRNA pour abolir son expression, voire même d'une seule sous-unité, sont impossibles.

Pour cela, la plupart de ces études expérimentales se sont appuyées sur une approche pharmacologique afin de moduler l'ouverture du translocon, en utilisant quatre antibiotiques (Tableau.4):

- La puromycine: analogue structural du phénylalanyl-ARNt, entraînant la formation

d'un peptidyl-puromycine anormal. Les chaînes polypeptidiques ainsi produites sont donc incomplètes, ce qui provoque leur détachement du translocon, ce qui provoque *in vivo* une inhibition de la synthèse protéique [527]. A ce niveau, le ribosome est encore lié au translocon [520,528].

- La pactamycine: le mode d'action de cet antibiotique reste encore débattu. En effet, les premières études ont montré que la pactamycine s'associe au ribosome, empêchant ainsi l'ARNt d'entrer au niveau du site P. Ceci serait dû à un changement de conformation du ribosome, ou par une compétition directe, inhibant ainsi la traduction des protéines. En 2004, de nouvelles données tendent à montrer que la pactamycine inhiberait la traduction plutôt au niveau du site E, à l'étape de translocation [519,529].
- L'anisomycine: inhibiteur de la traduction en se liant à la sous-unité 60S du ribosome et bloquant la peptidyl-transférase, empêchant l'élongation de la chaîne peptidique. Le ribosome est libéré du translocon, entraînant sa fermeture [110,520].
- L'émétine: interagit avec la sous-unité 40S du ribosome au niveau du site E, inhibant la progression du ribosome sur l'ARNm. Cette molécule est donc un inhibiteur irréversible de l'élongation de la traduction, qui stabilise le complexe ribosome/chaîne naissante, entraînant la fermeture du pore du translocon [519]. Il est intéressant de noter que l'émétine et la pactamycine partagent un même site de liaison au ribosome [519].
- La cycloheximide: inhibiteur de l'élongation qui lie le site E du ribosome et qui sert de contrôle vis-à-vis des effets des antibiotiques cités ci-dessus.

4. Implication du translocon dans le stress réticulaire et la voie UPR associée

Comme précédemment mentionné, la partie luminale du translocon est scellée par la

chaperonne GRP78 qui permet d'inhiber la fuite de calcium du RE et de maintenir la concentration calcique de l'organite [475]. Ainsi, la diminution de la déplétion calcique du RE par l'inhibition du translocon pourrait inhiber l'apoptose.

Il a été établi que la déplétion calcique du RE pouvait activer les SOCE (store-operated calcium entry) [530], et que ces derniers étaient activés par la stimulation du translocon par la puromycine, démontrant un rôle du translocon dans le déclenchement du stress du RE [517]. Un rôle du translocon dans l'ERAD pendant un stress réticulaire a aussi été signalé [531]. En effet, le traitement de cellules LNCaP à la puromycine induit l'apoptose, accompagné d'une surexpression de GRP78 et d'une diminution de l'interaction entre GRP78 et le translocon. Au contraire, l'anisomycine protège les cellules en inhibant la déplétion calcique réticulaire [110]. De même, le blocage du translocon dans les ovocytes de Xénope en utilisant l'émétine protège les cellules du stress du RE et de l'initiation de la voie UPR. Le mécanisme sous-jacent de cette protection comprend l'inhibition de l'augmentation de calcium cytosolique induite par la fuite calcique du translocon, une diminution de la phosphorylation d'eIF2 et une diminution de l'expression de GRP78 [525]. Une étude récente a également montré que l'inhibition du translocon par l'anisomycine restaure la concentration calcique du RE et améliore la sécrétion d'insuline dans des îlots humains soumis à des conditions lipotoxiques sans affecter le stress du RE mettant en évidence le rôle du translocon dans la protection contre la lipotoxicité et la déplétion calcique [532].

Toutes ces données valident l'hypothèse que durant le stress réticulaire, la fuite calcique du RE par le translocon joue un rôle important dans l'homéostasie calcique et peut jouer un rôle important dans la protection contre la mortalité cellulaire et cela en régulant le stress du RE.

HYPOTHESE DE TRAVAIL

Dans le cadre de nos thématiques de travail dans le laboratoire CarMeN U1060, nous nous intéressons à l'étude du mode d'action et des voies de signalisation en amont des lésions d'ischémie/reperfusion. Le calcium étant une cible majeure et un des seconds messagers les plus importants, son rôle dans la physiologie et la modulation de la réponse cellulaire face à des stimuli externes est le centre d'intérêt de nos recherches.

En effet, la signalisation du calcium est centrale pour la fonction cardiaque, par son rôle physiologique dans le couplage excitation/contraction et son impact préjudiciable sur la mortalité cellulaire pendant l'ischémie/reperfusion cardiaque.

L'accumulation cytosolique du calcium, additionnée au transfert du calcium du RE aux mitochondries dans la pathophysiologie de la mort cellulaire pendant l'ischémie/reperfusion est la cause principale de la surcharge calcique mitochondriale, conduisant à l'ouverture des mPTP, suivie de la mort cellulaire. La compréhension du mécanisme de ce transfert ainsi que sa modulation peut être la clé pour trouver de nouvelles cibles pharmacologiques pour le conditionnement cardiaque.

Comme nous l'avons précédemment reporté, la plupart des études pharmacologiques dans le domaine de la cardioprotection face aux lésions d'ischémie/reperfusion, ayant comme cible la mitochondrie ont été décevantes après transposition chez l'homme. Le stress du RE est apparu alors comme une nouvelle cible prometteuse.

Au cours de l'ischémie/reperfusion, le stress oxydatif et les perturbations de l'homéostasie calcique peuvent conduire à un stress du RE et l'activation des voies complexes de signalisation cytoplasmique et nucléaire appelées UPR. Les médicaments qui interfèrent avec le stress du RE ont un grand potentiel thérapeutique.

Parmi les acteurs de l'homéostasie calcique réticulaire figure le translocon. Le translocon est

un canal transmembranaire du RE qui joue un rôle important dans la fuite calcique réticulaire. Plusieurs études ont montré que la modulation pharmacologique du translocon peut affecter la réponse cellulaire à travers l'induction ou l'inhibition du stress réticulaire.

Le but de cette étude de thèse financée par l'IDRS (institut de recherche SERVIER) en collaboration avec INRSEM transfert (Institut national de la santé et de la recherche médicale) était le développement d'une nouvelle cible pharmacologique de cardioprotection, en agissant sur la modulation de la fuite calcique réticulaire par la modulation du translocon. Ceci est possible par l'activation ou l'inhibition pharmacologique de la libération de calcium réticulaire à travers le translocon, ce qui nous a permis d'évaluer si ces modulateurs de libération du calcium réticulaire pouvaient jouer un rôle dans la protection contre les lésions d'ischémie/reperfusion et modifier la taille d'infarctus dans un modèle de souris *in vivo*.

Enfin, notre hypothèse de travail est que le translocon peut être un acteur clé dans la perturbation calcique liée au stress du RE pendant l'ischémie/reperfusion. Ceci fait de lui une cible moléculaire intéressante pour atténuer les lésions de reperfusion mortelle après ischémie/reperfusion. L'objectif du présent mémoire est composé de cinq axes principaux:

1. Mettre en évidence l'expression et la localisation du translocon au sein des cardiomyocytes.
2. Vérifier la fonctionnalité du translocon en tant que canal de fuite calcique.
3. Cibler le translocon par une approche *in vitro/in vivo* dans le contexte de protection contre les lésions d'ischémie/reperfusion
4. Evaluer l'impact de la modulation du calcium réticulaire sur la contraction cellulaire
5. Explorer les voies impliquées dans la cardioprotection induites par la modulation de la fuite calcique du réticulum *via* le translocon.

 **MATERIELS ET METHODES**

Tous les produits chimiques ont été achetés de Sigma-Aldrich, sauf autrement mentionné.

1. Isolation des cardiomyocytes de souris adulte

Ce protocole a obtenu l'accord du comité éthique (Protocole éthique: N° BH2012-64).

La souris reçoit d'abord une injection IP (intra-péritonéale) d'héparine sodique (50UI/kg) puis est anesthésiée par injection IP de pentobarbital sodique (70mg/kg). Une fois l'animal anesthésié, il est placé sur le dos et nettoyé avec de l'éthanol 70°. Une incision sous le diaphragme est réalisée afin d'accéder à la cage thoracique pour permettre de prélever le cœur qui sera immédiatement plongé dans une solution appelée « perfusion buffer », conservée à 4°C, dont la composition est: NaCl 113mM, KCl 4.7mM, KH₂PO₄ 0.6mM, Na₂HPO₄ 0.6mM, MgSO₄-7H₂O 1.2mM, phenol red 0.032mM, NaHCO₃ 12mM, KHCO₃ 10mM, HEPES 10mM, taurine 30mM, préparée la veille, auxquels on ajoute du 2,3-butanedione monoxime 10mM (un inhibiteur de contraction cellulaire), et du glucose 5.5mM, ajustée à un pH de 7,4.

L'aorte est minutieusement isolée et permet de canuler rapidement le cœur au système de perfusion langerdorff *via* une canule adaptée et un mini-clamp (Harvard Apparatus®, Holliston, MA). Cette technique permet de forcer le passage de la solution dans la circulation coronaire afin que l'ensemble du tissu soit perfusé. Le cœur est alors perfusé par la solution « perfusion buffer » grâce à une colonne (1m de hauteur) gainée et chauffée par un tuyau assurant une circulation d'eau à 37°C. Une fois le cœur rincé (environ 5 min), la solution de perfusion buffer est remplacée par la solution « digestion buffer » (perfusion buffer 1X, liberase TM Research grade 0.167mg/mL (Roche 05401127001), trypsine 2.5%

10X 0.14mg/mL (Inivtrogen 15090046), CaCl_2 12.5 μM). Les enzymes de digestion présentes permettent la dissociation des cardiomyocytes. Une fois la dissociation complète, le cœur est détaché du système de reperfusion et immédiatement plongé dans une solution SB1 (stopping buffer 1) (perfusion Buffer 1X, BCS (bovine calf serum) 10% (PAA, SVF Gold), CaCl_2 12,5 μM) afin de stopper les réactions enzymatiques. Dans cette solution, les deux oreillettes, le ventricule droit ainsi que le septum sont éliminés et le ventricule gauche est trituré par des allers-retours dans une pipette afin de séparer les cardiomyocytes. La solution contenant les cardiomyocytes isolés est ensuite récupérée et filtrée (SEFAR Nitex 03-200/47 102cm, Zurich Dutsher 01655530) et les cellules sont mises à sédimenter environ 15min. Le surnageant est alors enlevé délicatement et remplacé par une solution SB2 (stopping buffer 2) (même composition que SB1 avec seulement 5% de BCS). De la même façon, les cellules sont mises à sédimenter puis commence le protocole de remontées en calcium. Après chaque phase de sédimentation, le milieu est remplacé par le suivant contenant une concentration plus élevée en calcium (1: SB2 + 50 μM CaCl₂; 2: SB2 + 100 μM CaCl₂; 3: SB2 + 500 μM CaCl₂; 4: SB2 + 1mM CaCl₂). Au terme des remontées en calcium, les cellules sont maintenues dans la dernière solution pendant 30min. Les expériences sont réalisées avec 70-80% de cardiomyocytes vivants.

Finalement, les cardiomyocytes sont mis en culture dans des Ibdidis (Ibidi Biovalley) ou des labTech (Merck Millipore) selon l'expérimentation, préalablement coatées à la laminine 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Corning) et incubées pendant 2 heures à 37°C, dans un milieu de culture M199 supplémenté en ITS insuline (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)-transférine (0,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$)-sélénium (0,5 ng/mL) (Sigma) et en pénicilline (100 U/mL)-streptomycine (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (life technologies). Les expériences sont réalisées le jour même dans les 5 heures qui suivent.

2. Western Blot

A. Préparation des échantillons

i. Tampon de lyse

La lyse des échantillons est réalisée par un tampon non dénaturant RIPA (NaCl 150mM, Triton X100 1%, Sodium déoxycholate 0.5% et Tris 50mM, supplémenté avec 5mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 20mM NaF, 1mM DTT et 1mM cocktail anti-protéase (Sigma).

ii. Extraction protéique

L'extraction des protéines sur tissu est réalisée par l'ajout de tampon de lyse sur l'échantillon (300µL) dans des tubes spéciaux precellys (Ozyme) qui seront placés dans un broyeur (Precellys 24, Bertin technologies) réglé à 6000 agitations/min 3 fois 10 secondes. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 10min à 3000 G (himac CT15RE), puis le surnageant est transféré dans un tube eppendorf et centrifugé à nouveau pendant 15min à 10000 rpm. A nouveau, le surnageant est transféré dans un nouveau tube eppendorf, constituant l'échantillon de protéines extraites.

Dans le cas d'extraction des protéines des cellules, les cardiomyocytes sont lysés après l'ajout du tampon de lyse par 3 cycles de congélation/décongélation de 10min. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par une centrifugation à 3000 G pendant 10min.

B. Dosage des protéines par BC Assay

Une gamme standard de BSA (Bovine Serum Albumine) est préparée dans le tampon de lyse (0µg/µL, 0.1µg/µL, 0.2µg/µL, 0.5µg/µL, 1µg/µL et 2µg/µL). Dans une plaque 96 puits, 10µL de gamme étalon sont déposés ainsi que 1µL d'échantillon, complété avec le tampon de lyse qsp 10µL, en duplicat. Le réactif BCA (Interchim) est ajouté à raison de 200µL/ puit.

Après 30min d'incubation à 37°C, la plaque est lue en spectrophotométrie à 526nm.

C. Préparation des gels de migration

Les gels de migrations sont préparés en deux temps, et le pourcentage d'acrylamide dépend de la taille des protéines à révéler. Le gel de séparation est d'abord préparé (Tris 1.5M pH 8.8, acrylamide 30%, SDS 10% et H₂O, puis Temed 0.1% et APS 0.075% ajoutés au dernier moment), et coulé, puis le gel de concentration de composition standard (Tris 0.5M pH 6.8, Acrylamide 5%, SDS 0.1%, et APS 0.075% + Temed 0.1% ajoutés au dernier moment).

D. Préparation des échantillons à déposer

Les échantillons à déposer sont préparés avec la quantité de protéines nécessaire dans un tampon de dénaturation (tampon de lyse + β -mercaptoéthanol 5%) et incubés 5min à 95°C afin de permettre la dénaturation des protéines. Les échantillons ainsi préparés peuvent être déposés dans le gel de migration préalablement préparé, ainsi qu'un marqueur de taille des protéines (ProSieve™ QuadColor™, Ozyme).

E. Migration et transfert

La migration des échantillons par électrophorèse se réalise dans un system de migration Trans-Blot Turbo Transfer (Biorad) contenant le tampon de migration (Euromedex) dilué 10 fois dans l'eau distillée. Le système est alors soumis à un courant constant de 100V permettant la migration des protéines.

Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Biorad) à l'aide du Trans-Blot Turbo Transfer (Biorad).

F. Détection des protéines

Après saturation de la membrane par un solution de BSA 5% (TBS-Tween 0.1% + BSA 5%) ou une solution de lait 5% pendant 2 heures, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire à la dilution optimale (généralement 1/1000 dans la solution de BSA ou lait préparée pour le blocage) avec agitation constante pendant la nuit à 4°C. La membrane est ensuite lavée 3 fois 10min avec une solution de rinçage (TBS Tween) puis incubée avec l'anticorps secondaire correspondant au primaire, anticorps anti-espèce couplé à l'HRP (Horseradish peroxydase), généralement dilué à 1/10000, pendant 2 heures à température ambiante avec agitation constante. La membrane est à nouveau lavée 3 fois 10min avec la solution de lavage.

La révélation des protéines se fait par utilisation d'un kit de révélation ECL prime (GE healthcare) et par visualisation de la membrane sur la caméra du Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR+ (Bio-Rad).

G. Quantification et analyse des résultats

L'intensité des bandes détectées par chimioluminescence par la camera est quantifiée par densitométrie grâce au logiciel ImageLab (Bio-Rad). La densité de chaque bande de protéine est ensuite normalisée par rapport à la densité de la bande d'une protéine de ménage.

3. Immunofluorescence

Après les deux heures d'incubation des cardiomyocytes à 37°C dans des LabTech, le milieu est rincé afin de se débarrasser des cellules non adhérentes et des cellules mortes, puis remplacé par du paraformaldéhyde à 4% pendant 15min afin de fixer les cellules.

Les cardiomyocytes sont ensuite rincés 3 fois 5min par du PBS (Gibco) avant l'ajout du triton

à 0,1 % pendant 10min, permettant de perméabiliser les membranes.

Le Triton est ensuite rincé par du PBS 3 fois 5min et les cellules sont prêtes au blocage par un tampon de saturation (PBS 3X, SVF mucoplex 1X PAA, (mucoplex), solution de blocage 1X (life technologies)) pendant 1h.

Après le blocage, les cardiomyocytes sont incubés avec les anticorps primaires dilués dans le tampon de saturation 1h 30min à température ambiante ou bien à 4°C pendant la nuit.

L'anticorps primaire est ensuite rincé 3 fois 5min par du PBS pour être remplacé par l'anticorps secondaire pendant 1h. Ce dernier est dilué dans du PBS contenant du calcium et du magnésium qui favorise l'activité du fluorophore couplé à l'anticorps secondaire (Gibco).

Suite à l'incubation avec l'anticorps secondaire, les cellules sont rincées de nouveau 3 fois 5min, puis les noyaux sont marqués par une incubation de 10min à l'obscurité avec du bis-bromophénol dilué dans le PBS.

Après 3 rinçages de 5min, les lamelles obtenues après démontage des LabTech sont mises à sécher pendant 5min, puis couvertes par des lamelles fines en verre après application d'un milieu du montage SlowFade® Diamond Antifade Mountant (life technologies) directement sur les cellules.

Les lamelles ainsi obtenues sont stockées à 4°C pour être observées à l'aide d'un microscope confocal NIKON eclipse Ti confocal microscope (NIKON). Et les images sont analysées en utilisant le Nis software (Nikon).

4. Analyse de transformée rapide de Fourier

La similarité de distribution spatiale de Sec61, IP3R2 et RyR2 dans le CM de la souris a été obtenue en analysant l'image de fluorescence dans le domaine de la fréquence spatiale en utilisant un programme Matlab (Mathworks, Natick, Ma, USA). Les images (256*1024

pixels; $0.100\mu\text{m}$ / pixel) ont été segmentées au-dessus de l'intensité de fluorescence moyenne afin d'améliorer les signaux de haute intensité et de se débarrasser du bruit éventuel. La colocalisation spatiale des signaux fluorescents a été visualisée par la génération d'images fusionnées composées de la multiplication scalaire des deux signaux. Afin de réaliser des analyses statistiques de la distribution de fréquence, un total de 40 segments longitudinaux ($100\mu\text{m}$ en moyenne) ont été choisis entre 10 et 15 CM. La largeur de ces segments était ($\approx 3\mu\text{m}$) pour améliorer le rapport signal sur bruit et assurer la récupération maximale de la fluorescence sur la longueur des structures (ER et lignes Z). Chaque segment a été intégré sur sa largeur et une transformée de Fourier rapide numérique (FFT) a été réalisée sur sa longueur pour Sec61, IP3R2, RyR2 et les images fusionnées. Les segments étaient composés de ≈ 400 points, car cet échantillonnage s'avérait être un bon compromis entre la gamme spectrale et la résolution ($\approx 0.02\mu\text{m}^{-1}$ sur une gamme $\approx 4\mu\text{m}^{-1}$). Pour permettre des calculs de moyenne simple des spectres des séries d'images, chaque spectre a été interpolé à la même résolution ($0,01\mu\text{m}^{-1}$), ce qui a permis de ne pas modifier les informations. Les courbes de fréquence moyennes ont été déterminées pour les signaux Sec61, IP3R2, RyR2 et fusionnés afin de démontrer la constance d'une distribution spatiale spécifique structurée avec une fréquence de $0,6\mu\text{m}^{-1}$. Un exemple des différentes étapes d'analyse est donné pour CM représentatif marqué avec Sec61/RyR2 ou Sec61/IP3R2.

5. Anticorps utilisées pour les westerns blots et l'immunofluorescence

Anticorps primaires: Sec61- α (ab15575) et RyR₂ (ab2827) ont été achetés chez abcam, LC3-B (2775) chez Cell signaling, Bax (sc-493), BCL-2 (sc-492), Spectrin-alphaII/Fodrin-alpha(sc-48382), α -Tubulin(sc-5286), GRP78 (sc-1050) and IP₃R₂ (sc-7278) ont été achetés chez Santa Cruz.

Les anticorps secondaires conjugués au HRP ont été achetés chez GE Healthcare et les anticorps secondaires conjugués à l'Alexa Fluor ont été achetés chez life technologies.

6. Hypoxie/ré-oxygénation *in vitro*

Après les 2 heures de culture des cardiomyocytes sur les Ibdis pré-coatées à la laminine à 37°C, le milieu M199 est rincé 2 fois par un milieu hypoxique (tyrode sans glucose: 140mMNaCl ; 5mMKCl ; 10mMHEPES ; 1mMMgCl₂ ; 1,8mM CaCl₂ ; pH 7,4) puis remplacé par ce dernier, et les Ibdis sont placées dans la chambre à hypoxie (Ref: O₂Sens[®]Box, Adellio[®]).

La chambre à hypoxie est une enceinte hermétique en plexiglas, placée dans un incubateur à 37°C, ventilée par un mélange gazeux (95% N₂ et 5% CO₂, Air Liquid).

Afin de contrôler le pourcentage d'oxygène au cours de l'hypoxie, le taux d'oxygène dans la chambre est mesuré par un logiciel informatique (Ref: O₂Sens[®]Box, Adellio[®]) grâce à une sonde reliée à un ordinateur. L'hypoxie dure 30min et démarre quand le taux d'oxygène atteint 1 %.

Une fois les 30min terminées, le surnageant est remplacé sans rinçage par le milieu M199 pendant la durée de reperfusion de 2h qui se déroule dans un incubateur à 37 °C avec un taux normal d'oxygène.

Le pré-conditionnement commence 10min avant le début de l'hypoxie dans le milieu de culture et la molécule reste présente dans le milieu d'hypoxie ainsi que dans le milieu de reperfusion.

A la fin de la séquence d'hypoxie ré-oxygénation, la mortalité cellulaire est évaluée par un kit mesurant la LDH libérée dans le milieu extracellulaire (abcam).

7. Mesures calciques

Après les 2 heures d'incubation des cardiomyocytes dans des boîtes Ibdis à 37°C, le milieu de culture est remplacé par du CCB (calcium containing buffer) (140mMNaCl ; 5mMKCl ; 10mMHEPES ; 1mMMgCl₂ ; 2mM CaCl₂ ; 10mMGlucose, pH 7,4) contenant une sonde calcique fluorescente pendant 30min à température ambiante.

Une fois le chargement terminé, les cellules sont ensuite lavées 1 fois 5min avec du CCB et 1 fois 5min avec du CFB (calcium free buffer) (140mMNaCl ; 5mMKCl ; 10mMHEPES ; 1mMMgCl₂ ; 0,1mMEGTA ; 10mMGlucose, pH 7,4) pour éliminer le surplus de sonde (sauf indication contraire).

L'hypoxie a été effectuée dans une chambre hypoxique (ligne okolab-Bold) où la température et le niveau d'oxygène ont été surveillés. Les cardiomyocytes chargés par Fura2-AM ont été lavés par du CCB, puis, après stabilisation du signal de fluorescence, le milieu a été remplacé par le tampon hypoxique (CCB sans glucose) et le niveau d'oxygène a été réduit à 1%. Après 30min d'hypoxie, les cardiomyocytes ont été stimulé par une injection de 10mM caféine.

Les mesures sont effectuées en utilisant un microscope Leica champ large (LeicaDMI6000B microscope) équipé par une camera digital Orca-Flash4.0 (HAMAMATSU). Les paramètres d'acquisition ont été standardisés et maintenus identiques spécifiquement pour chaque type d'expérience.

A. Sondes utilisées

L'utilisation d'une sonde calcique permet de réaliser des mesures dynamiques de la concentration du calcium libre. La sonde est constituée d'une partie capable de fixer le calcium et d'un chromophore. La fixation du calcium sur les sondes induit une modification de l'environnement électronique de cette molécule, ce qui engendre des changements des

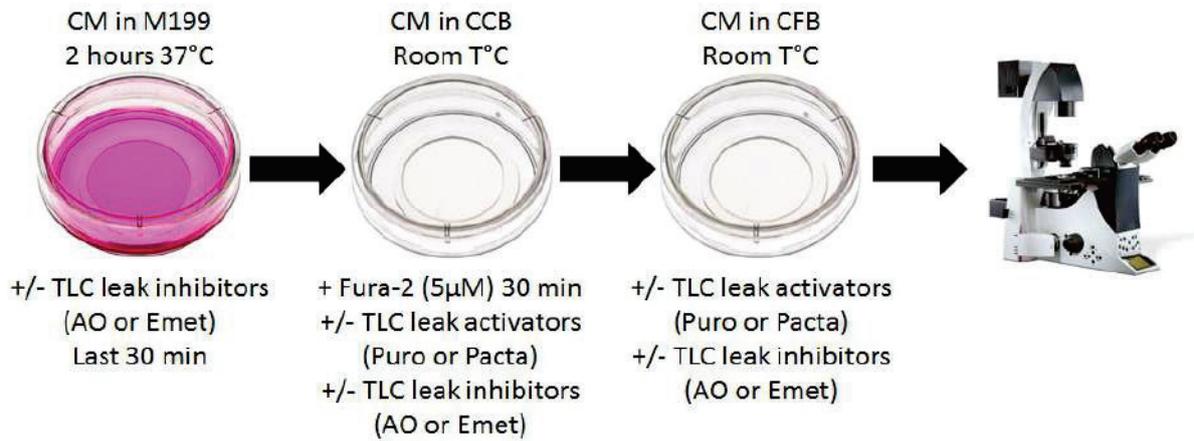


Figure.17: Protocole expérimental des mesures calciques cytosolique

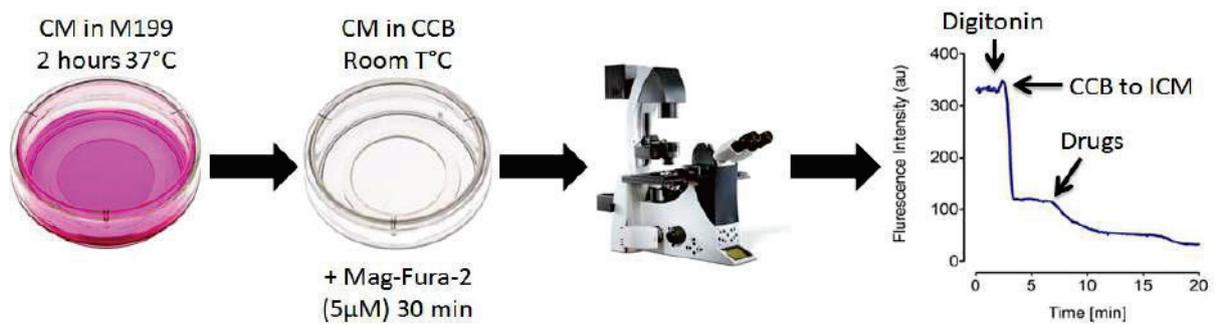


Figure.18: Protocole expérimental des mesures calciques réticulaire

propriétés de fluorescence de la sonde. Ceci se traduit soit par une modification de la fluorescence (augmentation ou diminution), un déplacement du spectre d'excitation ou d'émission de la molécule.

Le choix de la sonde dépend de la concentration du calcium libre du compartiment cellulaire d'intérêt. En effet, chaque sonde possède une affinité différente au calcium, définie par son K_D (constante d'affinité). Plus le K_D est grand, plus la sonde sera sensible aux faibles concentrations de calcium.

i. Fura-2 AM

Fura-2 AM (Sigma) est une sonde fluorescente de haute affinité au calcium cytosolique libre. C'est une sonde ratiométrique qui possède 2 longueurs d'ondes d'excitation dépendante de sa forme liée au calcium (340nm) ou libre (380nm), avec une longueur d'onde d'émission (510nm), ce qui rend le rapport des émissions à ces longueurs d'onde directement lié à la quantité de calcium intracellulaire. La présence de cette forme d'ester acétoxyméthylque (AM) est utile pour le chargement intracellulaire non invasif (Figure.17).

ii. Mag-Fura-2 AM

Comme Fura-2, Mag-Fura-2 AM (Sigma) est une sonde fluorescente ratiométrique mais avec une faible affinité au calcium, lui permettant de mesurer la concentration de calcium dans les organites de haute concentration calcique. Une fois chargée dans la cellule, la sonde se propage dans le cytosol et les autres organites dépendamment des conditions de chargement. 30min à température ambiante suffisent pour internaliser la sonde dans le réticulum, bien qu'une perméabilisation cellulaire soit recommandée afin d'éliminer la sonde du cytoplasme, ce qui est nécessaire afin de mesurer avec précision le calcium réticulaire (Figure.18).

La perméabilisation se fait par traitement des cellules avec 10 μ M de digitonine pendant 5min, en changeant le milieu dès la baisse de la fluorescence, par un milieu extracellulaire de composition similaire au milieu intracellulaire (25mMNaCl ; 125mMKCl ; 10mMHEPES ; 0,1mMMgCl₂ ; 0,5mMCaCl₂ ; 1mMEGTA ; 10mMGlucose, pH 7,4) contenant de l'ATP à 200mM(Sigma) pour éviter la mort des cardiomyocytes.

iii. Mag-Fluo-4 AM

Contrairement aux deux sondes citées précédemment, Mag-Fluo-4 AM (Sigma) n'est pas une sonde ratiométrique, en revanche, son principe de charge est similaire à celui du Mag-Fura-2. Une fois chargée dans la cellule, la sonde internalise le réticulum et une perméabilisation est nécessaire pour une mesure plus précise du calcium réticulaire.

La sonde liée au calcium est excitée à 494nm et émet une longueur d'onde de 506nm.

B. Produits

Afin d'étudier l'effet de la modulation de l'activité du translocon, des prétraitements par les activateurs et les inhibiteurs du translocon sont ajoutés avant le début des acquisitions, en même temps que le chargement de la sonde et sont maintenus tout au long de la mesure (Puromycine, Anisomycine, Pactamycine, Emétine, Cycloheximide) sauf contre-indication.

Dans le cas du double traitement aux antibiotiques agissant sur le translocon, l'inhibiteur est ajouté 30min avant le chargement et reste présent pendant le reste de la mesure, soit un prétraitement total de 1h.

Les traitements de stimulation de la vidange calcique spécifique aux organites sont utilisés par application directe pendant la mesure calcique.

- L'ionomycine, un ionophore sélectif du calcium, qui perméabilise les membranes

cellulaires ainsi que des organites induisant la sortie du calcium vers le cytoplasme.

- Le FCCP, un ionophore dont le rôle est de découpler la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui induit l'arrêt de synthèse d'ATP ainsi que la libération du calcium mitochondrial dans le cytoplasme.
- La caféine connue pour son effet activateur des RyR afin de vider le stock calcique du RS. La caféine induit l'ouverture des RyR se traduisant dans une sortie massive du calcium dans le cytoplasme
- Angiotensine II, agoniste des IP₃R.

8. Chirurgie *in vivo*

A. Protocole chirurgical

Les chirurgies ont été réalisées par Dr. PILLOT Bruno au sein de notre plateforme de chirurgie du petit animal, agrément numéro: C-693880502. Le protocole à obtenu l'accord du comité d'éthique (Protocole éthique: N° BH2012-65).

Brièvement, après injection intra-péritonéale de l'analgésique buprénorphine puis de l'anesthésique pentobarbital sodique, les souris sont épilées au niveau de la gorge et du thorax et sont placées sur un tapis chauffant (la température de la souris doit être approximativement de 36 à 37°C). Les souris sont ensuite intubées pour être mises sous respiration assistée et l'évolution du rythme cardiaque est surveillée par l'électrocardiogramme.

Une thoracotomie est réalisée, permettant d'accéder au cœur après coupure de la 5ème côte, ainsi que des muscles inter-costaux supérieur et inférieur.

Une fois l'accès au cœur est libéré, le péricarde est ouvert. Un fil de suture est mis en place autour de l'artère inter-ventriculaire antérieure (IVA) et l'ischémie est réalisée en pratiquant

Protocole d'ischémie/reperfusion *in vivo*

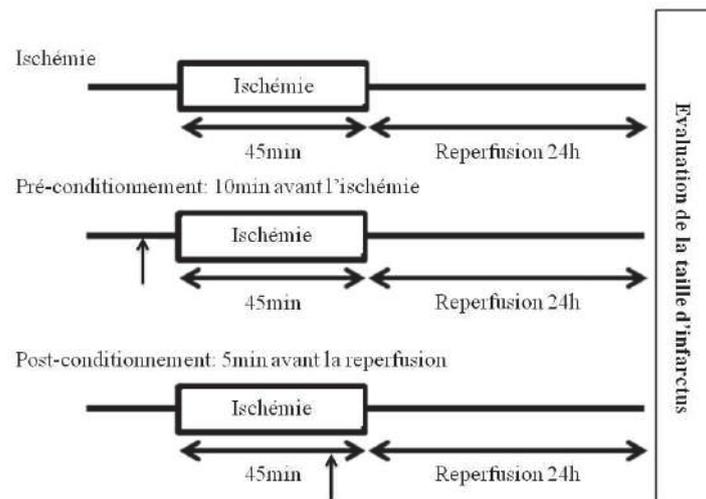


Figure.19: Protocole expérimental pré et post-conditionnement *in vivo*

un nœud simple autour de l'artère. Cette ischémie est contrôlée sur l'électrocardiogramme par le décalage du segment ST et dure 45min.

Le conditionnement pharmacologique est réalisé par une injection IV dans la veine jugulaire externe gauche, rendue accessible par l'incision au niveau de la gorge. Le pré-conditionnement commence 10min avant l'ischémie et le post-conditionnement commence 5min avant la reperfusion (Figure.19).

Une fois l'ischémie terminée, le fil est desserré et maintenu en place dans la cage thoracique, puis la cage thoracique et la peau sont suturées. L'animal est maintenu sous respiration artificielle jusqu'à son réveil complet puis placé dans une couveuse chauffée dont l'atmosphère est enrichie en oxygène après extubation.

B. Estimation de la taille d'infarctus

Après 24h de reperfusion, l'animal est de nouveau anesthésié en suivant le même protocole que précédemment, et est à nouveau intubé et la cage thoracique est ré-ouverte en coupant les fils de suture posés la veille. Le fil placé autour de l'artère inter ventriculaire antérieure est récupéré, et resserré afin d'occlure à nouveau l'artère. 400 µl de bleu Evans à 10 % sont injectés par la veine cave, permettant ainsi de colorer la zone saine en bleue, laissant la zone ischémique en rose (zone à risque). La diffusion du bleu d'Evans permet de discriminer la zone saine (non ischémisée) de la zone à risque (zone ischémisée). En effet le bleu diffusera librement dans la zone irriguée, et donc non ischémisée, alors que la zone privée de circulation sanguine, ischémisée, ne sera pas colorée.

Le cœur est ensuite excisé puis posé sur une compresse humide. Les oreillettes ainsi que le ventricule droit sont éliminés. Le ventricule gauche est alors découpé en partant de l'apex, à l'aide d'une lame de scalpel, en 4 tranches de 1mm de large environ. Elles sont ensuite

disposées de façon à ce que le côté base du cœur soit visible sur le dessus, puis délicatement recouvertes par une plaque en verre pour être photographiées.

Les tranches sont ensuite incubées 15-20min dans du triphényl tétrazolium chloride (TTC) afin de discriminer la zone où les cellules ont souffert de l'ischémie reperfusion par rapport aux cellules vivantes, le TTC colore en rouge les cellules vivantes, laissant les cellules morte blanches. dans le but de distinguer la zone infarctée (sans coloration, blanche) de la zone vivante (colorée en rouge brique) puis sont à nouveau photographiées.

Les tranches sont finalement pesées et la tailles des zones (à risque et nécrosées) est déterminée informatiquement en planimétrie (SigmaScanPro 5).

C. Prélèvements

Après reperfusion, l'animal est anesthésié si nécessaire en suivant le même protocole que précédemment. Le cœur est prélevé de la même façon que décrite plus haut, puis une partie (environ 20 à 50mg) de la zone à risque et, éventuellement, de zone saine et de ventricule droit sont prélevés et placés directement dans un tube eppendorf pour être ensuite plongé dans de l'azote liquide afin de les conserver.

9. Analyses des résultats et statistiques

Les résultats des différentes techniques utilisées sont récupérés sur un fichier Excel et les résultats des études sont analysés par le logiciel GraphPad Prism 5. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM. Les tests statistiques sont faits par ANOVA 1 facteur suivi de Benferroni pour la comparaison entre les groupes (sauf autrement indiqué). Une significativité est conclue pour un p value < 0.05 .

10. Modèle animal

Nos expériences ont été réalisées sur des souris mâles C57BL/6 âgés de 8 à 12 semaines provenant de chez Charles River. Comme précisé précédemment, elles ont reçu des soins humains conformes au Guide pour la prise en charge et l'utilisation des animaux de laboratoire dans notre plateforme (numéro d'accord C-693880502). Toutes nos procédures ont été approuvées par le comité local de recherche sur les animaux institutionnels (N°BH2012-65 pour la procédure chirurgicale et N°BH2012-64 pour collecte de coeur).

L'intérêt d'utiliser ces animaux réside dans leur fond génétique, très largement utilisé dans les modèles de modifications génétiques reproduisant des pathologies humaines.

**Acute induction of translocon-mediated calcium leak from
longitudinal sarcoplasmic reticulum protects cardiomyocytes against
ischemia/reperfusion injuries**

1. RESUME

CONTEXTE: Au cours de l'infarctus du myocarde, l'homéostasie du calcium entre le réticulum sarcoplasmique (RS), les mitochondries et le cytosol est altérée dans les cardiomyocytes (CM) et conduit à la mort cellulaire. Les canaux de fuite de calcium sont considérés comme des régulateurs clés de l'homéostasie calcique réticulaire. Le translocon (TLC), un composant majeur de la machine de la traduction protéique, est un important canal de fuite calcique réticulaire.

METHODES: Par des techniques d'imagerie, nous avons d'abord évalué l'organisation spatiale et la fonction du TLC dans le RS de CM de souris adultes. Dans un second temps, nous nous sommes demandé si et comment la modulation pharmacologique du TLC pouvait réduire les lésions d'ischémie/reperfusion (I/R) cardiaque dans un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris.

RÉSULTATS: Nos données montrent que le TLC est spécifiquement localisé dans le RS longitudinal des CM chez la souris adulte. Nous démontrons que la puromycine (activateur pharmacologique du TLC) induit une réduction partielle des réserves de calcium dans le RS longitudinal, alors que nous n'observons aucune altération des réserves de calcium dépendantes du récepteur ryanodine dans le RS jonctionnel. Le pré-conditionnement du cœur de souris par la puromycine, soumis à un infarctus du myocarde, diminue significativement la zone d'infarctus de près de $30,9 \pm 6,3\%$. Ceci est corrélé à une diminution de l'activation des protéines pro-apoptotiques mitochondriales et à une augmentation d'un mécanisme de pro-survie: l'autophagie. Nous avons également démontré que le pré-conditionnement à la puromycine diminue la vitesse d'augmentation du calcium dans le cytosol du CM adulte pendant la durée de l'ischémie en corrélation avec la diminution de l'activation des calpaïnes calciques.

CONCLUSIONS: Dans cette étude, nous avons caractérisé le TLC comme un canal de fuite spécifiquement situé dans le compartiment longitudinal du RS dans les CM de souris adultes. Nous avons constaté que l'activation pharmacologique du TLC avant l'infarctus du myocarde exerce un effet de pré-conditionnement sur le myocarde sans altérer les réserves de calcium dépendantes de la ryanodine. Dans l'ensemble, ces résultats mettent l'accent sur les connaissances actuelles sur la dualité entre le RS jonctionnel et le RS longitudinal et ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques.

**Acute induction of translocon-mediated calcium leak from
longitudinal sarcoplasmic reticulum protects cardiomyocytes against
ischemia/reperfusion injuries**

Ribal Al-Mawla^{1,2}, Gabriel Bidaux¹, Lucille Païta^{1,2}, Bruno Pillot¹, Camille Villedieu^{1,2},
Robert Bonvallet^{1,2}, Michel Ovize^{1,3}, Sylvie Ducreux^{1,2*}, Fabien Van Coppenolle^{1,2*‡}

1: Univ-Lyon, CarMeN laboratory, Inserm U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard
Lyon 1, INSA Lyon, Hospital Cardiology, B13 Building, Lyon East, 59 boulevard Pinel, Fr-
695000 Bron, France.

2: University of Lyon, Lyon, Cedex 07, France

3: Cardiovascular functional explorations, Louis Pradel hospital, Hospices Civils de Lyon, F-
69677, Lyon, France.

* These authors equally supervised this work.

‡ To whom correspondence should be addressed:

Fabien Van Coppenolle: fabien.van-coppenolle@univ-lyon1.fr;

CarMen Laboratory, Inserm U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1,
INSA Lyon, Hospital Cardiology, B13 Building, Lyon East,
59 boulevard Pinel, Fr-695000 Bron, France

Tel: + 33 (0)4 78.77.70.47

Short title: Cardioprotection by SR calcium leak through translocon

The total word count of the manuscript: 8373

Total text word count: 4906

ABSTRACT

BACKGROUND: During myocardial infarction, alteration of calcium homeostasis between sarcoplasmic reticulum (SR), mitochondria and cytosol occurs in cardiomyocytes (CM) and leads to cell death. Calcium leak channels are thought to be key regulators of the reticular calcium homeostasis. Translocon (TLC), a major component of the translation machinery, is a major reticular calcium leak channel.

METHODS: By the mean of photonics, we first assessed the spatial organization and the function of TLC in the SR of adult mouse CM. In a second time, we questioned if and how the pharmacological TLC modulation could reduce ischemia/reperfusion (I/R)-mediated heart injury in a model of mouse myocardial infarction.

RESULTS: Our data show that TLC is specifically located in the longitudinal SR in adult mouse CM. We demonstrate that puromycin induces a partial reduction of calcium stores in the longitudinal SR, while we observe no alteration in the ryanodine receptor-dependent calcium stores in the junctional SR. Puromycin preconditioning of mouse subjected to myocardial infarction significantly decreases the infarct area by near $30.9\pm 6.3\%$. This is correlated with a decrease in the activation of mitochondrial pro-apoptotic proteins and an increase of a pro-survival mechanism: autophagy. We further demonstrated that puromycin preconditioning decreases the rate of calcium increase in the cytosol of adult CM during the ischemia duration in correlation with the decreased activation of calcium-dependent calpains.

CONCLUSIONS: In this study, we characterized TLC as a leak channel specifically located in the longitudinal SR compartment of adult mouse CM. We found that the pharmacological activation of TLC before myocardial infarction exerts a preconditioning effect on myocardium without altering the ryanodine-dependent calcium stores. Altogether, these findings emphasize the present knowledge on the duality between junctional and longitudinal

SR in CM and open up new therapeutic perspectives.

Keywords: Calcium, Ischemia/Reperfusion, Cardiomyocytes, Translocon, Sarcoplasmic Reticulum.

Non-standard Abbreviations and Acronyms:

CM	:	Cardiomyocytes
TLC	:	Translocon
I/R	:	Ischemia/reperfusion
H/R	:	Hypoxia/reoxygenation

Clinical Perspective

Most studies on cardiomyocytes protection during ischemia/reperfusion, relied on avoidance of mitochondria's death¹ and emphasized the concept of direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. However, the disappointing results of phase III studies targeting mitochondria in order to prevent cardiomyocytes death²⁻⁴, nowadays, support the idea that linear and one-target therapeutic strategy is not anymore the most promising in the field of cardioprotection.

In the present study, we emphasized that cardiomyocytes death can be partly prevented during ischemia by the decrease in SR longitudinal calcium stores which in turn decreases calcium toxicity in both cytosol and mitochondria. Furthermore, by targeting the translocon, we demonstrated that a moderate decrease in longitudinal SR calcium stores does not modify RyR-dependent calcium stores and thus, likely does not alter cardiomyocytes contraction. This study proposes a new paradigm in cardioprotection by functionally decoupling the calcium-dependent contraction and calcium-dependent mitochondria fate.

INTRODUCTION

During myocardial infarction, ischemia (lack of oxygen and nutrients) triggers a molecular disaster including drop in ATP concentration⁵, acidosis⁶, Reactive Oxygen Species accumulation⁷ and calcium homeostasis perturbations⁸⁻¹⁰. This leads to irreversible cellular damages¹¹ that can eventually end by cardiomyocytes (CM) death¹². In this molecular storm, calcium ion, a preponderant second messenger, behaves as key inducer of ischemia/reperfusion (I/R)-mediated cell death. Indeed, the concomitant massive calcium leak from internal stores overloads mitochondrial matrix and triggers the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening^{13,14}, driving mitochondria to its terminal fate. Sarcoplasmic reticulum (SR) is the major CM internal calcium store and its calcium homeostasis is finely controlled by calcium binding proteins¹⁵ and the dynamic balance between cytosolic calcium uptake by Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases (SERCA) and calcium release across calcium channels^{16,17}. These latter are divided in two categories: 1) channels activated by signalization pathways such as Inositol-Tri-phosphate Receptors (IP₃R) and Ryanodine Receptors (RyR), activated by IP₃ and the calcium-induced calcium release mechanism respectively; 2) the calcium leak channels, which generate SR calcium leak as a side effect of their own activity^{16,17}.

Over the last decade, most of the cardioprotective research strategies targeted calcium-mediated cyclophilin D activation in mitochondria^{13,18}, or the calcium transfer from the SR to mitochondria¹⁹. However, implication of SR calcium channel in the physiopathology of I/R is still discussed. Indeed, while some studies defended implication of IP₃R₂ channels, independently of the RyR-dependent calcium stores^{13,19}, others implicated RyR₂ independently of IP₃R₂¹⁰. Strikingly, the knowledge on CM reticular organization is not yet decisive. Diads, composed of junctional SR and T-tubules, are required for the efficient

propagation of calcium waves in the sarcomeres, allowing myofibrils contractions. Junctional SR is the site of RyR₂ localization along the Z lines in CM and is thus close to subsarcolemmal mitochondria while the longitudinal SR, hosting site of IP₃R₂, spans intermyofibrillar mitochondria²⁰. Calcium content of junctional SR was reported to be smaller than that of the longitudinal SR²¹. This suggested a discontinuity in the SR cisternae or a difference in calcium buffering properties of each compartment. However, other studies support the idea of a luminal interconnection²². Finally, evidences suggested that membrane protein synthesis is independent from junctional SR²³. Interestingly, a component of the translation machinery²⁴, the translocon (TLC), is known to be a reticular calcium leak channel. However, both expression of reticular calcium leak channels in CM and their involvement in I/R-mediated mechanisms are poorly understood.

The ubiquitous heteromeric Sec61 complex forms the core of TLC pore, which is closed by the ribosome during protein synthesis. The chaperone protein GRP78/BiP binds to the luminal side to fold the neo-synthesized proteins²⁵. The study of TLC complex is actually hindered by its imperative requirement for life. Indeed both knockout and siRNA-mediated knockdown are lethal for cells and organisms. Therefore, the unique opportunity to investigate TLC role in physiopathology relies on a finely tuned pharmacological modulation²⁶. Puromycin, a translation inhibitor, terminates the peptide chain elongation and clears the protein from TLC pore that amplifies calcium leakage²⁶⁻²⁹. Conversely, emetine blocks the neo-synthesized peptide in the pore of TLC, closing it and inhibiting ribosome fixation^{26,30,31}. This pharmacological modulation of TLC kills human cancerous prostatic cells²⁷ and reduces the deleterious effects of lipotoxicity in mouse and human pancreatic cells³². Note worthily, transient puromycin treatment in cell does not affect protein synthesis. In human cancerous prostatic cells and in mouse and human pancreatic cells^{29,32}, we characterized TLC as a major

calcium leak channel, modulated by puromycin or emetine, enhanced or decreased reticular calcium leak, respectively²⁶⁻²⁸. Similar work have been performed using other cell types like *Xenopus* oocytes³³, rat liver microsomes³⁴, vascular smooth muscle cells³⁰ and Human salivary gland (HSG) cells³⁵.

In the present study, we investigated a novel cardioprotection strategy by modulating SR calcium content in CM in order to decrease calcium-dependent mitochondrial toxicity without altering the calcium-dependent contractile function. We hypothesized that acute pharmaceutical modulation of TLC could prevent mitochondrial calcium overload and could consequently decrease I/R-mediated cell death. We first characterized the TLC localization in the longitudinal SR and demonstrated that puromycin treatment decreased steady-state calcium content in this compartment that, in turn, decreased the mitochondria calcium content. Secondly, our *in vitro* and *in vivo* cardioprotection assays demonstrated that puromycin pretreatment protected the heart from I/R injuries as detected by the decreased size of the infarct area. Finally, our results revealed that puromycin-pretreatment promoted CM survival by targeting mitochondrial and cytosolic calcium-dependent mechanisms.

METHODS

For further details, see online data supplements.

Animals

Experiments were carried out on 75 male C57BL/6J mice, aged between 8 to 12 weeks and obtained from Charles River laboratories. They received human care conformed to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* in our platform (agreement number C-693880502). All our procedures were approved by the local institutional animal research committee (N°BH2012-65 for the surgical procedure and N°BH2012-64 for heart collect). Animals were randomly distributed towards different experiments and surgical procedures (calcium measuring 24; H/R 4; I/R 38; Protein expression and labeling 13).

Materials

All chemicals and fluorescent probes were purchased from Sigma-Aldrich and life-technologies respectively unless otherwise specified.

Cardiomyocytes isolation

As described previously¹³, briefly, after anesthesia, heart mice was collected after a thoracotomy. CM were enzymatically isolated by perfusion *via* langerdorff system. Once the enzymatic reaction was stopped, CM were submitted to several medium changes with gradual increase of calcium concentrations to be finally plated on laminin precoated supports in supplemented M199 medium (Gibco) at 37°C for 2h.

Immunoblot and immunostaining (see online data supplements).

Primary antibodies: Sec61- α (ab15575) and RyR₂(ab2827) were purchased from abcam, LC3-B(2775) from Cell signaling, Bax(sc-493), BCL-2(sc-492), Spectrin-alphaII/Fodrin-alpha(sc-48382), α -Tubulin(sc-5286), GRP78(sc-1050) and IP₃R₂(sc-7278) were purchased from Santa Cruz. HRP conjugated secondary antibodies were purchased from GE Healthcare and Alexa Fluor conjugated secondary fluorescent antibodies from life technologies.

Organelles labeling

Mitochondrial and SR compartments in CM were discriminated with a concomitant staining with 1 μ mol/L of ERTracker™ Blue-White DPX and 100nmol/L of mitoTracker Red CMXRos. Longitudinal SR was labeled by the mean of a concomitant staining with 1 μ mol/L of ERTracker™ Blue-White DPX and 5 μ mol/L of mag-fluo4-AM. Fluorescent indicators were incubated with CM for 45min at 37°C in CCB. Observations were examined with a NIKON eclipse Ti confocal microscope.

Fast Fourier Transform analysis

The spatial distribution similarity of Sec61, IP₃R₂ and RyR₂ in mouse CM has been achieved by analyzing fluorescence image in the spatial frequency domain using a homemade Matlab (Mathworks, Natick, Ma, USA) program. Images (256*1024 pixels; 0.100 μ m/pixel) were segmented above the mean fluorescence intensity in order to enhance the high intensity signals and to get rid of possible noise. The spatial colocalization of fluorescent signals was visualized by the generation of merged images composed of the scalar multiplication of the two signals. In order to achieve statistical analyses of frequency distribution, a total of 40 longitudinal segments (100 μ m in average) were chosen over 10 to 15 CM. These segments' width was (\approx 3 μ m) to improve the signal to noise ratio and to ensure the maximal recovery of

the fluorescence over the length of structures (ER and Z lines). Each segment was integrated over its width and a numerical fast Fourier transform (FFT) was performed over its length for Sec61, IP₃R₂, RyR₂ and merged images. The segments were composed of ≈ 400 points, as this sampling was found to be a good compromise between spectral range and resolution ($\approx 0.02\mu\text{m}^{-1}$ over a $\approx 4\mu\text{m}^{-1}$ range). To allow straightforward spectra mean calculations of image series, each spectrum was interpolated to the same resolution ($0.01\mu\text{m}^{-1}$), which was ensured not to change the relevant information (see Figure.2). Mean frequency curves have been figured out for Sec61, IP₃R₂, RyR₂ and merged signals to demonstrate the constancy of one specific spatial distribution structured with a frequency of $0.6\mu\text{m}^{-1}$. An example of the different steps of analysis is given for representative CM labeled with Sec61/RyR₂ or Sec61/IP₃R₂ (Figure.2).

Calcium measurements

After the 2h incubation in Ibidi dishes at 37°C, the culture medium was replaced by a Calcium Containing Buffer (CCB) (in mmol/L: 140NaCl, 5KCl, 10HEPES, 1MgCl₂, 2CaCl₂, 10glucose, adjusted to pH7.4) containing 5 $\mu\text{mol/L}$ of fura2-AM or mag-fura2-AM during 30min at room temperature in order to load the CM with the fluorescent probe.

- After the fura2-AM loading, cells were washed twice for 5min with a Calcium Free Buffer (CFB) (same as CCB but without CaCl₂) in which 0.1mmol/L EGTA was added.

Pretreatment protocol: CM were pretreated with 200 $\mu\text{mol/L}$ puromycin for 30min while being loaded with the probe, and in the case of double pretreatment with emetine, 20 $\mu\text{mol/L}$ of the latter was added 30min before CM probe loading. In both cases, once the drug was added, it remained present during the whole experiment.

After signal stabilization, CM were stimulated by either 5 μ mol/L ionomycin, 25 μ mol/L FCCP or 10mmol/L caffeine.

- Hypoxia was performed in a hypoxic chamber (okolab-Bold line) where temperature and oxygen level were monitored. Fura2-AM loaded CM were washed with CCB, then, after fluorescence signal stabilization, the medium was replaced by the hypoxic buffer (CCB without glucose) and oxygen level was decreased to 1%. After 30min of hypoxia, CM were stimulated by 10mmol/L caffeine.
- For mag-fura2-AM experiments, cellular permeabilization was required in order to remove the cytoplasmic probe: after loading, CM were washed with CCB, for 5min. Following signal stabilization, 10 μ mol/L of digitonin (Sigma) was added. As soon as the signal changed, extracellular medium was replaced by an intracellular medium (in mmol/L: 25NaCl, 125KCl, 10HEPES, 0.1MgCl₂, 0.5CaCl₂, 1EGTA, 10glucose, adjusted to pH7.4) supplemented by 200mmol/L ATP (Sigma). Drugs were added after signal stabilization.

Measurements were performed using a wide field LeicaDMI6000B microscope equipped with Orca-Flash4.0 digital camera (HAMAMATSU). CM were double excited at 340 and 380nm and emission was collected at 510nm with identical acquisition parameters.

CM mortality

CM hypoxia was assessed using a hypoxia chamber where the oxygen level was monitored thanks to a probe placed in the chamber (Ref: O2Sens®Box, Adellio®). After the 2h of CM culture, the M199 medium was rinsed and replaced by a hypoxic medium, then placed in the hypoxia chamber at 37°C ventilated by a gas mixture (95%N₂ and 5%CO₂). Hypoxia started when oxygen level reached 1%. After 30min of hypoxia, the supernatant was replaced without

rinsing by M199 medium during the 2h reperfusion period that took place in an incubator at 37°C. The preconditioning protocol began 10min before the onset of hypoxia in the culture medium and the molecules remained present all along the experiment.

As an internal control, CM were subjected to 2h hypoxia and 30min reoxygenation (Isch 100%) to mimic maximum mortality (Figure.5A). CM mortality was assessed by measuring LDH secretion using LDH kit (abcam).

***In vivo* model of acute myocardial IR injury**

As described previously^{13,14}, after anesthesia, C57BL/6J (male, 8-10 weeks old) were subjected to 45 min regional myocardial ischemia by ligation of the left anterior descending coronary artery followed by reperfusion. Preconditioning was performed by IV injection of puromycin in the jugular vein 10min before ischemia while control mice were injected with saline solution.

Myocardial infarct size was determined by triphenyltetrazolium staining (TTC) and expressed in percentage of the ratio of the necrosis area (AN) over the area-at-risk (AR) after 24h of reperfusion (Figure.5C).

Another group of hearts was used for immunoblot analysis. Areas-at-risk (that underwent I/R) were collected after 15min or 24h of reperfusion. Sham mice that underwent surgery without I/R were used as control.

Statistical analysis

Data are presented as mean±S.E.M. Experiments were performed at least three times in duplicates or more. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5 software (La Jolla, CA, USA). For two groups comparison, unpaired t-test with Welch's correction was

used, while one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni post-hoc test was used to analyze differences between multiple groups (unless otherwise specified). $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

1. Spatial distribution of TLC in CM.

TLC expression in mouse CM was confirmed by western blot (Figure.1A). We first assessed how junctional SR, longitudinal SR, and mitochondria compartments were spatially distributed in CM. As shown in the supplementary Figure.S1, ERTracker blue probe, a specific ER probe, labeled elongated compartment in the longitudinal axis of CM. Surprisingly, no transversal signal staining the junctional SR was detected. CM were concomitantly labeled by mitoTracker red probe, labeling mitochondria (Figure.S1A). Intermyoibrillar mitochondria appeared aligned along the longitudinal axis and spanned into ERTracker signal. This confirms that longitudinal SR specifically surrounded intermyofibrillar mitochondria. We next assessed in which of the two SR areas TLC was located. Immunofluorescence of Sec61, one of the TLC pore-forming proteins, stained longitudinal SR compartments in mouse CM (Figure.1B) similarly to IP_3R_2 staining. By means of a spatial frequency domain analysis using the fast Fourier transform (FFT) algorithm, we assessed whether Sec61 signal spread randomly or showed a structured organization compared to RyR_2 and IP_3R_2 . FFT analysis revealed that the three signals shared a common peak frequency at $0.6\mu\text{m}^{-1}$ (Figure.2A-B-C). This corresponds to a $1.67\pm 0.3\mu\text{m}$ periodic signal, which is equivalent to the expected distance between Z lines while sarcomeres are relaxed. The distribution of intermyofibrillar mitochondria along the longitudinal axis of CM (Figure.S1B) also revealed this characteristic frequency of $0.6\mu\text{m}^{-1}$. Fast Fourier transform of the Longitudinal SR labeling by ERTracker also showed the same peak of frequency, even though its amplitude was smaller and similar to the peaks of frequency of Sec61 and IP_3R_2 signals. Interestingly, we noticed a phase shift between Sec61

and RyR₂ signals (Figure.2C) while IP₃R₂ distribution was partially in phase with RyR₂ distribution. This suggests a close proximity between the domains expressing of these two channels. Besides, our results demonstrated that Sec61 and RyR₂ expressions are mutually exclusive along the longitudinal axis.

Altogether, our results showed that TLC localization is limited by the longitudinal SR which surrounded the mitochondrial compartment. Since TLC activity was known to generate ER calcium leak in non-CM cell models, we hypothesized that modulation of calcium leak through TLC could shift the mitochondrial calcium content during I/R in CM.

2. TLC activation decreases calcium content in longitudinal SR in isolated mouse CM.

We first investigated the functionality of TLC as a reticular calcium leak channel by monitoring the evolution of reticular calcium content with mag-fura2-AM fluorescent probe in CM treated with puromycin for 25min. A significant and progressive decrease of SR calcium concentration was observed (Figure.3A-B). In the same line of evidence, the remaining calcium stores after puromycin-mediated depletion was $18.7 \pm 5.4\%$ lower than in Ctrl CM (Figure.3C) as assessed by a treatment with angiotensin II and CPA (inhibitor of SERCA pumps). However, the total reticular calcium content was similar in Ctrl and puromycin-treated CM (Figure.3D). Although mag-fura2-AM is usually used to detect variation in reticular calcium due to its high calcium dissociation constant, its localization in CM was unknown. Mag-fluo4 and ERTracker staining were revealed in longitudinally elongated and overlapping structures (Figure.3E). We thus concluded that puromycin-induced SR calcium leak occurred in the longitudinal SR where TLC lies.

We next assessed whether the calcium stores in the other compartments could also be

modulated by the activation of TLC.

3. The puromycin-sensitive calcium stores shift steady-state calcium in mitochondria but are independent of the caffeine-sensitive pool.

We measured total calcium content in CM loaded with fura2-AM and treated with ionomycin. Steady-state calcium concentration in cytosol was unchanged after puromycin-pretreatment for 30min, but was decreased by $7.2\pm 1.2\%$ after a pretreatment with emetine prior to puromycin (Figure.4A-B). A non-significant ($p=0.08$) decrease in total cell calcium content was observed in CM pretreated with puromycin or concomitantly pretreated by puromycin and emetine (Figure.4A-C). This absence of significant variation in the total cell calcium content looked paradoxical to the observed decreased in longitudinal SR calcium stores in puromycin-pretreated cells. Since released calcium may have been uptaken by mitochondria, we examined steady-state calcium content in mitochondria. FCCP, an ionophore used to decouple ATP synthesis from the mitochondrial respiratory chain, induced the leak of mitochondrial calcium content, which was measured by the cytosolic fura2-AM probe. Puromycin pretreatment significantly decreased mitochondrial calcium stock by $29.1\pm 8.3\%$ (Figure.4D-E). As expected, this reduction was abrogated by the inhibition of TLC by emetine. Following mitochondrial calcium release by FCCP stimulation, CM were treated by ionomycin in order to estimate the remaining calcium cellular stores (Figure.4D-F). Puromycin pretreated cells showed a decrease of 38.3 ± 9.1 in the released calcium content. This decrease was inhibited by emetine pretreatment.

We next assessed whether the decrease in longitudinal SR calcium stores could modify junctional SR calcium stores. CM were treated with 10mmol/L caffeine to activate RyR, which is preferentially located in the junctional SR membrane²⁰ as shown in the Figure.2.

Caffeine-mediated calcium release from SR was modified neither by puromycin nor by puromycin+emetine pretreatment (Figure.4G-H). Ionomycin treatment after caffeine stimulation showed a reduction of $64.4\pm 5.2\%$ in ER calcium stores in puromycin-pretreated CM compared to control CM (Figure.4I). Conversely, emetine pretreatment not only abolished the effect of puromycin, but also triggered a $+1.37\pm 0.17$ -fold increase in the remaining calcium stock compared to control CM (Figure.4I). Although, this remaining calcium stores could be attributed to both mitochondria and longitudinal SR, we thus estimated calcium content in mitochondria following caffeine-mediated calcium release. No difference could be observed between control and puromycin-pretreated cells (Figure.S2).

Cytosolic calcium oscillations occurring in CM during ischemia play an important role in cell mortality *via* the activation of calcium-dependent proteases like calpains. We thus investigated whether puromycin preconditioning could decrease cytosolic calcium overload occurring during hypoxia (Figure.4J). The rate of cytosolic calcium increase over hypoxia was figured out and it reflected the mean activity of hypoxia-mediated calcium fluxes into CM cytosol. As reported in the Figure.4K, the rate of cytosolic calcium increase dropped over a 30min hypoxia in CM pretreated with puromycin compared to Ctrl CM ($0.31\pm 0.03\text{ s}^{-1}$ and $1.1\pm 0.2\text{ s}^{-1}$, respectively). Importantly, caffeine-dependent calcium stores after the 30min hypoxia were similar between Ctrl and puromycin preconditioned CM ($0.46\pm 0.05\text{ s}^{-1}$ vs. $0.34\pm 0.05\text{ s}^{-1}$ respectively) (Figure.4J-K). In addition, steady-state caffeine-dependent calcium fluxes, estimated by the rate of cytosolic calcium increase after caffeine treatment, significantly increased after 30min of hypoxia (Figure.S4).

Altogether, our results confirm that pharmaceutical modulation of TLC induces calcium leak from the longitudinal SR in CM. Besides, we found that the puromycin-mediated decrease in reticular stores is correlated to a concomitant decrease in the mitochondrial calcium content.

Finally, our results demonstrated autonomous but erratic calcium increases in cytosol of CM during hypoxia. The mean rate of these calcium increases was found to be about 3-times higher than the rate of induced calcium increase solely by RyR₂ channels. We demonstrated that the puromycin-mediated decrease in longitudinal SR calcium stores was accompanied by a 3-fold decrease in the rate of cytosolic calcium increase during hypoxia. However, we found that neither hypoxia nor puromycine treatment modified the caffeine-dependent calcium stores – attributed to junctional SR. We thus wondered whether puromycin pretreatment could protect CM against I/R.

4. Puromycin pretreatment protects CM after *in vitro* hypoxia/reoxygenation (H/R), and reduces infarct size in mice submitted to I/R *in vivo*.

CM death after H/R was assessed with LDH assay kit. LDH quantification was performed after 30min hypoxia and 2h reoxygenation with or without puromycin pretreatment (Figure.5A). Results showed a significant protective effect of puromycin pretreatment on CM submitted to H/R by reducing cell mortality by 32±2% compared to control H/R (Figure.5B). Since TLC stimulation by puromycin enhanced cell survival when submitted to H/R, we assessed its putative protective action in an *in vivo* mouse model of myocardial I/R preconditioned or not with puromycin. In order to optimize the treatment efficiency, we performed dose-effect experiments. Infarct size estimation was figured out after 45min ischemia and 24h reperfusion (Figure.5C). Optimal preconditioning was obtained with a 0.8mg/kg puromycin treatment and showed a reduction of 30.9±6.3% in infarct size compared to Ctrl mice (Figure.5D). Higher puromycin concentrations failed to protect mouse heart.

Although, we found a correlation between *in vivo* myocardial infarction assay and the decrease in steady-state calcium content in longitudinal SR and in mitochondria, we finally

investigated the calcium-dependent cell processes beneath the cardioprotective effect of puromycin-mediated SR calcium leak.

5. Longitudinal SR calcium leak prevents the increase in cytosolic calcium concentration and apoptosis, while stimulates autophagy in I/R mouse myocardium.

Cytosolic and mitochondrial pro-apoptotic pathways were studied by quantifying the expression levels of marker proteins in Sham and I/R left ventricle samples from mice with or without 0.8mg/kg puromycin preconditioning.

Proteins were extracted from the area-at-risk after either 15min or 24h reperfusion. As expected, the Bax/BCL-2 protein ratio, reporting apoptosis induction, increased in Ctrl I/R mice after a 24h reperfusion (2.2 ± 0.1 vs. 1.2 ± 0.1 in Sham). This increase was significantly abrogated after puromycin preconditioning (1.5 ± 0.1) (Figure.6A-B). LC3-B protein, a major component of the autophagy mechanism was also quantified by measuring the ratio of LC3-BI over LC3-BII expression. Results showed a significant increase in LC3-B protein ratio after a 15min reperfusion in both Ctrl and puromycin I/R mice, compared to Sham. Besides, puromycin preconditioned mice had decreased LC3-B protein ratio compared to Ctrl I/R mice (Ctrl I/R 3.0 ± 0.1 , Puro I/R 2 ± 0.2 and Sham 1.3 ± 0.1). Conversely, after a 24h reperfusion, LC3-B proteins expression in Ctrl I/R mice was similar to Sham (1.2 ± 0.1 and 1.2 ± 0.1 respectively), while puromycin preconditioned mice showed a significant increase of these proteins expression ratio level: 1.7 ± 0.1 (Figure.6C-D).

Finally increase in calpain-dependent cleavage of Fodrin- α was detected mostly after a 24h reperfusion in Ctrl I/R mice (3.3 ± 0.2 vs. 0.8 ± 0.1 in Sham). This increase was significantly lowered at 2 ± 0.2 by puromycin preconditioning (Figure.6E-F). We demonstrated that

puromycin treatment reduced the mean calcium overload in cytosol during hypoxia (Figure.4G-K) which correlates with the decreased activity of calcium-dependent calpain proteases in the cytosol of CM from I/R heart.

As a summary, our results demonstrated that TLC-mediated SR calcium leak in longitudinal SR protects mouse myocardium from I/R injuries by decreasing calcium toxicity in both cytosol and mitochondria. This in turn attenuates I/R-mediated apoptosis while increasing pro-survival autophagy.

DISCUSSION

Over the last decades, better understanding of I/R injuries mechanisms¹ led to strong progresses in the field of cardioprotection. However, the results of several recent phase III clinical trials were disappointing and the idea of focusing only on mitochondria-mediated CM death was insufficient, although necessary. Further investigations are thus needed to develop complementary protective strategies against myocardial infarction. In this context, our study aimed to deciphering the specific role of calcium leak from reticular stores in I/R, and to assess the effects of its pharmacological modulation in heart cardioprotection.

Insights in spatial and functional organization of SR.

Electronic micrographs, first, revealed the continuous membrane between both the junctional and longitudinal SR in CM³⁶. Caffeine-induced calcium release from SR stores has been reported to empty most part, if not all, of the SR calcium content that supports the luminal connection between the two compartments. An estimation of the calcium stores has revealed a 5-6 times lower content in the junctional SR than in the longitudinal SR²¹. Along the same line of evidence, RyR-mediated calcium release from SR stores has been characterized by 2 time constants suggesting the existence of two calcium stores having different properties³⁷. Paradoxically, this suggests that the action mass law is not conserved while equilibrium of the free calcium concentration would be expected in the luminal continuum of SR. An alternative model based on an asymmetry of concentration of the SR calcium binding protein, calsequestrin, between junctional and longitudinal SR in skeletal myocytes has been proposed to explain how a continuous SR compartment could, however, present local heterogeneity in calcium content³⁸. This model is supported by a study reporting how calsequestrin2 concentration regulates the calcium content in the junctional SR of CM³⁷. Interestingly, our

experiments with the calcium-sensitive reticular fluorescent indicators (mag-fluo4-AM) demonstrate an asymmetry in the fluorescent signal since only the longitudinal SR was stained. It is thus likely that average calcium content in junctional SR is too low compared to calcium content in longitudinal SR to detect mag-fluo4-AM fluorescence in both at the time. This discrepancy could be explained by different buffering capacities as explained above. However, the asymmetrical localization of ERTracker is unlikely explained by different calcium concentration and could better rely on luminal molecular crowding and diffusion hindrance inside the lumen since long duration of incubation should have allowed the loading in junctional SR.

Altogether, these results confirm the specialization of the two SR calcium stores: junctional and longitudinal, even though the nature of the asymmetrical calcium content between both compartments cannot be confirmed. Nevertheless, the spatial and temporal characteristics of calcium fluxes have been reported to orchestrate cell response to stimuli³⁹. This theory likely explains why the junctional SR and T-tubules-forming diads are required to the efficient propagation of high calcium concentration in the sarcomeres and allowing myofibrils contractions. This consequently suggests that longitudinal SR has a specific role, which could likely be the modulation of cell bioenergetics by controlling the mitochondrial calcium content. Cell bioenergetics are intimately bound to nucleic acids and proteins synthesis. Conversely drop in ATP levels during I/R is known to arrest transcription and translation while stimulating pro-survival mechanisms such as autophagy (for review, read⁴⁰). This connection between reticular calcium stores, translation and cell bioenergetics emphasizes the importance of studying the mechanisms of the SR calcium leak.

TLC-mediated calcium leak as a key mechanism of calcium homeostasis in CM.

McFarland *et al.* first reported that TRAP (translocon-associated protein), a major protein of

the TLC complex is mainly located in longitudinal SR in rat CM²⁰. Our results confirm this preferential localization of Sec61 in longitudinal SR in mouse CM. Furthermore, we show that TLC-mediated calcium leak in longitudinal SR does not interfere with calcium stores in junctional SR. These findings further support a model with two functional SR compartments in which the longitudinal SR calcium content would be involved in the mitochondrial calcium homeostasis. Mitochondrial calcium concentration is mainly affected by calcium transfer from the reticulum stores^{14,41-43} and is well known to control mitochondria bioenergetics and fate. In this study, we show that the induction of calcium leak *via* TLC correlates with a drop in mitochondrial calcium content. In the cyclophilin D knockout mice, a drop in steady-state calcium concentration in mitochondria is caused by a decrease in SR to mitochondria calcium transfer and is associated with a decrease in CM death after I/R¹³. Like for TLC-mediated calcium leak, this mechanism does not involve RyR-dependent calcium stores. Interestingly, Hall AR *et al*¹⁹ suggested that the cardioprotection observed in the double knockout of mitofusin 1 and 2 involved the loss of proximity between VDAC, in mitochondria, and RyR₂ in SR. However, they did not investigate the role of IP₃R-Grp75-VDAC tethers. Besides, the authors clearly stated that this mouse KO line presented a strong myocontractile impaired function. We believe that it is thus difficult to assess the causality of mechanisms in a pathological model. In the same line, it was shown that a leaky mutant of the RyR₂ (RyR₂-S2808D) increased mitochondrial content and infarct area after I/R¹⁰. However, it can be clearly seen in the basal measure of the left ventricular ejection fraction that the expression of this leaky RyR₂ modifies the basal heart efficacy as well¹⁰. Finally, our results do not preclude a role for RyR₂ receptors at the junction between junctional and longitudinal SR, but conversely propose a RyR₂-independent strategy to transiently modulate SR calcium content without affecting the CM physiology. Indeed, we observed that the decrease of the SR

calcium content had beneficial effects on heart after I/R. A similar proof-of-concept has been previously reported by Petrovski *et al.*⁴⁴. These authors reported the beneficial effects of thapsigargin (a SERCA pump inhibitor that induces reticular calcium leak at low doses) in a preconditioning protocol in rats. They reported that thapsigargin pretreatment decreased infarct size and improved left ventricular function. However, it is obvious that SERCA inhibition will also lead to inhibition of CICR and thus prevents CM contraction. Note worthily, these authors reported that thapsigargin treatment induced both ER stress and autophagy. Although mitochondria are thought to be a hub for cell fate pathways in cardioprotection, it is likely that cytosolic process may also contribute.

Mechanisms of I/R-mediated cell death and their control by SR stores.

As expected by the decrease in calcium content in both SR and mitochondria in puromycin-pretreated CM, the expression of the pro-apoptotic markers Bax/BCL-2 mainly 24h after reperfusion were reduced. This confirms that the cardioprotective effect of puromycin-induced calcium leak is partly related to the mitochondrial pathways. In the same line, White *et al.* have shown that reticular calcium leakage through IP₃R protects cells against apoptosis after overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 or Bcl-xl⁴⁵.

As already mentioned, mild SR calcium depletion with low doses of thapsigargin was shown to induce a moderate ER stress and triggered autophagy. These two cell mechanisms were known to be cardioprotective^{44,46}. In the current study, we reported that puromycin treatment increased expression of GRP78, an ER stress marker after 24h of reperfusion (Figure.S3). In parallel of ER stress, we found that autophagy was increased at 24h of reperfusion. Along the same line, Yao *et al.* reported a cardioprotective transition from apoptosis to autophagy after a 24-hour reperfusion⁴⁷. Interestingly, ER stress and decreased mitochondrial calcium level enhances the activity of survival AMP-activated protein kinase (AMPK) in CM model that

leads to induction of autophagy^{41,48}.

In puromycin-pretreated CM, we further report a concomitant decrease in calcium fluxes towards cytosol during hypoxia and a decrease in calpain-dependent Fodrin- α cleavage. Calpain is a calcium-dependent protease, which participates in the induction of apoptosis and necrosis⁴⁹ and which inhibition reduces infarct size and participates in cardioprotection mechanisms (for review see⁴⁹⁻⁵²).

Our results emphasize that the modulation of the longitudinal SR calcium content modifies concomitantly several cell processes: mitochondria calcium content and apoptosis, ER stress and autophagy, as well as calpain activation (summarized in the Figure.7). We believe that this multiple consequences of the decrease in SR calcium content could induce a robust cardioprotective effect, less prone to individual fluctuations.

Acknowledgments

None

Sources of Funding

This work was supported by a grant from IDRS (Institut de Recherche Servier) Servier Laboratories and INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale) (132484/BR/VO-Réf INSERM:131589A10).

Disclosures

None

References

1. Hausenloy DJ, Barrabes JA, Bøtker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J, Engstrom T, Ferdinandy P, Carbrera-Fuentes HA, Heusch G, Ibanez B, Iliodromitis EK, Inseste J, Jennings R, Kalia N, Kharbanda R, Lecour S, Marber M, Miura T, Ovize M, Perez-Pinzon MA, Piper HM, Przyklenk K, Schmidt MR, Redington A, Ruiz-Meana M, Vilahur G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Garcia-Dorado D. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol*. 2016;111:70.
2. Cung T-T, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, Bonnefoy-Cudraz E, Guérin P, Elbaz M, Delarche N, Coste P, Vanzetto G, Metge M, Aupetit J-F, Jouve B, Motreff P, Tron C, Labeque J-N, Steg PG, Cottin Y, Range G, Clerc J, Claeys MJ, Coussement P, Prunier F, Moulin F, Roth O, Belle L, Dubois P, Barragan P, Gilard M, Piot C, Colin P, De Poli F, Morice M-C, Ider O, Dubois-Randé J-L, Untersee H, Le Breton H, Béard T, Blanchard D, Grollier G, Malquarti V, Staat P, Sudre A, Elmer E, Hansson MJ, Bergerot C, Boussaha I, Jossan C, Derumeaux G, Mewton N, Ovize M. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2015;373:1021–1031.
3. Argaud L, Cour M, Dubien P-Y, Giraud F, Jossan C, Riche B, Hernu R, Darmon M, Poncelin Y, Tchénio X, Quenot J-P, Freysz M, Kamga C, Beuret P, Usseglio P, Badet M, Anette B, Chaulier K, Alasan E, Sadoune S, Bobbia X, Zéni F, Gueugniaud P-Y, Robert D, Roy P, Ovize M, CYRUS Study Group. Effect of Cyclosporine in Nonshockable Out-of-Hospital Cardiac Arrest: The CYRUS Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol*. 2016;1:557–565.
4. Ottani F, Latini R, Staszewsky L, La Vecchia L, Locuratolo N, Sicuro M, Masson S, Barlera S, Milani V, Lombardi M, Costalunga A, Mollicelli N, Santarelli A, De Cesare N, Sganzerla P, Boi A, Maggioni AP, Limbruno U, CYCLE Investigators. Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction: The Multicenter, Controlled, Open-Label CYCLE Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67:365–374.
5. Sztark F, Payen JF, Piriou V, Rigoulet M, Ventura-Clapier R, Mazat JP, Leverve X, Janvier G. Cellular energy metabolism: physiologic and pathologic aspects. *Ann Fr Anesth Reanim*. 1999;18:261–269.
6. Nabel EG, Braunwald E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2012;366:54–63.
7. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord ENJ, Smith AC, Eyassu F, Shirley R, Hu C-H, Dare AJ, James AM, Rogatti S, Hartley RC, Eaton S, Costa ASH, Brookes PS, Davidson SM, Duchon MR, Saeb-Parsy K, Shattock MJ, Robinson AJ, Work LM, Frezza C, Krieg T, Murphy MP. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 2014;515:431–435.
8. Saini HK, Dhalla NS. Defective calcium handling in cardiomyocytes isolated from hearts

- subjected to ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H2260-2270.
9. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol*. 2005;14:170–175.
 10. Santulli G, Xie W, Reiken SR, Marks AR. Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:11389–11394.
 11. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68–78.
 12. Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, Baxter GF, Schulz R. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacol Rev*. 2014;66:1142–1174.
 13. Paillard M, Tubbs E, Thiebaut P-A, Gomez L, Fauconnier J, Da Silva CC, Teixeira G, Mewton N, Belaidi E, Durand A, Abrial M, Lacampagne A, Rieusset J, Ovize M. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation*. 2013;128:1555–1565.
 14. Gomez L, Thiebaut P-A, Paillard M, Ducreux S, Abrial M, Crola Da Silva C, Durand A, Alam MR, Van Coppenolle F, Sheu S-S, Ovize M. The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3 β during reperfusion injury. *Cell Death Differ*. 2016;23:313–322.
 15. Yáñez M, Gil-Longo J, Campos-Toimil M. Calcium binding proteins. *Adv Exp Med Biol*. 2012;740:461–482.
 16. Sammels E, Parys JB, Missiaen L, De Smedt H, Bultynck G. Intracellular Ca²⁺ storage in health and disease: a dynamic equilibrium. *Cell Calcium*. 2010;47:297–314.
 17. Fearnley CJ, Roderick HL, Bootman MD. Calcium Signaling in Cardiac Myocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3:a004242.
 18. Teixeira G, Chiari P, Fauconnier J, Abrial M, Couture-Lepetit E, Harisseh R, Pillot B, Lacampagne A, Tourneur Y, Gharib A, Ovize M. Involvement of Cyclophilin D and Calcium in Isoflurane-induced Preconditioning. *Anesthesiology*. 2015;123:1374–1384.
 19. Hall AR, Burke N, Dongworth RK, Kalkhoran SB, Dyson A, Vicencio JM, Dorn II GW, Yellon DM, Hausenloy DJ. Hearts deficient in both Mfn1 and Mfn2 are protected against acute myocardial infarction. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2238.
 20. McFarland TP, Milstein ML, Cala SE. Rough endoplasmic reticulum to junctional sarcoplasmic reticulum trafficking of calsequestrin in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49:556–564.
 21. Inui M, Wang S, Saito A, Fleischer S. Characterization of junctional and longitudinal
-

- sarcoplasmic reticulum from heart muscle. *J Biol Chem.* 1988;263:10843–10850.
22. Glembotski CC. Roles for the sarco-/endoplasmic reticulum in cardiac myocyte contraction, protein synthesis, and protein quality control. *Physiol Bethesda Md.* 2012;27:343–350.
 23. Sleiman NH, McFarland TP, Jones LR, Cala SE. Transitions of protein traffic from cardiac ER to junctional SR. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;81:34–45.
 24. Pfeffer S, Dudek J, Zimmermann R, Förster F. Organization of the native ribosome-translocon complex at the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1860:2122–2129.
 25. Voorhees RM, Hegde SR. Toward a structural understanding of co-translational protein translocation. *Curr Opin Cell Biol.* 2016;41:91–99.
 26. Flourakis M, Van Coppenolle F, Lehen'kyi V 'yacheslav, Beck B, Skryma R, Prevarskaya N. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2006;20:1215–1217.
 27. Hammadi M, Oulidi A, Gackière F, Katsogiannou M, Slomianny C, Roudbaraki M, Dewailly E, Delcourt P, Lepage G, Lotteau S, Ducreux S, Prevarskaya N, Van Coppenolle F. Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2013;27:1600–1609.
 28. Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E, Prevarskaya N. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci.* 2004;117:4135–4142.
 29. Lomax RB, Camello C, Van Coppenolle F, Petersen OH, Tepikin AV. Basal and physiological Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons. *J Biol Chem.* 2002;277:26479–26485.
 30. Amer MS, Li J, O'Regan DJ, Steele DS, Porter KE, Sivaprasadarao A, Beech DJ. Translocon closure to Ca²⁺ leak in proliferating vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296:H910-916.
 31. Jiménez A, Carrasco L, Vázquez D. Enzymic and nonenzymic translocation by yeast polysomes. Site of action of a number of inhibitors. *Biochemistry (Mosc).* 1977;16:4727–4730.
 32. Cassel R, Ducreux S, Alam MR, Dingreville F, Berlé C, Burda-Jacob K, Chauvin MA, Chikh K, Païta L, Al-Mawla R, Crola Da Silva C, Rieusset J, Thivolet C, Van Coppenolle F, Madec AM. Protection of Human Pancreatic Islets from Lipotoxicity by Modulation of the Translocon. *PloS One.* 2016;11:e0148686.

33. Paredes RM, Bollo M, Holstein D, Lechleiter JD. Luminal Ca²⁺ depletion during the unfolded protein response in *Xenopus* oocytes: cause and consequence. *Cell Calcium*. 2013;53:286–296.
34. Giunti R, Gamberucci A, Fulceri R, Bánhegyi G, Benedetti A. Both translocon and a cation channel are involved in the passive Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum: a mechanistic study on rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 2007;462:115–121.
35. Ong HL, Liu X, Sharma A, Hegde SR, Ambudkar IS. Intracellular Ca(2+) release via the ER translocon activates store-operated calcium entry. *Pflugers Arch*. 2007;453:797–808.
36. Simpson FO, Rayns DG. The relationship between the transverse tubular system and other tubules at the Z disc levels of myocardial cells in the ferret. *Am J Anat*. 1968;122:193–207.
37. Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Györke I, Volpe P, Williams SC, Györke S. Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: Mechanism for hereditary arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:11759–11764.
38. Manno C, Sztretye M, Figueroa L, Allen PD, Ríos E. Dynamic measurement of the calcium buffering properties of the sarcoplasmic reticulum in mouse skeletal muscle. *J Physiol*. 2013;591:423–442.
39. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:517–529.
40. Bairwa SC, Parajuli N, Dyck JRB. The role of AMPK in cardiomyocyte health and survival. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862:2199–2210.
41. Camara AKS, Lesnefsky EJ, Stowe DF. Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13:279–347.
42. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*. 2008;27:6407–6418.
43. Bravo-Sagua R, Rodriguez AE, Kuzmicic J, Gutierrez T, Lopez-Crisosto C, Quiroga C, Díaz-Elizondo J, Chiong M, Gillette TG, Rothermel BA, Lavandero S. Cell death and survival through the endoplasmic reticulum-mitochondrial axis. *Curr Mol Med*. 2013;13:317–329.
44. Petrovski G, Das S, Juhasz B, Kertesz A, Tosaki A, Das DK. Cardioprotection by endoplasmic reticulum stress-induced autophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14:2191–2200.
45. White C, Li C, Yang J, Petrenko NB, Madesh M, Thompson CB, Foskett JK. The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. *Nat Cell Biol*. 2005;7:1021–1028.

46. Belaidi E, Decorps J, Augeul L, Durand A, Ovize M. Endoplasmic reticulum stress contributes to heart protection induced by cyclophilin D inhibition. *Basic Res Cardiol*. 2013;108:363.
47. Yao T, Ying X, Zhao Y, Yuan A, He Q, Tong H, Ding S, Liu J, Peng X, Gao E, Pu J, He B. Vitamin D receptor activation protects against myocardial reperfusion injury through inhibition of apoptosis and modulation of autophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22:633–650.
48. Park M, Sabetski A, Kwan Chan Y, Turdi S, Sweeney G. Palmitate induces ER stress and autophagy in H9c2 cells: implications for apoptosis and adiponectin resistance. *J Cell Physiol*. 2015;230:630–639.
49. Neuhof C, Neuhof H. Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World J Cardiol*. 2014;6:638–652.
50. Insete J, Barba I, Hernando V, Garcia-Dorado D. Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium. *Cardiovasc Res*. 2009;81:116–122.
51. Insete J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Agulló L, Pina P, Soler-Soler J. Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovasc Res*. 2004;64:105–114.
52. Khalil PN, Neuhof C, Huss R, Pollhammer M, Khalil MN, Neuhof H, Fritz H, Siebeck M. Calpain inhibition reduces infarct size and improves global hemodynamics and left ventricular contractility in a porcine myocardial ischemia/reperfusion model. *Eur J Pharmacol*. 2005;528:124–131.

FIGURE LEGENDS**Figure.1: TLC expression in CM.**

A, Sec61, the major component of TLC was detected by the immunoblotting of cardiomyocytes protein extracts from 4 mouse hearts by SDS-PAGE. α -tubulin reported the protein loading in each lane. 40 μ g of proteins were loaded. **B**, Immunofluorescence shows the spatial organization of TLC, IP₃R₂ and RyR₂ in isolated adult mouse CM. Scale bar: 10 μ m.

Figure.2: TLC localization in CM.

Immunofluorescence showing the concomitant detection of Sec61 and IP₃R₂ in longitudinal structures (**A**, left) while RyR₂ localizes along transversal Z lines (**B**, left). Curves show the intensity profiles (top right), analytic spectrum (middle right) and interpolation of the fast Fourier Transforms (FFT) spectrum (bottom right). **C**, Mean amplitude of FFT of Sec61, IP₃R₂ and RyR₂ along the longitudinal axis of CM. **D**, Representative profile of fluorescence intensity along the longitudinal axis of CM emphasizes the concomitance of IP₃R₂ and TLC fluorescence signal and the mutually exclusive distribution of TLC and RyR₂. 30 cells were analyzed for each group.

Figure.3: TLC activation by puromycin induces a decrease in reticular calcium stock.

A, Graphical representation of the mag-fura2-AM fluorescence ratio evolution with time in control condition and in response to 25min of 200 μ mol/L puromycin treatment, both stimulated with 5 μ mol/L Angiotensin II (AgII)+15 μ mol/L CPA; Representative curve of reticular fluorescence evolution in Ctrl condition and under puromycin treatment. **B**, Representative histogram of: reticular calcium decrease at the end of 25min perfusion with or without puromycin compared to initial fluorescence. **C**, The reticular calcium stock after

puromycin or control treatment estimated by AgII+CPA stimulation, calculated as difference between fluorescence level at stimulation time and final fluorescence. **D**, The total calcium decrease, calculated as difference between initial fluorescence and final fluorescence, under control or puromycin treatment followed by AgII+CPA stimulation. The mean of the control was used as reference (100%). **E**, Colocalization of mag-fluo4-AM and ERTracker™ Blue-White DPX in longitudinal SR of mouse CM reveals high calcium content. Data are represented as mean±SEM. n=cell count. Statistics: ++ p<0.01, vs. T=0, \$\$ p<0.01 vs. T=28 Ctrl.

Figure.4: The reticular puromycin mediated calcium stock release is independent of the one stimulated by caffeine and does not affect CM calcium resting.

Time traces show cytosolic calcium concentration assessed by fura2-AM cytosolic probe, in Ctrl condition, and after 30min of 200µmol/L puromycin pretreatment or 20µmol/L emetine+200µmol/L puromycin pretreatment (**A**, **D** and **G**). Effect of puromycin and emetine+puromycin was measured after CM pretreatment in CCB for 30min (See Materials and Methods). Fluorescence values are normalization of fura2-AM fluorescence ratio divided by fura2-AM fluorescence ratio at origin (F/F_0). Histograms represent the steady-state cytosolic calcium concentration (**B**), total cell calcium content assessed by 5µmol/L of ionomycin stimulation (**C**), mitochondrial calcium content assessed by 25µmol/L of FCCP stimulation (**E**), remaining cell calcium content after FCCP stimulation assessed by ionomycin stimulation (**F**), RyR₂-dependent calcium stores assessed by 10mmol/L of caffeine stimulation (**H**) and remaining cell calcium content after caffeine stimulation assessed by ionomycin stimulation (**I**). Calcium content was figured out by the maximum amplitude of fura2-AM fluorescence ratio ($\Delta_{\max} \text{Ratio}_{(340/380)}$) after the addition of different stimulations.

J, Time traces display cytosolic calcium concentration (measured by the fura2-AM fluorescence ratio) in a control CM and in a 200 μ mol/L puromycin preconditioned CM subjected to a 30min-hypoxia. At the end of the hypoxia period, 10mmol/L caffeine was added to the medium. Fluorescence values are normalization of fura2-AM fluorescence ratio divided by fura2-AM fluorescence ratio at origin (F/F_0). **K**, Mean rates of cytosolic calcium increase were figured out as masses of fura2-AM fluorescence signal over time in CM treated as explain in (**J**). Data are represented as mean \pm SEM. n=cell count. Statistics: ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$ vs. Ctrl, *** $p<0.001$ vs. Puro.

Figure.5: *In vitro* and *in vivo* CM protection after Hypoxia/Reoxygenation by puromycin pretreatment.

A, Experimental design represents Hypoxia/Reoxygenation (H/R) protocols achieved in isolated adult mouse CM. **B**, Histogram shows mortality of CM (Sham), CM subjected to H/R (Ctrl H/R) or CM concomitantly subjected to H/R and a 200 μ mol/L puromycin pretreatment. Percentage of cell mortality was calculated as LDH secretion level normalized on the LDH secretion level of CM subjected to a 2h hypoxia. Experiment was performed 3 times independently. **C**, Experimental design shows the I/R protocols performed in mice with different concentration of puromycin compared to a non-treated group. **D**, Dots plot represents individual I/R mouse by the percentage of necrosis area (AN) over area-at-risk (AR). Data are represented as mean \pm SEM. Statistics: § $p<0.05$ vs. Sham, + $p<0.05$ vs. Ctrl H/R, ## $p<0.01$ Mann Whitney test vs. Ctrl I/R.

Figure.6: *In vivo* puromycin pretreatment reduces infarct size necrosis, apoptosis and increases autophagy during I/R

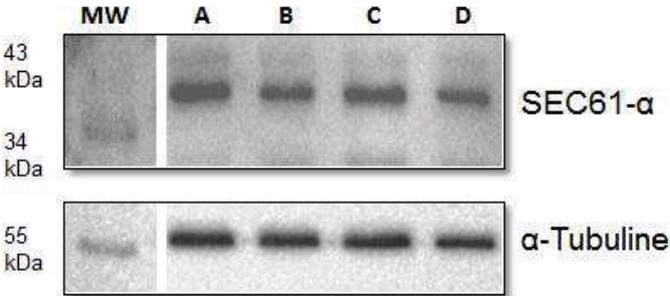
Histograms show ratio of protein amount, assessed by western-blot, in the heart left ventricle of Sham mice, control and puromycin (0.8mg/kg) preconditioned mice, with 45min I/R, after 15min or 24h reperfusion. **A** and **B** show the ratio of pro-apoptotic Bax protein over anti-apoptotic BCL-2 protein and report the induction of the mitochondria-related apoptosis. **C** and **D** show the ratio of LC3-BI over LC3-BII proteins and report the amplitude of autophagy activation. **E** and **F** show the ratio of Fodrin- α over the total form of the protein and report the activation of calcium-dependent calpains. Representative immunoblottings are depicted in insets. Data are represented as mean \pm SEM, n=cell count. Statistics: § p<0.05, §§ p<0.01, §§§ p<0.001 vs. Sham, + p<0.05, ++ p<0.01, +++p<0.001 vs. Ctrl I/R.

Figure.7: Scheme

Proposed model for the theoretical mouse CM's SR involvement in I/R and cardioprotection. Under basal conditions, longitudinal SR with higher Ca^{2+} concentration than the junctional SR, is responsible for the physiological Ca^{2+} transfer to mitochondria. Ischemia and lack of ATP lead to an increased SR Ca^{2+} leak causing mitochondrial and cytosolic Ca^{2+} surcharge favoring cell death by apoptosis and calpains activation. Cardioprotection by puromycin pretreatment induces reduction of Ca^{2+} content in both longitudinal SR mitochondria. This prevents mitochondrial Ca^{2+} overload and erratic cytosolic Ca^{2+} elevation during ischemia which leads to apoptosis and calpains activity decrease along with an increase of autophagy.

FIGURES

A



B

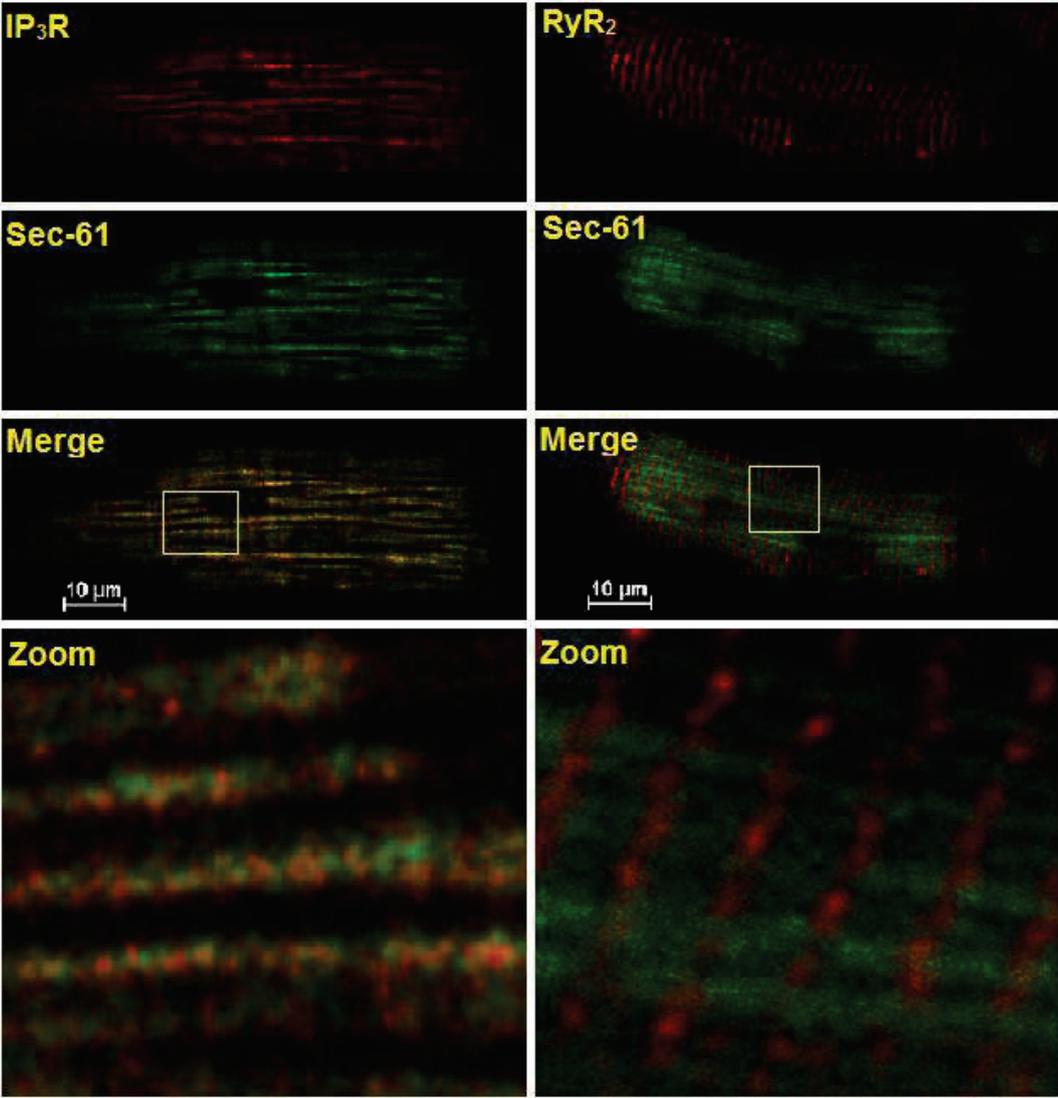


Figure.1

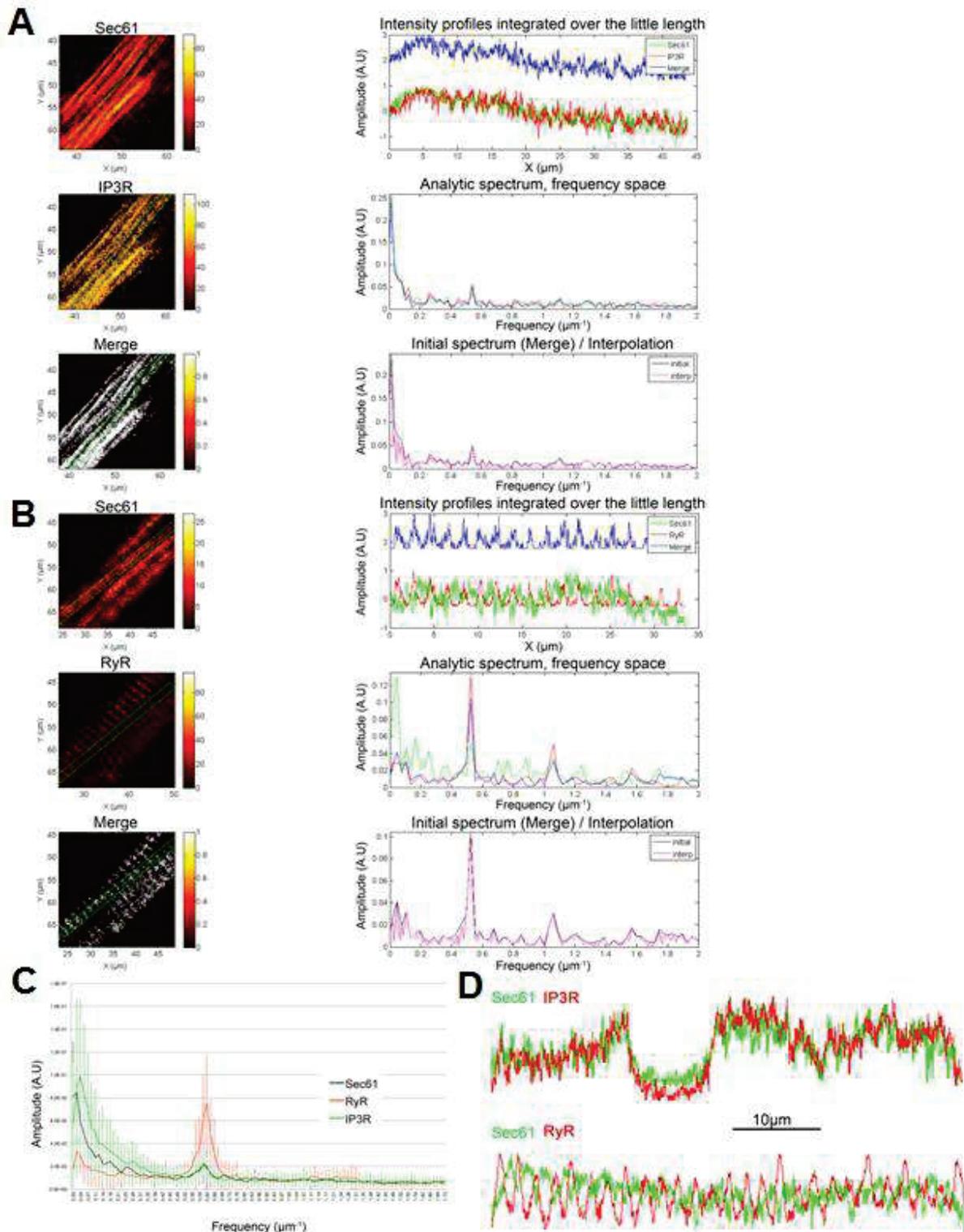


Figure.2

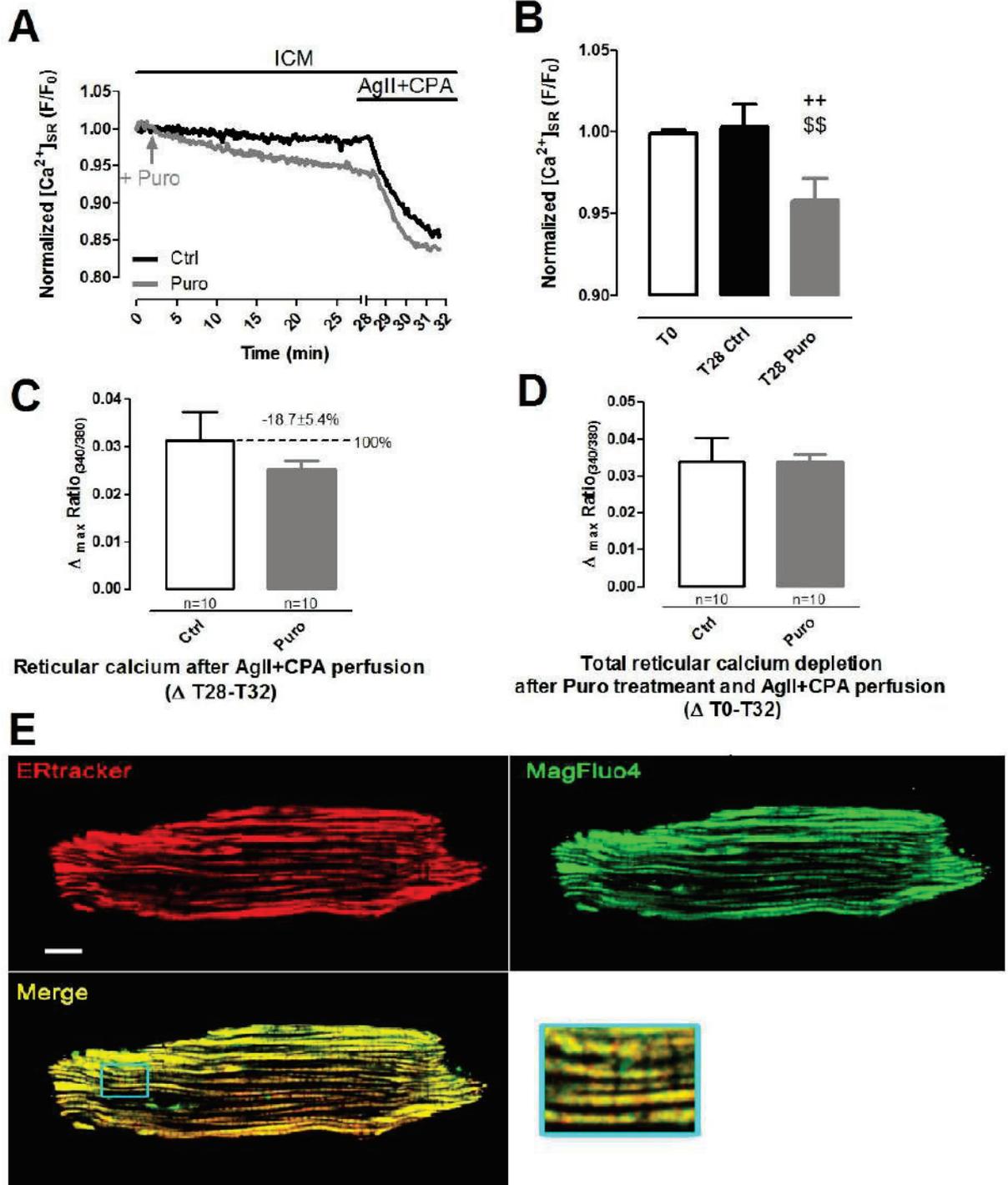


Figure.3

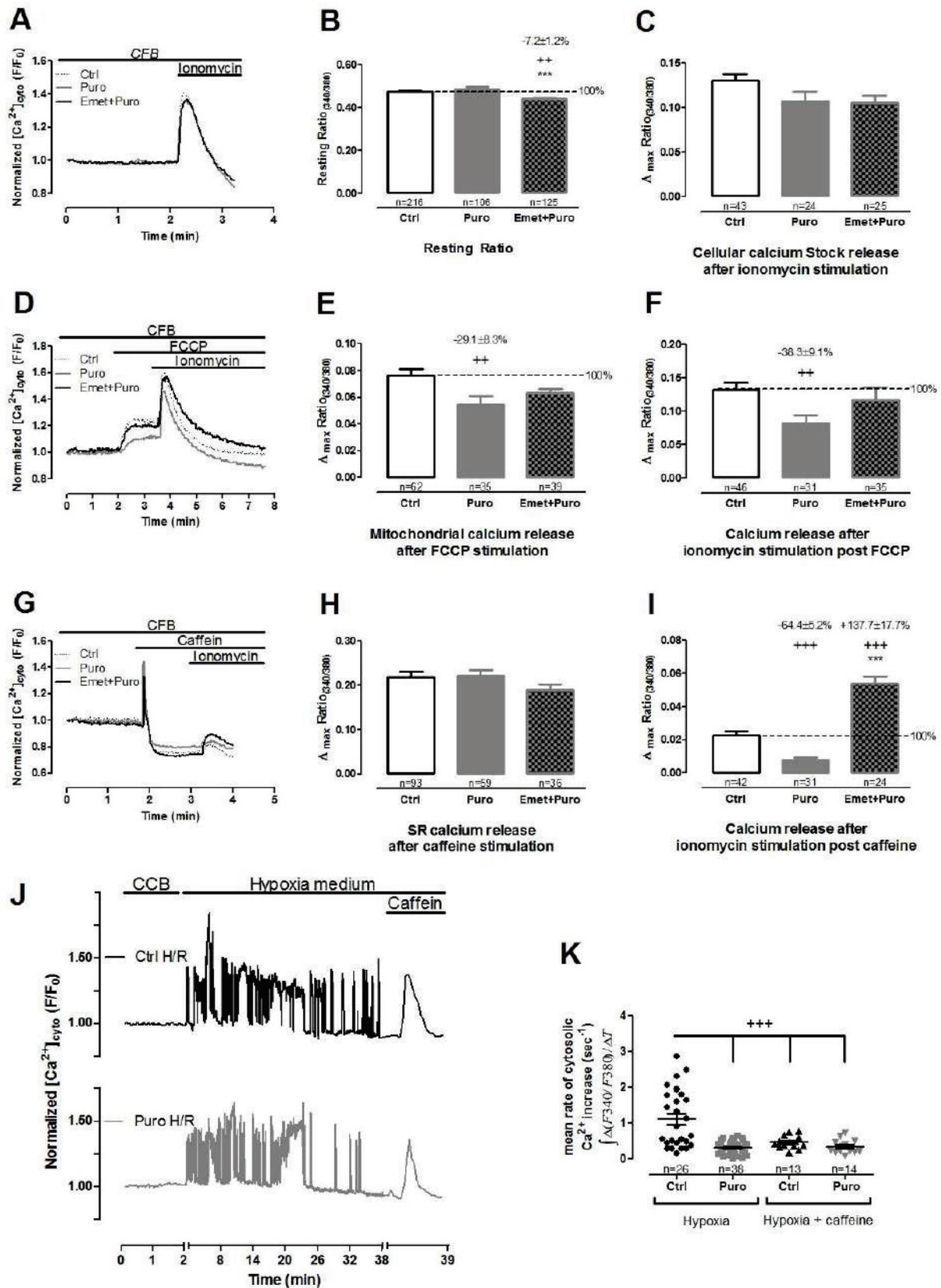


Figure.4

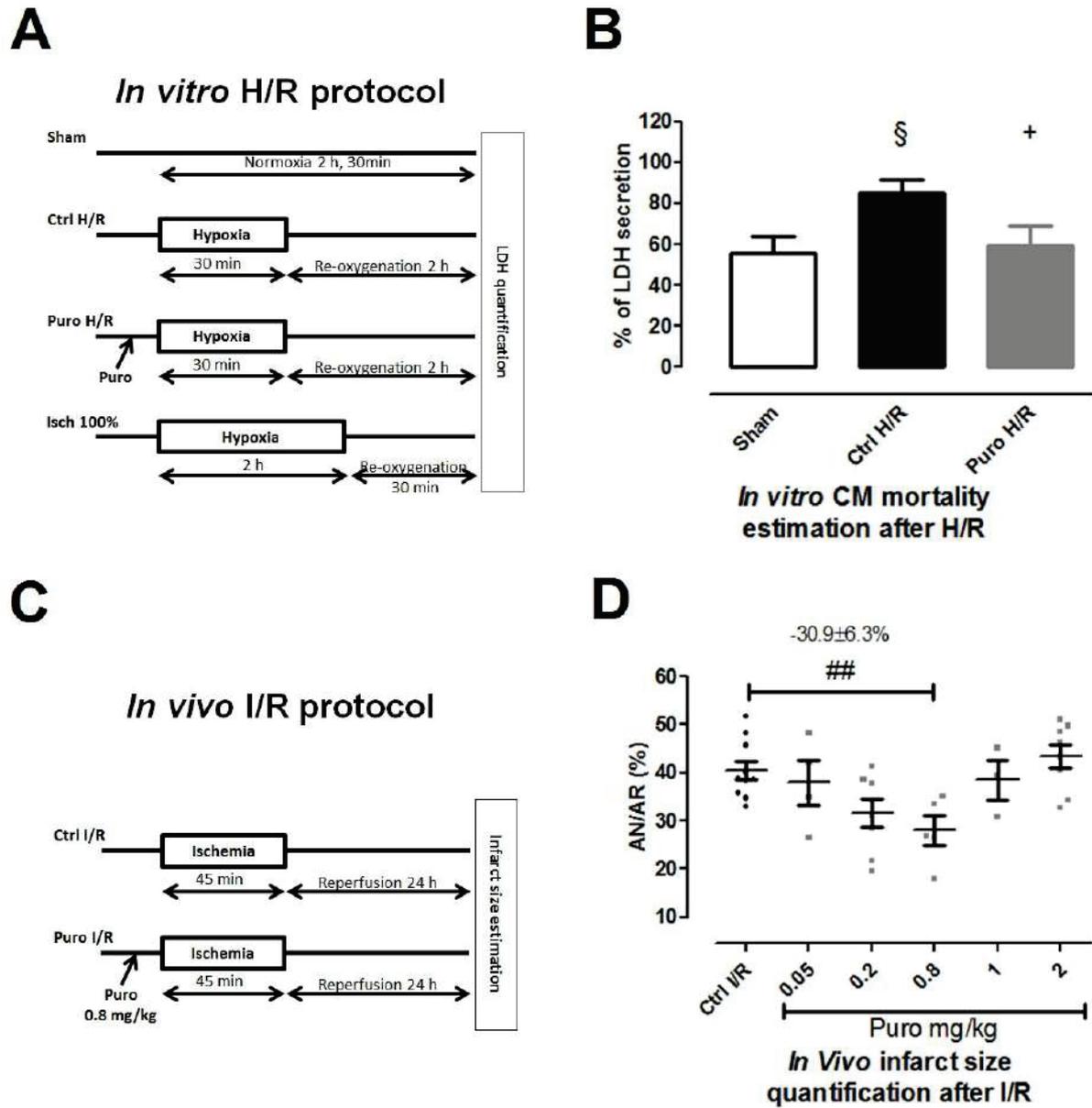


Figure.5

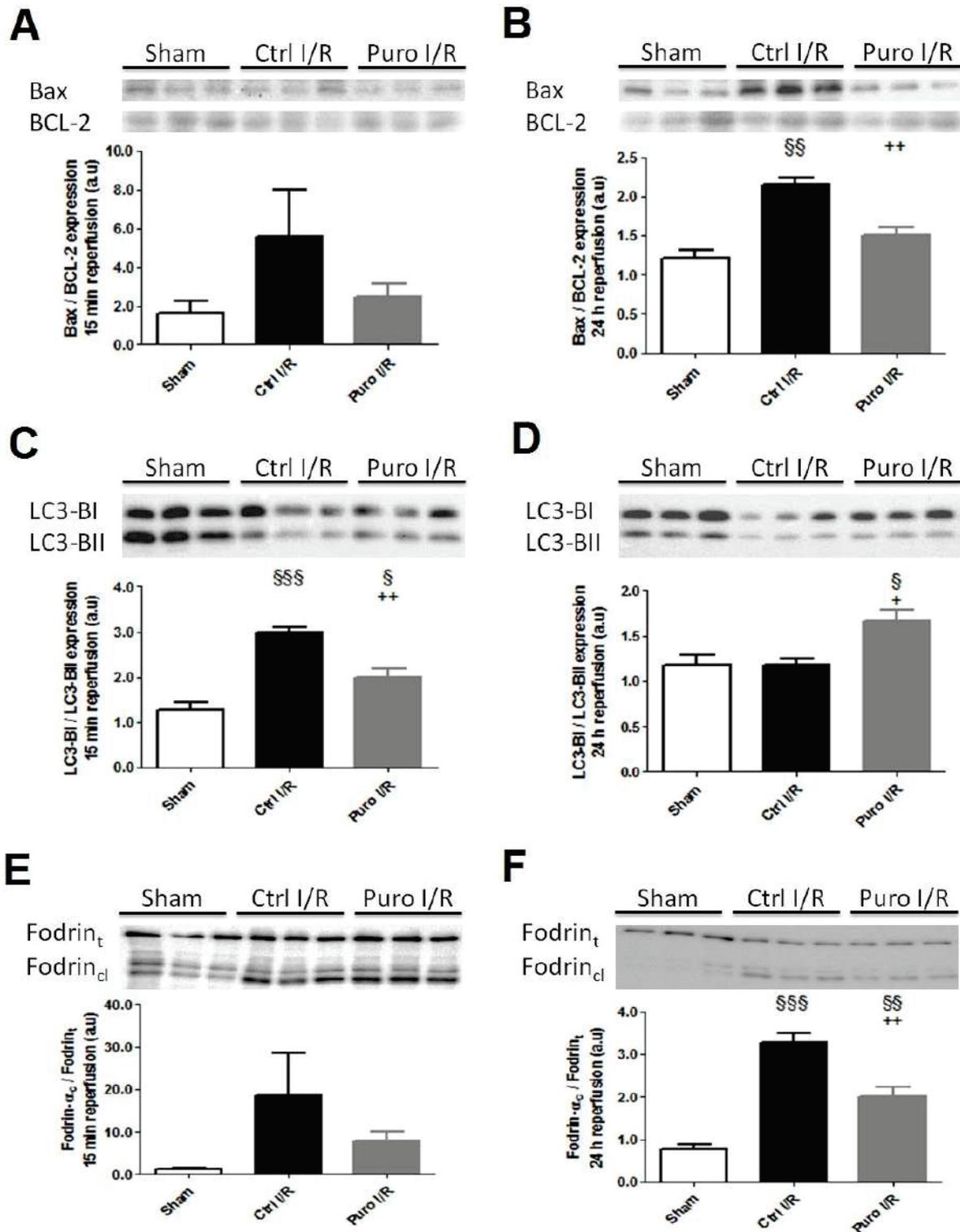


Figure.6

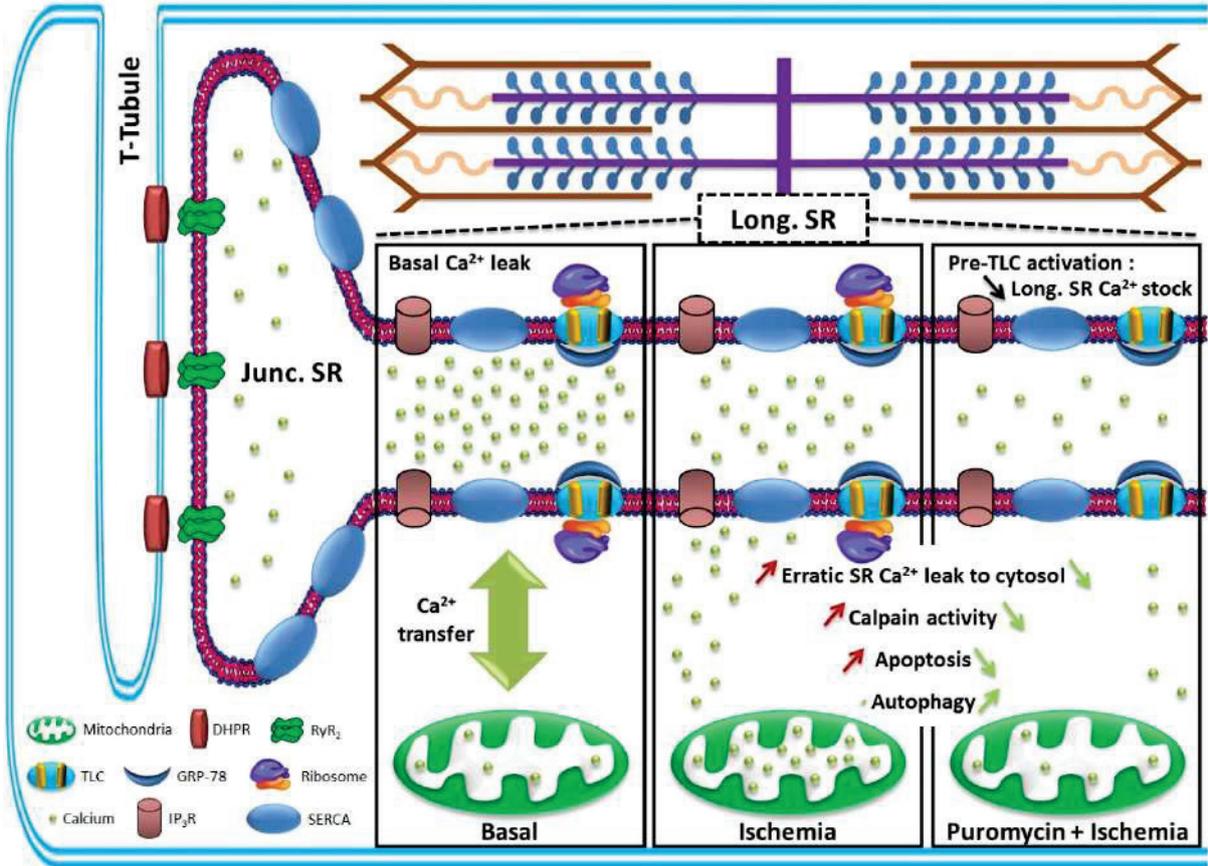


Figure.7

ONLINE DATA SUPPLEMENTS

CONTENT

EXPANDED METHODS AND RESULTS

ADDITIONAL FIGURES

Figure.S1

Figure.S2

Figure.S3

Figure.S4

EXPANDED METHODS AND RESULTS

Cardiomyocytes isolation

Mice were first injected intraperitoneally by 100µl of 50UI/kg heparin sodium then anesthetized with 70mg/kg pentobarbital sodium. Once pedal pinch reflexes were completely inhibited, a thoracotomy was performed and the heart was collected and perfused by a langerdorff system for 5min at 37°C. Blood was washed out with perfusion buffer (in mmol/L: 113NaCl, 4.7KCl, 0.6KH₂PO₄, 0.6Na₂HPO₄, 1.2MgSO₄-7H₂O, 0.032phenol red, 12NaHCO₃, 10KHCO₃, 10HEPES powder, 30taurine) where we added 2,3-butanedione monoxime and glucose 10 and 5.5mmol/L respectively before adjusting its pH to 7.4.

The heart then was perfused at 37°C with a digestion buffer (perfusion buffer 1X, 0.167mg/mL liberase TM Research grade (Roche), 0.14mg/mL trypsin 2.5% 10X (life technologies), 12.5µmol/L CaCl₂) at a constant rate.

At the end of digestion, the enzymatic activity is interrupted by a stopping buffer 1 (perfusion Buffer 1X, 10% bovine calf serum (PAA, SVF Gold), 12.5µmol/L CaCl₂) at 4°C. Left ventricles were isolated in order to detach CM. The solution is then filtered (SEFAR Nitex 102cm, Zurich Dutsher) in a 10 ml Tube.

After CM sedimentation, the medium is carefully replaced and cells were re-suspended in a stopping buffer 2 (same composition of stopping buffer 1 with only 5% bovine calf serum). This step is repeated in stopping buffer 2 containing gradual increased calcium concentration (SB2 + 0.05, 0.1, 0.5 and 1mmol/L CaCl₂ by increasing order).

In the end of the final incubation, cells were suspended in a M199 medium (Gibco) supplemented with (100U/mL penicillin, 100µg/ml streptomycin) mixture (life technologies), and ITS (insulin 1µg/mL, transferin 0.55µg/mL, selenium 0.5ng/mL) (Sigma).

CM were then seeded on 35mm Ibdid dishes (Ibidi Biovalley) (for calcium measurements and H/R experiments) or Labtech chamber slides (Merck Millipore) (for immunostaining) precoated with 10 μ g/ml laminin (Corning), and then incubated for 2h at 37°C.

Experiments were realized in the same day of the isolation with a 70-80% living CM estimated by observation.

Immunoblot

Samples were lysed in RIPA lysis buffer (1% Triton X100, 0.5% Sodium deoxycholat and in mmol/L: 150NaCl, 50Tris, supplemented with 5EDTA, 1Na₃VO₄, 20NaF, 1DTT, 1anti-protease cocktail (Sigma) and 1phosphatases inhibitors (Sigma)). A precellys homogenizer at 4°C (Precellys 24, Bertin technologies) was used for isolated samples from Sham, control and preconditioned mice hearts after I/R. Supernatant were then centrifuged for 15min 3000 G. The supernatant protein concentration was measured using BCA kit (Interchim) and 40 μ g of protein were denatured then deposited in 4-20% acrylamide gel for migration and blotted on nitrocellulose membrane by electro transfer (Trans-Blot Turbo Transfer, Biorad). The membrane is then saturated with 5% bovine serum albumin in 0.1% TBS tween mixture. Proteins were detected after labelling by specific primary antibodies. All primary antibodies were used at a dilution of 1/1000 in the above mixture with overnight incubation at 4°C, while secondary antibodies were diluted at 1/10000 in the same mixture and incubated for 1 hour at RT.

Revelation was obtained by addition of the reaction substrate ECL prime reagent (GE healthcare). Acquisition was performed with Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR+ (Bio-Rad). ImageLab software was used for quantification (Bio-Rad).

Immunostaining

Cultured CM on Labtech where fixed after the 2h incubation with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (Gibco) for 15min then permeabilized with 0.1% Triton also in PBS during 10min. Non-specific binding was then blocked with a blocking buffer (3X PBS, 1X bovine calf serum (PAA, mucoplex), 1X blocking buffer (life technologies)) for 1h. Primary antibodies were diluted in the blocking buffer and incubated with the CM during 1h at RT. Secondary antibody diluted in PBS Ca⁺ Mg⁺ (Gibco) were next applied for another 1h at RT in the dark. Once finished the Labtech system was unlocked, and slides were mounted using SlowFade® Diamond Antifade Mountant (life technologies). Observations were examined with a NIKON eclipse Ti confocal microscope. Images were processed with Nis software (Nikon).

ADDITIONAL FIGURES**FIGURE LEGENDS**

Figure.S1: Concomitant detection of ERTracker and mitoTracker in longitudinal SR in mouse CM.

A, Colocalization of mag-fluo4-AM and mitoTracker Red CMXRos in adult mouse CM was observed by confocal microscopy. **B**, Fast Fourier Transforms (FFT) along the CM longitudinal axis analyzes spatial distribution of probe fluorescence signals. Curves show the intensity profiles (top right), analytic spectrum (middle right) and interpolation of the FFT spectrum (bottom right).

Figure.S2:

A, Representative curve of the cytosolic calcium concentration assessed by fura2-AM fluorescence in Ctrl condition, and after 30min of puromycin pretreatment. **B**, Histogram show averaged mitochondrial calcium content after caffeine-induced calcium release from SR stores in control and puromycin-pretreated CM. Maximum amplitude of fura2-AM fluorescence ratio after FCCP ($\Delta\text{max}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$) was figured out to estimate mitochondrial calcium content released by FCCP treatment. Data are represented as mean \pm SEM, n=cell count.

Figure.S3:

Histogram of the expression level of GRP-78 over α -Tubulin proteins, in the heart left ventricle of Sham mice, control and puromycin (0.8mg/kg) preconditioned mice, with 45min

I/R, after 15min (**A**) or 24h reperfusion (**B**). Data are represented as mean±SEM. Statistics: §
p<0.05 vs. Sham.

Figure.S4:

Histogram shows mean rates of cytosolic calcium increase over hypoxia period, as measured by the masses of fura2-AM fluorescence over time in CM stimulated by 10mmol/L of caffeine in Ctrl condition and after 30min of hypoxia. Data are represented as mean±SEM. n=cell count. Statistics: +++p<0.001 unpaired t-test.

FIGURES

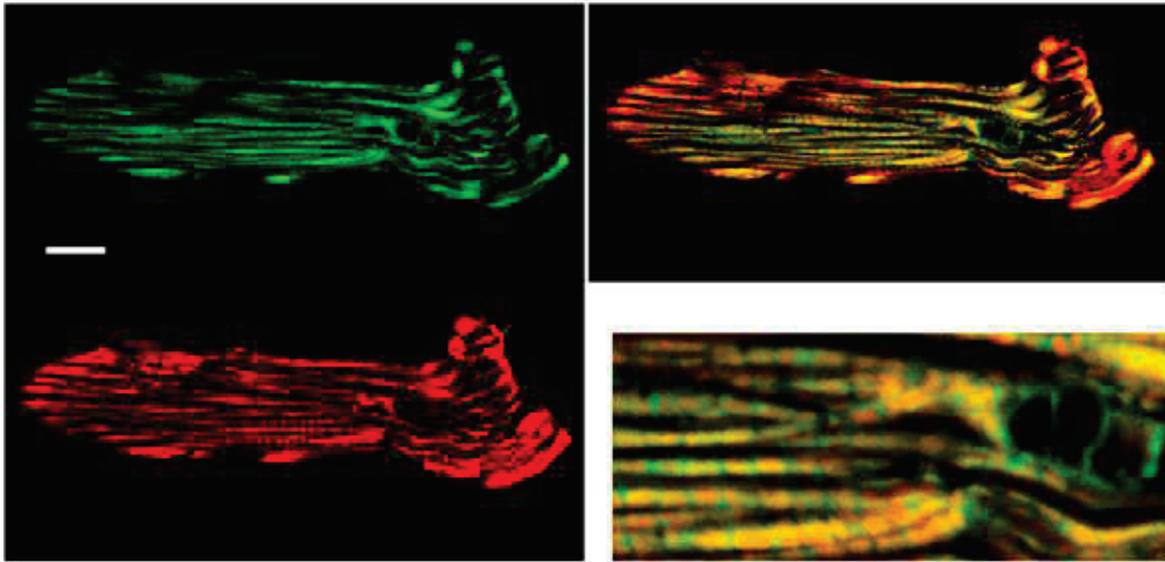
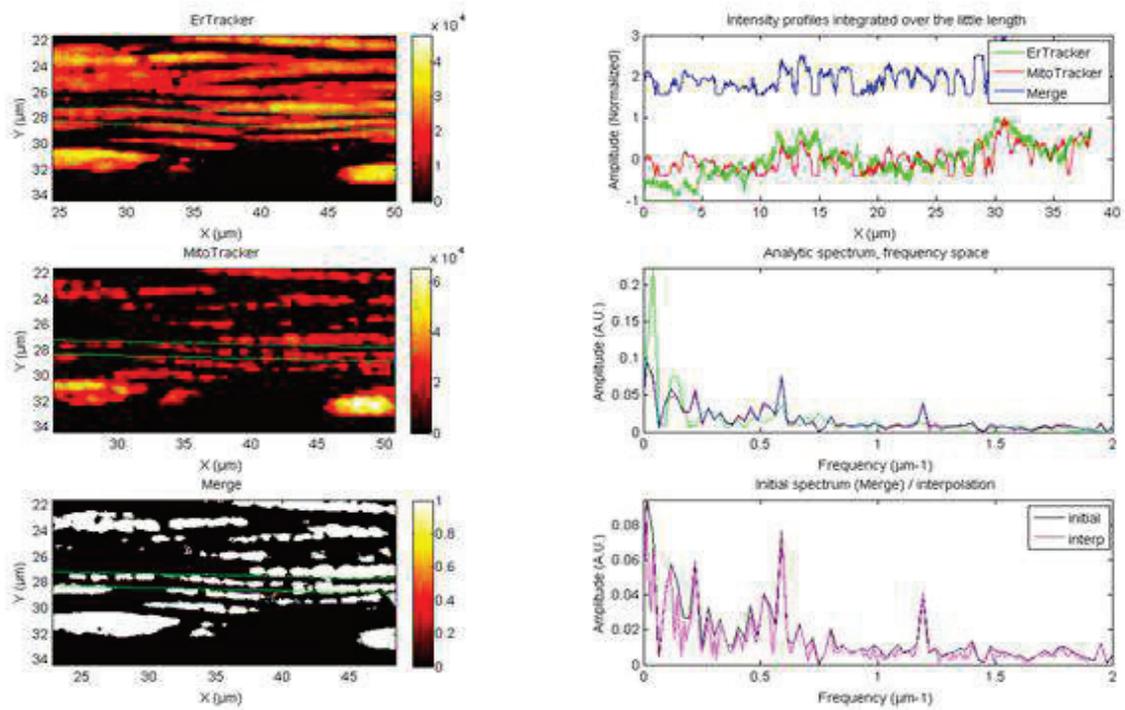
A**B**

Figure.S1

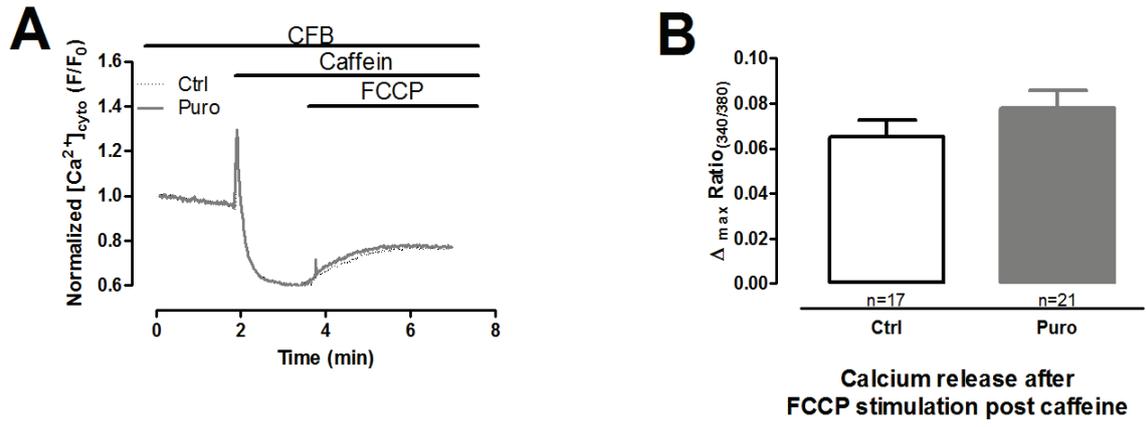


Figure.S2

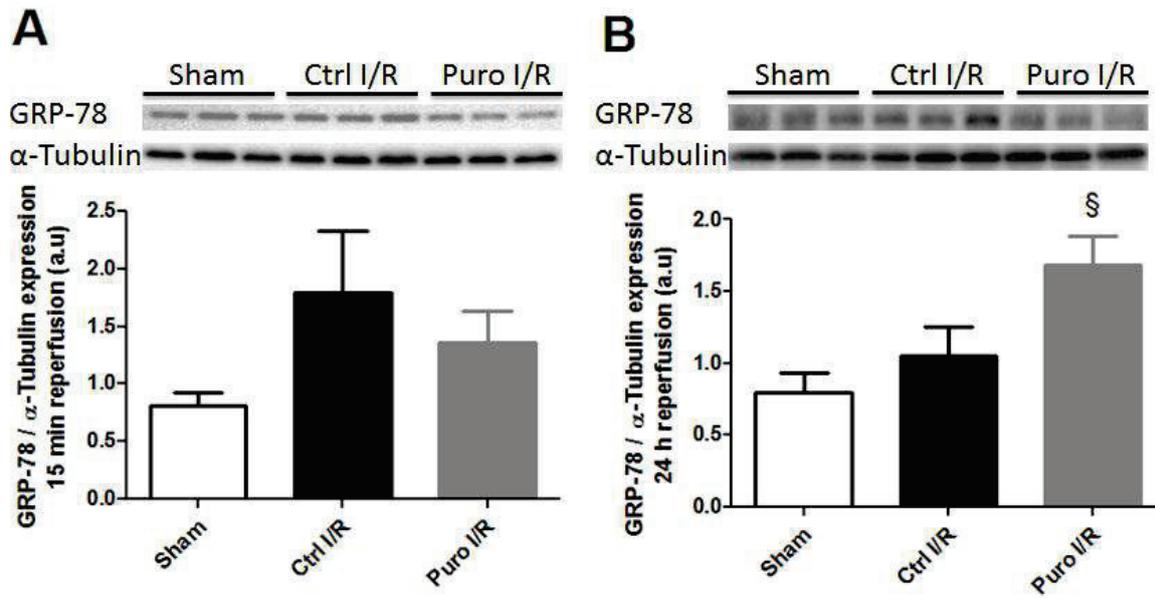


Figure.S3

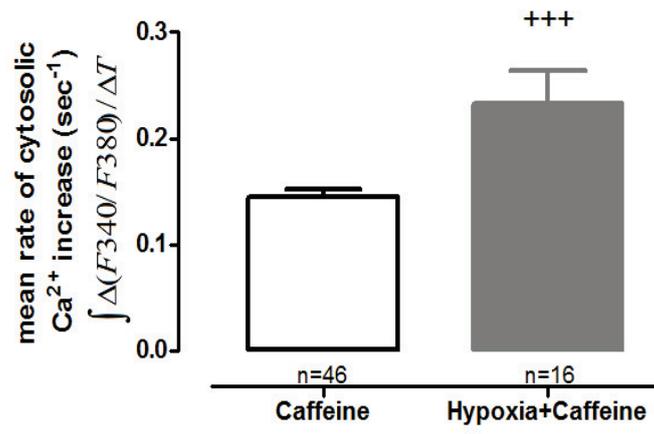


Figure.S4

2. DISCUSSION

Au cours des dernières décennies, une meilleure compréhension des mécanismes de lésions d'I/R a entraîné de solides progrès dans le domaine de la cardioprotection. Cependant, les résultats de plusieurs essais cliniques de phase III récents ont été décevants et l'idée de se concentrer uniquement sur la mort des CM médiée par les mitochondries est devenue insuffisante, bien que nécessaire. D'autres recherches sont donc nécessaires pour développer des stratégies de protection complémentaires contre l'infarctus du myocarde. Dans ce contexte, notre étude visait à déchiffrer le rôle spécifique de la fuite calcique réticulaire en I/R et à évaluer les effets de sa modulation pharmacologique dans la cardioprotection.

Aperçu de l'organisation spatiale et fonctionnelle de RS.

Les micrographies électroniques, ont d'abord révélé la membrane continue entre le RS jonctionnel et longitudinal dans les CM³⁶. L'utilisation de la caféine pour stimuler la libération de calcium des stocks du RS est suffisante pour vider la majeure partie, sinon la totalité, du contenu en calcium du RS, ce qui supporte la connexion luminale entre ces deux compartiments. Une estimation des stocks calcique a révélé un contenu 5-6 fois plus faible dans la partie jonctionnelle du RS que dans la partie longitudinale²¹. Dans le même ordre d'idées, la libération de calcium médiée par les RyR dans les stocks du RS a été caractérisée par deux constantes de temps suggérant l'existence de deux stocks de calcium ayant des propriétés différentes³⁷. Paradoxalement, cela suggère que la loi de masse d'action n'est pas conservée alors que l'équilibre de la concentration de calcium libre serait attendu dans le continuum luminal du RS. Un modèle alternatif basé sur une asymétrie de concentration de la protéine de liaison au calcium dans le RS, la calsequestrin, entre la partie jonctionnelle et longitudinale dans les myocytes squelettiques a été proposé afin d'expliquer comment un compartiment du RS continu pourrait, cependant, présenter une hétérogénéité locale dans le

contenu en calcium³⁸. Ce modèle est soutenu par une étude rapportant comment la concentration de calsequestrin 2 régule le contenu en calcium dans le RS jonctionnel des CM³⁷. Fait intéressant, nos expériences avec les sondes fluorescentes réticulaires sensibles au calcium (mag-fluo4-AM) démontrent une asymétrie dans le signal fluorescent puisque seul le RS longitudinal a été coloré. Il est donc probable que la teneur moyenne en calcium dans le RS jonctionnel soit trop faible par rapport à la teneur en calcium dans le RS longitudinal pour détecter la fluorescence de mag-fluo4-AM dans les deux compartiments au même moment. Cette divergence s'explique par différentes capacités de mise en mémoire tampon comme expliqué ci-dessus. Cependant, la localisation asymétrique d'ERTracker ne peut probablement pas être expliquée par une concentration différente de calcium mais plutôt par l'encombrement moléculaire luminal et l'entrave à la diffusion à l'intérieur de la lumière, car la longue durée d'incubation aurait permis le chargement dans le RS jonctionnel.

Ensemble, ces résultats confirment la spécialisation des deux réserves de calcium du RS: jonctionnel et longitudinal, même si la nature de la teneur en calcium asymétrique entre les deux compartiments ne peut être confirmée. Néanmoins, il a été rapporté que les caractéristiques spatiales et temporelles des flux de calcium permettaient d'orchestrer la réponse cellulaire aux stimuli³⁹. Cette théorie explique vraisemblablement pourquoi les diades formées de la jonction du RS et des tubules T sont nécessaires à la propagation efficace d'une concentration élevée de calcium dans les sarcomères et à la contraction de myofibrilles. Cela suggère donc que le RS longitudinal a un rôle spécifique, qui pourrait être la modulation de la bioénergétique cellulaire en contrôlant le contenu de calcium mitochondrial. Les bioénergies cellulaires sont intimement liées aux acides nucléiques et à la synthèse des protéines. Inversement, la baisse des niveaux d'ATP pendant l'I/R est connue pour arrêter la transcription et la traduction tout en stimulant les mécanismes de survie tels que l'autophagie

(pour plus d'information voir⁴⁰). Cette connexion entre les réserves de calcium réticulaires, la traduction et la bioénergie cellulaire souligne l'importance d'étudier les mécanismes de la fuite de calcium du RS.

La fuite de calcium médiée par la TLC est un mécanisme clé de l'homéostasie du calcium du CM.

McFarland *et al.* ont déjà rapporté que TRAP, une protéine majeure du complexe de TLC, est principalement située dans le RS longitudinal dans les CM²⁰ de rat. Nos résultats confirment cette localisation préférentielle de Sec61 sur le RS longitudinal dans les CM de souris. En outre, nous montrons que la fuite de calcium médiée par la TLC dans le RS longitudinal n'interfère pas avec les réserves de calcium du RS jonctionnel. Ces résultats soutiennent en outre un modèle avec deux compartiments de RS fonctionnels dans lesquels le contenu du RS longitudinal en calcium serait impliqué dans l'homéostasie du calcium mitochondrial. La concentration de calcium mitochondriale est principalement affectée par le transfert de calcium des stocks réticulaires^{14,41-43} et est bien connue pour contrôler la bioénergétique et le destin des mitochondries. Dans cette étude, nous montrons que l'induction de la fuite de calcium par TLC est en corrélation avec une baisse de la teneur en calcium mitochondrial. Dans les souris knock-out pour la cyclophilin D, une baisse de la concentration de calcium à l'état basal dans les mitochondries est causée par une diminution du transfert de calcium du RS aux mitochondries et est associée à une diminution de la mort des CM après l'I/R¹³. Similairement à la fuite de calcium médiée par le TLC, ce mécanisme n'implique pas les réserves de calcium dépendantes de RyR. Il est intéressant de noter que Hall AR *et al.*¹⁹ ont suggéré que la cardioprotection observée dans le double knock-out de la mitofusine 1 et 2 impliquait la perte de proximité entre VDAC, dans les mitochondries et RyR₂ dans le RS. Cependant, ils n'ont pas étudié le rôle des liaisons IP₃R-Grp75-VDAC. En outre, les auteurs

ont clairement indiqué que cette lignée de souris KO présentait une fonction myocontractile fortement altérée. Nous pensons qu'il est donc difficile d'évaluer la causalité des mécanismes dans un modèle pathologique. Dans la même ligne, il a été démontré qu'un mutant par inversion du RyR₂ (RyR₂-S2808D) augmente le contenu mitochondrial et la taille de la zone infarctée après l'I/R¹⁰. Cependant, on peut voir clairement dans la mesure basale de la fraction d'éjection du ventricule gauche que l'expression de ce RyR₂ muté modifie également l'efficacité basale du cœur¹⁰. Enfin, nos résultats n'infirment pas un rôle pour les récepteurs RyR₂ à la jonction entre RS jonctionnel et longitudinal, mais proposent plutôt une stratégie indépendante de RyR₂ pour moduler de manière transitoire le contenu en calcium du RS sans affecter la physiologie du CM. En effet, nous avons observé que la diminution de la teneur en calcium du RS avait des effets bénéfiques sur le cœur après l'I/R. Une preuve de concept similaire avait déjà été rapportée par Petrovski *et al.*⁴⁴. Ces auteurs ont signalé les effets bénéfiques de la thapsigargine (un inhibiteur de la pompe SERCA qui induit une fuite de calcium réticulaire à de faibles doses) dans un protocole de pré-conditionnement chez le rat. Ils ont montré que le prétraitement à la thapsigargine diminuait la taille de l'infarctus et améliorait la fonction ventriculaire gauche. Cependant, il est évident que l'inhibition de la SERCA entraînera également une inhibition du CICR et empêchera donc la contraction du CM. Toutefois, de manière appréciable, ces auteurs ont signalé que le traitement par thapsigargine induit à la fois le stress du RE et l'autophagie. Bien que les mitochondries soient considérées comme un carrefour pour les voies du devenir cellulaire dans la cardioprotection, il est probable que les processus cytosoliques puissent également contribuer.

Mécanismes de mort cellulaire provoqués par l'I/R et leur contrôle par les stocks du RS.

Comme prévu par la diminution de la teneur en calcium dans les RS et les mitochondries dans les CM prétraités par la puromycine, l'expression des marqueurs pro-apoptotiques Bax/BCL-2

a été réduite principalement 24h après la reperfusion. Cela confirme que l'effet cardioprotecteur de la fuite de calcium induite par la puromycine est en partie lié aux voies mitochondriales. Dans la même ligne, White *et al.* ont montré que la fuite de calcium réticulaire par IP₃R protège les cellules contre l'apoptose après une surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 ou Bcl-xl⁴⁵.

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'appauvrissement du RS en calcium avec de faibles doses de thapsigargine a induit l'activation d'un stress du RE modéré et a déclenché l'autophagie. Ces deux mécanismes cellulaires sont connus pour être cardioprotecteurs^{44,46}.

Dans l'étude en cours, nous avons montré que le traitement par la puromycine augmentait l'expression de GRP78, un marqueur du stress du RE après 24h de reperfusion (Figure.S3). En parallèle du stress du RE, nous avons constaté que l'autophagie était augmentée après 24 heures de reperfusion. Dans la même ligne, Yao *et al.* ont rapporté une transition cardioprotectrice de l'apoptose à l'autophagie après une reperfusion de 24 heures⁴⁷. De manière intéressante, le stress du RE et la diminution du niveau de calcium mitochondrial augmentent l'activité de la protéine kinase (AMPK) activée par l'AMP dans un modèle de CM, conduisant à l'induction de l'autophagie^{41,48}.

Dans les CM prétraités par la puromycine, nous rapportons en outre une diminution concomitante des flux de calcium vers le cytosol pendant l'hypoxie et une diminution du clivage calpaïne-dépendant de la de la Fodrin- α . La calpaïne est une protéase dépendante du calcium, qui participe à l'induction de l'apoptose et de la nécrose⁴⁹ et dont l'inhibition réduit la taille de l'infarctus et participe aux mécanismes de cardioprotection (pour plus d'informations⁴⁹⁻⁵²).

Nos résultats soulignent que la modulation de la teneur du RS longitudinal en calcium modifie simultanément plusieurs processus cellulaires: le taux de calcium des mitochondries et

l'apoptose, le stress du RE et l'autophagie, ainsi que l'activation de la calpaïne (résumée dans la Figure.7). Nous pensons que ces conséquences multiples de la diminution du contenu en calcium du RS peuvent induire un effet cardioprotecteur robuste, moins enclin aux fluctuations individuelles.

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES.

Comme expliqué précédemment dans l'article, l'invalidation génétique du translocon est létale [481] et nous avons donc opté pour sa modulation pharmacologique en utilisant différents activateurs et inhibiteurs. Sa fonctionnalité comme canal de fuite calcique réticulaire est ainsi abordée grâce à l'imagerie calcique *via* l'utilisation des sondes fluorescentes chimiques calciques: le Fura-2 pour mesurer les variations de calcium cytosolique, et le Mag-Fura-2 ou le Mag-Fluo-4 pour appréhender l'évolution du contenu des réserves calciques réticulaires. L'utilisation des sondes génétiques (ratiométriques et plus ciblées) n'est pas envisageable dans nos conditions expérimentales. La durée de vie des cardiomyocytes étant de 5h, il n'est donc pas possible de transfecter les cellules avec les sondes génétiques.

1. Vérification de la fuite réticulaire en utilisant le Mag-Fluo-4

Pour suivre l'évolution du calcium réticulaire, nous avons utilisé deux sondes fluorescentes réticulaires différentes: Mag-fluo-4 et Mag-Fura-2. Comme précédemment mentionné, ces deux sondes possèdent une forte affinité vis-à-vis du calcium et sont capables d'entrer dans le réticulum. Toutefois, le protocole de charge nécessite la perméabilisation des cellules. Ensuite, afin de connaître le contenu des stocks calciques intracellulaires restant, nous avons traité les cardiomyocytes (après l'application ou non de la puromycine) avec un mélange constitué de CPA (Cyclopiazonic acid, inhibiteur des SERCA) et d'AgII (Angiotensine II) (induisant la production d'IP₃). Ce traitement induit la vidange du calcium du réticulum endoplasmique *via* les IP₃R.

Mag-Fluo-4, contrairement à Mag-Fluo-2, n'est pas une sonde ratiométrique et son utilisation permet de valider l'effet observé par Mag-Fura-2.

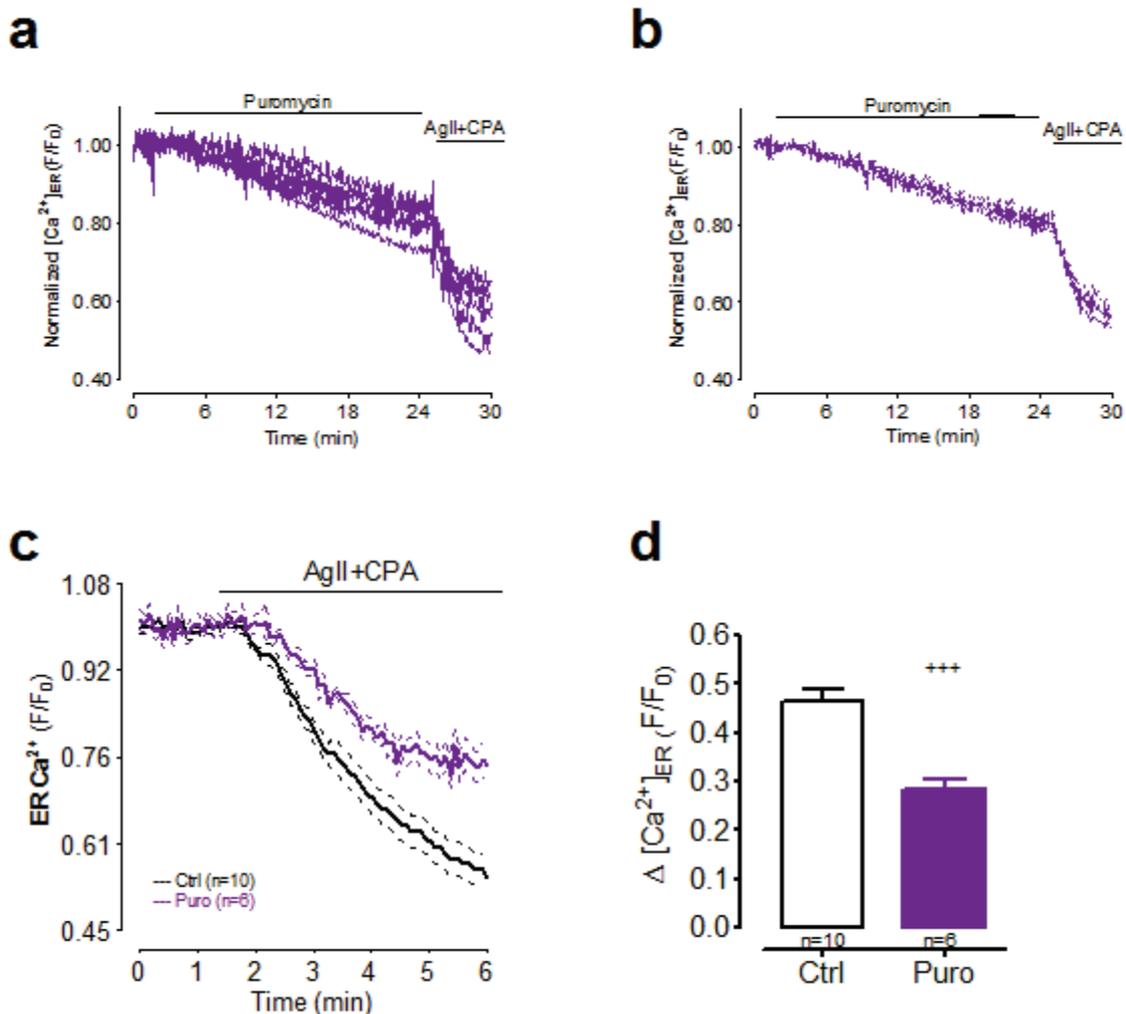


Figure.RS.1: L'activation de la translocon par la puromycine induit une diminution du stock de calcium réticulaire.

a, Représentation graphique de l'évolution de la fluorescence normalisée de Mag-Fluo-4 avec le temps dans des cardiomyocytes en réponse à 200 μ M de traitement par la puromycine (Puro) pendant 25min et stimulés enfin avec 5 μ M d'angiotensine II (AgII) + 15 μ M de cyclopiazonic acid (CPA). **b**, Courbe représentative (moyenne \pm SEM) de l'évolution de la fluorescence réticulaire dans les cardiomyocytes prétraités par la puromycine pendant 25min puis stimulés par l'AgII + CPA. **c**, Courbe représentative (moyenne \pm SEM) de l'évolution de la fluorescence réticulaire dans les cardiomyocytes contrôle et prétraités par la puromycine suite à la stimulation par l'AgII+CPA. **d**, Histogramme représentatif du stock de calcium réticulaire restant, estimé par la stimulation AgII+CPA, dans le cas contrôle ou après 25min de traitement par la puromycine, et calculée comme une différence entre le niveau de fluorescence au moment de la stimulation et la fluorescence finale.

Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM. n=nombre de cardiomyocytes. Statistiques: +++ p<0,001 vs. Ctrl.

De plus, le marquage de Mag-Fluo-4 semble présent dans la partie longitudinale du RS (résultat article Figure.3.E). L'utilisation de cette sonde pourrait donc donner une idée plus précise du contenu calcique de cet organite.

La diminution du niveau de la fluorescence lors de l'application de la puromycine indique, comme attendu, une diminution progressive de la concentration du calcium réticulaire dans les cardiomyocytes (Figure.RS.1a-b). Toutefois, cette diminution est mise en évidence par la comparaison du stock de calcium réticulaire restant après l'application de la puromycine sur les cardiomyocytes pendant 25min (Figure.RS.1c-d) en comparant aux cardiomyocytes contrôles. En effet, les résultats de la vidange du calcium réticulaire induit par l'application du mélange CPA + AgII ont montré une réduction de $38\pm 3\%$ du stock du calcium réticulaire après le traitement par la puromycine. Cette réponse est en accord avec nos résultats en Mag-Fura-2.

Ces résultats valident donc nos observations concernant la fonctionnalité du translocon comme canal de fuite calcique fonctionnel dans la partie longitudinale du RS des cardiomyocytes de souris (Figure.RS.1).

2. Effet de la pactamycine, un activateur de la fuite calcique à travers le translocon vs. la cycloheximide, une molécule témoin.

Afin de vérifier que nos observations étaient dépendantes de l'action du translocon, nous avons utilisé une autre molécule connue pour son effet d'activation de la fuite calcique par le translocon, la pactamycine. Cette dernière est aussi un antibiotique qui agit comme inhibiteur de l'initiation de la chaîne peptidique permettant de garder le pore du translocon libre et perméable au calcium [533].

En parallèle, pour s'affranchir de l'effet « antibiotique » qui se traduit par l'arrêt de

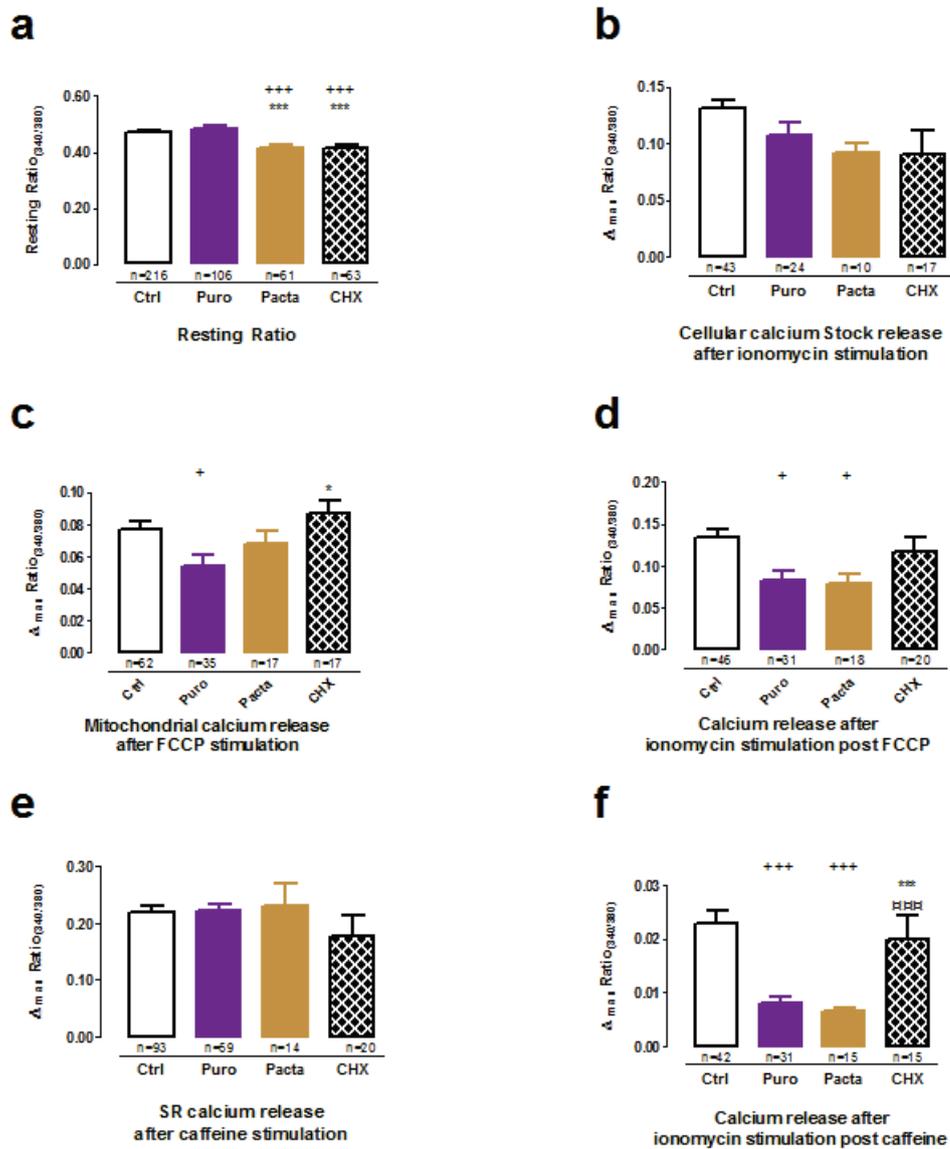


Figure.RS.2: Effet similaire entre la puromycine et la pactamycine sur l'activation de la fuite calcique à travers le translocon.

Les effets du prétraitement par la puromycine à 200 μ M (Puro), de la pactamycine à 1 μ M (Pacta) et du cycloheximide à 2mM (CHX) ont été mesurés sur des cardiomyocytes chargés en Fura-2 dans du CCB pendant 30min (voir Matériels et méthodes). Les histogrammes représentent les différences entre la concentration de calcium cytosolique à l'équilibre (a), la teneur totale en calcium cellulaire évaluée par une stimulation par 5 μ M d'ionomycine (b), le contenu de calcium mitochondrial évalué par une stimulation par 25 μ M de FCCP (c), la quantité de calcium cellulaire restante après la stimulation par le FCCP et évaluée par une stimulation par l'ionomycine (d), les réserves de calcium dépendantes de RyR₂ évaluées par une stimulation par 10mM de caféine (e) et la quantité restante en calcium cellulaire après la stimulation par la caféine évaluée par une stimulation par l'ionomycine (f) dans les cardiomyocytes Ctrl et les cardiomyocytes prétraités par les différentes molécules.

Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM. n=nombre de cardiomyocytes. Statistiques: + p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001 vs. Ctrl ; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. Puro ; □□□ p<0.001 vs. Pacta.

traduction, nous avons utilisé la cycloheximide comme molécule agissant sur l'élongation de la chaîne peptidique et n'ayant pas de rôle décrit sur la modulation de la fuite calcique réticulaire à travers le translocon [533].

A. Pactamycine, cycloheximide et modulation du calcium cellulaire

L'effet des différentes molécules a été mesuré par la sonde calcique cytosolique de haute affinité Fura-2, après prétraitement des cardiomyocytes pendant 30min avec la puromycine (200 μ M), la pactamycine (1 μ M) ou la cycloheximide (2mM).

Le niveau du calcium cytosolique étant directement affecté par celui des autres organites, un changement dans la concentration calcique cytosolique de l'ordre dunM peut être détecté par le Fura-2. Ce qui signifie qu'en stimulant la libération de calcium d'un organite cellulaire spécifique, le changement du niveau du calcium cytosolique reflète de façon indirecte le stock calcique de cet organite.

La fuite calcique a été mesurée en absence de calcium extra-cellulaire afin de s'affranchir de toute entrée calcique secondaire.

Les graphiques (Figure.RS.2), montrent les résultats de mesures calciques effectuées sur les cardiomyocytes suite au prétraitement par la pactamycine et la cycloheximide. Les résultats de la puromycine ont été gardés pour la comparaison.

Nos observations montrent que le niveau de calcium cytoplasmique basal dans les cardiomyocytes prétraités par la pactamycine est diminué de $12\pm 2\%$ en comparant avec les cardiomyocytes contrôles. De façon intrigante, les mêmes résultats ont été observés suite au prétraitement par la cycloheximide avec une diminution dans le taux calcique cytoplasmique basal de $12\pm 2\%$ comparé aux cardiomyocytes contrôles (Figure.RS.2a).

Ce résultat pourrait être lié au mode d'action de la pactamycine, indépendamment de son rôle

au niveau du translocon.

En revanche, aucune différence significative n'a été mise en évidence dans le contenu cellulaire total en calcium, mesuré après stimulation avec l'ionomycine (5 μ M). A noter qu'une tendance à la diminution du stock calcique total a été remarquée dans les cardiomyocytes prétraités par la pactamycine (-29 \pm 6%) comme par la puromycine (-18 \pm 8%) (p value=0.08 et 0.06 respectivement) en comparaison aux contrôles (Figure.RS.2b).

Ensuite nous avons procédé à la mesure des stocks calciques mitochondriaux en utilisant le FCCP à 25 μ M, ce qui induit la libération du calcium mitochondrial dans le cytoplasme.

Contrairement au prétraitement par la puromycine, les prétraitements par la pactamycine ou par la cycloheximide n'ont pas réduit le taux du calcium mitochondrial de manière significative (Figure.RS.2c).

Suite à la libération du calcium par le FCCP, les cardiomyocytes ont été stimulés par l'ionomycine afin d'estimer les réserves cellulaires de calcium restantes (majoritairement réticulaire). Comme les cardiomyocytes prétraités par la puromycine, les cardiomyocytes prétraités par la pactamycine ont montré une diminution de 31 \pm 10% dans la quantité de calcium libérée en comparaison avec les cardiomyocytes contrôles. En revanche, aucun changement n'a été observé suite au prétraitement par la cycloheximide (Figure.RS.2d).

Nous avons ensuite évalué si le prétraitement par la pactamycine pouvait modifier les réserves calciques du RS jonctionnel en étudiant l'activité des RyR stimulés par 10mM de caféine.

Comme pour la puromycine, le niveau du calcium du RS jonctionnel n'a pas été modifié par la pactamycine ou par la cycloheximide (Figure.RS.2e).

Le traitement par l'ionomycine, après la stimulation par la caféine, a permis de mettre en évidence une réduction de 71 \pm 2% des réserves cellulaires restantes dans les cardiomyocytes prétraités par la pactamycine comparés au contrôle. Cette diminution est comparable à celle

observée dans les cardiomyocytes prétraités par la puromycine ($64\pm 5\%$). Alors que le prétraitement par la cycloheximide n'a provoqué aucun changement (Figure.RS.2f).

Cette diminution ne peut être attribuée qu'aux stocks calciques propres au RS longitudinal. En effet, même si la stimulation par l'ionomycine après la caféine induit la libération du calcium mitochondrial, la concentration de cette dernière reste négligeable en comparaison avec celle du RS longitudinal.

D'une part, l'effet du prétraitement par la pactamycine est similaire à celui de la puromycine, toutes les deux connues pour leur rôle dans l'induction de la fuite calcique à travers le translocon. D'autre part, la cycloheximide, notre molécule témoin, n'a pas montré de changement dans la concentration calcique réticulaire.

Dans l'ensemble, nos résultats valident la spécificité de l'activation du translocon dans la réduction des stocks calciques du RS longitudinal.

B. Pactamycine, cycloheximide et protection contre les lésions d'ischémie/reperfusion.

Bien que les effets de la modulation de la fuite calcique par la pactamycine soient semblables à ceux induits par la puromycine, il était crucial de vérifier l'efficacité du prétraitement par la pactamycine contre les lésions d'ischémie/reperfusion. De même, il fallait aussi utiliser la cycloheximide comme contrôle afin de valider que les résultats observés dans l'article soient bien spécifiques à l'action de la fuite calcique à travers le translocon.

Comme expliqué précédemment, nous avons utilisé un modèle d'ischémie/reperfusion sur des souris C57Bl/6. Les souris ont subi une occlusion coronaire pendant 45min puis une reperfusion pendant 24h. Le prélèvement du cœur a ensuite permis d'étudier la taille de la zone nécrosée et de la zone à risque.

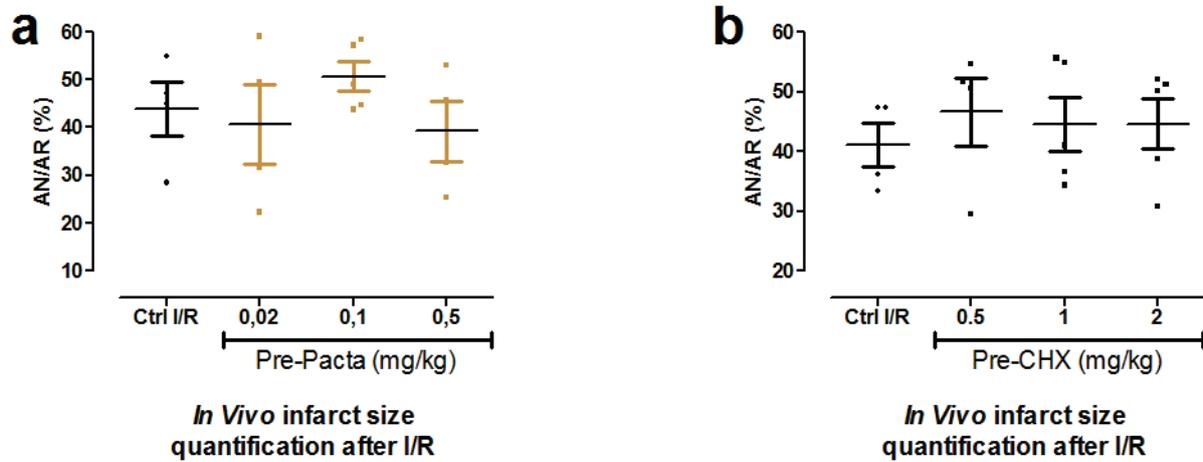


Figure.RS.3: Pas d'effet cardioprotecteur de la pactamycine ou de la cycloheximide

Nuages de points représentant la quantification de la zone infarctée après ischémie/reperfusion (I/R) calculé comme pourcentage de zone de nécrose (AN) sur la zone à risque (AR) dans le cœur des souris qui ont subi une ischémie *in vivo* pendant 45min puis une reperfusion de 24h avec différentes concentrations de pactamycine (Pacta) (a) ou de cycloheximide (CHX) (b) administrées en pré-conditionnement 10 min avant la chirurgie en comparaison à un groupe non traité (Ctrl I/R). Les données sont représentées par la moyenne±SEM.

Le prétraitement par la pactamycine ou la cycloheximide, a été réalisé 10min avant l'ischémie par injection intraveineuse de la molécule.

Les résultats ne montrent pas d'effet cardioprotecteur significatif suite à l'utilisation de la pactamycine en pré-conditionnement (Figure.RS.3a), néanmoins, des variations doses dépendantes ont été remarquées. Toutefois, il reste possible que des doses plus élevées puissent montrer un effet intéressant.

En revanche, comme attendu, aucun effet cardioprotecteur n'a été observé suite au prétraitement par la cycloheximide (Figure.RS.3b).

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que la réduction des stocks calciques du RS longitudinal pourrait être induite par l'activation spécifique de la fuite calcique à travers le translocon, et que cette diminution serait cardioprotectrice contre les lésions d'ischémie/reperfusion.

3. Effet de l'anisomycine, un inhibiteur de la fuite calcique à travers le translocon

Toujours dans la même logique, afin de valider la spécificité du translocon, nous nous sommes intéressés à inhiber l'activation du translocon par la puromycine en utilisant un autre antibiotique, l'anisomycine. Ce dernier est un inhibiteur de la peptidyl transférase qui bloque la chaîne peptidique dans le pore du translocon empêchant la fuite calcique et son utilisation en amont de la puromycine est connu pour limiter les effets de la fuite calcique à travers le translocon.

A. Anisomycine et modulation du calcium cellulaire

i. L'anisomycine inhibe la fuite calcique induite par la puromycine

Comme expliqué ci-dessus, les effets des différentes molécules ont été mesurés par la sonde

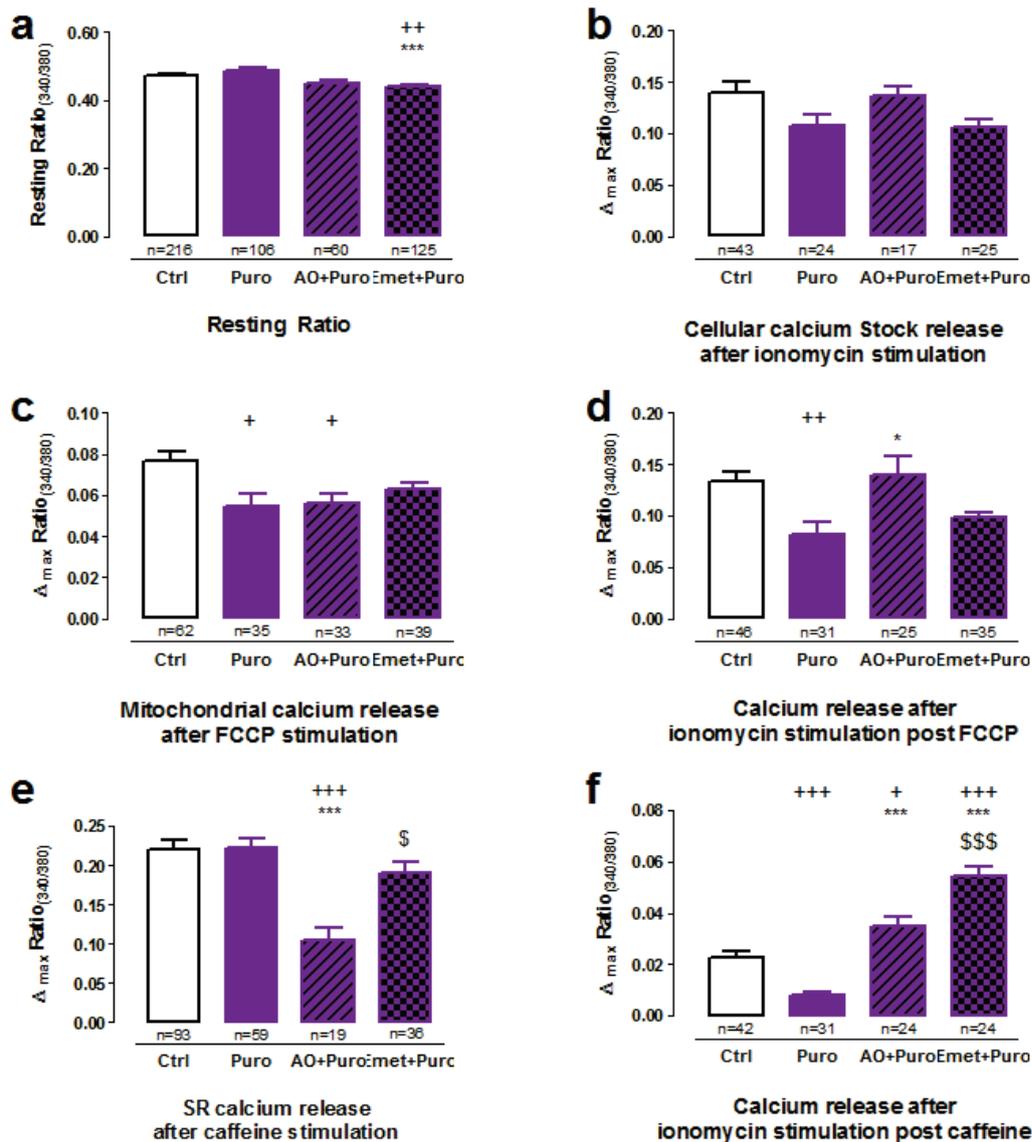


Figure.RS.4: L'anisomycine inhibe l'action de la puromycine sur la fuite calcique.

Les effets du prétraitement par la puromycine à 200 μ M (Puro) ainsi que de l'anisomycine à 200 μ M (AO) et l'émétine à 20 μ M (EMET) en amont de la puromycine ont été mesurés sur des cardiomyocytes chargées en Fura-2 dans du CCB pendant 30min (voir Matériels et méthodes). Les histogrammes représentent les différences entre la concentration de calcium cytosolique à l'équilibre (a), la teneur totale en calcium cellulaire évaluée par une stimulation par 5 μ M d'ionomycine (b), le contenu de calcium mitochondrial évalué par une stimulation par 25 μ M de FCCP (c), la quantité de calcium cellulaire restante après la stimulation par le FCCP et évaluée par une stimulation par l'ionomycine (d), les réserves de calcium dépendantes de RyR₂ évaluées par une stimulation par 10mM de caféine (e) et la quantité restante en calcium cellulaire après la stimulation par la caféine évaluée par une stimulation par l'ionomycine (f) dans les cardiomyocytes Ctrl et les cardiomyocytes prétraités par les différentes molécules.

Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM. n=nombre de cardiomyocytes. Statistiques: + p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001 vs. Ctrl ; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. Puro ; \$\$\$ p<0.001 vs. AO+Puro.

calcique cytosolique de haute affinité Fura-2, après prétraitement des cardiomyocytes pendant 30min avec la puromycine (200 μ M), l'anisomycine en amont de la puromycine (200 μ M) et nous avons gardé les résultats avec l'émétine (20 μ M) en amont de la puromycine dans le but de comparer les effets.

Les graphiques (Figure.RS.4) montrent les résultats de mesures calciques effectuées sur les cardiomyocytes suite aux différents traitements.

Aucune différence dans le calcium basal cytoplasmique n'a pas été observée suite aux différents prétraitements par la puromycine ainsi que le double traitement par l'anisomycine en amont de la puromycine) comparés au contrôle (Figure.RS.4a). Ce résultat est à l'encontre de l'effet observé par l'émétine (inhibiteur du translocon) utilisé dans l'article pour inhiber l'activation de la fuite calcique par la puromycine. En revanche, la stimulation par 5 μ M d'ionomycine a montré que le double traitement avec l'anisomycine comme celui avec l'émétine, a inhibé la faible réduction de la libération de calcium cellulaire totale observée après prétraitement par la puromycine (Figure.RS.4b).

Suite à la stimulation des cardiomyocytes par 25 μ M de FCCP, afin de libérer le calcium mitochondrial, le double traitement par l'anisomycine n'a pas inhibé la réduction de 29 \pm 8% observée dans les cellules prétraitées à la puromycine seule et a induit une réduction du taux de calcium mitochondrial de 27 \pm 6%, contrairement au double traitement par l'émétine (Figure.RS.4c). En revanche, la stimulation à l'ionomycine suite au FCCP des cardiomyocytes prétraitées par l'anisomycine en amont de la puromycine a montré des résultats similaires à ceux observés par le double traitement par l'émétine. Les deux molécules ont induit une inhibition de la réduction du calcium réticulaire observée par un prétraitement par la puromycine (Figure.RS.4d).

De façon surprenante, le double traitement par l'anisomycine a montré une forte réduction de

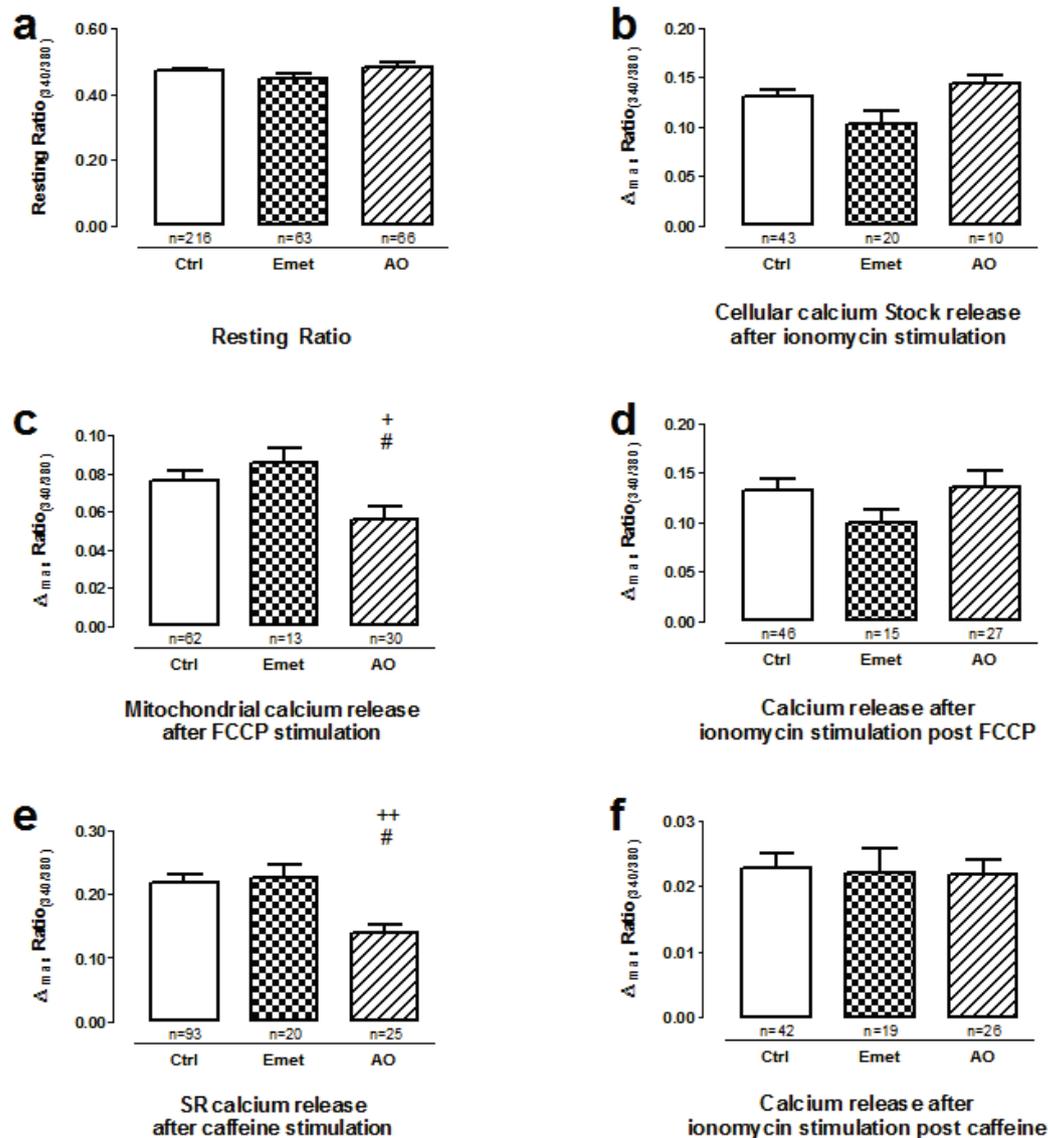


Figure.RS.5: L'anisomycine induit une diminution du stock calcique mitochondrial et RyR dependent

Les effets du prétraitement par l'anisomycine à 200 μ M (AO) et de l'émétine à 20 μ M (Emet) ont été mesurés sur des cardiomyocytes chargées en Fura-2 dans du CCB pendant 30min (voir Matériels et méthodes). Les histogrammes représentent les différences entre la concentration de calcium cytosolique à l'équilibre (a), la teneur totale en calcium cellulaire évaluée par une stimulation par 5 μ M d'ionomycine (b), le contenu de calcium mitochondrial évalué par une stimulation par 25 μ M de FCCP (c), la quantité de calcium cellulaire restante après la stimulation par le FCCP et évaluée par une stimulation par l'ionomycine (d), les réserves de calcium dépendantes de RyR₂ évaluées par une stimulation par 10mM de caféine (e) et la quantité restante en calcium cellulaire après la stimulation par la caféine évaluée par une stimulation par l'ionomycine (f) dans les cardiomyocytes Ctrl et les cardiomyocytes prétraités par les différentes molécules.

Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM. n=nombre de cardiomyocytes. Statistiques: + p<0.05, ++ p<0.01 vs. Ctrl ; # p<0.05 vs. Emet.

52±7% du taux du calcium du RS jonctionnel suite à la stimulation par 10mM de caféine, contrairement au prétraitement par la puromycine seul et l'émétine en amont de la puromycine, qui eux n'ont pas montré de changement dans la quantité de calcium libérée par la caféine (Figure.RS.4e). En revanche, l'effet du double traitement par l'anisomycine, comme celui de l'émétine en amont de la puromycine, non seulement a inhibé la réduction du taux du calcium du RS longitudinal, mais a également montré une augmentation du stock calcique réticulaire restant de 54±16% (Figure.RS.4f).

Les résultats observés lors du prétraitement par l'anisomycine étaient inattendus. En effet, bien que le double traitement par l'anisomycine inhibe l'activation de la fuite calcique par ce dernier à travers le translocon, nos résultats montrent une diminution significative du calcium mitochondrial ainsi que du calcium du RS jonctionnel après prétraitement par l'anisomycine en amont de la puromycine.

ii. L'anisomycine réduit les stocks calciques mitochondriaux et RyR-dépendant

Suite aux résultats inattendus du prétraitement par l'anisomycine en amont de la puromycine, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'anisomycine seule sur les cardiomyocytes afin de vérifier que nos observations ne sont pas liées à un artéfact induit par l'utilisation simultanée de l'anisomycine et la puromycine.

Ci-dessous les résultats des mesures effectuées en Fura-2 sur les cardiomyocytes suite aux différents prétraitements par l'anisomycine (200µM) et l'émétine à (20µM).

Le prétraitement de 30 min par l'émétine, comme celui par l'anisomycine, n'a pas montré de changements dans le niveau du calcium cytoplasmique basal comparé au contrôle (Figure.RS.5a). Les mêmes résultats ont été observés après stimulation par 5µM

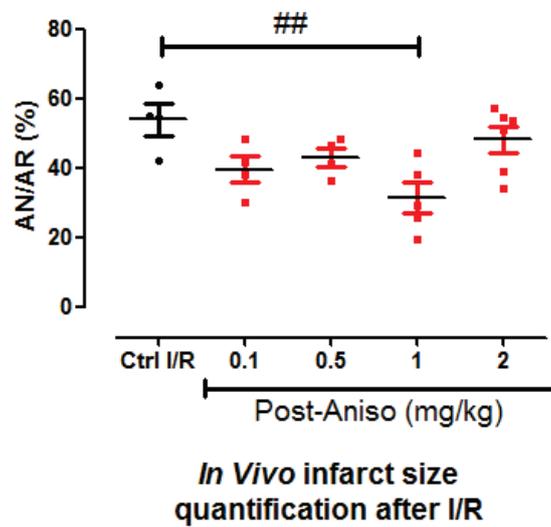


Figure.RS.6: L'anisomycine en post-conditionnement réduit la taille de la zone infarctie

Nuage de points représentant la quantification de la zone infarctie après ischémie/reperfusion (I/R) calculé comme pourcentage de zone de nécrose (AN) sur la zone à risque (AR) dans le cœur des souris qui ont subi une ischémie *in vivo* pendant 45min puis une reperfusion de 24h avec différentes concentrations d'anisomycine (AO) administrées en post-conditionnement 5min avant la reperfusion en comparaison à un groupe non traité (Ctrl I/R). Les données sont représentées par la moyenne±SEM. Statistiques: ## p <0,01 vs. Ctrl I/R.

d'ionomycine, qui ne montre aucun changement dans le taux de calcium cellulaire totale par rapport au contrôle (Figure.RS.5b).

Au contraire, suite à la stimulation par 25 μ M de FCCP, nous avons observé une diminution de 22 \pm 10% du niveau calcique mitochondrial dans les cardiomyocytes prétraités par l'anisomycine comparés aux cardiomyocytes contrôles, alors qu'aucune différence n'a été observée dans les cardiomyocytes prétraités par l'émétine (Figure.RS.5c).

Suite à la stimulation par la FCCP, nous n'avons pas observé de changement dans le taux du calcium cellulaire restant évalué par une stimulation à l'ionomycine, dans les différentes conditions (Figure.RS.5d).

Comme attendu, suite aux résultats observés dans la Figure.RS.4c, le prétraitement par l'anisomycine a induit une diminution dans le stock calcique du RS jonctionnel de 37 \pm 6% suite à la stimulation par la caféine en comparaison au contrôle contrairement aux cardiomyocytes prétraités par l'émétine qui n'ont montré aucun changement (Figure.RS.5c).

En revanche, contrairement à ce qui a été observé dans la Figure.RS.4d, aucune différence n'a été mesurée dans le taux du calcium du RS longitudinal, entre les différents prétraitements (Figure.RS.5d).

Les résultats observés montrent que la diminution du niveau de calcium mitochondrial et du RS jonctionnel est un effet spécifique au prétraitement par l'anisomycine.

Cet effet vient s'ajouter à son rôle comme inhibiteur de l'activité de fuite calcique à travers le translocon suite à son activation par la puromycine.

Il a été montré que la diminution du stock calcique RyR dépendante pouvait avoir un effet négatif sur la contraction cellulaire, or des molécules ayant les mêmes effets sur la contraction [534] ont démontré un effet cardioprotecteur une fois utilisées en post-conditionnement.

B. Anisomycine et protection contre les lésions d'ischémie/reperfusion.

Les effets observés par le prétraitement par l'anisomycine sur le niveau calcique du RS jonctionnel suggèrent que l'anisomycine peut avoir un effet cardioprotecteur lié à son action inotrope négatif.

Pour cela nous avons réalisé une étude dose réponse sur le post-conditionnement ischémique avec l'anisomycine sur notre modèle *in vivo* d'ischémie/reperfusion de souris C57Bl/6. Le post-conditionnement a été réalisé par une injection IV 5min avant la reperfusion.

Les résultats montrent un effet cardioprotecteur, traduit par une réduction significative de la taille de la zone infarctée ($42\pm 10\%$) suite à l'utilisation de l'anisomycine à 1mg/kg en post-conditionnement (Figure.RS.6).

Ces résultats ouvrent une nouvelle voie d'interrogation sur le mécanisme impliqué dans la cardioprotection induite suite à l'utilisation de l'anisomycine et si la diminution des stocks de RS jonctionnel est directement liée à cette protection.

DISCUSSION

Dans le cadre de nos travaux de recherche dans l'unité INRSEM U1060, nous nous intéressons particulièrement à la diminution des lésions cardiaques suite à l'ischémie/reperfusion et plus particulièrement aux lésions de reperfusion. Pour cela nous étudions les différentes voies de signalisation et les mécanismes qui s'activent au cours de l'ischémie/reperfusion afin de trouver des cibles potentielles de protection.

La majorité des études réalisées sur la protection contre la mortalité cellulaire notamment des cardiomyocytes se sont focalisées sur les mitochondries [404] et ont jusqu'à présent conduits à des essais cliniques décevants. Face à cette observation, notre projet porte sur le réticulum sarcoplasmique en tant que source majeure du calcium intracellulaire, compartiment inséparable de la mitochondrie puisque le calcium responsable de la surcharge calcique mitochondriale au cours de l'ischémie/reperfusion est majoritairement d'origine réticulaire. Il était donc capital d'essayer de connaître les voies de libération de calcium réticulaire dans les cardiomyocytes et d'appréhender leurs rôles potentiels pendant l'ischémie/reperfusion.

La dynamique calcique réticulaire est régulée majoritairement par des canaux calciques RyR₂ et IP₃R₂ et des pompes SERCA₂. La majorité du flux calcique intracellulaire entre le réticulum et les différents autres organites passe par ces structures en réponse à des stimuli extracellulaires. Cependant, d'autres canaux calciques commencent à être caractérisés: les canaux de fuite, qui affectent directement cette dynamique calcique.

La caractérisation de certains de ces canaux montre leur capacité à mobiliser des quantités non négligeables de calcium intra réticulaire, alors que leurs rôles à l'état de non excitation cellulaire est d'établir l'équilibre entre le niveau de calcium cellulaire et l'activité de SERCA.

Parmi ces canaux nous nous sommes intéressés particulièrement au translocon.

Le translocon est un canal ubiquitaire présent sur la membrane du RE et connu pour son rôle

dans le passage et la maturation des protéines néosynthétisées à travers son pore aqueux qui couvre complètement la bicouche lipidique du RE [291,479,535].

Mes travaux de thèse démontrent que le translocon est un canal de fuite calcique actif situé sur le RS longitudinal dans les cardiomyocytes de souris et que sa modulation par la puromycine n'affecte pas le taux du calcium présent dans les stocks du RS jonctionnel et donc n'impacte pas le mécanisme contractile des cardiomyocytes.

1. La pactamycine

Comme nous l'avons déjà évoqué, une approche génétique afin de moduler la perméabilité du pore du translocon est délétère [481], pour cela nous avons opté pour une approche pharmacologique. Pour valider les effets observés avec la puromycine nous avons utilisé un autre activateur de la fuite calcique à travers le translocon: la pactamycine [110].

D'un côté, les résultats des mesures calciques observées ont permis de valider que nos observations sont spécifiquement liées à l'activité du translocon. En effet, la pactamycine comme la puromycine induit une diminution du contenu calcique du RS longitudinal, sans affecter les compartiments RyR-dépendants. Toutefois, il faut noter que l'utilisation de la pactamycine n'a pas diminué le stock calcique basal mitochondrial. Ceci pourrait être la cause de l'échec de la protection contre les lésions d'ischémie/reperfusion observé suite à l'utilisation de différentes doses testées de la pactamycine.

D'un autre côté, la diminution du stock calcique réticulaire, surtout du RS longitudinal suite à la fuite devrait limiter les échanges calciques avec la mitochondrie, induisant une diminution de son stock calcique [470,471,536–539]. Dans le cas de la pactamycine, la forte diminution du stock calcique du RS longitudinal n'a pas eu d'effet significatif sur le taux calcique mitochondrial contrairement à ce que nous avons observé avec la puromycine.

Afin de comprendre cette différence, il faut vérifier tout d'abord ces résultats en augmentant le nombre des observations puis s'intéresser à la dynamique calcique en direct, en présence de la pactamycine. Ceci permettra de comprendre si l'effet observé est directement lié à la pactamycine ou si c'est un effet non spécifique secondaire.

Il a été montré que les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak peuvent favoriser la libération du calcium du RE et initier une forme d'apoptose associée à la caspase 12, tandis que les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-xl réduisent le contenu calcique du RE en favorisant la fuite calcique à travers IP₃R et protègent donc les cellules contre l'apoptose en contre-balançant les effets de Bax et Bak [267,539]. Or suite à l'incapacité du RS longitudinal de subvenir aux besoins mitochondriaux en calcium, on peut imaginer un système où la balance entre les protéines pro et anti-apoptotiques penche du côté de Bax et Bak en favorisant l'apoptose, ce qui explique l'échec rencontré dans les essais *in vivo*.

Etant donné la divergence dans les résultats de la taille d'infarctus observé dans les essais de pré-conditionnement avec la pactamycine *in vivo*, cette interprétation permettrait aussi de supposer que l'utilisation d'autres doses serait plus efficace en activant suffisamment la fuite pour déclencher des mécanismes de protection et limiter l'activation des protéines pro-apoptotiques.

2. La cycloheximide

Nous avons également utilisé la cycloheximide comme contrôle pour vérifier que les effets observés n'étaient pas dépendants de l'arrêt de l'activité de transcription protéique induite suite à l'utilisation des différents antibiotiques.

L'utilisation de la cycloheximide ne montre pas de changement au niveau des concentrations calciques intracellulaires. La diminution du calcium cytosolique libre pourrait s'expliquer par

une augmentation de la formation des complexes calcium-calmoduline afin d'activer différentes enzymes comme la phosphatase calcineurine, considérée parmi les facteurs les plus importants dans la résistance aux traitements anti-fongiques [540], dont la cycloheximide fait partie.

De plus, l'absence de résultats de protection contre les lésions d'ischémie/reperfusion *in vivo* suite au pré-conditionnement par la cycloheximide valide le lien entre la protection observée suite à l'utilisation de la puromycine (et potentiellement la pactamycine) et la modulation du calcium intracellulaire par la fuite à travers le translocon.

Pour conclure cette partie, nous avons pu démontrer grâce à deux molécules différentes, la puromycine et la pactamycine, que: (1) le translocon est un canal de fuite calcique situé sur la partie longitudinale du RS, (2) la fuite calcique à travers le translocon n'affecte pas les stocks calciques du RS jonctionnel et (3) l'activation de cette fuite est liée à la libération du pore du translocon de la chaîne polypeptidique et est indépendante de tout effet de l'arrêt de la traduction.

Nos résultats décrivent pour la première fois l'activité de la fuite calcique du translocon au sein du cardiomyocyte et corroborent les observations faites par plusieurs équipes sur d'autres types cellulaires non musculaires [110,517,520,522,523,525].

De plus, le fait de pouvoir moduler la fuite calcique du RS (et donc la survie cellulaire) sans impacter la contraction des cardiomyocytes (dû au calcium du RS jonctionnel) est capital. Il s'agit donc d'un élément clé dans la recherche d'une alternative thérapeutique en clinique.

3. L'anisomycine

Comme pour l'émétine, l'anisomycine devrait inhiber la fuite de calcium induite par la puromycine à travers le translocon et il en a été ainsi dans nos expériences. Cependant, un

effet inattendu à été observé: l'utilisation de l'anisomycine a induit une diminution non seulement du stock calcique du RS jonctionnel mais également du niveau du calcium mitochondrial.

Le rôle de l'anisomycine dans l'inhibition de la fuite calcique ainsi que l'inhibition de la déplétion calcique réticulaire a été largement étudié [110,517,520,522,523,525]. En revanche, son effet sur le stock calcique du RS reste peu connu.

Nos données suggèrent que les deux compartiments réticulaires (longitudinal et jonctionnel) des cardiomyocytes murins ne partagent pas de connectivité luminale, puisque la libération de calcium à travers le translocon du RS longitudinal semble indépendante de celle du RS jonctionnel ou RyR-dépendente. Toutefois, une régulation croisée pourrait exister, puisque l'utilisation de l'anisomycine en amont de la puromycine a induit une augmentation du niveau de calcium dans le RS longitudinal accompagnée d'une diminution de son niveau dans la RS jonctionnel. Cela pourrait s'expliquer par une boucle de rétroaction à travers laquelle l'activité des pompes SERCA peut être inhibée lorsque le niveau de calcium luminal est suffisamment élevé [541].

Nos résultats montrent également une diminution du taux de calcium mitochondrial suite à l'utilisation de l'anisomycine. Santulli *et al.* et d'autres, ont suggéré la présence d'une boucle de rétrocontrôle entre le RS jonctionnel et les mitochondries [538,542]. Par conséquent, une baisse du taux de calcium du RS jonctionnel comme celle induite par le prétraitement à l'anisomycine pourrait être la cause de la diminution observée du taux de calcium mitochondrial. Ce phénomène serait similaire à celui observé suite au prétraitement par la puromycine où la diminution du stock du RS longitudinal pourrait limiter l'échange calcique avec les mitochondries entraînant une diminution de leurs stocks de calcium [470,471,539,543].

Cette diminution pourrait expliquer la protection observée suite au post-conditionnement des souris *in vivo* par l'anisomycine après ischémie/reperfusion. En effet, la diminution du stock calcique mitochondrial a été proposée comme solution pour protéger le cœur contre les lésions d'ischémie/reperfusion. Une autre explication réside dans le fait que la reprise de l'activité des SERCA au moment de la reperfusion, suite à la reprise de la production d'ATP, induit des oscillations calciques issues du RS jonctionnel (§: III-2). Le fait que l'anisomycine réduise la concentration de ce dernier en calcium suggère qu'un post-conditionnement par l'anisomycine pourrait réduire les vagues calciques de la reperfusion en limitant les oscillations calciques et par conséquent la surcharge calcique cytoplasmique et mitochondriale.

De plus, une diminution du taux de calcium du RS jonctionnel pourrait avoir un effet inotrope négatif sur le fonctionnement du muscle cardiaque. Un tel effet est observé lors de l'utilisation des bêta-bloquants utilisés dans le post-conditionnement cardiaque [404,534].

En conclusion, des études additionnelles sur le translocon doivent être menées dans le but de mieux appréhender son rôle et son mécanisme d'action dans le cadre de la protection contre les lésions d'ischémie/reperfusion, voire aussi dans le cadre d'autres pathologies cardiaques.

❖ CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'homéostasie calcique au sein des cardiomyocytes nécessite l'intervention de plusieurs acteurs comme les canaux et les pompes calciques, les protéines tampons, et aussi les canaux de fuite calcique, parmi lesquels nous avons identifié le translocon.

Notre étude est la première à démontrer le rôle du translocon comme un canal de fuite calcique actif au sein des cardiomyocytes, plus précisément au niveau du RS longitudinal.

Grâce à une approche originale, nous avons pu démontrer aussi que la modulation de la fuite calcique à travers le translocon réduisait le stock calcique mitochondrial et du RS longitudinal, sans influencer le stock du RS jonctionnel responsable de la contraction cellulaire.

Plus important encore, nous avons initié l'étude des différentes voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection liées à la fuite calcique telle que l'apoptose, l'autophagie et le stress réticulaire.

En effet, l'implication d'un stress réticulaire modéré dans la limitation du transfert de calcium du réticulum à la mitochondrie pendant la reperfusion a été décrit plusieurs fois comme mécanisme de protection contre la surcharge calcique mitochondriale pendant la reperfusion [470,471], ainsi que dans le déclenchement de différentes voies de cardioprotection [462,465,467,468]. Nos résultats montrent que la modulation pharmacologique de la fuite calcique à travers le translocon permettrait de favoriser la survie cellulaire et jouerait un rôle protecteur contre les lésions d'ischémie/reperfusion. Ceci est validé par nos résultats de pré et post-conditionnement *in vitro* et *in vivo*. La déplétion calcique du réticulum suite à l'activation de la fuite calcique après prétraitement à la puromycine est connue comme inducteur d'un stress réticulaire et activateur de la réponse UPR et de l'apoptose [110,517,520].

Dans le suivi de ce travail, nous pensons que le stress réticulaire sera la clé de la cardioprotection observée. (1) Il serait crucial d'étudier les différentes voies connues de l'UPR afin de mieux comprendre le lien qui pourrait exister entre le calcium du RS longitudinal et la survie cellulaire au sein des cardiomyocytes. De plus, comme déjà évoqué dans l'introduction, le stress réticulaire serait une cible thérapeutique de premier choix dans la cardioprotection en raison de son implication dans un grand nombre de maladies à l'origine de l'échec des traitements actuels de cardioprotection comme l'obésité, le diabète et même le vieillissement... Trouver une cible commune représenterait une opportunité thérapeutique capitale (2) pour cela il serait intéressant de valider, chez des souris avec différents profils pathologiques, les effets de la cardioprotection obtenus dans notre étude ainsi que de tenter de comparer les voies impliquées dans cette potentielle protection. (3) Il serait aussi utile de décoder les différentes voies de mort cellulaire impliquées dans les lésions d'ischémie/reperfusion tel que l'apoptose, la nécrose, l'autophagie, les voies calcium-dépendantes, mais aussi les voies connues de protection comme les voies RISK et SAFE. De cette manière nous pourrions mieux comprendre les mécanismes d'action impliqués dans la cardioprotection et définir le rôle respectif de chaque voie afin de déterminer des cibles potentielles pour améliorer notre stratégie.

La diminution de la taille d'infarctus n'est pas le seul but de la cardioprotection, la survie de l'organe ainsi que son bon fonctionnement sont tout aussi importants, pour cela (4) des études sur les fonctions cardiaque post-infarctus seront cruciales. (5) Ces études seront accompagnées par l'étude des demie-vie de nos molécules d'intérêt, et leur potentiel effet toxique. En effet, l'insuffisance cardiaque constitue un problème majeur suite aux lésions d'ischémie/reperfusion, souvent liée aux traitements avec des effets inotropes négatifs utilisés dans les phases post-infarctus. Comme pour l'utilisation de l'anisomycine qui a montré une

diminution du taux calcique du RS jonctionnel, (6) il serait donc intéressant de regarder le potentiel effet inotrope suite au traitement par l'anisomycine. En effet, cela nous permettra de mieux comprendre l'organisation intra-cellulaire ainsi que de mieux adapter les doses et les traitements pendant et après l'ischémie/reperfusion.

Enfin, la majorité des mesures calciques que nous avons effectuées étaient des estimations mesurées en utilisant des sondes chimiques comme le Fura-2, (7) grâce à la technologie des virus crispr-cas-9, il serait intéressant d'étudier avec plus de minutie la dynamique calcique intracellulaire en utilisant des sondes génétiques mesurant d'une façon directe et précise l'évolution des concentrations calciques des différents organelles au sein des cardiomyocytes. Ceci permettra de valider les effets observés dans cette étude, mais plus important encore de mieux comprendre l'organisation spatiale des organelles au sein d'un cardiomyocyte.

Pour conclure, nous avons montré que la modulation de la fuite calcique à partir du translocon est cardioprotectrice et repose sur une réponse cellulaire multimodale induisant une diminution de l'apoptose médiée par les mitochondries, une diminution de l'activation de la calpaïne calcique dans le cytosol et une augmentation de l'autophagie. Cibler spécifiquement la réserve de calcium du RS longitudinal *via* un canal de fuite de calcium réticulaire est une approche nouvelle permettant d'une part de mieux comprendre la biologie cellulaire des cardiomyocytes et d'autre part de proposer une cible contre les lésions de reperfusion ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour la recherche clinique.

 REFERENCES

1. Betts JG, Desaix P, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Kruse D, et al. *Anatomy & physiology*. 2016.
2. Guyton AC, Hall JE. *Guyton and Hall textbook of medical physiology* [Internet]. 2011.
3. Bu G, Adams H, Berbari EJ, Rubart M. Uniform Action Potential Repolarization within the Sarcolemma of In Situ Ventricular Cardiomyocytes. *Biophys J*. 2009;96: 2532–2546. doi:10.1016/j.bpj.2008.12.3896
4. Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*. 1994;74: 555. doi:10.1161/01.RES.74.4.555
5. Pinali C, Bennett H, Davenport JB, Trafford AW, Kitmitto A. Three-dimensional reconstruction of cardiac sarcoplasmic reticulum reveals a continuous network linking transverse-tubules: this organization is perturbed in heart failure. *Circ Res*. 2013;113: 1219–1230. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301348
6. Shimada T, Kawazato H, Yasuda A, Ono N, Sueda K. Cytoarchitecture and intercalated disks of the working myocardium and the conduction system in the mammalian heart. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004;280: 940–951. doi:10.1002/ar.a.20109
7. Mezzano V, Pellman J, Sheikh F. Cell Junctions in the Specialized Conduction System of the Heart. *Cell Commun Adhes*. 2014;21: 149–159. doi:10.3109/15419061.2014.905928
8. Goodenough DA, Paul DL. Gap Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1: a002576. doi:10.1101/cshperspect.a002576
9. Sheikh F, Ross RS, Chen J. Cell-Cell Connection to Cardiac Disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2009;19: 182–190. doi:10.1016/j.tcm.2009.12.001
10. Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther*. 2009;123: 255–278. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.05.002
11. Kelly RA, Eid H, Krämer BK, O'Neill M, Liang BT, Reers M, et al. Endothelin enhances the contractile responsiveness of adult rat ventricular myocytes to calcium by a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Clin Invest*. 1990;86: 1164–1171.
12. Ducat A, Doridot L, Calicchio R, Méhats C, Vilotte J-L, Castille J, et al. Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Sci Rep*. 2016;6: 19196. doi:10.1038/srep19196
13. Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, et al. Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res*. 1991;69: 209. doi:10.1161/01.RES.69.1.209
14. Fukuta H, Little WC. The Cardiac Cycle and the Physiological Basis of Left Ventricular Contraction, Ejection, Relaxation, and Filling. *Heart Fail Clin*. 2008;4: 1–

11. doi:10.1016/j.hfc.2007.10.004
15. Lundbäck S. Cardiac pumping and function of the ventricular septum. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1986;550: 1–101.
16. Dupuis LJ, Lumens J, Arts T, Delhaas T. Mechano-chemical Interactions in Cardiac Sarcomere Contraction: A Computational Modeling Study. *PLoS Comput Biol.* 2016;12: e1005126. doi:10.1371/journal.pcbi.1005126
17. Means AR, Bagchi IC, VanBerkum MF, Kemp BE. Regulation of smooth muscle myosin light chain kinase by calmodulin. *Adv Exp Med Biol.* 1991;304: 11–24.
18. Ikebe M, Hartshorne DJ, Elzinga M. Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Phosphorylation sites and effects of phosphorylation. *J Biol Chem.* 1987;262: 9569–9573.
19. MacLeod KT. Recent advances in understanding cardiac contractility in health and disease. *F1000Research.* 2016;5: F1000 Faculty Rev-1770. doi:10.12688/f1000research.8661.1
20. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415: 198–205. doi:10.1038/415198a
21. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1: 11–21. doi:10.1038/35036035
22. Fearnley CJ, Roderick HL, Bootman MD. Calcium Signaling in Cardiac Myocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3: a004242. doi:10.1101/cshperspect.a004242
23. Schwaller B. Cytosolic Ca(2+) Buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2: a004051. doi:10.1101/cshperspect.a004051
24. Prins D, Michalak M. Organellar Calcium Buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3: a004069. doi:10.1101/cshperspect.a004069
25. Wang S-Q, Song L-S, Lakatta EG, Cheng H. Ca²⁺ signalling between single L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in heart cells. *Nature.* 2001;410: 592–596. doi:10.1038/35069083
26. Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature.* 1999;399: 159–162. doi:10.1038/20200
27. Egdell R, MacLeod K. Calcium Extrusion During Aftercontractions in Cardiac Myocytes: The Role of the Sodium-calcium Exchanger in the Generation of the Transient Inward Current. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32: 85–93. doi:10.1006/jmcc.1999.1056
28. Yue Z, Xie J, Yu AS, Stock J, Du J, Yue L. Role of TRP channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 2015;308: H157–H182.

- doi:10.1152/ajpheart.00457.2014
29. Brini M, Carafoli E. The Plasma Membrane Ca(2+) ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3: a004168. doi:10.1101/cshperspect.a004168
 30. Caride AJ, Filoteo AG, Penheiter AR, Pászty K, Enyedi Á, Penniston JT. Delayed activation of the plasma membrane calcium pump by a sudden increase in Ca²⁺: fast pumps reside in fast cells. *Cell Calcium.* 2001;30: 49–57. doi:10.1054/ceca.2001.0212
 31. Parks C, Alam MA, Sullivan R, Mancarella S. STIM1-dependent Ca(2+) microdomains are required for myofilament remodeling and signaling in the heart. *Sci Rep.* 2016;6: 25372. doi:10.1038/srep25372
 32. Correll RN, Goonasekera SA, van Berlo JH, Burr AR, Accornero F, Zhang H, et al. STIM1 elevation in the heart results in aberrant Ca(2+) handling and cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;87: 38–47. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.07.032
 33. Bartos DC, Grandi E, Ripplinger CM. Ion Channels in the Heart. *Compr Physiol.* 2015;5: 1423–1464. doi:10.1002/cphy.c140069
 34. Cavalli AL, O'Brien NW, Barlow SB, Betto R, Glembotski CC, Palade PT, et al. Expression and functional characterization of SCA_{MPER}: a sphingolipid-modulated calcium channel of cardiomyocytes. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2003;284: C780. doi:10.1152/ajpcell.00382.2002
 35. Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S. Presence of store-operated Ca²⁺ entry in C57BL/6J mouse ventricular myocytes and its suppression by sevoflurane. *Br J Anaesth.* 2012;109: 352–360. doi:10.1093/bja/aes212
 36. Madamanchi A. β-Adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *McGill J Med MJM.* 2007;10: 99–104.
 37. McFarland TP, Milstein ML, Cala' SE. Rough endoplasmic reticulum to junctional sarcoplasmic reticulum trafficking of calsequestrin in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49: 556–564. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.05.012
 38. Messina A, Reina S, Guarino F, De Pinto V. VDAC isoforms in mammals. *VDAC Struct Funct Regul Mitochondrial Cell Metab.* 2012;1818: 1466–1476. doi:10.1016/j.bbamem.2011.10.005
 39. Das S, Steenbergen C, Murphy E. Does the Voltage Dependent Anion Channel Modulate Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury? *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818: 1451–1456. doi:10.1016/j.bbamem.2011.11.008
 40. Patron M, Checchetto V, Raffaello A, Teardo E, Vecellio Reane D, Mantoan M, et al. MICU1 and MICU2 Finely Tune the Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter by Exerting Opposite Effects on MCU Activity. *Mol Cell.* 2014;53: 726–737. doi:10.1016/j.molcel.2014.01.013
 41. Palty R, Hershinkel M, Sekler I. Molecular Identity and Functional Properties of the

- Mitochondrial Na(+)/Ca(2+) Exchanger. *J Biol Chem.* 2012;287: 31650–31657. doi:10.1074/jbc.R112.355867
42. Garciarena CD, Caldiz CI, Correa MV, Schinella GR, Mosca SM, Chiappe de Cingolani GE, et al. Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitors decrease myocardial superoxide production via direct mitochondrial action. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2008;105: 1706–1713. doi:10.1152/jappphysiol.90616.2008
43. Grandi E, Herren AW. CaMKII-dependent regulation of cardiac Na⁺ homeostasis. *Front Pharmacol.* 2014;5: 41. doi:10.3389/fphar.2014.00041
44. Beutner G, Sharma VK, Giovannucci DR, Yule DI, Sheu SS. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* 2001;276: 21482–21488. doi:10.1074/jbc.M101486200
45. Beutner G, Sharma VK, Lin L, Ryu S-Y, Dirksen RT, Sheu S-S. Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: Transducer of excitation–metabolism coupling. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2005;1717: 1–10. doi:10.1016/j.bbamem.2005.09.016
46. Altschaffl BA, Beutner G, Sharma VK, Sheu S-S, Valdivia HH. The mitochondrial ryanodine receptor in rat heart: A pharmaco-kinetic profile. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2007;1768: 1784–1795. doi:10.1016/j.bbamem.2007.04.011
47. Dedkova EN, Blatter LA. Calcium signaling in cardiac mitochondria. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;58: 125–133. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.12.021
48. Ryu S-Y, Beutner G, Dirksen RT, Kinnally KW, Sheu S-S. Mitochondrial Ryanodine Receptors and Other Mitochondrial Ca²⁺ Permeable Channels. *FEBS Lett.* 2010;584: 1948–1955. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.032
49. Tewari SG, Camara AKS, Stowe DF, Dash RK. Computational analysis of Ca²⁺ dynamics in isolated cardiac mitochondria predicts two distinct modes of Ca²⁺ uptake. *J Physiol.* 2014;592: 1917–1930. doi:10.1113/jphysiol.2013.268847
50. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11: 621–632. doi:10.1038/nrm2952
51. Halestrap AP, Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *Mitochondria Basic Mitochondrial Biol Cardiovasc Dis.* 2015;78: 129–141. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.08.018
52. Juhaszova M, Wang S, Zorov DB, Nuss HB, Gleichmann M, Mattson MP, et al. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1123: 197–212. doi:10.1196/annals.1420.023
53. Morciano G, Giorgi C, Bonora M, Punzetti S, Pavasini R, Wieckowski MR, et al. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury. *Mitochondria Basic Mitochondrial Biol Cardiovasc Dis.*

- 2015;78: 142–153. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.08.015
54. Vertel BM, Walters LM, Mills D. Subcompartments of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Biol.* 1992;3: 325–341.
55. Fill M, Copello JA. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiol Rev.* 2002;82: 893. doi:10.1152/physrev.00013.2002
56. Sleiman NH, McFarland TP, Jones LR, Cala SE. Transitions of protein traffic from cardiac ER to junctional SR. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;81: 34–45. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.12.025
57. Lewarchik CM, Orabi AI, Jin S, Wang D, Muili KA, Shah AU, et al. The ryanodine receptor is expressed in human pancreatic acinar cells and contributes to acinar cell injury. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2014;307: G574–G581. doi:10.1152/ajpgi.00143.2014
58. Hamilton SL, Serysheva II. Ryanodine Receptor Structure: Progress and Challenges. *J Biol Chem.* 2009;284: 4047–4051. doi:10.1074/jbc.R800054200
59. Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37: 417–429. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.05.026
60. Vites AM, Pappano AJ. Distinct modes of inhibition by ruthenium red and ryanodine of calcium-induced calcium release in avian atrium. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;268: 1476.
61. Xu L, Tripathy A, Pasek DA, Meissner G. Potential for pharmacology of ryanodine receptor/calcium release channels. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;853: 130–148.
62. Zucchi R, Ronca-Testoni S. The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev.* 1997;49: 1–51.
63. Michalak M, Opas M. Endoplasmic and sarcoplasmic reticulum in the heart. *Trends Cell Biol.* 2009;19: 253–259. doi:10.1016/j.tcb.2009.03.006
64. Hund TJ, Ziman AP, Lederer W, Mohler PJ. The cardiac IP₃ receptor: Uncovering the role of “the other” calcium release channel. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45: 159–161. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.06.001
65. Roderick HL, Knollmann BC. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (InsP(3)R) – “exciting” players in cardiac excitation-contraction coupling? *Circulation.* 2013;128: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005157. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005157
66. Harzheim D, Talasila A, Movassagh M, Foo RS-Y, Figg N, Bootman MD, et al. Elevated InsP₃R expression underlies enhanced calcium fluxes and spontaneous extra-systolic calcium release events in hypertrophic cardiac myocytes. *Channels Austin Tex.* 2010;4: 67–71.

67. Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, et al. Local InsP(3)-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest.* 2006;116: 675–682. doi:10.1172/JCI27374
68. Higazi DR, Fearnley CJ, Drawnel FM, Talasila A, Corps EM, Ritter O, et al. Endothelin-1-Stimulated InsP3-Induced Ca²⁺ Release Is a Nexus for Hypertrophic Signaling in Cardiac Myocytes. *Mol Cell.* 2009;33: 472–482. doi:10.1016/j.molcel.2009.02.005
69. Molkenin JD. Dichotomy of Ca²⁺ in the heart: contraction versus intracellular signaling. *J Clin Invest.* 2006;116: 623–626. doi:10.1172/JCI27824
70. Lipp P, Laine M, Tovey SC, Burrell KM, Berridge MJ, Li W, et al. Functional InsP3 receptors that may modulate excitation–contraction coupling in the heart. *Curr Biol.* 2000;10: 939-S1. doi:10.1016/S0960-9822(00)00624-2
71. Parys JB, De Smedt H. Inositol 1,4,5-Trisphosphate and Its Receptors. In: Islam MS, editor. *Calcium Signaling.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. pp. 255–279. Available: http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_11
72. Signore S, Sorrentino A, Ferreira-Martins J, Kannappan R, Shafaie M, Ben FD, et al. Inositol 1, 4, 5-Triphosphate Receptors and Human Left Ventricular Myocytes. *Circulation.* 2013;128: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002764. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002764
73. Seidlmayer LK, Kuhn J, Berbner A, Arias-Loza P-A, Williams T, Kaspar M, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated sarcoplasmic reticulum-mitochondrial crosstalk influences adenosine triphosphate production via mitochondrial Ca²⁺ uptake through the mitochondrial ryanodine receptor in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 2016;112: 491–501. doi:10.1093/cvr/cvw185
74. Shareef MA, Anwer LA, Poizat C. Cardiac SERCA2A/B: Therapeutic targets for heart failure. *Eur J Pharmacol.* 2014;724: 1–8. doi:10.1016/j.ejphar.2013.12.018
75. Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res.* 2008;77: 265–273. doi:10.1093/cvr/cvm056
76. Blackwell DJ, Zak TJ, Robia SL. Cardiac Calcium ATPase Dimerization Measured by Cross-Linking and Fluorescence Energy Transfer. *Biophys J.* 2016;111: 1192–1202. doi:10.1016/j.bpj.2016.08.005
77. Eisner D, Bode E, Venetucci L, Trafford A. Calcium flux balance in the heart. *Calcium Signal Heart.* 2013;58: 110–117. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.11.017
78. Dally S, Monceau V, Corvazier E, Bredoux R, Raies A, Bobe R, et al. Compartmentalized expression of three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 isoforms including the switch to ER stress, SERCA3f, in non-failing and failing human heart. *Cell Calcium.* 2009;45: 144–154. doi:10.1016/j.ceca.2008.08.002

79. Sammels E, Parys JB, Missiaen L, De Smedt H, Bultynck G. Intracellular Ca²⁺ storage in health and disease: A dynamic equilibrium. *Cell Calcium*. 2010;47: 297–314. doi:10.1016/j.ceca.2010.02.001
80. Gees M, Colsoul B, Nilius B. The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2: a003962. doi:10.1101/cshperspect.a003962
81. Lotteau S, Ducreux S, Romestaing C, Legrand C, Coppenolle FV. Characterization of Functional TRPV1 Channels in the Sarcoplasmic Reticulum of Mouse Skeletal Muscle. *PLOS ONE*. 2013;8: e58673. doi:10.1371/journal.pone.0058673
82. Wegierski T, Steffl D, Kopp C, Tauber R, Buchholz B, Nitschke R, et al. TRPP2 channels regulate apoptosis through the Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*. 2009;28: 490–499. doi:10.1038/emboj.2008.307
83. Nishi M, Komazaki S, Iino M, Kangawa K, Takeshima H. Mitsugumin23, a novel transmembrane protein on endoplasmic reticulum and nuclear membranes. *FEBS Lett*. 1998;432: 191–196.
84. Venturi E, Mio K, Nishi M, Ogura T, Moriya T, Pitt SJ, et al. Mitsugumin 23 Forms a Massive Bowl-Shaped Assembly and Cation-Conducting Channel. *Biochemistry (Mosc)*. 2011;50: 2623–2632. doi:10.1021/bi1019447
85. Yamashita A, Taniwaki T, Kaikoi Y, Yamazaki T. Protective role of the endoplasmic reticulum protein mitsugumin23 against ultraviolet C-induced cell death. *FEBS Lett*. 2013;587: 1299–1303. doi:10.1016/j.febslet.2013.03.024
86. Dolmatova E, Spagnol G, Boassa D, Baum JR, Keith K, Ambrosi C, et al. Cardiomyocyte ATP release through pannexin 1 aids in early fibroblast activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303: H1208-1218. doi:10.1152/ajpheart.00251.2012
87. Ishikawa M, Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Fukumoto S, Yamada Y. Pannexin 3 functions as an ER Ca(2+) channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *J Cell Biol*. 2011;193: 1257–1274. doi:10.1083/jcb.201101050
88. Penuela S, Kelly JJ, Churko JM, Barr KJ, Berger AC, Laird DW. Panx1 regulates cellular properties of keratinocytes and dermal fibroblasts in skin development and wound healing. *J Invest Dermatol*. 2014;134: 2026–2035. doi:10.1038/jid.2014.86
89. Vanden Abeele F, Bidaux G, Gordienko D, Beck B, Panchin YV, Baranova AV, et al. Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *J Cell Biol*. 2006;174: 535. doi:10.1083/jcb.200601115
90. Ambrosi C, Gassmann O, Pranskevich JN, Boassa D, Smock A, Wang J, et al. Pannexin1 and Pannexin2 Channels Show Quaternary Similarities to Connexons and Different Oligomerization Numbers from Each Other. *J Biol Chem*. 2010;285: 24420–24431. doi:10.1074/jbc.M110.115444
91. Makarenkova HP, Shestopalov VI. The role of pannexin hemichannels in inflammation

- and regeneration. *Front Physiol.* 2014;5: 63. doi:10.3389/fphys.2014.00063
92. Takeda T, Asahi M, Yamaguchi O, Hikoso S, Nakayama H, Kusakari Y, et al. Presenilin 2 regulates the systolic function of heart by modulating Ca²⁺ signaling. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2005;19: 2069–2071. doi:10.1096/fj.05-3744fje
 93. Zhang H, Sun S, Herreman A, De Strooper B, Bezprozvanny I. Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2010;30: 8566–8580. doi:10.1523/JNEUROSCI.1554-10.2010
 94. Ikura M, Osawa M, Ames JB. The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 2002;24: 625–636. doi:10.1002/bies.10105
 95. Yáñez M, Gil-Longo J, Campos-Toimil M. Calcium Binding Proteins. In: Islam MS, editor. *Calcium Signaling.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. pp. 461–482. Available: http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_19
 96. Michalak M, Guo L, Robertson M, Lozak M, Opas M. Calreticulin in the heart. *Mol Cell Biochem.* 2004;263: 137–142. doi:10.1023/B:MCBI.0000041855.10149.5f
 97. John LM, Lechleiter JD, Camacho P. Differential Modulation of SERCA2 Isoforms by Calreticulin. *J Cell Biol.* 1998;142: 963–973.
 98. Li Y, Camacho P. Ca(2+)-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *J Cell Biol.* 2004;164: 35–46. doi:10.1083/jcb.200307010
 99. Roderick HL, Lechleiter JD, Camacho P. Cytosolic Phosphorylation of Calnexin Controls Intracellular Ca(2+) Oscillations via an Interaction with Serca2b. *J Cell Biol.* 2000;149: 1235–1248.
 100. Vandecaetsbeek I, Raeymaekers L, Wuytack F, Vangheluwe P. Factors controlling the activity of the SERCA2a pump in the normal and failing heart. *BioFactors Oxf Engl.* 2009;35: 484–499. doi:10.1002/biof.63
 101. Shan H, Wei J, Zhang M, Lin L, Yan R, Zhu Y, et al. Calreticulin is localized at mitochondria of rat cardiomyocytes and affected by furazolidone. *Mol Cell Biochem.* 2014;397: 125–130. doi:10.1007/s11010-014-2179-z
 102. Zhang M, Wei J, Li Y, Shan H, Yan R, Lin L, et al. Novel distribution of calreticulin to cardiomyocyte mitochondria and its increase in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;449: 62–68. doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.156
 103. Bousette N, Abbasi C, Chis R, Gramolini AO. Calnexin silencing in mouse neonatal cardiomyocytes induces Ca²⁺ cycling defects, ER stress, and apoptosis. *J Cell Physiol.* 2014;229: 374–383. doi:10.1002/jcp.24459
 104. Coe H, Bedard K, Groenendyk J, Jung J, Michalak M. Endoplasmic reticulum stress in the absence of calnexin. *Cell Stress Chaperones.* 2008;13: 497–507.

- doi:10.1007/s12192-008-0049-x
105. Prior K-K, Wittig I, Leisegang MS, Groenendyk J, Weissmann N, Michalak M, et al. The Endoplasmic Reticulum Chaperone Calnexin Is a NADPH Oxidase NOX4 Interacting Protein. *J Biol Chem*. 2016;291: 7045–7059. doi:10.1074/jbc.M115.710772
 106. Vinayagamoorthy T, Rajakumar AR. Stress relief protein modulation by calnexin. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;793: 479–484.
 107. Györke S, Stevens SCW, Terentyev D. Cardiac calsequestrin: quest inside the SR. *J Physiol*. 2009;587: 3091–3094. doi:10.1113/jphysiol.2009.172049
 108. Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Müller L, et al. Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66: 1556–1569. doi:10.1007/s00018-009-8745-y
 109. Lamb HK, Mee C, Xu W, Liu L, Blond S, Cooper A, et al. The affinity of a major Ca²⁺ binding site on GRP78 is differentially enhanced by ADP and ATP. *J Biol Chem*. 2006;281: 8796–8805. doi:10.1074/jbc.M503964200
 110. Hammadi M, Oulidi A, Gackière F, Katsogiannou M, Slomianny C, Roudbaraki M, et al. Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *FASEB J*. 2013;27: 1600–1609. doi:10.1096/fj.12-218875
 111. Lièvremont JP, Rizzuto R, Hendershot L, Meldolesi J. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J Biol Chem*. 1997;272: 30873–30879.
 112. Ouyang Y-B, Xu L-J, Emery JF, Lee AS, Giffard RG. Overexpressing GRP78 influences Ca²⁺ handling and function of mitochondria in astrocytes after ischemia-like stress. *Mitochondrion*. 2011;11: 279–286. doi:10.1016/j.mito.2010.10.007
 113. Booth L, Roberts JL, Cash DR, Tavallai S, Jean S, Fidanza A, et al. GRP78/BiP/HSPA5/Dna K is a Universal Therapeutic Target for Human Disease. *J Cell Physiol*. 2015;230: 1661–1676. doi:10.1002/jcp.24919
 114. Bando Y, Katayama T, Kasai K, Taniguchi M, Tamatani M, Tohyama M. GRP94 (94 kDa glucose-regulated protein) suppresses ischemic neuronal cell death against ischemia/reperfusion injury. *Eur J Neurosci*. 2003;18: 829–840.
 115. Little E, Ramakrishnan M, Roy B, Gazit G, Lee AS. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1994;4: 1–18.
 116. Vitadello M, Ausma J, Borgers M, Gambino A, Casarotto DC, Gorza L. Increased Myocardial GRP94 Amounts During Sustained Atrial Fibrillation. *Circulation*. 2001;103: 2201. doi:10.1161/01.CIR.103.17.2201
 117. Gregory KN, Ginsburg KS, Bodi I, Hahn H, Marreez YMA, Song Q, et al. Histidine-rich Ca binding protein: a regulator of sarcoplasmic reticulum calcium sequestration

- and cardiac function. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;40: 653–665. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.02.003
118. Rani S, Park CS, Sreenivasaiah PK, Kim DH. Characterization of Ca(2+)-Dependent Protein-Protein Interactions within the Ca(2+) Release Units of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum. *Mol Cells.* 2016;39: 149–155. doi:10.14348/molcells.2016.2284
 119. Arvanitis DA, Vafiadaki E, Fan G-C, Mitton BA, Gregory KN, Del Monte F, et al. Histidine-rich Ca-binding protein interacts with sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 2007;293: H1581. doi:10.1152/ajpheart.00278.2007
 120. Zhou X, Fan G-C, Ren X, Waggoner JR, Gregory KN, Chen G, et al. Overexpression of histidine-rich Ca-binding protein protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *Cardiovasc Res.* 2007;75: 487. doi:10.1016/j.cardiores.2007.04.005
 121. Sorimachi H, Suzuki K. The structure of calpain. *J Biochem (Tokyo).* 2001;129: 653–664.
 122. Ozaki T, Tomita H, Tamai M, Ishiguro S-I. Characteristics of mitochondrial calpains. *J Biochem (Tokyo).* 2007;142: 365–376. doi:10.1093/jb/mvm143
 123. Reverter D, Strobl S, Fernandez-Catalan C, Sorimachi H, Suzuki K, Bode W. Structural basis for possible calcium-induced activation mechanisms of calpains. *Biol Chem.* 2001;382: 753–766. doi:10.1515/BC.2001.091
 124. Wendt A, Thompson VF, Goll DE. Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biol Chem.* 2004;385: 465–472. doi:10.1515/BC.2004.054
 125. Ke L, Qi XY, Dijkhuis A-J, Chartier D, Nattel S, Henning RH, et al. Calpain mediates cardiac troponin degradation and contractile dysfunction in atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45: 685–693. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.08.012
 126. Xue H, Li W, Li Y, Gong Y, Yang B, Jin C, et al. Calpain I inhibition prevents atrial structural remodeling in a canine model with atrial fibrillation. *Chin Med J (Engl).* 2008;121: 32–37.
 127. Parker RA, Miller SJ, Gibson DM. Phosphorylation of microsomal HMG CoA reductase increases susceptibility to proteolytic degradation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;125: 629–635.
 128. Shioda N, Moriguchi S, Shirasaki Y, Fukunaga K. Generation of constitutively active calcineurin by calpain contributes to delayed neuronal death following mouse brain ischemia. *J Neurochem.* 2006;98: 310–320. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03874.x
 129. Blomgren K, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Leverin AL, Bahr BA, et al. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of “pathological apoptosis”? *J Biol Chem.* 2001;276: 10191–10198. doi:10.1074/jbc.M007807200
 130. Gafni J, Cong X, Chen SF, Gibson BW, Ellerby LM. Calpain-1 cleaves and activates

- caspase-7. *J Biol Chem.* 2009;284: 25441–25449. doi:10.1074/jbc.M109.038174
131. Camins A, Verdaguer E, Folch J, Pallàs M. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev.* 2006;12: 135–148. doi:10.1111/j.1527-3458.2006.00135.x
132. Crocker SJ, Smith PD, Jackson-Lewis V, Lamba WR, Hayley SP, Grimm E, et al. Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2003;23: 4081–4091.
133. Nath R, Raser KJ, Stafford D, Hajimohammadreza I, Posner A, Allen H, et al. Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem J.* 1996;319 (Pt 3): 683–690.
134. Wang W, Martindale J, Metzger JM. Parvalbumin: Targeting calcium handling in cardiac diastolic dysfunction. *Gen Physiol Biophys.* 2009;28 Spec No Focus: F3-6.
135. Asp ML, Sjaastad FV, Siddiqui JK, Davis JP, Metzger JM. Effects of Modified Parvalbumin EF-Hand Motifs on Cardiac Myocyte Contractile Function. *Biophys J.* 2016;110: 2094–2105. doi:10.1016/j.bpj.2016.03.037
136. Farrell EF, Antaramian A, Benkusky N, Zhu X, Rueda A, Gómez AM, et al. Regulation of cardiac excitation-contraction coupling by sorcin, a novel modulator of ryanodine receptors. *Biol Res.* 2004;37: 609–612.
137. Fowler MR, Colotti G, Chiancone E, Higuchi Y, Seidler T, Smith GL. Complex modulation of L-type Ca²⁺ current inactivation by sorcin in isolated rabbit cardiomyocytes. *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* 2008;457: 1049. doi:10.1007/s00424-008-0575-5
138. Matsumoto T, Hisamatsu Y, Ohkusa T, Inoue N, Sato T, Suzuki S, et al. Sorcin interacts with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and modulates excitation-contraction coupling in the heart. *Basic Res Cardiol.* 2005;100: 250–262. doi:10.1007/s00395-005-0518-7
139. Valeyev NV, Bates DG, Heslop-Harrison P, Postlethwaite I, Kotov NV. Elucidating the mechanisms of cooperative calcium-calmodulin interactions: a structural systems biology approach. *BMC Syst Biol.* 2008;2: 48. doi:10.1186/1752-0509-2-48
140. Maier LS. Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) in the Heart. In: Islam MS, editor. *Calcium Signaling.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. pp. 685–702. Available: http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_30
141. Balshaw DM, Xu L, Yamaguchi N, Pasek DA, Meissner G. Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem.* 2001;276: 20144–20153. doi:10.1074/jbc.M010771200
142. De Koninck P, Schulman H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science.* 1998;279: 227–230.

143. Schaub MC, Heizmann CW. Calcium, troponin, calmodulin, S100 proteins: From myocardial basics to new therapeutic strategies. *Ebashi Meml Issue*. 2008;369: 247–264. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.082
144. Uchinoumi H, Yang Y, Oda T, Li N, Alsina KM, Puglisi JL, et al. CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;98: 62–72. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.06.007
145. Wang X, Wang M. The S100 protein family and its application in cardiac diseases. *World J Emerg Med*. 2010;1: 165–168.
146. Kiewitz R, Acklin C, Minder E, Huber PR, Schäfer BW, Heizmann CW. S100A1, a New Marker for Acute Myocardial Ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;274: 865–871. doi:10.1006/bbrc.2000.3229
147. Most P, Boerries M, Eicher C, Schweda C, Ehlermann P, Pleger ST, et al. Extracellular S100A1 protein inhibits apoptosis in ventricular cardiomyocytes via activation of the extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2). *J Biol Chem*. 2003;278: 48404–48412. doi:10.1074/jbc.M308587200
148. Kiewitz R, Acklin C, Schäfer BW, Maco B, Uhrík B, Wuytack F, et al. Ca²⁺-dependent interaction of S100A1 with the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase2a and phospholamban in the human heart. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306: 550–557. doi:10.1016/S0006-291X(03)00987-2
149. Rebbeck RT, Nitu FR, Rohde D, Most P, Bers DM, Thomas DD, et al. S100A1 Protein Does Not Compete with Calmodulin for Ryanodine Receptor Binding but Structurally Alters the Ryanodine Receptor·Calmodulin Complex. *J Biol Chem*. 2016;291: 15896–15907. doi:10.1074/jbc.M115.713107
150. Völkers M, Loughrey CM, MacQuaide N, Remppis A, DeGeorge Jr. BR, Wegner F v., et al. S100A1 decreases calcium spark frequency and alters their spatial characteristics in permeabilized adult ventricular cardiomyocytes. *Cell Calcium*. 2007;41: 135–143. doi:10.1016/j.ceca.2006.06.001
151. Boerries M, Most P, Gledhill JR, Walker JE, Katus HA, Koch WJ, et al. Ca(2+)-Dependent Interaction of S100A1 with F(1)-ATPase Leads to an Increased ATP Content in Cardiomyocytes. *Mol Cell Biol*. 2007;27: 4365–4373. doi:10.1128/MCB.02045-06
152. Imbalzano E, Mandraffino G, Casciaro M, Quartuccio S, Saitta A, Gangemi S. Pathophysiological mechanism and therapeutic role of S100 proteins in cardiac failure: a systematic review. *Heart Fail Rev*. 2016;21: 463–473. doi:10.1007/s10741-016-9529-8
153. Pleger ST, Most P, Katus HA. S100 proteins: A missing piece in the puzzle of heart failure? *Cardiovasc Res*. 2007;75: 1. doi:10.1016/j.cardiores.2007.05.009
154. Acebo E, Val-Bernal JF, Gómez-Roman JJ. Thrombomodulin, calretinin and c-kit (CD117) expression in cardiac myxoma. *Histol Histopathol*. 2001;16: 1031–1036.

155. Sadowski M, Lazarewicz JW, Jakubowska-Sadowska K, Wisniewski HM, Mossakowski MJ, Brown WT. Long-term changes in calbindin D(28K) immunoreactivity in the rat hippocampus after cardiac arrest. *Neurosci Lett*. 2002;321: 90–94.
156. Metskas LA, Rhoades E. Order-Disorder Transitions in the Cardiac Troponin Complex. *J Mol Biol*. 2016;428: 2965–2977. doi:10.1016/j.jmb.2016.06.022
157. Petersson U, Somogyi E, Reinholt FP, Karlsson T, Sugars RV, Wendel M. Nucleobindin is produced by bone cells and secreted into the osteoid, with a potential role as a modulator of matrix maturation. *Bone*. 2004;34: 949–960. doi:10.1016/j.bone.2004.01.019
158. Scherer PE, Lederkremer GZ, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. Cab45, a novel (Ca²⁺)-binding protein localized to the Golgi lumen. *J Cell Biol*. 1996;133: 257. doi:10.1083/jcb.133.2.257
159. Morel-Huau VM, Pypaert M, Wouters S, Tartakoff AM, Jurgan U, Gevaert K, et al. The calcium-binding protein p54/NEFA is a novel luminal resident of medial Golgi cisternae that traffics independently of mannosidase II. *Eur J Cell Biol*. 2002;81: 87–100. doi:10.1078/0171-9335-00224
160. Lasorsa FM, Pinton P, Palmieri L, Scarcia P, Rottensteiner H, Rizzuto R, et al. Peroxisomes as Novel Players in Cell Calcium Homeostasis. *J Biol Chem*. 2008;283: 15300–15308. doi:10.1074/jbc.M800648200
161. Calcraft PJ, Arredouani A, Ruas M, Pan Z, Cheng X, Hao X, et al. NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*. 2009;459: 596–600. doi:10.1038/nature08030
162. Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, et al. Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med*. 2008;14: 1247–1255. doi:10.1038/nm.1876
163. Sanchez-Alonso JL, Bhargava A, O’Hara T, Glukhov AV, Schobesberger S, Bhogal N, et al. Microdomain-Specific Modulation of L-Type Calcium Channels Leads to Triggered Ventricular Arrhythmia in Heart Failure. *Circ Res*. 2016;119: 944–955. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308698
164. Levin MD, Singh GK, Zhang HX, Uchida K, Kozel BA, Stein PK, et al. K(ATP) channel gain-of-function leads to increased myocardial L-type Ca(2+) current and contractility in Cantu syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113: 6773–6778. doi:10.1073/pnas.1606465113
165. Lugenbiel P, Wenz F, Govorov K, Schweizer PA, Katus HA, Thomas D. Atrial fibrillation complicated by heart failure induces distinct remodeling of calcium cycling proteins. *PLoS One*. 2015;10: e0116395. doi:10.1371/journal.pone.0116395
166. Goonasekera SA, Hammer K, Auger-Messier M, Bodi I, Chen X, Zhang H, et al. Decreased cardiac L-type Ca²⁺ channel activity induces hypertrophy and heart failure in

- mice. *J Clin Invest*. 2012;122: 280–290. doi:10.1172/JCI58227
167. Talukder MAH, Zweier JL, Periasamy M. Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*. 2009;84: 345–352. doi:10.1093/cvr/cvp264
168. Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, Delpón E, Hu D, Desai M, et al. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm*. 2010;7: 1872–1882. doi:10.1016/j.hrthm.2010.08.026
169. Nagy ZA, Virág L, Tóth A, Biliczki P, Acsai K, Bányász T, et al. Selective inhibition of sodium-calcium exchanger by SEA-0400 decreases early and delayed after depolarization in canine heart. *Br J Pharmacol*. 2004;143: 827–831. doi:10.1038/sj.bjp.0706026
170. Imahashi K, Pott C, Goldhaber JJ, Steenbergen C, Philipson KD, Murphy E. Cardiac-specific ablation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*. 2005;97: 916–921. doi:10.1161/01.RES.0000187456.06162.cb
171. Radwański PB, Poelzing S. NCX is an important determinant for premature ventricular activity in a drug-induced model of Andersen-Tawil syndrome. *Cardiovasc Res*. 2011;92: 57–66. doi:10.1093/cvr/cvr180
172. Biesmans L, Macquaide N, Heinzl FR, Bito V, Smith GL, Sipido KR. Subcellular heterogeneity of ryanodine receptor properties in ventricular myocytes with low T-tubule density. *PloS One*. 2011;6: e25100. doi:10.1371/journal.pone.0025100
173. Sipido KR, Volders PGA, Vos MA, Verdonck F. Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovasc Res*. 2002;53: 782–805.
174. Castaldo P, Macrì ML, Lariccia V, Matteucci A, Maiolino M, Gratteri S, et al. Na(+)/Ca(2+) exchanger 1 inhibition abolishes ischemic tolerance induced by ischemic preconditioning in different cardiac models. *Eur J Pharmacol*. 2017;794: 246–256. doi:10.1016/j.ejphar.2016.11.045
175. Seth M, Zhang Z-S, Mao L, Graham V, Burch J, Stiber J, et al. TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart. *Circ Res*. 2009;105: 1023–1030. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.206581
176. Firth AL, Remillard CV, Yuan JX-J. TRP channels in hypertension. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772: 895–906. doi:10.1016/j.bbadis.2007.02.009
177. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*. 2008;118: 337–351. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.03.008
178. Wang H-J, Wang W, Cornish KG, Rozanski GJ, Zucker IH. Cardiac sympathetic afferent denervation attenuates cardiac remodeling and improves cardiovascular dysfunction in rats with heart failure. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2014;64: 745–755.

- doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03699
179. Williams D, Venardos KM, Byrne M, Joshi M, Horlock D, Lam NT, et al. Abnormal mitochondrial L-arginine transport contributes to the pathogenesis of heart failure and reoxygenation injury. *PloS One*. 2014;9: e104643. doi:10.1371/journal.pone.0104643
 180. Robbins N, Koch SE, Rubinstein J. Targeting TRPV1 and TRPV2 for potential therapeutic interventions in cardiovascular disease. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2013;161: 469–476. doi:10.1016/j.trsl.2013.02.003
 181. Ueda K, Valdivia C, Medeiros-Domingo A, Tester DJ, Vatta M, Farrugia G, et al. Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105: 9355–9360. doi:10.1073/pnas.0801294105
 182. Little R, Cartwright EJ, Neyses L, Austin C. Plasma membrane calcium ATPases (PMCA) as potential targets for the treatment of essential hypertension. *Pharmacol Ther*. 2016;159: 23–34. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.01.013
 183. Wu X, Chang B, Blair NS, Sargent M, York AJ, Robbins J, et al. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4 antagonizes cardiac hypertrophy in association with calcineurin inhibition in rodents. *J Clin Invest*. 2009;119: 976–985. doi:10.1172/JCI36693
 184. Yang M, Camara AKS, Wakim BT, Zhou Y, Gadicherla AK, Kwok W-M, et al. Tyrosine nitration of voltage-dependent anion channels in cardiac ischemia-reperfusion: reduction by peroxynitrite scavenging. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1817: 2049–2059. doi:10.1016/j.bbabbio.2012.06.004
 185. Ye T-M, Zhang S-Z, Xia Q. Role of mitochondrial calcium uniporter in myocardial hypoxia/reoxygenation induced injury. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi Chin J Appl Physiol*. 2006;22: 136–140.
 186. Morita N, Lee J-H, Bapat A, Fishbein MC, Mandel WJ, Chen P-S, et al. Glycolytic inhibition causes spontaneous ventricular fibrillation in aged hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301: H180-191. doi:10.1152/ajpheart.00128.2011
 187. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357: 1121–1135. doi:10.1056/NEJMra071667
 188. Halestrap AP, Pasdois P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787: 1402–1415. doi:10.1016/j.bbabbio.2008.12.017
 189. Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, et al. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet*. 2001;10: 189–194.
 190. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine
-

- receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. 2000;101: 365–376.
191. Kyrychenko S, Poláková E, Kang C, Pocsai K, Ullrich ND, Niggli E, et al. Hierarchical accumulation of RyR post-translational modifications drives disease progression in dystrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2013;97: 666–675. doi:10.1093/cvr/cvs425
 192. Lehnart SE. Novel targets for treating heart and muscle disease: stabilizing ryanodine receptors and preventing intracellular calcium leak. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7: 225–232. doi:10.1016/j.coph.2006.09.010
 193. Gutstein DE, Marks AR. Role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in regulating apoptotic signaling and heart failure. *Heart Vessels*. 1997;Suppl 12: 53–57.
 194. Jugdutt BI, Xu Y, Balghith M, Moudgil R, Menon V. Cardioprotection induced by AT1R blockade after reperfused myocardial infarction: association with regional increase in AT2R, IP3R and PKCepsilon proteins and cGMP. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2000;5: 301–311. doi:10.1054/JCPT.2000.19245
 195. Mikoshiba K. Role of IP3 receptor signaling in cell functions and diseases. *Adv Biol Regul*. 2015;57: 217–227. doi:10.1016/j.jbior.2014.10.001
 196. Fernandes AA, Ribeiro RF, de Moura VGC, Siman FD, Dias FMV, Zoghaib J, et al. SERCA-2a is involved in the right ventricular function following myocardial infarction in rats. *Life Sci*. 2015;124: 24–30. doi:10.1016/j.lfs.2015.01.010
 197. Fedele F, Mancone M, Chilian WM, Severino P, Canali E, Logan S, et al. Role of genetic polymorphisms of ion channels in the pathophysiology of coronary microvascular dysfunction and ischemic heart disease. *Basic Res Cardiol*. 2013;108: 387. doi:10.1007/s00395-013-0387-4
 198. Coutu P, Bennett CN, Favre EG, Day SM, Metzger JM. Parvalbumin corrects slowed relaxation in adult cardiac myocytes expressing hypertrophic cardiomyopathy-linked alpha-tropomyosin mutations. *Circ Res*. 2004;94: 1235–1241. doi:10.1161/01.RES.0000126923.46786.FD
 199. Wahr PA, Michele DE, Metzger JM. Parvalbumin gene transfer corrects diastolic dysfunction in diseased cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96: 11982–11985.
 200. Liu M, Dudley SC. Role for the Unfolded Protein Response in Heart Disease and Cardiac Arrhythmias. *Int J Mol Sci*. 2015;17. doi:10.3390/ijms17010052
 201. Sun Y, Liu G, Song T, Liu F, Kang W, Zhang Y, et al. Upregulation of GRP78 and caspase-12 in diastolic failing heart. *Acta Biochim Pol*. 2008;55: 511–516.
 202. Dickhout JG, Carlisle RE, Austin RC. Interrelationship between cardiac hypertrophy, heart failure, and chronic kidney disease: endoplasmic reticulum stress as a mediator of pathogenesis. *Circ Res*. 2011;108: 629–642. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226803
 203. Xin W, Lu X, Li X, Niu K, Cai J. Attenuation of endoplasmic reticulum stress-related

- myocardial apoptosis by SERCA2a gene delivery in ischemic heart disease. *Mol Med Camb Mass.* 2011;17: 201–210. doi:10.2119/molmed.2010.00197
204. Mao W, Fukuoka S, Iwai C, Liu J, Sharma VK, Sheu S-S, et al. Cardiomyocyte apoptosis in autoimmune cardiomyopathy: mediated via endoplasmic reticulum stress and exaggerated by norepinephrine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293: H1636-1645. doi:10.1152/ajpheart.01377.2006
 205. Li S-Y, Gilbert SAB, Li Q, Ren J. Aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) ameliorates chronic alcohol ingestion-induced myocardial insulin resistance and endoplasmic reticulum stress. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47: 247–255. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.03.017
 206. Keller SH, Platoshyn O, Yuan JX-J. Long QT syndrome-associated I593R mutation in HERG potassium channel activates ER stress pathways. *Cell Biochem Biophys.* 2005;43: 365–377. doi:10.1385/CBB:43:3:365
 207. Xu J, Wang G, Wang Y, Liu Q, Xu W, Tan Y, et al. Diabetes- and angiotensin II-induced cardiac endoplasmic reticulum stress and cell death: metallothionein protection. *J Cell Mol Med.* 2009;13: 1499–1512. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00833.x
 208. Vitadello M, Penzo D, Petronilli V, Michieli G, Gomirato S, Menabò R, et al. Overexpression of the stress protein Grp94 reduces cardiomyocyte necrosis due to calcium overload and simulated ischemia. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2003;17: 923–925. doi:10.1096/fj.02-0644fje
 209. Ding W, Wang B, Zhang M, Gu Y. Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress in Uremic Cardiomyopathy: Protective Effects of Tauroursodeoxycholic Acid. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2016;38: 141–152. doi:10.1159/000438616
 210. Zha X, Yue Y, Dong N, Xiong S. Endoplasmic Reticulum Stress Aggravates Viral Myocarditis by Raising Inflammation Through the IRE1-Associated NF- κ B Pathway. *Can J Cardiol.* 2015;31: 1032–1040. doi:10.1016/j.cjca.2015.03.003
 211. Sun M, Ouzounian M, de Couto G, Chen M, Yan R, Fukuoka M, et al. Cathepsin-L ameliorates cardiac hypertrophy through activation of the autophagy-lysosomal dependent protein processing pathways. *J Am Heart Assoc.* 2013;2: e000191. doi:10.1161/JAHA.113.000191
 212. Suzuki O, Kanai T, Nishikawa T, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, et al. Adult onset cardiac dilatation in a transgenic mouse line with Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase II (ST3Gal-II) transgenes: a new model for dilated cardiomyopathy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2011;87: 550–562.
 213. Gong Q, Jones MA, Zhou Z. Mechanisms of pharmacological rescue of trafficking-defective hERG mutant channels in human long QT syndrome. *J Biol Chem.* 2006;281: 4069–4074. doi:10.1074/jbc.M511765200
 214. Vitello AM, Du Y, Buttrick PM, Walker LA. Serendipitous discovery of a novel

- protein signaling mechanism in heart failure. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;421: 431–435. doi:10.1016/j.bbrc.2012.03.124
215. Michalak M, Lynch J, Groenendyk J, Guo L, Robert Parker JM, Opas M. Calreticulin in cardiac development and pathology. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1600: 32–37.
216. Gray B, Bagnall RD, Lam L, Ingles J, Turner C, Haan E, et al. A novel heterozygous mutation in cardiac calsequestrin causes autosomal dominant catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Heart Rhythm.* 2016;13: 1652–1660. doi:10.1016/j.hrthm.2016.05.004
217. Ríos E, Figueroa L, Manno C, Kraeva N, Riazi S. The couplonopathies: A comparative approach to a class of diseases of skeletal and cardiac muscle. *J Gen Physiol.* 2015;145: 459–474. doi:10.1085/jgp.201411321
218. Suarez J, Belke DD, Gloss B, Dieterle T, McDonough PM, Kim Y-K, et al. In vivo adenoviral transfer of sorcin reverses cardiac contractile abnormalities of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286: H68-75. doi:10.1152/ajpheart.00245.2003
219. Valdivia HH, Farrell EF, Antaramian A, Benkusky N, Zhu X, Rueda A, et al. Sorcin and ryanodine receptors in heart failure. *J Muscle Res Cell Motil.* 2004;25: 605–607.
220. Liu B, Ho H-T, Brunello L, Unudurthi SD, Lou Q, Belevych AE, et al. Ablation of HRC alleviates cardiac arrhythmia and improves abnormal Ca handling in CASQ2 knockout mice prone to CPVT. *Cardiovasc Res.* 2015;108: 299–311. doi:10.1093/cvr/cvv222
221. Gupta RC, Mishra S, Rastogi S, Wang M, Rousso B, Mika Y, et al. Ca(2+)-binding proteins in dogs with heart failure: effects of cardiac contractility modulation electrical signals. *Clin Transl Sci.* 2009;2: 211–215. doi:10.1111/j.1752-8062.2009.00097.x
222. Jaehnig EJ, Heidt AB, Greene SB, Cornelissen I, Black BL. Increased susceptibility to isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and impaired weight gain in mice lacking the histidine-rich calcium-binding protein. *Mol Cell Biol.* 2006;26: 9315–9326. doi:10.1128/MCB.00482-06
223. Shan H, Wei J, Zhang M, Yan R, Lin L, Zhang R, et al. Calreticulin-induced mitochondrial injury: a novel mechanism of cardiac hypertrophy. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2014;34: 1248–1253.
224. Zhu X-M, Liu X-H, Cai L-R, Xu F-F. Hypoxic preconditioning induces endoplasmic reticulum stress-related cardioprotection mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *Sheng Li Xue Bao.* 2006;58: 463–470.
225. Zhao F, Zhang S, Shao Y, Wu Y, Qin J, Chen Y, et al. Calreticulin overexpression correlates with integrin- α 5 and transforming growth factor- β 1 expression in the atria of patients with rheumatic valvular disease and atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2013;168: 2177–2185. doi:10.1016/j.ijcard.2013.01.239
226. Remppis A, Greten T, Schäfer BW, Hunziker P, Erne P, Katus HA, et al. Altered

- expression of the Ca(2+)-binding protein S100A1 in human cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1313: 253–257.
227. Yan L, Mathew L, Chellan B, Gardner B, Earley J, Puri TS, et al. S100/Calgranulin-mediated inflammation accelerates left ventricular hypertrophy and aortic valve sclerosis in chronic kidney disease in a receptor for advanced glycation end products-dependent manner. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34: 1399–1411. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303508
228. Jeck CD, Zimmermann R, Schaper J, Schaper W. Decreased expression of calmodulin mRNA in human end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26: 99–107. doi:10.1006/jmcc.1994.1011
229. Swaminathan PD, Purohit A, Hund TJ, Anderson ME. Calmodulin-dependent protein kinase II: linking heart failure and arrhythmias. *Circ Res*. 2012;110: 1661–1677. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243956
230. Nyegaard M, Overgaard MT, Søndergaard MT, Vranas M, Behr ER, Hildebrandt LL, et al. Mutations in calmodulin cause ventricular tachycardia and sudden cardiac death. *Am J Hum Genet*. 2012;91: 703–712. doi:10.1016/j.ajhg.2012.08.015
231. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 1999;84: 713–721.
232. Zhang R, Khoo MSC, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med*. 2005;11: 409–417. doi:10.1038/nm1215
233. Wu Y, Roden DM, Anderson ME. Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. *Circ Res*. 1999;84: 906–912.
234. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Bers DM, et al. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*. 2003;92: 912–919. doi:10.1161/01.RES.0000069686.31472.C5
235. Yang Y, Duan W, Zhou J, Yan J, Liu J, Zhang J, et al. Protective effects of adenosine on the diabetic myocardium against ischemia-reperfusion injury: role of calpain. *Med Hypotheses*. 2012;79: 462–464. doi:10.1016/j.mehy.2012.06.022
236. Heidrich FM, Ehrlich BE. Calcium, calpains, and cardiac hypertrophy: a new link. *Circ Res*. 2009;104: e19–20. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.191072
237. Aras K, Burton B, Swenson D, MacLeod R. Spatial organization of acute myocardial ischemia. *J Electrocardiol*. 2016;49: 323–336. doi:10.1016/j.jelectrocard.2016.02.014
238. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123: 92–100. doi:10.1172/JCI62874
239. Sztark F, Payen JF, Piriou V, Rigoulet M, Ventura-Clapier R, Mazat JP, et al. Cellular

- energy metabolism: physiologic and pathologic aspects. *Ann Fr Anesth Reanim.* 1999;18: 261–269.
240. McMurray JJ, Stewart S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart.* 2000;83: 596–602. doi:10.1136/heart.83.5.596
241. Nabel EG, Braunwald E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2012;366: 54–63. doi:10.1056/NEJMra1112570
242. Hütter JF, Soboll S. Role of fatty acid metabolites in the development of myocardial ischemic damage. *Int J Biochem.* 1992;24: 399–403.
243. Buja LM, Entman ML. Modes of Myocardial Cell Injury and Cell Death in Ischemic Heart Disease. *Circulation.* 1998;98: 1355. doi:10.1161/01.CIR.98.14.1355
244. Chen S, Li S. The Na(+)/Ca(2+) exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2012;18: RA161-RA165. doi:10.12659/MSM.883533
245. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans.* 2006;34: 232. doi:10.1042/BST0340232
246. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of Cardiovascular Risk Factors with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning. *Pharmacol Rev.* 2007;59: 418. doi:10.1124/pr.107.06002
247. Piper HM, Meuter K, Schäfer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 2003;75: S644-648.
248. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14: 170–175. doi:10.1016/j.carpath.2005.03.006
249. Saini HK, Dhalla NS. Defective calcium handling in cardiomyocytes isolated from hearts subjected to ischemia-reperfusion. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 2005;288: H2260. doi:10.1152/ajpheart.01153.2004
250. Bolli R, Marbán E. Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Stunning. *Physiol Rev.* 1999;79: 609.
251. Netticadan T, Tamsah R, Osada M, Dhalla NS. Status of Ca²⁺/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol.* 1999;277: C384-391.
252. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 1960;70: 68–78.
253. Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1998;38: 291. doi:10.1016/S0008-6363(98)00033-9
254. Abbate A, Kontos MC, Biondi-Zoccai GGL. No-reflow: the next challenge in treatment

- of ST-elevation acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008;29: 1795. doi:10.1093/eurheartj/ehn281
255. Ito H. No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nat Clin Pr Cardiovasc Med.* 2006;3: 499–506. doi:10.1038/ncpcardio0632
256. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS.* 1996;76: 99–114.
257. Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circ Res.* 1989;65: 1045. doi:10.1161/01.RES.65.4.1045
258. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res.* 2004;61: 461. doi:10.1016/j.cardiores.2003.10.025
259. Piper H., Abdallah Y, Schäfer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004;61: 365. doi:10.1016/j.cardiores.2003.12.012
260. Maulik N, Yoshida T. Oxidative stress developed during open heart surgery induces apoptosis: reduction of apoptotic cell death by ebselen, a glutathione peroxidase mimic. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;36: 601–608.
261. Vogt M, Bauer MK., Ferrari D, Schulze-Osthoff K. Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells. *FEBS Lett.* 1998;429: 67–72. doi:10.1016/S0014-5793(98)00562-6
262. De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MKA, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, et al. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J.* 2002; doi:10.1096/fj.01-0269fje
263. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular Biology of Apoptosis in Ischemia and Reperfusion. *J Invest Surg.* 2005;18: 335–350. doi:10.1080/08941930500328862
264. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001;412: 95–99. doi:10.1038/35083620
265. Wei Y, Fox T, Chambers SP, Sintchak J, Coll JT, Golec JM, et al. The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity. *Chem Biol.* 2000;7: 423–432.
266. Pinton P, Ferrari D, Magalhães P, Schulze-Osthoff K, Di Virgilio F, Pozzan T, et al. Reduced Loading of Intracellular Ca²⁺ Stores and Downregulation of Capacitative Ca²⁺Influx in Bcl-2–Overexpressing Cells. *J Cell Biol.* 2000;148: 857–862.
267. White C, Li C, Yang J, Petrenko NB, Madesh M, Thompson CB, et al. The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-XL modulation of the InsP3R. *Nat Cell Biol.* 2005;7: 1021–1028. doi:10.1038/ncb1302

268. Dremina ES, Sharov VS, Schöneich C. Displacement of SERCA from SR Lipid Caveolae-Related Domains by Bcl-2: A Possible Mechanism for SERCA Inactivation. *Biochemistry (Mosc)*. 2006;45: 175–184. doi:10.1021/bi050800s
269. Chen R, Valencia I, Zhong F, McColl KS, Roderick HL, Bootman MD, et al. Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol*. 2004;166: 193. doi:10.1083/jcb.200309146
270. Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, et al. Bcl-2 decreases the free Ca(2+) concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97: 5723–5728.
271. Liu M, Chen Z, Chen L. Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2016;37: 425–443. doi:10.1038/aps.2015.145
272. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, et al. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*. 1999;284: 339–343.
273. Gil-Parrado S, Fernández-Montalván A, Assfalg-Machleidt I, Popp O, Bestvater F, Holloschi A, et al. Ionomycin-activated Calpain Triggers Apoptosis: A PROBABLE ROLE FOR Bcl-2 FAMILY MEMBERS. *J Biol Chem*. 2002;277: 27217–27226. doi:10.1074/jbc.M202945200
274. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An Endoplasmic Reticulum Stress-specific Caspase Cascade in Apoptosis: CYTOCHROME c-INDEPENDENT ACTIVATION OF CASPASE-9 BY CASPASE-12. *J Biol Chem*. 2002;277: 34287–34294. doi:10.1074/jbc.M204973200
275. Nakagawa T, Yuan J. Cross-Talk between Two Cysteine Protease Families: Activation of Caspase-12 by Calpain in Apoptosis. *J Cell Biol*. 2000;150: 887–894.
276. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11: 700–714. doi:10.1038/nrm2970
277. Zhang D-W, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu B-J, Lin S-C, et al. RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis. *Science*. 2009;325: 332. doi:10.1126/science.1172308
278. Moquin D, Chan FK-M. The Molecular Regulation of Programmed Necrotic Cell Injury. *Trends Biochem Sci*. 2010;35: 434–441. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.001
279. Smith CC, Yellon DM. Necroptosis, necrostatins and tissue injury. *J Cell Mol Med*. 2011;15: 1797–1806. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01341.x
280. Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T. The Role of the Kinases RIP1 and RIP3 in TNF-Induced Necrosis. *Sci Signal*. 2010;3: re4.

- doi:10.1126/scisignal.3115re4
281. Morgan MJ, Kim Y-S, Liu Z. TNF α and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Res.* 2008;18: 343–349. doi:10.1038/cr.2008.31
 282. Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2009;104: 181–188. doi:10.1007/s00395-009-0004-8
 283. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46: 821–831. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.02.021
 284. Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Susin SA. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Orchestrated Way to Die. *Cell Cycle.* 2007;6: 2612–2619. doi:10.4161/cc.6.21.4842
 285. Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) Signals to Mitochondrial AIF: A Key Event in Parthanatos. *Exp Neurol.* 2009;218: 193–202. doi:10.1016/j.expneurol.2009.03.020
 286. Xu Y, Huang S, Liu Z-G, Han J. Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Signaling to Mitochondria in Necrotic Cell Death Requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 Activation. *J Biol Chem.* 2006;281: 8788–8795. doi:10.1074/jbc.M508135200
 287. Gottlieb RA, Mentzer RM. Autophagy During Cardiac Stress: Joys and Frustrations of Autophagy. *Annu Rev Physiol.* 2010;72: 45–59. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135757
 288. He C, Klionsky DJ. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009;43: 67–93. doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910
 289. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell.* 2008;132: 27–42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018
 290. Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. Setting the Standards: Quality Control in the Secretory Pathway. *Science.* 1999;286: 1882. doi:10.1126/science.286.5446.1882
 291. Johnson AE, van Waes MA. The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15: 799–842. doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.799
 292. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 1999;13: 1211–1233.
 293. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest.* 2002;110: 1389–1398. doi:10.1172/JCI16886
 294. Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Stress Responses.* 2005;569: 29–63. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.056
 295. Lee AS. Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family.

- Curr Opin Cell Biol. 1992;4: 267–273.
296. Groenendyk J, Sreenivasaiah PK, Kim DH, Agellon LB, Michalak M. Biology of Endoplasmic Reticulum Stress in the Heart. *Circ Res.* 2010;107: 1185. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227033
297. Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature.* 2016;529: 326–335.
298. Mori K. Tripartite Management of Unfolded Proteins in the Endoplasmic Reticulum. *Cell.* 2000;101: 451–454. doi:10.1016/S0092-8674(00)80855-7
299. Minamino T, Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48: 1105–1110. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.10.026
300. Sozen E, Karademir B, Ozer NK. Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med.* 2015;78: 30–41. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.031
301. Liu CY, Wong HN, Schauerte JA, Kaufman RJ. The protein kinase/endoribonuclease IRE1 α that signals the unfolded protein response has a luminal N-terminal ligand-independent dimerization domain. *J Biol Chem.* 2002;277: 18346–18356. doi:10.1074/jbc.M112454200
302. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al. Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Mol Cell.* 2000;6: 1099–1108. doi:10.1016/S1097-2765(00)00108-8
303. Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell.* 2001;7: 1165–1176.
304. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.* 2002;3: 99–111.
305. Shen J, Prywes R. Dependence of Site-2 Protease Cleavage of ATF6 on Prior Site-1 Protease Digestion Is Determined by the Size of the Luminal Domain of ATF6. *J Biol Chem.* 2004;279: 43046–43051. doi:10.1074/jbc.M408466200
306. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell.* 2000;6: 1355–1364.
307. Hong M, Li M, Mao C, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress triggers an acute proteasome-dependent degradation of ATF6. *J Cell Biochem.* 2004;92: 723–732. doi:10.1002/jcb.20118
308. Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Jungreis R, Harding HP, Ron D. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J.*

- 2003;22: 1180–1187. doi:10.1093/emboj/cdg112
309. Thuerauf DJ, Marcinko M, Belmont PJ, Glembotski CC. Effects of the Isoform-specific Characteristics of ATF6 α and ATF6 β on Endoplasmic Reticulum Stress Response Gene Expression and Cell Viability. *J Biol Chem.* 2007;282: 22865–22878. doi:10.1074/jbc.M701213200
310. Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 1998;12: 1812–1824.
311. Wang X, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* 1998;17: 5708. doi:10.1093/emboj/17.19.5708
312. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science.* 2000;287: 664. doi:10.1126/science.287.5453.664
313. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000;2: 326–332. doi:10.1038/35014014
314. Liu CY, Schröder M, Kaufman RJ. Ligand-independent Dimerization Activates the Stress Response Kinases IRE1 and PERK in the Lumen of the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem.* 2000;275: 24881–24885. doi:10.1074/jbc.M004454200
315. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001;107: 881–891.
316. Lee A-H, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol.* 2003;23: 7448–7459. doi:10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003
317. Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, Wang M, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature.* 2013;493: 433–436. doi:10.1038/nature11682
318. Thuerauf DJ, Marcinko M, Gude N, Rubio M, Sussman MA, Glembotski CC. Activation of the Unfolded Protein Response in Infarcted Mouse Heart and Hypoxic Cultured Cardiac Myocytes. *Circ Res.* 2006;99: 275. doi:10.1161/01.RES.0000233317.70421.03
319. Friedman AD. GADD153/CHOP, a DNA Damage-inducible Protein, Reduced CAAT/Enhancer Binding Protein Activities and Increased Apoptosis in 32D cl3 Myeloid Cells. *Cancer Res.* 1996;56: 3250.
320. McCullough KD, Martindale JL, Klotz L-O, Aw T-Y, Holbrook NJ. Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. *Mol Cell Biol.* 2001;21: 1249–1259.

doi:10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001

321. Ron D, Habener JF. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 1992;6: 439–453.
322. Tao T-Q, Wang X-R, Liu M, Xu F-F, Liu X-H. Myofibrillogenesis regulator-1 attenuated hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by inhibiting the PERK/Nrf2 pathway in neonatal rat cardiomyocytes. *Apoptosis Int J Program Cell Death.* 2015;20: 285–297. doi:10.1007/s10495-014-1081-1
323. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, et al. Activation of Caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem.* 2001; doi:10.1074/jbc.M010677200
324. Urano F, Bertolotti A, Ron D. IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 2000;113: 3697.
325. Bicknell AA, Tourtellotte J, Niwa M. Late Phase of the Endoplasmic Reticulum Stress Response Pathway Is Regulated by Hog1 MAP Kinase. *J Biol Chem.* 2010;285: 17545–17555. doi:10.1074/jbc.M109.084681
326. Meldolesi J, Pozzan T. The Heterogeneity of ER Ca(2+) Stores Has a Key Role in Nonmuscle Cell Signaling and Function. *J Cell Biol.* 1998;142: 1395–1398.
327. Leissring MA, Paul BA, Parker I, Cotman CW, LaFerla FM. Alzheimer's presenilin-1 mutation potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signaling in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem.* 1999;72: 1061–1068.
328. Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee S-F, Hao Y-H, et al. Presenilins Form ER Ca(2+) Leak Channels, a Function Disrupted by Familial Alzheimer's Disease-Linked Mutations. *Cell.* 2006;126: 981–993. doi:10.1016/j.cell.2006.06.059
329. Arduíno DM, Esteves AR, Cardoso SM, Oliveira CR. Endoplasmic reticulum and mitochondria interplay mediates apoptotic cell death: Relevance to Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2009;55: 341–348. doi:10.1016/j.neuint.2009.04.004
330. Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Maundrell K, Castilla J, Soto C. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J.* 2003;22: 5435–5445. doi:10.1093/emboj/cdg537
331. Haughey NJ, Holden CP, Nath A, Geiger JD. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-regulated stores of intracellular calcium in calcium dysregulation and neuron cell death caused by HIV-1 protein tat. *J Neurochem.* 1999;73: 1363–1374.
332. Cnop M, Welsh N, Jonas J-C, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2005;54: S97. doi:10.2337/diabetes.54.suppl_2.S97
333. Park SW, Zhou Y, Lee J, Lee J, Ozcan U. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase

- 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107: 19320–19325. doi:10.1073/pnas.1012044107
334. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Endoplasmic Reticulum Signal Organelle.* 2002;32: 235–249. doi:10.1016/S0143416002001823
335. Moenner M, Pluquet O, Bouhecareilh M, Chevet E. Integrated Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Cancer. *Cancer Res.* 2007;67: 10631. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1705
336. Bravo R, Vicencio JM, Parra V, Troncoso R, Munoz JP, Bui M, et al. Increased ER–mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci.* 2011;124: 2143. doi:10.1242/jcs.080762
337. Wang X, Eno CO, Altman BJ, Zhu Y, Zhao G, Olberding KE, et al. ER stress modulates cellular metabolism. *Biochem J.* 2011;435: 285. doi:10.1042/BJ20101864
338. Bravo R, Gutierrez T, Paredes F, Gatica D, Rodriguez AE, Pedrozo Z, et al. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44: 16–20. doi:10.1016/j.biocel.2011.10.012
339. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, et al. Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *Mitochondrial Calcium Health Dis.* 2009;1787: 1342–1351. doi:10.1016/j.bbabbio.2009.03.015
340. Kiviluoto S, Luyten T, Schneider L, Lisak D, Rojas-Rivera D, Welkenhuyzen K, et al. Bax Inhibitor-1-mediated Ca²⁺ leak is decreased by cytosolic acidosis. *Cell Calcium.* 2013;54: 186–192. doi:10.1016/j.ceca.2013.06.002
341. Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, et al. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene.* 2008;27: 285–299. doi:10.1038/sj.onc.1210638
342. Yoshida I, Monji A, Tashiro K, Nakamura K, Inoue R, Kanba S. Depletion of intracellular Ca²⁺ store itself may be a major factor in thapsigargin-induced ER stress and apoptosis in PC12 cells. *Neurochem Int.* 2006;48: 696–702. doi:10.1016/j.neuint.2005.12.012
343. Groenendyk J, Lynch J, Michalak M. Calreticulin, Ca²⁺, and calcineurin - signaling from the endoplasmic reticulum. *Mol Cells.* 2004;17: 383–389.
344. Michalak M, Robert Parker J., Opas M. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Endoplasmic Reticulum Signal Organelle.* 2002;32: 269–278. doi:10.1016/S0143416002001884
345. Paschen W. Shutdown of Translation: Lethal or Protective? Unfolded Protein Response versus Apoptosis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23: 773–779. doi:10.1097/01.WCB.0000075009.47474.F9

346. Verkhratsky A. Physiology and Pathophysiology of the Calcium Store in the Endoplasmic Reticulum of Neurons. *Physiol Rev.* 2004;85: 201. doi:10.1152/physrev.00004.2004
347. Giorgi C, Ito K, Lin H-K, Santangelo C, Wieckowski MR, Lebedzinska M, et al. PML Regulates Apoptosis at Endoplasmic Reticulum by Modulating Calcium Release. *Science.* 2010;330: 1247. doi:10.1126/science.1189157
348. Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inerte J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2012;94: 168. doi:10.1093/cvr/cvs116
349. Li G, Scull C, Ozcan L, Tabas I. NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. *J Cell Biol.* 2010;191: 1113. doi:10.1083/jcb.201006121
350. Li Y, Guo Y, Tang J, Jiang J, Chen Z. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2014;46: 629–640. doi:10.1093/abbs/gmu048
351. Timmins JM, Ozcan L, Seimon TA, Li G, Malagelada C, Backs J, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J Clin Invest.* 2009;119: 2925–2941. doi:10.1172/JCI38857
352. Liu X-H, Zhang Z-Y, Sun S, Wu X-D. Ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia/reperfusion injury through attenuating endoplasmic reticulum stress. *Shock Augusta Ga.* 2008;30: 422–427. doi:10.1097/SHK.0b013e318164ca29
353. Doroudgar S, Thuerauf DJ, Marcinko MC, Belmont PJ, Glembotski CC. Ischemia Activates the ATF6 Branch of the Endoplasmic Reticulum Stress Response. *J Biol Chem.* 2009;284: 29735–29745. doi:10.1074/jbc.M109.018036
354. Ravingerová T. Intrinsic defensive mechanisms in the heart: a potential novel approach to cardiac protection against ischemic injury. *Gen Physiol Biophys.* 2007;26: 3–13.
355. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74: 1124. doi:10.1161/01.CIR.74.5.1124
356. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation.* 1991;84: 350. doi:10.1161/01.CIR.84.1.350
357. Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res.* 2001;89: 273–278.
358. Liu Y, Ytrehus K, Downey JM. Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol.*

- 1994;26: 661–668. doi:10.1006/jmcc.1994.1078
359. Liu Y, Gao WD, O'Rourke B, Marban E. Synergistic modulation of ATP-sensitive K⁺ currents by protein kinase C and adenosine. Implications for ischemic preconditioning. *Circ Res.* 1996;78: 443–454.
360. Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev.* 2007;12: 217–234. doi:10.1007/s10741-007-9026-1
361. Hausenloy DJ, Yellon DM. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol.* 2016;13: 193–209. doi:10.1038/nrcardio.2016.5
362. Lecour S. Multiple protective pathways against reperfusion injury: a SAFE path without Aktion? *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46: 607–609. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.01.003
363. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic Res Cardiol.* 2010;105: 151–154. doi:10.1007/s00395-009-0080-9
364. Boengler K, Stahlhofen S, van de Sand A, Gres P, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, et al. Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfibrillar cardiomyocyte mitochondria. *Basic Res Cardiol.* 2009;104: 141–147. doi:10.1007/s00395-009-0007-5
365. Miro-Casas E, Ruiz-Meana M, Agullo E, Stahlhofen S, Rodríguez-Sinovas A, Cabestrero A, et al. Connexin43 in cardiomyocyte mitochondria contributes to mitochondrial potassium uptake. *Cardiovasc Res.* 2009;83: 747–756. doi:10.1093/cvr/cvp157
366. Rodríguez-Sinovas A, Boengler K, Cabestrero A, Gres P, Morente M, Ruiz-Meana M, et al. Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circ Res.* 2006;99: 93–101. doi:10.1161/01.RES.0000230315.56904.de
367. Heusch G. Molecular Basis of Cardioprotection. *Circ Res.* 2015;116: 674. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305348
368. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285: H579–588. doi:10.1152/ajpheart.01064.2002
369. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, et al. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res.* 2010;87: 406–423. doi:10.1093/cvr/cvq129
370. Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, Valen G, Vaage J. Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular

- rhythm. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* 2004;25: 1006–1010. doi:10.1016/j.ejcts.2004.02.003
371. Yang X-M, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44: 1103–1110. doi:10.1016/j.jacc.2004.05.060
372. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res.* 2004;95: 230–232. doi:10.1161/01.RES.0000138303.76488.fe
373. Hausenloy DJ, Ong S-B, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. *Basic Res Cardiol.* 2009;104: 189–202. doi:10.1007/s00395-009-0010-x
374. Inerte J, Hernando V, Vilarrosa Ú, Abad E, Poncelas-Nozal M, Garcia-Dorado D. Activation of cGMP/protein kinase G pathway in postconditioned myocardium depends on reduced oxidative stress and preserved endothelial nitric oxide synthase coupling. *J Am Heart Assoc.* 2013;2: e005975. doi:10.1161/JAHA.112.005975
375. Cohen MV, Yang X-M, Downey JM. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation.* 2007;115: 1895–1903. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675710
376. Sivaraman V, Pickard MJ, Hausenloy DJ. Remote ischaemic conditioning: cardiac protection from afar. *Anaesthesia.* 2015;70: 732–748. doi:10.1111/anae.12973
377. Heusch G, Bøtker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote Ischemic Conditioning. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65: 177–195. doi:10.1016/j.jacc.2014.10.031
378. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res.* 2008;79: 377. doi:10.1093/cvr/cvn114
379. Jensen RV, Støttrup NB, Kristiansen SB, Bøtker HE. Release of a humoral circulating cardioprotective factor by remote ischemic preconditioning is dependent on preserved neural pathways in diabetic patients. *Basic Res Cardiol.* 2012;107: 285. doi:10.1007/s00395-012-0285-1
380. Davidson SM, Selvaraj P, He D, Boi-Doku C, Yellon RL, Vicencio JM, et al. Remote ischaemic preconditioning involves signalling through the SDF-1 α /CXCR4 signalling axis. *Basic Res Cardiol.* 2013;108: 377. doi:10.1007/s00395-013-0377-6
381. Cabrera-Fuentes HA, Niemann B, Grieshaber P, Wollbrueck M, Gehron J, Preissner KT, et al. RNase1 as a potential mediator of remote ischaemic preconditioning for cardioprotection†. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* 2015;48: 732–737; discussion 737. doi:10.1093/ejcts/ezu519
382. Singh B, Randhawa PK, Singh N, Jaggi AS. Investigations on the role of leukotrienes

- in remote hind limb preconditioning-induced cardioprotection in rats. *Life Sci.* 2016;152: 238–243. doi:10.1016/j.lfs.2016.04.005
383. Li J, Rohailla S, Gelber N, Rutka J, Sabah N, Gladstone RA, et al. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol.* 2014;109: 423. doi:10.1007/s00395-014-0423-z
384. Turrell HE, Thaitirarot C, Crumbie H, Rodrigo G. Remote ischemic preconditioning of cardiomyocytes inhibits the mitochondrial permeability transition pore independently of reduced calcium-loading or sarcKATP channel activation. *Physiol Rep.* 2014;2. doi:10.14814/phy2.12231
385. Battipaglia I, Scalone G, Milo M, Di Franco A, Lanza GA, Crea F. Upper arm intermittent ischaemia reduces exercise-related increase of platelet reactivity in patients with obstructive coronary artery disease. *Heart Br Card Soc.* 2011;97: 1298–1303. doi:10.1136/hrt.2011.226415
386. Shimizu M, Saxena P, Konstantinov IE, Cherepanov V, Cheung MMH, Wearden P, et al. Remote ischemic preconditioning decreases adhesion and selectively modifies functional responses of human neutrophils. *J Surg Res.* 2010;158: 155–161. doi:10.1016/j.jss.2008.08.010
387. Schulman D, Latchman DS, Yellon DM. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283: H1481-1488. doi:10.1152/ajpheart.01089.2001
388. Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, et al. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43: 564–570. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.08.010
389. Costa ADT, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, Garlid KD. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 2006;281: 20801–20808. doi:10.1074/jbc.M600959200
390. Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2004;63: 305–312. doi:10.1016/j.cardiores.2004.04.011
391. Sun H-Y, Wang N-P, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton RA, et al. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis.* 2006;11: 1583–1593. doi:10.1007/s10495-006-9037-8
392. Miura T, Tanno M, Sato T. Mitochondrial kinase signalling pathways in myocardial protection from ischaemia/reperfusion-induced necrosis. *Cardiovasc Res.* 2010;88: 7–15. doi:10.1093/cvr/cvq206
393. Valentim L, Laurence KM, Townsend PA, Carroll CJ, Soond S, Scarabelli TM, et al. Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;40: 846–852.

- doi:10.1016/j.yjmcc.2006.03.428
394. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*. 2004;61: 448–460. doi:10.1016/j.cardiores.2003.09.024
395. Skyschally A, Gent S, Amanakis G, Schulte C, Kleinbongard P, Heusch G. Across-Species Transfer of Protection by Remote Ischemic Preconditioning With Species-Specific Myocardial Signal Transduction by Reperfusion Injury Salvage Kinase and Survival Activating Factor Enhancement Pathways. *Circ Res*. 2015;117: 279–288. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.306878
396. Skyschally A, van Caster P, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, et al. Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res*. 2009;104: 15–18. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.186429
397. Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, et al. Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation*. 2005;112: 3911–3918. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.581058
398. Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res*. 2009;84: 201–208. doi:10.1093/cvr/cvp274
399. Frias MA, Lecour S, James RW, Pedretti S. High density lipoprotein/sphingosine-1-phosphate-induced cardioprotection: Role of STAT3 as part of the SAFE pathway. *JAK-STAT*. 2012;1: 92–100. doi:10.4161/jkst.19754
400. Davidson SM, Hausenloy D, Duchon MR, Yellon DM. Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38: 414–419. doi:10.1016/j.biocel.2005.09.017
401. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol*. 2010;105: 771–785. doi:10.1007/s00395-010-0124-1
402. Lacerda L, McCarthy J, Mungly SFK, Lynn EG, Sack MN, Opie LH, et al. TNF α protects cardiac mitochondria independently of its cell surface receptors. *Basic Res Cardiol*. 2010;105: 751–762. doi:10.1007/s00395-010-0113-4
403. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291: H827-834. doi:10.1152/ajpheart.00003.2006
404. Hausenloy DJ, Barrabes JA, Bøtker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J, et al. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery.

- Basic Res Cardiol. 2016;111: 70. doi:10.1007/s00395-016-0588-8
405. Pandey KN. Guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A signaling antagonizes phosphoinositide hydrolysis, Ca²⁺ release, and activation of protein kinase C. *Front Mol Neurosci.* 2014;7. doi:10.3389/fnmol.2014.00075
406. Burley DS, Ferdinandy P, Baxter GF. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *Br J Pharmacol.* 2007;152: 855–869. doi:10.1038/sj.bjp.0707409
407. Insete J, Garcia-Dorado D. The cGMP/PKG pathway as a common mediator of cardioprotection: translatability and mechanism. *Br J Pharmacol.* 2015;172: 1996–2009. doi:10.1111/bph.12959
408. Bice JS, Burley DS, Baxter GF. Novel approaches and opportunities for cardioprotective signaling through 3',5'-cyclic guanosine monophosphate manipulation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2014;19: 269–282. doi:10.1177/1074248413518971
409. Ibanez B, Macaya C, Sánchez-Brunete V, Pizarro G, Fernández-Friera L, Mateos A, et al. Effect of early metoprolol on infarct size in ST-segment-elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: the Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) trial. *Circulation.* 2013;128: 1495–1503. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003653
410. Roolvink V, Rasoul S, Ottervanger JP, Dambrink J-HE, Lipsic E, van der Horst ICC, et al. Rationale and design of a double-blind, multicenter, randomized, placebo-controlled clinical trial of early administration of intravenous β -blockers in patients with ST-elevation myocardial infarction before primary percutaneous coronary intervention: EARLY β -blocker administration before primary PCI in patients with ST-elevation myocardial infarction trial. *Am Heart J.* 2014;168: 661–666. doi:10.1016/j.ahj.2014.07.015
411. Risenfors M, Herlitz J, Berg CH, Dellborg M, Gustavsson G, Gottfridsson C, et al. Early treatment with thrombolysis and beta-blockade in suspected acute myocardial infarction: results from the TEAHAT Study. *J Intern Med Suppl.* 1991;734: 35–42.
412. Risenfors M, Hartford M, Dellborg M, Edvardsson N, Emanuelsson H, Karlson BW, et al. Effects on chest pain of early thrombolytic treatment in suspected acute myocardial infarction: results from the TEAHAT Study. *J Intern Med Suppl.* 1991;734: 27–34.
413. group C (CLOpidogrel and M in MIT collaborative. Early intravenous then oral metoprolol in 45 852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *The Lancet.* 2005;366: 1622–1632. doi:10.1016/S0140-6736(05)67661-1
414. Cung T-T, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, et al. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2015;373: 1021–1031. doi:10.1056/NEJMoa1505489

415. Ottani F, Latini R, Staszewsky L, La Vecchia L, Locuratolo N, Sicuro M, et al. Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction: The Multicenter, Controlled, Open-Label CYCLE Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67: 365–374. doi:10.1016/j.jacc.2015.10.081
416. Atar D, Arheden H, Berdeaux A, Bonnet J-L, Carlsson M, Clemmensen P, et al. Effect of intravenous TRO40303 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction: MITOCARE study results. *Eur Heart J.* 2015;36: 112–119. doi:10.1093/eurheartj/ehu331
417. Theroux P, Chaitman BR, Erhardt L, Jessel A, Meinertz T, Nickel W-U, et al. Design of a trial evaluating myocardial cell protection with cariporide, an inhibitor of the transmembrane sodium-hydrogen exchanger: the Guard During Ischemia Against Necrosis (GUARDIAN) trial. *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 2000;1: 59–67. doi:10.1186/cvm-1-1-059
418. Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, et al. The Na(+)/H(+) exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38: 1644–1650.
419. Selker HP, Beshansky JR, Sheehan PR, Massaro JM, Griffith JL, D’Agostino RB, et al. Out-of-hospital administration of intravenous glucose-insulin-potassium in patients with suspected acute coronary syndromes: the IMMEDIATE randomized controlled trial. *JAMA.* 2012;307: 1925–1933. doi:10.1001/jama.2012.426
420. Siddiqi N, Neil C, Bruce M, MacLennan G, Cotton S, Papadopoulou S, et al. Intravenous sodium nitrite in acute ST-elevation myocardial infarction: a randomized controlled trial (NIAMI). *Eur Heart J.* 2014;35: 1255–1262. doi:10.1093/eurheartj/ehu096
421. Briguori C, Visconti G, Focaccio A, Golia B, Chieffo A, Castelli A, et al. Novel approaches for preventing or limiting events (Naples) II trial: impact of a single high loading dose of atorvastatin on periprocedural myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54: 2157–2163. doi:10.1016/j.jacc.2009.07.005
422. Patti G, Colonna G, Pasceri V, Pepe LL, Montinaro A, Di Sciascio G. Randomized trial of high loading dose of clopidogrel for reduction of periprocedural myocardial infarction in patients undergoing coronary intervention: results from the ARMYDA-2 (Antiplatelet therapy for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty) study. *Circulation.* 2005;111: 2099–2106. doi:10.1161/01.CIR.0000161383.06692.D4
423. Gibson CM, Giugliano RP, Kloner RA, Bode C, Tendera M, Jánosi A, et al. EMBRACE STEMI study: a Phase 2a trial to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of intravenous MTP-131 on reperfusion injury in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2016;37: 1296–1303. doi:10.1093/eurheartj/ehv597
424. Bates E, Bode C, Costa M, Gibson CM, Granger C, Green C, et al. Intracoronary KAI-

- 9803 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Circulation*. 2008;117: 886–896. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.759167
425. Lincoff AM, Roe M, Aylward P, Galla J, Rynkiewicz A, Guetta V, et al. Inhibition of delta-protein kinase C by delcasertib as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute anterior ST-segment elevation myocardial infarction: results of the PROTECTION AMI Randomized Controlled Trial. *Eur Heart J*. 2014;35: 2516–2523. doi:10.1093/eurheartj/ehu177
426. Bulluck H, Kwok CS, Ryding AD, Loke YK. Safety of short-term dual antiplatelet therapy after drug-eluting stents: An updated meta-analysis with direct and adjusted indirect comparison of randomized control trials. *Int J Cardiol*. 2015;181: 331–339. doi:10.1016/j.ijcard.2014.12.037
427. Piriou V, Mantz J, Goldfarb G, Kitakaze M, Chiari P, Paquin S, et al. Sevoflurane preconditioning at 1 MAC only provides limited protection in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a randomized bi-centre trial. *Br J Anaesth*. 2007;99: 624–631. doi:10.1093/bja/aem264
428. Ibanez B, Prat-González S, Speidl WS, Vilahur G, Pinero A, Cimmino G, et al. Early Metoprolol Administration Before Coronary Reperfusion Results in Increased Myocardial Salvage. *Circulation*. 2007;115: 2909–2916. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679639
429. Ibanez B, Cimmino G, Prat-González S, Vilahur G, Hutter R, García MJ, et al. The cardioprotection granted by metoprolol is restricted to its administration prior to coronary reperfusion. *Int J Cardiol*. 2011;147: 428–432. doi:10.1016/j.ijcard.2009.09.551
430. Group TMTR. Metoprolol in acute myocardial infarction (MIAMI). A randomised placebo-controlled international trial. *Eur Heart J*. 1985;6: 199–226.
431. Rude RE, Buja LM, Willerson JT. Propranolol in acute myocardial infarction: The MILIS experience. *Am J Cardiol*. 1986;57: F38–F42. doi:10.1016/0002-9149(86)90887-8
432. Reduction of infarct size with the early use of timolol in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1984;310: 9–15. doi:10.1056/NEJM198401053100103
433. Yusuf S, Sleight P, Rossi P, Ramsdale D, Peto R, Furze L, et al. Reduction in infarct size, arrhythmias and chest pain by early intravenous beta blockade in suspected acute myocardial infarction. *Circulation*. 1983;67: I32-41.
434. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. 2005;434: 658–662. doi:10.1038/nature03434
435. Duchon MR, McGuinness O, Brown LA, Crompton M. On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury.

- Cardiovasc Res. 1993;27: 1790–1794. doi:10.1093/cvr/27.10.1790
436. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*. 2005;434: 652–658. doi:10.1038/nature03317
437. Schaller S, Paradis S, Ngoh GA, Assaly R, Buisson B, Drouot C, et al. TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;333: 696–706. doi:10.1124/jpet.110.167486
438. Frölich O, Karmazyn M. The Na-H exchanger revisited: an update on Na-H exchange regulation and the role of the exchanger in hypertension and cardiac function in health and disease. *Cardiovasc Res*. 1997;36: 138–148.
439. Scholz W, Albus U, Counillon L, Gögelein H, Lang HJ, Linz W, et al. Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res*. 1995;29: 260–268.
440. Rupprecht HJ, vom Dahl J, Terres W, Seyfarth KM, Richardt G, Schultheis HP, et al. Cardioprotective effects of the Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. *Circulation*. 2000;101: 2902–2908.
441. Padilla F, Garcia-Dorado D, Agulló L, Barrabés JA, Inserte J, Escalona N, et al. Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits infarct size in anesthetized pigs. *Cardiovasc Res*. 2001;51: 592–600.
442. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res*. 2015;116: 674–699. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305348
443. Duranski MR, Greer JJM, Dejam A, Jaganmohan S, Hogg N, Langston W, et al. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest*. 2005;115: 1232–1240. doi:10.1172/JCI22493
444. Lefer DJ, Bolli R. Development of an NIH consortium for preclinical AssESment of CARdioprotective therapies (CAESAR): a paradigm shift in studies of infarct size limitation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011;16: 332–339. doi:10.1177/1074248411414155
445. Jones DA, Pellaton C, Velmurugan S, Rathod KS, Andiapan M, Antoniou S, et al. Randomized phase 2 trial of intracoronary nitrite during acute myocardial infarction. *Circ Res*. 2015;116: 437–447. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305082
446. Shi J, Dai W, Hale SL, Brown DA, Wang M, Han X, et al. Bendavia restores mitochondrial energy metabolism gene expression and suppresses cardiac fibrosis in the border zone of the infarcted heart. *Life Sci*. 2015;141: 170–178. doi:10.1016/j.lfs.2015.09.022
447. Inagaki K, Chen L, Ikeno F, Lee FH, Imahashi K, Bouley DM, et al. Inhibition of delta-

- protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation*. 2003;108: 2304–2307. doi:10.1161/01.CIR.0000101682.24138.36
448. Fryer RM, Wang Y, Hsu AK, Gross GJ. Essential activation of PKC-delta in opioid-initiated cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280: H1346-1353.
449. Goto M, Miura T, Iliodoromitis EK, O’Leary EL, Ishimoto R, Yellon DM, et al. Adenosine infusion during early reperfusion failed to limit myocardial infarct size in a collateral deficient species. *Cardiovasc Res*. 1991;25: 943–949.
450. Olafsson B, Forman MB, Puett DW, Pou A, Cates CU, Friesinger GC, et al. Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation*. 1987;76: 1135–1145.
451. Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Wartier DC. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology*. 1999;91: 1437–1446.
452. Toller WG, Kersten JR, Gross ER, Pagel PS, Wartier DC. Isoflurane preconditions myocardium against infarction via activation of inhibitory guanine nucleotide binding proteins. *Anesthesiology*. 2000;92: 1400–1407.
453. Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, Krolikowski JG, Kersten JR, Wartier DC. Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology*. 2005;102: 102–109.
454. Preckel B, Schlack W, Comfère T, Obal D, Barthel H, Thämer V. Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischaemia in the rabbit heart in vivo. *Br J Anaesth*. 1998;81: 905–912.
455. Bell RM, Bøtker HE, Carr RD, Davidson SM, Downey JM, Dutka DP, et al. 9th Hatter Biannual Meeting: position document on ischaemia/reperfusion injury, conditioning and the ten commandments of cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2016;111: 41. doi:10.1007/s00395-016-0558-1
456. Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res*. 2010;107: 1071–1082. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227819
457. Zheng P, Lin Y, Wang F, Luo R, Zhang T, Hu S, et al. 4-PBA improves lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus by attenuating ER stress. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;311: F763–F776. doi:10.1152/ajprenal.00225.2016
458. Cavadas C, Aveleira CA, Souza GFP, Velloso L. The pathophysiology of defective proteostasis in the hypothalamus - from obesity to ageing. *Nat Rev Endocrinol*. 2016; doi:10.1038/nrendo.2016.107
459. Cook KL, Soto-Pantoja DR, Clarke PAG, Cruz MI, Zwart A, Wärrri A, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Protein GRP78 Modulates Lipid Metabolism to Control Drug Sensitivity and Antitumor Immunity in Breast Cancer. *Cancer Res*. 2016;76:

- 5657–5670. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2616
460. Rozpędek W, Pytel D, Diehl JA, Majsterek I. Small molecule inhibitors of PERK-dependent signaling pathway as a novel, therapeutic molecular strategy in Alzheimer's disease treatment. *Pol Merkur Lek Organ Pol Tow Lek*. 2016;41: 5–10.
461. Mooradian AD. Therapeutic Targeting of Cellular Stress to Prevent Cardiovascular Disease: A Review of the Evidence. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2016; 1–13. doi:10.1007/s40256-016-0199-7
462. Martindale JJ, Fernandez R, Thuerauf D, Whittaker R, Gude N, Sussman MA, et al. Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circ Res*. 2006;98: 1186–1193. doi:10.1161/01.RES.0000220643.65941.8d
463. Toldo S, Severino A, Abbate A, Baldi A. The role of PDI as a survival factor in cardiomyocyte ischemia. *Methods Enzymol*. 2011;489: 47–65. doi:10.1016/B978-0-12-385116-1.00003-0
464. Terai K, Hiramoto Y, Masaki M, Sugiyama S, Kuroda T, Hori M, et al. AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. 2005;25: 9554–9575. doi:10.1128/MCB.25.21.9554-9575.2005
465. Bae HR, Kim DH, Park MH, Lee B, Kim MJ, Lee EK, et al. β -Hydroxybutyrate suppresses inflammasome formation by ameliorating endoplasmic reticulum stress via AMPK activation. *Oncotarget*. 2016; doi:10.18632/oncotarget.12119
466. Nickson P, Toth A, Erhardt P. PUMA is critical for neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Cardiovasc Res*. 2007;73: 48–56. doi:10.1016/j.cardiores.2006.10.001
467. He Q, Pu J, Yuan A, Lau WB, Gao E, Koch WJ, et al. Activation of liver-X-receptor α but not liver-X-receptor β protects against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Heart Fail*. 2014;7: 1032–1041. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001260
468. Yao T, Ying X, Zhao Y, Yuan A, He Q, Tong H, et al. Vitamin D receptor activation protects against myocardial reperfusion injury through inhibition of apoptosis and modulation of autophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22: 633–650. doi:10.1089/ars.2014.5887
469. Tao J, Zhu W, Li Y, Xin P, Li J, Liu M, et al. Apelin-13 protects the heart against ischemia-reperfusion injury through inhibition of ER-dependent apoptotic pathways in a time-dependent fashion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301: H1471-1486. doi:10.1152/ajpheart.00097.2011
470. Belaidi E, Decorps J, Augeul L, Durand A, Ovize M. Endoplasmic reticulum stress contributes to heart protection induced by cyclophilin D inhibition. *Basic Res Cardiol*. 2013;108: 363. doi:10.1007/s00395-013-0363-z
471. Paillard M, Tubbs E, Thiebaut P-A, Gomez L, Fauconnier J, Da Silva CC, et al.

- Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation*. 2013;128: 1555–1565. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001225
472. George I, Sabbah HN, Xu K, Wang N, Wang J. β -adrenergic receptor blockade reduces endoplasmic reticulum stress and normalizes calcium handling in a coronary embolization model of heart failure in canines. *Cardiovasc Res*. 2011;91: 447–455. doi:10.1093/cvr/cvr106
473. Ni L, Zhou C, Duan Q, Lv J, Fu X, Xia Y, et al. β -AR blockers suppresses ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure. *PloS One*. 2011;6: e27294. doi:10.1371/journal.pone.0027294
474. Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM, Johnson AE. The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 2005;168: 389–399. doi:10.1083/jcb.200409174
475. Schäuble N, Lang S, Jung M, Cappel S, Schorr S, Ulucan Ö, et al. BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca^{2+} leakage from the ER. *EMBO J*. 2012;31: 3282–3296. doi:10.1038/emboj.2012.189
476. Blobel G, Walter P, Chang CN, Goldman BM, Erickson AH, Lingappa VR. Translocation of proteins across membranes: the signal hypothesis and beyond. *Symp Soc Exp Biol*. 1979;33: 9–36.
477. Grudnik P, Bange G, Sinning I. Protein targeting by the signal recognition particle. *Biol Chem*. 2009;390: 775–782. doi:10.1515/BC.2009.102
478. Shen K, Arslan S, Akopian D, Ha T, Shan S. Activated GTPase movement on an RNA scaffold drives co-translational protein targeting. *Nature*. 2012;492: 271–275. doi:10.1038/nature11726
479. Dejgaard K, Theberge J-F, Heath-Engel H, Chevet E, Tremblay ML, Thomas DY. Organization of the Sec61 translocon, studied by high resolution native electrophoresis. *J Proteome Res*. 2010;9: 1763–1771. doi:10.1021/pr900900x
480. Conti BJ, Devaraneni PK, Yang Z, David LL, Skach WR. Cotranslational stabilization of Sec62/63 within the ER Sec61 translocon is controlled by distinct substrate-driven translocation events. *Mol Cell*. 2015;58: 269–283. doi:10.1016/j.molcel.2015.02.018
481. Lang S, Benedix J, Fedeles SV, Schorr S, Schirra C, Schäuble N, et al. Different effects of Sec61 α , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Sci*. 2012;125: 1958–1969. doi:10.1242/jcs.096727
482. Müller L, de Escauriaza MD, Lajoie P, Theis M, Jung M, Müller A, et al. Evolutionary gain of function for the ER membrane protein Sec62 from yeast to humans. *Mol Biol Cell*. 2010;21: 691–703. doi:10.1091/mbc.E09-08-0730
483. Blau M, Mullapudi S, Becker T, Dudek J, Zimmermann R, Penczek PA, et al. ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the

- membrane. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12: 1015–1016. doi:10.1038/nsmb998
484. Dudek J, Greiner M, Müller A, Hendershot LM, Kopsch K, Nastainczyk W, et al. ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12: 1008–1014. doi:10.1038/nsmb1007
485. Chevet E, Wong HN, Gerber D, Cochet C, Fazel A, Cameron PH, et al. Phosphorylation by CK2 and MAPK enhances calnexin association with ribosomes. *EMBO J.* 1999;18: 3655–3666. doi:10.1093/emboj/18.13.3655
486. Lakkaraju AK, Abrami L, Lemmin T, Blaskovic S, Kunz B, Kihara A, et al. Palmitoylated calnexin is a key component of the ribosome-translocon complex. *EMBO J.* 2012;31: 1823–1835. doi:10.1038/emboj.2012.15
487. Schnell DJ, Hebert DN. Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell.* 2003;112: 491–505.
488. Pfeffer S, Dudek J, Gogala M, Schorr S, Linxweiler J, Lang S, et al. Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon. *Nat Commun.* 2014;5: 3072. doi:10.1038/ncomms4072
489. Pfeffer S, Burbaum L, Unverdorben P, Pech M, Chen Y, Zimmermann R, et al. Structure of the native Sec61 protein-conducting channel. *Nat Commun.* 2015;6: 8403. doi:10.1038/ncomms9403
490. Mahamid J, Pfeffer S, Schaffer M, Villa E, Danev R, Cuellar LK, et al. Visualizing the molecular sociology at the HeLa cell nuclear periphery. *Science.* 2016;351: 969–972. doi:10.1126/science.aad8857
491. Simon SM, Blobel G. A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell.* 1991;65: 371–380.
492. Crowley KS, Liao S, Worrell VE, Reinhart GD, Johnson AE. Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell.* 1994;78: 461–471.
493. Hamman BD, Hendershot LM, Johnson AE. BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell.* 1998;92: 747–758.
494. Hamman BD, Chen JC, Johnson EE, Johnson AE. The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40–60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell.* 1997;89: 535–544.
495. Walter P, Johnson AE. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10: 87–119. doi:10.1146/annurev.cb.10.110194.000511
496. Egea PF, Stroud RM. Lateral opening of a translocon upon entry of protein suggests the mechanism of insertion into membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 17182–

17187. doi:10.1073/pnas.1012556107
497. Li L, Park E, Ling J, Ingram J, Ploegh H, Rapoport TA. Crystal structure of a substrate-engaged SecY protein-translocation channel. *Nature*. 2016;531: 395–399. doi:10.1038/nature17163
498. Van den Berg B, Clemons WM, Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, et al. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*. 2004;427: 36–44. doi:10.1038/nature02218
499. Becker T, Bhushan S, Jarasch A, Armache J-P, Funes S, Jossinet F, et al. Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science*. 2009;326: 1369–1373. doi:10.1126/science.1178535
500. Gogala M, Becker T, Beatrix B, Armache J-P, Barrio-Garcia C, Berninghausen O, et al. Structures of the Sec61 complex engaged in nascent peptide translocation or membrane insertion. *Nature*. 2014;506: 107–110. doi:10.1038/nature12950
501. Park E, Ménétret J-F, Gumbart JC, Ludtke SJ, Li W, Whynot A, et al. Structure of the SecY channel during initiation of protein translocation. *Nature*. 2014;506: 102–106. doi:10.1038/nature12720
502. Voorhees RM, Hegde RS. Structure of the Sec61 channel opened by a signal sequence. *Science*. 2016;351: 88–91. doi:10.1126/science.aad4992
503. Voorhees RM, Fernández IS, Scheres SHW, Hegde RS. Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4 Å resolution. *Cell*. 2014;157: 1632–1643. doi:10.1016/j.cell.2014.05.024
504. Swanton E, Bulleid NJ. Protein folding and translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Membr Biol*. 2003;20: 99–104. doi:10.1080/0968768031000069241
505. Sommer N, Junne T, Kalies K-U, Spiess M, Hartmann E. TRAP assists membrane protein topogenesis at the mammalian ER membrane. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833: 3104–3111. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.08.018
506. von Heijne G, Gavel Y. Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem*. 1988;174: 671–678.
507. Kelleher DJ, Gilmore R. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology*. 2006;16: 47R–62R. doi:10.1093/glycob/cwj066
508. Ruiz-Canada C, Kelleher DJ, Gilmore R. Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell*. 2009;136: 272–283. doi:10.1016/j.cell.2008.11.047
509. Mohorko E, Owen RL, Malojčić G, Brozzo MS, Aebi M, Glockshuber R. Structural basis of substrate specificity of human oligosaccharyl transferase subunit N33/Tusc3 and its role in regulating protein N-glycosylation. *Struct Lond Engl* 1993. 2014;22:

- 590–601. doi:10.1016/j.str.2014.02.013
510. Chen W, Helenius J, Braakman I, Helenius A. Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92: 6229–6233.
511. Oliver JD, Hresko RC, Mueckler M, High S. The glut 1 glucose transporter interacts with calnexin and calreticulin. *J Biol Chem*. 1996;271: 13691–13696.
512. Tatu U, Helenius A. Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 1997;136: 555–565.
513. Nicchitta CV, Zheng T. Regulation of the ribosome-membrane junction at early stages of presecretory protein translocation in the mammalian endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 1997;139: 1697–1708.
514. Oliver JD, van der Wal FJ, Bulleid NJ, High S. Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science*. 1997;275: 86–88.
515. Rapiejko PJ, Gilmore R. Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *Cell*. 1997;89: 703–713.
516. Lomax RB, Camello C, Van Coppenolle F, Petersen OH, Tepikin AV. Basal and physiological Ca(2+) leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons. *J Biol Chem*. 2002;277: 26479–26485. doi:10.1074/jbc.M201845200
517. Flourakis M, Van Coppenolle F, Lehen'kyi V, Beck B, Skryma R, Prevarskaya N. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2006;20: 1215–1217. doi:10.1096/fj.05-5254fje
518. Giunti R, Gamberucci A, Fulceri R, Bánhegyi G, Benedetti A. Both translocon and a cation channel are involved in the passive Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum: a mechanistic study on rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 2007;462: 115–121. doi:10.1016/j.abb.2007.03.039
519. Ong HL, Liu X, Sharma A, Hegde RS, Ambudkar IS. Intracellular Ca(2+) release via the ER translocon activates store-operated calcium entry. *Pflugers Arch*. 2007;453: 797–808. doi:10.1007/s00424-006-0163-5
520. Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E, et al. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci*. 2004;117: 4135–4142. doi:10.1242/jcs.01274
521. Erdmann F, Schäuble N, Lang S, Jung M, Honigmann A, Ahmad M, et al. Interaction of calmodulin with Sec61 α limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO J*. 2011;30: 17–31. doi:10.1038/emboj.2010.284
522. Cassel R, Ducreux S, Alam MR, Dingreville F, Berl e C, Burda-Jacob K, et al.

- Protection of Human Pancreatic Islets from Lipotoxicity by Modulation of the Translocon. *PloS One*. 2016;11: e0148686. doi:10.1371/journal.pone.0148686
523. Amer MS, Li J, O'Regan DJ, Steele DS, Porter KE, Sivaprasadarao A, et al. Translocon closure to Ca²⁺ leak in proliferating vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 2009;296: H910–H916. doi:10.1152/ajpheart.00984.2008
524. Bultynck G, Kiviluoto S, Henke N, Ivanova H, Schneider L, Rybalchenko V, et al. The C terminus of Bax inhibitor-1 forms a Ca²⁺-permeable channel pore. *J Biol Chem*. 2012;287: 2544–2557. doi:10.1074/jbc.M111.275354
525. Paredes RM, Bollo M, Holstein D, Lechleiter JD. Luminal Ca²⁺ depletion during the unfolded protein response in *Xenopus* oocytes: cause and consequence. *Cell Calcium*. 2013;53: 286–296. doi:10.1016/j.ceca.2013.01.002
526. Layhadi JA, Fountain SJ. Influence of ER leak on resting cytoplasmic Ca(2+) and receptor-mediated Ca(2+) signalling in human macrophage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;487: 633–639. doi:10.1016/j.bbrc.2017.04.106
527. Traut RR, Monro RE. The puromycin reaction and its relation to protein synthesis. *J Mol Biol*. 1964;10: 63–72.
528. Pestova TV, Hellen CU. Functions of eukaryotic factors in initiation of translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2001;66: 389–396.
529. Dinos G, Wilson DN, Teraoka Y, Szaflarski W, Fucini P, Kalpaxis D, et al. Dissecting the Ribosomal Inhibition Mechanisms of Edeine and Pactamycin. *Mol Cell*. 2004;13: 113–124. doi:10.1016/S1097-2765(04)00002-4
530. Putney JW, Ribeiro CM. Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2000;57: 1272–1286.
531. Kaneko M, Nomura Y. ER signaling in unfolded protein response. *Life Sci*. 2003;74: 199–205.
532. Cassel R, Ducreux S, Alam MR, Dingreville F, Berlé C, Burda-Jacob K, et al. Protection of Human Pancreatic Islets from Lipotoxicity by Modulation of the Translocon. *PloS One*. 2016;11: e0148686. doi:10.1371/journal.pone.0148686
533. Chen W, Helenius A. Role of Ribosome and Translocon Complex during Folding of Influenza Hemagglutinin in the Endoplasmic Reticulum of Living Cells. *Mol Biol Cell*. 2000;11: 765–772.
534. Negroni JA, Morotti S, Lascano EC, Gomes AV, Grandi E, Puglisi JL, et al. β -adrenergic effects on cardiac myofilaments and contraction in an integrated rabbit ventricular myocyte model. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;81: 162–175. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.02.014
535. Pfeffer S, Dudek J, Zimmermann R, Förster F. Organization of the native ribosome-translocon complex at the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *Biochim*

- Biophys Acta. 2016;1860: 2122–2129. doi:10.1016/j.bbagen.2016.06.024
536. Bravo-Sagua R, Rodriguez AE, Kuzmicic J, Gutierrez T, Lopez-Crisosto C, Quiroga C, et al. Cell Death and Survival Through the Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Axis. *Curr Mol Med*. 2013;13: 317–329.
537. Mekahli D, Bultynck G, Parys JB, De Smedt H, Missiaen L. Endoplasmic-Reticulum Calcium Depletion and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3. doi:10.1101/cshperspect.a004317
538. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*. 2008;27: 6407–6418. doi:10.1038/onc.2008.308
539. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. *Science*. 2003;300: 135–139. doi:10.1126/science.1081208
540. Liu S, Hou Y, Liu W, Lu C, Wang W, Sun S. Components of the Calcium-Calcineurin Signaling Pathway in Fungal Cells and Their Potential as Antifungal Targets. *Eukaryot Cell*. 2015;14: 324–334. doi:10.1128/EC.00271-14
541. Aschar-Sobbi R, Emmett TL, Kargacin GJ, Kargacin ME. Phospholamban phosphorylation increases the passive calcium leak from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*. 2012;464: 295–305. doi:10.1007/s00424-012-1124-9
542. Santulli G, Xie W, Reiken SR, Marks AR. Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112: 11389–11394. doi:10.1073/pnas.1513047112
543. Petrovski G, Das S, Juhasz B, Kertesz A, Tosaki A, Das DK. Cardioprotection by endoplasmic reticulum stress-induced autophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14: 2191–2200. doi:10.1089/ars.2010.3486

Modulation pharmacologique de la fuite calcique du réticulum sarcoplasmique au sein de cardiomyocytes soumis à l'hypoxie/réoxygénation

RESUME

Le calcium est un acteur clé de la physiologie cellulaire et dans les cardiomyocytes le réticulum sarcoplasmique (RS) constitue une source principale de calcium intracellulaire. L'homéostasie calcique au sein du RS est finement régulée avec des canaux calciques, des pompes, des tampons et des canaux de fuite calcique comme le translocon. Au cours de l'infarctus du myocarde, une altération de l'homéostasie du calcium entre le RS, les mitochondries et le cytosol se produit et conduit à la mort cellulaire. Afin de limiter la toxicité du calcium, nous avons demandé si la modulation du stock calcique du RS, à l'origine de la surcharge calcique mitochondrial, en ciblant le translocon, pourrait être une stratégie efficace.

Nous avons pu (1) caractériser le translocon en tant que canal de fuite calcique actif localisé dans le RS longitudinal chez les cardiomyocytes de souris adultes. Nous avons montré aussi que (2) l'activation pharmacologique du translocon induit une réduction partielle des réserves calciques du RS longitudinal et exerce un effet de pré-conditionnement sur le myocarde avant l'ischémie/reperfusion (3) sans altérer les réserves calciques ryanodine-dépendantes. De manière importante, cela a été corrélé avec (4) une diminution de l'activation des protéines pro-apoptotiques mitochondriales, (5) une diminution du taux d'augmentation du calcium dans le cytosol pendant l'ischémie, (6) une diminution de l'activation des calpains calcium-dépendante et (7) une augmentation des mécanismes de pro-survie: autophagie et ER-stress.

Cette étude propose un nouveau paradigme dans la cardioprotection en découplant fonctionnellement la contraction calcium-dépendante et le sort des mitochondries calcium-dépendant ce qui met l'accent sur les connaissances actuelles sur la dualité entre les RS jonctionnel et longitudinal dans les cardiomyocytes et ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques en proposant une stratégie thérapeutique multi-cible contre les lésions d'ischémie/reperfusion.

ABSTRACT

Calcium is a key component of cellular physiology and in cardiomyocytes the sarcoplasmic reticulum (SR) represent a major source of intracellular calcium. Calcium homeostasis in the SR is finely regulated by calcium channels, pumps, buffers and calcium leak channels such as translocon. During myocardial infarction, alteration of calcium homeostasis between the SR, mitochondria and cytosol occurs and leads to cell death. In order to limit calcium toxicity, we questioned if modulating the SR calcium stock, at the origin of the mitochondrial calcium surcharge, by targeting the translocon, might be an effective strategy.

We were able to (1) characterize translocon as an active calcium leak channel localized in the longitudinal SR in adult mouse cardiomyocytes. We also showed that the (2) pharmacological activation of translocon induces a partial reduction of longitudinal SR calcium stores and exerts a preconditioning effect on myocardium before ischemia/reperfusion (3) without altering the ryanodine-dependent calcium stores. Importantly, this was correlated with (4) a decrease in the activation of mitochondrial pro-apoptotic proteins, (5) a decrease in the rate of calcium increase in the cytosol during the ischemia duration, (6) a decrease in the calcium-dependent calpains activation and (7) an increase of pro-survival mechanisms: autophagy and ER-stress.

This study proposes a new paradigm in cardioprotection by functionally decoupling the calcium-dependent contraction and calcium-dependent mitochondria fate which emphasize the present knowledge on the duality between junctional and longitudinal SR in cardiomyocytes and open up new therapeutic perspectives by proposing a multi-target therapeutic strategy against ischemia/reperfusion injuries.
