



HAL
open science

Régulation des fonctions mitochondriales dans la cardioprotection : spécificité du rat

Damien de Paulis

► **To cite this version:**

Damien de Paulis. Régulation des fonctions mitochondriales dans la cardioprotection : spécificité du rat. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10017 . tel-00858772

HAL Id: tel-00858772

<https://theses.hal.science/tel-00858772>

Submitted on 6 Sep 2013

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.

**REGULATION DES FONCTIONS
MITOCHONDRIALES DANS LA
CARDIOPROTECTION – SPECIFICITE DU RAT**

THESE

Présentée

devant l'Université Claude Bernard – Lyon 1

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

et soutenue publiquement le

20 Janvier 2011

par

Damien DE PAULIS

Jury :

Professeur Michel OVIZE	Université de Lyon	Président
Professeur Alain BERDEAUX	Université de Créteil	Rapporteur
Professeur Bernard GENY	Université de Strasbourg	Rapporteur
Professeur Fabrice PRUNIER	Université d'Angers	Rapporteur
Docteur Abdallah GHARIB	Université de Lyon	Directeur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

SECTEUR SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

SECTEUR SCIENCES TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M. R. Bernard

A tous les rats qui me sont passés entre les mains et dont le sacrifice a permis de mener à bien ce travail.

Mes remerciements vont particulièrement :

A mon directeur de thèse, le Docteur Abdallah Gharib, qui a encadré ce travail avec rigueur. Son aide quotidienne et ses conseils judicieux ont permis de façonner mon apprentissage de la discipline. Que sa générosité et sa bonne humeur (supérieure à coups de colère, $p < 0.001$!) soient récompensées par la plus simple expression... Merci pour tout.

Au Professeur Michel Ovize, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et m'a donné les moyens d'accomplir ce travail. Sa grande expertise dans le domaine de la cardioprotection en fait le référent incontournable de ces travaux. Qu'il trouve ici l'expression sincère de mon admiration et de ma gratitude.

Aux rapporteurs, les Professeurs Alain Berdeaux, Bernard Geny et Fabrice Prunier, qui ont accepté de nous accorder leur temps pour juger ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression profonde de ma reconnaissance.

A Elisabeth Couture-Lepetit, sans qui ce travail n'aurait jamais abouti. Au-delà de sa précieuse aide, je la remercie de m'avoir supporté toutes ces années.

A Pascal Chiari et ses multiples facettes. Tour à tour anesthésiste, chercheur et violoniste, il a insufflé son savoir et sa bonne humeur à ce travail.

A Lionel Augeul, mon compagnon d'infortune lors de la mise au point de ce modèle. Que l'aboutissement de ce travail soit la récompense de ses efforts.

A Joseph « le président Aulas a dit » Loufouat, éternel optimiste et inconditionnel de l'OL. A vaincre sans péril, on triomphe sans gloire !

A tous les membres (passés, présents et futurs) de l'U886 : René, Souhila, Denis, Fabrice, Johanna, Laurent, Martin, Geneviève, Ludo, Mélanie, Mumu, Claire, Odile, Brigitte... par vos conseils et votre convivialité, vous avez facilité l'accomplissement de ce travail.

A Elise « Paul » Belaïdi, éternelle stressée du labo. Ton oreille attentive ainsi que tes conseils, toujours pertinents, m'auront permis d'avancer dans ce travail. Je n'ai pas de doute quant à ta future nomination en qualité de MCU tant tu fais preuve de pédagogie au quotidien. N'oublie pas, comme le grand sage l'a dit, « le truc qu'il y a dans ta chaussure, c'est ton pied ! ».

A Geotrouvepatou / Rainette Pigeon / Jojo_du_quatre_deux, cofondateur de la Fraternité. Bon public, il m'aura accompagné sur tous les terrains de France et de Navarre (et notamment du Cocoon !). Si j'ai eu plaisir à venir chaque matin, sache que tu n'y étais pas étranger !

A mes parents, auxquels je dois tout.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	10
I. LA MITOCHONDRIE	11
<i>I-1. Structure des mitochondries</i>	<i>11</i>
I-1-1. La membrane externe	11
I-1-2. L'espace intermembranaire	12
I-1-3. La membrane interne	12
I-1-4. La matrice	12
<i>I-2. Fonctions des mitochondries</i>	<i>13</i>
I-2-1. Synthèse de l'ATP	13
I-2-1-1. La constitution d'un pool matriciel de cofacteurs réduits	13
I-2-1-2. Le transfert d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire	13
I-2-1-3. La synthèse d'ATP	14
I-2-2. Transport des nucléotides adényliques	15
I-2-3. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)	15
I-2-4. L'homéostasie calcique	16
I-2-5. Turnover des monoamines	17
I-2-6. Autres fonctions mitochondriales	17
<i>I-3. Pore de transition de perméabilité mitochondriale</i>	<i>17</i>
I-3-1. Structure moléculaire du mPTP	18
I-3-1-1. Modèle classique du mPTP	18
I-3-1-2. Modèle réactualisé du mPTP	22
I-3-2. Régulation de l'ouverture du mPTP	23
I-3-2-1. Le calcium	23
I-3-2-2. Le pH	24
I-3-2-3. Les ROS	24
I-3-2-4. Le potentiel membranaire	24
I-3-2-5. Le phosphate inorganique (Pi)	24
I-3-2-6. Le transporteur du phosphate mitochondrial (PiC)	25
I-3-2-7. Le complexe I de la chaîne respiratoire	25
I-3-2-8. Les ubiquinones	25
I-3-2-9. Autres facteurs régulateurs	26
II. ISCHEMIE-REPERFUSION CARDIAQUE	27
<i>II-1. Ischémie</i>	<i>27</i>
II-1-1. La durée de l'ischémie	27
II-1-2. La taille de la zone à risque	28
II-1-3. Le débit collatéral	29
<i>II-2. Reperfusion</i>	<i>29</i>
<i>II-3. Conséquences de l'ischémie-reperfusion cardiaque</i>	<i>30</i>
II-3-1. Métabolisme énergétique	31
II-3-1-1. Normoxie	31
II-3-1-2. Ischémie modérée	31
II-3-1-3. Ischémie sévère	31
II-3-1-4. Reperfusion	32
II-3-2. Altérations ioniques cellulaires	32
II-3-3. Chute du potentiel membranaire mitochondrial	32
II-3-4. Formation de ROS	32
II-3-5. Métabolisme du NO	33

II-3-6. Dysfonction endothéliale	33
II-3-7. Apoptose et autophagie.....	33
II-3-8. Activation immunitaire	33
III. CARDIOPROTECTION	34
<i>III-1. Préconditionnement</i>	34
III-1-1. Préconditionnement ischémique.....	34
III-1-1-1. Historique	34
III-1-1-2. Design du PreC Isch	35
III-1-1-3. Mécanisme d'action du PreC Isch	37
III-1-2. Préconditionnement à la CsA	43
III-1-3. Préconditionnement aux halogénés	43
III-1-3-1. Historique	43
III-1-3-2. Voies de signalisation du PreC aux halogénés.....	44
III-1-4. Préconditionnement à distance	45
III-1-5. Autres types de preconditionnement	45
<i>III-2. Postconditionnement</i>	46
III-2-1. Postconditionnement ischémique	46
III-2-1-2. Design du PostC Isch.....	47
III-2-1-3. Mécanisme d'action du PostC Isch.....	48
III-2-2. Postconditionnement à la CsA.....	51
III-2-3. Postconditionnement aux halogénés.....	51
III-2-3-1. Historique	51
III-2-3-2. Voies de signalisation du PostC aux halogénés	51
III-2-4. Postconditionnement à distance.....	52
III-2-5. Autres types de postconditionnement.....	53
<i>III-3. Perconditionnement</i>	53
III-3-1. Historique	53
III-3-2. Combinaison du PerC et du PostC	53
<i>III-4. Spécificité du modèle de rat</i>	54
BUT DU TRAVAIL	56
MATERIELS ET METHODES.....	59
I. ANIMAUX	60
II. PREPARATIONS CHIRURGICALES.....	60
<i>II-1. Préparation chirurgicale du rat adulte</i>	60
<i>III-2. Préparation chirurgicale du rat nouveau-né</i>	61
III. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.....	61
<i>III-1. Ischémie-reperfusion cardiaque chez le rat adulte</i>	61
<i>III-2. Ischémie-reperfusion cérébrale chez le rat nouveau-né</i>	63
<i>III-3. Influence de la surexpression de la MAO-A cardiaque chez la souris</i>	63
IV. QUANTIFICATION DE L'INFARCTUS.....	63
V. ISOLATION DES MITOCHONDRIES	64
VI. DOSAGE DE PROTEINE.....	64
VII. ANALYSE DES FONCTIONS MITOCHONDRIALES	65
<i>VII-1. Phosphorylation oxydative</i>	65
<i>VII-2. Ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale</i>	65

<i>VII-3. Production d'espèces réactives de l'oxygène</i>	66
VIII. ANALYSES STATISTIQUES	67
RESULTATS ET DISCUSSION	68
<i>In vivo ischemic and pharmacological preconditioning and postconditioning in the rat heart model</i>	69
<i>Regulation of mitochondrial permeability transition by complex I and cyclophilin D ..</i>	105
<i>Modification of mitochondrial permeability transition and ROS production by Coenzyme Q analogues in isolated rabbit heart mitochondria</i>	121
<i>Evaluation of cyclosporine A in a stroke model in the immature rat brain</i>	152
<i>Overexpression of monoamine oxidase-A drives chronic oxidative-dependent myocytes necrosis and ventricular failure in mice</i>	164
CONCLUSIONS	213
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	216

LISTE DES ABREVIATIONS

AAR	Aire à risque (area at risk)
Acétyl CoA	Acétyl coenzyme A
ADP	Adénosine diphosphate
AIF	Facteur induisant l'apoptose (apoptosis-inducing factor)
ANT	Transporteur des nucléotides adényliques (adenine nucleotide translocase)
ATP	Adénosine triphosphate
BAX	Protéine X associée à Bcl-2
BKA	Acide bongkréique
BSA	Albumine sérique bovine (bovine serum albumin)
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CAT	Carboxyatractyloside
CK	Créatine kinase
CRC	Capacité de rétention calcique (calcium retention capacity)
CsA	Cyclosporine A
Cyp D	Cyclophiline D
Cyt C	Cytochrome C
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique (ethylenediaminetetraacetic acid)
EGTA	Acide tétra-acétique d'éthylène-glycol (ethylene glycol tetraacetic acid)
HK	Hexokinase
IMM	Membrane mitochondriale interne
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
I/R	Ischémie reperfusion
IS	Zone infarctée (infarct size)
K _{ATP}	Canaux potassiques ATP dépendants
LV	Ventricule gauche (left ventricle)
MAC	Concentration alvéolaire minimale (minimum alveolar concentration)

MAO	Monoamine oxydase
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MOPS	Acide morpholino propane sulfonique (morpholinepropanesulfonic acid)
mPTP	Pore de transition de perméabilité mitochondriale
NCE	Efflux calcique Na ⁺ -dépendant
NICE	Efflux calcique Na ⁺ -indépendant
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
OMM	Membrane mitochondriale externe
PBR	Récepteur périphérique des benzodiazépines
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PostC	Postconditionnement
PPIase	Isomérase peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i>
PreC	Préconditionnement
RACK	Récepteur de la kinase C activée
RaM	Rapid uptake mode
RISK	Reperfusion injury salvage kinase
RCI	Indice du couplage respiratoire (respiratory control index)
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)
TIM	Translocase de la membrane interne (translocase of the inner membrane)
TK	Tyrosine kinase
TMPD	Tétraméthyl-p-phénylènediamine
TOM	Translocase de la membrane externe (translocase of the outer membrane)
TspO	Protéine translocatrice
TTC	Chlorure de triphényltétrazolium (triphenyltetrazolium chloride)
VDAC	Canal anionique voltage-dépendant

INTRODUCTION

I. La mitochondrie

La mitochondrie est présente dans la majorité des cellules eucaryotes ¹. Elle fournit l'énergie indispensable au bon fonctionnement de la cellule vivante en synthétisant l'adénosine triphosphate (ATP). Lors d'une agression cellulaire comme l'ischémie-reperfusion (I/R), elle peut se détourner de son fonctionnement physiologique et conduire la cellule vers l'apoptose et/ou la nécrose par l'intermédiaire du phénomène de transition de perméabilité.

I-1. Structure des mitochondries

La mitochondrie est un organe cellulaire d'environ 2 à 10 μm de longueur et de 0,5 à 1 μm de largeur. Elle est limitée par deux membranes qui définissent deux compartiments mitochondriaux séparés : l'espace matriciel interne et l'espace intermembranaire plus étroit (Figure 1).

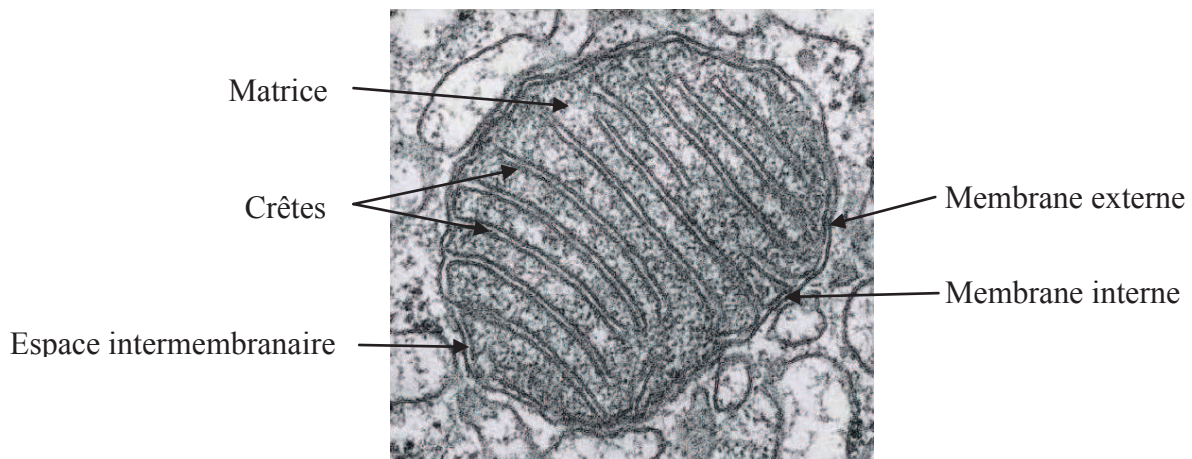


Figure 1. Structure de la mitochondrie

I-1-1. La membrane externe

La membrane externe est une membrane classique, lisse, pauvre en protéines. Cependant, elle contient de nombreuses copies d'une protéine de transport nommée porine qui forme de grands canaux aqueux à travers la double couche lipidique. Ainsi, elle est perméable à toutes les molécules d'une masse moléculaire inférieure à 5 kDa, y compris les protéines. Les molécules de plus haut poids moléculaire peuvent entrer par cette membrane externe par transport actif à condition qu'elles soient capables de se lier à une protéine multi-subunités nommée translocase de la membrane externe (TOM). La rupture de cette membrane dans certaines conditions laisse sortir les facteurs pro-apoptotiques, tel le cytochrome c (Cyt C), et déclenche le processus de la mort cellulaire ².

I-1-2. L'espace intermembranaire

La plupart des petites molécules pénétrant par la membrane externe ne peuvent franchir la membrane interne imperméable. Ainsi, cet espace intermembranaire est chimiquement équivalent au cytosol vis-à-vis des petites molécules qu'il contient. Les protéines de plus haut poids moléculaire, qui traversent la membrane externe via les TOM, se retrouvent quant à elles à des concentrations différentes de celles du cytosol.

I-1-3. La membrane interne

Cette membrane, composée de 75 % de protéines et 25 % de lipides, est très spécialisée. Elle contient une proportion élevée d'un phospholipide « double », la cardiolipine, qui contient quatre acides gras et aiderait à rendre la membrane particulièrement imperméable aux ions. La dégradation de ces cardiolipines induit un dysfonctionnement mitochondrial et la mort cellulaire³.

La membrane interne est quasiment imperméable aux ions et aux métabolites hydrosolubles. Ces substances ne peuvent traverser la membrane qu'à l'aide d'un assortiment de protéines membranaires de transport, nommées navettes. La membrane interne contient aussi des translocases de la membrane interne (TIM), impliquées dans l'import des protéines. Les enzymes de la chaîne respiratoire sont enchâssées dans la membrane mitochondriale interne, et elles sont indispensables à la phosphorylation oxydative qui produit la majorité de l'ATP de la cellule animale.

Cette membrane interne forme des invaginations, formant ainsi une série de replis, connus sous le nom de crêtes, dans l'espace matriciel. Ces replis augmentent considérablement la surface de la membrane interne. Le nombre de crêtes dans la mitochondrie d'une cellule du muscle cardiaque est très élevé, ce qui est la conséquence probable de la grande demande en ATP de ces cellules.

La membrane interne est le siège de la formation d'un méga canal appelé pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). Par sa formation, il conduit la cellule vers l'apoptose et/ou la nécrose.

I-1-4. La matrice

L'espace matriciel contient un mélange très concentré de nombreuses enzymes, dont celles qui sont nécessaires à l'oxydation du pyruvate et des acides gras (en acétyl-CoA) et au cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs). Il renferme également plusieurs copies identiques d'ADN (génom mitochondrial) et les protéines nécessaires à sa transcription puis à la traduction de l'ARNm en protéines.

Cependant, cette conception schématique de la mitochondrie ne doit pas nous éloigner d'une vision plus dynamique de cet organite intracellulaire. En effet, les mitochondries entretiennent d'étroites relations avec les autres constituants cellulaires (cytosquelette, protéines cytoplasmiques, réticulum endoplasmique, noyau).

I-2. Fonctions des mitochondries

I-2-1. Synthèse de l'ATP

Le métabolisme cellulaire produit, lors de la glycolyse, de la β -oxydation et essentiellement du cycle de Krebs, des cofacteurs réduits comme le $\text{NADH} + \text{H}^+$ (nicotinamide adénine dinucléotide réduit) et le FADH_2 (flavine adénine dinucléotide réduit). La réoxydation de ces molécules par le transfert des électrons sur l'oxygène (l'accepteur final), par l'intermédiaire de la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale interne, permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP. L'ensemble de ces réactions qui conduisent à la synthèse d'ATP consomment de l'oxygène et sont ainsi assimilées à une respiration mitochondriale (ou phosphorylation oxydative). Cette phosphorylation oxydative se décompose donc en trois étapes essentielles : la constitution d'un pool matriciel de cofacteurs réduits, le transfert d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP à proprement parlé.

I-2-1-1. La constitution d'un pool matriciel de cofacteurs réduits

Le métabolisme oxydatif dans la mitochondrie est principalement tributaire des acides gras et du pyruvate produits par la glycolyse dans le cytosol. Ces composés sont sélectivement transportés du cytosol à la matrice mitochondriale où ils sont scindés pour former le groupement acétyle de l'acétyl coenzyme A (acétyl CoA). Afin d'assurer un apport continu de combustible nécessaire au métabolisme oxydatif, les cellules animales stockent les acides gras sous la forme de triglycéride et le glucose sous la forme de glycogène. L'acétyl CoA va rentrer dans le cycle de Krebs pour être oxydé au niveau de son groupement acétyle. Au cours de ce cycle de Krebs, le NAD^+ et le FAD sont réduits respectivement en $\text{NADH} + \text{H}^+$ et FADH_2 , les cofacteurs réduits indispensables au fonctionnement de la chaîne respiratoire.

I-2-1-2. Le transfert d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire

Le transfert des électrons issus des coenzymes réduits $\text{NADH} + \text{H}^+$ et FADH_2 est réalisé par différentes réactions d'oxydoréduction au niveau de la chaîne respiratoire (Figure 2). Ce phénomène est couplé au transport actif de protons, depuis la matrice vers l'espace intermembranaire, générant ainsi une différence de potentiel électrochimique (couplage chimiosmotique).

Le NADH et le FADH_2 sont oxydés respectivement au niveau des complexes I (NADH déshydrogénase) et II (succinate déshydrogénase) de la chaîne respiratoire. Chacune de ces oxydations libère deux électrons qui sont transférés au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q). Ces électrons sont successivement pris en charge par le complexe III (ou ubiquinone - cytochrome c réductase), le cytochrome c et le complexe IV (ou cytochrome c oxydase). Ils réagissent enfin avec leur accepteur final, l'oxygène moléculaire, pour former des molécules d'eau. Au cours de ces étapes, une quantité très faible d'électrons est incomplètement réduite, essentiellement au niveau des complexes I et III. Ces électrons réagissent avec l'oxygène moléculaire et génèrent ainsi des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui ont des rôles importants de second messenger mais peuvent également être néfastes (voir ultérieurement). Lors de cette phosphorylation oxydative, les complexes I, III et IV utilisent l'énergie générée

par ce transfert d'électrons pour pomper des protons depuis la matrice vers l'espace intermembranaire. Ceci crée un gradient de protons (ou gradient de pH, ΔpH) et modifie le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta \Psi_m$).

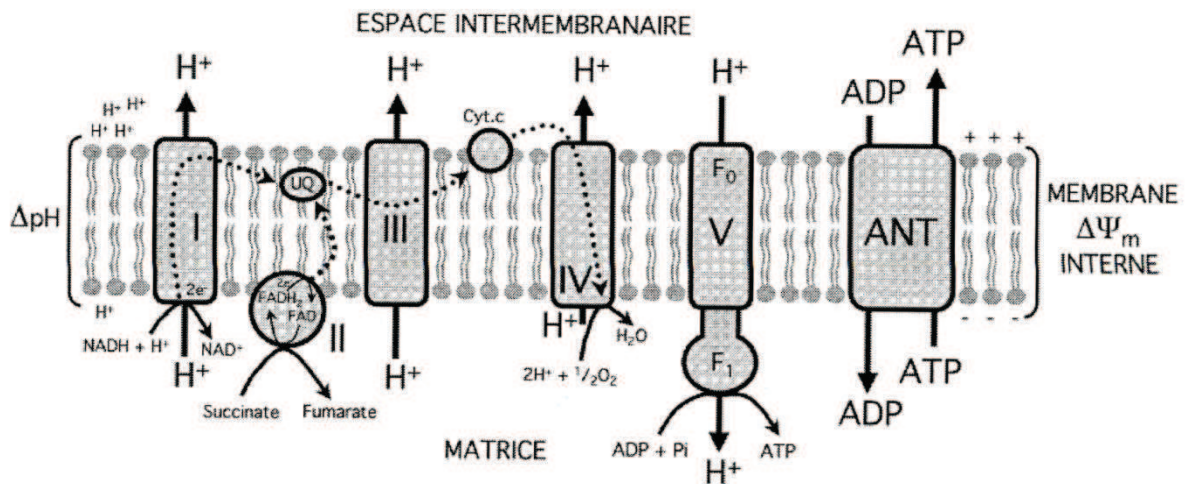


Figure 2. Représentation de la chaîne respiratoire. Le flux d'électrons (flèches en pointillés) provenant des complexes I (pour le NADH) ou II (pour le FADH₂) est transféré successivement à l'ubiquinone, au complexe III, au cytochrome c, au complexe IV, et finalement combiné à l'oxygène moléculaire. Les complexes I, III et IV sont également des pompes à protons qui font sortir des H⁺ vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient de pH (ΔpH) et un potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta \Psi_m$). Le complexe V ou F₀/F₁-ATP synthase convertit cette force protomotrice en ATP en faisant rentrer les H⁺ dans la matrice. Le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) assure la sortie d'une molécule d'ATP contre l'entrée d'une molécule d'ADP.

I-2-1-3. La synthèse d'ATP

La génération d'ATP par la phosphorylation oxydative dépend d'un processus chimiosmotique, qui fut proposé dès 1961. Ce terme vient du fait que les intermédiaires chimiques riches en énergie sont remplacés par une association entre des processus chimiques (« chimi ») et des processus de transport (« osmotiques »). L'imperméabilité de la membrane mitochondriale permet de maintenir le gradient de protons. Le reflux de protons, dans le sens de ce gradient, est employé pour activer une enzyme membranaire, l'ATP synthase (ou F₀/F₁-ATP synthase), qui catalyse la conversion d'ADP + P_i en ATP, et complète le processus de la phosphorylation oxydative. C'est le domaine membranaire F₀ qui joue le rôle de canal à protons alors que le domaine extrinsèque hydrophile F₁, du côté matriciel, supporte l'activité catalytique de l'ATP synthase, également appelée complexe V. Son fonctionnement est néanmoins réversible, si bien que, lors d'une chute de la force protomotrice, une hydrolyse de l'ATP se produira.

I-2-2. Transport des nucléotides adényliques

Le bon fonctionnement de la phosphorylation oxydative est conditionné par un transport satisfaisant d'ADP et d'ATP. L'ATP est synthétisée dans la matrice mais utilisée en grande partie dans le cytosol. A l'inverse, l'ADP est synthétisée dans l'espace intermembranaire. C'est le transporteur de nucléotides adényliques (ou ANT) qui assure la continuité métabolique de ce système. Cette translocase hautement spécifique transfère une molécule d'ATP dans l'espace intermembranaire pour chaque molécule d'ADP qui rentre au niveau matriciel.

I-2-3. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ROS sont des atomes ou des molécules dont une orbitale contient un électron non apparié, ce qui les rend instables et très réactifs. Ils sont alors capables d'extraire un électron des molécules voisines pour combler la vacance de leur orbitale. Les ROS sont d'importants seconds messagers cellulaires ⁴ et leurs effets sont variés. Ils sont à l'origine de nombreux dommages, tant au niveau cellulaire que moléculaire, comme la fragmentation de l'ADN ⁵⁻⁶ et l'oxydation de protéines ⁷. Ils initient également des réactions en cascade telle que la peroxydation lipidique (d'où altération des membranes et mort cellulaire) ⁸. L'hyperproduction de ROS est à la base des explications physiopathologiques des grandes maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer ⁹⁻¹¹. Ainsi, ils sont traditionnellement considérés comme délétères. Cependant, les ROS sont également impliqués dans des phénomènes protecteurs tels que le pré- et le postconditionnement cardiaque ¹²⁻¹⁴.

La mitochondrie représente le site majeur de production de ROS. Au cours de la phosphorylation oxydative, une petite quantité d'oxygène échappe à la réduction complète en H₂O et subit une réduction mono-électronique au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire ¹⁵, donnant ainsi naissance à l'anion superoxyde (O₂⁻). L'oxydation du FADH₂ au niveau du complexe II produit également des ROS par un phénomène appelé flux inverse d'électrons (reverse electron transfert) ¹⁶⁻¹⁷. Une partie des électrons obtenus par l'oxydation de ce FADH₂ retourne en direction du complexe I, générant ainsi des ROS au niveau de la flavine mononucléotide du complexe I. L'anion superoxyde ayant une durée de vie extrêmement limitée, ce sont surtout ses dérivés qui sont considérés comme délétères : le peroxynitrite (ONOO⁻) et les radicaux hydroxyles (HO[·]) et peroxydes (ROO[·]) (Figure 3).

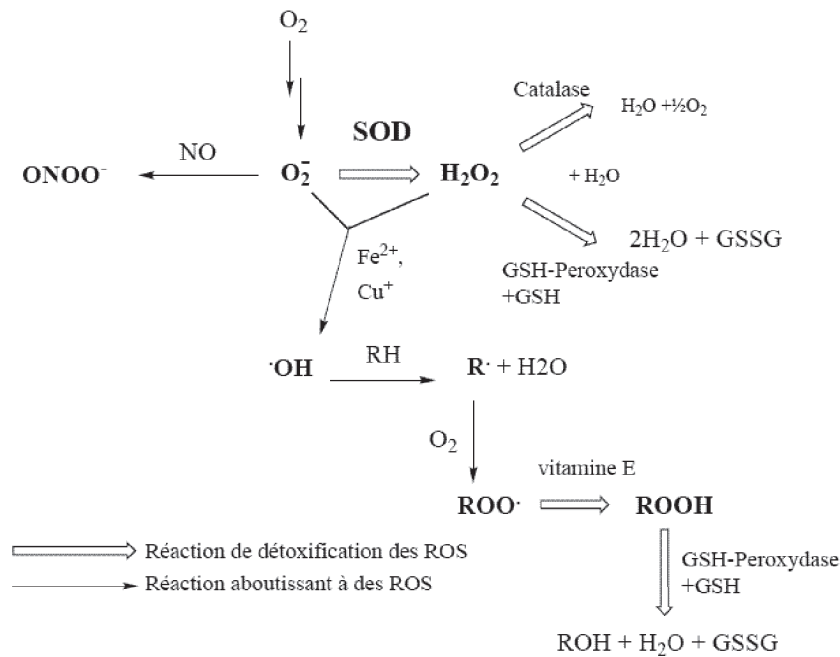


Figure 3. Synthèse et détoxification des ROS. SOD, superoxyde dismutase; GSH, glutathion réduit ; R·, radical lipidique.

I-2-4. L'homéostasie calcique

Le calcium est un second messager cellulaire qui régule de nombreuses réactions métaboliques et des processus physiologiques variés comme la contraction des cardiomyocytes. La mitochondrie participe, en relation étroite avec le réticulum endoplasmique, à la régulation de la concentration cellulaire de calcium. Elle est pourvue d'un certain nombre de canaux ioniques spécifiques du calcium (Figure 4) ¹⁸⁻¹⁹.

Un changement de concentration calcique intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), en réponse à des hormones et des neurotransmetteurs, induit une augmentation de la concentration calcique matricielle ($[\text{Ca}^{2+}]_m$). La différence de potentiel entre le cytosol et la matrice mitochondriale permet l'entrée passive de calcium à travers un canal ou uniporteur calcique ²⁰. La structure de ce transporteur est encore inconnue, bien qu'une étude récente l'identifie comme un canal calcique très sélectif ²¹. Le calcium peut également rentrer dans la mitochondrie par un mécanisme rapide appelé RaM (rapide uptake mode) ²², dont la structure est encore inconnue à ce jour. La sortie de calcium est assurée par deux transporteurs localisés dans la membrane mitochondriale interne. Ces transporteurs sont le NCE (efflux calcique Na^+ -dépendant, $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) et le NICE (efflux calcique Na^+ -indépendant, $2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$) ¹⁸.

La proximité entre la mitochondrie, les canaux calciques du réticulum endoplasmique (les récepteurs à la ryanodine et à l'inositol triphosphate, IP_3) et la membrane plasmique est considérée comme la cause de ces changements de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ²⁰.

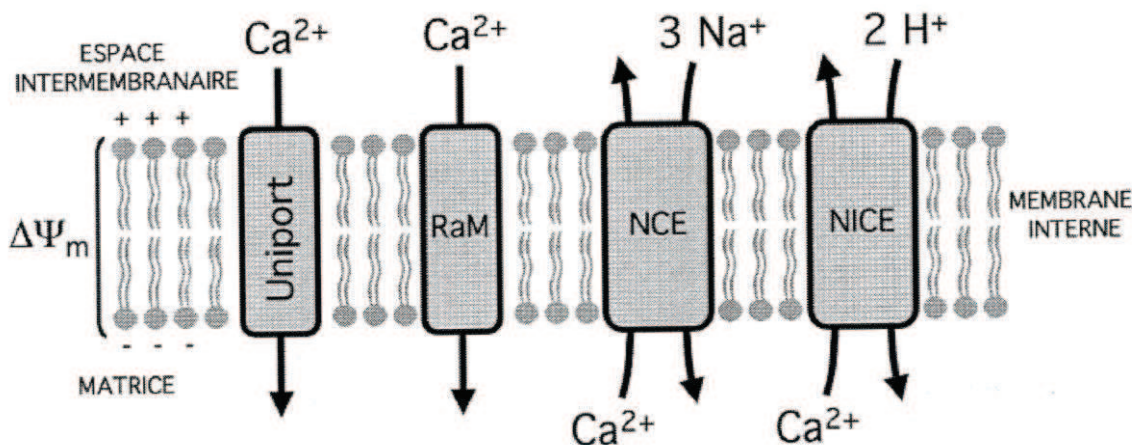


Figure 4. Transport mitochondrial du calcium. L'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie est assurée par l'uniprot calcique et le rapid uptake mode (RaM), deux transporteurs électrogéniques, dépendant du potentiel de membrane mitochondrial. Sa sortie dépend de deux transporteurs, dépendant (NCE) ou indépendant (NICE) de l'ion Na^+ .

I-2-5. Turnover des monoamines

Les monoamines sont des neurotransmetteurs dérivés d'acides aminés. On distingue les catécholamines (adrénaline, noradrénaline et dopamine) et les indolamines (sérotonine), qui dérivent respectivement de la tyrosine et du tryptophane. Leur dégradation se fait par les monoamines oxydases A et B (MAO-A et MAO-B). La MAO-A est localisée sur la face externe de la membrane mitochondriale externe. La mitochondrie régule ainsi le turnover de ces monoamines. Au cours de leur dégradation, des ROS peuvent être générés puisque de l' H_2O_2 est produit. Ainsi, les molécules d' H_2O_2 issues de la dégradation des monoamines par la MAO-A ont un rôle critique dans les lésions post-ischémiques myocardiques²¹.

I-2-6. Autres fonctions mitochondriales

Les mitochondries sont également impliquées dans de nombreuses autres fonctions : synthèse de stéroïdes hormonaux, participation à l'apoptose par la libération de Cyt C dans le cytoplasme et régulation de la prolifération cellulaire entre autre...

I-3. Pore de transition de perméabilité mitochondriale

Le pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) est un acteur important de plusieurs processus physiologiques ou physiopathologiques. C'est un canal transitoire non spécifique situé dans la membrane interne de la mitochondrie, dont l'ouverture est induite par plusieurs facteurs dont le Ca^{2+} ²²⁻²⁴. Ces facteurs entraînent un gonflement mitochondrial. Ce mPTP a une perméabilité très importante ($\approx 1\ 200\ \text{pS}$) et des états de conductance multiples. Son ouverture laisse passer les molécules de poids moléculaire inférieur à $1\ 500\ \text{Da}$ ²⁵. L'ouverture transitoire de ce mPTP à des niveaux de perméabilité intermédiaires pourrait participer à la régulation calcique²⁶. Lorsqu'elle est prolongée, elle se caractérise par la perte

de l'imperméabilité constitutionnelle de la membrane interne. Cela provoque un effondrement du potentiel membranaire ($\Delta \Psi_m$) et un gonflement mitochondrial. La dissipation du $\Delta \Psi_m$ entraîne non seulement l'arrêt de la synthèse d'ATP mais également son hydrolyse par l'ATP synthase qui se met à fonctionner en sens inverse (ATPase). Le gonflement de la matrice induit une rupture de la membrane externe et une fuite de molécules pro-apoptotiques comme le Cyt C et l'AIF (facteur induisant l'apoptose).

Lors d'une souffrance intense de la mitochondrie, l'ouverture de ce pore représente pour la cellule un point de non-retour vers la mort, qu'elle soit de nature nécrotique ou apoptotique. Le rôle physiopathologique du mPTP a été étudié dans de nombreux domaines ²⁷⁻³⁰, notamment dans l'ischémie-reperfusion cardiaque ³¹⁻³⁴.

I-3-1. Structure moléculaire du mPTP

Le mPTP semble associé aux sites de contact entre membrane interne et membrane externe. La structure moléculaire du pore n'est pas encore établie avec certitude, mais semble comprendre le voltage-dépendant anion channel (VDAC, ou porine) de la membrane externe, l'adénine nucléotide translocator (ANT) de la membrane interne, et la cyclophiline D (Cyp D) matricielle. D'autres transporteurs ainsi que des kinases associées à la mitochondrie (hexokinase, créatine kinase, glycérol kinase) pourraient être impliqués.

I-3-1-1. Modèle classique du mPTP

A la fin des années 1990, un modèle émergea, reflétant les connaissances acquises à l'époque ³⁵. Il fut proposé que ce pore soit un complexe multiprotéique dynamique formé dans des états non physiologiques et pathologiques. Selon les circonstances, il pourrait se former et faciliter le passage d'autres protéines. La structure proposée de ce pore était alors formée par le complexe VDAC/ANT/Cyp D, localisé aux sites de contact entre les membranes mitochondriales interne et externe. D'autres études ont révélé que l'hexokinase et la créatine kinase ³⁶, les membres de la famille Bcl-2 ³⁷⁻³⁸ et le récepteur périphérique des benzodiazépines ³⁹ pouvaient également interagir avec ce méga canal (Figure 5).

a. Le canal anionique voltage dépendant (VDAC)

C'est la protéine la plus abondante de la membrane externe mitochondriale. D'un poids moléculaire de 32 kDa, elle est formée de 19 feuilletts β et d'une région α -hélicoïdale N-terminale située à l'intérieur du canal. Ce VDAC est perméable aux petits ions (comme le Cl^- , le K^+ et le Na^+) ainsi qu'à de grands anions (tels que le glutamate et l'ATP) et cations (comme l'acétylcholine, la dopamine et le Tris). Il régule les mouvements de métabolites mitochondriaux. Il en existe trois isoformes (VDAC1, VDAC2 et VDAC3) chez les mammifères, ayant a priori des fonctions physiologiques distinctes ⁴¹.

De nombreuses études ont suggéré que la protéine de la membrane externe impliquée dans la formation du mPTP était le VDAC. Il apparaît en effet que l'incorporation de VDAC purifié dans des bicouches phospholipidiques forme des canaux aux propriétés électrophysiologiques similaires à celles du mPTP ⁴². De plus, ce canal est modulé par l'addition de Ca^{2+} , NADH et glutamate ⁴³⁻⁴⁵ et par liaison de l'hexokinase ⁴⁶, des conditions qui modulent également

l'activité du mPTP⁴⁷⁻⁴⁹. Les travaux de Crompton et al.⁵⁰, qui démontrent que l'ANT et le VDAC issus de mitochondries cardiaques solubilisées peuvent se lier à la Cyp D, abondent dans ce sens.

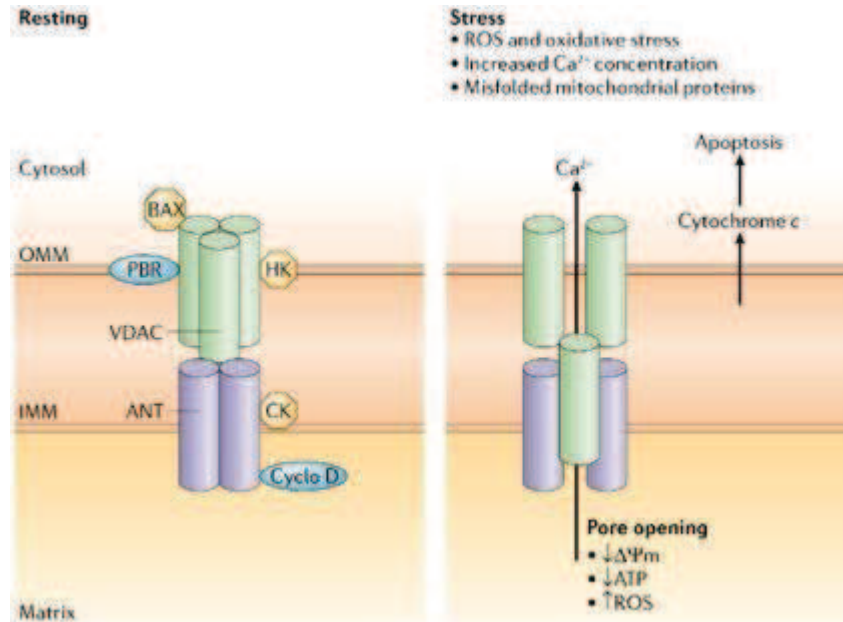


Figure 5. Schéma hypothétique classique du pore de transition de perméabilité mitochondriale. Le mPTP est constitué du VDAC (voltage-dependent anion channel) de la membrane mitochondriale externe (OMM), de l'ANT (adenine nucleotide translocator) de la membrane mitochondriale interne (IMM) et de la Cyp D (cyclophiline D) matricielle. D'autres protéines, comme le récepteur périphérique des benzodiazepines (PBR), l'hexokinase (HK) et la créatine kinase (CK), peuvent également être associées à ce pore. Sous certaines conditions physiopathologiques, ce complexe forme un pore ouvert entre l'OMM et l'IMM, permettant la diffusion passive de solutés à travers les membranes. Il en résulte un gonflement mitochondrial, un efflux de Ca^{2+} et un relargage de protéines pro-apoptotiques comme le cytochrome c et les procaspases. $\Delta\Psi_m$, potentiel membranaire mitochondrial; BAX, Bcl-2-associated X protein; ROS, reactive oxygen species. D'après Abou-Sleiman et al.⁴⁰.

b. Le transporteur des nucléotides adényliques (ANT)

L'ANT est une protéine d'un poids moléculaire de 35 kDa, constituée de 6 hélices α transmembranaires. Ce transporteur est la protéine la plus abondante de la membrane mitochondriale interne. L'ANT est un antiporteur qui permet l'échange d'une molécule d'ATP (en direction du cytoplasme) contre une molécule d'ADP (vers la matrice). Cet échange électrogénique est rendu possible grâce au gradient de protons. Il en existe 3 isoformes : ANT1 (musculaire), ANT2 (spécifiquement exprimée dans les cellules en prolifération) et ANT3 (ubiquitaire).

L'implication de l'ANT dans la structure du mPTP a été proposée en 1990 par l'équipe d'Halestrap et al.⁵¹. Par la suite, de nombreuses études ont montré que l'ouverture du mPTP

est favorisée par la déplétion en nucléotides adényliques, et inhibée par l'addition d'ATP ou d'ADP⁵²⁻⁵⁴, confirmant ainsi le rôle de cet ANT dans la transition de perméabilité. L'ouverture de ce mPTP est également modulée par d'autres ligands spécifiques de l'ANT comme le carboxyatractyloside (CAT) et l'acide bongkréique (BKA). Le CAT stabilise l'ANT dans une certaine conformation, ce qui favorise l'ouverture du mPTP. A l'inverse, le BKA stabilise l'ANT dans une autre conformation, ce qui inhibe l'ouverture de ce pore^{22, 55}.

c. La cyclophiline D (Cyp D)

La Cyp D est une protéine matricielle d'environ 18 kDa. Crompton et al.⁵⁶ ont été les premiers à montrer que la cyclosporine A (CsA) inhibe l'ouverture du mPTP. De plus, il a été montré que les analogues de la CsA inhibent ce pore en relation avec leur capacité à inhiber l'activité d'une isomérase peptidyl-prolyl *cis-trans* matricielle (PPIase)^{51, 57}. Cette PPIase a ensuite été identifiée comme étant la Cyp D⁵⁸. Le rôle critique de la Cyp D dans la formation du mPTP a été confirmé par des études faites sur des souris Cyp D^{-/-}⁵⁹⁻⁶⁰. Ces auteurs ont démontré que le mPTP peut s'ouvrir chez ces souris, mais la sensibilité à la CsA est perdue, prouvant ainsi que la Cyp D est la seule cible de la CsA. De plus, les souris déficientes en Cyp D sont naturellement cardioprotégées contre les lésions d'ischémie-reperfusion, alors que celles sur-exprimant cette protéine sont sensibles à la mort cellulaire. Toutes ces observations démontrent que la Cyp D est un acteur majeur de ce mPTP.

La CsA est un agent immunosuppresseur utilisé en transplantation d'organes afin de diminuer les risques de rejet de greffe. Elle est également utilisée dans le traitement de certaines maladies auto-immunes. La CsA se lie à la cyclophiline des lymphocytes immunocompétents. Le complexe cyclosporine-cyclophiline inhibe la calcineurine, une protéine phosphatase qui active normalement la transcription du gène de l'interleukine 2, réduisant ainsi l'activité des lymphocytes T effecteurs. La CsA et ses analogues non immunosuppresseurs se lient à la Cyp D et inhibent l'ouverture du mPTP de façon calcineurine indépendante⁶¹⁻⁶².

Il n'existe toujours aucune certitude concernant le mécanisme d'interaction Cyp D/mPTP. Halestrap et al.⁶³ ont suggéré que la Cyp D peut se lier à l'ANT sous certaines conditions, et que lors d'une surcharge calcique, l'ANT se change en un canal aspécifique de haute conductance sous l'effet d'un changement de conformation lié à l'activité PPIase. La CsA inhiberait l'ouverture du mPTP en empêchant la liaison physique entre la Cyp D et l'ANT⁶⁴.

L'application thérapeutique de la CsA est un très bon exemple de recherche translationnelle. Après avoir démontré le bénéfice conféré par la CsA en recherche fondamentale, sur les lésions d'ischémie-reperfusion cardiaque^{31, 65} l'équipe du Pr Ovize l'a appliquée avec succès en clinique humaine⁶⁶.

d. Le récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR)

Le PBR est une protéine localisée dans la membrane externe des mitochondries. Il représente un site de liaison des benzodiazépines différent du récepteur classique GABA. Ce récepteur de 18 kDa est également connu comme une protéine translocatrice (TspO). Il est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques telles que le transport de cholestérol et la

prolifération cellulaire⁶⁷⁻⁶⁸. Sous certaines conditions, ce PBR se lie avec l'ANT et le VDAC³⁹. De plus, un canal mitochondrial, soupçonné comme étant le mPTP, est sensible à la fois aux ligands du PBR⁶⁹ et à la CsA⁷⁰. Ces résultats suggèrent que les PBR ont un rôle structural dans le mPTP. Cependant, il a été montré que le 4'-chlorodiazepam, un ligand des PBR, induisait une cardioprotection contre la détérioration des contractions post-ischémiques, probablement par interaction avec un site en amont du mPTP⁷¹. Ce résultat suggère que le PBR est plus un régulateur qu'un composant structural du mPTP.

e. La créatine kinase (CK)

La créatine kinase est localisée au niveau de l'espace inter-membranaire mitochondrial. Cette enzyme catalyse la conversion de créatine en phosphocréatine à partir d'ATP. Cette réaction permet à la cellule de préserver de l'énergie. Elle est localisée principalement dans le cœur (CK-MB), le muscle (CK-MM) et le cerveau (CK-BB). La CK-MB est libérée en cas d'infarctus du myocarde, mais son usage diagnostique n'est qu'une alternative au dosage de la troponine I, qui est un meilleur marqueur⁷². L'incorporation de créatine kinase mitochondriale, d'hexokinase cytosolique, de VDAC et d'ANT dans des bicouches phospholipidiques reconstitue une activité semblable au mPTP³⁶. Ceci suggère que ces kinases sont impliquées dans la régulation de ce pore. Le rôle régulateur de la CK a également été soutenu par une étude faite sur des souris transgéniques exprimant la CK au niveau hépatique (en temps normal, le foie ne l'exprime pas). En effet, la créatine et la cyclocréatine, qui stabilise la CK dans une forme liée à l'ANT, inhibent l'ouverture du mPTP dans le foie de souris transgéniques mais pas de souris *wild type*⁷³. Une fois encore, il semble que la CK soit un régulateur de ce mPTP.

f. L'hexokinase (HK)

L'hexokinase est une enzyme qui catalyse la première étape du métabolisme du glucose. Elle transfère le phosphate terminal d'une molécule d'ATP sur le glucose, libérant ainsi le glucose 6-phosphate et l'ADP. Les cellules de mammifères possèdent 4 isoformes d'hexokinase : HK I, II (fortement exprimée dans les muscles squelettiques et le cœur), III et IV⁷⁴. La séquence N-terminale d'HK I et II présente une grande affinité pour le VDAC⁷⁵. Les travaux reconstituant une activité semblable au mPTP à partir, notamment, d'hexokinase suggèrent que cette enzyme est impliquée dans la régulation de ce pore³⁶. Récemment, il a été montré que le relargage d'HK de la mitochondrie, induit par un peptide (transactivateur de transcription, TAT-HK), entraîne la mort cellulaire par ouverture du mPTP⁷⁶. De façon surprenante, ce peptide est également efficace sur des fibroblastes VDAC1/3^{-/-} (où l'isoforme VDAC2 n'est pas liée à l'HK II), prouvant ainsi que le VDAC n'est pas nécessaire pour induire l'apoptose de ces cellules. Ainsi, le détachement de l'HK II, d'un site différent de celui du VDAC, peut être le signal déclencheur de l'apoptose via un changement conformationnel des membranes mitochondriales interne et externe et des composants/modulateurs du mPTP, indépendamment de la présence de VDAC.

g. Les protéines de la famille Bcl-2

Bcl-2 (lymphome 2 à cellules B) est une protéine de la membrane mitochondriale interne qui est impliquée dans l'inhibition de l'apoptose⁷⁷. Elle donne son nom à une classe de gènes qui peuvent être soit anti-apoptotiques (notamment Bcl-2 et Bcl-x_L), soit pro-apoptotiques (entre autres BAX et Bad). Des études *in vitro* d'interaction entre Bcl-2, BAX et l'ANT sur des bicouches lipidiques artificielles suggèrent que BAX forme des canaux avec l'ANT, à l'inverse de Bcl-2. De plus, Bcl-2 bloque la capacité de BAX à former ces canaux avec l'ANT⁷⁸. Ces résultats suggèrent que les protéines de la famille Bcl-2 peuvent jouer un rôle régulateur dans la transition de perméabilité. Les protéines de la famille Bcl-2 à domaines BH3 (pro-apoptotiques, telles BAX, Bad...) et BH4 (anti-apoptotiques, telles Bcl-2, Bcl-x_L...) semblent capable de médier (ou au moins réguler) leurs effets pro/anti-apoptotiques via une interaction directe avec le mPTP ou avec ses régulateurs⁷⁹⁻⁸¹.

I-3-1-2. Modèle réactualisé du mPTP

Les résultats d'études récentes, basées notamment sur des knock-out des constituants potentiels de ce pore, s'opposent à ce modèle classique^{79, 82-83}.

La participation du VDAC dans la composition de ce mPTP est maintenant fortement remise en cause. Des analogues de l'ubiquinone ont la capacité d'inhiber l'ouverture du mPTP. Cette inhibition se fait en association avec une protéine de 32 kDa de la membrane mitochondriale interne, identifiée initialement comme le VDAC1⁸⁴. Cependant, ces molécules peuvent se lier avec cette même protéine de 32 kDa dans des mitochondries déficientes en VDAC1, démontrant ainsi que le VDAC1 n'est pas la cible de ces analogues de l'ubiquinone⁸⁵. De plus, il a été montré très récemment que des mitochondries déficientes en toutes les isoformes de VDAC ont une ouverture normale de ce pore, prouvant ainsi que le VDAC n'est pas un composant essentiel de ce pore⁸⁶.

Le rôle de l'ANT comme élément constitutif de ce pore a également été remis en cause. Kokoszka et al.⁸⁷ ont démontré que les mitochondries de souris knock-out en ANT1 et ANT2 présentaient quand même une inhibition de l'ouverture du mPTP CsA-dépendante, bien que la surcharge calcique nécessaire à cette ouverture soit plus importante chez les souris sauvages. Il a été suggéré qu'en absence de l'ANT, un autre membre de la famille des transporteurs mitochondriaux, indéterminé à ce jour, puisse former le mPTP⁸⁸. Une autre explication est que l'ANT est plus un facteur de régulation qu'un composant essentiel de ce pore⁸⁹.

De récentes études génétiques ont démontré que la Cyp D est plus un régulateur qu'un composant propre du mPTP⁹⁰. Par ailleurs, l'inhibition CsA-dépendante du mPTP chez des souris ANT^{-/-} est toujours présente. Ceci suggère que le possible rôle régulateur de l'ANT semble être situé en amont de la Cyp D. Récemment, il a été proposé que la protéine se liant à la Cyp D ne soit pas l'ANT⁹¹, ce qui est en accord avec le courant de pensée actuel pour qui l'ANT n'est pas un composant structurel du mPTP. Les travaux de Nakagawa et al.⁶⁰ ont également permis de mieux comprendre le fonctionnement du mPTP. Ces auteurs ont démontré que les cellules déficientes en Cyp D présentent une résistance accrue à la nécrose

mais pas à l'apoptose. Ces résultats suggèrent que le mPTP serait finalement plutôt impliqué dans cette voie nécrotique.

En conclusion, la structure moléculaire du mPTP n'est toujours pas déterminée à ce jour. Il semblerait cependant que les protéines décrites précédemment comme constituants de ce pore soient en réalité plus des régulateurs de celui-ci. La figure 6 présente la vue réactualisée de ce pore.

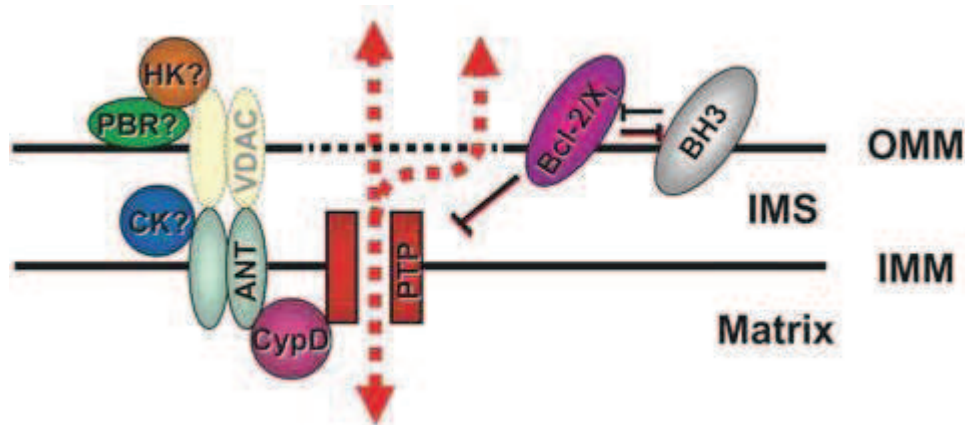


Figure 6. Vue actuelle du pore de transition de perméabilité mitochondriale. Les éléments composant le mPTP ne sont pas identifiés, mais ils sont probablement régulés par des protéines adjacentes, comme indiqué. Le VDAC n'est actuellement plus considéré comme une protéine composant le pore, ni même un régulateur de celui-ci, au regard des travaux récents de génétique. Les points d'interrogation montrent les grandes questions qui restent en suspend, notamment sur la participation de régulateurs potentiels de ce mPTP. OMM, membrane mitochondriale externe ; IMM, membrane mitochondriale interne ; IMS, espace inter-membranaire ; PTP, pore de transition de perméabilité ; Cyp D, cyclophiline D ; ANT, transporteur des nucléotides adényliques ; CK, créatine kinase ; VDAC, canal anionique voltage-dépendant ; PBR, récepteur périphérique aux benzodiazépines ; HK, hexokinase. D'après Zorov et al. ⁹².

I-3-2. Régulation de l'ouverture du mPTP

En plus des éléments régulateurs précédemment décrits, une multitude d'autres facteurs peuvent moduler l'ouverture de ce mPTP.

I-3-2-1. Le calcium

En se basant sur les résultats d'études de mitochondries isolées, il a été admis que le calcium est l'inducteur le plus important de l'ouverture du mPTP ⁹³⁻⁹⁴. Cependant, au regard d'études *in vivo*, il apparaît que ce pore est relativement insensible à une augmentation du Ca^{2+} cytosolique, alors qu'il devient sensible au Ca^{2+} quand les mêmes mitochondries sont séparées du cytoplasme. Il a été montré que le calcium matriciel induit l'ouverture du mPTP, alors que le calcium cytosolique l'inhibe ⁹⁵. A ce titre, l'uniport calcique semble être primordial dans la signalisation de la transition de perméabilité, en permettant la redistribution du Ca^{2+} dans la cellule ⁹⁶.

La quantité de calcium nécessaire pour induire l'ouverture du mPTP, ou capacité de rétention calcique (CRC), est le critère classique d'évaluation de la vulnérabilité de ce pore.

I-3-2-2. Le pH

Haworth et al.²³ ont été les premiers à montrer, sur des mitochondries isolées, qu'une baisse du pH retarde l'ouverture du mPTP. A l'inverse, l'alcalose augmente la probabilité d'ouverture de ce pore. L'effet protecteur de l'acidose a été confirmé par la suite, aussi bien sur des cellules entières⁷⁹ que sur des cœurs soumis à une séquence d'ischémie-reperfusion⁹⁷⁻⁹⁸. Cette protection pourrait être la conséquence de la limitation de l'activation des calpaïnes, des protéases calcium-dépendantes cytosoliques ubiquitaires⁹⁹. Ainsi, la modulation du pH pourrait être une nouvelle stratégie de postconditionnement myocardique.

I-3-2-3. Les ROS

Le stress oxydatif est l'un des plus puissants activateurs de l'ouverture du mPTP¹⁰⁰. Il a ainsi été montré que l'administration de divers pro-oxydants potentialisait la sensibilité du mPTP à la surcharge calcique^{54, 101-102}. Le propofol, un agent anesthésique connu comme piègeur de ROS, inhibe l'ouverture du mPTP sur mitochondries isolées¹⁰³ et sur mitochondries de cœurs traités au propofol¹⁰⁴. D'autres anesthésiques, comme le sévoflurane, peuvent être protecteurs en diminuant la production de ROS¹⁰⁵. Halestrap et al.⁵⁴ ont démontré que les espèces réactives de l'oxygène augmentaient la probabilité d'ouverture du mPTP en affectant la liaison de la Cyp D à l'ANT. Le MitoQ10, un piègeur de ROS spécifique à la mitochondrie, protège également le cœur contre les lésions de reperfusion¹⁰⁶. Ces ROS ont cependant un rôle double puisqu'ils participent également à la signalisation du PreC^{105, 107}. En fait, il semblerait que l'impact de ces espèces réactives ne soit pas le même selon la localisation de ces ROS. Les ROS matriciels induiraient l'ouverture du mPTP en modifiant les groupements thiols de l'ANT¹⁰⁸, alors qu'une augmentation des ROS cytosoliques pourrait être cardioprotectrice en activant les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène¹⁰⁹⁻¹¹⁰.

I-3-2-4. Le potentiel membranaire

La chute du potentiel membranaire mitochondrial est l'une des conséquences de l'ouverture du mPTP. Cependant, elle peut aussi en être la cause, comme Bernardi et al.^{96, 111} l'ont montré. En effet, ces auteurs ont démontré que la dépolarisation membranaire était nécessaire et suffisante pour induire l'ouverture du mPTP lorsque l'acidification matricielle et l'efflux calcique étaient prévenus. Le potentiel membranaire pourrait agir sur le mPTP en changeant la conformation de l'ANT⁵⁴. Récemment, Sedlic et al.¹¹² ont montré qu'une légère dépolarisation de la membrane mitochondriale était bénéfique en limitant la production de ROS, retardant ainsi l'ouverture du mPTP.

I-3-2-5. Le phosphate inorganique (Pi)

La capacité du phosphate à activer l'ouverture du mPTP est connue depuis très longtemps¹⁰². Cependant, il a également été montré que le Pi est essentiel dans l'inhibition de l'ouverture du mPTP. Ainsi, en présence de CsA ou en absence de Cyp D, il désensibiliserait le mPTP à la

surcharge calcique ¹¹³. La Cyp D pourrait être la cause de ce double effet : lorsqu'elle serait présente, elle masquerait l'action inhibitrice du Pi en bloquant son site de régulation sur le mPTP. A l'inverse, lorsqu'elle serait absente (ou bloquée par la CsA), le Pi pourrait alors inhiber ce pore.

I-3-2-6. Le transporteur du phosphate mitochondrial (PiC)

Un nouveau modèle de mPTP a très récemment été proposé par Leung et al. ¹¹⁴. Selon ces auteurs, le PiC induirait, en synergie avec le Ca²⁺, l'ouverture du mPTP en modifiant sa conformation. La liaison du PiC est modulée par un prétraitement au Ro 68-3400 et à l'ubiquinone 0, une molécule décrite précédemment comme inhibitrice du mPTP ¹¹⁵⁻¹¹⁶. De plus, ces molécules inhibent le transport du Pi avec la même efficacité qu'elles inhibent le mPTP ¹¹⁴. Ces mêmes auteurs ont suggéré la possibilité de liaison entre le PiC et la Cyp D, qui serait inhibée par la CsA ¹¹⁴. Cependant, aucune preuve indiscutable démontrant l'implication de ce transporteur dans la composition du mPTP n'a été montrée à ce jour.

I-3-2-7. Le complexe I de la chaîne respiratoire

La probabilité d'ouverture du mPTP est plus grande après activation de la chaîne respiratoire par les substrats du complexe I qu'avec ceux du II ⁴⁷. De plus, l'inhibition du complexe I par la roténone, en présence du substrat du complexe II, retarde l'ouverture de ce pore. Il a également été démontré, sur un modèle de cellules tumorales, que la roténone inhibe plus efficacement l'ouverture du mPTP que la CsA ¹¹⁷. Dans notre étude (2^{ème} article), nous avons montré qu'il existait une relation entre le complexe I, la Cyp D et le mPTP. En effet, l'administration conjointe de CsA et de roténone, un inhibiteur du complexe I, inhibe plus fortement l'ouverture du mPTP qu'en présence de CsA seule sur des mitochondries cardiaques de souris *wild type* et de rat. De plus, l'ajout de roténone sur des mitochondries isolées de souris Cyp D^{-/-}, naturellement cardioprotégées contre les lésions d'I/R, retarde l'ouverture de ce mPTP. Tous ces résultats suggèrent un rôle du complexe I dans la régulation du mPTP.

I-3-2-8. Les ubiquinones

L'étude de la régulation du mPTP par le flux d'électrons à travers le complexe I de la chaîne respiratoire a permis la découverte d'une nouvelle classe de régulateurs, les ubiquinones. Il a tout d'abord été démontré que l'ubiquinone 0 inhibe l'ouverture du mPTP dans le foie en bloquant le transfert d'électrons à travers le complexe I ⁴⁷. Les effets d'analogues de l'ubiquinone ont ensuite été étudiés afin d'élucider leur mode d'action. Ces molécules sont classées en 3 groupes selon leur effet sur le mPTP (Figure 7) : les ubiquinones du groupe I inhibent l'ouverture de ce pore, celles du groupe II l'induisent, alors que celles du groupe III n'ont pas d'effet ¹¹⁵. Aucune corrélation n'a été trouvée entre la structure primaire de ces analogues et leurs fonctions. L'utilisation d'animaux transgéniques déficients en Cyp D a permis de démontrer que ces molécules sont Cyp D-indépendantes ⁹⁰. Dans notre étude (3^{ème} article), nous avons montré sur des mitochondries cardiaques de lapin que des analogues du

coenzyme Q, CoQ₁₀ et CoQ₂, faciliteraient l'ouverture du mPTP indépendamment de leur effet oxydant. A l'heure actuelle, le mécanisme d'action de ces ubiquinones est toujours inconnu.

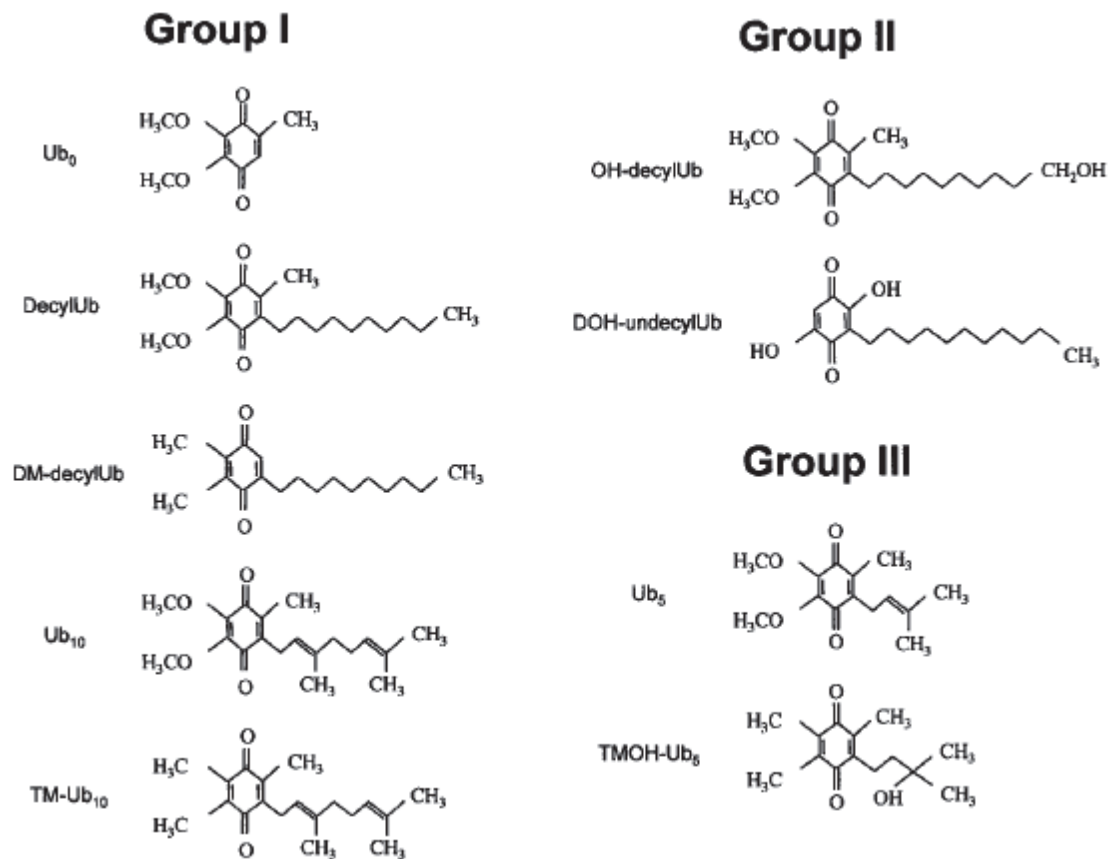


Figure 7. Structure chimique des analogues de l'ubiquinone. Les groupes I, II et III correspondent respectivement aux inhibiteurs, inducteurs et aux analogues qui n'ont pas d'effet direct sur le mPTP. Ub, ubiquinone. D'après Walter et al. ¹¹⁵.

I-3-2-9. Autres facteurs régulateurs

D'autres facteurs peuvent également moduler l'ouverture de ce pore, telle que la PKCε dont l'activation ouvrirait les canaux K_{ATP} mitochondriaux, ce qui augmenterait alors la production d'H₂O₂ et inhiberait ainsi le mPTP ¹¹⁸. Des cations bivalents autres que le Ca²⁺ (comme Sr²⁺, Ba²⁺ et Mn²⁺) peuvent également inhiber l'ouverture du mPTP, par compétition sur ses sites de fixation ⁹⁵. Les nucléotides adényliques régulent aussi ce pore, notamment l'ATP qui, lorsque sa production diminue, augmente la probabilité d'ouverture du mPTP ^{64, 100}.

II. Ischémie-reperfusion cardiaque

II-1. Ischémie

L'ischémie myocardique est la conséquence de l'insuffisance de la perfusion coronaire. Elle se traduit par un déséquilibre entre les apports et les besoins du myocarde en oxygène et en substrats, et induit l'accumulation des produits du métabolisme. Elle peut être d'origine physiopathologique (infarctus, ischémie, athérosclérose...) ou chirurgicale (circulation extracorporelle). L'agression ischémique est un processus dynamique qui dépend à la fois de la durée et de la sévérité de l'ischémie.

II-1-1. La durée de l'ischémie

La gravité des lésions cellulaires engendrées par une séquence d'ischémie-reperfusion dépend avant tout de la durée de l'ischémie. On distingue classiquement deux phases lors d'une occlusion coronaire. La première phase d'ischémie est réversible et débute dans les secondes suivant le début du processus. Elle entraîne une diminution très brutale et importante de l'activité contractile : l'épaississement-raccourcissement du myocarde est remplacé par un amincissement-dilatation passif. Elle entraîne également des modifications ultrastructurales essentiellement caractérisées par une diminution des réserves intracellulaires de glycogène et le développement d'un œdème intracellulaire. Cette phase se caractérise par sa réversibilité puisque si la perfusion coronaire est rétablie, il n'y aura pas de nécrose myocytaire ¹¹⁹. A l'inverse, si l'ischémie perdure, des lésions irréversibles vont apparaître. Cette deuxième phase d'ischémie voit la nécrose s'étendre progressivement du sous-endocarde, qui est la région la plus sensible et qui reçoit le moins de perfusion collatérale, vers l'épicarde selon un phénomène d'onde de progression (ou « wavefront », Figure 8) ¹²⁰⁻¹²¹.

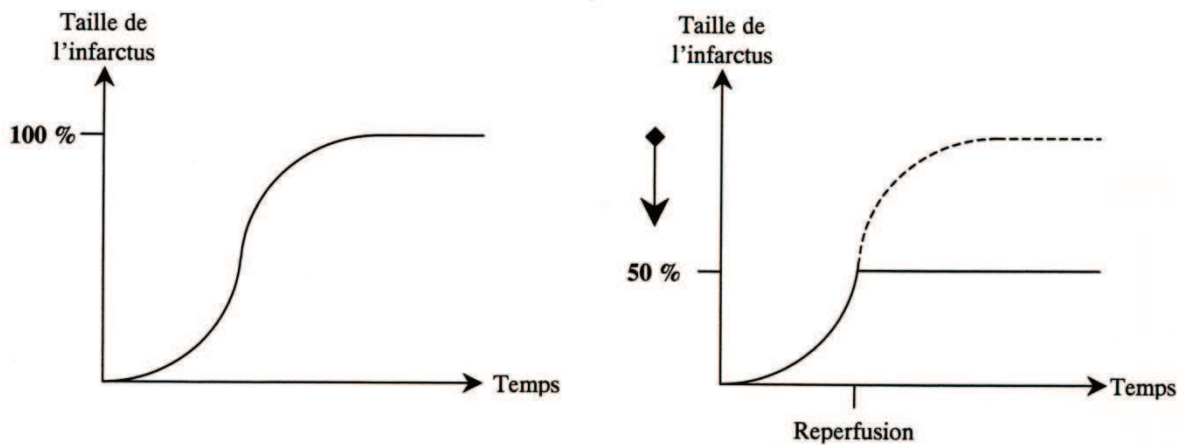
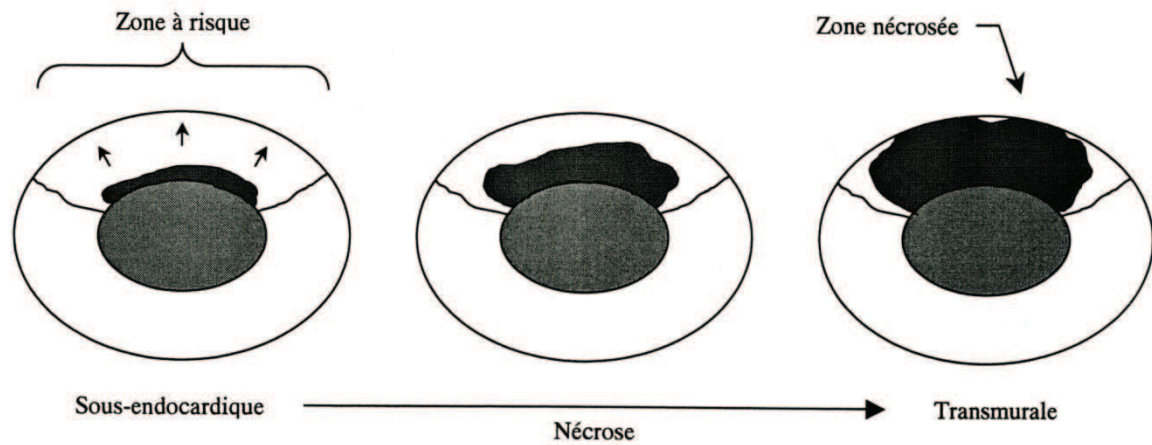


Figure 8. Importance de la durée de l'ischémie sur la taille de l'infarctus du myocarde. L'extension de la nécrose au sein de la zone à risque suit une onde de progression depuis une lésion sous-endocardique jusqu'à une lésion transmurale. La durée de l'ischémie est un déterminant majeur de cette progression. La reperfusion permet de diminuer les lésions ischémiques.

II-1-2. La taille de la zone à risque

La zone à risque (AAR) est la région du myocarde dont la vascularisation dépend de l'artère coronaire occluse¹²². Plus elle est large, c'est-à-dire plus l'occlusion coronaire est proximale, plus l'infarctus risque d'être étendu (Figure 9)¹²³. Il est classiquement admis qu'une AAR de petite taille est à exclure car la survenue d'un infarctus est alors aléatoire.

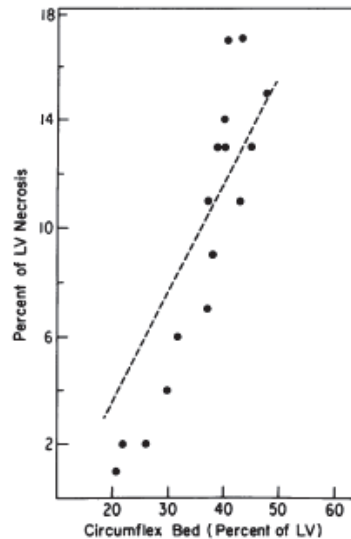


Figure 9. La zone à risque est un déterminant majeur de la taille de l'infarctus du myocarde. La quantité totale de myocarde infarcté, exprimée par le pourcentage de nécrose du ventricule gauche, est étroitement corrélée avec le lit vasculaire de l'artère circonflexe occluse, c'est-à-dire la taille de la zone à risque ($r = 0.81$). D'après Lowe et al. ¹²³.

II-1-3. Le débit collatéral

Il se définit comme le débit sanguin myocardique qui persiste dans la zone ischémique après occlusion coronaire. Lors de l'occlusion d'une artère coronaire, les zones voisines épargnées par l'ischémie vont perfuser la zone à risque selon la vascularisation native. Cette circulation collatérale est rendue possible grâce à des connexions artériolaires qui sont essentiellement épiscardiques. Ce débit collatéral est également un facteur capable d'influencer la taille de l'infarctus du myocarde. Le débit collatéral résiduel est inversement proportionnel à la taille de l'infarctus ¹¹⁹, c'est-à-dire que plus la circulation collatérale est faible, plus l'évolution vers la nécrose est rapide. Ce débit varie selon les espèces (il est par exemple beaucoup plus développé chez le chien que chez le lapin), mais il existe également une importante variabilité individuelle.

II-2. Reperfusion

En 1983, Jennings et Reimer ¹¹⁹ ont démontré que la reperfusion était essentielle afin de protéger le myocarde ischémique. La reperfusion coronaire est reconnue comme étant la seule méthode permettant de réduire la taille de l'infarctus, à condition d'être entreprise suffisamment tôt, de façon indiscutable aussi bien en expérimental qu'en clinique. Du fait de la dynamique d'apparition de nécrose, qui suit une courbe sigmoïde (Figure 7), il existe une période de temps critique pour sauver le myocarde ischémique. Après cette constatation, l'utilisation de thérapies thrombolytiques devint une routine.

Bien qu'il ne fasse aucun doute que la reperfusion précoce soit le seul moyen de sauver un myocarde ischémique, de nombreux travaux ont soulevé la question d'un possible effet néfaste de cette reperfusion. La reperfusion s'accompagne d'une accélération du processus

nécrotique commencé lors de l'ischémie préalable^{119, 124}. Elle apparaît ainsi comme une « épée à double tranchant ». Il a été démontré que la réoxygénation du myocarde s'accompagne d'une libération massive d'enzymes cardiaques et de dommages cellulaires beaucoup plus importants que si l'ischémie avait été maintenue¹²⁵. Il existe quatre formes de lésions de reperfusion : les arythmies de reperfusion, la sidération myocardique (*myocardial stunning*), les dommages vasculaires (*no-reflow*) et la nécrose de reperfusion. Leurs mécanismes sont probablement multiples et comportent notamment une aggravation de la surcharge calcique et une surproduction de ROS.

La reperfusion est l'événement principal dans le déclenchement de la cascade moléculaire conduisant à la cardioprotection¹²⁶, renforçant la distinction à faire entre l'ischémie et la reperfusion.

II-3. Conséquences de l'ischémie-reperfusion cardiaque

Les événements moléculaires et cellulaires à la base des lésions d'I/R sont complexes. Néanmoins, de nombreux mécanismes physiopathologiques impliqués dans les lésions d'I/R ont émergé (Tableau 1).

Tableau 1. Mécanismes physiopathologiques des lésions d'ischémie-reperfusion du myocarde.
D'après Turer et al.¹²⁷.

-
- Accumulation ionique
 - Δ Surcharge calcique intracellulaire
 - Δ Augmentation du sodium intracellulaire
 - Δ Baisse du pH avec une normalisation rapide au moment de la reperfusion
 - Chute du potentiel membranaire mitochondrial
 - Δ mPTP
 - Formation de radicaux libres / ROS
 - Δ Production par la xanthine oxydase
 - Δ Relargage d'intermédiaires mitochondriaux réactifs
 - Δ Infiltration de neutrophiles
 - Δ Production de ROS ROS-dépendante (rétrocontrôle positif)
 - Métabolisme du NO
 - Δ Perte de la vasodilatation NO-dépendante
 - Δ Accumulation de peroxinitrite
 - Apoptose et autophagie
 - Dysfonction endothéliale
 - Δ Signalisation des chémokines et cytokines
 - Δ Expression des marqueurs d'adhésion cellulaire
 - Δ Altération de la vasodilatation
 - Agrégation plaquettaire et microembolisation
 - Activation immune
 - Δ Immunité innée (activation complémentaire, expression récepteurs Toll-like...)
 - Δ Accumulation de neutrophiles
 - Δ Dommages médiés par les macrophages et les lymphocytes T
-

II-3-1. Métabolisme énergétique

II-3-1-1. Normoxie

Le cœur est l'un des organes les plus oxydatifs chez les mammifères, utilisant environ 10 % de la consommation totale d'oxygène de l'organisme ¹²⁸. Son activité contractile permanente nécessite un apport continu d'énergie, dont la quasi-totalité provient du métabolisme oxydatif. Ses réserves énergétiques ne lui permettant que quelques secondes d'autonomie, il est obligé de fonctionner en flux tendu. Ainsi, le cœur est dépendant de l'oxygène car la phosphorylation oxydative est le seul mécanisme permettant un flux d'ATP suffisant.

Le myocarde a un besoin essentiel en substrats oxydatifs, quelles que soient les conditions nutritionnelles. Ainsi, il est capable d'utiliser tous les substrats exogènes (lipides, glucose, lactate...) ou endogènes (glycogène, acides aminés, corps cétoniques). En condition de normoxie, l'énergie provient majoritairement de la β -oxydation des acides gras (60 %), mais également du glucose (30 %) et du lactate (10 %).

L'ATP doit être régulée de manière extrêmement fine car elle contrôle autant les mécanismes cellulaires vitaux (cascades de signalisation, synthèses protéiques...) que les activités spécifiques (telle la contraction). Cette régulation fine est particulièrement importante lorsque la synthèse d'ATP est limitée, à cause d'un apport faible en oxygène et en substrats (ischémie, hypoxie...). La mitochondrie est l'organite qui joue un rôle central dans la régulation de ces flux énergétiques intracellulaires.

II-3-1-2. Ischémie modérée

L'ischémie partielle diminue l'oxydation des acides gras et augmente la glycolyse anaérobie par multiplication du nombre de transporteurs de glucose, notamment GLUT-1 ¹²⁹. Cependant, la β -oxydation reste encore la principale source énergétique du cardiomyocyte. Au cours de cette ischémie modérée, le myocarde « hiberne », autopréservant ainsi la viabilité de ses cellules qui s'adaptent en réduisant leur activité mécanique et leur besoin énergétique. Cette situation est néanmoins précaire car le cœur est incapable de faire face à une augmentation d'activité.

II-3-1-3. Ischémie sévère

Le débit coronaire chute lorsque l'ischémie est sévère, ce qui réduit l'apport de glucose aux cellules. Ainsi, l'oxydation du glucose cesse pratiquement, tout comme la β -oxydation (par manque d'O₂). Le glycogène intracellulaire devient alors la source principale de production d'ATP, même si le rendement est faible (2 ATP par molécule de glucose). Dans ces conditions, l'oxydation du pyruvate cesse, ce qui aboutit à l'accumulation de protons (découplage entre la glycolyse anaérobie et l'oxydation du pyruvate) ¹³⁰, et la production de lactate augmente. Le flux coronaire étant réduit, ces protons et ce lactate s'accumulent dans les cardiomyocytes, ce qui se traduit par une acidification intracellulaire. Une partie de l'ATP est alors utilisée afin de rétablir l'homéostasie, entre autre, des ions H⁺, ce qui peut conduire à

une diminution marquée de l'efficacité cardiaque ¹³¹. Si cette situation perdure, elle peut aboutir à la nécrose cellulaire.

II-3-1-4. Reperfusion

Pendant cette période, le cœur est exposé à une augmentation de concentration d'acides gras circulants. La β -oxydation devient alors la source prédominante de production d'ATP, apportant 80 à 90 % des besoins énergétiques myocardiques ¹³². Cependant, la production d'ATP par la β -oxydation est plus coûteuse en O_2 que l'oxydation du glucose. Ainsi, l'utilisation préférentielle des acides gras, couplée à la baisse de l'oxydation du glucose, contribue à la dysfonction contractile. Expérimentalement, il a été montré qu'une stimulation de l'oxydation du glucose pouvait entraîner une amélioration de la fonction cardiaque ¹³².

II-3-2. Altérations ioniques cellulaires

L'ischémie et la reperfusion entraînent des perturbations ioniques cellulaires marquées. L'ischémie induit une accumulation intracellulaire de Na^+ , H^+ et Ca^{2+} , aboutissant à une acidose tissulaire. L'organisme va alors s'employer à rétablir l'équilibre du pH intracellulaire au plus vite. Parmi les mécanismes de régulation du pH, l'antiport Na^+/H^+ représente une voie majeure pour la sortie d'ions H^+ des cellules lors d'une acidification ¹³³. Ainsi, cet échangeur va être particulièrement actif au moment de la reperfusion. Cependant, les conséquences de cette activation sont plus complexes que le seul rétablissement du pH, car elle est également associée à un flux entrant de Na^+ , de même que l'activation du symport Na^+/HCO_3^- , autre mécanisme alcalinisant ¹³⁴. Cette accumulation intracellulaire de sodium va conduire, en retour, à une augmentation du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique via l'échangeur Na^+/Ca^{2+} ¹³⁵. L'augmentation de l'entrée de Ca^{2+} par les canaux calciques sarcolemmaux de type L ¹³⁶ et la déficience de l'import de Ca^{2+} cytosolique dans le réticulum sarcoplasmique ¹³⁷ favorisent la surcharge calcique. Ces altérations ioniques conduisent à une hyper contractilité myofibrillaire, une déplétion d'ATP, des dommages ultra structuraux de la mitochondrie et à la sidération myocardique ¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Ainsi, la reperfusion modifie très rapidement les flux ioniques, mais une normalisation rapide du pH augmente paradoxalement la cytotoxicité ¹⁴¹⁻¹⁴².

II-3-3. Chute du potentiel membranaire mitochondrial

La membrane mitochondriale interne, qui est responsable du maintien du potentiel transmembranaire, est normalement imperméable aux ions et aux protéines. Lorsque le cardiomyocyte est soumis à une séquence d'I/R, le mPTP va s'ouvrir, créant ainsi un canal non sélectif entre la membrane mitochondriale interne et le sarcoplasme. Il en résulte une chute du gradient électrochimique, le relargage de ROS et l'apoptose.

II-3-4. Formation de ROS

Lors de la reperfusion, le retour massif d'oxygène couplé à la baisse d'ADP favorise la production de ROS par augmentation de la fuite d'électrons. De plus, la xanthine oxydase va

également augmenter la production de ces ROS dans le cœur reperfusé. En effet, le retour d'oxygène lors de la reperfusion va permettre à cette enzyme de catalyser l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine, ses deux substrats qui s'étaient accumulés durant l'ischémie¹⁴³, produisant ainsi de l'H₂O₂. Ces ROS vont non seulement endommager les cellules par réactions avec les lipides, protéines et acides nucléiques, mais aussi favoriser l'ouverture du mPTP⁹². La production mitochondriale de ROS va alors augmenter par un mécanisme de rétrocontrôle positif (ou production de ROS ROS-dépendante)¹⁴⁴.

II-3-5. Métabolisme du NO

L'endothélium est également impliqué dans les lésions d'I/R. C'est la source principale de formation du NO. En conditions normales, la production de NO entraîne une vasodilatation qui a des effets bénéfiques lors de l'I/R, tels que la modulation de la consommation d'oxygène¹⁴⁵, de l'agrégation plaquettaire¹⁴⁶, et de la défense anti-radicalaire¹⁴⁷. Paradoxalement, une concentration élevée de NO favorise la formation d'espèces fortement radicalaires, telle que le peroxynitrite¹⁴⁸.

II-3-6. Dysfonction endothéliale

L'endothélium est également impliqué dans d'autres rôles pathophysiologiques lors de l'I/R. Il permet notamment la production de substances vasoactives et active le système immunitaire à travers l'expression de cytokines, de chémokines et de molécules d'adhésion cellulaire (telles que l'E-sélectine, la molécule-1 d'adhésion intercellulaire et la molécule-1 d'adhésion de cellule vasculaire).

II-3-7. Apoptose et autophagie

Au moment de la reperfusion, toutes les conditions favorisant l'ouverture du mPTP sont réunies (normalisation rapide du pH, production de ROS, surcharge calcique...), favorisant ainsi l'apoptose. Des travaux récents ont également impliqué l'autophagie dans la pathogénèse de l'I/R¹⁴⁹⁻¹⁵⁰. A l'heure actuelle, les données concernant cette implication sont encore peu nombreuses, il est donc nécessaire d'attendre pour savoir si ce mécanisme est une cible thérapeutique potentielle des lésions d'I/R.

II-3-8. Activation immune

Les molécules d'adhésion cellulaire induites par la lésion de l'endothélium favorisent l'invasion tissulaire de cellules inflammatoires. Ces cellules, en particulier les neutrophiles, sont directement toxiques pour le myocarde en sécrétant des protéases, en produisant des ROS et en occluant la microvascularisation. D'autres composants du système immunitaire inné, comme les récepteurs Toll-like¹⁵¹, semblent également participer à la pathogénèse des lésions d'I/R. De plus, il semble que les cellules médiant l'immunité, les macrophages et les lymphocytes T, soient impliquées dans la pathogénèse des lésions myocardiques après reperfusion¹⁵²⁻¹⁵³.

III. Cardioprotection

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès en France. Les pathologies ischémiques représentent 27 % de ces décès. L'incidence de l'infarctus du myocarde reste encore élevée avec 120 000 cas par an en France. Selon l'OMS, ces cardiopathies sont également devenues la première cause de mortalité dans certains pays en voie de développement. Les facteurs de risque de cette maladie sont multiples, parmi lesquels certains sont incontrôlables tels l'âge, le sexe et les antécédents familiaux. A l'inverse, on peut agir en prévention de ces pathologies sur de nombreux facteurs de risque comme le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, la sédentarité, l'obésité et le diabète. La mortalité de l'infarctus a diminuée de 30 % en 10 ans aux Etats Unis et en Europe de l'Ouest. Ce pronostic a été amélioré grâce à un ensemble de progrès : prise en charge précoce ayant permis la correction immédiate des troubles du rythme, extension de la thrombolyse hospitalière puis pré hospitalière, angioplastie de désobstruction coronaire, meilleure prévision des sujets à risque... Cependant, le vieillissement de la population et la persistance des facteurs de risque de la coronaropathie font que cette maladie est un enjeu de santé publique ¹⁵⁴⁻¹⁵⁵. L'amélioration de morbi-mortalité post-infarctus reste toutefois conditionnée par une réduction maximale et incompressible des délais de prise en charge des malades afin d'assurer une préservation optimale du myocarde contre sa nécrose. De nombreuses interventions expérimentales ont été proposées afin de protéger le myocarde ischémique, mais les résultats des essais cliniques sont malheureusement décevants ¹⁵⁶. La découverte d'une technique permettant d'augmenter la résistance du myocarde à l'ischémie, dénommée préconditionnement (PreC), par Murry et al. ¹⁵⁷ a permis une grande avancée dans le domaine de la cardioprotection. Moins de 20 ans après, Zhao et al. ¹⁵⁸ ont eu la brillante idée de translater cette technique, inapplicable en clinique dans la plupart des cas, au moment de la reperfusion. Ainsi, le corollaire du PreC a été dénommé postconditionnement (PostC), en rapport avec le timing de son application. Les premiers essais cliniques de cette stratégie thérapeutique semblent prometteurs ¹⁵⁹⁻¹⁶².

III-1. Préconditionnement

III-1-1. Préconditionnement ischémique

III-1-1-1. Historique

En 1986, l'équipe de Murry et Reimer a présenté deux articles qui allaient être déterminants dans la lutte contre les lésions d'I/R myocardiques. Dans une première étude, ces auteurs ont démontré que l'application de plusieurs occlusions coronaires brèves de 10 minutes, espacées de périodes de reperfusion de 20 minutes, n'entraînaient pas de nécrose et n'avaient pas d'effet cumulatif en terme de perte d'ATP sur le myocarde de chien ¹⁶³. Par la suite, ces auteurs ont montré de façon surprenante que l'administration de 4 séquences de 5 minutes d'occlusion coronaire, séparées de périodes de reperfusion de 5 minutes, réduisaient considérablement les lésions myocardiques induites par une ischémie coronaire prolongée de

40 minutes¹⁵⁷. La zone infarctée du myocarde était réduite par un facteur 4 grâce à ce protocole, et ce sans modification de la perfusion coronaire collatérale. Tout aussi étonnant, ils démontraient que cette protection n'était pas conservée si la durée de l'ischémie prolongée passait à 3 heures. Ces auteurs démontraient ainsi que le préconditionnement ischémique (PreC Isch, nom donné à ce phénomène) n'empêchait pas la mort cellulaire mais qu'il en retardait la survenue.

Ces premiers travaux ont donné naissance à une littérature extrêmement abondante et complexe¹⁶⁴⁻¹⁶⁵. L'engouement suscité par ce PreC tient principalement à trois facteurs : la pathologie coronaire qui est un réel problème de santé publique, la puissance de cette protection et le fait que ce phénomène se retrouve chez l'Homme. Ce traitement demeure à ce jour le plus puissant mécanisme capable de diminuer la taille de l'infarctus, à l'exclusion de la reperfusion en elle-même.

III-1-1-2. Design du PreC Isch

Le PreC Isch consiste en l'application de brèves séquences d'ischémie-reperfusion avant une occlusion coronaire prolongée suivie d'une reperfusion (Figure 10).

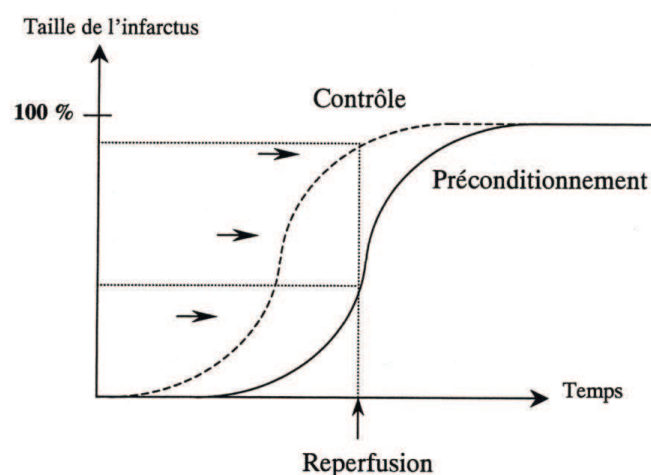
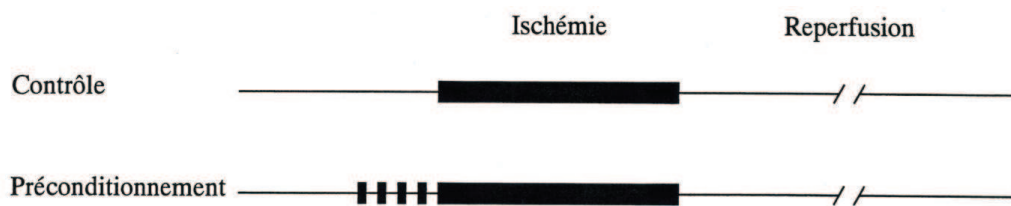


Figure 10. Le préconditionnement ischémique. Le préconditionnement ischémique consiste en l'application de brèves séquences d'ischémie-reperfusion avant une occlusion coronaire prolongée suivie d'une reperfusion (schéma du haut). Il retarde la survenue de l'infarctus en décalant vers la droite la courbe de la cinétique d'apparition de la nécrose (schéma du bas).

Ce phénomène de mémorisation cellulaire a été retrouvé dans toutes les espèces animales, y compris chez l'Homme, mettant ainsi en évidence que ce mécanisme est conservé au sein de l'évolution^{157, 166-170}. Le même type de protection a été décrit dans des organes autres que le myocarde, tels que le cerveau¹⁷¹, le foie¹⁷² et le rein¹⁷³.

Dans la première description de ce phénomène, la protection consistait en l'application de 4 séquences de 5 minutes d'ischémie suivie de 5 minutes de reperfusion avant une ischémie prolongée de 40 minutes. Cependant, il n'existe pas un modèle unique d'algorithme. Certaines équipes ont par exemple utilisé une seule séquence d'I/R pour induire une protection^{31, 174}, alors que d'autres en utilisent plusieurs^{157, 175}. Cette différence pourrait s'expliquer par l'espèce animale étudiée. Néanmoins, cette hétérogénéité des protocoles est également retrouvée au sein des mêmes espèces^{34,121}. Il semblerait tout de même que les séquences d'I/R doivent être de l'ordre de plusieurs minutes, pour que les cellules aient un seuil de souffrance « suffisant » afin de la mémoriser.

Le délai qui sépare le signal inducteur de la protection de l'ischémie prolongée est un paramètre fondamental pour le PreC. Ce temps de mémorisation a ainsi permis d'établir deux fenêtres de protection qui définissent le PreC classique (ou précoce) durant 1 à 2 heures et le PreC tardif qui survient après une période réfractaire d'environ 24 heures et qui persiste jusqu'à 72 heures¹⁷⁶ (Figure 11). Cela signifie que si l'on réalise l'occlusion coronaire prolongée entre ces deux phases, le PreC sera inefficace. Par contre, si on attend 24 heures pour la réaliser, on verra réapparaître un effet protecteur du PreC sur la réduction de la taille d'infarctus.

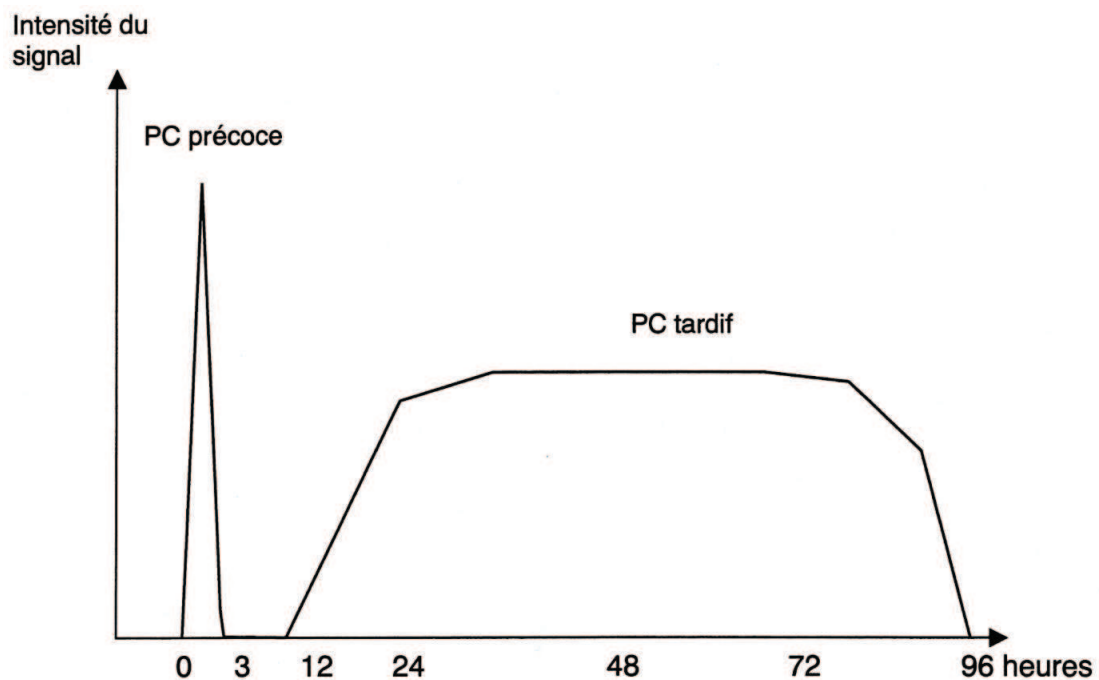


Figure 11. Préconditionnement précoce et tardif. 2 phases de PreC ont été décrites : une phase précoce qui dure de 1 à 2 heures, et une phase tardive qui dure entre 24 et 72 heures. La phase définit le temps entre le PreC et l'ischémie longue.

III-1-1-3. Mécanisme d'action du PreC Isch

Les voies mécanistiques étant à la base de cette cardioprotection endogène sont complexes et incomplètement élucidées à ce jour (Figure 12). Par convention, il est admis que la cascade de réactions aboutissant à cette protection comprend des facteurs inducteurs, des médiateurs et des effecteurs. L'identification des voies de signalisation du PreC Isch a facilité l'utilisation d'agents pharmacologiques mimant la cardioprotection apportée par ce PreC Isch (on parle alors de PreC pharmacologique). Ces agents permettent ainsi de protéger le myocarde en s'affranchissant de l'utilisation d'un protocole invasif.

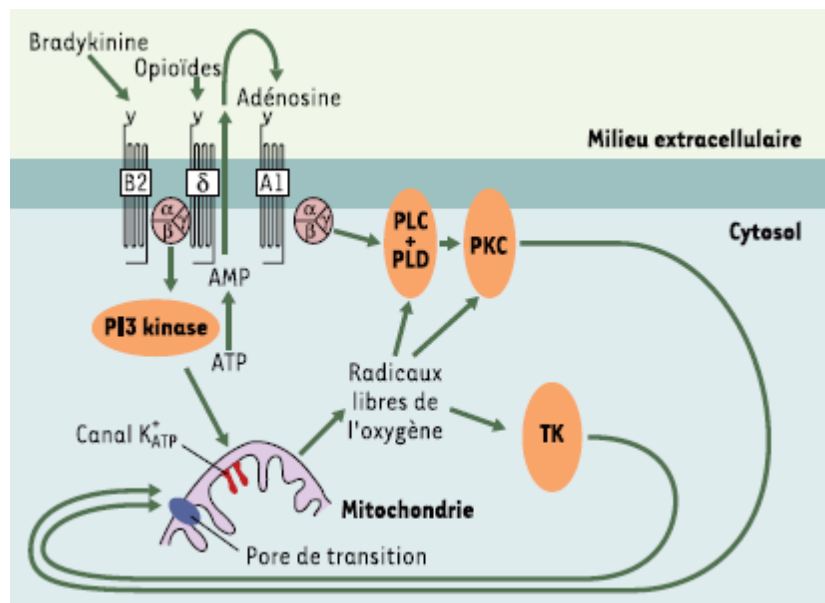


Figure 12. Schéma simplifié des voies de signalisation impliquées dans le PreC. La transmission du signal protecteur au sein du myocarde préconditionné implique en particulier les récepteurs (B_2 , δ et A_1) de substances cardioactives (bradykinine, opioïdes, adénosine) situés sur le sarcolemme, différentes kinases – protéine kinase C (PKC), PI3K, tyrosine kinase (TK) – et la production de ROS. Les canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}) mitochondriaux et le mPTP semblent être des médiateurs importants de ce phénomène. PLC, PLD : phospholipases C et D. D'après Argaud et al. ¹⁷⁷.

a. Inducteurs

- Inducteurs endogènes récepteurs-dépendants
 - Adénosine

Le récepteur à l'adénosine a été le premier élément identifié de la voie de signalisation du PreC Isch ¹⁷⁸. Il a été montré qu'une augmentation de la concentration interstitielle d'adénosine apparaissait durant l'ischémie du PreC ¹⁷⁹. Ainsi, le blocage des récepteurs A_1 et A_3 , mais pas A_2 , inhibe presque totalement la cardioprotection apportée par le PreC Isch ¹⁷⁸,

¹⁸⁰⁻¹⁸¹. Réciproquement, l'augmentation de la concentration d'adénosine favorise la cardioprotection apportée par le PreC Isch ¹⁸².

- Bradykinine

La bradykinine contribue également à réduire la taille de l'infarctus par le PreC Isch ¹⁸³. L'augmentation de la concentration interstitielle de bradykinine précède celle de l'adénosine ¹⁸⁴. La bradykinine serait impliquée dans le PreC peu intense, c'est-à-dire lorsque la durée de l'ischémie du PreC est courte ¹⁸⁴ ou qu'il n'y a qu'un seul cycle d'I/R ¹⁸³, alors que pour un PreC plus intense, c'est-à-dire lorsque la durée de l'ischémie du PreC est plus longue ¹⁸⁴ ou qu'il y a plusieurs cycles d'I/R ¹⁸³, l'adénosine joue un rôle plus important. Cependant, Goto et al. ¹⁸³ ont proposé que ces deux inducteurs agiraient en synergie. Ainsi, cette hypothèse expliquerait pourquoi la cardioprotection apportée par le PreC n'est complètement abolie que lorsque le récepteur B₂ de la bradykinine est bloqué et que le taux d'adénosine endogène s'effondre ¹⁸⁴.

- Opioïdes

Le blocage des récepteurs opioïdes abolit la réduction de la taille de l'infarctus engendrée par le PreC Isch ¹⁸⁵. Il a été démontré que c'est le récepteur δ qui est responsable de cette cardioprotection ¹⁸⁶. Cependant, le récepteur κ pourrait également être impliqué, bien que son rôle soit controversé ¹⁸⁷⁻¹⁸⁸. En effet, certains auteurs ont montré que le blocage de ce récepteur abolit la cardioprotection ¹⁸⁷, alors que d'autres ont montré que son activation augmente la taille de l'infarctus ¹⁹⁰. Les opioïdes et l'adénosine semblent interagir dans la signalisation du PreC Isch ¹⁸⁵⁻¹⁸⁶. Récemment, Yao et al. ¹⁸⁹ ont montré que les récepteurs de l'adénosine sont impliqués dans la signalisation du PreC cardiaque à distance par la morphine. Les récepteurs centraux seraient importants dans l'initiation du processus, alors que les récepteurs périphériques auraient un rôle dans la médiation de cet effet protecteur.

- Endothéline, angiotensine

L'administration exogène d'agonistes neurohumoraux peut préconditionner le cœur, mais ils ne sont pas libérés en quantité suffisante par le myocarde ischémique pour déclencher la protection de manière endogène. Le prétraitement à l'endothéline-1 mime le PreC Isch, permettant ainsi de réduire la taille d'infarctus ¹⁹⁰⁻¹⁹¹. Cependant, l'administration d'un antagoniste des récepteurs à l'endothéline n'inhibe pas cette cardioprotection, indiquant que l'endothéline n'est pas un médiateur physiologique important du PreC Isch ¹⁹⁰. De même, le prétraitement à l'angiotensine II réduit la taille de l'infarctus ¹⁹²⁻¹⁹³, mais l'inhibition de son récepteur AT2 n'abolit pas cette cardioprotection ¹⁹².

• Inducteurs endogènes récepteurs-indépendants

- Radicaux libres

Les radicaux libres, qui endommagent les cardiomyocytes lors des lésions d'I/R, sont également impliqués dans l'induction du PreC Isch ¹⁹⁴. Ainsi, il a été montré que l'administration d'antioxydant ¹⁹⁴ ou de piègeur de ROS ¹⁹⁵ bloquait la cardioprotection

apportée par le PreC Isch. Le mécanisme d'action par lequel les ROS protègent le myocarde n'est pas bien clair, mais il semble qu'ils puissent activer les protéines G¹⁹⁶, les protéines kinases¹⁹⁵, et les canaux K_{ATP}¹⁹⁷.

- Monoxyde d'azote (NO)

Le rôle du NO endogène dans le PreC Isch n'est pas clair. Il a été montré que le NO n'est pas un inducteur ou un médiateur du PreC Isch chez le lapin¹⁹⁸ ou le cochon¹⁹⁹. Cependant, le blocage de sa synthèse atténue le rétablissement fonctionnel engendré par le PreC Isch chez le rat²⁰⁰. De plus, il a été proposé que le NO produit dans le tissu ischémique pouvait agir aussi bien en tant qu'inducteur que médiateur du PreC tardif¹⁶⁴.

- Calcium

Les résultats de différentes études laissent à penser que le calcium est un inducteur du PreC Isch. Miyawaki et al.²⁰¹ ont démontré que le blocage des canaux calciques, par le verapamil, inhibait le PreC Isch. De plus, l'administration intracoronaire de Ca²⁺ induit une cardioprotection, alors que le PreC Isch peut être inhibé par un bloqueur de l'échangeur Na⁺/Ca²⁺²⁰². Cependant, la nisoldipine, un antagoniste calcique, n'atténue pas le PreC Isch chez le cochon, remettant ainsi en question le rôle inducteur du calcium endogène dans la signalisation du PostC Isch²⁰³.

• Inducteurs exogènes

Tous les inducteurs décrits précédemment peuvent préconditionner le cœur lorsqu'ils sont administrés de façon exogène. Ceci est vrai pour les substances endogènes qui agissent par activation de leurs récepteurs (adénosine, bradykinine, opioïdes), pour les donneurs de NO^{198, 204}, pour l'activation des récepteurs de l'endothéline¹⁹⁰ et de l'angiotensine¹⁹²...

• Protéines G et phospholipases

Tous les récepteurs couplés aux protéines G inhibitrices (G_i) peuvent induire un PreC. Ainsi, le traitement chronique par une toxine bloquant les G_i abolit la cardioprotection apportée par le PreC Isch²⁰⁵. Il a été montré que l'adénosine²⁰⁵ et les récepteurs aux opioïdes²⁰⁶ sont couplés à ces protéines. La stimulation des G_i a plusieurs effets : elle provoque l'inhibition de l'influx calcique entrant durant l'ischémie, l'activation directe des canaux K_{ATP}, et l'activation des phospholipases C et D (PLC et PLD). La PLC hydrolyse la liaison ester entre le glycérol et le phosphate, tandis que la PLD lyse la fonction ester entre la fonction acide du phosphate et l'alcool. L'activation de la PLC catalyse l'hydrolyse des phospholipides membranaires contenant de l'inositol en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP₃). La PLD dégrade les autres phospholipides membranaires, notamment la phosphatidylcholine, ce qui aboutit également à la formation de DAG²⁰⁷. L'activité de la PLD est augmentée lors d'un PreC Isch. A l'inverse, son inhibition atténue cette cardioprotection²⁰⁸.

b. Médiateurs

- Protéine kinase C (PKC)

Le DAG stimule la translocation et l'activation des différentes isoformes de la protéine kinase C (PKC). Les phospholipases sont donc des composants essentiels de l'activation des PKC. En effet, le DAG se lie à la sous-unité régulatrice de la PKC, ce qui résulte en un changement de conformation de cette PKC qui va alors se lier à son récepteur, dénommé RACK (récepteur de la kinase C activée). Cette liaison complète l'activation de la PKC qui va alors pouvoir phosphoryler ses substrats. Le peptide ϵ V1-2, un antagoniste de RACK 2²⁰⁹ bloque la capacité du PreC à protéger les cardiomyocytes de rat²¹⁰ et de lapin²¹¹, suggérant que c'est la PKC ϵ qui est l'isoforme impliquée dans le PreC²¹². Ping et al.²¹³ ont suggéré que c'est la translocation des isoformes ϵ et η qui est responsable de la cardioprotection apportée par le PreC Isch. Il a également été montré, chez le rat, que ce sont les isoformes α , δ et ϵ qui sont impliquées dans le PreC²¹⁴. Chez le chien, seule la PKC α est transloquée en réponse à un PreC Isch²¹⁵.

Bien que l'implication des différentes isoformes ne soit pas complètement clarifiée, il apparaît toutefois que la PKC joue un rôle important dans le PreC Isch. Ainsi, l'inhibition de cette protéine abolit la cardioprotection du PreC²¹⁶. L'activation de la PKC aboutit in fine à l'activation des canaux K_{ATP} ¹⁶⁷.

- Tyrosine kinases (TK)

La protection conférée par le PreC Isch peut être abolie par l'administration d'un inhibiteur de la tyrosine kinase (TK), la génistéine²¹⁷. Baines et al.²¹⁸ ont montré que la TK agissait en aval de la PKC. Cependant, d'autres études ont suggéré qu'elle agirait en parallèle de la PKC²¹⁹⁻²²⁰. Lorsque le stimulus du PreC est modéré, tel qu'une occlusion unique, la protection peut être inhibée par l'administration d'un bloqueur de la PKC ou de la TK. Ceci laisse penser que ces deux voies doivent être activées pour atteindre le seuil de la protection. Lorsque le stimulus utilisé est plus puissant, il faut bloquer les deux voies pour abolir la protection. Ces résultats suggèrent que ces voies peuvent induire une cardioprotection à elles seules si elles sont suffisamment stimulées²²¹.

- Mitogen-activated protein kinases (MAPK)

Les cibles potentielles de la PKC et de la TK sont les MAPK (mitogen-activated protein kinases). Les MAPK sont divisées en sous-familles, ERK, JNK et p38, qui semblent chacune jouer un rôle dans la cardioprotection apportée par le PreC Isch²²²⁻²²³. Les MAPK sont activées par les MAPK kinases. La MAPK p38 est bloquée par la génistéine²²⁴. Ainsi, la MAPK kinase a été proposée comme étant la TK responsable de la signalisation du PreC²²⁵.

Le PreC Isch augmente l'activité d'ERK1 dans le myocarde de lapin²²⁶, alors qu'aucune différence de phosphorylation d'ERK1 et d'ERK2 n'est retrouvée chez le cochon²²⁷. Le rôle de l'activation d'ERK dans la cardioprotection apportée par le PreC Isch est controversé. En

effet, alors que l'inhibition d'ERK n'empêche pas cette cardioprotection chez le lapin ²²⁶, elle l'abolit chez le cochon ²²⁸.

JNK46 et JNK54 sont présents dans le cœur ²²⁹ et sont activés durant la reperfusion qui suit une ischémie. L'activation de JNK et p38 MAPK réduit la taille d'infarctus chez le lapin ²³⁰ et le cochon ²³¹. Chez le rat, la cardioprotection apportée par le PreC Isch est inhibée lorsque JNK46 est bloqué ²³².

Seules les isoformes p38 α et p38 β des p38 MAPK sont exprimées dans le cœur ²³³. Après un PreC Isch, la phosphorylation de la p38 durant l'ischémie longue est augmentée dans certains modèles ^{224-225, 234}, alors qu'elle peut être inaltérée ²²⁷ ou diminuée dans d'autres ²³⁵⁻²³⁶. De ce fait, l'importance de l'activation de la p38 dans la cardioprotection reste controversée. L'inhibition de l'activation ischémique de la p38 augmente la résistance des cardiomyocytes à une ischémie létale ²³³. De même, le blocage de la p38 n'affecte pas la réduction de taille d'infarctus apportée par le PreC Isch ²³⁷⁻²³⁸. A l'inverse, ce blocage abolit cette cardioprotection dans d'autres études ^{236, 239}. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par la balance relative entre les différentes isoformes de p38 selon les espèces et les modèles utilisés, de même que par la sélectivité des différents inhibiteurs utilisés. En effet, le SB 203580 n'inhibe pas seulement la p38 MAPK ²⁴⁰, mais également la JNK de façon dose-dépendante ²⁴¹ ou des TK ²⁴².

- Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)

La PI3K est une autre protéine kinase impliquée dans la cardioprotection. Son activation permet la phosphorylation d'Akt, une autre kinase. Cette voie PI3K/Akt est essentielle dans les mécanismes de survie cellulaire. Des travaux récents ont impliqué la PI3K dans la cascade de signalisation du PreC Isch. Tong et al. ²⁴³ ont été les premiers à montrer que l'inhibition de la PI3K, par la wortmannine, bloquait l'effet protecteur du PreC. Ces résultats ont été confirmés par Mocanu et al. ²⁴⁴ sur un modèle d'infarctus chez le rat. La voie PI3K/Akt peut agir à plusieurs niveaux. Elle active la PKC, stimule l'eNOS et inhibe la caspase 9 et les protéines pro-apoptotiques BIM, BAX et BAD. Le mode d'action de la voie PI3K/Akt est semblable à celui de MEK/ERK, regroupant ainsi ces kinases sous le terme de la voie RISK (reperfusion injury salvage kinase) ²⁴⁵.

c. Effecteurs

La dernière étape de la transduction du signal n'est pas encore clairement identifiée. Ce sont principalement les canaux K_{ATP} et le mPTP qui sont envisagés comme étant les effecteurs de cette cardioprotection.

- Canaux K_{ATP}

Les canaux K_{ATP} ont été découverts par Noma et al. ²⁴⁶ au niveau des cardiomyocytes. Ces canaux potassiques sont appelés ATP dépendants car ils sont normalement inhibés par des concentrations physiologiques d'ATP. Leur ouverture provoque l'entrée de K^+ dans la mitochondrie selon leur gradient électrochimique favorable. Gross et al. ²⁴⁷ ont été les premiers à proposer que l'ouverture de ces canaux K_{ATP} était impliquée dans le PreC. Ceci a

été confirmé par la suite puisque les ouvreurs de ces canaux miment le PreC²⁴⁸, alors que leurs bloqueurs abolissent la protection apportée par le PreC Isch^{247,249}. De plus, le glibenclamide, un bloqueur de ces canaux, abolit également la protection apportée par la stimulation des récepteurs A₁ de l'adénosine, suggérant que l'activation des récepteurs à l'adénosine joue un rôle en amont de celui des canaux K_{ATP}²⁴⁹.

Deux populations distinctes de canaux K_{ATP} existent dans les cardiomyocytes, les sarcolemmaux et les mitochondriaux (mitoK_{ATP}). Initialement, le rôle cardioprotecteur de ces canaux a été attribué aux sarcolemmaux, les mitochondriaux étant alors inconnus. Par la suite, il a été proposé que les mitoK_{ATP} seraient en réalité responsables de cette protection²⁵⁰⁻²⁵¹. Cependant, certains travaux suggèrent toujours un rôle critique du canal sarcolemmal dans ce processus protecteur. Ainsi, Suzuki et al.²⁵² ont montré que le PreC Isch n'avait pas d'effet sur les souris dont les canaux K_{ATP} sarcolemmaux sont invalidés. Malgré tout, la majorité des équipes s'accorde à considérer que les mitoK_{ATP} sont les canaux les plus importants dans cette protection.

Le mode d'action des canaux mitoK_{ATP} est encore hypothétique. Trois principaux concepts tentent d'expliquer leur fonctionnement.

- Hypothèse du gonflement mitochondrial

Dos Santos et al.²⁵³⁻²⁵⁴ ont suggéré que le gonflement mitochondrial consécutif à l'entrée de K⁺ préserverait le bon fonctionnement de la mitochondrie. Lors d'une ischémie, la baisse du potentiel membranaire entraîne une baisse de la pénétration intra-mitochondriale de K⁺ et d'eau (car osmotiquement liée). Ceci entraîne un déficit en eau de la matrice et une augmentation du volume de l'espace intermembranaire. Or, l'architecture de cet espace est primordiale pour le métabolisme énergétique du myocarde. Les canaux mitoK_{ATP} vont alors s'ouvrir pour faire rentrer le K⁺ et l'eau dans la matrice, préservant ainsi la structure de l'espace intermembranaire. En retour, cela va permettre de préserver le bon fonctionnement de la mitochondrie, notamment le transfert d'énergie vers le cytoplasme.

- Hypothèse du calcium

L'ouverture des mitoK_{ATP} entraîne une dépolarisation de la membrane mitochondriale interne, diminuant ainsi la force motrice de captation de Ca²⁺²⁵⁵⁻²⁵⁶. Ceci préviendrait alors la surcharge calcique mitochondriale, inhibant ainsi l'ouverture du mPTP.

- Hypothèse des ROS

Pain et al.²⁵⁷ ont trouvé que la protection induite par le diazoxide était bloquée par un piègeur (scavenger) de ROS. Ces résultats ont été confirmés par Forbes et al.²⁵⁸. L'ouverture des mitoK_{ATP} entraînerait donc une production de ROS capable d'activer en aval les kinases qui modèleraient alors l'effecteur final du PreC. Selon cette hypothèse, les mitoK_{ATP} seraient donc plus des modulateurs que des effecteurs de cette protection.

- mPTP

Il est connu qu'un prétraitement à la CsA est cardioprotecteur. Cependant, il n'était pas établi si cette protection était la conséquence de son effet inhibiteur sur les phosphatases (par exemple la calcineurine) ou sur l'ouverture du pore de transition. Hausenloy et al.²⁵⁹ ont proposé que le PreC Isch puisse agir en inhibant l'ouverture de ce mPTP. Ils ont démontré que les protections apportées par le PreC Isch, le diazoxide et par un agoniste de l'adénosine étaient toutes bloquées par l'ajout d'atractyloside, un ouvreuseur du pore. Le diazoxide inhibe également l'ouverture calcium-dépendante du pore sur des mitochondries isolées. Là encore, ceci laisse supposer que le mPTP est l'effecteur final du PreC. Par la suite, Javadov et al.²⁶⁰ ont montré que le PreC Isch inhibait l'ouverture de ce mPTP. Argaud et al.³¹ ont été les premiers à démontrer que le PreC Isch, comme la CsA, inhibe l'ouverture du mPTP induite par la surcharge calcique et diminue la taille de l'infarctus du myocarde. L'importance de ce pore dans ce processus protecteur est également soutenue par l'apport de la transgénèse. En effet, les souris dont le gène codant la Cyp D est invalidé présentent une protection endogène contre les lésions d'I/R⁶⁰.

A ce jour, l'identité moléculaire de ce pore n'est toujours pas élucidée, mais tout laisse à penser que ce mPTP joue un rôle majeur dans les phénomènes de protection myocardique contre les lésions d'I/R.

III-1-2. Préconditionnement à la CsA

L'effet cardioprotecteur d'un prétraitement à la CsA est connu²⁶¹⁻²⁶². Crompton et al.⁵⁶ ont été les premiers à montrer que la CsA inhibait l'ouverture du mPTP. Il a été trouvé que cet effet était en relation avec l'inhibition de l'activité d'une protéine^{54,60}, identifiée ensuite comme étant la Cyp D⁵⁸. La CsA inhiberait l'ouverture du mPTP en empêchant la liaison physique entre la Cyp D et l'ANT⁶⁴. *In vitro*, il a été montré que la CsA renforce la résistance de la mitochondrie à la surcharge calcique, retardant ainsi l'ouverture de ce pore³¹. La CsA est devenue la molécule de référence dans la cardioprotection, tant par son effet pré/postconditionnant que par son utilisation *in vitro* pour confirmer/infirmier l'implication du mPTP.

III-1-3. Préconditionnement aux halogénés

III-1-3-1. Historique

L'effet protecteur des anesthésiques halogénés sur le myocarde est également connu. Cope et al.²⁶³ ont montré qu'une anesthésie entièrement conduite sous agents halogénés diminuait significativement la taille de l'infarctus du myocarde par rapport à une anesthésie intraveineuse de pentobarbital, kétamine-xylazine ou propofol. Cason et al.²⁶⁴ ont montré qu'un PreC à l'isoflurane permettait de réduire la taille de l'infarctus. Ce PreC consistait en l'administration de cet isoflurane pendant 15 minutes, avant l'ischémie coronaire, interrompue 15 minutes avant la ligature coronaire (wash out). A la même époque, Kersten et al.²⁶⁵ ont également montré qu'un PreC à l'isoflurane était cardioprotecteur.

Tous les agents anesthésiques halogénés ont montré un effet préconditionnant ^{263, 266-267}. Toller et al. ²⁶⁶ ont démontré que le sévoflurane a la particularité d'être plus sensible au wash out que les autres halogénés. En effet, ils ont remarqué qu'un wash out de 30 minutes gommait tout effet protecteur sur un modèle canin. Par la suite, Piriou et al. ²⁶⁸ ont trouvé un résultat similaire chez le lapin.

III-1-3-2. Voies de signalisation du PreC aux halogénés

a. Récepteurs couplés aux protéines G

L'utilisation d'un antagoniste de l'adénosine bloque le PreC induit par l'halotane ou l'isoflurane ^{263, 269}. Ces agents anesthésiques pourraient activer directement les récepteurs A₁ de l'adénosine, couplés aux protéines G_i, ou augmenter leur sensibilité aux concentrations circulantes d'adénosine ²⁷⁰. Par ailleurs, l'injection d'un inhibiteur de la protéine G_i abolit l'effet cardioprotecteur de l'isoflurane ²⁷¹. Enfin, il existe probablement un lien entre les récepteurs aux opioïdes et les agents anesthésiques volatils. En effet, l'administration conjointe d'isoflurane et d'agonistes des opioïdes potentialise l'ouverture des canaux K_{ATP}, améliorant ainsi la protection myoardique ²⁷². De même, le PreC induit par l'isoflurane est abolit par un antagoniste non sélectif des opioïdes ²⁷³.

b. Protéines kinases

Le PreC à l'isoflurane, tout comme le PreC Isch, active et transloque la PKC δ au niveau de la mitochondrie et du sarcolemme ²⁷⁴. Cette activation semble indispensable à l'activation et l'ouverture des canaux K_{ATP} ²⁷⁵. Les familles des TK et des MAPK semblent aussi impliquées dans ce PreC pharmacologique ²⁷⁶⁻²⁷⁷.

c. ROS

Tanaka et al. ²⁷⁸⁻²⁷⁹ ont mis en évidence qu'une production d'anion superoxyde fait suite à l'administration d'isoflurane, et que celle-ci est bloquée par un inhibiteur des mitoK_{ATP}. Ces travaux vont dans le sens de ceux de Pain et al. ²⁵⁷ qui avaient montré que l'ouverture de ces mitoK_{ATP} induisait une production de ROS. De plus, l'administration d'un piègeur de ROS abolit la protection induite par l'isoflurane ²⁸⁰. Une hypothèse est que ces agents halogénés favoriseraient la production de ROS à partir du complexe I de la chaîne respiratoire, déclenchant ainsi la cardioprotection ²⁸¹. Enfin, les ouvreurs des canaux K_{ATP} et le sévoflurane pourraient diminuer la surproduction radicalaire délétère qui intervient lors de la reperfusion ^{105, 282}. Ces ROS ont donc un rôle ambivalent : le PreC anesthésique induit une faible production de ROS, ce qui aboutit à l'atténuation de la surproduction radicalaire survenant lors de la reperfusion.

d. Canaux K_{ATP}

La cardioprotection apportée par le PreC à l'isoflurane est bloquée par un inhibiteur des récepteurs K_{ATP} ²⁶⁵. Dans le même sens, Piriou et al. ²⁸³ montraient que l'administration conjointe d'isoflurane et d'un ouvreur des canaux K_{ATP} améliorerait la récupération

fonctionnelle post-ischémique du myocarde. Depuis, de nombreuses études ont confirmé le rôle joué par ces canaux K_{ATP} dans le PreC induit par les agents anesthésiques halogénés.

Les effets protecteurs de l'isoflurane, du sévoflurane et du desflurane sont inhibés par l'utilisation d'un bloqueur des mito K_{ATP} , mais pas par un bloqueur des canaux K_{ATP} sarcolemmaux^{275, 284}. Il semble donc que ce soit les mito K_{ATP} qui soient impliqués dans le PreC aux halogénés. Cependant, Toller et al.²⁶⁷ ont montré que ces deux types de canaux pouvaient être impliqués dans cette protection. Récemment, il a été montré que ce serait les canaux K_{ATP} ϵ , et non pas les δ , qui seraient responsables de cet effet²⁸⁵.

Les halogénés apparaissent plus comme des agents augmentant la probabilité d'ouverture des canaux K_{ATP} que des ouvreurs directs. Ainsi, il a été montré que l'isoflurane n'ouvrait pas directement les canaux K_{ATP} sarcolemmaux mais favorisait l'action d'autres agents, possiblement via la translocation de la PKC²⁸⁶. De même, Zaugg et al.²⁷⁵ ont montré que l'isoflurane et le sévoflurane sensibilisaient ces canaux à l'action d'un ouvreur spécifique, alors qu'ils n'avaient pas d'activité par eux-mêmes.

e. mPTP

Il a été suggéré que le PreC aux halogénés diminuerait la mort des cardiomyocytes par l'inhibition de l'ouverture du mPTP²⁸⁷. Récemment, Pravdic et al.²⁸⁵ ont montré que le PreC à l'isoflurane retardait l'ouverture de ce pore. Cependant, cet halogéné perd son effet sur des mitochondries préalablement traitées avec un inhibiteur des K_{ATP} . Il semblerait donc que ces agents halogénés inhibent l'ouverture du mPTP, non pas par une action directe, mais plutôt par l'activation préalable des canaux K_{ATP} ϵ .

III-1-4. Préconditionnement à distance

Pryzklenk et al.²⁸⁸ ont montré qu'une ischémie myocardique régionale induisait un effet protecteur sur une partie adjacente du muscle cardiaque. De même, Dickson et al.²⁸⁹, en démontrant que le PreC Isch était transférable d'un myocarde à un autre par le jeu de circulations croisées, ont mis en évidence l'existence d'un phénomène humoral à l'origine de cette protection. La substance responsable de cet effet n'est toujours pas connue. Dans le même ordre d'idée, l'ischémie d'un autre organe situé à distance, tel que le rein, peut induire une cardioprotection²⁹⁰. Cette notion de PreC à distance a été décrite pour de nombreux organes tels que l'intestin, le foie, le cerveau et le muscle squelettique²⁹¹⁻²⁹³.

III-1-5. Autres types de preconditionnement

Bien que le PreC Isch (régional ou global) demeure la référence, il existe d'autres interventions expérimentales capables de protéger le myocarde. Par exemple, l'hypoxie²⁹⁴, l'hyperthermie²⁹⁵ et l'étirement myocardique²⁹⁶ peuvent également être cardioprotecteurs.

III-2. Postconditionnement

III-2-1. Postconditionnement ischémique

III-2-1-1. Historique

La reperfusion contribue au développement de lésions létales survenant après une ischémie prolongée (Figure 13). En 2003, Zhao et al.¹⁵⁸ ont eu l'idée de réaliser de brefs épisodes d'I/R à l'initiation de la reperfusion suivant une ischémie prolongée. De façon très surprenante, cette manœuvre permet de réduire la taille de l'infarctus. Le concept de postconditionnement ischémique (PostC Isch) était né !

Cette première étude a donné naissance à une littérature extrêmement abondante, obtenue tant sur des modèles *in vivo*²⁹⁷⁻²⁹⁸ qu'*in vitro*^{32, 299}. En complément de son effet sur la diminution de la taille de l'infarctus, le PostC permet notamment de réduire l'apoptose des cardiomyocytes³⁰⁰, la dysfonction endothéliale coronaire¹⁵⁸ et les arythmies³⁰¹.

Le PostC présente un intérêt clinique puisqu'il est envisageable d'appliquer un protocole comparable chez les patients présentant un infarctus du myocarde. Ainsi, la démonstration d'un tel effet bénéfique chez l'Homme a été apportée par le travail de Staat et al.¹⁵⁹. Ces auteurs ont montré que le PostC Isch réduisait la taille de l'infarctus du myocarde de 36 %.

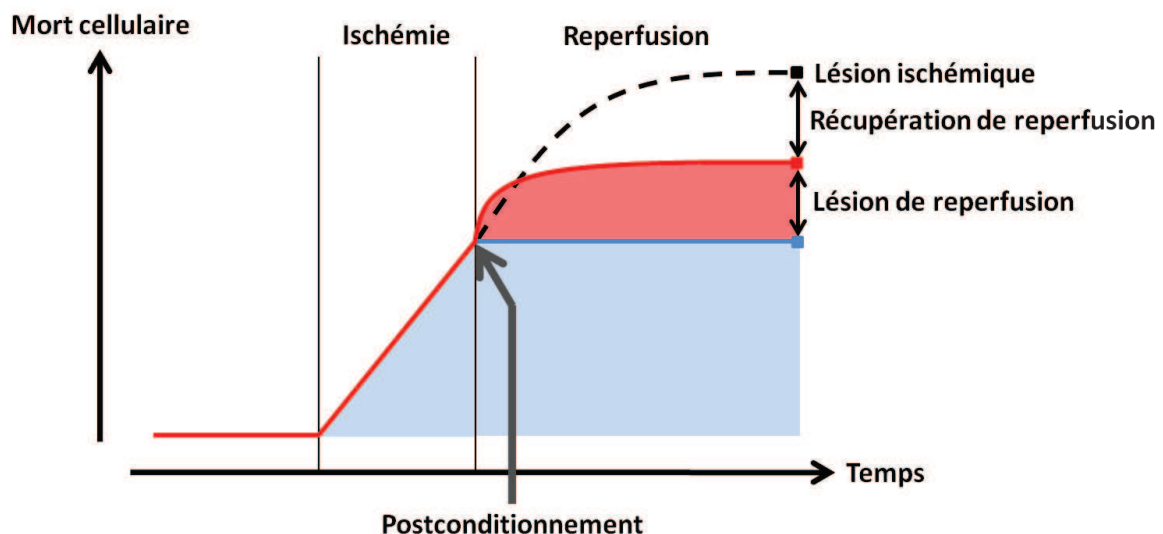


Figure 13. Concept des lésions de reperfusion. Pendant l'ischémie, des dommages cellulaires irréversibles se produisent dans la zone à risque ischémique. Ces dommages menant à la mort cellulaire sont dépendants du temps. En l'absence de reperfusion, ils tuent progressivement de plus en plus de cellules, pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire totale (courbe en pointillés). La reperfusion arrête ce processus de mort cellulaire, mais dans sa phase précoce elle engendre tout de même une mort cellulaire supérieure à celle due à l'ischémie : ce sont les lésions de reperfusion. Cependant, la reperfusion tissulaire soutient moins de mort cellulaire que l'ischémie sans reperfusion. Par conséquent, le traitement de ces lésions de reperfusion peut potentiellement augmenter la survie cellulaire. Le postconditionnement appliqué au début de la reperfusion limite l'extension des dommages de reperfusion et augmente la récupération cellulaire. Adapté de Garcia-Dorado et Piper³⁰².

III-2-1-2. Design du PostC Isch

A la différence du PreC, le PostC ne cible que les événements qui surviennent durant la reperfusion. La fenêtre thérapeutique de cette intervention correspond aux tous premiers instants de la reperfusion³⁰³. En effet, il semble que le PostC Isch perde son efficacité si le délai d'application de la première ré-occlusion dépasse quelques minutes.

Le PostC Isch nécessite des séquences d'I/R beaucoup plus brèves que celles du PreC Isch, afin de ne pas prolonger la souffrance cellulaire. A ce jour, il n'existe pas un protocole type pour réduire la taille de l'infarctus du myocarde. Néanmoins, il semble que la durée des cycles d'I/R doit être proportionnelle à la taille de l'espèce étudiée, c'est-à-dire que les animaux de petite taille nécessitent des cycles courts (généralement 10 s/10 s), alors que les animaux de grande taille nécessitent des cycles plus longs (plutôt 30 s/30 s)³⁰⁴.

La durée de l'ischémie prolongée est également à prendre en compte dans l'optique de la diminution de la taille d'infarctus. Ainsi, plus la durée de l'ischémie est longue et plus la puissance du PostC diminue, probablement parce que l'extension des dommages est trop sévère. A l'inverse, la puissance est optimale pour des ischémies de courtes durées. Cependant, le PostC Isch peut augmenter la taille de l'infarctus lorsque la durée de l'ischémie est très courte³⁰⁵ (Figure 14).

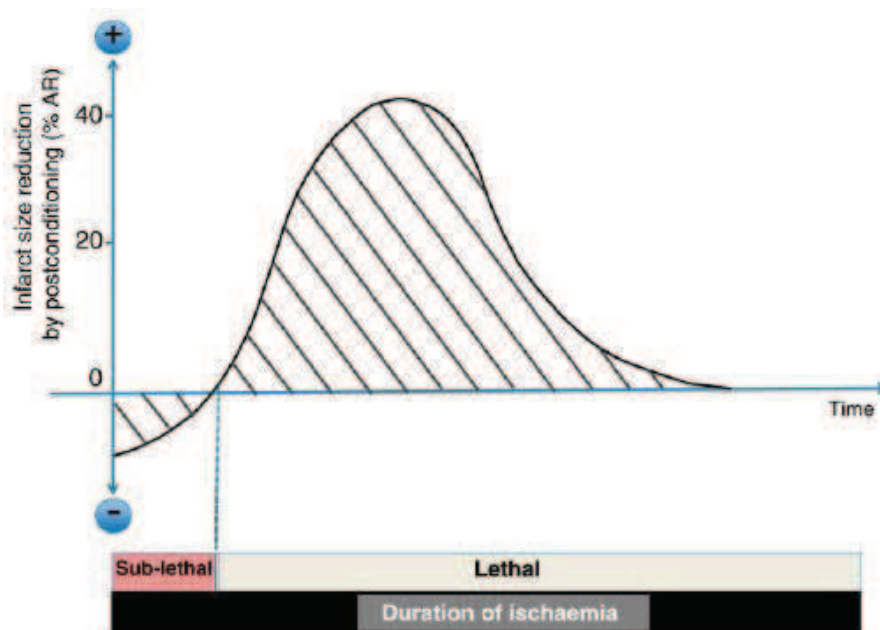


Figure 14. L'atténuation des dommages de reperfusion est fonction de la durée de l'ischémie prolongée. La réduction de la taille de l'infarctus par des interventions post-ischémiques (comme le postconditionnement ischémique) peut varier selon la durée de l'ischémie prolongée. Des études expérimentales ont montré que la puissance du postconditionnement est limitée pour des ischémies longues, probablement parce que l'extension des dommages ischémiques est trop sévère. Lorsque la durée de l'ischémie prolongée est plus courte, la puissance de la protection est optimale. Cependant, lorsque la durée de cette ischémie est si courte qu'elle n'engendre pas d'infarctus (ischémie sous-léthale), l'application d'un postconditionnement ischémique peut être néfaste et causer un petit infarctus. D'après Ovize et al.³⁰⁶.

III-2-1-3. Mécanisme d'action du PostC Isch

La connaissance des différents modes d'action du PreC Isch a aidé à la compréhension des mécanismes d'action du PostC Isch. Il semble en effet que ces deux approches empruntent des voies de signalisation communes ¹⁶⁵. Cependant, cela ne signifie pas pour autant que le PreC et le PostC aient un mécanisme d'action totalement identique. Comme pour le PreC, la cascade de réactions aboutissant au PostC Isch peut être divisée en trois groupes : les facteurs inducteurs, les médiateurs et les effecteurs. La voie de signalisation du PostC Isch est schématisée dans la figure 15.

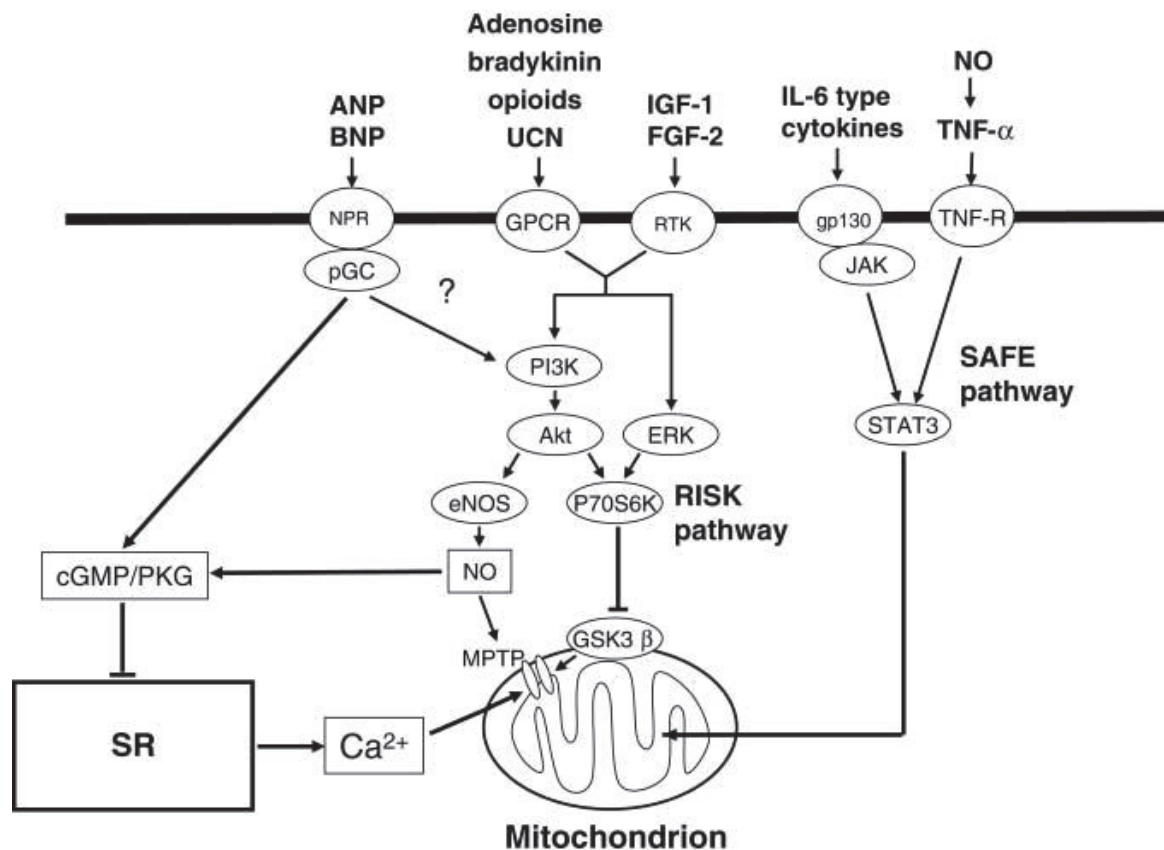


Figure 15. Voies de signalisation du PostC Isch. Des facteurs extracellulaires produits de façon endogène sont impliqués (adénosine, bradykinine, opioïdes). D'autres autacoïdes, tels que les peptides natriurétiques (ANP et BNP), les facteurs de croissance (IGF-1 et FGF-2) et le TNF- α , peuvent également jouer un rôle. La liaison de ces autacoïdes à leurs récepteurs active la voie de signalisation PI3K/Akt et ERK. L'activation de cette voie RISK aboutit à l'inhibition de l'ouverture du mPTP lors de la reperfusion, via le NO et l'inhibition de la GSK3 β . L'activation de la voie GMPc/PKG, par le NO ou les peptides natriurétiques, protège lors de la reperfusion en diminuant le relargage de Ca²⁺ par le réticulum sarcoplasmique (SR). L'activation de la PKC ϵ pourrait aboutir à l'ouverture des mitoK_{ATP}, ce qui augmenterait légèrement la production de ROS, inhibant ainsi l'ouverture du mPTP. La voie SAFE (augmentation des facteurs activant la survie) pourrait également jouer un rôle dans le PostC Isch. Ainsi, le TNF- α et JAK (Janus kinase) phosphorylent le facteur de transcription STAT3, qui va alors se transloquer dans le noyau, aboutissant à la transcription de facteurs cardioprotecteurs. GPCR, récepteur couplé aux protéines G ; NPR, récepteur des peptides natriurétiques ; pGC, guanylyl cyclase particulière ; RTK, récepteur des TK ; TNF-R, récepteur du TNF ; UCN, urocortines ; ?, rôle inconnu à ce jour. D'après Ovize et al. ³⁰⁶.

a. Inducteurs

- Adénosine

La concentration d'adénosine interstitielle augmente durant l'ischémie, alors qu'elle diminue lors des premiers instants de la reperfusion. Kin et al.³⁰⁷ ont montré que le PostC Isch retardait cette diminution de reperfusion. Cela permettrait à l'adénosine d'activer ses récepteurs A_{2A} et A₃, mais pas les A₁, réduisant ainsi la taille de l'infarctus. Cependant, l'administration d'un antagoniste du récepteur A₁ abolit la cardioprotection apportée par le PostC Isch, chez le lapin³⁰⁸. La contribution relative des différentes sous-unités des récepteurs à l'adénosine dans cette protection demeure inconnue, et peut être espèce et modèle-dépendante³⁰⁹.

- Bradykinine

L'injection intermittente de bradykinine au début de la reperfusion protège le cœur³¹⁰. Le récepteur B₂ de la bradykinine joue un rôle important dans le processus de PostC. En effet, l'administration d'un antagoniste du récepteur B₂ abolit la cardioprotection apportée par le PostC Isch³¹⁰. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de la transgénèse puisque le PostC Isch perd son efficacité chez des souris invalidées pour ce récepteur³¹¹. Le mécanisme d'action du PostC induit par la bradykinine n'est pas clair, mais il pourrait impliquer le NO et la synthèse de prostaglandine (PGI₂)³¹²⁻³¹³.

- Opioïdes

Les récepteurs aux opioïdes sont également impliqués dans cette protection. Le PostC Isch préserve la concentration de peptides opioïdes lors de la reperfusion³¹⁴. L'administration d'un agoniste spécifique des récepteurs δ aux opioïdes ou de morphine (agoniste non sélectif), avant la reperfusion, réduit la taille de l'infarctus du myocarde³¹⁵. Sur un modèle de rat, Zatta et al.³¹⁴ ont montré que les antagonistes des récepteurs δ, κ et μ des opioïdes abolissaient la cardioprotection apportée par le PostC Isch.

b. Médiateurs

- Voie RISK

Hausenloy et al.²⁴⁵ ont montré que l'activation pharmacologique, à la reperfusion, des kinases PI3K-Akt et ERK1/2 réduisait la taille de l'infarctus du myocarde, démontrant ainsi le rôle joué par la voie RISK dans cette protection. De même, l'inhibition de la PI3K à la reperfusion bloque l'effet protecteur du PostC²⁹⁹. Cependant, plusieurs études ont suggéré qu'il y aurait d'autres voies impliquées dans cette protection. En effet, Darling et al.³¹⁶ ont constaté que l'inhibition de la PI3K ne modifiait pas le PostC chez le lapin. De même, il a été montré que le PostC activait Akt et ERK sans pour autant réduire les lésions de reperfusion chez le cochon³¹⁷.

La GSK3 β ferait également partie de cette voie, ou serait au moins une cible de celle-ci. En effet, la phosphorylation de la GSK3 β induit une cardioprotection via l'inhibition de l'ouverture du mPTP³¹⁸. Cependant, son rôle est ambigu puisque certains auteurs ont montré que la réussite du PostC nécessitait la phosphorylation de cette protéine³³, alors que d'autres auteurs ont montré que cette cardioprotection était indépendante de cette phosphorylation³¹⁹.

- Voie SAFE

L'activation de la voie Jak-Stat (Janus kinase-signal de transduction et activateur de transcription), ou voie SAFE (augmentation des facteurs activant la survie), a été proposée comme une voie alternative menant à la cardioprotection, indépendamment et en plus de la voie RISK³²⁰. Les récepteurs aux cytokines de la membrane plasmique vont activer la voie SAFE en phosphorylant le facteur de transcription STAT3, qui va alors se transloquer au niveau nucléaire. Ceci va aboutir à la transcription de protéines impliquées dans différents processus cellulaires, notamment dans la cardioprotection.

L'inhibition de cette voie (pharmacologiquement ou par transgénèse) au début de la reperfusion annihile l'effet cardioprotecteur du PostC³²¹⁻³²². Cependant, des souris déficientes en STAT3 au niveau cardiaque sont tout de même cardioprotégées par un PostC³¹⁷. Les voies RISK et SAFE semblent toutes deux converger vers la mitochondrie qui serait l'effecteur de la cardioprotection³²³.

- PKC et PKG

L'inhibition non spécifique de la PKC abolit l'effet cardioprotecteur du PostC³²⁴. Il a été montré que ce serait l'isoforme PKC ϵ qui serait impliquée dans cette protection³²⁵. L'administration à la reperfusion d'un activateur de la PKC confère une protection cardiaque, qui est néanmoins perdue par l'injection conjointe d'un inhibiteur de la PI3K³²⁶.

La PKG serait également impliquée dans le PostC Isch³²⁷. Le NO et la guanylate cyclase (GC) stimuleraient la production de GMPc, qui activerait alors la PKG, facilitant ainsi la transduction du signal. Dans ce sens, l'inhibition pharmacologique de la voie NO-GC-GMPc-PKG bloque la protection apportée par le PostC³²⁸⁻³²⁹.

- K_{ATP}

Il a été montré que le PostC Isch était bloqué par l'administration, au tout début de la reperfusion, d'un inhibiteur des canaux mitoK_{ATP}^{308, 310}. De même, alors que l'application d'une réoxygénation intermittente (plusieurs cycles avec un tampon oxygéné/hypoxique) n'a pas d'effet, sa combinaison avec un ouvreuse des canaux mitoK_{ATP} reproduit la cardioprotection apportée par le PostC Isch³¹⁰. Les mitoK_{ATP} agiraient en régulant la production de ROS et en activant la PKC³²⁴.

c. Effecteurs

Le mPTP semble être au cœur de la problématique du PostC Isch. L'état de ce pore est un facteur fondamental orientant le destin cellulaire, balancé entre la vie et la mort à l'issue de

l'I/R. Argaud et al.²⁹⁷ ont montré que le PostC Isch inhibait l'ouverture du mPTP. Les voies de signalisation activées dans le PostC, et notamment la voie RISK, sont supposées moduler la probabilité d'ouverture du mPTP^{32, 330}. Il a été proposé que l'activation de la PKC ϵ provoque l'ouverture des mitoK_{ATP}, résultant en une légère augmentation de la formation d'H₂O₂ qui inhiberait alors l'ouverture du mPTP¹¹⁸.

III-2-2. Postconditionnement à la CsA

Malgré l'intérêt clinique du PostC Isch, il n'est applicable qu'aux patients qui sont revascularisés par angioplastie coronaire, et non pas à ceux traités par thrombolyse. Un des défis pour lutter contre la pathologie ischémique a été d'identifier des agents pharmacologiques capables de postconditionner chimiquement le myocarde afin d'appliquer cette protection à tous les patients présentant un infarctus. A ce titre, la CsA est apparue comme étant une molécule de premier choix.

En effet, l'administration de CsA juste avant la reperfusion coronaire réduit significativement la taille de l'infarctus du myocarde^{65, 331}. Une étude pilote menée par Piot et al.⁶⁶ a montré que l'effet cardioprotecteur de cette molécule était retrouvé en clinique humaine. Le mode d'action de la CsA passe par l'inhibition de l'ouverture du mPTP⁶⁵. Krolikowski et al.³³² ont montré, sur un modèle de lapin *in vivo*, que l'administration d'un ouvreur du mPTP inhibait la cardioprotection induite par le PostC à la CsA. De même, ces auteurs ont montré que cette protection pouvait être abolie par l'ajout d'un bloqueur des canaux K_{ATP}. Il semblerait donc que le mPTP et les canaux K_{ATP} soient en étroite relation.

III-2-3. Postconditionnement aux halogénés

III-2-3-1. Historique

Les agents anesthésiques halogénés sont aussi capables de protéger le myocarde lorsqu'ils sont administrés lors de la reperfusion. Ainsi, l'administration de desflurane ou de sévoflurane, mais pas d'isoflurane, pendant les 15 premières minutes de la reperfusion myocardique réduit la taille de la nécrose myocardique sur un modèle de lapin³³³. Néanmoins, l'application d'isoflurane sur un modèle de cœur isolé de rat permet une récupération fonctionnelle³³⁴. De même, le PostC au sévoflurane permet de réduire la taille de l'infarctus chez le rat³³⁵. Par la suite, il a été montré que le PostC à l'isoflurane permettait de réduire la nécrose myocardique sur un modèle de lapin³³⁶.

III-2-3-2. Voies de signalisation du PostC aux halogénés

a. NO

Des études pharmacologiques ont suggéré que le NO serait impliqué dans le PostC à l'isoflurane chez le lapin³³⁷ et le rat³³⁸. Les résultats de plusieurs études sous-entendent que le mPTP serait la cible de la protection NO-dépendante contre les lésions d'I/R³³⁹⁻³⁴⁰. Récemment, Ge et al.³⁴¹ ont montré que le PostC à l'isoflurane protégeait le myocarde contre les lésions d'I/R, en inhibant l'ouverture du mPTP par un mécanisme eNOS-dépendant.

b. PI3K-Akt-GSK3 β

Comme le PostC Isch^{299, 342}, le PostC à l'isoflurane augmente l'activité de la voie RISK au moment de la reperfusion^{336, 343-344}, ce qui prévient l'ouverture du mPTP par inhibition de la GSK3 β , réduisant ainsi la taille de l'infarctus³¹². De même, Feng et al.³³⁸ ont montré, sur un modèle de rat, que la protection du PostC à l'isoflurane était abolie en présence du LY294002, un inhibiteur de la phosphorylation d'Akt.

c. mPTP

Comme pour le PreC aux halogénés, il semblerait que l'inhibition de l'ouverture du mPTP soit une conséquence, et non pas un effet direct, du PostC aux halogénés. Cette inhibition serait sous la dépendance de l'ouverture des canaux K_{ATP}³³², de même qu'elle serait eNOS-dépendante³⁴¹. Récemment, il a été montré qu'à la reperfusion, le PostC à l'isoflurane inhiberait la respiration mitochondriale, dépolariiserait la mitochondrie et acidifierait le pH matriciel³⁴⁵. Ces événements inhiberaient l'ouverture du mPTP, ce qui préserverait alors le $\Delta\Psi_m$ et la synthèse d'ATP, diminuant ainsi la mort cellulaire.

La cascade de signalisation du PostC à l'isoflurane, l'agent halogéné utilisé dans notre étude, est représentée sur la figure 16.

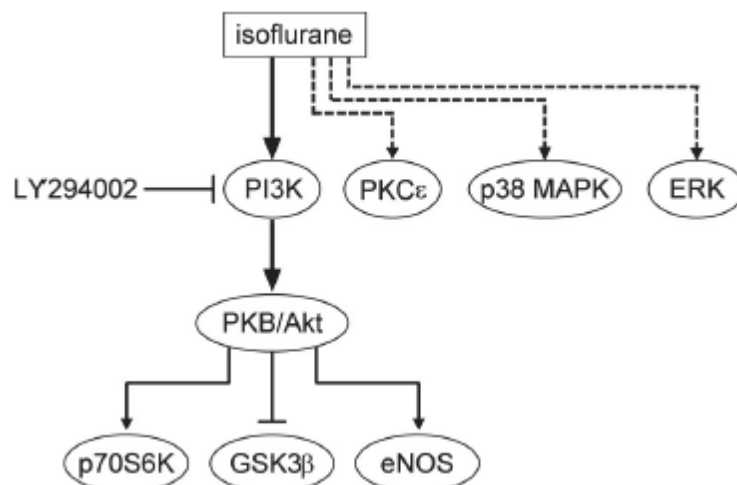


Figure 16. Mécanisme d'action simplifié du PostC à l'isoflurane. La protéine kinase B (PKB)/Akt se situe en aval de la PI3K, une enzyme clef de la voie RISK (flèche pleine). La phosphorylation de PKB/Akt active la p70S6K (70-kDa ribosomal protein S6 kinase) et l'eNOS, et inactive la GSK3 β en la phosphorylant. Les activations de la PKC ϵ , de la p38 MAPK et d'ERK sont potentiellement impliquées dans cette cardioprotection (flèches en pointillés). LY294002 : inhibiteur spécifique de la PI3K. D'après Feng et al.³³⁸.

III-2-4. Postconditionnement à distance

Tout comme le PreC, le PostC peut protéger le myocarde à distance. Cela permet d'éviter l'application d'un traitement invasif au cœur. Ainsi, Kerendi et al.³⁴⁶ ont été les premiers à

montrer que le PostC d'un rein, appliqué juste avant la reperfusion myocardique, réduisait la taille de l'infarctus du myocarde de 50 % chez le rat. De même, Andreka et al.³⁴⁷ ont montré que le PostC de la patte postérieure d'un cochon, réalisé immédiatement à la reperfusion myocardique, était cardioprotecteur. Ce PostC à distance pourrait être dû à la libération d'adénosine par l'organe postconditionné, ce qui activerait en retour ses récepteurs endogènes cardiaques³⁴⁶.

III-2-5. Autres types de postconditionnement

Comme pour le PreC, il existe d'autres interventions expérimentales capables de protéger le myocarde lors de la reperfusion. Schaller et al.³⁴⁸ ont montré que l'administration de TRO40303 10 minutes avant la reperfusion réduisait la taille de l'infarctus du myocarde. Ce nouveau composé modulerait le mPTP, non pas en inhibant la surcharge calcique mitochondriale, mais en diminuant la production de ROS. La reperfusion à basse pression³⁴⁹ et le maintien d'une acidose à la reperfusion³⁵⁰ sont également capables de diminuer les lésions de reperfusion.

III-3. Perconditionnement

III-3.1. Historique

La constatation que la protection apportée par le PreC à distance était médiée par des facteurs humoraux sanguins³⁵¹⁻³⁵² ou par voie neuronale³⁵³⁻³⁵⁴ ont suggéré que cette thérapie pouvait être initiée lors de l'ischémie prolongée, afin de diminuer les lésions de reperfusion.

Lors de l'ischémie myocardique prolongée, l'application de courtes séquences d'I/R sur une artère autre que celle responsable de cette ischémie prolongée a été dénommée perconditionnement (PerC)³⁵⁵. Le PerC peut ainsi se définir comme un conditionnement à distance appliqué au moment de l'ischémie longue. Schmidt et al.³⁵⁵ ont été les premiers à démontrer que le PerC permettait de réduire les lésions d'I/R. En effet, ils ont montré, sur un modèle de cochon, que l'application de ce PerC au niveau d'un membre postérieur réduisait la taille de l'infarctus du myocarde d'environ 37 %. De plus, l'inhibition des canaux K_{ATP} par le glibenclamide abolit cette protection. Il semble donc que les effets protecteurs du PerC soient médiés, en partie au moins, par un mécanisme dépendant de ces canaux K_{ATP} (au niveau du membre postérieur et/ou du cœur). Le cochon ayant une circulation collatérale négligeable, il semble que si une partie du mode d'action de cette protection passe par des facteurs circulants, ceci ne puisse se faire qu'à la reperfusion.

Cette nouvelle approche permet d'élargir le champ de la cardioprotection car l'ischémie d'un membre est facilement réalisable en clinique.

III-3-2. Combinaison du PerC et du PostC

Le PostC, comme le PreC, implique l'activation de la voie RISK. Cependant, il est moins efficace que le PreC dans sa protection contre les lésions de reperfusion³⁰⁴. Il est donc possible que ce PostC n'active pas complètement la voie RISK. La combinaison du PostC

avec le PerC pourrait alors activer plus grandement ces kinases, ce qui induirait une meilleure cardioprotection.

Très récemment, Xin et al.³⁵⁶ ont ainsi étudié l'effet de cette combinaison sur un modèle *in vivo* de rat. Ces auteurs ont montré que l'association d'un PostC avec un PerC protégeait aussi efficacement le cœur que le PreC. De plus, la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 est maximale lors de cette combinaison. Ces auteurs ont également démontré que ces effets n'étaient pas additifs avec ceux du PreC, suggérant ainsi que les mécanismes d'action de ces différentes protections sont vraisemblablement les mêmes.

III-4. Spécificité du modèle de rat

En 2003, Zhao et al.¹⁵⁸ démontraient pour la première fois que le PostC Isch était cardioprotecteur. Cette étude, faite chez le chien, montrait que la protection apportée par le PostC Isch était aussi puissante que celle du PreC Isch. Un an après, cette même équipe publiait les résultats d'une étude similaire réalisée chez le rat²⁹⁸. Ces auteurs montraient que le PostC Isch permettait également de réduire la taille de l'infarctus chez cet animal, mais avec une efficacité fortement réduite par rapport au PreC Isch. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que cette différence inter-espèce serait la conséquence de l'augmentation d'activité de la xanthine oxydase chez le rat, donc d'une surproduction radicalaire.

De toutes les espèces animales étudiées, le rat est sans conteste celle qui présente le plus grand nombre de résultats contradictoires quant à la réussite du PostC. Manintveld et al.³⁰⁵ ont montré que la durée de l'ischémie prolongée était un déterminant majeur de l'efficacité, et par conséquent de la réussite, du PostC Isch. Lorsque l'ischémie dure de 45 à 60 minutes, le PostC Isch protège efficacement le cœur contre les lésions d'I/R. Si cette ischémie dépasse une heure, le PostC perd son efficacité, alors que pour des durées inférieures à 45 minutes, il devient délétère. A l'inverse, Tang et al.³⁵⁷ ont montré que le PostC Isch était cardioprotecteur pour des ischémies inférieures à 45 minutes. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par la différence des protocoles utilisés dans ces deux études : rats Wistar anesthésiés au pentobarbital, inconscients et algorithme de 3 cycles de 30 secondes dans l'étude de Manintveld et al.³⁰⁵, versus rats Sprague-Dawley anesthésiés par un mélange de kétamine/xylazine, conscients et algorithme de 20 cycles de 10 secondes dans l'étude de Tang et al.³⁵⁷. Néanmoins, la raison de cette différence demeure indéterminée.

A ce jour, la majorité des travaux étudiant le phénomène de PostC chez le rat sont réalisés pour des ischémies de 30 minutes^{298, 325, 357}. Malgré tout, un certain nombre d'études a démontré que le PostC Isch n'était pas universel chez le rat. Ainsi, Dow et al.³⁵⁸ ont montré que le PostC était inefficace dans leur modèle. Ces auteurs ont testé différents protocoles, qui se distinguaient au niveau de la durée de l'ischémie (30 ou 45 minutes), de l'algorithme du PostC (4 cycles de 10/10 ou 20/20 s, ou 8 cycles de 30/30 s ou 20 cycles de 10/10 s d'I/R) et de l'anesthésie (mélange kétamine/xylazine ou pentobarbital). Quel que soit le protocole utilisé, ils n'ont jamais réussi à réduire la taille de l'infarctus. Kaljusto et al.³⁵⁹ ont également relevé l'ambiguïté de ce modèle. Dans une première étude, ils ont montré que l'application de 3 cycles de 10 s/10 s d'I/R consécutive à une ischémie de 40 minutes ne réduisait pas la

nécrose. Par contre, un algorithme de 3 cycles de 15 s/15 s cardioprotège les animaux soumis à une ischémie coronaire de 30 minutes. Ces auteurs en ont conclu que le rat n'est pas le meilleur modèle pour étudier le mécanisme du PostC. Nous avons mené notre étude afin d'éclaircir cette situation et d'identifier les causes potentielles de l'échec du PostC chez le rat.

Skyschally et al.³⁰⁴ ont fait une synthèse des différents modèles expérimentaux et protocoles de PostC Isch utilisés dans la littérature. Cette revue ne recense que les études dont le critère final est la taille de l'infarctus du myocarde. Plus de la moitié des protocoles *in vivo* réalisés chez le rat et recensés dans cette revue ont échoué à diminuer la taille l'infarctus par PostC Isch³⁰⁴. A titre de comparaison, seulement moins de 10 % des protocoles effectués chez la souris ont présenté un tel échec de cardioprotection. Il ressort également de ce travail que la majorité des études réalisées chez le rat utilisent une ischémie longue de 30 minutes, avec un algorithme de PostC Isch allant de 3 à 6 cycles de 10 secondes d'ischémie séparés par 10 secondes de reperfusion.

Cette hétérogénéité des résultats est partiellement abolie lorsque les études sont réalisées *in vitro*. Kaljusto et al.³⁵⁹ ont étudié le cœur isolé et perfusé en mode Langendorff. Ces auteurs ont montré que le PostC était inefficace dans leur modèle, que les cœurs soient soumis à une ischémie régionale ou globale. De même, une récente étude a montré que le PostC Isch était inefficace sur le cœur de rat perfusé en mode Langendorff, indépendamment du sexe³⁶⁰. Les trois algorithmes de PostC testés ont échoué à limiter la taille de l'infarctus et à augmenter la récupération fonctionnelle cardiaque, alors que dans le même temps, l'application *in vivo* d'un PostC Isch a permis de réduire les lésions d'I/R. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que des facteurs sanguins et/ou humoraux joueraient un rôle important dans l'induction du PostC, et qu'en s'affranchissant de ces facteurs sur un modèle de cœur isolé, on bloque l'effet protecteur de cette manœuvre. Cependant, la plupart des études *in vitro* réalisées chez le rat ont montré que le PostC Isch permettait de réduire la taille de l'infarctus du myocarde³⁰⁴. Ainsi, Ferrera et al.³⁶¹ ont montré que l'application de deux cycles de 30 s/30 s d'I/R consécutive à une ischémie de 40 minutes réduisait la taille de l'infarctus. De même, Tamareille et al.³⁶² ont montré que le PostC Isch, correspondant à 3 cycles de 10 s/10 s d'I/R, était cardioprotecteur dans leur modèle de cœur isolé.

Les raisons de cette différence de résultats entre les modèles *in vivo* et *in vitro* ne sont pas connues. Toutefois, plusieurs pistes peuvent être envisagées. Les études réalisées *in vitro* permettent d'isoler le cœur, afin notamment d'étudier plus en détail son fonctionnement cellulaire. Le myocarde ainsi coupé de son environnement naturel nécessite d'être perfusé avec des tampons dont la composition se rapproche le plus fidèlement possible de la situation physiologique. Bien que la composition ionique de ces tampons artificiels soit proche de celle du sérum sanguin, le cœur reste néanmoins privé de régulations avec son environnement de par son isolement. Ces études réalisées *in vitro* s'affranchissent ainsi de facteurs sanguins et/ou humoraux qui pourraient moduler la réussite du PostC. De même, le cœur peut être perfusé de façon rétrograde, ce qui peut également conditionner la réussite de cette technique.

BUT DU TRAVAIL

Dans la littérature, au contraire du PreC, il existe des résultats contradictoires vis-à-vis de la réussite du PostC chez le rat. En effet, Manintveld et al.³⁰⁵ ont montré que le PostC Isch protégeait le cœur contre les lésions d'I/R lorsque la durée de l'ischémie était comprise entre 45 et 60 minutes. A l'inverse, Tang et al.³⁵⁷ ont montré que le PostC Isch réduisait la taille de l'infarctus pour des durées d'ischémie inférieures à 45 minutes. Par ailleurs, certains auteurs ont démontré que le PostC était inefficace chez le rat, quel que soit le protocole utilisé. Par exemple, Dow et al.³⁵⁸ ont montré que le PostC Isch et le PostC CsA ne permettaient pas de réduire la taille de l'infarctus chez cet animal. De même, Kaljusto et al.³⁶² ont montré que le PostC Isch n'était pas cardioprotecteur chez cette espèce. Dans un premier temps, l'objectif de notre travail était d'élucider cette situation. Pour cela, nous avons étudié les effets de trois types de préconditionnement et de postconditionnement cardiaques sur un modèle de rat *in vivo* : PreC et PostC ischémiques, à la CsA et à l'isoflurane. Ces trois protocoles mettent en jeu des voies cellulaires distinctes dans le PreC et le PostC. La souche, l'origine, le sexe, le poids, les conditions d'hébergement et la prise alimentaire de nos animaux sont les mêmes entre les différents groupes, ce qui nous permet de nous affranchir d'un certain nombre de variabilités.

Parallèlement, de nombreuses études réalisées sur différentes espèces animales ont montré que la mitochondrie jouait un rôle pivot dans la cardioprotection^{31, 60, 297, 330}. Afin d'établir si la réussite ou l'échec d'un type de PreC ou PostC pouvait être en relation avec la mitochondrie, nous avons étudié les principales fonctions mitochondriales connues pour être impliquées dans la cardioprotection. Nous avons donc évalué la transition de perméabilité mitochondriale, la phosphorylation oxydative et la production d'espèces radicalaires de nos animaux dans les différentes conditions expérimentales par des méthodes identiques.

Nous avons également étudié l'implication de ces fonctions mitochondriales sur d'autres modèles afin de préciser le rôle de la mitochondrie soit dans d'autres espèces, soit dans des situations plus particulières. Une approche pharmacologique a également été utilisée pour rechercher de nouvelles molécules potentiellement actives sur le mPTP. Ainsi, nous avons étudié la régulation du mPTP par deux analogues de l'ubiquinone, CoQ₂ et CoQ₁₀, sur le cœur de lapin sham. Ces molécules sont connues pour leur effet protecteur ou pour leur activité inhibitrice du mPTP sur d'autres types cellulaires. De plus, en collaboration avec l'équipe du Pr Fontaine à Grenoble (INSERM U884), nous avons étudié la régulation du mPTP par le flux d'électrons à travers le complexe I de la chaîne respiratoire, sur différentes lignées cellulaires et modèles animaux, afin d'éclaircir le possible rôle structurel du complexe I dans le mPTP. Nous avons également étudié l'effet protecteur de la CsA sur les mitochondries du cerveau de rat nouveau-né. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Charriaut-Marlangue à Paris (INSERM U676). Ainsi, nous avons évalué l'impact de l'administration de CsA en PreC et en PostC dans un modèle d'infarctus cérébral chez le rat nouveau-né. Enfin, concernant le rôle des ROS dans la cardioprotection, nous avons établi une collaboration avec l'équipe du Dr Mialet-Perez à Toulouse (INSERM U858). Nous avons étudié l'influence de la surexpression de la MAO-A cardiaque chez la souris afin d'évaluer l'implication des ROS dans l'insuffisance cardiaque, étant donné que la MAO-A est localisée sur la partie externe de

la membrane mitochondriale externe et que cette enzyme produit de l' H_2O_2 lors de son fonctionnement.

L'ensemble de ces approches nous a permis de préciser dans quelles conditions la mitochondrie est impliquée dans la régulation de la vie cellulaire. Nos résultats démontrent que l'inhibition de l'ouverture du mPTP, la préservation de la phosphorylation oxydative et la diminution de la production de ROS sont nécessaires afin que le PostC soit protecteur chez le rat.

MATERIELS ET METHODES

I. Animaux

Des rats mâles Wistar (300-350 g) sont utilisés dans nos études de préconditionnement (PreC) et postconditionnement (PostC) *in vivo*. Les animaux sont placés à une température contrôlée ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) et soumis à un cycle lumière/obscurité de 12 h/12 h, avec un accès *ad libitum* à de la nourriture et de l'eau. Les expérimentations sont réalisées après une période d'adaptation minimale de 7 jours.

Des rats Wistar (17-21 g) des deux sexes sont utilisés dans notre étude d'attaque cérébrale. Les expérimentations sont réalisées à J7, après une période d'adaptation de 4 jours.

Des souris C57BL6/J et des transgéniques sur-exprimant la monoamine-oxidase A (MAO-A) spécifiquement au niveau cardiaque, des deux sexes, sont utilisées dans notre étude sur les conséquences de la surexpression de cette enzyme. Les expérimentations sont réalisées sur des souris âgées de 6 mois, après une période d'adaptation de 4 jours.

Les expérimentations sont pratiquées en conformité avec les textes réglementaires français (décrets n° 2001-464 du 29 mai 2001 et 2001-486 du 6 juin 2001) et les recommandations de l'INSERM de septembre 2002 relatifs à l'expérimentation animale, ainsi qu'en accord avec « the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals » publié par le « US National Institute of Health » (NIH Publication No. 85-23, révisé en 1996).

II. Préparations chirurgicales

II-1. Préparation chirurgicale du rat adulte

Les rats adultes sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (65 mg/kg), intubés et ventilés mécaniquement avec une pression positive à l'aide d'un respirateur pour rongeurs (Inspira asv Harvard Apparatus®, Holliston, MA). Une thoracotomie gauche est pratiquée au 4^{ème} espace intercostal. Après ouverture du sac péricardique, un fil de suture (7/0 polypropylène) relié à une aiguille courbe est placé autour de l'artère coronaire descendante antérieure gauche afin de permettre la réalisation d'une séquence d'ischémie-reperfusion (I/R) coronaire. Des cathéters sont mis en place dans l'artère carotide gauche et la veine fémorale droite de l'animal pour respectivement le recueil des paramètres hémodynamiques (pression artérielle et fréquence cardiaque) et l'administration de drogues. Les animaux sont ensuite héparinés à l'aide d'une injection *i.v.* d'héparine sodique (150 UI/kg) en bolus. La température corporelle des animaux est monitorée via un thermomètre rectal et maintenue à $37-38^\circ\text{C}$ à l'aide d'une couverture chauffante. Une phase de stabilisation de 15 minutes est respectée avant l'enregistrement des paramètres de référence. L'électrocardiogramme est continuellement monitoré grâce à des électrodes subcutanées.

III-2. Préparation chirurgicale du rat nouveau-né

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr Charriaut-Marlangue à Paris. Notre contribution s'est limitée à l'étude des fonctions mitochondriales.

Les rats sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'hydrate de chloral (350 mg/kg). L'animal anesthésié est positionné sur son dos et une incision médiane est faite dans son cou pour dégager l'artère carotide commune gauche. Le raton est ensuite positionné sur son côté droit et une incision oblique de la peau est faite entre l'œil et l'oreille. Après l'excision du muscle temporal, l'os du crâne est retiré de la suture frontale, en dessous de la voûte zygomatique. L'artère cérébrale moyenne gauche est électrocoagulée au niveau inférieur de la veine cérébrale. Un clip vasculaire est ensuite placé pour occlure l'artère carotide commune gauche. Les rats sont ensuite placés dans une couveuse afin d'éviter une hypothermie. Après 50 minutes, le clip est retiré. La restauration du flux sanguin carotidien est vérifiée à l'aide d'un microscope. Les incisions au niveau du cou et du crâne sont suturées. Durant la procédure chirurgicale, la température corporelle est maintenue à 36-36.5°C. Après leur rétablissement, les rats sont restitués à leurs mères. Se référer à l'article pour plus de détails.

III. Protocoles expérimentaux

III-1. Ischémie-reperfusion cardiaque chez le rat adulte

Tous les rats sont soumis à une occlusion coronaire de 30 minutes suivie d'une reperfusion de 15 minutes pour la préparation des mitochondries isolées ou de 2 heures pour la détermination de la zone infarctée (IS). L'ischémie est confirmée visuellement par une cyanose régionale de la surface du myocarde et par une élévation du segment ST de l'électrocardiogramme. Les animaux sont répartis aléatoirement dans l'un des 8 groupes expérimentaux suivants (Figure 17) : le groupe contrôle ne reçoit pas d'autre intervention. Les animaux préconditionnés sont soumis avant l'occlusion coronaire de 30 minutes soit à un protocole de préconditionnement ischémique de 3 cycles de 3 minutes d'ischémie/5 minutes de reperfusion (PreC Isch), soit à une injection intraveineuse en bolus de 10 mg/kg de cyclosporine A (CsA) 10 minutes avant l'ischémie (PreC CsA), soit à 2 cycles d'administration d'isoflurane (1.0 minimum alveolar concentration, MAC, correspondant à une concentration télé-expiratoire de 1.4 %) de 15 minutes suivie de 5 minutes de rinçage (PreC Iso). Les animaux postconditionnés reçoivent soit 6 cycles de 10 secondes de reperfusion/10 secondes d'occlusion appliqués au début immédiat de la reperfusion (PostC Isch), soit une injection intraveineuse en bolus de 10 mg/kg de CsA 5 minutes avant la reperfusion (PostC CsA), soit de l'isoflurane (1.5 MAC, correspondant à une concentration télé-expiratoire de 2.1 %) administré pendant les 5 dernières minutes d'ischémie et les 5 premières minutes de reperfusion (PostC Iso). Un groupe Sham est également constitué, dans lequel les rats ne sont soumis à aucune séquence

ischémique lors de l'expérimentation. Les concentrations finales d'anesthésiques sont mesurées avec un analyseur de gaz à infrarouge connecté à l'extrémité du tube ventilatoire.

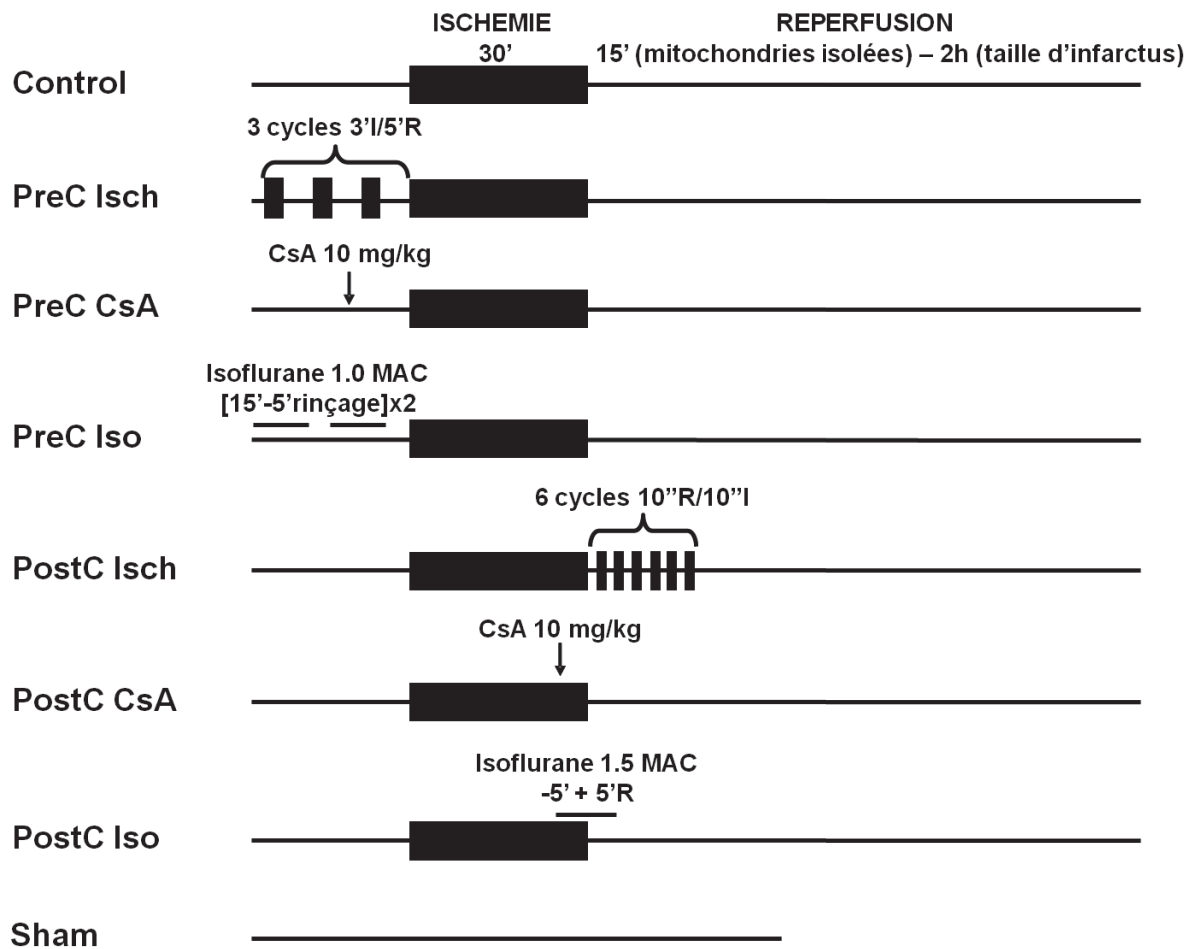


Figure 17. Protocole expérimental de l'étude de l'I/R cardiaque chez le rat adulte. Tous les groupes sont soumis à une ischémie de 30 minutes suivie de 15 minutes (étude des fonctions mitochondriales) ou 2 h (quantification de la taille d'infarctus) de reperfusion. I, ischémie ; R, reperfusion ; CsA, cyclosporine A ; MAC, concentration alvéolaire minimale ; PreC Isch, préconditionnement par 3 cycles de 3 minutes d'ischémie / 5 minutes de reperfusion ; PreC CsA, préconditionnement par injection de CsA (10 mg/kg) 10 minutes avant l'ischémie ; PreC Iso, préconditionnement par 2 cycles d'administration d'isoflurane (1.0 MAC) suivis de 5 minutes de rinçage ; PostC Isch, postconditionnement par 6 cycles de 10 secondes d'ischémie / reperfusion ; PostC CsA, postconditionnement par injection de CsA (10 mg/kg) 5 minutes avant la reperfusion ; PostC Iso, postconditionnement à l'isoflurane (1.5 MAC) administré 5 minutes avant la fin de l'ischémie et jusqu'aux 5 premières minutes de reperfusion ; Sham, une ligature a été placée sous l'artère coronaire descendante antérieure gauche mais n'a pas été serrée, le temps de l'expérimentation est identique à celui du groupe contrôle (l'étude est alors limitée à l'analyse des fonctions mitochondriales).

Un neuvième groupe est également constitué. Il est soumis au même protocole, si ce n'est qu'il subit un PostC Isch de 3 cycles de 10 secondes de reperfusion/10 secondes d'occlusion. La quantification de l'infarctus est le seul paramètre mesuré dans ce groupe (après 2 heures de reperfusion).

De la même façon, une étude parallèle est menée afin de quantifier l'infarctus de rats soumis à une ischémie de 45 minutes, suivie d'une reperfusion de 2 heures. Ces animaux sont répartis en 2 groupes : le groupe contrôle ne reçoit pas d'autre intervention. Le groupe PreC Isch est soumis au même algorithme que celui de l'étude principale.

III-2. Ischémie-reperfusion cérébrale chez le rat nouveau-né

Les rats sont soumis à une ischémie cérébrale par occlusion définitive de l'artère cérébrale moyenne gauche et transitoire de l'artère carotide commune gauche. Après l'occlusion de 50 minutes de cette dernière, une reperfusion de 30 à 40 minutes est observée. Les animaux sont répartis en quatre groupes pour l'étude des fonctions mitochondriales. Les groupes ischémiques véhicule et CsA reçoivent une injection intraveineuse, 14 heures avant les occlusions, respectivement de NaCl à 0.9 % et de CsA à 10 mg/kg. Les groupes sham véhicule et CsA reçoivent les mêmes injections mais ne sont pas soumis à une ischémie. A la fin de la reperfusion, les cortex des rats sont prélevés. L'isolation et l'étude des fonctions mitochondriales se font selon la même procédure que celle utilisée chez le rat adulte (décrite ultérieurement).

III-3. Influence de la surexpression de la MAO-A cardiaque chez la souris

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Mialet-Perez à Toulouse. Notre participation s'est limitée à l'étude des fonctions mitochondriales.

Les souris sont euthanasiées par décapitation et leurs cœurs sont immédiatement prélevés. L'isolation et l'étude des fonctions mitochondriales se font selon la même procédure que celle utilisée chez le rat adulte (décrite ultérieurement).

IV. Quantification de l'infarctus

A la fin des 2 heures de reperfusion, l'artère coronaire est brièvement réoccluse, et 0.5 mg/kg d'une solution de colorant bleu Uniprise (Ciba-Geigy®, Hawthorne, NY) à 20% est injecté au niveau de la veine fémorale afin de délimiter l'aire à risque, comme précédemment décrit³⁶³. La zone de myocarde non ischémique apparaît en bleu, alors que la partie du myocarde précédemment ischémisée n'est pas colorée. Le cœur est ensuite excisé. Le ventricule droit, les oreillettes et l'aorte sont retirés. Le ventricule gauche (LV) est coupé, parallèlement au sillon auriculo-ventriculaire, en 5 à 6 tranches transverses qui sont pesées et photographiées pour la mesure ultérieure de l'aire à risque (AAR). Chaque tranche est ensuite incubée pendant 20 minutes à 37°C dans une solution de chlorure de triphényltétrazolium (TTC) à 1%. Le

myocarde « viable » apparaît coloré en rouge brique, alors que la zone infarctée (IS) apparaît pâle ³⁶⁴. Les tranches de myocarde sont une nouvelle fois photographiées, pour la quantification de l'IS. L'AAR et l'IS sont quantifiés par planimétrie à l'aide du logiciel Adobe Photoshop®. Les poids totaux d'AAR et d'IS sont mesurés et exprimés en grammes et les rapports IS/AAR, IS/LV et AAR/LV sont calculés. Le critère d'inclusion est défini par une AAR supérieure à 10 % du volume ventriculaire gauche.

V. Isolation des mitochondries

La préparation des mitochondries est adaptée d'une procédure décrite précédemment ³¹. A la fin des 15 minutes de reperfusion, le cœur est excisé et rincé dans du tampon A (70 mM sucrose, 210 mM mannitol et 10 mM EGTA dans 50 mM Tris/HCl à pH 7.4) à 4°C. L'AAR est disséquée, pesée puis découpée en petits morceaux dans du tampon A à 4°C (selon la proportion 10 ml de tampon par gramme de tissu). Le broyage est réalisé à l'aide d'un broyeur verre-verre (Potter Elvehjem®). Les mitochondries sont isolées par centrifugations différentielles. Brièvement, l'homogénat est centrifugé à 1 300 g durant 3 minutes à 4°C. Cette centrifugation permet d'éliminer les noyaux, les hématies et différents débris cellulaires. Le surnageant est centrifugé à 10 000 g et à 4°C pendant 10 minutes afin de séparer la fraction mitochondriale du surnageant post-mitochondrial. Le culot de mitochondries ainsi obtenu est remis en suspension dans du tampon B (70 mM sucrose et 210 mM mannitol dans 50 mM Tris/HCl à pH 7.4) à 4°C (10 ml de tampon par gramme de tissu). L'homogénat est centrifugé à 6 500 g durant 10 minutes, ce qui permet de rincer la fraction mitochondriale et d'éliminer l'EGTA. Le culot mitochondrial est suspendu dans environ 200 µl de tampon B. La suspension de mitochondries est alors prête pour le dosage de protéine et l'étude des fonctions mitochondriales.

VI. Dosage de protéine

La concentration des protéines mitochondriales est mesurée par la méthode de Bradford en utilisant l'albumine sérique bovine comme standard ³⁶⁵. Le dosage des protéines est réalisé par spectrophotométrie (Hitachi®, F-7000) à l'aide d'un lecteur multi plaques (Thermo®, Multiskan Ex). La longueur d'onde d'absorbance est de 550 nm. Une gamme étalon est établie à partir d'un standard d'albumine sérique bovine concentrée à 2 mg/ml (Thermo scientific).

VII. Analyse des fonctions mitochondriales

VII-1. Phosphorylation oxydative

La consommation mitochondriale d'oxygène est mesurée à 25°C à l'aide d'une électrode à oxygène de Clark (Oroboros® oxygraphe, Austria) ³⁴. Les mitochondries (350 µg de protéines) sont incubées et légèrement agitées dans 2 ml de tampon de respiration (100 mM KCl, 50 mM MOPS, 1 mM EGTA, 5 mM KH₂PO₄ et 1 mg/ml de BSA dépourvue d'acide gras à pH 7.4). Le glutamate/malate (G/M, substrats du complexe I, 5 mM chacun), le succinate (substrat du complexe II, 5 mM) et le TMPD-Ascorbate (substrats du complexe IV, respectivement 0.125 et 1.25 mM) sont utilisés comme donneurs d'électrons spécifiques aux différents sites de la chaîne de transport d'électrons. La roténone (6.25 µM) est ajoutée au succinate pour inhiber le flux réverse d'électrons en bloquant le complexe I. La combinaison de roténone (6.25 µM) et d'antimycine A (12.5 µM) est ajoutée au TMPD-Ascorbate afin d'inhiber le complexe III et d'étudier le complexe IV ³⁶⁶. La respiration à l'état 3 est initiée par l'addition de 200 µM d'ADP, et lorsque la majorité de l'ADP est transformé en ATP, la consommation d'oxygène baisse, c'est l'état 4. Cette consommation d'O₂ est exprimée en nmoles d'O₂/min/mg de protéines. L'indice du couplage respiratoire (RCI) est également calculé, il est défini comme le rapport état 3/état 4.

VII-2. Ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale

La capacité de rétention calcique (CRC) est définie comme la quantité de calcium nécessaire à l'induction de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) après additions successives et régulières de calcium. Comme décrit précédemment ^{31,367}, la CRC est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Hitachi®, F-7000) thermostaté et muni d'un agitateur électromagnétique, en présence de 0.5 µM de la sonde calcium green-5N, avec des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectivement à 500 et 530 nm. Les mitochondries fraîchement isolées (250 µg de protéines) sont suspendues dans 2 ml de tampon C (150 mM sucrose, 50 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄ et 20 mM Tris/HCl à pH 7.4) à 25°C. Le G/M (5 mM chacun) ou le succinate (5 mM) sont ajoutés comme substrats respectifs des complexes I et II. La suspension mitochondriale est ensuite agitée et stabilisée pendant 90 s. A la fin de cette période de pré incubation, 10 nmoles de CaCl₂ sont injectées toutes les minutes. Le calcium est rapidement capté par les mitochondries, ce qui se traduit par un retour rapide de la fluorescence au niveau basal. Lorsque la surcharge calcique est suffisante, la fluorescence augmente rapidement ce qui indique un relargage massif et irréversible de Ca²⁺ par les mitochondries dû à l'ouverture du mPTP. La quantité de Ca²⁺ nécessaire pour obtenir cette transition de perméabilité mitochondriale est exprimée en nmoles de CaCl₂²⁺/mg de protéines.

La CRC est mesurée à l'état de base et en présence de cyclosporine A (CsA, 1 µM) qui est la molécule inhibitrice de référence du mPTP. Afin d'étudier l'influence de l'inhibition du complexe I sur l'ouverture de ce mPTP, la CRC est également mesurée en présence de

roténone (1 μM) et de roténone plus CsA (1 μM de chaque) lorsque le succinate est le substrat.

VII-3. Production d'espèces réactives de l'oxygène

Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit continuellement de petites quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La mesure d' H_2O_2 extramitochondrial est aujourd'hui admise comme un indicateur de la production mitochondriale de ROS³⁶⁸⁻³⁶⁹. Les radicaux d' O_2^- produits par la chaîne de transfert des électrons sont immédiatement convertis en H_2O_2 sous l'effet de la superoxyde dismutase mitochondriale (Mn-SOD) et deviennent rapidement indétectables³⁷⁰. Les molécules d' H_2O_2 ont la capacité de traverser la membrane mitochondriale³⁷¹ et servent ainsi d'indicateur stœchiométrique de la production de ROS mitochondriaux. La détection de l' H_2O_2 est réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre (longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectivement à 530 et 590 nm) en présence de la sonde Amplex® Red (10 μM) et de l'enzyme horseradish peroxidase (0.6 U/ml). En présence d'horseradish peroxidase, l'Amplex® Red, qui est un substrat incolore, est oxydé par l' H_2O_2 ce qui génère un complexe fortement fluorescent³⁷².

Les mitochondries isolées sont suspendues dans 2 ml de tampon ROS (250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1.5mg/ml de BSA dépourvue d'acide gras et 20 mM Tris/HCl à pH 7.4) à 25°C et en présence de 10 μM d'Amplex Red® et 0.6 U/ml d'horseradish peroxidase. Le G/M (5 mM chacun) ou le succinate (5 mM) sont utilisés comme substrats. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'eau oxygénée produite. Une gamme étalon d' H_2O_2 est donc établie afin de transformer l'intensité de fluorescence obtenue en vitesse de production d' H_2O_2 (nmoles d' H_2O_2 /min/mg de protéines) (Figure 18). Les résultats sont présentés par le ratio de la production d' H_2O_2 par la consommation d'oxygène (nmoles d' O_2 /min/mg protéines) à l'état 3, et sont exprimés en pourcentage.

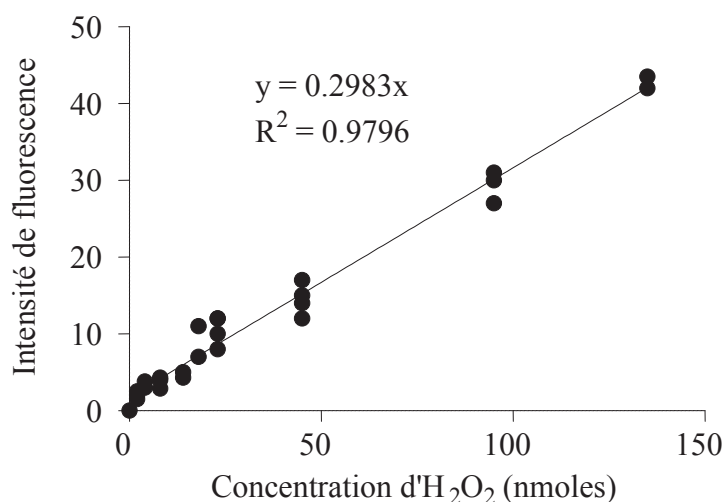


Figure 18. Gamme étalon d' H_2O_2

VIII. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm SEM. Les paramètres hémodynamiques ont été analysés par une ANOVA à 2 voies avec des mesures répétées sur un facteur. La corrélation entre l'IS et l'AAR a été évaluée à l'aide d'une analyse de covariance (ANCOVA) suivie d'un test *post hoc* de Bonferroni, avec l'IS comme variable dépendante et l'AAR comme covariant. Une ANOVA à une voie suivie d'un test *post hoc* de Bonferroni a été utilisée pour analyser les différences entre les groupes. Un test *t* de Student a été utilisé quand cela était approprié. Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme statistiquement significative.

RESULTATS ET DISCUSSION

ARTICLE N° 1

**In vivo ischemic and pharmacological preconditioning and
postconditioning in the rat heart model**

Damien De Paulis, Pascal Chiari, Elisabeth Couture-Lepetit, Laurent
Argaud, Abdallah Gharib, Michel Ovize.

En cours de soumission à Cardiovasc Res

Résumé

Objectif : Dans la littérature, une contradiction existe quant à la possibilité de PostC le rat. Le but de cette étude est de comparer trois types de PreC et de PostC (ischémique, à la CsA et à l'isoflurane) sur un modèle d'I/R *in vivo* chez le rat.

Matériels et méthodes : Des rats anesthésiés ont subis 30 minutes d'occlusion de l'artère coronaire descendante gauche suivie de 15 minutes, pour l'étude des fonctions mitochondriales, ou 2 heures, pour la quantification de l'infarctus, de reperfusion. Les animaux ont été randomisés en 8 groupes : un groupe contrôle n'ayant aucune intervention préalable à la séquence d'I/R. Les animaux préconditionnés ont reçu avant l'occlusion soit un PreC Isch de 3 cycles de 3 minutes d'ischémie/5 minutes de reperfusion (PreC Isch), soit un bolus *i.v* de CsA à 10 mg/kg 10 minutes avant l'ischémie (PreC CsA), soit 2 cycles de 15 minutes d'isoflurane (1.0 MAC) suivis de 5 minutes de rinçage (PreC Iso). Les animaux postconditionnés ont reçu soit 6 cycles de 10 secondes de reperfusion/10 secondes d'ischémie appliqués au décours immédiat de la reperfusion (PostC Isch), soit un bolus *i.v* de CsA à 10 mg/kg 5 minutes avant la reperfusion (PostC CsA), soit de l'isoflurane (1.5 MAC) administré 5 minutes avant la reperfusion pendant 10 minutes (PostC Iso). Le groupe sham n'a subi aucune ischémie durant l'expérimentation.

Résultats : Nous avons montré que le PreC Isch, le PreC CsA et le PreC Iso diminuaient significativement la taille de l'infarctus (respectivement $17.1 \pm 3.5\%$, $23.9 \pm 5.4\%$, et $20 \pm 5.3\%$ de l'aire à risque) comparé au groupe contrôle ($59.4 \pm 2.8\%$). En revanche, le PostC Isch et le PostC CsA n'ont pas d'effet (respectivement $49.5 \pm 4.1\%$ and $52.2 \pm 2.1\%$), alors que le PostC Iso réduit significativement la taille de l'infarctus ($36.2 \pm 3.4\%$). Nous avons également démontré que tous les protocoles de PreC restauraient la phosphorylation oxydative, mais ne modifiaient ni l'ouverture du mPTP, ni la production de ROS. Des trois protocoles de PostC, seul le PostC Iso restaure toutes les fonctions mitochondriales testées.

Conclusion : Cette étude démontre que l'hétérogénéité des effets cardioprotecteurs induits par le PreC et le PostC impliquent différemment les fonctions mitochondriales cardiaques dans un modèle *in vivo* d'I/R chez le rat. La réussite du PreC et du PostC exige une sauvegarde de la chaîne respiratoire. Concernant le PostC, nos résultats suggèrent que la réduction de la taille de l'infarctus nécessite une réduction de la production de ROS et une inhibition de l'ouverture du mPTP chez le rat.

In vivo ischemic and pharmacological preconditioning and postconditioning in the rat heart model

Damien De Paulis ^(1, 2), Pascal Chiari ^(1, 3), Elisabeth Couture-Lepetit ^(1, 2), Laurent Argaud ^(1, 2, 4) Abdallah Gharib ⁽¹⁾, Michel Ovize ^{*(1, 2, 5)}

1. INSERM, UMR886, Cardioprotection, F-69373, Lyon, France ;

2. Université Lyon 1, faculté de médecine, F-69373, Lyon, France ;

3. Hospices Civils de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Service d'anesthésie-réanimation, F-69677, Bron, France ;

4. Hospices Civils de Lyon, Service de Réanimation Médicale, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, F-69437, Lyon, France ;

5. Hospices Civils de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Service de cardiologie, F-69677, Bron, France.

Short title: *in vivo* Pre and Post-conditioning in rat

Total word count:

Table: 2

Fig: 4

*Corresponding author:

Pr M. Ovize

INSERM UMR886 “Cardioprotection”

Laboratoire de Physiologie, Lyon Nord, 8 av Rockefeller, 69373 Lyon, France.

Tel: (33) 4-78-77-71-21; Fax: (33) 4-78-77-71-75.

E-mail address michel.ovize@chu-lyon.fr (M. Ovize).

ABSTRACT

Objective: To compare three *in vivo* preconditioning (PreC) and postconditioning (PostC) protocols: ischemic, cyclosporine A (CsA) and isoflurane. **Methods:** In anesthetized rats, the left descendent coronary artery was occluded for 30 min and reperfused for 15 min for mitochondrial study or 2 h for myocardial infarct size (IS) measurement. Control group receiving no further intervention. Preconditioned animals received before the occlusion either an ischemic preconditioning (PreC Isch), an administration of CsA (PreC CsA) or isoflurane (PreC Iso). Postconditioned animals received either an ischemic postconditioning applied at the reperfusion (PostC Isch), or an administration of CsA (PostC CsA) or isoflurane (PostC Iso) before reperfusion. **Results:** We showed that PreC Isch, PreC CsA, and PreC Iso significantly reduced the IS ($17.1 \pm 3.5\%$, $23.9 \pm 5.4\%$, and $20 \pm 5.3\%$ of the area at risk, respectively) when compared to the control ($59.4 \pm 2.8\%$, $p < 0.05$). In contrast, PostC Isch and PostC CsA had no significantly effect ($49.5 \pm 4.1\%$ and $52.2 \pm 2.1\%$, respectively). PostC Iso significantly reduced the IS ($36.2 \pm 3.4\%$, $p < 0.05$). All PreC protocols restore the oxidative phosphorylation, but did not modify both mPTP opening and ROS production. Only PostC Iso restores all mitochondria patterns tested. **Conclusions:** We demonstrate the different cardioprotective effects of PreC and PostC that imply different mitochondrial pattern in a rat *in vivo* model. The success of the PreC passes by a safeguarding of the respiratory chain, whereas the PostC also requires both reduction in the production of ROS and inhibition of mPTP opening.

Key words: ischemia-reperfusion, preconditioning, postconditioning, mitochondria, rat.

INTRODUCTION

The ischemic and pharmacological preconditioning of the heart proved their efficiencies in reduction of the damages of infarct to all the animal species examined¹⁻⁵. Zhao et al.⁶ proposed the concept of ischemic postconditioning (PostC Isch), a new protocol that reduces infarct size (IS) after a prolonged period of ischemia. PostC Isch is defined as brief intermittent episodes of ischemia and reperfusion performed at the onset of reperfusion following prolonged ischemia. Thus, PostC Isch offers a novel approach to cardioprotection. In this sense, beneficial effect to reduce IS was obtained in several experimental animals models tested including dogs⁶, pigs⁷, rabbits⁸, mice⁹, and even humans¹⁰. In rats, this phenomenon remains controversial: some studies demonstrated that PostC Isch protects this specie¹¹⁻¹³ while other one's failed too¹⁴⁻¹⁵. However, the cardioprotective mechanism is not clearly understood. Mitochondria are a major part in the mechanism of cell death as well as protection by PreC⁵ or PostC⁸. Many drugs have also shown to reduce IS when administered before ischemia (as PreC) or at reperfusion (as PostC). However, the action of these different drugs implicated a variety of molecular targets in mitochondria or cardiomyocytes. For example, cyclosporin A (CsA) inhibits the mitochondrial permeability transition pore (mPTP)¹⁶ by detaching cyclophilin D (Cyp D) from the other components of the pore¹⁷. Phosphatidylinositol-3-kinase, protein kinase C- ϵ , GSK-3 β and reactive oxygen species (ROS) have proposed a pivotal role in the signal transduction cascade in volatile anesthetic PreC¹⁸⁻²¹. Complex I of respiratory chain and ROS production was proposed as target of amobarbital in PreC and PostC²²⁻²³. Recently, Schaller et al.²⁴ presented the TRO40303 as a new cardioprotective molecule that binds to translocator protein 18 kDa, known as peripheral benzodiazepine receptor, inhibits the mPTP opening in intact cardiomyocytes, but not in isolated mitochondria, and reduces IS in rat *in vivo* model when administered at reperfusion. All these mechanisms demonstrated the complicity of the metabolic ways implicated in cardioprotection and approved the idea of intrinsic factors modulation of cardiomyocytes during ischemia/reperfusion (I/R). These factors are modulating by some physiological factors, including sex, age, and specie (for review see Skyschally et al²⁵).

The aim of the present study was to compare and clarify the cardioprotection effects in term of IS reduction in an *in vivo* I/R rat model of three PreC and PostC protocols. We have also examined, in the first minutes of reperfusion, if mitochondrial oxidative phosphorylation, inhibition of the mPTP opening and ROS production are involved in this protection. We showed that all PreC protocols reduced the IS and restore the oxidative phosphorylation, but did not modified the mPTP opening and ROS production. In PostC protocols, only PostC by isoflurane reduced the IS and restore all mitochondria patterns tested.

MATERIALS AND METHODS

The present study was performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). All experimental procedures were approved by the Lyon I Claude Bernard University Committee for Animal Research.

Surgical Preparation

Male Wistar rats (300-350 g) were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (65 mg/kg), intubated and mechanically ventilated with a positive pressure rodent ventilator (Inspira asv Harvard Apparatus, Holliston, MA). A left thoracotomy was performed at the fourth intercostal space, the pericardium was opened, and the heart exposed. A 7/0 polypropylene suture attached to a small needle was passed around the left anterior descending coronary artery to perform a coronary artery occlusion and reperfusion. Sodium heparin (150 IU/kg) was injected by an intravenous bolus. Catheters were inserted into the left carotid artery and the right femoral vein for measurement of arterial blood pressure and drug administration, respectively. Limb lead II electrocardiograph was continually monitored by means of subcutaneous needle electrodes. Body temperature was monitored

via a rectal thermometer and maintained at 37-38°C with a heating pad. After the surgical procedure, a 15-min stabilisation period was observed.

Experimental Protocol

All rats underwent a 30-min coronary occlusion followed by either 2 h of reperfusion for determination of IS (n = 6-8 in each group) or 15-min of reperfusion for preparation of isolated mitochondria (n = 5-8 in each group). Ischemia was confirmed by regional cyanosis of the myocardial surface and ischemic ST-segment changes in the electrocardiogram. Animals were randomly assigned to one of seven separate experimental groups (Fig. 1). Control group received no further intervention. Preconditioned animals received before the sustained coronary occlusion either an preconditioning protocol of three cycles of 3-min ischemia / 5-min reperfusion (PreC Isch), an intravenous bolus injection of 10 mg/kg of CsA, 10 min before ischemia (PreC CsA) or two cycles of 15-min isoflurane administration (1.0 minimum alveolar concentration, MAC, corresponding to 1.4% end tidal) followed by 5 min washout (PreC Iso). Postconditioned animals received, either 6 cycles of 10-s reperfusion / 10-s occlusion applied immediately at the onset of reperfusion after the prolonged coronary occlusion (PostC Isch), an intravenous bolus injection of 10 mg/kg of CsA 5 min before reperfusion (PostC CsA) or isoflurane (1.5 MAC corresponding to 2.1% end tidal) administered for 5 min before and 5 min after reperfusion (PostC Iso). End-tidal concentrations of volatile anaesthetics were measured at the tip of the ventilating tube with an infrared gas analyzer (Capnomac Ultima, Datex, Helsinki, Finland). Furthermore, a Sham group was constituted in which rats underwent no ischemic insult throughout the experiment.

Area at risk and infarct size

At the end of the 2-h reperfusion period, the coronary artery was briefly reoccluded, and 0.5 mg/kg Uniperse blue pigment (Ciba-Geigy, Hawthorne, NY) was injected intravenously to delineate the *in*

vivo area at risk (AAR), as previously described ³⁶³. The heart was excised and cut into five to six transverse slices, parallel to the atrioventricular groove. After removal of right ventricular tissue, each slice was weighted, and its basal surface was photographed for further measurement of the AAR. Each slice was then incubated for 20 min in a 1% solution of triphenyltetrazolium chloride (TTC) at 37°C to differentiate infarcted (pale) from viable (brick red) myocardial area ²⁷. The slices were then rephotographed. Enlarged projections of these slices were traced for determination of the boundaries of the AAR and IS. The extent of the AAR and IS was quantified by computerized planimetry and corrected for the weight of the tissue slices. Total weights of the AAR and the IS were then calculated and expressed in grams and as percentage of total left ventricular (LV) and of the AAR, respectively.

Isolation of mitochondria

Preparation of mitochondria was adapted from a previously described procedure ⁵. Briefly, at the end of the 15-min reperfusion period, the myocardial AAR was removed from the chest and placed in cold buffer (pH 7.4) containing 70 mM sucrose, 210 mM mannitol and 10 mM EGTA in 50 mM Tris/HCl. The tissue was finely minced and then homogenized in the same buffer (10 ml of buffer per gram of tissue) using a Potter Elvehjem. The homogenate was centrifuged at 1,300 g for 3 min and the supernatant at 10,000 g for 10 min. The mitochondrial pellet was suspended in cold buffer (pH 7.4) containing 70 mM sucrose and 210 mM mannitol in 50 mM Tris/HCl and centrifuged at 6,500 g for 10 min. The mitochondrial pellet was re-suspended in the same buffer. Mitochondrial protein concentration was measured by the Bradford method by using bovine serum albumin as a standard ²⁸.

Oxidative phosphorylation

Mitochondrial respiratory functions were measured at 25°C using a Clark-type oxygen electrode (Oroboros oxygraph, Austria) ⁸. Mitochondria (350 µg protein/2 ml) were incubated in buffer (pH 7.4) containing 100 mM KCl, 50 mM MOPS, 1 mM EGTA, 5 mM KH₂PO₄, and 1 mg/ml defatted

BSA. Glutamate/Malate (5 mM/5 mM, complex I substrates) and succinate (5 mM, complex II substrate) were used as electron donors to specific sites in the electron transport chain. As previously described, rotenone (6.25 μM) was added with succinate to avoid the reverse electron flow by inhibition of complex I²⁹. Respiration state 3 was initiated by the addition of 200 μM ADP and state 4 without ADP. The oxygen consumption was expressed in $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$. The respiratory control index (RCI) was calculated as the ratio of the state 3/state 4.

Calcium retention capacity

As previously described^{5, 8}, the calcium retention capacity (CRC) was measured with a spectrofluorometer in the presence of 0.5 μM Calcium Green-5N, with excitation and emission wavelengths set at 500 and 530 nm, respectively. Isolated mitochondria (250 μg protein) were suspended in 2 ml of buffer (pH 7.4) containing 150 mM sucrose, 50 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 and 20 mM Tris/HCl. Glutamate/Malate (5 mM/5 mM) or succinate (5 mM) was added into the buffer as substrates. The CRC was measured at baseline and with the reference PTP inhibitor CsA (1 μM). In order to study the influence of complex I inhibition on the mPTP opening, the CRC was also measured in the presence of rotenone (1 μM) and rotenone plus CsA (1 μM each) when succinate was used. Mitochondria were gently stirred for 90 s. At the end of the period, a 10-nmol CaCl_2 administration was performed every minute. Ca^{2+} is rapidly taken up by the mitochondria resulting in a rapid return of extra-mitochondria Ca^{2+} concentration to near baseline level. After sufficient CaCl_2 loading, a rapid increase of the fluorescence indicates a massive release of Ca^{2+} by mitochondria due to mPTP opening. The CRC was expressed as $\text{nmol Ca}^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1}$.

Reactive oxygen species production

Normal cellular metabolism of oxygen produces in a continuous way small quantities of reactive oxygen species (ROS). The quantification of H_2O_2 has been accepted as an indicator of ROS

production by mitochondria^{30, 31}. As previously described, the total H₂O₂ production was measured spectrofluorometrically, using the fluorescent probe Amplex red (10 μM) in the presence of 0.6 U/ml horseradish peroxidase (excitation and emission wavelengths set to 530 and 590 nm, respectively)³². Isolated mitochondria (250 μg protein) were suspended in 2 ml of buffer (pH 7.4) containing 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1.5 mg/ml defatted BSA, and 20 mM Tris/HCl. Glutamate/Malate (5 mM/5 mM) or succinate (5mM) was used as substrates. The H₂O₂ production was assessed by estimating the fluorescence variation in function of time and calculated in nmol H₂O₂.min⁻¹.mg protein⁻¹. The results were presented as the ratio of H₂O₂ production and oxygen consumption (nmol O₂.min⁻¹.mg protein⁻¹) in state 3, and expressed as percentage.

Chemicals

All chemicals reagents of the highest purity were purchased from Sigma-Aldrich. Calcium Green[®]-5N and Amplex Red[®] reagent were purchased from Molecular Probes, Inc. CsA Sandimmun[®] was from Novartis (Basel, Switzerland).

Statistical analysis

All values are expressed as mean ± SEM. Hemodynamics were analyzed by the use of two-way ANOVA with repeated measures on one factor. Differences in the relationship between IS and AAR were evaluated by analysis of covariance (ANCOVA) and *post hoc* Bonferroni's test, with IS as the dependent variable and AAR as the covariant. One-way ANOVA and *post hoc* Bonferroni test were used to analyze differences between the groups. Statistical significance was defined as a value of $p < 0.05$.

RESULTS

Mortality and exclusions

A total of 167 rats were used in the protocol. Two died at the anesthesia induction. Two others died due to the ventilator failure. Three animals were euthanized under deep anesthesia due to an excessive bleeding. In three cases, rats died before the end of reperfusion because of an inability to reperfuse the infarcts. Two rats were excluded on the basis of a too small AAR (AAR/LV<10%). Thus, 155 rats were included in this study (51 for the infarct size and 104 for the mitochondrial pattern).

Hemodynamics

Heart rate and mean arterial blood pressure (MAP) were comparable among groups at baseline ($p = ns$, Table 1). Sustained I/R caused a significant decrease in MAP in control, PreC Isch and PreC Iso groups ($p < 0.05$), but MAP returns near to baseline values at the end of reperfusion period in PreC Isch and PreC Iso groups.

Area at risk and infarct size

Body weight, LV mass, AAR weight, and the ratio of AAR to LV mass were similar between groups (data not shown). When IS was plotted with AAR, data points for the preconditioned groups (PreC Isch, PreC CsA, and PreC Iso) lie below the control line, indicating that for any size of the risk region, the preconditioning protocols resulted in significantly smaller infarcts than controls (Fig. 2A). In contrast, in the postconditioned groups, the regression lines of the PostC Isch and PostC CsA data were comparable from that obtained in the control group, indicating that these protocols fail to protect rat heart in vivo (Fig. 2B). Only Isoflurane-induced postconditioning was able to significantly reduce the IS. These data were confirmed when the IS was expressed as percentage of area at risk (Fig. 2C). PreC Isch, PreC CsA and PreC Iso significantly reduced the IS ($17.1 \pm 3.5\%$, $23.9 \pm 5.4\%$, and $20 \pm$

5.3%, respectively) compared to the control group ($59.4 \pm 2.8\%$, $p < 0.05$). PostC Isch and PostC CsA had no significant effect on IS ($49.5 \pm 4.1\%$ and $52.2 \pm 2.1\%$, respectively), but PostC Iso resulted in significantly smaller infarcts ($36.2 \pm 3.4\%$, $p < 0.05$) than controls.

Oxidative phosphorylation

In the Sham group, respiration of mitochondria using complex I electrons donors was tightly coupled (RCI = 5.7, Table 2). In control group, state 3, state 4 and RCI decreased significantly when compared to the Sham group ($p < 0.05$). The preconditioned groups and the PostC Iso group had a significantly higher state 3 than Control ($p < 0.05$). Similarly, state 4 rates were preserved in the PreC Isch, the PreC Iso, and the PostC Iso groups. As a consequence, RCI was significantly higher in PreC CsA, PreC Iso, and PostC Iso groups when compared to Control group ($p < 0.05$). Using complex II electrons donor, state 3 and state 4 were significantly decreased in the control group compared to the Sham group ($p < 0.05$). This effect was reversed by isoflurane in the PreC Iso and the PostC Iso groups.

Calcium retention capacity

Using complex I electrons donors, CRC averaged 320 ± 33 nmol $\text{CaCl}_2 \cdot \text{mg protein}^{-1}$ in the sham group and was significantly reduced to 166 ± 27 nmol $\text{CaCl}_2 \cdot \text{mg protein}^{-1}$ in the control group ($p < 0.05$, Fig. 3). The PreC and PostC protocols did not significantly modify the values of CRC, compared to the control group. Interestingly, *in vitro* addition of CsA significantly increased CRC in all groups ($p < 0.05$, Fig. 3).

Using complex II electrons donor, CRC averaged 815 ± 77 nmol $\text{CaCl}_2 \cdot \text{mg protein}^{-1}$ in the Sham group and significantly decreased to 276 ± 34 nmol $\text{CaCl}_2 \cdot \text{mg protein}^{-1}$ in the control group ($p < 0.05$). The values of CRC were not different from the control group in all PreC and PostC groups except in the PostC Iso (437 ± 28 nmol $\text{CaCl}_2 \cdot \text{mg protein}^{-1}$). *In vitro* addition of CsA increased CRC of the Sham group (+54%, $p < 0.05$ compared to succinate alone). In contrast, CsA had no effect in all groups

submitted to I/R sequence except in the PostC Iso group (+39%, $p < 0.05$). In all groups, the addition of rotenone, to test the influence of complex I in the presence of succinate, had no significant effects on CRC compared to succinate alone. In contrast, combination of CsA and rotenone significantly increased the CRC in all groups ($p < 0.05$). Only Sham and PreC Isch groups had an increased CRC in this condition when compared to CsA alone (+28% and +75%, respectively, $p < 0.05$).

Reactive oxygen species production

Using complex I electrons donors, H_2O_2 production per O_2 consumed at state 3 was $0.038 \pm 0.002\%$ in the Sham group, and increased significantly in the control group (+171%, $p < 0.05$, Fig. 4A). This small percentage is the consequence of unit's variation between the ROS production (pmol) and oxygen consumption (nmol), and is equivalent to that calculated from another study³³. The different cardioprotection protocols had no significant effects on ROS production, when compared to control group. In contrast, PreC Iso (-60%) and PostC Iso (-79%) groups significantly reduced the H_2O_2 production, compared to the Control group ($p < 0.05$).

The ratio of H_2O_2 production per O_2 consumed in the Sham group was about a hundred times higher with complex II electrons donor ($3.95 \pm 0.32\%$) than with complex I (Fig. 4B). This rate was not significantly modified in the control group. The different cardioprotection protocols had no significant effect compared to control. Nevertheless, PreC Iso and PostC Iso tend to decrease this level to -52% and -23%, respectively, compared to control.

DISCUSSION

In this study, we compared the cardioprotection afforded by various PreC and PostC protocols in the rat *in vivo* model. Our results clearly established the beneficial effects of the different PreC protocols and the PostC induced by isoflurane on the IS sparing in this model. In addition, we focused on the

mitochondrial functions including oxidative phosphorylation, mPTP opening, and H₂O₂ production. We founded that oxidative phosphorylation was related to the IS results. The different PreC protocols and the PostC by isoflurane decreased the mitochondrial H₂O₂ production and only PostC Iso inhibited the mPTP opening by increasing the CRC compared to the control group. These results show up the differences in the metabolic ways of rat model compared to others *in vivo* or *in vitro* models and suggest the implication of intrinsic factors modulation in rat cardiomyocytes, especially on the regulation of the respiratory chain.

Hearts subjected to ischemia injury developed an IS which is proportional to the duration of ischemia³⁴. Early reperfusion could salvage myocardium from infarction and reduce IS³⁵. However, reperfusion is a double-edged sword which not only rescues from infarction but also induces irreversible damage³⁶. Based on this, Zhao et al.⁶ first reported that several brief cycles of I/R applied on the first moment of reperfusion reduced IS. Since, the cardioprotective effect of ischemic PostC has been verified in many species, including dogs⁶, pigs⁷, rabbits⁸, mice⁹, and even humans¹⁰. In rats, this phenomenon seems to be ambiguous, at the difference of PreC. In the literature, some studies demonstrated that ischemic PostC protects this specie¹¹⁻¹³ while other one's failed too¹⁴⁻¹⁵. Vinten-Johansen's group found that ischemic PostC was significantly less efficient than PreC in a rat *in vivo* model¹¹. These authors evoked the fact that rats have greater xanthine oxidase activity and greater production of oxygen radicals than other species. In addition, several studies investigated pharmacological PostC by CsA or volatile anaesthetic^{14, 18, 37-38}. So, Huhn et al³⁷ showed that CsA administered just before reperfusion reduced the IS whereas Dow et al¹⁴ failed with the same pharmacological PostC. Conversely, volatils anesthetics sevoflurane and isoflurane, which had been demonstrated as being cardioprotectors as well in PreC or PostC in the *in vivo* rabbit and mouse models^{18, 38-39}, are also efficient in the rat heart^{37, 40-42}. In the present study, we questioned whether the paradox of the PreC and PostC in the rat can be linked to the protocol used. For understand this, we treated animals with three distinguish protocols: ischemic, CsA and isoflurane PreC and PostC procedures. As expected, we have shown that all PreC protocols reduce the IS after a 30 min ischemia, with a same effect (from -60 to -70% vs. control group). In contrast, PostC Isch and PostC CsA failed

to reduce IS. This result is in accordance with the observations of Dow et al ¹⁴ who showed that whatever the duration of ischemia and the protocol used, PostC Isch and PostC CsA does not reduce IS in the rat. The difference with their study is that ours was carried out on males whereas theirs was on females. However, although this effect was smaller in females, PostC reduced IS in both genders ⁴³. Finally, in agreement with literature ^{20, 41}, we demonstrated that isoflurane was efficient to induce postconditioning on the rat heart. Taking together, these results show that rat cardiomyocytes seems particularly sensitive to ischemia, which results in an increased difficulty to postcondition these animals. Although the signal ways of PreC and PostC are not clearly elucidated, it seems that the reperfusion injury salvage kinase pathway, with the inhibition of the opening of the mPTP like finality, plays an important role in this protection ⁴⁴⁻⁴⁵. Ischemia seems to have a critical and differential consequence on the signal ways involved in the cardioprotection. Signals applied before ischemia, as PreC, seems to be more efficient than those administered at the end of ischemia, as PostC. Thus, PostC Isch, PostC CsA, and PostC Iso, well having common signal ways, must certainly have proper ones which were differently affected by ischemia. This would explain why PostC Iso is effective in our model whereas the two others are not.

Mitochondria are proposed to play an essential role in the mechanism of cardioprotection. The primary mitochondrial function is to produce the energy necessary for cellular functioning. We showed in the present study that all PreC protocols and PostC Iso increased oxidative phosphorylation in the presence of complex I substrates. Thus, there is a correlation between effectiveness of the treatment on the IS reduction and oxidative phosphorylation in this rat *in vivo* model. However, our group ⁸ recently demonstrated in a rabbit *in vivo* model that PostC Isch inhibited mPTP opening independently to oxidative phosphorylation. The rat model appears clearly to be different from the other species regarding the PostC phenomenon. Concerning PostC Iso, Pravdic et al ⁴¹ demonstrated that *in vivo* PostC Iso decreased oxidative phosphorylation with complex I substrates in a rat model. Moreover, these authors also showed that *in vitro* PostC Iso, but not PreC Iso, preserved oxidative phosphorylation in isolated mitochondria. Isoflurane has been shown to inhibit complex I of the respiratory chain ⁴⁶. In addition, some authors showed that PreC and PostC with amobarbital inhibited

the complex I activity and decreased IS in Langendorff-perfused rat hearts²²⁻²³. Furthermore, they demonstrated that the specific site that elicits mitochondrial damage during ischemia is likely located in the segment between complex III and cytochrome oxidase⁴⁷. An inhibition upstream of this site protects from the mitochondrial damage. Thus, there is potentially a link between the efficiency of isoflurane in our model and the inhibition of the complex I activity by this pharmacological agent.

An important consequence of ischemia is an uncontrolled uptake of calcium which in turn results in the opening of the mPTP. Strategies aimed at protecting against I/R injuries have focused on mitochondria, especially on the mPTP⁴⁸. Indeed, our group established in different species and even in human that the inhibition of the mPTP opening conditions the success of PostC^{8-9, 49}. Pravdic et al^{19, 41} demonstrated that PreC and PostC with isoflurane delayed the opening of the mPTP in the rat. We showed that whatever the substrates used, I/R decreased the CRC, and all the treatments had no effect on this, except in the PostC Iso group with succinate. These results are in apparent discrepancy with many studies, including in our own laboratory, who have demonstrated that PreC and PostC induced inhibition of mPTP opening^{9, 38, 50}. These differences can be due to the species and models (like Langendorff-perfused hearts) used. In rat model, Pravdic et al.^{19, 41} demonstrated that PreC and PostC with isoflurane inhibited the mPTP opening in the presence of complex I substrates. In our study, we showed that only PostC Iso with complex II substrate inhibited the mPTP opening. This can be explained by the difference of the methods used between these studies. Thus, Pravdic et al^{19, 41} used different protocols (time administration and concentration of isoflurane, PreC Iso without ischemia after), buffers, substrates (pyruvate/malate for complex I electrons donors) and index of mPTP opening ($\Delta\Psi_m$) that us. In order to check the capacity of CsA to inhibit the mPTP opening by detaching cyclophilin D (Cyp D) from the other components of the pore, we measured the CRC after *in vitro* addition of CsA. We showed that *in vitro* addition of CsA delayed the opening of the mPTP in all groups with Glutamate/Malate as substrates. Furthermore, in these conditions, the value of the CRC is higher in the Sham group compared to all the I/R groups, which seems shown that ischemia partially bound Cyp D to mPTP proteins.

Interestingly, with succinate as substrate, this phenomenon was abolished when ischemia undergoes, except in the PostC Iso group. Thus, it seems that after ischemia there is only a correlation between the complex I and the CsA's target the Cyp D. Inhibition of complex I by rotenone, which did not have any effect when used alone, restored the property of CsA to delay the mPTP opening in all groups. It seems that the mPTP, who has a "normal" functioning on intact mitochondria (*e.g.* response to CsA added *in vitro*), loses its capacity after an ischemia. It thus seems there is a regulation of the mPTP by complex I and Cyp D. This is in agreement with Chauvin et al ⁵¹ which demonstrated that respiratory chain complex I plays a key role in mPTP regulation. Furthermore, it seems that the value of the CRC in the presence of rotenone plus CsA after stimulation of complex II is overall identical to that in the presence of CsA after stimulation of complex I. It thus seems that the mitochondria are to the maximum of their capacities of Ca²⁺ uptake. All these results show the difficulty to establish a relation between the mPTP and the IS in rat model.

In physiological function of mitochondria, the electron transport chain produces superoxide (O₂⁻) in relation with oxygen consumption ⁵². Superoxide is converted into H₂O₂ in the matrix or in the cytosol by antioxidant enzymes. The sites of superoxide production have been localized to complex I and III in mitochondrial electron transport chain ⁵³⁻⁵⁴. It is established that ischemia and I/R increased the H₂O₂ production in rat heart mitochondria ^{22, 55}. Thus, cardiac ischemia damages the ETC, decreases the oxidative phosphorylation and O₂ consumption ²², and in turn results in the uncoupling of the respiratory chain. To illustrate this phenomenon and examine the effect of various protocols used in the present work, we presented the ratio of rates of H₂O₂ production and oxygen consumption in state 3 in each group (Fig. 4). In agreement with previous study ⁵⁶, our results confirm that with Glutamate/Malate substrates the H₂O₂ production from isolated mitochondria in Sham group is low. In Control group, the percentage of H₂O₂ production was some 2-fold greater. Of all the I/R groups, only isoflurane reduced this production. These results reinforce the idea that the isoflurane acts by the inhibition of the complex I ⁴⁶. However, PreC Isch and PreC CsA do not reduce the H₂O₂ production in spite of their effects on oxidative phosphorylation. Nevertheless, only isoflurane restores the oxidative phosphorylation with the substrate of complex II. Recently, Schaller et al ²⁴ demonstrated a

reduction of IS in rat with a new PostC pharmacological agent (TRO40303), and proposed a mechanism implicating both oxidative stress and inhibition of mPTP opening. Thus, a possibility of succeeding with postconditioning the rat is to reduce the ROS production which then will affect the mPTP opening.

In summary, in our in vivo rat model of myocardial I/R, PreC induced by three independent protocols reduced myocardial IS. In contrast, PostC Isch and PostC CsA did not reduce myocardial IS. Only PostC Iso reduces the IS. Mitochondrial functions were tested, including oxidative phosphorylation, mPTP opening and ROS production. We demonstrated that there is a good correlation between effectiveness of the treatment on the IS reduction and oxidative phosphorylation. However, we did not find a relation between the inhibition of the mPTP and the quantity of the IS in rat model. Finally, PreC and PostC by Isoflurane reduced the ROS overproduction consecutive to I/R and inhibit the mPTP opening, potentially acting by the inhibition of the complex I.

In conclusion, the present study demonstrates the complexity of the rat model, for which the success of the PreC and PostC passes by a safeguarding of the respiratory chain. In PostC, the reduction of IS require a reduction in the production of ROS and an inhibition of mPTP opening.

Acknowledgments

The work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U886) and also by a grant from the program INSERM DHOS n° ASE09027CSA (to Dr. Chiari). Damien De Paulis was a recipient of a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France.

References

1. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
2. Li Y, Kloner RA. The cardioprotective effects of ischemic 'preconditioning' are not mediated by adenosine receptors in rat hearts. *Circulation* 1993;87:1642-8.
3. Ovize M, Aupetit JF, Rioufol G, et al. Preconditioning reduces infarct size but accelerates time to ventricular fibrillation in ischemic pig heart. *Am J Physiol* 1995;269:H72-9.
4. Miller DL, Van Winkle DM. Ischemic preconditioning limits infarct size following regional ischemia-reperfusion in in situ mouse hearts. *Cardiovasc Res* 1999;42:680-4.
5. Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, et al. Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 2004;61:115-22.
6. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H579-88.
7. Iliodromitis EK, Georgiadis M, Cohen MV, Downey JM, Bofilis E, Kremastinos DT. Protection from post-conditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs. *Basic Res Cardiol* 2006;101:502-7.
8. Paillard M, Gomez L, Augeul L, Loufouat J, Lesnefsky EJ, Ovize M. Postconditioning inhibits mPTP opening independent of oxidative phosphorylation and membrane potential. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:902-9.
9. Gomez L, Thibault H, Gharib A, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H1654-61.

10. Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005;112:2143-8.
11. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2004;62:74-85.
12. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F. Postconditioning--A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2005;100:295-310.
13. Tang XL, Sato H, Tiwari S, et al. Cardioprotection by postconditioning in conscious rats is limited to coronary occlusions <45 min. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H2308-17.
14. Dow J, Kloner RA. Postconditioning does not reduce myocardial infarct size in an in vivo regional ischemia rodent model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2007;12:153-63.
15. Kaljusto ML, Mori T, Mohammad Husain Rizvi S, et al. Postconditioning in rats and mice. *Scand Cardiovasc J* 2006;40:334-41.
16. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:367-74.
17. Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 2005;280:18558-61.
18. Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier 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;102:102-9.

19. Pravdic D, Sedlic F, Mio Y, Vladic N, Bienengraeber M, Bosnjak ZJ. Anesthetic-induced preconditioning delays opening of mitochondrial permeability transition pore via protein Kinase C-epsilon-mediated pathway. *Anesthesiology* 2009;111:267-74.
20. Feng J, Fischer G, Lucchinetti E, et al. Infarct-remodeled myocardium is receptive to protection by isoflurane postconditioning: role of protein kinase B/Akt signaling. *Anesthesiology* 2006;104:1004-14.
21. Tsutsumi YM, Yokoyama T, Horikawa Y, Roth DM, Patel HH. Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning: in vivo and in vitro characterization. *Life Sci* 2007;81:1223-7.
22. Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury following reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319:1405-12.
23. Stewart S, Lesnefsky EJ, Chen Q. Reversible blockade of electron transport with amobarbital at the onset of reperfusion attenuates cardiac injury. *Transl Res* 2009;153:224-31.
24. Schaller S, Paradis S, Ngoh GA, et al. TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;333:696-706.
25. Skyschally A, van Caster P, Iliodromitis EK, Schulz R, Kremastinos DT, Heusch G. Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. *Basic Res Cardiol* 2009;104:469-83.
26. Argaud L, Prigent AF, Chalabreysse L, Loufouat J, Lagarde M, Ovize M. Ceramide in the antiapoptotic effect of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H246-51.
27. Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol* 1985;121:522-30.
28. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.

29. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;3:965-76.
30. Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 1975;54:311-4.
31. Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 1974;42:68-72.
32. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003;278:36027-31.
33. Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C460-6.
34. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977;56:786-94.
35. Ginks WR, Sybers HD, Maroko PR, Covell JW, Sobel BE, Ross J, Jr. Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion. *J Clin Invest* 1972;51:2717-23.
36. Heusch G. Postconditioning: old wine in a new bottle? *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1111-2.
37. Huhn R, Heinen A, Weber NC, Hollmann MW, Schlack W, Preckel B. Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore. *Br J Anaesth* 2008;100:465-71.

38. Ge ZD, Pravdic D, Bienengraeber M, et al. Isoflurane postconditioning protects against reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition by an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Anesthesiology* 2010;112:73-85.
39. Piriou V, Chiari P, Gateau-Roesch O, et al. Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology* 2004;100:581-8.
40. Ljubkovic M, Mio Y, Marinovic J, et al. Isoflurane preconditioning uncouples mitochondria and protects against hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C1583-90.
41. Pravdic D, Mio Y, Sedlic F, et al. Isoflurane protects cardiomyocytes and mitochondria by immediate and cytosol-independent action at reperfusion. *Br J Pharmacol* 2010;160:220-32.
42. Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Scharbatke H, Preckel B, Schlack W. The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo. *Anesth Analg* 2005;101:1252-60.
43. Penna C, Tullio F, Merlino A, et al. Postconditioning cardioprotection against infarct size and post-ischemic systolic dysfunction is influenced by gender. *Basic Res Cardiol* 2009;104:390-402.
44. 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;95:230-2.
45. Yang XM, 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;44:1103-10.
46. Hanley PJ, Ray J, Brandt U, Daut J. Halothane, isoflurane and sevoflurane inhibit NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of cardiac mitochondria. *J Physiol* 2002;544:687-93.

47. Chen Q, Yin G, Stewart S, Hu Y, Lesnefsky EJ. Isolating the segment of the mitochondrial electron transport chain responsible for mitochondrial damage during cardiac ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;397:656-60.
48. Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, Forte M. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci* 2001;26:112-7.
49. Piot C, Croisille P, Staat P, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2008;359:473-81.
50. Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol* 2003;549:513-24.
51. Chauvin C, De Oliveira F, Ronot X, Mousseau M, Leverve X, Fontaine E. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem* 2001;276:41394-8.
52. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552:335-44.
53. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 2000;25:502-8.
54. Herrero A, Barja G. Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev* 1997;98:95-111.
55. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004;61:461-70.
56. Lambert AJ, Brand MD. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 2004;279:39414-20.

Table 1**Hemodynamic measurements**

Groups	Baseline		15 min CAO		15 min reperfusion	
	HR (bpm)	MAP (mmHg)	HR (bpm)	MAP (mmHg)	HR (bpm)	MAP (mmHg)
Sham	401 ± 22	113 ± 8	397 ± 20	106 ± 11	402 ± 20	90 ± 5
Control	409 ± 10	100 ± 6	424 ± 18	75 ± 6*	381 ± 6	69 ± 3*
PreC Isch	404 ± 12	90 ± 8	447 ± 19	71 ± 7*	423 ± 17	91 ± 9
PreC CsA	407 ± 23	102 ± 7	451 ± 15	101 ± 6	436 ± 21 [†]	94 ± 8
PreC Iso	416 ± 13	99 ± 8	433 ± 20	74 ± 6*	409 ± 16	82 ± 6
PostC Isch	404 ± 15	102 ± 9	455 ± 13*	94 ± 5	426 ± 10	78 ± 5
PostC CsA	385 ± 28	87 ± 14	450 ± 12*	89 ± 11	447 ± 8* [†]	97 ± 6 [†]
PostC Iso	408 ± 11	109 ± 7	453 ± 10*	97 ± 7	436 ± 11 [†]	99 ± 9 [†]

HR: heart rate; bpm: beats per minute; MAP: mean arterial pressure; CAO: coronary artery occlusion.

n = 5-8 / group. * p<0.05 vs. baseline; [†] p<0.05 vs. control.

Table 2**Oxydative phosphorylation**

	Sham	Control	PreC Isch	PreC CsA	PreC Iso	PostC Isch	PostC CsA	PostC Iso
Complex I								
State 3	59 ± 5	13 ± 1*	28 ± 4 [†]	26 ± 4 [†]	30 ± 4 [†]	18 ± 1	14 ± 3	36 ± 5 [†]
State 4	11 ± 1	6 ± 1*	9 ± 1 [†]	7 ± 1	9 ± 1 [†]	6 ± 1	6 ± 1	9 ± 1 [†]
RCI	5.7 ± 0.2	2.1 ± 0.2*	3.2 ± 0.2	3.7 ± 0.5 [†]	3.4 ± 0.4 [†]	3.1 ± 0.2	2.5 ± 0.6	3.8 ± 0.5 [†]
Complex II								
State 3	45 ± 4	24 ± 4*	33 ± 5	34 ± 2	39 ± 2 [†]	27 ± 1	33 ± 2	39 ± 1 [†]
State 4	32 ± 4	21 ± 4*	29 ± 5	28 ± 2	33 ± 2 [†]	23 ± 1	30 ± 2	32 ± 1 [†]
RCI	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1*	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1

State 3 and state 4 were measured in isolated mitochondria with Glutamate/Malate (complex I) or succinate/rotenone (complex II), and expressed in nmol O₂.min⁻¹.mg protein⁻¹. RCI: respiratory control index (state 3/state 4). n = 5-8 / group. * p<0.05 vs. Sham; [†] p<0.05 vs. Control.

Figure 1.

Experimental protocol. All groups underwent 30 min of ischemia followed by 15 min (isolated mitochondria experiments) or 2 h (infarct size experiments) of reperfusion. I: ischemia ; R: reperfusion ; CsA, Cyclosporine A; MAC, minimum alveolar concentration; PreC Isch, preconditioning by three 3-min I / 5-min R cycles; PreC CsA, preconditioning by the injection of CsA (10mg/kg) 10 min before ischemia; PreC Iso, preconditioning by two cycles of 15-min isoflurane administration (1.0 MAC) followed by 5 min washout; PostC Isch, six 10-s cycles of postconditioning; PostC CsA, postconditioning by the injection of CsA (10mg/kg) 5 min before reperfusion; PostC Iso, postconditioning by isoflurane (1.5 MAC) administered for 5 min before and 5 min after the onset of reperfusion.

Figure 2.

Infarct size. Panels A and B: necrosis plotted as a function of area at risk. Both individual values and the regression lines obtained by linear regression analysis are illustrated. Preconditioning (A) and Postconditioning (B) data were compared to control animals. In all groups, infarct size was positively and linearly related to the size of the area at risk. Analysis of covariance demonstrated that the regression lines for PreC Isch, PreC CsA, PreC Iso and PostC Iso groups were significantly different from that for control group, indicating that, when compared to the control group, they develop a smaller infarct for any size of the area at risk. Panel C: myocardial infarct size expressed as a percentage of area at risk. All Preconditioning protocols, but only PostC Iso, significantly reduced infarct size compared to the Control group. n = 6-8 / group. * p<0.05 vs. control

Figure 3.

Calcium retention capacity (CRC). CsA: Cyclosporine A. n = 5-8 / group. * p<0.05 vs. respective substrate only; † p<0.05 vs. Control; § p<0.05 vs. Succinate + CsA

Figure 4.

Ratio of H₂O₂ production and oxygen consumption in state 3 with Glutamate/Malate (A) and succinate (B). n = 5-8 / group. * p<0.05 vs. Sham; † p<0.05 vs. Control

Figure 1.

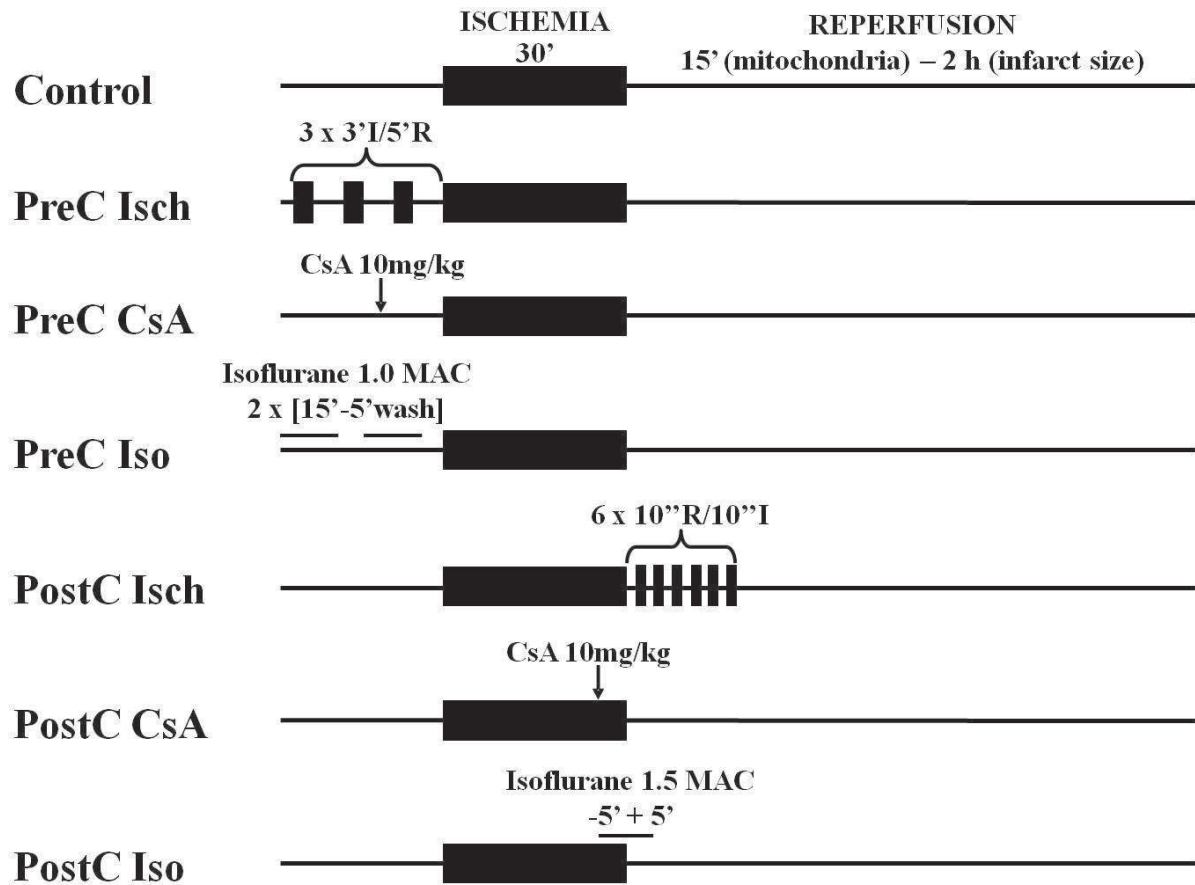
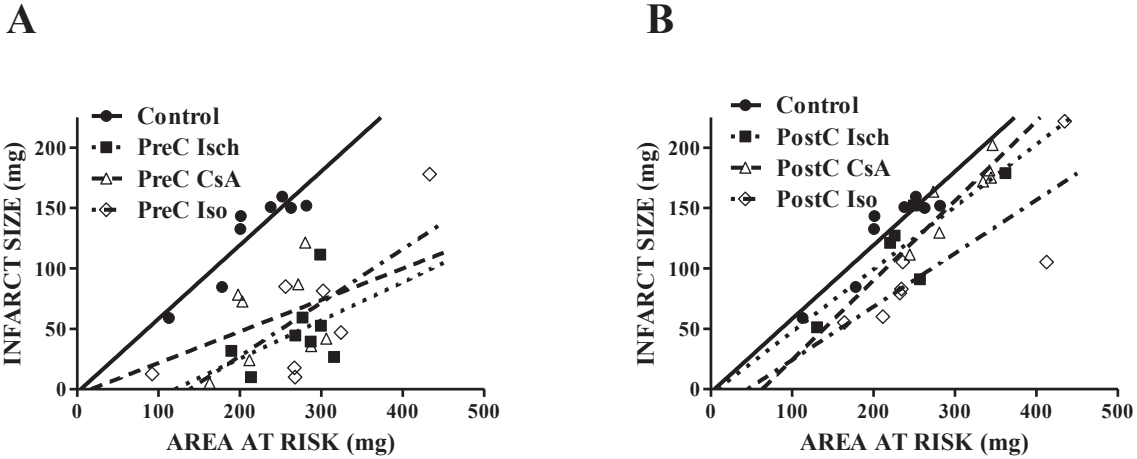


Figure 2.



C

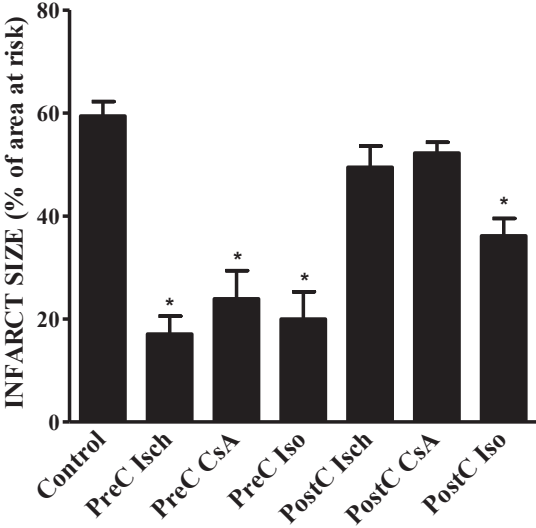


Figure 3.

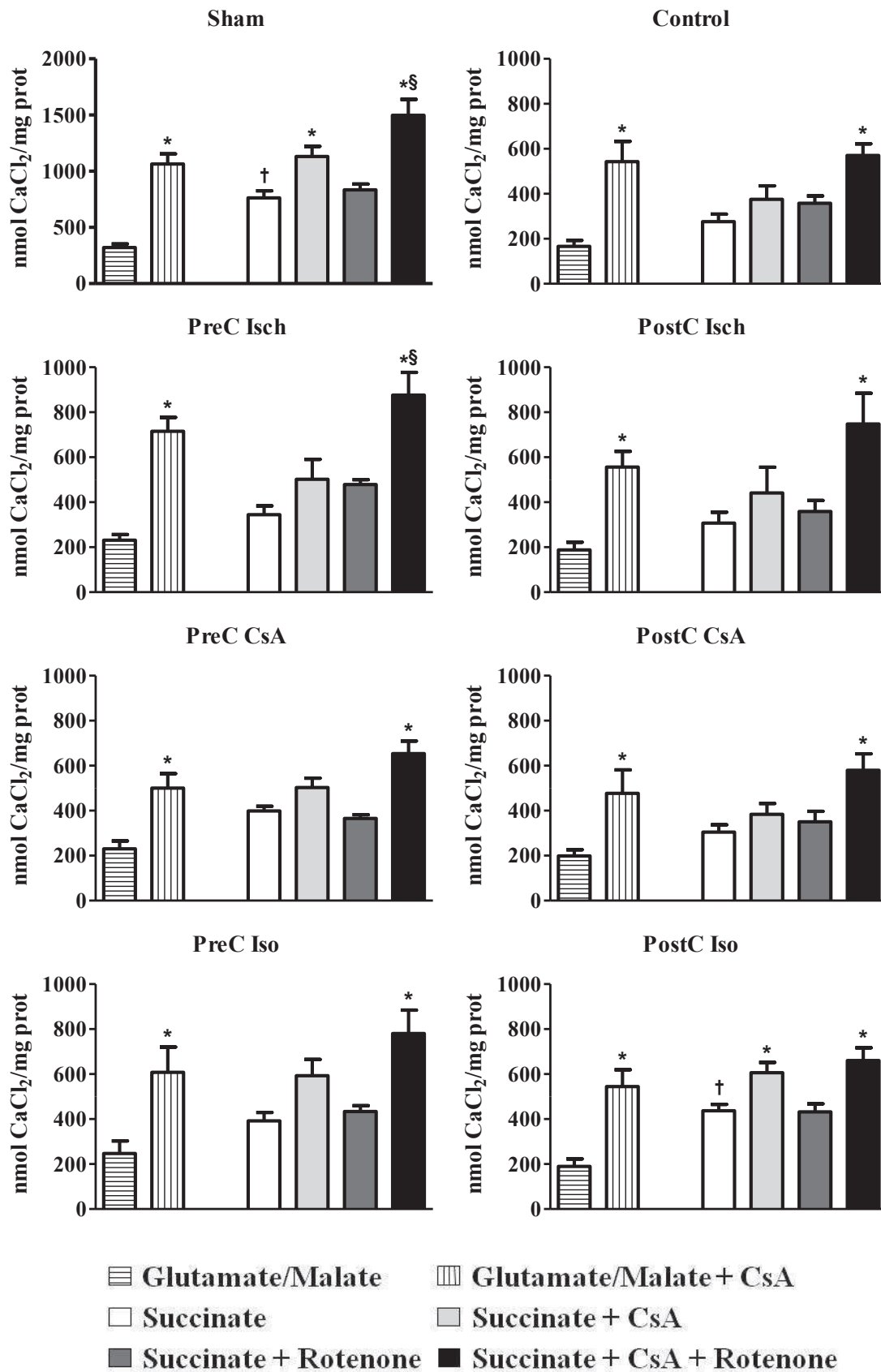
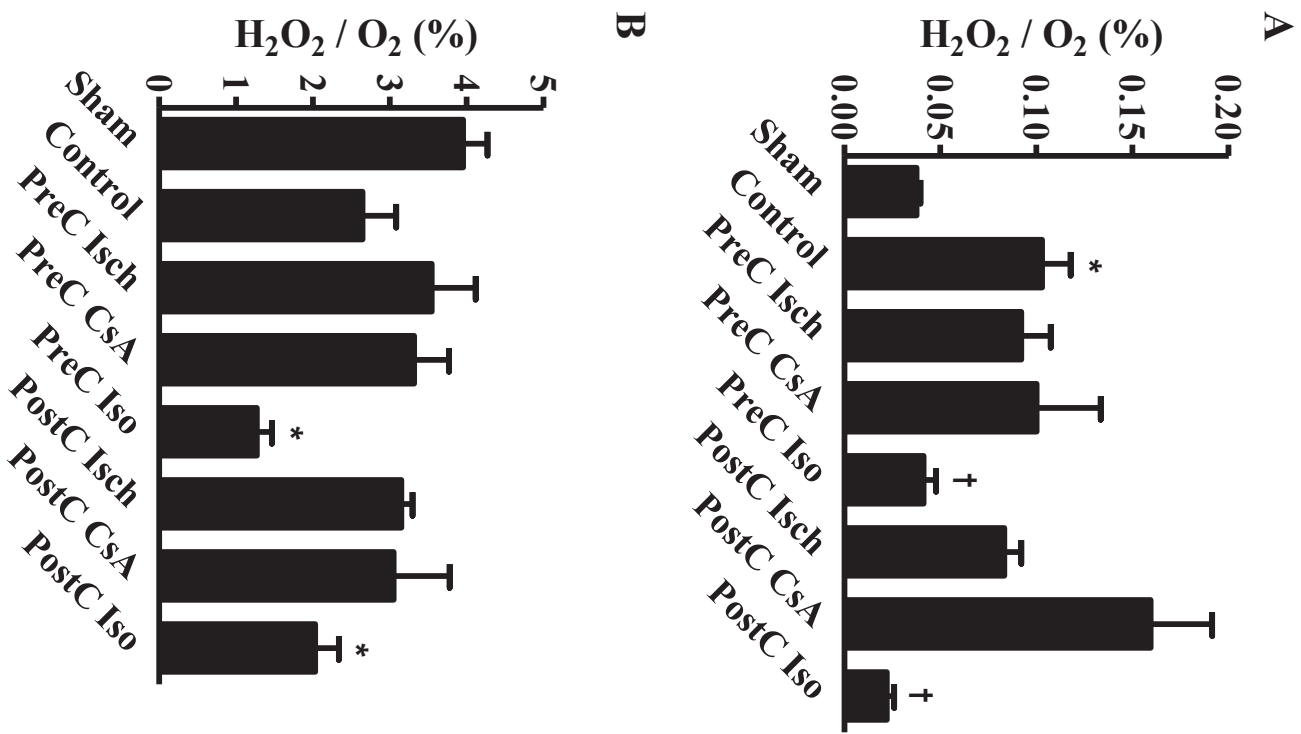


Figure 4.



Synthèse des résultats et discussion

Manintveld et al.³⁰⁵ ont montré que le PostC Isch protégeait le cœur contre les lésions d'I/R lorsque la durée de l'ischémie était comprise entre 45 et 60 minutes. Nous avons commencé une étude pilote (résultats non présentés) en nous basant sur leurs travaux. Ainsi, nous avons étudié l'effet du PreC Isch (afin de valider notre modèle) sur les lésions d'I/R consécutives à une ischémie de 45 minutes. Le PreC Isch permet de réduire significativement la taille de l'infarctus comparé au groupe contrôle ($44.1 \pm 4.6\%$ vs $58.2 \pm 3.3\%$ de l'aire à risque, respectivement). Cependant, la protection limitée de ce traitement préventif (seulement -24% de réduction de taille d'infarctus) nous a conduit à redéfinir notre modèle afin de ne pas masquer le possible effet bénéfique du PostC Isch, admis comme étant moins efficace que le PreC Isch. Au regard de la littérature^{298, 325, 357}, nous avons décidé de réduire la durée de l'ischémie à 30 minutes. Ce raccourcissement ne modifie pas significativement la taille de l'infarctus ($59.4 \pm 2.8\%$ pour 30 minutes contre $58.2 \pm 3.3\%$ pour 45 minutes). Néanmoins, le bénéfice du PreC Isch est beaucoup plus important dans ces conditions (-70% de réduction de taille d'infarctus). Nous avons donc décidé d'arrêter la durée de l'ischémie à 30 minutes dans notre modèle puisque la quantité de myocarde potentiellement préservable est très importante.

Nous avons montré que les trois types de PreC testés dans notre étude (PreC Isch, PreC CsA et PreC Iso) diminuaient significativement la taille de l'infarctus par rapport au groupe contrôle, avec une efficacité comparable entre les groupes (entre -60 et -70% de réduction de taille d'infarctus).

A l'inverse, ni le PostC Isch, ni le PostC CsA n'ont permis de réduire significativement la taille de l'infarctus. Nous avons également testé un deuxième algorithme de PostC Isch (3 cycles de 10 s de reperfusion/10 s d'ischémie au lieu de 6 cycles). Ce 2^{ème} type de PostC Isch a également échoué à réduire la taille de l'infarctus ($55.3 \pm 3.3\%$, $p = ns$ vs groupe contrôle). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Dow et al.³⁵⁸ qui ont montré que quels que soient la durée de l'ischémie et le protocole utilisé, le PostC Isch et le PostC CsA ne réduisaient pas la taille de l'infarctus chez le rat. En revanche, nous avons montré que le PostC Iso réduisait les lésions d'I/R. Nos résultats indiquent que le modèle du rat est sensible au PostC mais dans des conditions particulières. Les PostC Isch, PostC CsA et PostC Iso, bien qu'ayant des voies de signalisation communes, doivent très certainement avoir des voies propres qui sont affectées différemment par l'ischémie. Ceci peut expliquer pourquoi le PostC Iso est effectif dans notre modèle alors que les PostC Isch et PostC CsA ne le sont pas.

Les mitochondries jouent un rôle majeur dans les processus de cardioprotection dans plusieurs espèces. Nous avons donc étudié la phosphorylation oxydative, l'ouverture du mPTP et la production de ROS de nos différents groupes afin de voir si la réussite du conditionnement était corrélée à ces différentes fonctions mitochondriales.

Les mitochondries cardiaques des rats soumis à une séquence d'I/R ont un découplage de leur chaîne respiratoire. Les trois protocoles de PreC et le PostC Iso préviennent ce découplage, à l'inverse du PostC Isch et du PostC CsA. Nos résultats suggèrent que la préservation de la

phosphorylation oxydative est une condition nécessaire à la réussite du conditionnement chez le rat.

L'I/R module également le mPTP puisqu'elle favorise son ouverture. Lorsque le complexe I est stimulé, les trois protocoles de PreC et de PostC ne modifient pas l'ouverture du mPTP par rapport au groupe contrôle. Dans ces conditions, l'ajout de CsA *in vitro* inhibe l'ouverture du mPTP de tous les groupes. Lorsque le complexe II est stimulé, seul le groupe PostC Iso retarde l'ouverture de ce pore. L'addition de CsA inhibe l'ouverture du mPTP du groupe sham mais pas des groupes soumis à une séquence d'I/R, hormis pour le groupe PostC Iso. L'inhibition du complexe I par la roténone, qui n'a aucun effet lorsqu'elle est utilisée seule, restaure la propriété de la CsA à retarder l'ouverture du mPTP dans tous les groupes. Il semble donc que le mPTP soit régulé par le complexe I et la Cyp D. A la différence des autres espèces, l'inhibition du mPTP n'apparaît pas comme un événement incontestable dans le processus de cardioprotection chez le rat. Cette spécificité pourrait être à l'origine de la difficulté à postconditionner cet animal. Cependant, il serait nécessaire d'approfondir nos investigations afin d'argumenter cette hypothèse.

Lorsque le complexe II est stimulé, la voie de production mitochondriale d'H₂O₂ n'est pas différente entre les groupes sham et contrôle. Les différents protocoles de PreC et PostC ne modifient pas cette production par rapport au groupe contrôle. Lorsque le complexe I est stimulé, la voie de production mitochondriale d'H₂O₂ augmente dans le groupe contrôle par rapport au groupe sham. Cette production est diminuée uniquement dans les groupes traités à l'isoflurane. La réussite du PreC Isch et du PreC CsA n'est donc pas directement dépendante d'une baisse de la production de ROS. A l'inverse, le traitement à l'isoflurane, qu'il soit préventif ou palliatif, réduit la production de ces radicaux libres. Ces résultats confirment que les modes d'action de ces différents protocoles ne sont pas les mêmes. Il est donc possible que la réussite du PostC nécessite une réduction de la production de ROS. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en quantifiant la taille de l'infarctus après traitement par un piègeur de radicaux libres, conjointement à l'application d'un PostC Isch.

Nos résultats démontrent la complexité de la cardioprotection chez le rat. Alors que les trois types de PreC testés dans notre étude montrent un effet bénéfique, seul le PostC à l'isoflurane est cardioprotecteur. L'étude des fonctions mitochondriales cardiaques démontre qu'elles ne sont pas spécialement impliquées dans la cardioprotection induite chez le rat, à la différence des autres espèces. La phosphorylation oxydative est préservée dans tous les groupes cardioprotégés. Il semble donc que le succès du PreC et du PostC nécessite la sauvegarde de la respiration mitochondriale. Contrairement aux autres espèces, le mPTP ne semble pas jouer un rôle majeur dans la cardioprotection chez le rat. Nos résultats montrent que le complexe I de la chaîne respiratoire régule l'ouverture du mPTP, en accord avec Fontaine et al.⁴⁷. Ce complexe I pourrait en fait être plus qu'un simple régulateur de ce pore. Bien que nos résultats ne le démontrent pas clairement, il apparaît envisageable que ce complexe soit en réalité un élément constitutif du mPTP. Cette hypothèse est étudiée plus en détail dans le 2^{ème} article de ce travail. Nous avons également montré que seul le traitement à l'isoflurane permettait de réduire la surproduction de ROS consécutive à la séquence d'I/R. La réduction de la taille de l'infarctus par le PostC chez le rat peut ainsi nécessiter, en plus de la sauvegarde de la

respiration mitochondriale, une réduction de la production de ROS et une inhibition de l'ouverture du mPTP.

ARTICLE N° 2

**Regulation of mitochondrial permeability transition by
complex I and cyclophilin D**

Bo Li, Christiane Chauvin, **Damien De Paulis**, Frédéric De Oliveira,
Abdallah Gharib, Guillaume Vial, Xavier Leverve, Michel Ovize,
Eric Fontaine.

Soumis à Science

Résumé

Objectif : L'inhibition de l'ouverture du mPTP prévient la mort cellulaire induite par un stress oxydatif, notamment lors des lésions d'I/R. La régulation de ce pore est un déterminant majeur des stratégies visant à réduire ces lésions. L'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire inhibe l'ouverture de ce pore dans plusieurs types tissulaires. Le but de ce travail est d'étudier la relation de la Cyp D et du complexe I sur la régulation du mPTP dans une large variété de tissus.

Matériels et méthodes : L'ouverture du mPTP est mesurée par spectrofluorimétrie sur différentes populations cellulaires, incluant les mitochondries isolées de foie et de cœur de rat et de souris *wild type* et *Cyp D^{-/-}*. Cette ouverture est mesurée sous différentes conditions : à l'état de base ; en présence de roténone, un inhibiteur du complexe I ; en présence de CsA, la molécule inhibitrice de référence du mPTP ; ou en présence conjointe de ces deux composés. Les quantités de Cyp D, de complexe I et d'ANT sont mesurées par Western blot après séparation protéique par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 10%.

Résultats : La roténone inhibe l'ouverture du mPTP des mitochondries de foie de souris ainsi que des cellules C6 de tumeurs gliales et MH1C1 de carcinome hépatocellulaire de rat. A l'inverse, elle ne modifie pas le mPTP des mitochondries cardiaques de rat et de souris, ainsi que les mitochondries de foie et les hépatocytes perméabilisés de rat. La roténone inhibe l'ouverture du mPTP lorsque la Cyp D est détachée ou absente (mitochondries cardiaques de souris *Cyp D^{-/-}*). La combinaison de roténone plus CsA inhibe plus fortement l'ouverture de ce pore que la CsA seule sur les cellules pour lesquelles la roténone seule n'a pas d'effet. Le taux de Cyp D est plus important dans ces cellules que dans celles où la roténone a un effet sur le mPTP.

Conclusion : L'inhibition du complexe I régule l'ouverture du mPTP de façon Cyp D-dépendante. Puisque la Cyp D est le seul composant indiscutable du mPTP, ces résultats suggèrent que le complexe I ferait également partie de la composition de ce pore.

Regulation of Mitochondrial Permeability Transition by Complex 1 and Cyclophilin D

Bo Li^{1,2*}, Christiane Chauvin^{3,4*}, Damien De Paulis^{1,2}, Frédéric De Oliveira^{3,4}, Abdallah Gharib^{1,2},
Guillaume Vial^{3,4}, Xavier Leverve^{3,4}, Michel Ovize^{1,2} & Eric Fontaine^{3,4}

¹INSERM U886

F-69373, Lyon, France

²Université Claude Bernard Lyon 1

F-69373, Lyon, France

³INSERM, U884,

F-38041, Grenoble, France

⁴Université Joseph Fourier, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée,

F-38041, Grenoble, France

Running head: PTP regulation by Complex 1.

Address correspondence to: Eric Fontaine, INSERM U884, Bioénergétique Fondamentale et Appliquée - Université Joseph Fourier - BP 53, F-38041 Grenoble Cedex, France. Tel + 33 476 63 56 01; Fax + 33 476 51 42 18; e-mail: eric.fontaine@ujf-grenoble.fr

*These authors have equally contributed to this work.

Prolonged opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP) leads to the release into the cytosol of mitochondrial pro-apoptotic mediators¹. Inhibition of PTP opening has been proven to be an effective strategy to prevent oxidative stress-induced cell death²⁻⁴, including ischemia-reperfusion injury in man⁵. PTP regulation has been extensively studied in rat liver mitochondria⁶, assuming that it is identical in every tissue. However, respiratory chain Complex 1 inhibition prevents PTP opening in some tissues⁷⁻⁹. Here we show that low level of Cyclophilin D characterizes tissues where Complex 1 regulates PTP opening, and that detachment or ablation of Cyclophilin D restores the regulation by Complex 1 in tissues with high level of Cyclophilin D. Because Cyclophilin D is the only indisputable component of the PTP³⁻⁴, these results suggest that Complex 1 may be a hitherto unrecognized component of the pore.

The mitochondrial permeability transition (PT) consists in a sudden increase in the permeability of the inner mitochondrial membrane, which becomes non-selectively permeable to molecules smaller than 1500 Da⁶. It is believed that PT is due to the opening of an inner membrane channel regulated by other mitochondrial proteins. This multi proteins complex is called the Permeability Transition Pore (PTP). Despite numerous efforts, the exact molecular nature of the PTP remains elusive. The matrix protein Cyclophilin D (CyP-D) is the only indisputable component of the PTP³⁻⁴. Although the molecular target of CyP-D has not been found yet, CyP-D favours PTP opening when it binds the PTP¹⁰. The reference PTP inhibitor Cyclosporin A (CsA) indirectly inhibits PTP opening by detaching CyP-D from the other components of the pore¹¹⁻¹².

We have shown that direct or indirect inhibition of respiratory chain Complex 1 inhibited PTP opening in U937, KB and HMEC cells⁷⁻⁹, whereas this kind of regulation did not exist in rat liver mitochondria⁶. We therefore started an extensive study to survey the tissues or cells in which Complex 1 inhibition prevented PTP opening.

Matrix Ca^{2+} is the single most important factor for inducing PT. The “PT-inhibitors” and the other so-called “PT-inducers” design compounds that increase and decrease the amount of Ca^{2+} required to induce PT¹³. The Ca^{2+} retention capacity (i.e., the amount of Ca^{2+} required to induce PTP opening) was measured by loading mitochondria or digitonin permeabilized cells with train of Ca^{2+} pulses until a fast Ca^{2+} release occurred¹⁴. As shown in figure 1, Complex 1 inhibitor rotenone did not inhibit PTP opening in rat liver mitochondria, permeabilized rat hepatocytes, rat heart mitochondria and mice heart mitochondria. This is in agreement with the general literature on the PTP, which has mainly studied rat liver or rat heart mitochondria⁶. In all the other tissues or cell lines tested in this work, rotenone was more potent than CsA at PTP inhibition. This was particularly the case in rat hepatoma MH1C1 cells, in rat glioma C6 cells and in mice liver mitochondria, suggesting that the lack of PTP regulation by Complex 1 does not characterize a particular animal species (rat) or a particular tissue (liver). Note that CsA is not a universal PTP inhibitor because CsA did not prevent PTP opening in CLTTi, NIH/3T3 and HL60 cells (figure 1). Together, these data confirms that PTP regulation may noticeably change according to the tissue studied, indicating that PTP regulation in rat liver mitochondria cannot be safely extrapolated to other tissues.

In the presence of both CsA and rotenone, the Ca^{2+} retention capacity was always higher than in the presence of CsA alone (figure 1). This was particularly the case in rat liver, rat heart and mice heart mitochondria, in which rotenone alone did not affect PTP opening, suggesting that CsA might potentiate rotenone at PTP regulation. On the other hand, rotenone did not potentiate CsA in cells in which CsA was inactive.

CyP-D is the molecular target of CsA^{2-4,10}, while ANT and Complex 1 have been proposed to be part of the PTP^{7,15}. We then quantified CyP-D, ANT, Complex 1 and cytochrome oxidase (as a control) in several cells lines in which rotenone differently regulates PTP opening. As shown in figure 2, the CyP-D / cytochrome oxidase ratio remained the same in all the cells tested. On the contrary, the CyP-D / ANT and the CyP-D / Complex 1 ratios

were dramatically higher in cells in which rotenone alone did not regulate PTP opening as compared with cells in which rotenone alone regulated PTP opening.

CyP-D can be detached from the PTP by incubating mitochondria either in the presence of CsA¹², or in hyper osmotic media¹¹, or at alkaline pH (figure 3A). As shown in figure 3A, rotenone inhibited PTP opening in rat liver mitochondria once CyP-D has been detached. Rotenone also inhibited PTP opening in permeabilized rat hepatocyte when CyP-D expression was decreased by siRNA (figure 3B), or in mice heart mitochondria from genetically ablated CyP-D (figure 3C).

As shown in figure 1 (insert), rotenone inhibits Complex 1 and PTP opening in a similar concentration manner, suggesting that rotenone inhibits PTP opening because it inhibits Complex 1. As a consequence, a significant inhibition of PTP opening can be obtained when Complex 1 is partly inhibited. Indeed, the anti diabetic drug metformin, which indirectly restricts Complex 1 activity¹⁶, has been shown to inhibit PTP opening and to prevent PTP opening-induced cell death⁸⁻⁹.

Up to now, the molecular target of CyP-D for PTP regulation has not been found. CyP-D binds the adenine nucleotide translocator (ANT), but CsA regulates PTP opening in ANT-deleted cells¹⁷ suggesting that ANT is not the molecular target of CyP-D. Whether CyP-D induces PTP opening because it binds one or several components of the PTP is not known. Note however that Complex 1 inhibition regulates PTP opening in a CyP-D-dependent manner, which suggests a direct or an indirect interaction between these two proteins. Therefore, despite the fact that the mechanism by which Complex 1 inhibition regulates PTP opening remains unknown, these results suggest that Complex 1 may be a hitherto unrecognized component of the PTP.

Methods

CyD-Knock-out mice were a generous gift from Korsmeyer's laboratory⁴. Liver and heart mitochondria were isolated from rat and mouse as described previously¹⁸⁻¹⁹. Liver mitochondria and permeabilized cells were incubated in a medium containing 250 mM sucrose, 1 mM Pi-Tris and 10 mM Tris-MOPS, while heart mitochondria were incubated in a medium containing 150 mM sucrose, 50 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄ and 20 mM Tris/HCl. Measurements of Ca²⁺ were performed fluorimetrically at 25 °C in the presence of 0.25 μM Calcium Green-5N (excitation: 506 nm, emission: 530 nm) with a spectrofluorometer equipped with magnetic stirring and thermostatic controls¹⁴.

Human fibroblasts were prepared from normal skin by trypsin treatment. Human lymphocytes were extracted from whole blood collected in the Grenoble medical centre. OV1 and CLTT cells were generous gifts from Dr J. Benard²⁰, and Dr Galiana²¹, respectively. These cells were grown in a RPMI medium (Gibco), supplemented with 10% SVF and antibiotics. Mouse fibroblasts NIH/3T3 (CRL-1658TM), human promyeloblasts HL-60 (CCL-240TM), human epithelial KB (CCL-17TM), human erythroleukemia K-562 (CCL-243TM), human fibrosarcoma HT-1080 (CCL-121TM), human hepatocellular carcinoma Hep G2 (HB-8065TM), rat hepatoma MH1C1 (CCL-144TM) and rat glioma C6 (CCL-107TM) were obtained from ATCC and were grown in the medium suggested by the supplier.

Freshly isolated rat hepatocytes were grown in DMEM medium (Gibco) containing 4.5g/l glucose supplemented with 25% M199 (Sigma), 10% SVF, 0.2 mg/ml BSA, 10μg/ml insulin, 2 mM glutamine, and antibiotics (100 U /ml penicillin and streptomycin). After 24h the medium was supplemented with 1 μM Hydrocortisone, 10 ng/ml EGF and 1 mg/ml BSA.

Rat hepatocytes were transfected in a serum and antibiotics-free DMEM transfection medium by cationic liposomes, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). CyD-targeting siRNA oligonucleotides CAAGAGCCCUGAGUUAUGU (oligo n°1) and GAGGACUGUUCAGAAAUCU (for oligo n°2) were obtained from Eurogentec. Oligonucleotides (300 pmoles) were added to the transfection medium and combined to lipofectamine according to the manufacturer's protocol. After 20 minutes

incubation, complexes were added to a 100 mm culture dish containing 5 ml transfection medium. Hepatocytes were then added at a density of 1 million per dish and incubated at 37°C for 4 hours. After this period the culture medium was supplemented with SVF and antibiotics for 20 hours.

Total proteins from cells or liver lysates were separated by 10% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes and probed with antibodies against the human CyD (rabbit polyclonal antibody (Affinity Bioreagent PA1028)), against the human complex 1 39 KDa subunit (mouse monoclonal Molecular Probes A21344), against the human cytochrome oxidase subunit 4 (cox4) (mouse monoclonal Molecular Probes A21348), against the ANT-1 (mouse monoclonal Mitosciences MSA02) and against actin (mouse monoclonal Sigma A 3853). Detection was performed by enhanced chemiluminescence (ECL) (GE-Healthcare) and densitometry was performed with NIH image software.

Legends

Figure 1. Rotenone inhibits PTP opening in most of the tested tissues. The incubation medium (see material and methods) was supplemented with 5 mM succinate-Tris, and 0.25 μ M Calcium Green-5N. The final volume was 1 ml, pH 7.4, 25 °C. Experiments were begun by the addition of either 0.5 mg isolated mitochondria or $2 \cdot 10^6$ cells plus 40 μ M digitonin, followed by the addition of either vehicle (control), 1 μ M CsA, 1 μ M rotenone or 1 μ M CsA plus 1 μ M rotenone. After 2 min of incubation, the Ca^{2+} Retention Capacity (CRC) was measured by adding Ca^{2+} pulses until PTP opening. Results are mean \pm S.E. of at least four independent experiments. **Insert:** Isolated rat liver mitochondria were incubated as indicated above in the presence of 1 μ M CsA. The oxygen consumption rate (JO_2) and the CRC were measured in parallel experiments at the indicated concentration of rotenone. Results are mean \pm S.E. of three independent experiments.

Figure 2. Cy-D is elevated in tissues in which rotenone does not inhibit PTP opening. **Upper:** Representative experiment with 50 μ g of total proteins from lysates separated by 10% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes and probed with antibodies against CyD, Complex 1 (39 KDa), Cytochrome oxidase (Cox4) and ANT-1. **Lower:** Each immunoblot was quantified and the ratios were calculated. For an easier comparison between the different cell lines, the ratios were normalized (divided by the corresponding ratio observed in KB cells). Results are mean \pm S.E. of 10 independent immunoblots.

Figure 3. Detachment of CyD or decrease in CyD content allows rotenone to inhibit PTP opening. **A:** Isolated rat liver mitochondria were incubated in a medium containing 1 mM Pi-Tris, 10 mM Tris-MOPS, 5 mM succinate-Tris, 0.25 μ M Calcium Green-5N and the indicated concentration of sucrose in the presence or absence of 1 μ M CsA. The final volume was 1 ml,

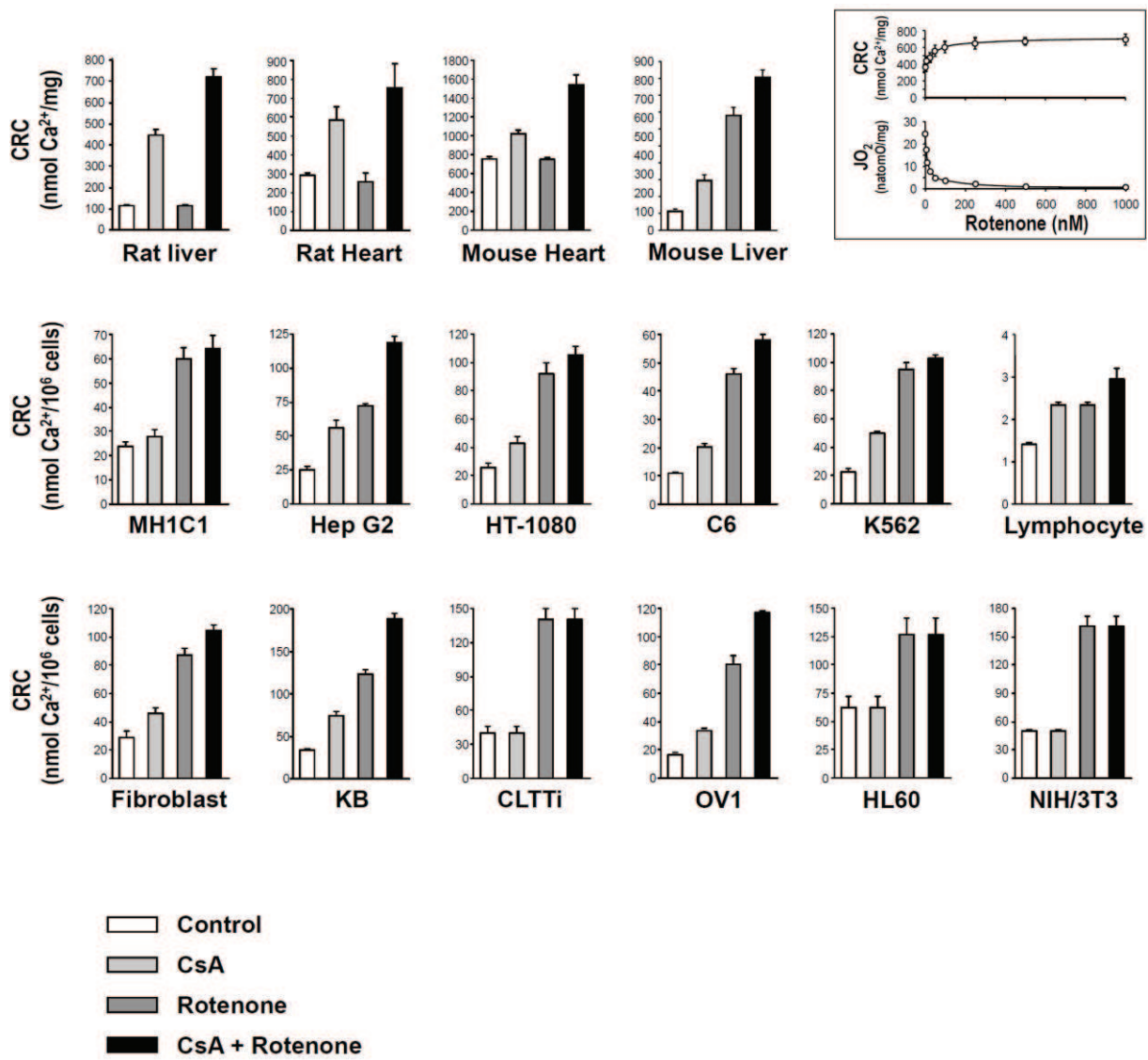
pH as indicated, 25 °C. The CRC was measured as in figure 1. The same mitochondria were broken (frozen and thawed 3 times) and then centrifuged for 30 min at 8000g. The supernatants were run on 10 % SDS-PAGE, blotted and probed with a polyclonal antibody against CyD. Results (CRC and quantification of unbound CyD) are mean \pm S.E. of 5 different assays. **B:** Rat hepatocytes (1 million cells) were transfected with CyD siRNA oligonucleotides (50 nM) using lipofectamine 2000 in a DMEM medium, then incubated in 100 mm plates for 24h. Quantification of CyD, Complex 1 and Cytochrome oxidase were performed on hepatocyte lysates as described in figure 2.

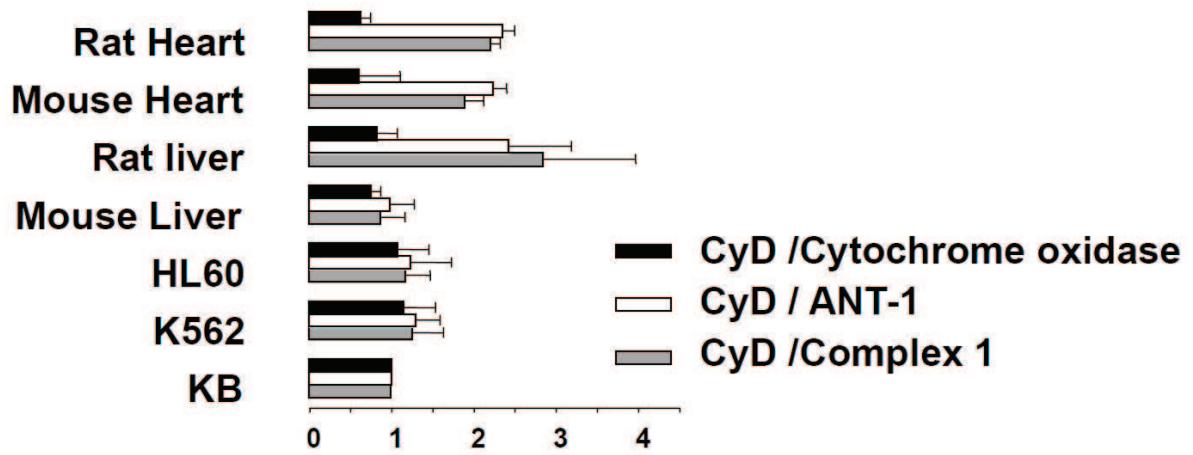
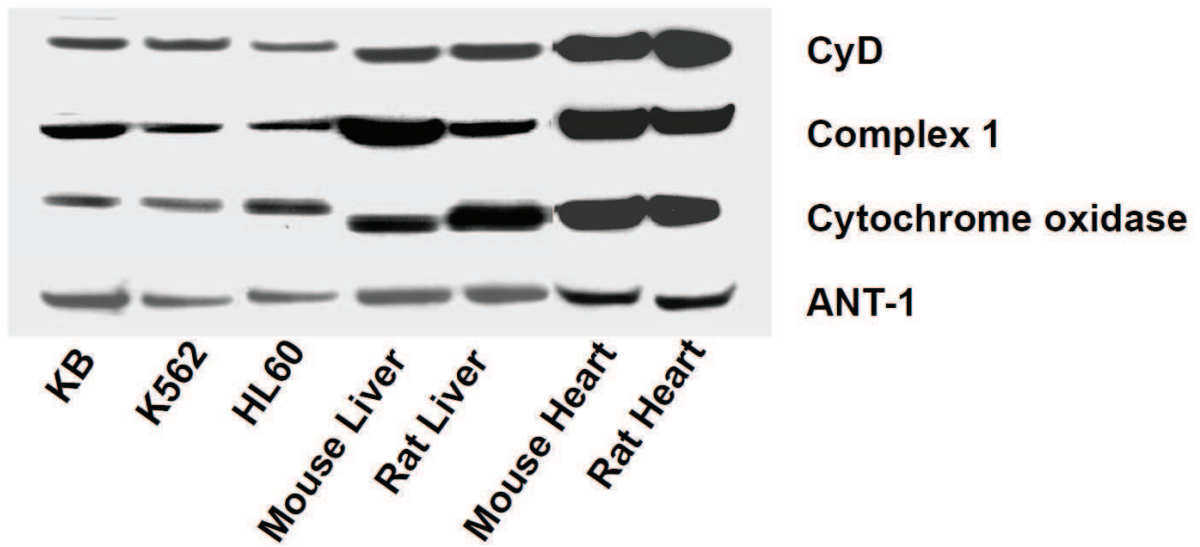
Each immunoblot was quantified and the ratios were calculated. For an easier comparison, the ratios were divided by the proper ratio observed in control condition (ie; lipofectamine without oligonucleotide). The CRC measurements were performed on digitonin-permeabilised rat hepatocytes as described in figure 1. Results (CRC and quantification of CyD, Complex 1 and Cytochrome oxidase) are mean \pm S.E. of 3 to 5 different assays. **C:** Heart mouse mitochondria isolated from wild type or CyD $-/-$ animal were incubated as in figure 1 in order to measure the CRC. Results are mean \pm S.E. of 3 different assays.

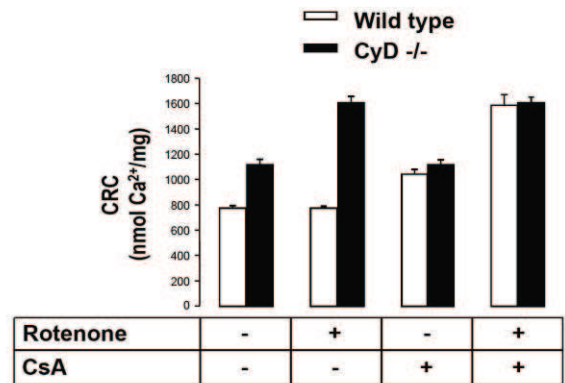
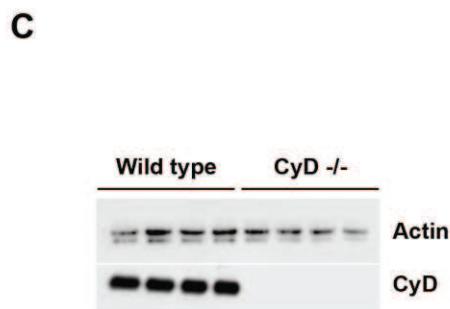
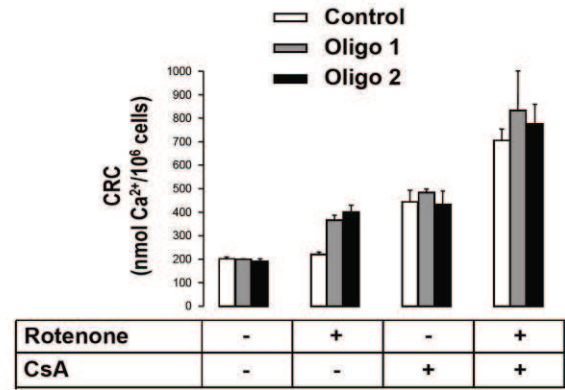
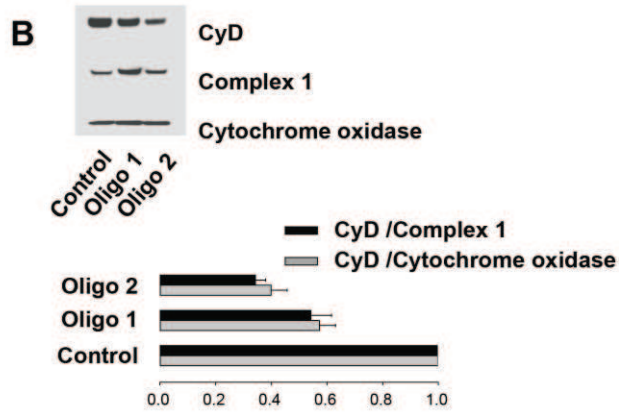
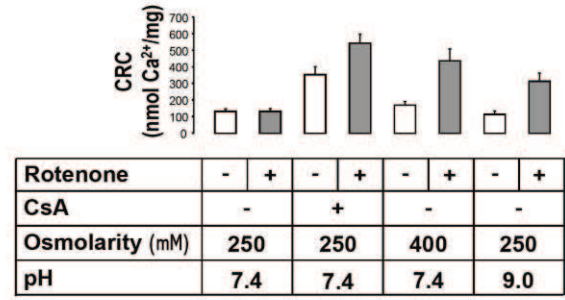
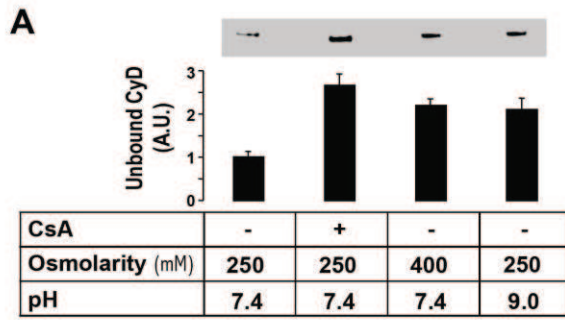
References

- 1 Desagher, S. & Martinou, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* **10**, 369-377, doi:S0962-8924(00)01803-1 [pii] (2000).
- 2 Baines, C. P. *et al.* Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**, 658-662, doi:nature03434 [pii] 10.1038/nature03434 (2005).
- 3 Nakagawa, T. *et al.* Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434**, 652-658, doi:nature03317 [pii] 10.1038/nature03317 (2005).
- 4 Schinzel, A. C. *et al.* Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12005-12010, doi:0505294102 [pii] 10.1073/pnas.0505294102 (2005).
- 5 Piot, C. *et al.* Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* **359**, 473-481, doi:359/5/473 [pii] 10.1056/NEJMoa071142 (2008).
- 6 Zoratti, M. & Szabo, I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* **1241**, 139-176, doi:0304-4157(95)00003-A [pii] (1995).
- 7 Chauvin, C. *et al.* Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem* **276**, 41394-41398, doi:10.1074/jbc.M106417200 M106417200 [pii] (2001).
- 8 Detaille, D. *et al.* Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes* **54**, 2179-2187, doi:54/7/2179 [pii] (2005).
- 9 Guigas, B. *et al.* Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J* **382**, 877-884, doi:10.1042/BJ20040885 BJ20040885 [pii] (2004).
- 10 Basso, E. *et al.* Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* **280**, 18558-18561, doi:C500089200 [pii] 10.1074/jbc.C500089200 (2005).
- 11 Connern, C. P. & Halestrap, A. P. Chaotropic agents and increased matrix volume enhance binding of mitochondrial cyclophilin to the inner mitochondrial membrane and sensitize the mitochondrial permeability transition to [Ca²⁺]. *Biochemistry* **35**, 8172-8180, doi:10.1021/bi9525177 bi9525177 [pii] (1996).
- 12 Nicolli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wenger, R. M. & Bernardi, P. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J Biol Chem* **271**, 2185-2192 (1996).
- 13 Bernardi, P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* **79**, 1127-1155 (1999).
- 14 Fontaine, E., Ichas, F. & Bernardi, P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* **273**, 25734-25740 (1998).
- 15 Green, D. R. & Kroemer, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**, 626-629, doi:10.1126/science.1099320 305/5684/626 [pii] (2004).

- 16 El-Mir, M. Y. *et al.* Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* **275**, 223-228 (2000).
- 17 Kokoszka, J. E. *et al.* The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* **427**, 461-465, doi:10.1038/nature02229 nature02229 [pii] (2004).
- 18 Groen, A. K., Sips, H. J., Vervoorn, R. C. & Tager, J. M. Intracellular compartmentation and control of alanine metabolism in rat liver parenchymal cells. *Eur J Biochem* **122**, 87-93 (1982).
- 19 Gateau-Roesch, O. *et al.* Calcium-binding properties of the mitochondrial channel-forming hydrophobic component. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 105-110 (2000).
- 20 Benard, J. *et al.* Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res* **45**, 4970-4979 (1985).
- 21 Galiana, E. *et al.* Establishment of permanent astroglial cell lines, able to differentiate in vitro, from transgenic mice carrying the polyoma virus large T gene: an alternative approach to brain cell immortalization. *J Neurosci Res* **26**, 269-277, doi:10.1002/jnr.490260302 (1990).







Synthèse des résultats et discussion

En 1998, Fontaine et al.⁴⁷ ont proposé que le flux d'électrons à travers le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale régule l'ouverture du mPTP. Ce phénomène a été examiné sur des mitochondries de foie, de muscle squelettique et des cellules cancéreuses. Nous avons repris et élargi ce travail sur des mitochondries cardiaques de rat et de souris. La capacité de rétention calcique (CRC) des mitochondries isolées de cœurs de rats et de souris est examinée sous stimulation du complexe II. L'inhibition du complexe I par la roténone ne modifie pas la CRC des mitochondries sham. Cependant, la combinaison de roténone et de CsA augmente la CRC des mitochondries cardiaques de rat et de souris par rapport à la CsA seule. La production d'H₂O₂ est inhibée en présence de roténone, mais la combinaison avec la CsA ne la modifie pas davantage (résultats non publiés). Dans un modèle de souris déficientes en Cyp D, la roténone seule inhibe l'ouverture du mPTP d'une façon comparable à celle obtenue en présence de la combinaison de roténone et CsA chez les *wild type*. Ce résultat démontre que le flux d'électrons à travers le complexe I de la chaîne respiratoire peut réguler le mPTP cardiaque en relation avec la Cyp D. La modification de la production de ROS sous l'effet de la roténone n'est pas suffisante pour expliquer son effet sur l'ouverture du mPTP.

Bien que l'utilisation de roténone (inhibiteur du complexe I) en présence de succinate (substrat du complexe II) laisse supposer que la régulation du mPTP implique le flux inverse d'électrons du complexe II vers le complexe I, il semble en réalité que l'activité du complexe I soit à l'origine de cette régulation. En effet, il est connu que le mPTP est moins résistant à la surcharge calcique en présence des substrats du complexe I qu'en présence du substrat du complexe II (Fontaine et al.⁴⁷, résultats de notre 1^{ère} étude). Ceci suggère que le complexe par lequel entrent les électrons dans la chaîne respiratoire joue un rôle important dans la régulation du mPTP. Le deuxième argument qui exclut le rôle du flux inverse d'électrons vient des résultats de gonflement mitochondrial induit par le FCCP (non publiés). Le FCCP découple la chaîne respiratoire et abolit totalement ce flux inverse d'électrons¹⁷. Cependant, l'inhibition du gonflement mitochondrial provoquée par la combinaison de roténone et de CsA persiste en présence de FCCP. Nous en concluons que c'est bien le transport d'électrons suite à l'activation du complexe I qui régule l'ouverture du mPTP.

Notre travail démontre le rôle régulateur du complexe I sur l'ouverture du mPTP, un facteur essentiel qui dirige les cellules cardiaques vers la vie ou la mort. Son mécanisme d'action demeure néanmoins inconnu. Nos résultats démontrent que ce processus est lié à l'état de la Cyp D, un autre régulateur important du mPTP, mais indépendant de la production de ROS. Les modifications de conformation pendant l'interaction entre la Cyp D et le complexe I sont des facteurs majeurs pour expliquer les effets observés sur l'ouverture du mPTP. Une meilleure connaissance de la structure du complexe I et le développement d'inhibiteurs spécifiques dirigés contre ses sous-unités nous aideront à élucider son mécanisme d'action sur la régulation du mPTP.

ARTICLE N° 3

**Modification of mitochondrial permeability transition and
ROS production by Coenzyme Q analogues in isolated
rabbit heart mitochondria**

Abdallah Gharib, **Damien De Paulis**, Bo Li, Lionel Augeul, Elisabeth
Couture-Lepetit, Ludovic Gomez, Denis Angoulvant, Michel Ovize.

Soumis à Basic Res Cardiol

Résumé

Objectif : Il est connu que les analogues du coenzyme Q sont impliqués dans la régulation des fonctions mitochondriales de foie de rat. L'objectif de cette étude est de déterminer les effets de deux de ces analogues, le CoQ₂ et le CoQ₁₀, sur la production d'H₂O₂ et le pore de transition de perméabilité de mitochondries cardiaques.

Matériels et méthodes : Des lapins New Zealand White sont anesthésiés par injection sous cutanée de kétamine/xylazine (50/5 mg/kg). Les mitochondries cardiaques de ces lapins sham sont isolées par centrifugations différentielles. La production d'H₂O₂ et l'ouverture du mPTP sont mesurées par spectrofluorimétrie (sondes Amplex Red et Calcium Green, respectivement) en présence de CoQ₂, CoQ₁₀. La respiration mitochondriale est mesurée par oxygraphie à l'aide d'une électrode de Clark. L'acide L-ascorbique est utilisé comme agent antioxydant pour étudier la relation éventuelle entre la production d'H₂O₂ et l'ouverture du mPTP en présence de CoQ₂ et CoQ₁₀.

Résultats : D'une façon dose dépendante, le CoQ₁₀ et le CoQ₂ découplent la chaîne respiratoire (diminution du RCI de 30% et 46%, respectivement, p<0.01), essentiellement par augmentation de la consommation d'oxygène à l'état 4. Ils favorisent également l'ouverture du mPTP et modulent la production d'H₂O₂. L'effet sur le mPTP est partiellement prévenu par la CsA. L'acide L-ascorbique diminue énormément le niveau d'H₂O₂ induit par le CoQ₂. Cependant, il n'affecte pas l'ouverture du mPTP induite par cet analogue.

Conclusion : Le CoQ₂ favorise l'ouverture du mPTP de cœur de lapin. Cet effet ne peut être attribué à l'augmentation du taux d' H₂O₂, mais est relié à une modification d'activité de la chaîne respiratoire. Le CoQ₂ module donc différemment l'ouverture du mPTP selon le tissu et l'espèce étudiés.

Modification of mitochondrial permeability transition and ROS production by Coenzyme Q analogues in isolated rabbit heart mitochondria

Abdallah Gharib ^{*(1)}, Damien De Paulis ^(1,3), Bo Li ^(1,3), Lionel Augeul ^(1,3), Elisabeth Couture-Lepetit ^(1,3), Ludovic Gomez ^(1,3), Denis Angoulvant ^(1,2,3), Michel Ovize ^(1,2,3)

1. INSERM UMR886, Cardioprotection, F-69373 ;
2. Hospices Civils de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Service de cardiologie, F-69677, Bron ;
3. Université Lyon 1, Faculté de médecine Lyon Nord, F-69373 ;

Short title: CoQ₂ activates mPTP opening and ROS production

Total word count: 4791

Table: 1

Fig: 5

*Corresponding author:

Dr A. Gharib

INSERM UMR886 “Cardioprotection”

Laboratoire de Physiologie, Lyon Nord, 8 av Rockefeller, 69373 Lyon, France.

Tel: (33) 4-78-78-56-10; Fax: (33) 4-78-77-71-75.

E-mail address abdallah.gharib@univ-lyon1.fr (A. Gharib).

Abstract

Coenzyme Q (CoQ) analogues are known to be implicated in the regulation of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) in isolated rat liver mitochondria and in reactive oxygen species (ROS) generation. By an *in vitro* approach, we examined the effect of two CoQ analogues: CoQ₁₀ and CoQ₂, on mPTP opening and ROS production in isolated rabbit heart mitochondria.

Hearts were excised from anesthetized New Zealand White rabbits, and the mitochondria were isolated. Oxygen consumption was measured using a Clark-type electrode. ROS production and Ca²⁺-induced mPTP opening were assessed by spectrofluorometry in the presence of Amplex Red[®] and Calcium Green[®]-5N, respectively. 150 μM of L-ascorbic acid was used as an antioxidant and 1 μM of cyclosporine A (CsA) as an inhibitor of mPTP opening.

CoQ₁₀ at 23 μM did not modified significantly any mitochondrial parameter measured in this study. Both CoQ₁₀ and CoQ₂ at 46 μM reduced the respiratory control index by 30 % and 46 %, respectively ($p < 0.01$), mainly through an increased oxygen consumption in state 4. CoQ₂ at 23 μM increased (+170%, $p < 0.05$) H₂O₂ production by mitochondria and decreased (-60%, $p < 0.05$) the Calcium Retention Capacity (CRC). CsA partially prevented this effect on CRC. Although L-A reduced the level of H₂O₂ in the presence of CoQ₂, it did not attenuate its effect on CRC. Finally, none of the analogues significantly affect the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$). We concluded that CoQ₂ favors mPTP opening in isolated rabbit heart mitochondria in opposed manner to its role in rat liver mitochondria.

Keywords: Coenzyme Q; mitochondria; permeability transition pore; oxygen radicals; rabbit heart.

Coenzyme Q (CoQ) exists in many intracellular organelles. The chemical structure of CoQ varies among species and tissues by the number of monounsaturated *trans*-isoprenoid units. The chemical structure of CoQ₁₀ or Ub₅₀, the major form in primates and CoQ₂ or Ub₁₀, the major form in micro-organisms [44] includes 10 and 2 isoprenoid units, respectively. In mitochondria, CoQ₁₀ is not only a component of the respiratory electron transport chain (ETC), but also presents several other physiological or pathophysiological functions [25, 44]. The ETC significantly contributes to the production of intracellular reactive oxygen species (ROS), mainly localized in complexes I and III [31, 42]. ROS were traditionally considered to be substances that cause damage to mitochondrial proteins, lipids, DNA and cell membranes. Recent studies have shown that a small amount of ROS is a sensor to stimulate signal transduction pathways that feeds back to protect cells against lethal ischemia-reperfusion injury [5, 39, 43].

The opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) appears to be a pivotal event in cell death [7, 49]. The opening of this mega-channel is regulated by several factors including Ca²⁺ overload, mitochondrial matrix pH, decreases of membrane potential ($\Delta\psi_m$), concentration of ATP, and excessive production of ROS [4, 6, 29, 30, 37]. Consequently, the selective inhibition of mPTP opening is a promising therapeutic strategy. The CoQ₂ was classified as mPTP inhibitor in liver's mitochondria but did not affect mPTP opening in cultured liver Clone-9 and cancerous rat liver MH1C1 cells [17, 20, 45]. In contrast, the classification of CoQ₁₀ has not been determined. Moreover, several *in vivo* studies examining the effects of CoQ₁₀ on cardiovascular diseases in rabbit, rat, and more recently in humans have provided limited and controversial results [8, 12, 13, 41].

In this study, we used isolated rabbit heart's mitochondria to investigate the effects of CoQ₁₀ and CoQ₂ on mitochondrial respiration, ROS production, mPTP opening and $\Delta\psi_m$. We found

for the first time, that CoQ₁₀ and CoQ₂ activated mPTP opening in a concentration-dependent manner, and increased the ROS production in isolated rabbit heart mitochondria.

MATERIALS AND METHODS

Animal experiments were performed in conformity with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animal* published by the US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23 revised 1996). All experimental protocols were carried out in accordance with the French (87/848, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) and European Community guidelines (86609/EEC).

Materials

All chemical reagents of the highest purity were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Calcium Green[®]-5N and Amplex Red[®] reagents were purchased from Molecular Probes, Inc. (Cergy Pontoise, France). CoQ₁₀ (Ub₅₀) and CoQ₂ (Ub₁₀) were dissolved in absolute ethanol (0.5 mg/ml and 1 mg/ml respectively).

Animal preparation and isolation of mitochondria

Male New Zealand White rabbits (2.2 to 2.5 kg) were anesthetized with xylazine (5 mg/kg i.m.) and ketamine (50 mg/kg i.m.), and ventilated with room air, as previously described [40]. A cannula was inserted into the left carotid artery for measurement of blood pressure. Limb lead II of the ECG was used to measure heart rate. Heart rate and blood pressure were monitored continuously by a Gould recorder (Gould Inc). After the left thoracotomy was performed, a 20 min stabilization period was observed. At the end of this period, the heart was harvested and the left ventricle was rapidly excised. Mitochondria were isolated as previously described [23], re-suspended in medium (pH 7.4) containing sucrose 70

mM and mannitol 210 mM in Tris 50 mM, at 4°C. Mitochondrial protein concentration was determined by a Biuret's method, using bovine serum albumin as standard [24]. Using this method, we obtained about 16 mg of mitochondrial protein/g cardiac tissue.

Measurement of mitochondrial oxygen consumption

Mitochondrial oxygen consumption was measured using a Clark-type oxygen electrode at 25°C. Mitochondria (about 800 µg prot/ml) were incubated in the respiration buffer (pH 7.4) containing KCl 60 mM, sucrose 150 mM, Tris-HCl 20 mM and KH₂PO₄ 5 mM. Glutamate/malate (complex I substrates, 5 mM each) were used in the absence (control) or presence of CoQ₁₀ or CoQ₂ (23 or 46 µM each). State 3 (ADP-stimulated: induced by addition of 0.3 mM ADP) and state 4 respiration (ADP-limited: without ADP) were determined and expressed as nmol O₂/min/mg prot. The respiratory control index (RCI) was calculated as the ratio of the state 3/state 4.

Measurement of the mitochondrial calcium retention capacity (CRC)

CRC is defined here as the amount of calcium required to trigger mPTP opening *in vitro*, as previously described [2]. Measurement of CRC was carried at 25°C using a spectrofluorophotometer F-2500 digi lab Hitachi[®] equipped with magnetic stirring and thermostatic control. Extra-mitochondrial free Ca²⁺ was measured in the presence of Calcium Green[®]-5N (1 µM) with excitation and emission wavelengths set at 500 and 530 nm respectively. The mitochondria (400 µg prot/2ml) were resuspended in buffer (pH 7.4) containing 50 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 20 mM Tris, 150 mM sucrose and 5 mM succinate at 25°C. Following 1 min preincubation period, 10 nmol CaCl₂ was administered every one minute. As previously reported, once added, Ca²⁺ is rapidly taken up by the mitochondria resulting in a rapid return of extra-mitochondrial Ca²⁺ concentration to near baseline level [2].

After sufficient CaCl_2 loading, a rapid increase of fluorescence indicates a massive release of Ca^{2+} by mitochondria due to mPTP opening. The influence of CoQ_{10} or CoQ_2 (23 μM or 46 μM) on CRC was tested in optimal concentrations of CoQ analogues tested in liver mitochondria [45], and also in the presence or absence of 150 μM of L-ascorbic acid or 1 μM CsA. The CRC was expressed as $\text{nmol Ca}^{2+}/\text{mg prot.}$

Measurement of H_2O_2 production in mitochondria

The quantification of H_2O_2 has been accepted as an indicator of ROS production by mitochondria. The superoxide radicals produced by ETC are immediately converted into H_2O_2 catalyzed by superoxide dismutase [22]. Because H_2O_2 diffuses across mitochondrial membrane it can be used as an indicator of ROS production by mitochondria [1, 9, 34]. The rate of H_2O_2 production by rabbit heart mitochondria was measured at 25°C in the presence of Amplex Red[®] (10 μM) and horseradish peroxidase (0.6 units) using spectrofluorophotometer F-2500 digi lab Hitachi[®] (excitation and emission wavelengths set at 530 and 590 nm respectively). The rate of H_2O_2 production from mitochondria was measured in basal condition and with CoQ analogues (23 μM of each). Isolated mitochondria (200 $\mu\text{g prot}$) were added to 2 ml buffer (pH 7.4) containing 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.15% BSA and 1 mM EGTA in 20 mM Tris/HCl.

The rate of H_2O_2 production was also measured after stimulation of the ETC either by the complex I substrates glutamate/malate (5 mM each) or by the complex II substrate succinate (3.75 mM) in absence or presence of CoQ_2 or CoQ_{10} . Finally, we tested the H_2O_2 production when complex I was inhibited, with rotenone (6.25 μM), in presence of complex I or complex II substrates.

To verify the origin of fluorescence in the medium, we added 450U/ml of catalase. The fluorescence was attenuated by 90-95 %. The calibration curve was obtained by adding

known amount of H₂O₂ to the assay medium. The assay was linear from 0 to 150 nM H₂O₂. The H₂O₂ production was measured by estimating the fluorescence variation in time. The results were expressed as pmol H₂O₂/min/mg prot.

Measurement of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

$\Delta\psi_m$ was measured during state 2-4 respiration using glutamate/malate by transmembrane distribution of the fluorescence indicator tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) as previously described [38]. Briefly, fresh mitochondria (250 μ g prot) were suspended in 2 ml of the respiration buffer (pH 7.4) containing also 200 nM TMRM. The fluorescence was recorded at 25°C (excitation and emission wavelengths set at 550 and 580 nm respectively). Following 2 min equilibration period, 5 mM of each substrate glutamate/malate (without ADP) was added to reach state 2. State 3 respiration was induced by the addition of 0.2 mM ADP. $\Delta\psi_m$ was expressed as the percentage of TMRM fluorescence relative to the fluorescence recorded after addition of 3 mM carbonylcyanide-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazone (FCCP) a mitochondrial uncoupler considered as 100% efficient.

Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm standard error of mean (S.E.M). Multiple groups comparisons were performed using one-way analysis of variance (Graph Pad InStat) followed by a Tukey's post hoc test. Statistical significance was defined at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Oxidative phosphorylation

In the control group, RCI averaged 4.35 ± 0.29 (Table 1). CoQ₁₀ (23 μ M) did not modify the mitochondrial respiration parameters. At 46 μ M, CoQ₁₀ significantly decreased ($p < 0.01$) the RCI caused by a reduction in state 3 combined with a increase in state 4 respiration. At both concentrations, CoQ₂ resulted in a marked decrease (30 % and 46 % respectively, $p < 0.01$) in RCI, which was caused mainly by a major increase of state 4 (30% and 92 % respectively, $p < 0.01$). L-ascorbic acid did not reverse the effect of CoQ analogues on respiratory parameters (data not shown).

Calcium retention capacity (CRC)

In control mitochondria, CRC averaged 605 ± 59 nmol Ca²⁺/mg prot (Fig. 1). In the presence of CoQ₁₀ (46 μ M) or CoQ₂ (23 μ M or 46 μ M), the CRC value was significantly reduced to 287 ± 35 , 219 ± 28 and 158 ± 10 nmol Ca²⁺/mg prot respectively ($p < 0.05$ vs control). Interestingly, CsA 1 μ M partially reversed their effect on mPTP (Fig. 1). In contrast, L-ascorbic acid did not affect the reduction of CRC by CoQ analogues (Fig. 1).

H₂O₂ production in basal condition

In basal condition, the rate of H₂O₂ production by mitochondria was very low (4.74 ± 0.68 pmol/min/mg prot). It was not modified by CoQ₁₀ (23 μ M) and significantly increased by 23 μ M CoQ₂ (12.7 ± 1.1 pmol/min/ mg prot; $p < 0.05$ vs basal) (Fig. 2).

H₂O₂ production in the presence of complex I substrates

In control group, the addition of complex I substrates (glutamate/malate) significantly increased H₂O₂ production to 20.3 ± 2.9 pmol/min/mg prot, $p < 0.05$ vs baseline. Further addition of rotenone significantly increase H₂O₂ production to 60 ± 10 pmol/min/mg prot ($p < 0.05$) (Fig. 3). CoQ₁₀ did not affect H₂O₂ production in any groups (Fig. 3). In contrast,

CoQ₂ significantly increase the level of H₂O₂ in each individual group compared to control group ($p<0.05$) (Fig. 3). The co-addition of L-ascorbic acid and complex I substrates dramatically reduced the level of H₂O₂ in all groups (data not shown).

H₂O₂ production in the presence of complex II substrate

In control group, the addition of complex II substrate (succinate) stimulated the H₂O₂ production to 312 ± 37 pmol/min/mg prot ($p<0.05$ vs basal group) (Fig. 3). Rotenone significantly reduced this succinate-induced H₂O₂ production to 45 ± 10 pmol/min/mg prot). The addition of CoQ₁₀ did not significantly affect the succinate-induced increase in H₂O₂ production. In this condition, rotenone reduced H₂O₂ production in a similar manner to control (Fig. 3).

In the presence of CoQ₂, the H₂O₂ production was not significantly different compared to control group. In this case, rotenone lost its capacity to reduce the succinate-induced increase in H₂O₂ production (Fig. 3). Again, the presence of L-ascorbic acid in medium abolished the level of H₂O₂ in the succinate plus CoQ₂ group without or with rotenone (Fig. 4).

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

In control group, the degree of depolarization of mitochondrial membrane in state 2 (S2), state 3 (S3) and state 4 (S4) was illustrated in fig. 5. The addition of CoQ₁₀ and CoQ₂, in all concentrations tested, did not significantly affect any state (Fig. 5).

Discussion

In the present study, we demonstrate that CoQ₁₀ and CoQ₂ modulate the mitochondrial respiration, ROS production and increase mPTP susceptibility in dose dependent manner and that CsA, but not L-A, prevents the effects of these analogues on mPTP. We conclude that

exogenous CoQ₂ favor the mPTP opening in rabbit heart mitochondria. This effect is related to a modification of activity of the ETC.

The endogenous coenzyme Q, a constituent of the respiratory chain, is located in the mitochondrial inner membrane. It acts as an electron shuttle between ubiquinone reductase and complex III. In complex I, electron transport to CoQ is coupled to proton pumping which generates membrane potential [18, 47]. Due to their lipophilic properties, the exogenous CoQ₁₀ and CoQ₂ can be incorporate into the mitochondrial inner membrane, and modulate the respiratory complex activity and oxidative phosphorylation [18]. The effects of exogenous CoQ on mitochondrial respiration have been objectives in many works. It is widely admitted that CoQ contributes to ATP synthesis by generating proton gradient across the membrane [35, 36]. Nevertheless, Echtay et al. reported that CoQ is also an obligatory cofactor of uncoupled protein [19]. Fontaine et al. showed that some analogues of CoQ inhibited the uncoupled mitochondria respiration [45]. In our work we observe that CoQ₂ at 23 μ M and 46 μ M and CoQ₁₀ 46 μ M uncoupled the mitochondria respiration in the rabbit heart mitochondria. However, we did not observed a significant modification on $\Delta\psi_m$ in the presence of these two analogues.

CoQ has been considered to be an important antioxidant agent [27, 33]. CoQ has also been explored as an oxygen radical generator in heart mitochondria, with a suggested mechanism of auto-oxidation of CoQ [10, 11, 26, 48]. In our work, to specifically investigate the interaction between CoQ and ROS production we only tested the 23 μ M dose of CoQ₁₀ that doesn't affect mPTP opening. We observe that CoQ₁₀ did not modify H₂O₂ generation in the presence of complex I and II substrates, CoQ₂ accentuated H₂O₂ production with either substrate tested. In the presence of succinate and CoQ₂, rotenone did not modify H₂O₂ production by mitochondria. The sensitivity of complex I to rotenone is known to be reduced in presence of CoQ₂ [15], a phenomenon which might conserve the reverse electron transport

from complex II to complex I and keep H₂O₂ production at a high level in spite of the presence of rotenone.

Recent studies indicate that exogenous CoQ analogues regulate the opening of the mPTP. Although mPTP regulation exhibits a number of tissue-specific characteristics, several molecules are classified as either activator (Ca²⁺, ROS, and Bax) or inhibitor (ATP, CsA) of mPTP opening [14, 16, 19-21, 46]. From studies performed with isolated rat liver mitochondria, three functional classes of CoQ analogs have been defined in which CoQ₂ acts as a strong inhibitor of mPTP opening [45]. In contrast, we found that CoQ₂ increased mPTP opening in rabbit heart mitochondria, and that CsA (1 μM) partially prevented this effect. Accumulating evidence suggests that CsA interaction with cyclophilin D (CypD) blocks the attachment of CypD to mPTP and inhibits mPTP opening. Our data suggest that CoQ₂ regulates mPTP opening in a CypD independent manner, which is in agreement with the results obtained in mice devoid of CypD by Basso et al. [3]. In contrast to CsA, the presence of L-ascorbic acid, an antioxidant, dramatically reduced the level of H₂O₂ produced in the presence of CoQ₂, but could not prevent activation of mPTP opening [28, 32]. This strongly suggests that the effect of CoQ₂ on mPTP is not related to high H₂O₂ production. The mechanism of action of CoQ₂ may be related to a substantial damage of the ETC. The hypothesis of Fontaine et al. that the electron flux through the complex I modulates mPTP opening seems to be a reasonable explanation. The sensibility of complex I to different CoQ analogues in the absence or presence of complex I inhibitors and their effects on mPTP should be investigated to further elucidate this theory.

In summary, we show for the first time in isolated rabbit heart mitochondria that CoQ₁₀ and CoQ₂ induced mPTP opening in a concentration-dependent manner, and that CoQ₂ increases the production of H₂O₂ and uncouples the oxidative phosphorylation. Finally, the effects of CoQ analogues on mPTP opening were still antagonized by CsA.

Acknowledgements

The work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U886). D.D.P. was a recipient of a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France.

TABLE AND FIGURE LEGENDS

Table 1: Oxidative phosphorylation.

	State 3 nmol O₂/min/mg	State 4 nmol O₂/min/mg	RCI State 3/State 4	n
Control	69.50 ± 5.37	16.00 ± 1.45	4.35 ± 0.29	8
CoQ₁₀ 23μM	63.83 ± 4.57	18.33 ± 1.94	3.58 ± 0.40	6
CoQ₁₀ 46μM	58.13 ± 4.73	19.25 ± 1.77	3.04 ± 0.19*	8
CoQ₂ 23μM	63.74 ± 8.60	20.73 ± 2.46	3.07 ± 0.05*	4
CoQ₂ 46μM	67.17 ± 5.36	30.67 ± 2.82*	2.35 ± 0.09*	6

Fig. 1: Effects of CoQ₁₀ and CoQ₂ on the calcium retention capacity. Effect of L-ascorbic acid or CsA.

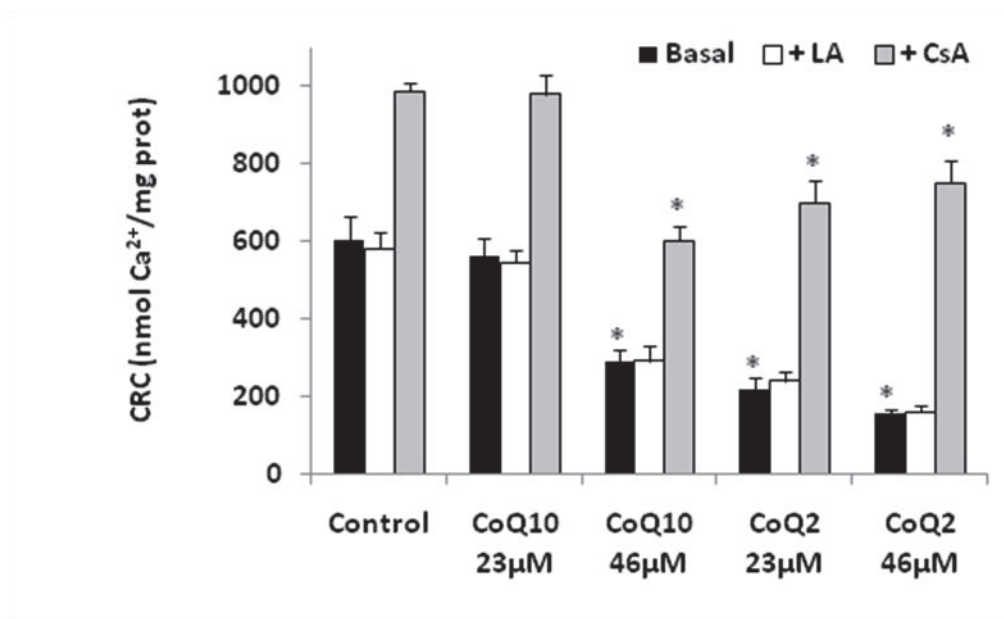


Fig. 2: H₂O₂ production in isolated mitochondria.

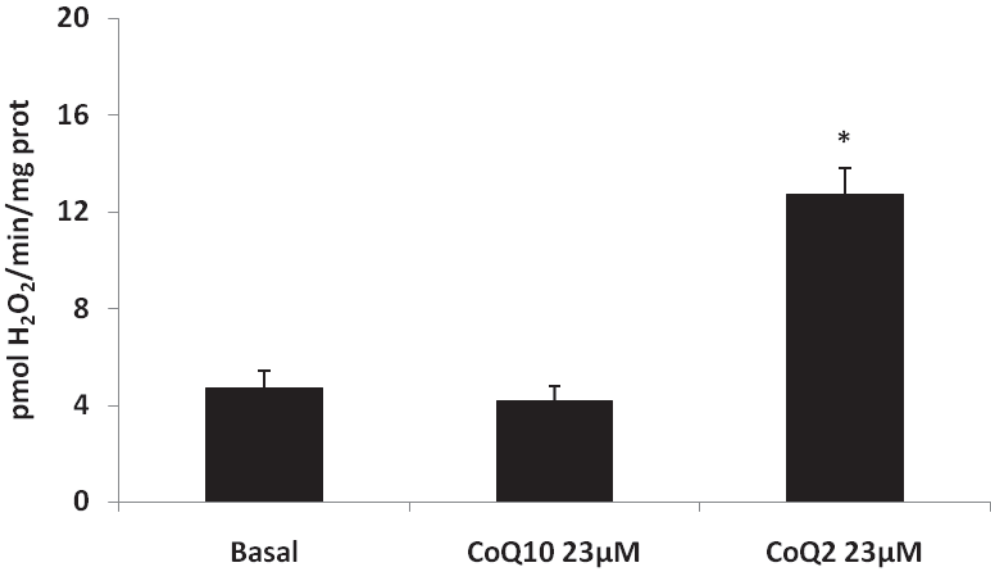


Fig. 3: H₂O₂ production with complex I and complex II substrates. Effect of rotenone

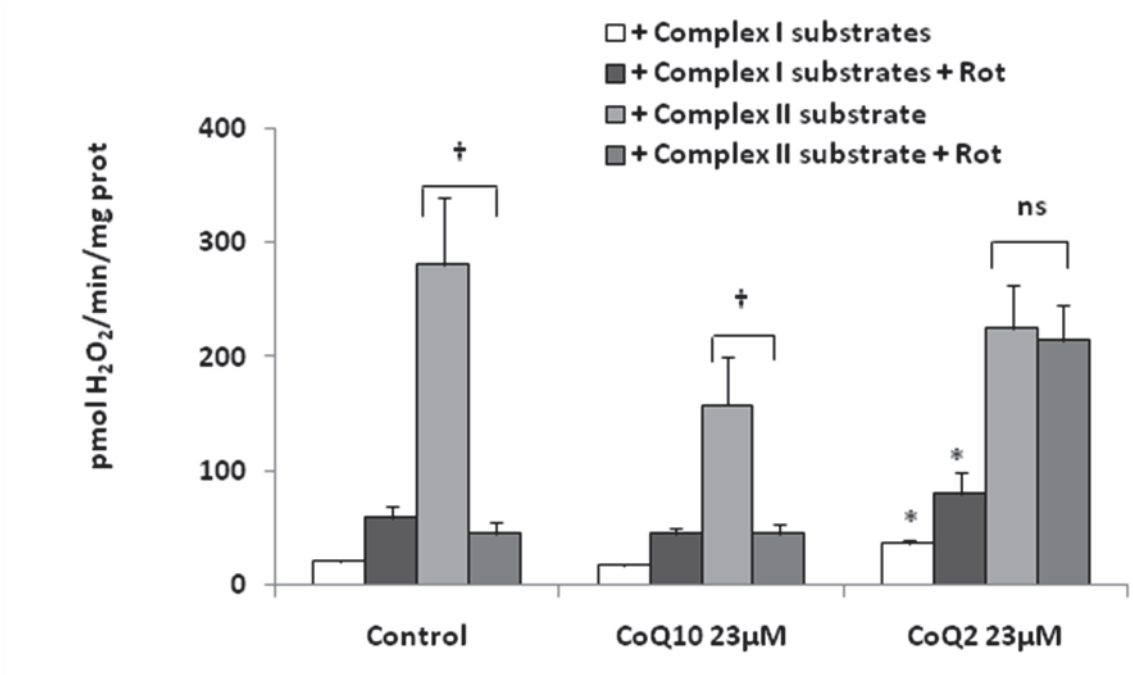


Fig. 4 : Effect of L-ascorbic acid on the level of H₂O₂.

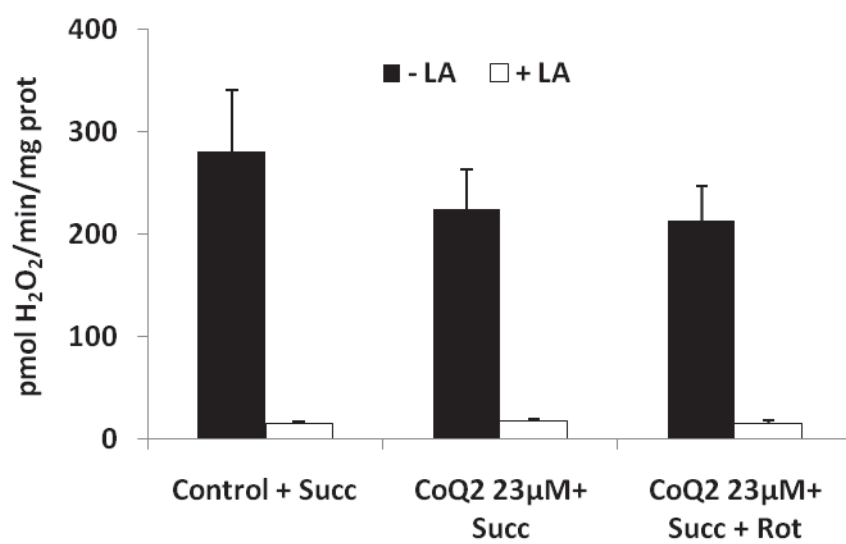


Fig. 5: Effect of CoQ₁₀ or CoQ₂ on membrane depolarization.

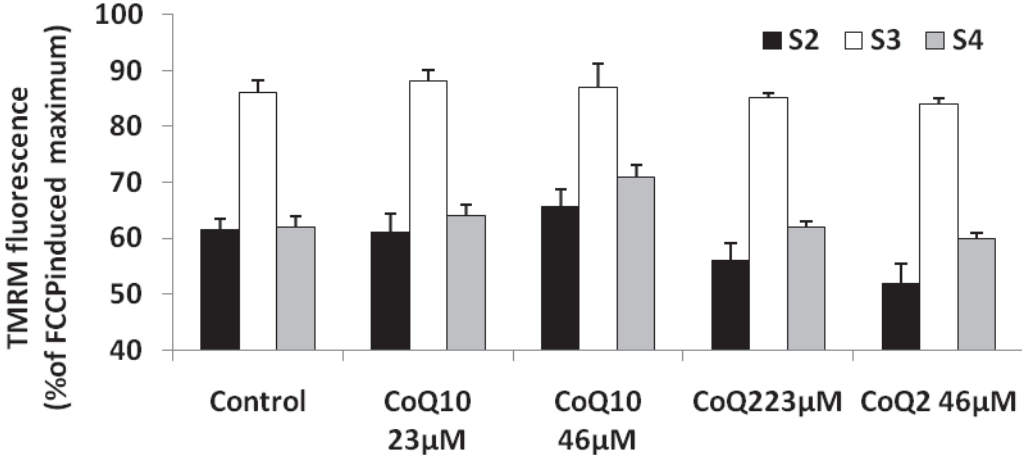


Table 1: Oxidative phosphorylation.

O₂ consumption was measured at state 3 (0.3 mM ADP-stimulated) and state 4 (ADP-limited) in control condition and in the presence of CoQ₁₀ or CoQ₂. The respiratory control index (RCI) was determined as the ratio of state 3/state 4. Data (nmol O₂/min/mg prot) are expressed as mean ± S.E.M. **p*<0.01 vs control.

Fig. 1: Effects of CoQ₁₀ and CoQ₂ on the calcium retention capacity. Effect of L-ascorbic acid or CsA.

CRC Results (nmol CaCl₂/mg prot) are mean ± S.E.M, of eight independent experiments. CoQ₁₀ and CoQ₂ were added at indicated concentration. The effect of 150 μM L-ascorbic acid (LA) or 1μM CsA was tested in all groups. **p*<0.05 vs control group.

Fig. 2: H₂O₂ production in isolated mitochondria.

H₂O₂ production in control group was determined by the slope of the Amplex Red[®] fluorescence as described in materials and methods. Data (pmol H₂O₂/min/mg prot)

are mean \pm S.E.M, of eight independent experiments. CoQ₁₀ and CoQ₂ were added at 23 μ M. * p <0.05 vs control group.

Fig. 3: H₂O₂ production with complex I and complex II substrates. Effect of rotenone.

H₂O₂ production was measured at control condition after stimulation by complex I or complex II substrate in the absence or presence of rotenone. In the same conditions, the CoQ₁₀ and CoQ₂ were both tested at 23 μ M. Data (pmol H₂O₂/min/mg prot) are mean \pm S.E.M, of eight independent experiments. * p <0.05 compared to control and CoQ₁₀ groups respectively. † p <0.05 compared to respective substrates (alone).

Fig. 4 : Effect of L-ascorbic acid on the level of H₂O₂.

L-ascorbic acid (L-A) nearly abolished the level of H₂O₂ release in medium by mitochondria stimulated by complex II substrate (succinate) in control or in the presence of CoQ₂. The effect of L-ascorbic acid on rotenone plus succinate was tested. Data (pmol H₂O₂/min/mg prot) are mean \pm S.E.M of four independent experiments.

Fig. 5: Mitochondria membrane depolarization. Effect of CoQ analogues

The membrane potential ($\Delta\psi_m$) in rabbit heart mitochondria in stat 2, stat 3 and stat 4

was calculate as a % of the effect of FCCP with or without CoQ analogues.

Administration of the mitochondrial uncoupler FCCP substantially dissipated the

$\Delta\psi_m$ at the same level between all groups. Data (% of FCCP induced maximum

TMRM fluorescence) are mean \pm S.E.M of four independent experiments.

References

1. Antunes F, Cadenas E (2000) Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett* 475:121-126
2. Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Bejui F, Robert D, Ovize M (2004) Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 61:115-122
3. Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 280:18558-18561
4. Beal MF (1998) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1366:211-223
5. Becker LB (2004) New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 61:461-470
6. Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR (1994) Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 26:509-517
7. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F (1999) Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 264:687-701
8. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA (1996) The effect of coenzyme Q10 on infarct size in a rabbit model of ischemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* 32:861-868
9. Boveris A, Cadenas E (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 54:311-314
10. Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 180:248-257

11. Crane FL (2007) Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function. *Mitochondrion* 7 Suppl:S2-7
12. Crestanello JA, Doliba NM, Babsky AM, Niborii K, Osbakken MD, Whitman GJ (2002) Effect of coenzyme Q10 supplementation on mitochondrial function after myocardial ischemia reperfusion. *J Surg Res* 102:221-228
13. Damian MS, Ellenberg D, Gildemeister R, Lauermann J, Simonis G, Sauter W, Georgi C (2004) Coenzyme Q10 combined with mild hypothermia after cardiac arrest: a preliminary study. *Circulation* 110:3011-3016
14. De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, Remington SJ, Youle RJ, Ichas F (2002) The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *Faseb J* 16:607-609
15. Degli Esposti M, Ngo A, McMullen GL, Ghelli A, Sparla F, Benelli B, Ratta M, Linnane AW (1996) The specificity of mitochondrial complex I for ubiquinones. *Biochem J* 313 (Pt 1):327-334
16. Desagher S, Martinou JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10:369-377
17. Devun F, Walter L, Belliere J, Cottet-Rousselle C, Leverve X, Fontaine E (2010) Ubiquinone analogs: a mitochondrial permeability transition pore-dependent pathway to selective cell death. *PLoS One* 5:e11792
18. Di Virgilio F, Azzone GF (1982) Activation of site I redox-driven H⁺ pump by exogenous quinones in intact mitochondria. *J Biol Chem* 257:4106-4113
19. Echtay KS, Winkler E, Klingenberg M (2000) Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature* 408:609-613

20. Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P (1998) Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem* 273:12662-12668
21. Fontaine E, Ichas F, Bernardi P (1998) A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 273:25734-25740
22. Forman HJ, Azzi A (1997) On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology. *Faseb J* 11:374-375
23. Gateau-Roesch O, Pavlov E, Lazareva AV, Limarenko EA, Levrat C, Saris NE, Louisot P, Mironova GD (2000) Calcium-binding properties of the mitochondrial channel-forming hydrophobic component. *J Bioenerg Biomembr* 32:105-110
24. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177:751-766
25. Heales SJ, Gegg ME, Clark JB (2002) Oxidative phosphorylation: structure, function, and intermediary metabolism. *Int Rev Neurobiol* 53:25-56
26. James AM, Smith RA, Murphy MP (2004) Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch Biochem Biophys* 423:47-56
27. Kagan VE, Serbinova EA, Koynova GM, Kitanova SA, Tyurin VA, Stoytchev TS, Quinn PJ, Packer L (1990) Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes. *Free Radic Biol Med* 9:117-126
28. Kc S, Carcamo JM, Golde DW (2005) Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury. *Faseb J* 19:1657-1667
29. Kirkinetzos IG, Moraes CT (2001) Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol* 12:449-457

30. Kowaltowski AJ, Vercesi AE (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 26:463-471
31. Lambert AJ, Brand MD (2004) Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 279:39414-39420
32. Li X, Cobb CE, Hill KE, Burk RF, May JM (2001) Mitochondrial uptake and recycling of ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys* 387:143-153
33. Littarru GP, Tiano L (2007) Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments. *Mol Biotechnol* 37:31-37
34. Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 42:68-72
35. Mitchell P (1975) Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* 56:1-6
36. Nohl H, Staniek K, Kozlov AV, Gille L (2003) The biomolecule ubiquinone exerts a variety of biological functions. *Biofactors* 18:23-31
37. Nulton-Persson AC, Szweda LI (2001) Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 276:23357-23361
38. Paillard M, Gomez L, Augeul L, Loufouat J, Lesnefsky EJ, Ovize M (2009) Postconditioning inhibits mPTP opening independent of oxidative phosphorylation and membrane potential. *J Mol Cell Cardiol* 46:902-909
39. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G, Pagliaro P (2006) Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol* 101:180-189

40. Piriou V, Chiari P, Gateau-Roesch O, Argaud L, Muntean D, Salles D, Loufouat J, Gueugniaud PY, Lehot JJ, Ovize M (2004) Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology* 100:581-588
41. Rowland MA, Nagley P, Linnane AW, Rosenfeldt FL (1998) Coenzyme Q10 treatment improves the tolerance of the senescent myocardium to pacing stress in the rat. *Cardiovasc Res* 40:165-173
42. Sugioka K, Nakano M, Totsune-Nakano H, Minakami H, Tero-Kubota S, Ikegami Y (1988) Mechanism of O₂- generation in reduction and oxidation cycle of ubiquinones in a model of mitochondrial electron transport systems. *Biochim Biophys Acta* 936:377-385
43. Tsutsumi YM, Yokoyama T, Horikawa Y, Roth DM, Patel HH (2007) Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning: in vivo and in vitro characterization. *Life Sci* 81:1223-1227
44. Turunen M, Olsson J, Dallner G (2004) Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 1660:171-199
45. Walter L, Nogueira V, Leverve X, Heitz MP, Bernardi P, Fontaine E (2000) Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *J Biol Chem* 275:29521-29527
46. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P (2003) Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res* 93:292-301
47. Wikstrom M (1984) Two protons are pumped from the mitochondrial matrix per electron transferred between NADH and ubiquinone. *FEBS Lett* 169:300-304
48. Yamamura T, Otani H, Nakao Y, Hattori R, Osako M, Imamura H, Das DK (2001) Dual involvement of coenzyme Q10 in redox signaling and inhibition of death signaling in the rat heart mitochondria. *Antioxid Redox Signal* 3:103-112

49. Zoratti M, Szabo I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241:139-176

Synthèse des résultats et discussion

Nous démontrons pour la première fois que le CoQ₁₀ et le CoQ₂ découplent la respiration mitochondriale, modulent la production de ROS et favorisent l'ouverture du mPTP de mitochondries cardiaques de lapin. Le mPTP des mitochondries traitées par ces analogues reste sensible à la CsA. Le traitement par l'acide L-ascorbique, un piègeur de ROS, ne modifie pas l'ouverture du mPTP en présence de ces deux analogues. Nous en concluons donc que dans les mitochondries cardiaques de lapin, le CoQ₁₀ et le CoQ₂ favorisent l'ouverture du mPTP sans altérer la Cyp D et que le taux d'H₂O₂ n'est pas la cause de cette ouverture.

Le CoQ₁₀ est un transporteur d'électrons essentiel entre les complexes I, II et le complexe III. Il est utilisé depuis longtemps comme agent cardioprotecteur dans différentes pathologies cardiaques³⁷³. Ses mécanismes d'action ne sont pas complètement élucidés. Il pourrait agir en améliorant la production d'ATP en condition aérobie et en assurant un meilleur couplage de la chaîne respiratoire³⁷⁴. Cependant, il a également été observé qu'il découplerait la chaîne respiratoire en rapport avec son rôle de cofacteur avec les protéines de découplage³⁷⁵. Fontaine et al.¹¹⁵⁻¹¹⁶ ont montré que les analogues du CoQ sont soit neutres, soit des inhibiteurs du découplage de la respiration mitochondriale. Dans notre travail, nous montrons pour la première fois que le CoQ₁₀ et le CoQ₂ découplent la chaîne respiratoire d'une façon dose dépendante sur des mitochondries de cœur de lapin.

Le rôle du CoQ sur la production de ROS a également été proposé pour expliquer sa propriété cardioprotectrice. Ainsi, de nombreuses études ont montré que le CoQ est un agent antioxydant. Paradoxalement, il agit également comme un pro-oxydant en augmentant la production d'H₂O₂³⁷⁶. Dans notre étude, le CoQ₁₀ ne modifie pas la production d'H₂O₂ en présence de glutamate/malate à la dose de 23 µM. Le CoQ₂ augmente cette production quel que soient les substrats utilisés par la chaîne respiratoire. En présence du succinate et du CoQ₂, la roténone n'a pas d'effet sur la production d'H₂O₂. Étant donné la plus forte affinité du CoQ₂ vis-à-vis du complexe I par rapport à la roténone³⁷⁷, le CoQ₂ permet de préserver le flux inverse du complexe II vers le complexe I. Ainsi, la production d'H₂O₂ reste élevée malgré la présence de roténone.

Fontaine et al.¹¹⁵⁻¹¹⁶ ont largement étudiés les effets régulateurs des analogues du coenzyme Q sur le mPTP de foie et d'hépatocyte. Contrairement à ce qu'ils ont observé sur des mitochondries de foie de rat, le CoQ₂ favorise l'ouverture du mPTP de cœur de lapin. Nous montrons également que le CoQ₁₀ favorise cette ouverture à 46 µM. Nos résultats montrent que les facteurs régulateurs du mPTP varient selon les organes et peut être entre les espèces. Nos résultats obtenus en présence d'acide L-ascorbique nous permettent d'exclure un rôle direct des ROS dans ce processus. De la même façon, nous concluons que ces analogues favorisent l'ouverture du mPTP sans altérer la Cyp D puisque le mPTP reste sensible à la CsA. L'hypothèse proposée par Fontaine et al. selon laquelle le flux d'électrons à travers le complexe I régule l'ouverture du mPTP nous incite à mieux connaître la structure de ce pore et le rôle éventuel du complexe I dans sa constitution.

L'ensemble de ces résultats sont en faveur d'un rôle essentiel de la chaîne respiratoire dans la régulation du mPTP et par conséquence de la mort cellulaire.

ARTICLE N° 4

**Evaluation of cyclosporine A in a stroke model in the
immature rat brain**

Pierre-Louis Leger, **Damien De Paulis**, Sonia Branco, Philippe Bonnin,
Elisabeth Couture-Lepetit, Olivier Baud, Sylvain Renolleau, Michel Ovize,
Abdallah Gharib, Christiane Charriaut-Marlangue.

Exp Neurol 2010 Jun 16. [Epub ahead of print]

Résumé

Objectif : Dans le cerveau immature, les effets de l'I/R sur l'ouverture du mPTP ne sont pas entièrement compris. Le but de cette étude est d'évaluer l'effet de la CsA sur l'ischémie cérébrale transitoire de rat nouveau-né.

Matériels et méthodes : Des rats Wistar âgés de 7 jours sont anesthésiés par injection *i.p.* d'hydrate de chloral. Les animaux sont soumis à une ischémie cérébrale par occlusion définitive de l'artère cérébrale moyenne gauche et ligature transitoire (50 minutes) de l'artère carotide commune gauche. A la fin de l'ischémie, les animaux sont soumis à une reperfusion de 30-40 minutes pour l'étude de l'ouverture du mPTP et de la dégradation de l' α -spectrine calpaïne-dépendante, ou de 48 heures pour l'étude de la taille de l'infarctus, de la mort cellulaire et de l'inflammation. Les rats sont répartis en plusieurs groupes : le groupe contrôle ne reçoit pas d'autre intervention, le groupe prétraité à la CsA reçoit une injection *i.v.* de CsA (10 mg/kg) 14 heures avant l'induction de l'ischémie et les groupes sham reçoivent une injection équivalente de CsA ou de solution saline sans I/R.

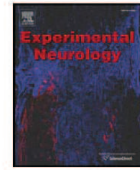
Résultats : La CsA réduit la taille d'infarctus (5.6 ± 2.5 vs 9.0 ± 3.6), la fragmentation de l'ADN (49.2 ± 10.8 vs 76.8 ± 11.2), les corps apoptotiques (-70%) et les réponses inflammatoires (diminution des neutrophiles, de la dégranulation des mastocytes et de l'activation de la microglie) lors de lésions ischémiques modérées, mais pas lorsqu'elles sont sévères. La CsA augmente la charge calcique nécessaire à l'ouverture du mPTP (78.4 ± 19.2 vs 50.2 ± 19.9 nmol.mg⁻¹ protein, $p < 0.05$) en limitant le découplage de la chaîne respiratoire (5.66 ± 1.41 vs 4.31 ± 1.27) par réduction de l'état 4, mais sans modifier l'état 3. Elle permet également de préserver l'intégrité du cytosquelette (atténuation de la protéolyse précoce de l' α -spectrine calpaïne-dépendante).

Conclusion : Le mPTP est impliqué dans ce modèle d'attaque cérébrale chez le rat nouveau-né. L'administration de CsA permet, par inhibition du mPTP, de protéger le cerveau contre les lésions ischémiques modérées.



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Neurology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexnr

Evaluation of cyclosporine A in a stroke model in the immature rat brain

Pierre-Louis Leger^{a,b,c}, Damien De Paulis^d, Sonia Branco^{a,b}, Philippe Bonnin^e, Elisabeth Couture-Lepetit^d, Olivier Baud^b, Sylvain Renolleau^{a,b,c}, Michel Ovize^{d,f}, Abdallah Gharib^d, Christiane Charriaut-Marlangue^{a,b,*}

^a UMR-CNRS 7102, Université P&M Curie-Paris6, 75005 Paris, France

^b INSERM U676, Equipe AVENIR R05230HS, Hôpital R. Debré, 75019 Paris, France

^c AP-HP, Service de Réanimation, Hôpital Armand Trousseau, UPMC-Paris6, 75012 Paris, France

^d INSERM U886, Laboratoire de Physiologie Lyon-Nord, Université C. Bernard Lyon 1, France

^e AP-HP, Hôpital Lariboisière, Physiologie-Explorations Fonctionnelles, Université-Denis, Diderot-Paris7; INSERM U965; 75010 Paris, France

^f Hospices Civils de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Service de cardiologie, F-69677, Bron, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 October 2009

Revised 27 May 2010

Accepted 8 June 2010

Available online xxxxx

Keywords:

Neonatal brain injury
Permeability transition pore
Mitochondria
Rat pups
Reperfusion
Brain damage
Calpain
Alpha-spectrin

ABSTRACT

The effects of ischemia–reperfusion on opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) and its blockade in the immature brain are not fully understood. Presently, we evaluated the effect of cyclosporine A (CsA) on cell death and mPTP opening in a model of transient focal ischemia induced by permanent left middle cerebral artery, and homolateral transient common carotid artery occlusion (50 min) in P7 rats. CsA (10 mg/kg) was administered 14 h before induction of ischemia and effects were analyzed at 30–40 min and 48 h after reperfusion. CsA administration reduced infarct size, DNA fragmentation and apoptotic bodies, and inflammatory responses in mild but not severe injury. CsA increased the Ca^{2+} load required to open the mPTP (78.4 ± 19.2 vs. 50.2 ± 19.9 nmol.mg⁻¹ protein, $p < 0.05$) in limiting the decoupling of the respiratory chain by unchanged state 3 but reduced state 4, and attenuated early calpain-mediated alpha-spectrin proteolysis. In conclusion, CsA mediates inhibition of mPTP opening and has a tendency to protect immature rat brain against mild ischemic injury.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Perinatal hypoxia–ischemia is an important cause of neonatal brain injury and results in cerebral palsy, learning disabilities, visual field deficits, and epilepsy (Ferriero, 2004). However, recent data suggest a higher incidence of focal ischemia in neonates compared to the incidence of global cerebral ischemia arising from systemic asphyxia (Golomb et al., 2008; Lynch et al., 2002), while mechanisms of arterial ischemic injury without the confounding effect of hypoxia are not fully understood.

Mitochondria play essential roles in energy metabolism, generation of reactive oxygen species, and regulation of apoptosis in response to neuronal brain injury (Achanta et al., 2005). Mitochondrial biogenesis is a highly regulated process and occurs on a regular basis in healthy cells, where it is controlled by the nuclear genome. Damage to the bioenergetic integrity of mitochondria plays a critical role in adult ischemia (Murphy

et al., 1999), and the formation and opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) is one of the core mediators of this process (Ankarcrona et al., 1995; Bernardi, 1996; Crompton, 1999). Although calcium (Ca^{2+}) accumulation plays a pivotal role in normal neuronal function, excessive mitochondrial Ca^{2+} accumulation causes a severe reduction in mitochondrial membrane potential, triggers the formation and opening of the mPTP and membrane permeability leading to the release of apoptogenic proteins like cytochrome c, apoptosis-inducing factor (AIF), endonuclease G, Smac/Diablo from the mitochondrial intermembrane space (Halestrap, 2006; Halestrap, 2009), mitochondrial oxidative damage, and eventual cell death. Pharmacological inhibition of the pore opening by cyclosporine A (CsA), a potent inhibitor of mPTP formation, provides the strongest evidence that mPTP occurs during reperfusion after adult cerebral ischemia. However, for several years studies indicate that the pattern of cell death in the immature brain differs from that seen in the adult central nervous system (Vannucci and Hagberg, 2004). The contribution of mPTP in the immature brain was evidenced by entrapment of deoxy-glucose (Puka-Sundvall et al., 2001) and loss of glutathione (Wallin et al., 2000). However, CsA treatment did not provide neuroprotection after hypoxia–ischemia in 7-day-old rats (P7), whatever the dose as well as the route of administration used (Puka-Sundvall et al., 2001).

* Corresponding author. INSERM U676, Equipe AVENIR R05230HS, Hôpital Robert Debré, Bâtiment Ecran - 3ème étage, 48 Bd Séurier, 75019 Paris, France. Fax: +33 1 40 03 19 95.

To address the role of the mPTP in our model of ischemia–reperfusion (elicited by middle cerebral artery occlusion and transient common carotid occlusion) in P7 rats, we evaluate the effect of CsA at mid-term (48 h after ischemia) on lesion volume, cell death and inflammation, and at very short term (30–40 min after ischemia) on Ca^{2+} -induced mPTP opening and Ca^{2+} -dependent calpain-mediated alpha-spectrin degradation. We demonstrated that mPTP opening occurred in our stroke model and CsA was able to reduce cell injury only in the case of mild compared to severe lesion.

Materials and methods

Perinatal ischemia

All animal experimentation was conducted in accordance with the French and European Community guidelines for the care and use of experimental animals. Ischemia was performed on Wistar 7 day-old rat pups (17–21 g; Janvier, Le Genest St-Isle, France) of both sexes, as previously described (Renolleau et al., 1998). Rat pups were anesthetized with an intraperitoneally (i.p.) injection of chloral hydrate (350 mg/kg). The anaesthetized rat was positioned on its back and a median incision was made in the neck to expose the left common carotid artery (CCA). The rat was then placed on its right side and an oblique skin incision was made between the ear and the eye. After excision of the temporal muscle, the cranial bone was removed from the frontal suture to a level below the zygomatic arch. Then the left middle cerebral artery (MCA), exposed just after its appearance over the rhinal fissure, was electrocoagulated (MCAo) at the inferior level of the cerebral vein. After this procedure, a vascular clip (18055-04, Fine Science Tools, Heidelberg, Germany) was placed to occlude the left common carotid artery (tCCAo). Rats were then placed in an incubator to avoid hypothermia. After 50 min, the clip was removed. Carotid blood flow restoration was verified with the aid of a microscope. Both neck and cranial skin incisions were then closed. During the surgical procedure, external body temperature was maintained at 36–36.5 °C. After recovery, pups were transferred to their mothers.

Therapeutic protocol

Animals ($n=123$, see supplemental Table 1) were randomly assigned to one of the ten following groups. Control ischemic (receiving saline buffer) animals were distributed in 4 groups (G1, G3, G5 and G9). Cyclosporine (CsA, Sandimmun, Novartis®, Basel, Switzerland) dissolved in saline was administered either intraperitoneally (i.p., at a dose of 20 mg/kg in 200 μl) at the reperfusion (group G2) or intravenously (i.v., at a dose of 10 mg/kg in 100 μl under 1% isoflurane anesthesia) 1-h (group G4) or 14 h (groups G6 and G10) before the ischemic onset. Sham animals received an equivalent volume of 0.9% saline or CsA (groups G7 and G8). Mortality rate did not differ between CsA-treated and vehicle-treated groups in any of the experiments ($\leq 10\%$).

Arterial blood flow monitoring using ultrasound imaging

Rats subjected to ischemia ($n=11$) were analyzed using ultrasound measurements via an echocardiograph (Vivid 7, GE Medical Systems ultrasound®, Horten, Norway) equipped with a 12-MHz linear transducer (12 L) as previously reported (Bonnin et al., 2008; Villapol et al., 2009). Doppler spectral recordings in the right and left internal carotid arteries and basilar trunk (Hilger et al., 2002), were evaluated (1) before surgery (basal level), (2) during ischemia, and (3) 15 min after reperfusion. Data were then transferred to an ultrasound image workstation for subsequent analysis (PC EchoPAC, GE Medical Systems ultrasound®). The repeatability coefficient values for intra-observer repeatability were 1.5 cm s^{-1} for the peak systolic, 1.7 cm s^{-1} for the end-diastolic, and 1.7 cm s^{-1} for the mean BFV in

ICA. Blood flow values were expressed as percentage of basal level for each artery in each animal.

Measurement of infarct volume

P7 Rat were euthanized at 48 h (vehicle- and CsA-treated) and the extent of the pale ischemic lesion on the cortical surface was visually graded from 1 to 3, where 1, 2 and 3 indicated small, medium and large infarctus, respectively (Joly et al., 2004). Brains were then fixed for 2 days in 4% buffered paraformaldehyde and cryoprotected in 20% sucrose for 3 days. Coronal brain sections (50 μm) were cut on a cryostat and collected on gelatin-coated slides. Sixteen sections from anterior striatum to posterior hippocampus (corresponding to plates 9 to 27 in Paxinos' rat brain atlas) were selected, taken at equally spaced 0.5-mm intervals. Infarct size was determined on cresyl violet-stained sections using an image analyzer (Image-Pro, Paris, France). Infarct volumes were expressed as the percentage of the ipsilateral hemisphere.

Assessment of cell damage

Coronal sections (20 μm , $n=6$ for each condition) were prepared as described above and processed for DNA strand breaks (TUNEL assay) using the *in situ* Cell Death Detection Kit (Fluorescein, Roche®, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions. TUNEL-positive nuclei were scored under fluorescence microscopy. Apoptosis was determined by nuclear condensation and/or fragmentation into apoptotic bodies, whereas flocculent chromatin signed necrosis.

Immunohistochemistry and immunofluorescence

Coronal sections ($n=6$ for each condition) were first incubated for 30 min with 5% normal horse serum in PBS with 0.5% triton X-100 (PBS-TX-NHS), then overnight at 4 °C with appropriately diluted primary antibody in PBS-TX-NHS. The primary antibodies against myeloperoxidase (N5787, Sigma, Sigma-Aldrich, France; 1:200), to stain neutrophils, were visualized after incubation with the anti-rabbit biotinylated secondary antibody (Vectastain Lab., AbCys, Paris, France, 1:200) followed by the streptavidin–biotin–peroxidase complex (Elite ABC kit, Vectastain Lab.). Nonspecific peroxidase activity was abrogated by incubating the sections in 1% hydrogen peroxide in PBS 0.1 M at the appropriate stage. Antibodies against tomatolectin (Vector, Burlingame, CA) to stain resident, activated macrophage/microglia were revealed using streptavidin, anti-mouse IgG antibody coupled to the red fluorescent marker Cy3 (Jackson ImmunoResearch laboratories, Interchim, Asnières, France). All these sections were used for cell counting.

Mast cell (MC) quantification

Sections (12 per brain) were stained with 0.01% acidic (pH=3.8) toluidine blue as previously described (Biran et al., 2008). Quantitative data were obtained by counting MCs both in the pia mater (3 sections from Bregma 4.5 to 3.0 mm, every 500 μm) and choroid fissure (3 sections from Bregma –1.80 to –3.30 mm, every 500 μm).

Preparation of isolated mitochondria

Vehicle- and CsA-treated P7 rats (groups G9 and G10, see supplemental Table 1) were killed by decapitation at 30–40 min after reperfusion ($n=2$ animals for each preparation of isolated mitochondria with a total of 6 to 16 animals). The brains were then rapidly dissected out on a cold plate. Cortical tissues (corresponding to the middle cerebral artery territory) were harvested from both lesioned and sham animals. Mitochondria were isolated in a 50 mM Tris (pH 7.4) buffer containing 70 mM sucrose, 210 mM mannitol,

10 mM EGTA, by differential centrifugation of cortical homogenates, as described previously (Gateau-Roesch et al., 2000; Wang et al., 2009) giving a supernatant (S2) and a mitochondrial (M1) fraction. Mitochondria were resuspended in the same medium without EGTA and kept on ice. Cytoplasmic and mitochondrial protein concentration was measured by the Bradford's method (1976) (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard.

Electron microscopy

Brain mitochondria from sham animals ($n=3$) isolated as described above, were fixed in 0.1 M Na-cacodylate buffer containing glutaraldehyde 2%, pH 7.4 and post-fixed in 1% osmium tetroxide. Dehydration was performed in a series of ethanol and propylene oxide extractions, before sample embedding in Epon. Sections were contrasted and examined with a Jeol 100 CXII electron microscope.

Measurement of the mitochondrial Ca^{2+} retention capacity (CRC)

CRC is defined here as the amount of calcium required to trigger mPTP opening *in vitro*, as previously described (Argaud et al., 2004). Measurement of CRC was carried at 25 °C using a spectrofluorophotometer (F-2500 digi lab, Hitachi) equipped with magnetic stirring and thermostatic control. Extra-mitochondrial free Ca^{2+} was measured in the presence of Calcium GreenTM-5 N (1 μM) with excitation and emission wavelengths set at 500 and 530 nm, respectively. The mitochondria (0.25 mg of proteins) were resuspended in 2 ml buffer containing 50 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , 20 mM Tris, 150 mM sucrose and 5 mM succinate at pH 7.4. Following a preincubation period for 1 min, CaCl_2 was administered every 1 min. Once added, Ca^{2+} is rapidly taken up by the mitochondria resulting in a rapid return of extra-mitochondria Ca^{2+} concentration to near baseline level (Argaud et al., 2004). After sufficient CaCl_2 loading, a rapid increase of the fluorescence indicates a massive release of Ca^{2+} by mitochondria due to mPTP opening. The CRC was expressed as n moles of Ca^{2+} per mg of protein.

Mitochondrial oxygen consumption

Mitochondrial oxygen consumption was measured using Oroboros instrument (Oxygraph) at 25 °C. Mitochondria (about 0.3 mg of proteins) were incubated in 2 ml medium containing 60 mM KCl, 150 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl, 5 mM KH_2PO_4 and glutamate 20 mM at pH 7.4. Respiration state 3 was initiated by the addition of 0.2 mM ADP and state 4 without ADP. The oxygen consumption was expressed in $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of protein. The respiratory control index (RCI) was calculated as the ratio of the state 3/state 4.

Western blotting analysis

Proteins (40 μg) from fractions M1 and S2 (see above, $n=7$ each) were submitted to Western blotting as previously described (Renolleau et al., 2007). The primary antibodies used in this study were anti α -spectrin (FG 6090, Biomol, Cogter, Paris, France), cyclophilin D (AP1035, Calbiochem, Merck Chemicals, Nottingham, UK) and AIF (AB16501, Chemicon, Cogter). A standardized protein loading control was included on each blot using antibodies against β -actin (clone AC-15, Sigma Aldrich) for cytosolic proteins and against subunit IV of COX-1 (clone 20E8, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for mitochondrial proteins.

Statistical analysis

Two investigators blinded to treatment group independently estimated the volume lesion and the number of positive cells. One-way ANOVA and *post hoc* Bonferroni test was used to analyze

differences between the groups (Ca^{2+} overload, TUNEL assay data, cell counts). Infarct volumes (made by an investigator blind to the treatment) were analyzed using non-parametric tests. All results are expressed as mean \pm SD. StatView 6.0 software was used in all statistical analyses.

Results

Effects of cyclosporine A (CsA) treatment on neonatal ischemic injury

Different protocols of CsA treatment were used. A first low-dose CsA (20 mg/kg, *i.p.*) was given immediately after reperfusion and did not affect the extent of brain damage evaluated 48 h after reperfusion (G2, $12.3 \pm 6.2\%$, $n=9$) as compared to vehicle-treated animals (G1, $12.2 \pm 5.6\%$, $n=9$, Fig. 1A). In a second set of experiments, CsA (10 mg/kg, *i.v.*) was delivered 1 h before surgery (G4) and mean infarct volume was not significantly reduced despite a slight decrease in the mean lesion size in CsA- versus vehicle-treated ischemic (G3) animals (16.4 ± 7.5 vs. $19.2 \pm 8.1\%$, NS, $n=9$ each, Fig. 1B) at 48 h. In a final set of experiments, we evaluated the effect of CsA (10 mg/kg, *i.v.*) 14 h before ischemia (G6), because CsA has a half-life of about 16–20 h in rodents (Vachon et al., 2002). As shown in Fig. 1C, this protocol did not lead to significant reduction in size lesion (mean of 11.4 ± 3.3 and 11.4 ± 9.2 for vehicle-G5 vs. CsA treatment respectively, $n=11$ each) despite a smaller median in the CsA group (9 vs. 11.5). A similar minor median was also found in the two previous experiments (9 vs. 12, G2 vs. G1 and 17 vs. 19.5, G3 vs. G4, respectively). Subanalysis according to sex did not show protection in one gender compared to the other (data not shown) and could not explain the wide standard deviation found in the group G6. Interestingly, it appeared that CsA-treated animals belonging to score1-group (see Materials and methods) displayed a reduced lesion ($p=0.068$) as compared to score1 vehicle-treated animals (median of 6.5 vs. 10), an effect neither observed for score2-group (Fig. 2) nor for the alone animal from score3-group (supplementary Table 2). Both groups (score1 and score2) were characterized by hemodynamic responses as demonstrated using 2D color-coded pulsed Doppler ultrasound imaging. In the basal state, heart rate of the rat pups was 362.3 ± 22.4 beats per minute, which remained stable during the whole procedure of ischemia-reperfusion. The percentage of changes in peak systolic and end-diastolic blood flow velocity (BFV) recorded in each artery was strongly similar to the percentage of changes in the mean BFV (mBFV). Thus, only the changes in mBFVs are presented. Ischemia induced a reverse flow in the left internal carotid artery (ICA) towards the left external carotid whereas a significant slight increase in mBFV percentage (against basal levels) in the basilar trunk was observed in group1 (by $121 \pm 23\%$) but not in group2 ($96 \pm 17\%$, $p<0.05$; see supplementary Table 3).

Effect of CsA on cell death and inflammatory responses

Lesion was characterized by cell death using the TUNEL assay. A reduced percentage of TUNEL-positive nuclei from 76.8 ± 11.2 to 49.2 ± 10.8 ($n=5$, $p<0.001$ compared to vehicle-ischemia - G5) was observed after CsA pre-treatment (in G6 score1 animals) and 48 h of reperfusion (Fig. 3) as well as necrosis (from 28 ± 7 to $5 \pm 2\%$). In addition, a very significant decrease (by 70%) of apoptotic bodies as compared to vehicle-treated ischemic animals (Fig. 3D) was observed, suggesting delayed cell death. An increase density of reactive astrocytes (GFAP-positive cells) with clasmatodendrotic features represents a delayed hallmark of ischemic outcome in our neonatal stroke model (Benjelloun et al., 1999; Gelot et al., 2009, Fig. 4A). Forty-eight hours after CsA treatment the number of reactive GFAP-positive astrocytes is reduced as well as their clasmatodendrotic characteristic (Fig. 4A–B).

CsA reduced degranulation of mast cells in the pia mater (Fig. 4C–D), but not in the choroid fissure (Table 1), without a reduction in their total number. In a similar way, the number of myeloperoxidase-stained neutrophils was also very significantly reduced in the pia mater and only

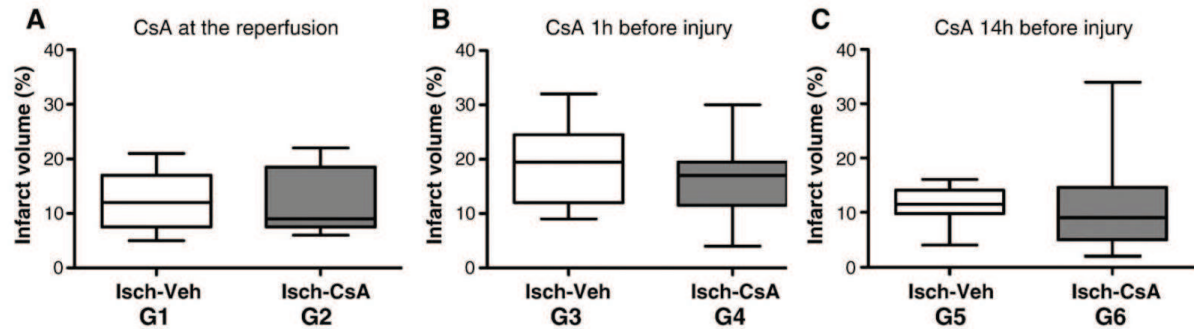


Fig. 1. Effect of CsA on brain lesion after neonatal stroke. P7 rats underwent electrocoagulation of the left middle cerebral artery and transient homolateral common carotid artery occlusion for 50 min followed by 48 h of recovery (A–C). Saline buffer was administered to groups G1, G3 and G5. CsA at 20 mg/kg was administered i.p. after reperfusion (release of the vascular clip on the left CCA, G2). CsA at 10 mg/kg was administered in the jugular vein 1 h (G4) or 14 h (G6) before surgery. CsA did not induce a significant reduction of the infarct volume at 48 h after ischemia in the different conditions. It should be, however, noted that in all experiments a reduced median (by 2 to 2.5 points) was detected in treated compared to untreated animals.

a general trend toward a reduced number in the lesion border was observed (Table 1 and Fig. 4E–F). CsA also significantly reduced the number of activated microglia, labeled with tomato lectin, in the border of the lesion as compared to vehicle-treated ischemic animals (Table 1).

In contrast, no significant reduced TUNEL-positive nuclei, GFAP-positive astrocytes, activated microglia and degranulated mast cells were detected in CsA-treated animals with a score-2 and -3 as compared to vehicle-treated animals with the same score-2 and -3 (data not shown).

Ca²⁺ retention capacity (CRC) in isolated ischemic mitochondria

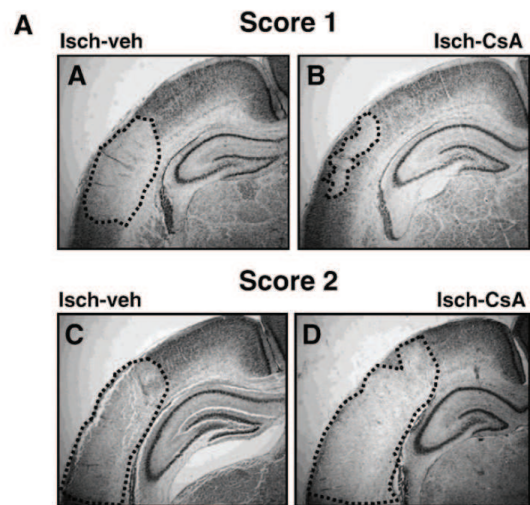
The brain mitochondria from sham animals are shown in Fig. 5A. A representation of the final pellet indicated a low contamination by synaptosomes and vesicles. At higher magnification, the integrity of isolated mitochondria was preserved. Cyclophilin D (CyD) was abundant in P7 rat brain and its expression was not altered at 30–40 min after ischemia–reperfusion (Fig. 5B). The functional properties of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) were evaluated using the Ca²⁺ retention capacity (CRC assay), which measures the threshold amount of Ca²⁺ required to open the PTP in isolated mitochondria. As shown in Fig. 5C and D, the amount of Ca²⁺ required to open the PTP averaged $75.7 \pm 22.6 \text{ nmol mg}^{-1}$ mitochondrial proteins in sham animals (curve a, $n=11$ —group G7) and 30–40 min reperfusion after ischemia led to a decreased CRC of $50.2 \pm 19.9 \text{ nmol mg}^{-1}$ of proteins (curve b, $n=15$ —group G9, $p<0.05$ vs. sham). CsA was efficient in both conditions giving a ratio between CRC detected in the presence and absence of CsA of 1.5 and 1.59 in sham and ischemic rats, respectively (not shown). Ischemia produced a small decrease in respiratory control index (RCI, state3/state4) after 30–40 min reperfusion (4.31 ± 1.27 vs. 5.66 ± 1.41) mainly related to suppression of substrate and ADP-stimulated respiration (state 3, $p<0.05$), as state 4 respiration (in the absence of ADP) was unaffected (Table 2). Measure of CRC at 24 h after ischemia was of $49.83 \pm 15.74 \text{ nmol mg}^{-1}$ of proteins ($n=6$) with no decrease in respiratory control index (5.64 ± 0.46 , NS compared to sham animals).

Pre-treatment of animals (sham and ischemic, groups G8 and G10) with CsA 14 h before (to have a reduced CsA blood concentration at the time point of examination) led to an averaged amount of Ca²⁺ required to open the mPTP of $92.7 \pm 15.3 \text{ nmol mg}^{-1}$ mitochondrial proteins in CsA-treated sham animals ($n=6$) and $78.4 \pm 19.2 \text{ nmol mg}^{-1}$ ($n=12$, NS vs. sham-CsA) after ischemia and 30–40 min of reperfusion (curves c and d). Administration of 10 mg/kg CsA in sham animals did not modify mitochondrial respiration compared to untreated animals (Table 2). This treatment before ischemia increased the RCI to 5.64 ± 1.22 ($p<0.05$ vs. vehicle-ischemia), a similar level than that detected in sham animals. Interestingly, state 3 was not

modified but state 4 was significantly reduced, compared to untreated ischemia (Table 2).

Early cell death markers

We then tested the ability of CsA to preserve cellular cytoskeleton by preventing early calpain-mediated alpha-spectrin breakdown in



B	Isch -veh	Isch -CsA
Score 1 (n=5) [4 - 11 %]	9.0 ± 3.6	5.6 ± 2.5
Score 2 (n=5) [12 - 18 %]	13.6 ± 1.8	12.8 ± 3.8

Fig. 2. CsA administered 14 h before surgery reduced brain injury in score1 animals. (A) Illustration of the ischemic lesion on cresyl violet-stained coronal sections animals with a score1 (A–B) and a score2 (C–D). (B) Table showing the mean infarct volume of animals according to their score of the lesion extent (see Materials and methods) in untreated and CsA-treated ischemic animals. Note that CsA reduced the lesion in score1-group ($n=5$) but not in score2-group ($n=5$).

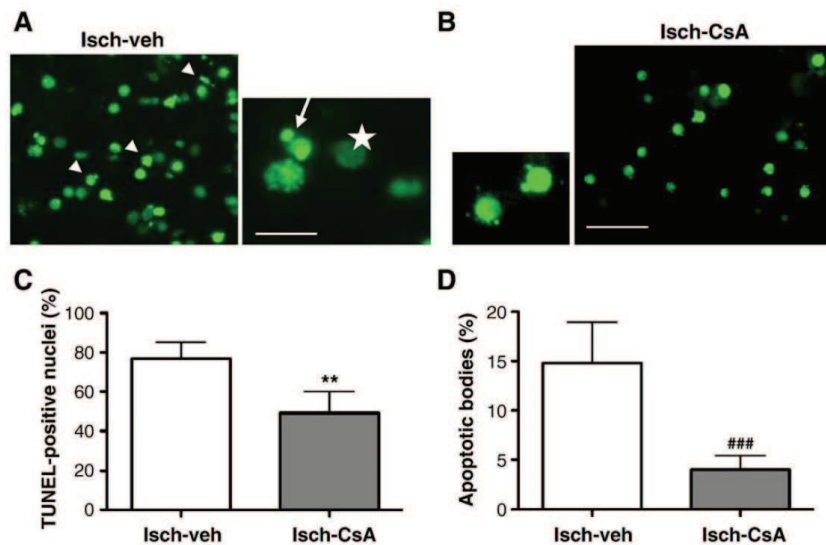


Fig. 3. CsA administered 14 h before surgery reduced cell death in score1 animals. DNA fragmentation was determined by dUTP nick-end labeling (TUNEL) at 48 h after ischemia. Apoptosis (chromatin condensation and apoptotic bodies) was scored under fluorescence microscopy. (A) Note the presence of numerous apoptotic bodies (white arrowheads) in the lesion. Enlarged panel demonstrated the presence of a continuum between apoptosis (white arrow, apoptotic bodies) and necrosis (white star illustrating a diffuse staining). (B) Note that TUNEL-positive nuclei were reduced in CsA-treated animals. (C–D) Quantification of TUNEL-positive nuclei (C) and apoptotic bodies (D).

neonatal ischemia. Densitometric western blot analysis of 150–145 kDa alpha-spectrin breakdown products was conducted in S2 fraction isolated from sham, vehicle- and CsA-treated cortical tissues at 30–40 min after ischemia (Fig. 6A). Alpha-spectrin breakdown was particularly observed after ischemia but not in sham and CsA-treated animals. However, at this time point after reperfusion, the permeability of the inner mitochondrial membrane was not obvious because AIF (Fig. 6B), Smac-Diablo or cytochrome c (not shown) protein levels were not modified between the three different conditions (sham, ischemia and CsA-treated ischemia), suggesting that at this time point no mitochondrial membrane permeabilization occurs.

Discussion

Previous studies have shown that administration of CsA, a potent modulator of the mitochondrial PTP (mPTP), attenuates mitochondrial dysfunction and neuronal damage after experimental heart and brain ischemia-reperfusion (Halestrap, 2006). Mechanisms of CsA protection are mediated through inhibition of mPTP by binding to cyclophilin D (CyD), which is a necessary molecular component of the mPTP (Halestrap, 2009). In this study, we demonstrated that (1) CsA administration before ischemia in P7 rats decreased lesion, cell death and inflammation only after mild injury; (2) ischemia involved mPTP opening early after reperfusion and (3) CsA (14 h before ischemia) blocked mPTP opening and early Ca^{2+} -dependent calpain activation.

Mitochondrial uptake of Ca^{2+} requires a membrane potential (Murphy et al., 1999) and this is collapsed during severe ischemia. During reperfusion, mitochondrial membrane potential and Ca^{2+} uptake are restored, leading to an oxidized intracellular environment, promoting mPTP (Solenski et al., 1997). Concurrent loss of mitochondrial membrane potential and flux of molecules smaller than 1500-Da from the mitochondrial matrix and intermembrane space ensue (for review see Halestrap, 2009). In the developing brain, mPTP was demonstrated to occur after hypoxia-ischemia, as indicated by entrapment of deoxyglucose in mitochondria (Puka-Sundvall et al., 2001). The changes in mitochondrial deoxyglucose accumulation were paralleled by a loss of mitochondrial glutathione (Wallin et al.,

2000), which support the existence of mPTP in the immature brain. According to these data, our results demonstrated that mPTP occurs early (30–40 min) after reperfusion. In contrast, our data reported a moderate decrease (~25%) in mitochondrial respiration as compared to that found (reduced by 50%) 1 h after hypoxia-ischemia (Puka-Sundvall et al., 2000). Twenty-four hours after ischemia, the respiratory control index was recovered (similar to that obtained in sham) and this recover may be in part attributed to healthy proliferating astrocytes as previously reported (Spiegler et al., 2007) and thus, it is difficult to evaluate the occurrence of mPTP at this time point of analysis. Only a partial recover in respiratory control index was observed between 3 and 8 h after hypoxia-ischemia (Puka-Sundvall et al., 2000). We also demonstrated that CsA administered 14 h before ischemic onset was able to restore the mitochondrial respiratory control index and to inhibit opening of the mPTP after 30–40 min of reperfusion. CsA did not modify state 3 but reduced state 4, suggesting that CsA was able to limit the decoupling of the respiratory chain, an effect not observed by Puka-Sundvall et al. (2001). Griffiths and Halestrap (1995) demonstrated that the mPTP remains closed throughout cardiac ischemia, but opens at time of reperfusion, as early as 2 min (Halestrap et al., 2004) and reached a maximal value after 30–40 min (Griffiths and Halestrap, 1995). These data strongly suggested that CsA should be administered before reperfusion. Indeed, CsA provide neuroprotection after focal ischemia when administered orally for several days prior to ischemia in the adult rat (Shiga et al., 1992), and immediately following ischemia, either intraarterially (Yoshimoto and Siesjo, 1999) or intraperitoneally (Matsumoto et al., 1999). However, CsA administered i.p. immediately after recirculation, and after 24 h of recirculation also diminished infarct size in a adult rat model of transient focal ischemia (Matsumoto et al., 1999). In the developing rat brain, we demonstrated that CsA inducing a trend toward reduced lesion (only after mild injury) should be administered before ischemia, suggesting a long lasting action of this pharmacological agent, and mechanisms of its action *in vivo* are not yet well defined. Interestingly, it was reported that CsA only protects against neuronal injury by limited doses of glutamate and selected ischemic paradigms. CsA failed to prevent

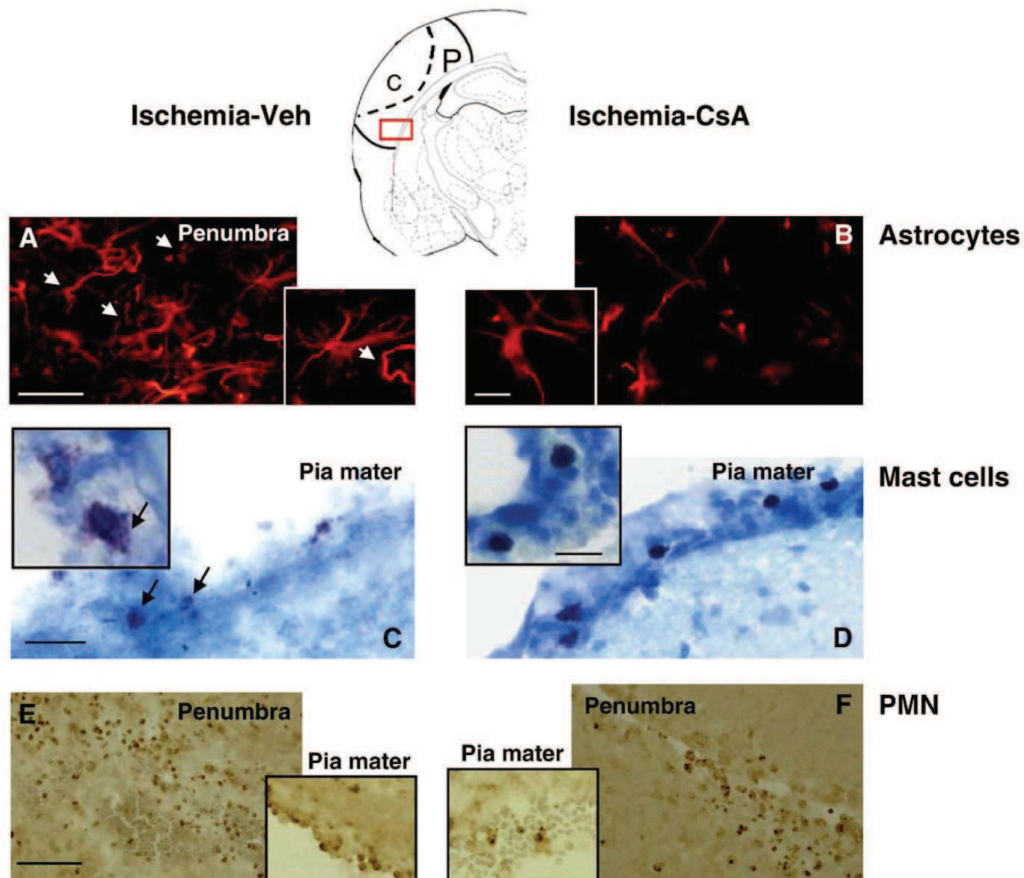


Fig. 4. CsA administered 14 h before surgery reduced inflammatory responses. (A–B) Astrogliosis was determined using glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunostaining in the penumbra (P in the schema at Bregma -3.72 mm). Note that CsA significantly reduced reactive astrocytes in the border of the lesion and that GFAP immunoreactivity and clasmotodendrosis (beaded and broken processes, arrowheads in A) are more important after ischemia than after CsA treatment (enlarged panels in A–B). (C–D) Toluidin blue-stained sections in the pia mater to detect mast cell granules. Note highly degranulated mast cells (black arrows) in ischemic animals (C), but not after CsA (D) treatment. (E–F) Neutrophils (polymorphonuclear cells, PMN) were detected with anti-myeloperoxidase immunostaining in both the lesion border (P) and the pia mater. Note that CsA significantly reduced the number of neutrophils in the pia mater as compared to vehicle-treated ischemic sections. Photographs are representative of three different experiments. Scale bar represents $50 \mu\text{m}$ and $25 \mu\text{m}$ (enlarged panels, A–D). The red rectangle represents the penumbral zone used for cell counting. C = core of the lesion.

Ca^{2+} -induced depolarization or to repolarize mitochondria when mitochondria were depolarized excessively. Similarly, CsA failed to prevent mitochondria swelling or polyethylenglycol (PEG)-induced shrinkage after swelling when the Ca^{2+} challenge produced a strong, sustained depolarization. Thus in brain mitochondria CsA may be effective only as an inhibitor of the permeability transition and the Ca^{2+} -activated low permeability state under conditions of partial

depolarization (Brustovetsky and Dubinsky, 2000). In P7 Wistar rats, the most commonly used model was that of hypoxia–ischemia designed by Vannucci's group (Rice et al., 1981). Our ischemic model can be considered complementary since both models examine two different types of insults (hypoxia–ischemia and ischemia–reperfusion). Although both models shared similar mechanisms, we observed that mitochondrial respiration appeared to be early less

Table 1

Quantification of inflammatory cells in coronal sections from sham and ischemic rats treated or not by CsA (10 mg/kg 12–14 h before ischemia) at 48 h after reperfusion.

	Degranulating Mast cells (%) ^a		Polymorphonuclear neutrophils ^b		Microglia ^c
	Pia mater	Choroid fissure	Pia mater	Lesion border	Lesion border
Sham (n=5)	13 ± 6	18 ± 12	–	–	15.2 ± 0.2
Ischemia (n=5)	35 ± 6	33 ± 16	65.3 ± 19.9	43.3 ± 11.4	34.1 ± 5.5
Sham-CsA (n=5)	11 ± 4	20 ± 5	–	–	14.8 ± 0.4
Isch-CsA (n=6)	24 ± 7**	34 ± 11	14.2 ± 1.9***	35.3 ± 14.4	20.0 ± 2.4**

Data are mean ± SD. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus ischemia.

^a mast cells were stained by acidic toluidine blue to determine the percentage of degranulating mast cells (see Biran et al., 2008).

^b polymorphonuclear neutrophils were stained by immunohistochemistry with antibodies against myeloperoxidase.

^c resident microglia in sham and activated microglia (after ischemia) were stained by immunohistochemistry with antibodies against tomatolectin.

Please cite this article as: Leger, P.-L., et al., Evaluation of cyclosporine A in a stroke model in the immature rat brain, *Exp. Neurol.* (2010), doi:10.1016/j.expneurol.2010.06.009

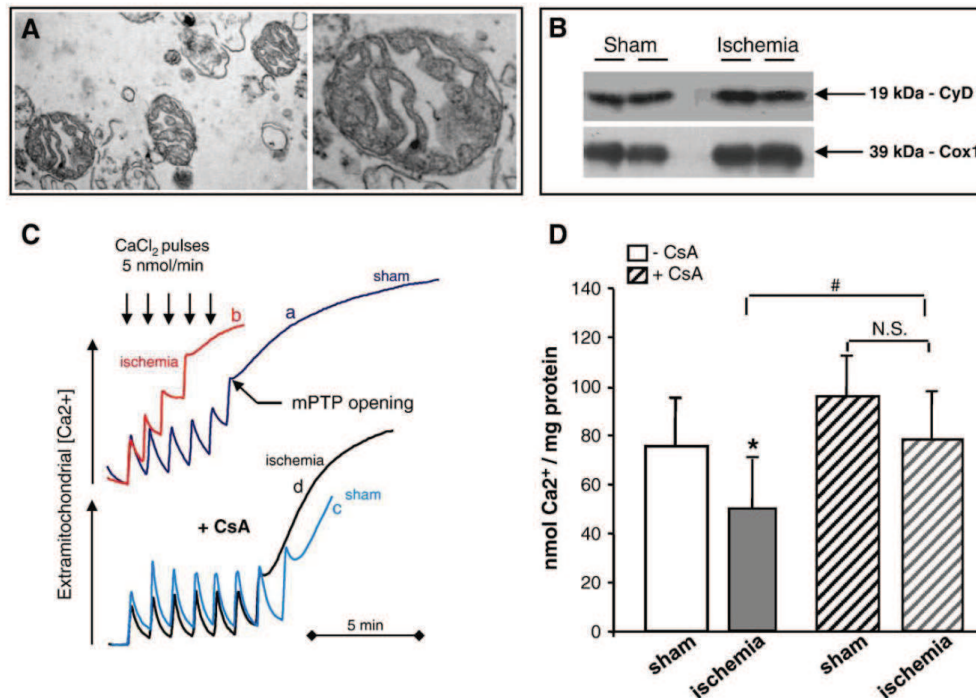


Fig. 5. Brain mitochondria and Ca^{2+} -induced mPTP opening. (A) Electron microscopy showing morphology of isolated brain mitochondria from sham animals ($n=3$); magnification $\times 25,000$ for mitochondrial pellet (left) and $\times 65,000$ for isolated mitochondria (right). (B) Representative immunoblotting picture of mitochondrial CyD in sham and ischemic P7 rats. (C) Typical examples of a Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening recording in mitochondria isolated from sham and ischemic animals and in mitochondria isolated from CsA-treated sham and ischemic animals (10 mg/kg, 14 h before surgery). Traces shown are representative of at least eleven experiments; a (dark blue): sham animals; b (red): ischemic animals; c (blue): CsA-treated sham rats; d (black): CsA-treated ischemic rats. D: Ca^{2+} overload required for PTP pore opening in sham (white bar, $n=11$) versus ischemic (grey bar, $n=15$) animals untreated (plain) or treated with CsA (hatched). Data are mean \pm SD with $*p<0.05$ vs. sham and $^{\#}p<0.05$ vs. ischemia. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

affected in our model compared to the other, suggesting that MCA electrocoagulation and transient CCA occlusion induced milder injury. CsA given 14 h before ischemia reduced and delayed cell death characterized by DNA fragmentation at 48 h in animals with the smaller score lesion (score 1). One of the hallmarks of apoptosis is the compaction of chromatin and its degradation early in high molecular weight fragments and later on the chromatin is cut into shorter fragments referred as oligonucleosomal DNA fragmentation (Wyllie, 1980). Microscopic analysis of TUNEL-positive nuclei indicated that oligonucleosomal DNA cleavage leads to the formation of apoptotic bodies at 48 h after ischemia-reperfusion. We previously reported that neonatal ischemia induced high molecular weight fragments of 300 and 50 kbp between 6 and 24 h of reperfusion with a significant amount of intact DNA still remaining suggesting high chromatin condensation whereas presence of 10 kbp and shorter fragments (giving apoptotic bodies) were delayed (Charriaut-Marlangue et al., 1999).

Calpains are Ca^{2+} -dependent cysteine proteases usually implicated in necrosis, but they have also been shown to be involved in cell death after hypoxia-ischemia, either in concert with caspases or independently (Blomgren et al., 2001). We demonstrated that CsA (14 h before ischemia) was able to preserve the cytoskeleton by preventing calpain-mediated alpha-spectrin breakdown 30–40 min after neonatal ischemia. Spectrin breakdown products and more precisely the 150 kDa band was obviously detected as early as 30 min after hypoxia-ischemia (Blomgren et al., 1995) and most studies on the role of calpains in ischemia have been focused on μ -calpain, since that isozyme requires a lower calcium concentration for initiation of activity *in vitro*. However, both μ - and m-calpain respond to hypoxia-ischemia in the same manner (Blomgren et al., 1995, 2001).

Inhibition of mPTP opening was mediated by Cyclophilin D (CyD), a matrix protein that is encoded by the nuclear genome (Connern and Halestrap, 1992; Tanveer et al., 1996). CyD knockout mice showed protection against ischemia-reperfusion of both the heart (Baines et

Table 2
Effect of CsA on mitochondrial respiration after neonatal stroke.

	State 3	State 4	RCR (State3/State4)
Sham ($n=16$)	18.74 ± 3.74	3.40 ± 0.56	5.66 ± 1.41
Ischemia ($n=19$)	$14.36 \pm 3.42^{**}$	3.46 ± 0.75	$4.31 \pm 1.27^{**}$
Sham + CsA ($n=6$)	21.07 ± 5.00	3.34 ± 0.69	6.30 ± 0.48
Ischemia + CsA ($n=13$)	$14.66 \pm 3.01^{**}$	$2.72 \pm 0.83^{\$}$	5.64 ± 1.22

States 3 (+ADP) and 4 (-ADP) (in nmol O_2 /min/mg protein) and respiratory control ratio (RCR) were measured in the mitochondrial fraction isolated from the cerebral cortex of sham P7 rats, and after 30–40 min of ischemia-reperfusion in the absence or presence of CsA at 10 mg/kg (administered 14 h before injury). Data are expressed as mean \pm S.D.; $**p<0.01$ versus sham, $^{\#}p<0.01$ versus sham-CsA, $^{\$}p<0.05$ versus ischemia.

Please cite this article as: Leger, P.-L., et al., Evaluation of cyclosporine A in a stroke model in the immature rat brain, *Exp. Neurol.* (2010), doi:10.1016/j.expneurol.2010.06.009

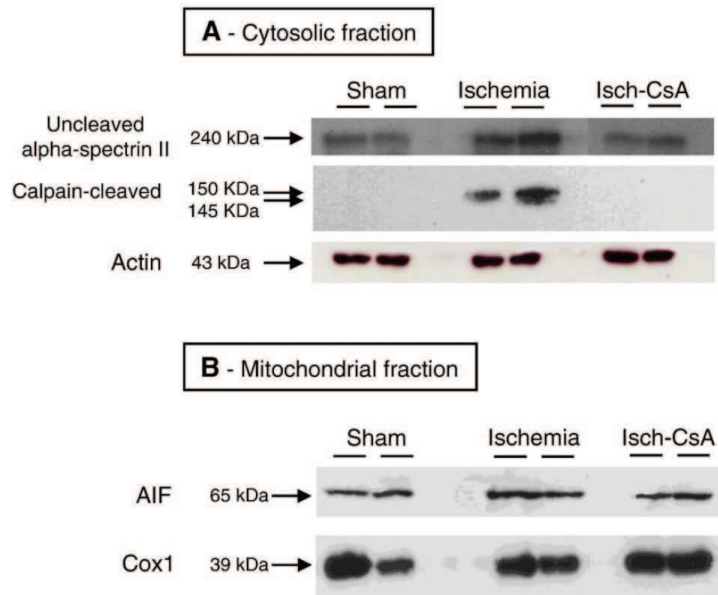


Fig. 6. CsA administered 14 h before surgery blocked cell death markers. (A) Representative Western blot of proteins from S2 fraction (see materials and methods) from sham, vehicle- and CsA-treated ischemic rats killed at 30–40 min after ischemia, probed with anti α II-spectrin. Note that the 145–150 kDa breakdown alpha-spectrin II products were only detected in ischemic animals and that specific cleavage was inhibited with CsA treatment. The cytosolic marker β -actin was used as protein loading control. (B) Representative Western blot of proteins from M1 fraction from sham, vehicle- and CsA-treated ischemic rats killed at 30–40 min after ischemia, probed with anti-AIF. Note that the same amount of AIF was detected in all conditions. The mitochondrial marker COX-1 was used as protein loading control.

al., 2005; Nakagawa et al., 2005) and brain (Schinzel et al., 2005; Wang et al., 2009). Conversely, it was recently demonstrated that CyD prevents rather than enhances mitochondrial permeabilization, because lack of CyD worsens hypoxic-ischemic injury in P9 CyD^{-/-} mice (Wang et al., 2009). Furthermore, authors reported that brain mitochondria from neonatal mice required higher (≥ 200 nmol/mg protein) levels of Ca^{2+} than those from adults (~ 100 nmol/mg protein) to open the mPTP. In this study, Ca^{2+} level was not found so high and CsA was, however, demonstrated to be an efficient desensitizer in neonatal P7 rat brain mitochondria. Wang et al. suggested that the mPTP had a considerably higher induction threshold and lower sensitivity to CsA in neonatal versus adult mice. On the contrary, Bax, a pro-apoptotic protein is critical for the development of brain injury in the adult, whereas Bax-dependent mechanisms prevail in the immature brain (Wang et al., 2009). As we previously reported that Bax was up-regulated between 12 and 96 h after ischemia (Renolleau et al., 1997), we cannot rule out that both mechanisms (mPTP opening and Bax-dependent cell death) could occur in concert in our model and further experiments are needed to evaluate the kinetic of that differential mechanisms (and their possible crosstalk) implicated after ischemia in animals displaying a score1 or score2 lesion. These two groups can be differentiated with ultrasound imaging by their hemodynamic responses. In score1 animals, early (during ischemia) rise in blood flow velocities in the basilar trunk reflects the efficiency of communicating arteries through the circle of Willis (van Laar et al., 2007) leading to a fast opening of cortical arterial anastomoses between anterior and posterior territories (Liebeskind, 2003; Menzies et al., 1992), which reduces the deeper of the ipsilateral hypoperfusion and thus lesion injury (Renolleau et al., manuscript in preparation).

CsA is also thought to act by targeting the Ca^{2+} -dependent protein phosphatase calcineurin and to be an inhibitor of IgE-dependent histamine release from mast cells (Harrison et al., 2007). Others and we recently reported that the recruitment of mast cells releasing histamine might contribute to ischemia-induced brain damage in P7

rats (Biran et al., 2008; Jin et al., 2007). However, as CsA-mediated inhibition of mast cell degranulation was only observed in the pia matter, we assume that calcineurin inhibition should only play a little role in our neonatal stroke model.

In conclusion, in the case of moderate ischemia, CsA given before ischemia was able to block the early Ca^{2+} release from mitochondria by preventing the opening of the mPTP and to reduce cell injury measured at 48 h in the immature rat brain. CsA or similar treatment might be used in high-risk pregnancies where ischemic events are common, or, because the potential side effects would be limited, in the hour before Cesarean delivery in patients having variable or late decelerations (indications of ischemic risk).

Acknowledgments

This study was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-06-BYOS-0002-03).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.expneurol.2010.06.009.

References

- Achanta, G., Sasaki, R., Feng, L., Carew, J.S., Lu, W., Pelicano, H., Keating, M.J., Huang, P., 2005. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *EMBO J.* 24, 3482–3492.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A., Nicotera, P., 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15, 961–973.
- Argaud, L., Gateau-Roesch, O., Chalabreysse, L., Gomez, L., Loufouat, J., Thivolet-Bejui, F., Robert, D., Ovize, M., 2004. Preconditioning delays Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc. Res.* 61, 115–122.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., Robbins, J., Molkenin, J.D., 2005. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434, 658–662.

- Benjelloun, N., Renolleau, S., Represa, A., Ben-Ari, Y., Charriat-Marlangue, C., 1999. Inflammatory responses in the cerebral cortex after ischemia in the P7 neonatal rat. *Stroke* 30 (9), 1916–1923 (discussion 1923–4).
- Bernardi, P., 1996. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 5–9.
- Biran, V., Cochois, V., Karroubi, A., Arrang, J.M., Charriat-Marlangue, C., Heron, A., 2008. Stroke induces histamine accumulation and mast cell degranulation in the neonatal rat brain. *Brain Pathol.* 18, 1–9.
- Blomgren, K., McRae, A., Bona, E., Saïdo, T.C., Karlsson, J.O., Hagberg, H., 1995. Degradation of fodrin and MAP 2 after neonatal cerebral hypoxic-ischemia. *Brain Res.* 684, 136–142.
- Blomgren, K., Zhu, C., Wang, X., Karlsson, J.O., Leverin, A.L., Bahr, B.A., Mallard, C., Hagberg, H., 2001. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J. Biol. Chem.* 276, 10191–10198.
- Bonnin, P., Debbabi, H., Mariani, J., Charriat-Marlangue, C., Renolleau, S., 2008. Ultrasonic assessment of cerebral blood flow changes during ischemia-reperfusion in 7-day-old rats. *Ultrasound Med. Biol.* 34, 913–922.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brustovetsky, N., Dubinsky, J.M., 2000. Limitations of cyclosporin A inhibition of the permeability transition in CNS mitochondria. *J. Neurosci.* 20, 8229–8237.
- Charriat-Marlangue, C., Richard, E., Ben-Ari, Y., 1999. DNA damage and DNA damage-inducible protein Gadd45 following ischemia in the P7 neonatal rat. *Brain Res. Dev.* 116, 133–140.
- Conner, C.P., Halestrap, A.P., 1992. Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochem. J.* 284 (Pt 2), 381–385.
- Crompton, M., 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341 (Pt 2), 233–249.
- Ferriero, D.M., 2004. Neonatal brain injury. *N. Engl. J. Med.* 351, 1985–1995.
- Gateau-Roesch, O., Pavlov, E., Lazareva, A.V., Limarenko, E.A., Levrat, C., Saris, N.E., Louisot, P., Mironova, G.D., 2000. Calcium-binding properties of the mitochondrial channel-forming hydrophobic component. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 105–110.
- Gelot, A., Villapol, S., Bilette de Villemeur, T., Renolleau, S., Charriat-Marlangue, C., 2009. Astrocytic demise in the developing rat and human brain after hypoxic-ischemic damage. *Dev. Neurosci.* 31 (5), 459–470.
- Golomb, M.R., Garg, B.P., Saha, C., Azzouz, F., Williams, L.S., 2008. Cerebral palsy after perinatal arterial ischemic stroke. *J. Child Neurol.* 23, 279–286.
- Griffiths, E.J., Halestrap, A.P., 1995. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* 307 (Pt 1), 93–98.
- Halestrap, A.P., 2006. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 232–237.
- Halestrap, A.P., 2009. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 821–831.
- Halestrap, A.P., Clarke, S.J., Javadov, S.A., 2004. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 61, 372–385.
- Harrison, C.A., Bastan, R., Peirce, M.J., Munday, M.R., Peachell, P.T., 2007. Role of calcineurin in the regulation of human lung mast cell and basophil function by cyclosporine and FK506. *Br. J. Pharmacol.* 150, 509–518.
- Hilger, T., Niessen, F., Diedenhofen, M., Hossmann, K.A., Hoehn, M., 2002. Magnetic resonance angiography of thromboembolic stroke in rats: indicator of recanalization probability and tissue survival after recombinant tissue plasminogen activator treatment. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 652–662.
- Jin, Y., Silverman, A.J., Vannucci, S.J., 2007. Mast cell stabilization limits hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Dev. Neurosci.* 29, 373–384.
- Joly, L.M., Mucignat, V., Mariani, J., Plotkine, M., Charriat-Marlangue, C., 2004. Caspase inhibition after neonatal ischemia in the rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 124–131.
- Liebeskind, D.S., 2003. Collateral circulation. *Stroke* 34, 2279–2284.
- Lynch, J.K., Hirtz, D.G., DeVeber, G., Nelson, K.B., 2002. Report of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke workshop on perinatal and childhood stroke. *Pediatrics* 109, 116–123.
- Matsumoto, S., Friberg, H., Ferrand-Drake, M., Wieloch, T., 1999. Blockade of the mitochondrial permeability transition pore diminishes infarct size in the rat after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 736–741.
- Menzies, S.A., Hoff, J.T., Betz, A.L., 1992. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* 31, 100–106 (discussion 106–107).
- Murphy, A.N., Fiskum, G., Beal, M.F., 1999. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 231–245.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., Tsujimoto, Y., 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652–658.
- Puka-Sundvall, M., Gilland, E., Hagberg, H., 2001. Cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: involvement of mitochondrial permeability transition? *Dev. Neurosci.* 23, 192–197.
- Puka-Sundvall, M., Wallin, C., Gilland, E., Hallin, U., Wang, X., Sandberg, M., Karlsson, J., Blomgren, K., Hagberg, H., 2000. Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 125, 43–50.
- Renolleau, S., Aggoun-Zouaoui, D., Ben-Ari, Y., Charriat-Marlangue, C., 1998. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. *Stroke* 29, 1454–1460 (discussion 1461).
- Renolleau, S., Benjelloun, N., Ben-Ari, Y., Charriat-Marlangue, C., 1997. Regulation of apoptosis-associated proteins in cell death following transient focal ischemia in rat pups. *Apoptosis* 2, 368–376.
- Renolleau, S., Fau, S., Goyenvalle, C., Joly, L.M., Chauvier, D., Jacotot, E., Mariani, J., Charriat-Marlangue, C., 2007. Specific caspase inhibitor Q-VD-OPH prevents neonatal stroke in P7 rat: a role for gender. *J. Neurochem.* 100, 1062–1071.
- Rice III, J.E., Vannucci, R.C., Brierley, J.B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 9, 131–141.
- Schinzel, A.C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J.K., Zhou, Z., Rubens, J., Hetz, C., Daniai, N.N., Moskowitz, M.A., Korsmeyer, S.J., 2005. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12005–12010.
- Shiga, Y., Onodera, H., Matsuo, Y., Kogure, K., 1992. Cyclosporin A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain. *Brain Res.* 595, 145–148.
- Solenski, N.J., Kwan, A.L., Yanamoto, H., Bennett, J.P., Kassell, N.F., Lee, K.S., 1997. Differential hydroxylation of salicylate in core and penumbra regions during focal reversible cerebral ischemia. *Stroke* 28, 2545–2551 (discussion 2551–2542).
- Spiegler, M., Villapol, S., Biran, V., Goyenvalle, C., Mariani, J., Renolleau, S., Charriat-Marlangue, C., 2007. Bilateral changes after neonatal ischemia in the P7 rat brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66, 481–490.
- Tanveer, A., Virji, S., Andreeva, L., Toty, N.F., Hsuan, J.J., Ward, J.M., Crompton, M., 1996. Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. *Eur. J. Biochem.* 238, 166–172.
- Vachon, P., Beaudry, F., Marier, J.F., Ste-Marie, L., Montgomery, J., 2002. Cyclosporin A in blood and brain tissue following intra-carotid injections in normal and stroke-induced rats. *Brain Res.* 943, 1–8.
- van Laar, P.J., Hendrikse, J., Klijn, C.J., Kappelle, L.J., van Osch, M.J., van der Grond, J., 2007. Symptomatic carotid artery occlusion: flow territories of major brain-feeding arteries. *Radiology* 242, 526–534.
- Vannucci, S.J., Hagberg, H., 2004. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J. Exp. Biol.* 207, 3149–3154.
- Villapol, S., Bonnin, P., Fau, S., Baud, O., Renolleau, S., Charriat-Marlangue, C., 2009. Unilateral blood flow decrease induces bilateral and symmetric responses in the immature brain. *Am. J. Pathol.* 174, 2111–2120.
- Wallin, C., Puka-Sundvall, M., Hagberg, H., Weber, S.G., Sandberg, M., 2000. Alterations in glutathione and amino acid concentrations after hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 125, 51–60.
- Wang, X., Carlsson, Y., Basso, E., Zhu, C., Rousset, C.I., Rasola, A., Johansson, B.R., Blomgren, K., Mallard, C., Bernardi, P., Forte, M.A., Hagberg, H., 2009. Developmental shift of cyclophilin D contribution to hypoxic-ischemic brain injury. *J. Neurosci.* 29, 2588–2596.
- Wyllie, A.H., 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555–556.
- Yoshimoto, T., Siesjo, B.K., 1999. Posttreatment with the immunosuppressant cyclosporin A in transient focal ischemia. *Brain Res.* 839, 283–291.

Synthèse des résultats et discussion

Le mPTP est impliqué dans le phénomène d'hypoxie-ischémie se produisant dans le cerveau en cours de développement. Nos résultats démontrent que ce pore s'ouvre également au début de la reperfusion qui fait suite à une ischémie focale dans le cerveau immature de rat. L'I/R cérébrale chez le rat nouveau-né diminue la respiration mitochondriale et provoque un infarctus dont la taille est proportionnelle à la sévérité de l'ischémie. Cette séquence d'I/R conduit à des lésions caractéristiques de la mort cellulaire. Nous avons ainsi observé qu'elle induit une nécrose cellulaire et une fragmentation de l'ADN avec apparition de corps apoptotiques. Elle engendre également une réponse inflammatoire se traduisant par une augmentation des neutrophiles, une dégranulation des mastocytes et une activation de la microglie. L'I/R induit enfin une protéolyse de l' α -spectrine calpaïne-dépendante, qui traduit une désorganisation du cytosquelette.

L'administration de CsA 14 heures avant le début de l'ischémie réduit la taille de l'infarctus, la fragmentation de l'ADN, le pourcentage de corps apoptotiques et les réponses inflammatoires chez les animaux soumis à des lésions ischémiques modérées. Ce traitement pharmacologique inhibe l'ouverture du mPTP et restaure l'index du contrôle respiratoire mitochondrial. La CsA limite ainsi le découplage de la chaîne respiratoire en réduisant l'état 4, sans modifier l'état 3. Elle permet également de préserver l'intégrité du cytosquelette en atténuant la protéolyse précoce de l' α -spectrine calpaïne-dépendante.

Notre étude démontre que le mPTP joue un rôle dans les conséquences de l'I/R cérébrale chez le rat nouveau-né, et que l'inhibition de son ouverture, par un traitement à la CsA, protège le cerveau contre ces lésions. Lorsque l'on compare ces résultats avec ceux de notre première étude (PreC et PostC chez le rat adulte), on remarque qu'il y a une différence intra-espèce. En effet, nous avons montré que le PreC à la CsA chez le rat adulte protégeait le myocarde contre les lésions d'I/R sans modification de l'ouverture du mPTP. Le PreC à la CsA module donc l'ouverture du mPTP dans le cas de l'I/R cérébrale mais pas de l'I/R myocardique. Les causes de cette différence sont probablement multiples. En effet, nous avons relevé quelques différences entre ces deux études. 1- La spécificité tissulaire peut être mise en jeu puisque les études ont été réalisées sur le cerveau ou sur le myocarde. 2- La différence de maturité des organes étudiés peut également expliquer cette divergence. 3- Il est par ailleurs possible que l'intervalle de reperfusion joue un rôle puisque les fonctions mitochondriales ont été analysées à 15 minutes de reperfusion sur le cœur contre 30 à 40 minutes sur le cerveau. Des études complémentaires seraient nécessaires afin d'élucider les raisons de cette différence.

Overexpression of monoamine oxidase-A drives chronic oxidative-dependent myocytes necrosis and ventricular failure in mice

Christelle Villeneuve, Céline Guilbeau-Frugier, Olivier Lairez, Catherine Ordener, Thibaut Duparc, **Damien De Paulis**, Elisabeth Couture-Lepetit, Bettina Couderc, Odile Spreux-Varoquaux, Claude Knauf, Philippe Valet, Elisabetta Borchì, Chiara Nediani, Abdallah Gharib, Michel Ovize, Marie-Bernadette Delisle, Angelo Parini, Jeanne Mialet-Perez.

Soumis à Circulation

Résumé

Objectif : L'âge prédispose à l'insuffisance cardiaque. Chez les personnes âgées, l'insuffisance cardiaque est la conséquence d'un remodelage cardiaque à long terme caractérisé par une perte de cardiomyocytes, une hypertrophie compensatrice et une dysfonction ventriculaire. Les ROS sont supposés participer à de tels dommages cardiaques associés au vieillissement. La production d' H_2O_2 par la MAO-A augmente fortement dans le cœur sénescant. Ceci suggère que cette enzyme joue un rôle majeur dans les lésions oxydatives cardiaques lors du vieillissement. L'objectif de ce travail est d'évaluer le rôle de la MAO-A dans les dommages cellulaires.

Matériels et méthodes : Afin de mimer les changements observés lors du vieillissement, des souris transgéniques adultes surexprimant la MAO-A spécifiquement au niveau des cardiomyocytes, sous le contrôle du promoteur α de la chaîne lourde de myosine, ont été générées.

Résultats : Les cœurs transgéniques présentent une diminution du taux des substrats de la MAO-A, la norépinéphrine et la sérotonine, et un taux élevé d' H_2O_2 , associés avec des dommages oxydatifs de l'ADN. Dans deux lignées indépendantes de souris transgéniques, la surexpression de la MAO-A induit une perte progressive de cardiomyocytes par nécrose, un remodelage ventriculaire et une insuffisance cardiaque. Le traitement chronique à la clorgyline, un inhibiteur de la MAO-A, et au NAC, un antioxydant, prévient cette mort cellulaire et cette dysfonction cardiaque chez ces souris transgéniques. *In vitro*, la transfection des cardiomyocytes par un adénovirus-MAO-A induit un stress oxydatif et une nécrose. Les effets délétères de la MAO-A sont corrélés avec des défauts d'ultrastructure des mitochondries et des altérations bioénergétiques des cœurs des souris transgéniques. Paradoxalement, la sensibilité du mPTP au calcium n'est pas modifiée.

Conclusion : Ces résultats démontrent que la MAO-A induit des dommages mitochondriaux et participe à la progression de l'insuffisance ventriculaire par la génération d'un stress oxydatif chronique.

Circulation

Circulation

**Overexpression of monoamine oxidase-A drives chronic oxidative-dependent myocyte
necrosis and ventricular failure in mice**

Christelle Villeneuve, Céline Guilbeau-Frugier, Olivier Lairez, Catherine Ordener, Thibaut Duparc,
Damien De Paulis, Elisabeth Couture-Lepetit, Bettina Couderc, Odile Spreux-Varoquaux, Claude
Knauf, Philippe Valet, Elisabetta Borchi, Chiara Nediani, Abdallah Gharib, Michel Ovize,
Marie-Bernadette Delisle, Angelo Parini, and Jeanne Mialet-Perez
CIRCULATIONAHA/2010/003129

This information is current as of October 20, 2010

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes
only, and not to be further disclosed.

Downloaded from <http://submit-circ.ahajournals.org> on October 20, 2010

Overexpression of monoamine oxidase-A drives chronic
oxidative-dependent myocyte necrosis and
ventricular failure in mice

Villeneuve, MAO-A and chronic ventricular failure

*Christelle Villeneuve,^{1,2} *Céline Guilbeau-Frugier,^{1,2} Olivier Lairez,^{1,2} Catherine Ordener,^{1,2}
Thibaut Duparc,^{1,2} Damien De Paulis,^{3,4} Elisabeth Couture-Lepetit,^{3,4} Bettina Couderc,² Odile
Spreux-Varoquaux,^{5,6} Claude Knauf,^{1,2} Philippe Valet,^{1,2} Elisabetta Borchi,⁷ Chiara Nediani,⁷
Abdallah Gharib,^{3,4} Michel Ovize,^{3,4} Marie-Bernadette Delisle,^{1,2} Angelo Parini,^{1,2} and Jeanne
Mialet-Perez^{1,2}

¹ INSERM ; U858 ; Toulouse, France

² Université Paul Sabatier ; Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil ; CHU de Toulouse ;
Institut Claudius Regaud, IFR150, F-31432 Toulouse, France

³ INSERM ; U886 ; Université Claude Bernard Lyon 1, F-69373 Lyon, France

⁴ Service de Cardiologie, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, F-69677 Bron, France

⁵ Université Versailles-St-Quentin, Pharmacologie, Faculté de Médecine Paris-Ile de France-
Ouest, France

⁶ Service de Biologie, Unité de Pharmacologie, Centre Hospitalier de Versailles, F-78157 Le
Chesnay, France

⁷ Department of Biochemical Sciences, University of Florence, Italy

* C. Villeneuve and C. Guilbeau-Frugier contributed equally to this work.

Correspondance: Jeanne Mialet-Perez, INSERM Unit 858, Institut de Médecine Moléculaire de
Rangueil, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France

Tel: +33 561 32 22 10, Fax: +33 562 17 24 54, E-mail: jeanne.perez@inserm.fr

5997 Words

Abstract

Background: Aging predisposes individuals to heart failure. In the elderly, heart failure is the end consequence of a “long-term” cardiac remodelling characterized by cardiomyocyte loss, compensatory hypertrophy and ventricular dysfunction. Reactive oxygen species (ROS) are assumed to participate in such aging-associated cardiac damage. Monoamine oxidase-A-dependent H₂O₂ production strongly increases in the senescent heart, which suggests that this enzyme could be one of the major factors involved in cardiac oxidative damage during aging.

Method and results: To evaluate such possibility, we established transgenic (Tg) mice with overexpression of MAO-A under the control of the α -MHC promoter. Tg hearts presented depletion in MAO-A substrates norepinephrine and serotonin and elevated levels of H₂O₂, associated with oxidative DNA damages. In two independent lines of Tg mice, MAO-A overexpression caused progressive loss of cardiomyocytes by necrosis, ventricular remodelling and heart failure. Chronic treatment with clorgyline, a MAO-A inhibitor, and NAC, an anti-oxidant, prevented cardiomyocyte death and cardiac dysfunction in Tg mice. *In vitro*, MAO-A-adenovirus transduction of cardiomyocytes triggered oxidative stress and necrosis. Interestingly, deleterious effects of MAO-A correlated with mitochondrial ultrastructural defects and impaired bioenergetics in Tg hearts.

Conclusion: Our data support a strong linkage between MAO-A, chronic oxidative stress, mitochondrial damage and progressive ventricular failure.

Key Words: aging, heart failure, necrosis, oxidative stress

Introduction

The incidence and prevalence of heart failure increase with age, and the developed countries are faced with an increasingly aging population. It is well known that the aging cardiomyocyte develops decreased tolerance to stress, diminished mitochondrial function and increased susceptibility to apoptosis and necrosis¹. The enhanced rate of cell death in the aging heart reduces the total number of cardiomyocytes². Consequently, collagen deposition augments and the remaining cardiomyocytes develop adaptive hypertrophy. These structural alterations accumulate into a loss of cardiac function and precipitate the occurrence of heart failure³. The growing rate of heart failure in the elderly may be caused, in part, by the enhanced frequency of extrinsic risk factors (i.e. atherosclerosis, diabetes and hypertension). However, individual susceptibility to the development of heart failure may depend on intrinsic factors whose function is altered during aging. Elucidating these factors represents a major challenge for future clinical implication. According to the free radical theory of aging, reactive oxygen species (ROS) are causal for the process of aging⁴. Aging cardiomyocytes are subjected to enhanced oxidative stress⁵⁻⁷, which is believed to cause molecular damage to DNA, lipids and proteins, and over time, cell dysfunction and death⁸, ultimately increasing the risk of heart failure. The causal link between oxidative stress and heart failure in the elderly has been supported by the observation that anti-oxidants administration or catalase overexpression slowed the progression of heart failure in animals^{5, 6, 9}. In addition, clinical studies demonstrated that patients with heart failure displayed increased oxidative stress in the heart¹⁰⁻¹³. The disequilibrium of the intracellular redox state in the aging heart may be related to a decrease in the activity of antioxidant systems and/or an increase in ROS generation. In the heart, under pathological conditions, mitochondria constitute a major source of ROS, which are generated

primarily through electron leakage from the electron transport chain¹⁴. In addition, ROS can be generated through oxidative metabolism of biogenic amines by monoamine oxidase-A (MAO-A) in the outer membrane of mitochondria. We have recently shown that MAO-A-dependent ROS generation played a critical role in acute cardiomyocyte death¹⁵. Interestingly, generation of H₂O₂ by MAO-A increases dramatically in the aging heart, which may have significant impact on the general oxidative status of senescent cardiomyocytes¹⁶. A chronic and sustained increase in oxidative stress by MAO-A could translate into enhanced sensitivity to apoptosis or necrosis during aging.

In order to address this possibility and to mimic changes that occur during cardiac aging, we analyzed the functional consequences of cardiomyocyte MAO-A overexpression using transgenic mice (Tg) and adenoviral transduction of primary culture of cardiomyocytes.

Methods

Generation of Tg mice and animal procedure. The cDNA encoding the rat MAO-A (genbank accession number NM_033653) provided by Akio Ito (Kyushu University, Fukuoka, Japan) was subcloned into the full-length mouse α -myosin heavy-chain (α -MHC) promoter. Briefly, a 2060 bp cDNA, including 6 bp of the 5' and 474 bp of the 3' flanking sequences was subcloned into the Sall site of the polylinker of the α -MHC promoter construct¹⁷. The resulting recombinant plasmid, p α MHC-MAO-A, was confirmed by restriction mapping and nucleotide sequencing. A linear 8000 bp DNA fragment was microinjected into fertilized eggs at the "Institut Clinique de la Souris" (Strasbourg, France). Offsprings were genotyped and founders were bred with C57BL6/J mice to establish stable Tg mice. Mice were housed in a pathogen-free facility and handled in accordance with the principles and procedures outlined in Council Directive 86/609/EEC. For all experiments, littermates were used as controls.

Statistical Analysis. Results are expressed as mean \pm SEM. Experimental groups were compared using Student's *t* test or 1-way ANOVA, as appropriate. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Generation of Tg mice with cardiac-specific overexpression of MAO-A.

During aging, MAO-A activity increases gradually between 2 and 24 months in cardiac homogenates (Fig. 1A). Interestingly, MAO-A upregulation is recapitulated in primary cultures of cardiac myocytes isolated from senescent rats. Indeed, cardiomyocytes isolated from 24-months old rats express about 35-fold higher MAO-A activity than those isolated from 2-months old rats (Fig. 1B). In order to mimic changes observed during aging, we generated mice with

cardiomyocyte-specific overexpression of MAO-A under the control of the α -MHC promoter (Fig. 1C). Two independent lines of Tg mice were propagated, exhibiting MAO-A activity of about 9000 pmol/mg/min (Tg 61) and 40 000 pmol/mg/min (Tg 113). Western blot analysis demonstrated specific overexpression of MAO-A in cardiac but not liver homogenates compared to non transgenic littermates (NTg) (Fig. 1D). In order to verify that overexpressed MAO-A was correctly targeted to mitochondria, we first performed double immunofluorescence staining on heart sections using anti-MAO-A antibody and anti-Cox IV antibody, a marker of the mitochondrial compartment. As expected, MAO-A staining was enhanced in Tg 61 mice compared to NTg and demonstrated colocalization with the mitochondrial protein Cox IV (Fig. 1E). Next, we measured H₂O₂ generation related to MAO-A on isolated mitochondria from cardiac homogenates. We found that, when incubated with MAO substrate tyramine, mitochondria from Tg 61 mice produced larger amounts of H₂O₂ compared to NTg, an effect that was inhibited by 96 % with the MAO inhibitor pargyline (Fig. 1F). Thus, Tg mice overexpress an active MAO-A enzyme, specifically in cardiac mitochondria. We used HPLC to evaluate the levels of MAO-A substrates serotonin (5-HT) and norepinephrine (NE), along with their respective MAO metabolites 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and dihydroxyphenylglycol (DHPG). As shown in Fig. 1G, 5-HIAA/5-HT and DHPG/NE ratios were significantly elevated in Tg 61 mice as a result of both substrate depletion and metabolite accumulation (not shown). These observations indicate that oxidative metabolism of endogenous substrates is strongly potentiated in MAO-A Tg mice.

Real-time H₂O₂ production and oxidative stress are increased in hearts from MAO-A overexpressing mice.

Oxidative metabolism of biogenic amines by MAO-A generates H₂O₂ as a byproduct. Therefore, we performed *in vivo* real-time amperometric measurement of H₂O₂ in ventricles from NTg and Tg 61 mice using an H₂O₂-sensitive electrode. As shown in Fig. 2A-B, Tg mice displayed a significant increase in baseline H₂O₂ concentrations in the heart. Next, as a sensitive marker of oxidative stress, we evaluated DNA oxidation in cardiac sections from Tg 61 mice. We demonstrated that 8-OH-dG staining was much more pronounced in Tg hearts (16 %) than NTg hearts (7 %) as soon as 5 weeks after birth (Fig. 2C, 2D). 8-OH-dG staining was also significantly enhanced in Tg 113 mice (data not shown). Interestingly, in both lines of Tg mice, a prominent cytoplasmic staining indicated that mitochondrial DNA was particularly susceptible to oxidation in this model. Finally, we analyzed the regulation of anti-oxidant enzymes. Interestingly, both GPX1 mRNA and GPX activity were upregulated in Tg mice as an indirect evidence of changes in oxidative status of cardiomyocytes (Fig. 2E, 2F). Moreover, while catalase (CAT) mRNA expression was unchanged, its activity was significantly decreased in Tg mice (Fig. 2E, 2F). Superoxide dismutase (Mn-SOD) mRNA was down-regulated in Tg 61 mice with no change in enzymatic activity (Fig. 2E, 2F).

Mice with MAO-A overexpression display dilated cardiomyopathy with cardiomyocyte drop-out, inflammatory response and fibrosis.

A premature lethality was observed in MAO-A Tg mice that correlated with the level of MAO-A overexpression (Fig. 3A). Indeed, maximal survival was around 11 and 37 weeks for line 113 and line 61, respectively. Echocardiographies performed on Tg 61 demonstrated a significant and progressive decrease in Fractional Shortening (FS, Fig. 3B). Line 113 also showed a dramatic drop in FS at 10 weeks (Fig. 3B), indicating that both lines suffered from heart failure. In

addition, Tg 61 and Tg 113 mice demonstrated left-ventricular dilatation indicated by an increase in left-ventricular diameter (LVEDD, Fig. 3C). No cardiac hypertrophy was observed, since posterior wall thickness (PWT) was not modified (Fig. 3D), neither heart weight to body weight ratio (not shown). Interestingly, histological examinations of Tg 61 and Tg 113 hearts at the age of 12 weeks demonstrated myocardial disarray. We observed some necrotic areas with disruption of myofibrils, cell debris, loss of nuclei, smudging, loss of cytoplasmic detail, and scattered leukocytes (see arrows in Fig. 3E). Therefore, we counted the number of cardiomyocytes in tissue slides. A significant loss of cardiomyocytes was observed in Tg mice (about 51 % in Tg 61 and 56 % in Tg 113) (Fig. 3F). Following the time-course of cardiomyocyte drop-out in line 61, we found that cell loss started around the age of 5 weeks (about 16 % loss, data not shown) to be maximal at the age of 12 weeks (about 51 % loss). The remaining cardiomyocytes were hypertrophied as a compensatory response, and interstitial fibrosis was enhanced in both lines of Tg mice (Fig. 3E, 3F). Tg 61 cardiac mRNA expression analysis confirmed histological findings, with up-regulation of some pro-inflammatory cytokines as soon as 5 weeks after birth, along with re-expression of the fetal gene program and upregulation of extracellular matrix components (Suppl Fig. 1).

Evidences of cell necrosis in the hearts of Tg mice

In order to clarify the underlying mechanism of myocyte loss in Tg 61 mice, we tested for the presence of necrosis and apoptosis, two mechanisms involved in cardiomyopathy. Histological examination identified necrotic areas in Tg mice, as described above (Fig. 3E, black arrows). In order to confirm this observation, we measured the levels of plasmatic troponin-I, a marker of myocardial necrosis. We found that cardiac troponin-I was released in plasma of Tg mice as soon

as 5 weeks after birth and remained stable until the age of 12 weeks (Fig. 4A). Next, we examined the presence of apoptosis in Tg hearts using DNA strand breaks TUNEL staining. Although no evidence of apoptosis was observed at 5 weeks, there was a small but significant increase in the number of apoptotic nuclei (from 2 to 4.5 per 10000) at 12 weeks compared to NTg (Fig. 4B). Analysis of mRNA expression demonstrated an increase in apoptosis-related genes caspase-8 and -3 along with anti-apoptotic protein Bcl2 and pro-apoptotic Bax (Fig. 4C). However, analysis of caspase-3 cleavage by immunoblot did not provide any evidence of activation of this protease at 5 or 12 weeks (not shown). Therefore, our data propose cell necrosis as the predominant mechanism for cardiomyocyte death in MAO-A overexpressing mice.

MAO-A inhibition and anti-oxidant treatment prevent cell loss and cardiac dysfunction in Tg mice

The contribution of MAO-A catalytic activity as a causative factor in the development of heart failure in Tg mice was evaluated using a selective MAO-A inhibitor. First, we determined that 10 mg/kg/day of clorgyline completely inhibited cardiac MAO-A activity in mice treated orally for 1 week (Suppl. Fig. 2). Then, we used this concentration from the age of 4 to 24 weeks. In Tg mice, chronic treatment with clorgyline prevented the decrease in FS and the ventricular dilatation, compared to untreated Tg animals (Fig. 5A, 5B). Moreover, cardiomyocyte drop-out, fibrosis and accumulation of oxidative DNA damage were all prevented by clorgyline (Fig. 5D, 5E, 5F). Based on our previous data, it is evident that the deleterious consequence of MAO-A overexpression in Tg mice could be related to either substrate depletion (NE and 5-HT), or enhanced oxidative stress. In order to evaluate the participation of oxidative stress in Tg mice, we used a pharmacological approach with N-acetyl-cystein, a ROS scavenger. Chronic treatment

with 1.5 g/kg/day of NAC during 20 weeks allowed to preserve cardiac function in Tg mice at a level comparable to NTg mice (Fig. 6A), and prevented cardiac dilatation (Fig. 6B). Much interestingly, cell loss was also prevented, which strongly supports a role for MAO-A-dependent oxidative stress in cardiomyocyte necrosis (Fig. 6D). Cardiac fibrosis was not statistically decreased in NAC-treated Tg mice (Fig. 6E). Altogether, our results provide evidence that MAO-A activity and the subsequent ROS generation are responsible for enhanced oxidative damage, cardiomyocyte drop-out and deterioration of cardiac function in Tg mice.

Overexpression of MAO in neonatal cardiomyocytes induces oxidative stress-dependent cell necrosis.

In order to demonstrate that increasing MAO-A expression triggers cardiomyocyte death, we developed an *in vitro* model of MAO-A overexpression using an adenoviral vector (AdeMAO-A). Following AdeMAO-A transduction, MAO-A activity was dose-dependently increased in neonatal cardiomyocytes (Fig. 7A). However, some cell toxicity was observed with AdeMAO-A starting at MOI 10, compared to Ade-GFP (Suppl Fig. 2). Consequently, all experiments were performed at MOI 5. In order to get rid of the potential receptor-dependent effects, we used tyramine as a MAO substrate and we chose a concentration of 500 μ M based on the lack of necrotic effect in non-infected cardiomyocytes (Fig. 7C). Then, we tested if an increase in MAO-A activity could trigger necrosis. Interestingly, treatment of AdeMAO-A infected cardiomyocytes with tyramine generated ROS and triggered massive LDH release, indicative of necrosis (Fig. 7B, 7C). Both events were significantly prevented in the presence of clorgyline or NAC. These results show that, in the presence of a constant substrate concentration, increase in MAO-A expression is sufficient per se to trigger cardiomyocyte necrosis.

Upregulation of MAO-A induces mitochondrial damage in the heart.

Since MAO-A is located in the outer membrane of mitochondria, we hypothesized that mitochondria could be at particular risk for H₂O₂-mediated injury. We examined the effect of MAO-A overexpression on mitochondrial ultrastructure by electronic microscopy. In NTg mice, mitochondria were normal with dense matrices filled, homogeneous matrix granules, intact double membrane and tightly packed cristae (Fig. 8A, left panel). On the other hand, Tg heart mitochondria tended to make aggregates and were heterogeneous in size (Fig. 8A, right panel). In the same cell, small and numerous mitochondria were observed, alternating with normal or swelling mitochondria. The most obvious change was the appearance of electron-lucent areas in mitochondrial matrix. Other changes were observed such as concentric cristae. These morphological features indicated mitochondrial damage. We measured ATP levels in myocardial samples from Tg mice and found that cardiac ATP content was decreased at the age of 6 weeks, suggesting impairment in mitochondrial bioenergetics (Fig. 8B). We next evaluated mitochondrial biogenesis as another mechanism through which MAO-A could promote mitochondrial dysfunction. Expression of PGC_{1α} involved in mitochondrial biogenesis was significantly downregulated whereas expression of the mitochondrial specific transcription factor TFAM was unchanged (Fig. 8C). Expression profiling using microarray confirms a global down-regulation of genes encoding mitochondrial proteins, and emphasizes depressed energy metabolism and oxidative phosphorylation in Tg mice (Fig. 8D). Altogether, these observations provide evidence for mitochondrial damage associated with MAO-A overexpression in the heart. The mitochondrial permeability transition pore (MPT) is a common mediator of cell death in response to oxidative stress¹⁸. However, at baseline or under stimulated conditions with

tyramine, MPT remained unchanged in isolated mitochondria from Tg or NTg mice (Suppl Fig. 4). In addition, we confirmed that MPT pore was not a target for MAO-A-generated H₂O₂ in neonatal cardiomyocytes *in vitro* (Suppl Fig. 4).

Discussion

During cardiac aging, an accumulation of oxidative stress is believed to compromise cellular function and to cause damage at the organ level. In the present study, we provide evidence that MAO-A, which is greatly overexpressed in the aging heart, represents a relevant source of oxidative stress and exerts deleterious cardiac effects. Indeed, by generating a new model of Tg mice with cardiac-specific overexpression of MAO-A, we demonstrate for the first time that a chronic increase in MAO-A decreases life-span, engenders oxidative damage, spontaneous myocyte necrosis and heart failure, and that all these parameters are prevented by MAO-A inhibitor treatment. Interestingly, cardiac remodelling associated with MAO-A overexpression mimicks the histomorphological alterations observed during aging: loss of myocytes with compensatory hypertrophy and fibrosis.

A deleterious role for MAO-A/H₂O₂ axis has been well documented in acute situations such as cardiac ischemia-reperfusion. In those studies, pharmacological or genetic inactivation of MAO-A prevented post-reperfusion cardiomyocyte oxidative damage and apoptosis *in vivo*^{15, 19}.

However, until now, the importance of MAO-A/H₂O₂ axis in chronic situations like cardiac aging remained poorly understood. Thus, our observation that enhanced MAO-A activity per se is sufficient to trigger deleterious effects in the heart, represents a new finding, particularly relevant in cardiac diseases where MAO-A upregulation appears to be frequently observed. Indeed, gene expression profiling revealed increase in MAO-A mRNA, not only during aging,

but also in different animal models of pathological hypertrophy and failure^{20, 21}. At present, the reason why MAO-A is upregulated in different models of cardiac stress remains unknown. Sympathetic activation and NE spillover are major features associated with cardiac aging and failure^{22, 23}. In addition, whole-blood 5-HT levels increase in humans with heart failure^{24, 25}. Therefore, MAO-A upregulation might be an adaptative mechanism to increased levels of substrates, as previously demonstrated in rat mesangial cells²⁶. However, on the long term, a chronic increase in the metabolism of 5-HT and catecholamines by cardiac MAO-A would lead to accumulation of oxidative stress and cardiomyocyte toxicity. Understanding the mechanisms of MAO-A upregulation in the heart seems of major interest and will need to be elucidated in future studies.

Although H₂O₂ generated by MAO-A has previously been involved in cardiomyocyte hypertrophy *in vitro*²⁷⁻²⁹, this does not appear to be relevant in the alteration of cardiac function in MAO-A Tg mice. Indeed, compensatory hypertrophy of cardiac myocytes appears only after cardiomyocyte death. These findings are also supported by previous studies showing that, in response to pressure overload, MAO-A was not necessary for the development of cardiac hypertrophy but seemed to be more important for the transition to failure^{28, 30}.

Interestingly, overexpression of MAO-A in mice leads to a decrease in cardiac NE and 5-HT, together with an increase in their respective MAO metabolites DHPG and 5-HIAA. Thus, endogenous substrate concentration does not seem to be a limiting factor when MAO-A activity is increased. Although we could not rule out a role for substrate depletion in cardiac cell death, we provided evidence that oxidative stress played a key role in cardiomyocyte drop-out and heart failure in Tg mice. First, using an original approach of direct real-time H₂O₂ detection in mice heart, we showed that MAO-A overexpressing mice were constantly exposed to high cardiac

levels of H₂O₂. This observation correlated with the appearance of oxidative damage on DNA in Tg hearts. Second, chronic treatment with an anti-oxidant (NAC) prevented cardiomyocyte death and deterioration of cardiac function.

When examining MAO-A induced cardiomyocyte death, cell apoptosis was barely detectable in young Tg mice. Considering that caspase-3 activation was not observed in Tg hearts, we conclude that such level of apoptosis is insufficient to explain the major cell loss observed in Tg mice between the ages of 5 and 12 weeks. On the other hand, we found that cell necrosis was strongly enhanced in Tg mice, as assessed by both histological examinations and measurement of plasma troponin I. In addition, increasing MAO-A expression rendered the cells more vulnerable to necrosis *in vitro*. The level of H₂O₂ in cardiomyocytes has already been demonstrated to be a determinant of cell death by necrosis or apoptosis³¹. In addition, aged cardiomyocytes with higher levels of oxidative stress are more sensitive to necrosis³². Therefore, an increase in MAO-A expression could render the cells more sensitive to necrosis during aging. This observation is interesting since, after being neglected for a while, necrosis is now recognized as a major way of cell death during heart failure³³.

Necrotic cell death can be initiated at the level of the mitochondria following Ca²⁺ overload, hypoxia and oxidative stress through MPT pore opening³⁴. However, in our model, MPT pore-calcium sensitivity remained unchanged in isolated mitochondria of Tg hearts, even in the presence of tyramine. Moreover, MPT pore was not involved in cardiomyocyte necrosis induced by MAO-A adenovirus infection *in vitro*. Our findings are in accordance with previous study which failed to demonstrate an effect of tyramine by itself on MPT pore opening in isolated rat liver mitochondria³⁵. This study demonstrated that H₂O₂ produced outside the mitochondrial

matrix was not sufficient to induce pore opening but rather needed a co-stimulating factor inside the mitochondria (ex: alumine).

A number of studies have demonstrated that mitochondrial integrity declines as a function of age³⁶. Age-dependent increase in the level of damaged-DNA has been commonly assessed through biomarkers such as 8-OH-dG¹⁴. Interestingly, in mice overexpressing MAO-A, mitochondrial DNA oxidation was strongly potentiated as soon as 5-weeks after birth, while nuclear DNA oxidation was less evident. This is not surprising since mitochondrial DNA, which lacks protection by histones, is more vulnerable to ROS than nuclear DNA¹⁴. The high level of mitochondrial DNA oxidation in Tg mice could be of particular importance since oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life-span in the heart of mammals³⁷. Moreover, it has been demonstrated that accumulation of mutations in mitochondrial DNA was sufficient to shorten life-span, and induces cardiomyopathy in mice with a proofreading deficient mitochondrial DNA polymerase γ ³⁸. During aging, ROS-inflicted damages, including mitochondrial DNA mutations, have been postulated to lead to mitochondrial dysfunction. In our case, mitochondrial damage was evidenced by electronic microscopy and was related to ATP depletion and decreased biogenesis in MAO-A Tg mice. In addition, microarray analysis demonstrated downregulation of genes involved in mitochondrial respiration. This is consistent with recent genomic studies showing that transcriptional components of the electron transport chain are affected by aging. Indeed, a two-fold decrease in a large set of genes involved in ATP synthesis and mitochondrial respiration was observed in *C. elegans* and *drosophila* during aging¹⁴. Therefore, our data further support a strong linkage between oxidative stress, mitochondrial damage and cardiac dysfunction during aging.

Altogether, our results put forward MAO-A as a relevant source of oxidative stress in the heart and propose MAO-A as a promising target for the prevention of cardiomyocyte death in chronic diseases.

Acknowledgements and fundings

This work was supported by grants from INSERM, Agence Nationale pour la Recherche (ANR), Fondation pour la Recherche Medicale (FRM), Mouse Clinical Institute (MCI) in Strasbourg and Région Midi-Pyrénées. Christelle Villeneuve was a recipient from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). We thank C. Fourreau (IFR150 Animal Facility), J.J. Maoret (IFR150 Molecular Biology Platform), S. Estaque (IFR150 Histology Platform), A. Colom (INSERM U858), J. S. Iacovoni (IFR150 Bioinformatic Plateau) for technological assistance.

Conflict of interest: None

References

1. Bernhard D, Laufer G. The aging cardiomyocyte: a mini-review. *Gerontology*. 2008; 54:24-31.
2. Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Li P, Li B, Nitahara JA, Chapnick S, Reiss K, Olivetti G, Anversa P. Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am J Physiol*. 1996; 271:H1215-1228.
3. Goldspink DF, Burniston JG, Tan LB. Cardiomyocyte death and the ageing and failing heart. *Exp Physiol*. 2003; 88:447-458.
4. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956; 11:298-300.
5. Dai DF, Santana LF, Vermulst M, Tomazela DM, Emond MJ, MacCoss MJ, Gollahon K, Martin GM, Loeb LA, Ladiges WC, Rabinovitch PS. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. *Circulation*. 2009; 119:2789-2797.
6. Wu S, Li Q, Du M, Li SY, Ren J. Cardiac-specific overexpression of catalase prolongs lifespan and attenuates ageing-induced cardiomyocyte contractile dysfunction and protein damage. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34:81-87.
7. Sohal RS, Agarwal S, Candas M, Forster MJ, Lal H. Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev*. 1994; 76:215-224.
8. Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2002; 34:379-388.
9. Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1996; 28:506-514.
10. Baumer AT, Flesch M, Wang X, Shen Q, Feuerstein GZ, Bohm M. Antioxidative enzymes in human hearts with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2000; 32:121-130.
11. Dieterich S, Bielick U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*. 2000; 101:33-39.
12. Mallat Z, Philip I, Lebret M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation*. 1998; 97:1536-1539.
13. Sam F, Kerstetter DL, Pimental DR, Mulukutla S, Tabae A, Bristow MR, Colucci WS, Sawyer DB. Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. *J Card Fail*. 2005; 11:473-480.
14. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005; 120:483-495.
15. Bianchi P, Kunduzova O, Masini E, Cambon C, Bani D, Raimondi L, Seguelas MH, Nistri S, Colucci W, Leducq N, Parini A. Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury. *Circulation*. 2005; 112:3297-3305.
16. Maurel A, Hernandez C, Kunduzova O, Bompard G, Cambon C, Parini A, Frances B. Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284:H1460-1467.

17. Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J. Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem.* 1991; 266:9180-9185.
18. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 1999; 341 (Pt 2):233-249.
19. Pchejetski D, Kunduzova O, Dayon A, Calise D, Seguelas MH, Leducq N, Seif I, Parini A, Cuvillier O. Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis. *Circ Res.* 2007; 100:41-49.
20. Kong SW, Bodyak N, Yue P, Liu Z, Brown J, Izumo S, Kang PM. Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Physiol Genomics.* 2005; 21:34-42.
21. Strom CC, Kruhoffer M, Knudsen S, Stensgaard-Hansen F, Jonassen TE, Orntoft TF, Haunso S, Sheikh SP. Identification of a core set of genes that signifies pathways underlying cardiac hypertrophy. *Comp Funct Genomics.* 2004; 5:459-470.
22. Eisenhofer G, Friberg P, Rundqvist B, Quyyumi AA, Lambert G, Kaye DM, Kopin IJ, Goldstein DS, Esler MD. Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure. *Circulation.* 1996; 93:1667-1676.
23. Kaye D, Esler M. Sympathetic neuronal regulation of the heart in aging and heart failure. *Cardiovasc Res.* 2005; 66:256-264.
24. Chandra M, Gupta V, Johri AK, Misra R, Kumar A, Gujrati V, Shanker K. Serotonergic mechanisms in heart failure. *Indian Heart J.* 1994; 46:153-156.
25. Nigmatullina RR, Kirillova VV, Jourjikiya RK, Mukhamedyarov MA, Kudrin VS, Klodt PM, Palotas A. Disrupted Serotonergic and Sympathoadrenal Systems in Patients with Chronic Heart Failure May Serve as New Therapeutic Targets and Novel Biomarkers to Assess Severity, Progression and Response to Treatment. *Cardiology.* 2009; 113:277-286.
26. Pizzinat N, Marchal-Victorion S, Maurel A, Ordener C, Bompard G, Parini A. Substrate-dependent regulation of MAO-A in rat mesangial cells: involvement of dopamine D2-like receptors. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 284:F167-174.
27. Bianchi P, Pimentel DR, Murphy MP, Colucci WS, Parini A. A new hypertrophic mechanism of serotonin in cardiac myocytes: receptor-independent ROS generation. *Faseb J.* 2005; 19:641-643.
28. Kaludercic N, Takimoto E, Nagayama T, Feng N, Lai EW, Bedja D, Chen K, Gabrielson KL, Blakely RD, Shih JC, Pacak K, Kass DA, Di Lisa F, Paolocci N. Monoamine Oxidase A-Mediated Enhanced Catabolism of Norepinephrine Contributes to Adverse Remodeling and Pump Failure in Hearts With Pressure Overload. *Circ Res.* 2009; 106:193-202.
29. Villeneuve C, Caudrillier A, Ordener C, Pizzinat N, Parini A, Mialet-Perez J. Dose-dependent activation of distinct hypertrophic pathways by serotonin in cardiac cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297:H821-828.
30. Lairez O, Calise D, Bianchi P, Ordener C, Spreux-Varoquaux O, Guilbeau-Frugier C, Escourrou G, Seif I, Roncalli J, Pizzinat N, Galinier M, Parini A, Mialet-Perez J. Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload. *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 46:597-595.
31. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H(2)O(2) regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35:615-621.

32. Miyoshi N, Oubrahim H, Chock PB, Stadtman ER. Age-dependent cell death and the role of ATP in hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:1727-1731.
33. Nakayama H, Chen X, Baines CP, Klevitsky R, Zhang X, Zhang H, Jaleel N, Chua BH, Hewett TE, Robbins J, Houser SR, Molkenstin JD. Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest*. 2007; 117:2431-2444.
34. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*. 2005; 434:652-658.
35. De Marchi U, Mancon M, Battaglia V, Ceccon S, Cardellini P, Toninello A. Influence of reactive oxygen species production by monoamine oxidase activity on aluminum-induced mitochondrial permeability transition. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61:2664-2671.
36. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:10771-10778.
37. Barja G, Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *Faseb J*. 2000; 14:312-318.
38. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 2005; 309:481-484.

Figure legends

Figure 1. Expression of MAO-A during aging and generation of Tg mice with MAO-A overexpression. (A, B) MAO-A activity in cardiac homogenates (n=5) and isolated cardiac myocytes (n=3-4) of rats at different ages. (*p<0.05 vs 2 months). (C) Cardiac MAO-A activity in NTg, Tg 61 and Tg 113 mice (n=3). The DNA transgene is represented above the histogram, with the α MHC promoter in front of the MAO-A cDNA. (D) Representative MAO-A immunoblot on cardiac and liver homogenates. (E) Double immunofluorescence staining on heart sections using MAO-A and Cox-IV antibodies (x 1000). (F) H₂O₂ measurements on isolated cardiac mitochondria stimulated with tyramine (30 μ M) plus inhibitor pargyline (100 μ M) (n=4-5). (G) 5-HIAA/5-HT ratio and DHPG/NE ratio in cardiac homogenates by HPLC (n=5). (*p<0.05, ***p<0.001 vs indicated value).

Figure 2. Oxidative status in Tg mice with cardiac MAO-A overexpression. (A,B) Real-time measurements of H₂O₂ in ventricles from anesthetized mice using amperometric probe (n=5) (C) 8-OH-dG immunohistochemistry on cardiac sections from NTg and Tg mice (x 400). (D) Quantification of 8-OH-dG staining expressed as percent of total area (n=4). (E) Real-time RT-PCR expression of anti-oxidant enzymes catalase (CAT), Glutathion peroxidase (GPX1) and Superoxide dismutase (Mn-SOD) in ventricles (n=4). (F) Enzymatic activity of CAT, GPX and Mn-SOD in ventricles (n=5 to 6). (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs NTg).

Figure 3. Cardiac phenotype in MAO-A Tg mice. (A) Kaplan-Meier analysis of death with aging in NTg (n=26), Tg 61 (n=38) and Tg 113 mice (n=17). (B, C, D) FS, LVEDD and PWT assessment by echocardiography. (E) Histology (x 400) of cardiac ventricular pathology by

hematoxylin-eosin (HE), Periodic Acid Schiff (PAS) and Masson's Trichrome (green) in NTg, Tg 61 and Tg 113 mice at 12-weeks. (F) Quantification of cardiomyocytes per total area (n=4), cardiomyocyte diameter (n=4) and collagen content on cardiac sections (n=4). (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs NTg).

Figure 4. Evaluation of cell necrosis and apoptosis in MAO-A overexpressing mice. (A) Troponin-I levels by ELISA in plasma from NTg and Tg 61 mice (n=4). (B) Quantification of TUNEL-positive apoptotic nuclei related to total number of nuclei in cardiac sections (C) Real-time RT-PCR expression of apoptotic genes in ventricles. Expression of the gene of interest is expressed as fold over NTg (n=4). (*p<0.05, **p<0.01 vs NTg).

Figure 5. Clorgyline treatment prevents cardiac dysfunction in MAO-A overexpressing mice. (A, B, C) FS, LVESD and LVEDD were measured by echocardiography in the indicated groups. (D) Quantification of cardiomyocytes in cardiac sections stained with PAS. (E) Quantification of fibrosis in cardiac sections stained with Masson's Trichrome. (F) Quantification of 8-OH-dG staining by immunocytochemistry in cardiac sections. (**p<0.01, ***p<0.001 in Tg 61 vs NTg mice; § p<0.05, §§ p<0.01, §§§ p<0.001 in Tg 61 treated with clorgyline vs Tg 61 untreated mice).

Figure 6. Anti-oxidant NAC prevents cardiac dysfunction in MAO-A overexpressing mice. (A, B, C) FS, LVESD and LVEDD were measured by echocardiography in the indicated groups. (D) Quantification of cardiomyocytes in cardiac sections stained with PAS. (E) Quantification of

fibrosis in cardiac sections stained with Masson's Trichrome. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in Tg 61 vs NTg mice; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ in Tg 61 treated with NAC vs Tg 61 untreated mice).

Figure 7. MAO-A overexpression in neonatal cardiomyocytes induces oxidative stress and necrosis. (A) MAO-A activity in cardiomyocytes infected with AdeMAO-A at different MOIs. (B) ROS generation in cardiomyocytes infected with AdeMAO-A (MOI 5) or non-infected (MOI 0). Tyramine stimulation was performed for 2 h in the presence of NAC (5 mM) or clorgyline (10 μ M), when indicated. (C) LDH release in cardiomyocytes infected with AdeMAO-A (MOI 5) or non-infected (MOI 0). Tyramine stimulation for 24 h in the presence of NAC (5 mM) or clorgyline (10 μ M), when indicated. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs indicated value).

Figure 8. MAO-A overexpression induces mitochondrial damage, ATP depletion and impaired mitochondrial biogenesis. (A) Representative electron micrographs of ventricles from NTg and Tg 61 mice at the age of 6-weeks (x 4000). Cardiomyocytes from Tg mice show electron-lucent areas in mitochondrial matrix (arrows) or concentric cristae (asterisk). (B) ATP concentrations in ventricle homogenates at the age of 6-weeks (n=4). (C) Real-time RT-PCR expression of PGC1 α and TFAM mRNA at 9-weeks (n=5). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs indicated value). (D) Geneset Enrichment Analysis for differentially expressed genes by microarray in Tg compared to NTg mice. Common themes were defined among the various overlapping and unique gene sets. Blue blocks and red blocks represent highly enriched in category among the various downregulated or upregulated genes, respectively.

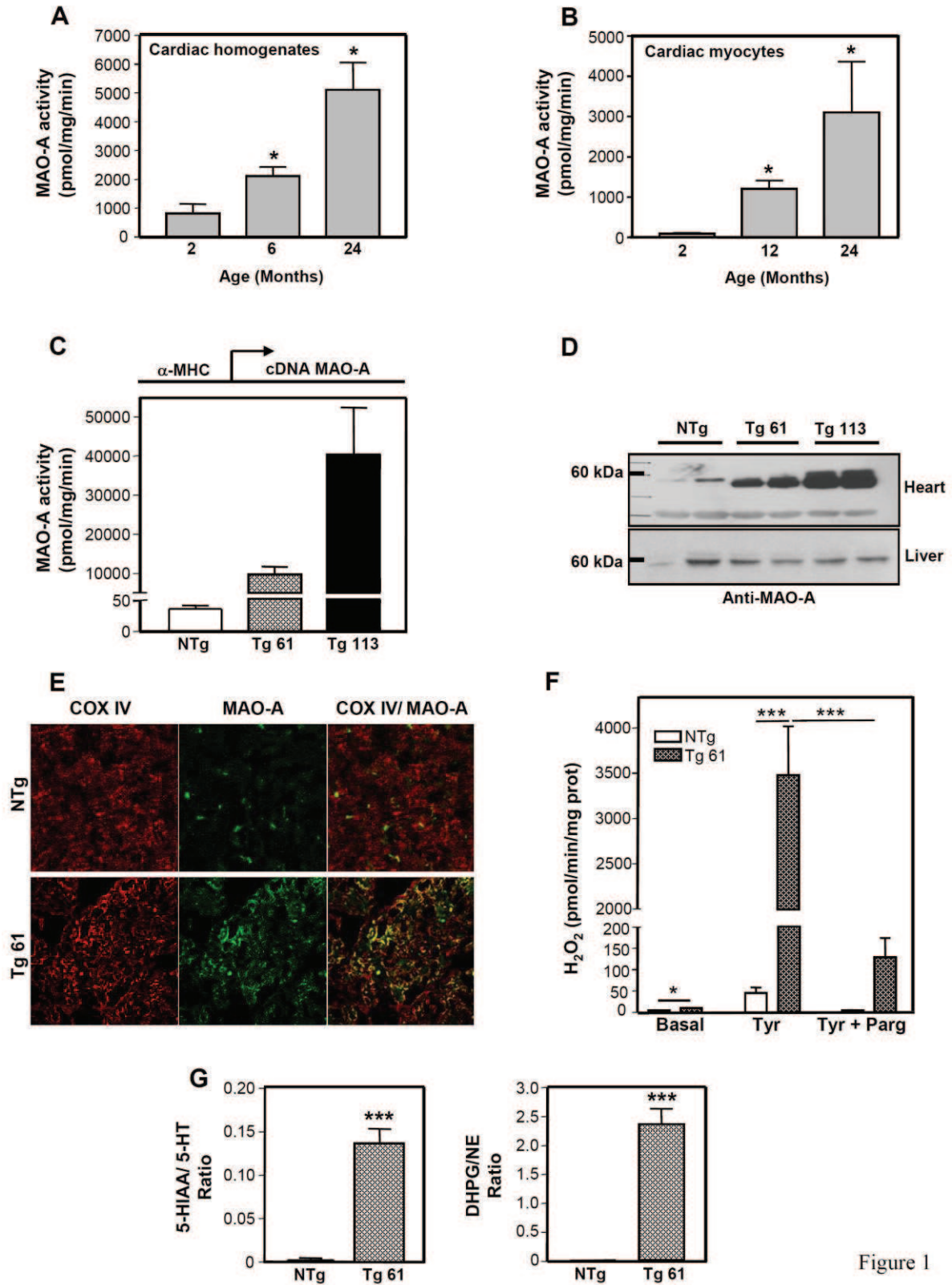


Figure 1

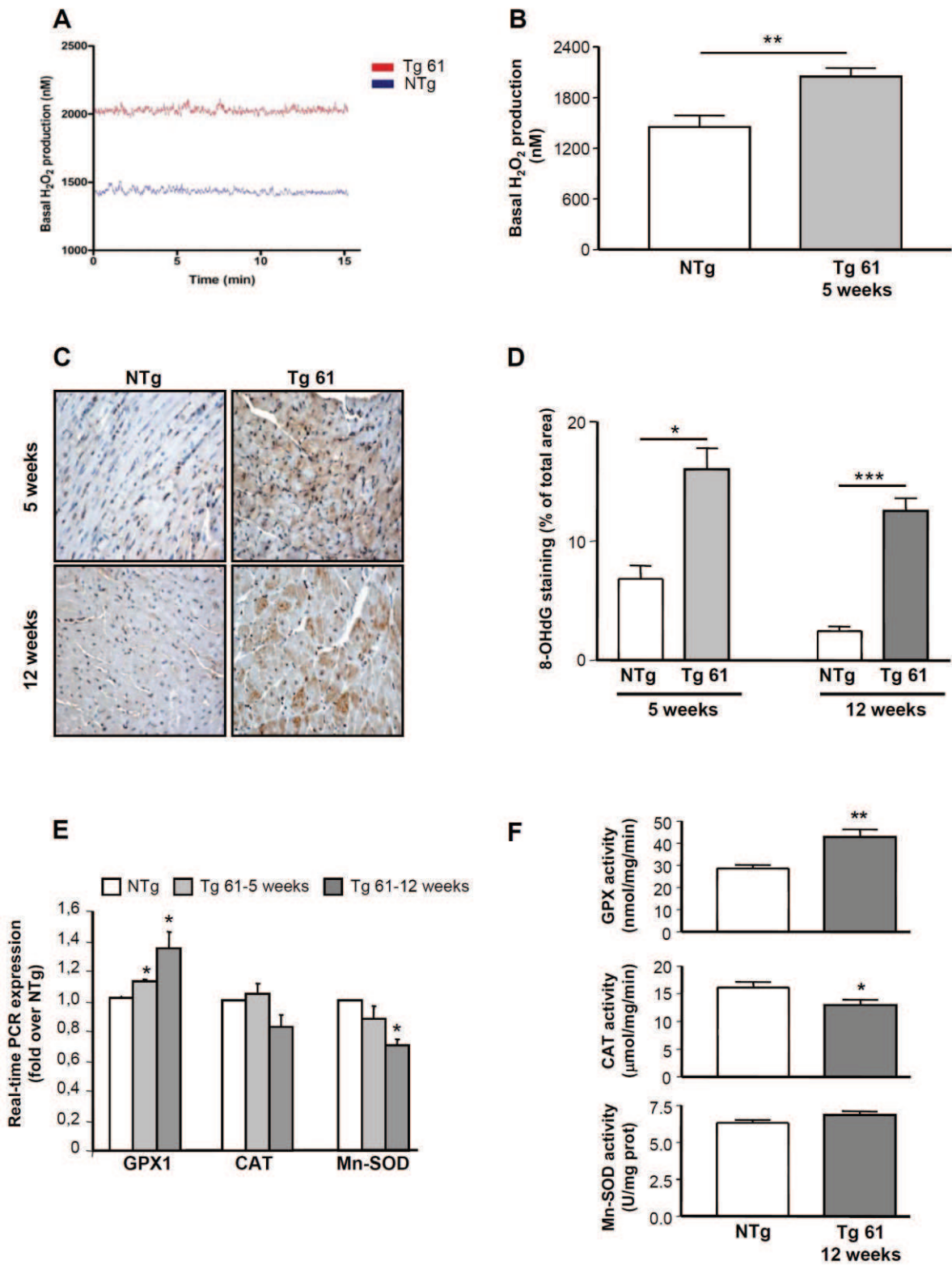


Figure 2

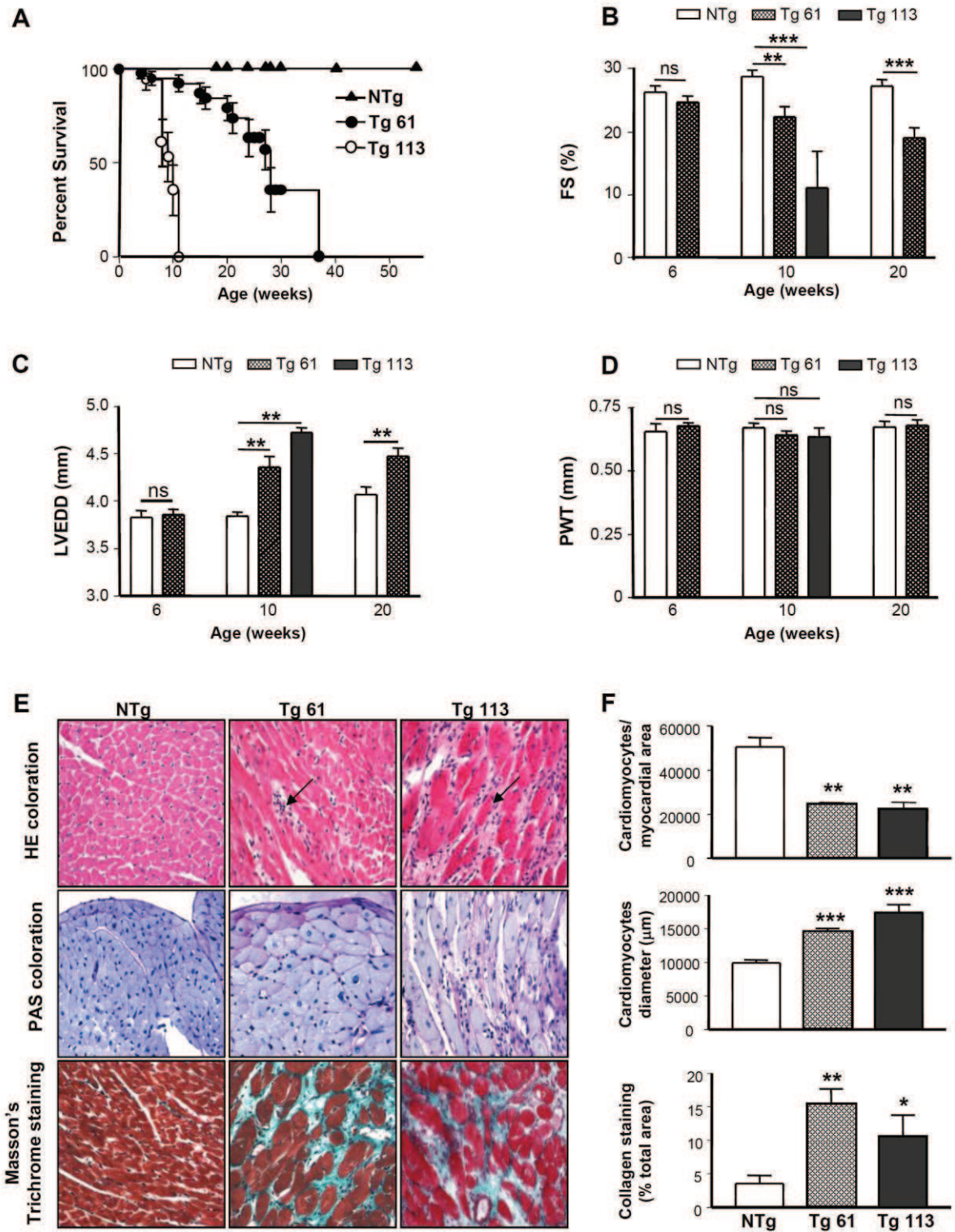


Figure 3

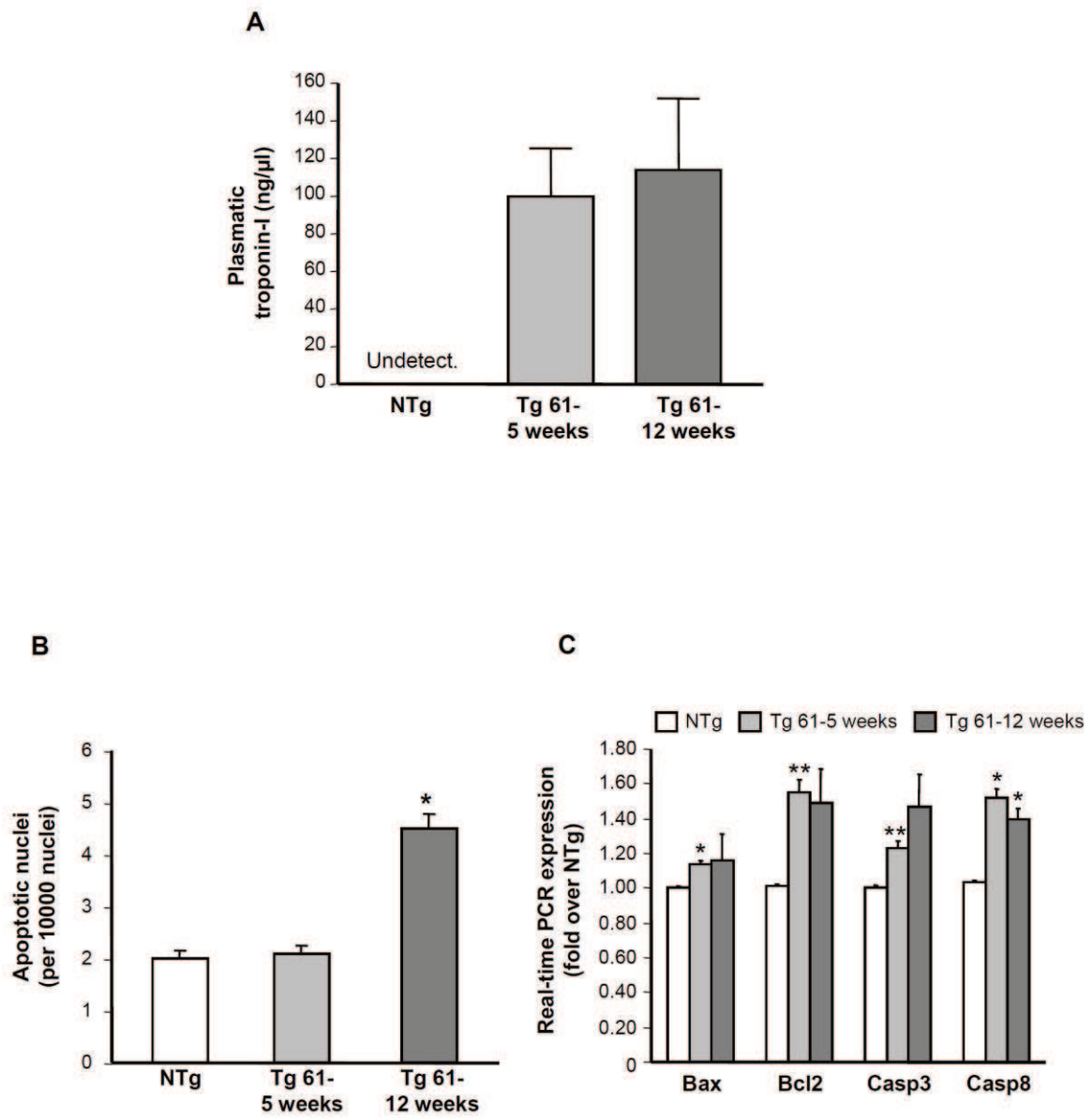


Figure 4

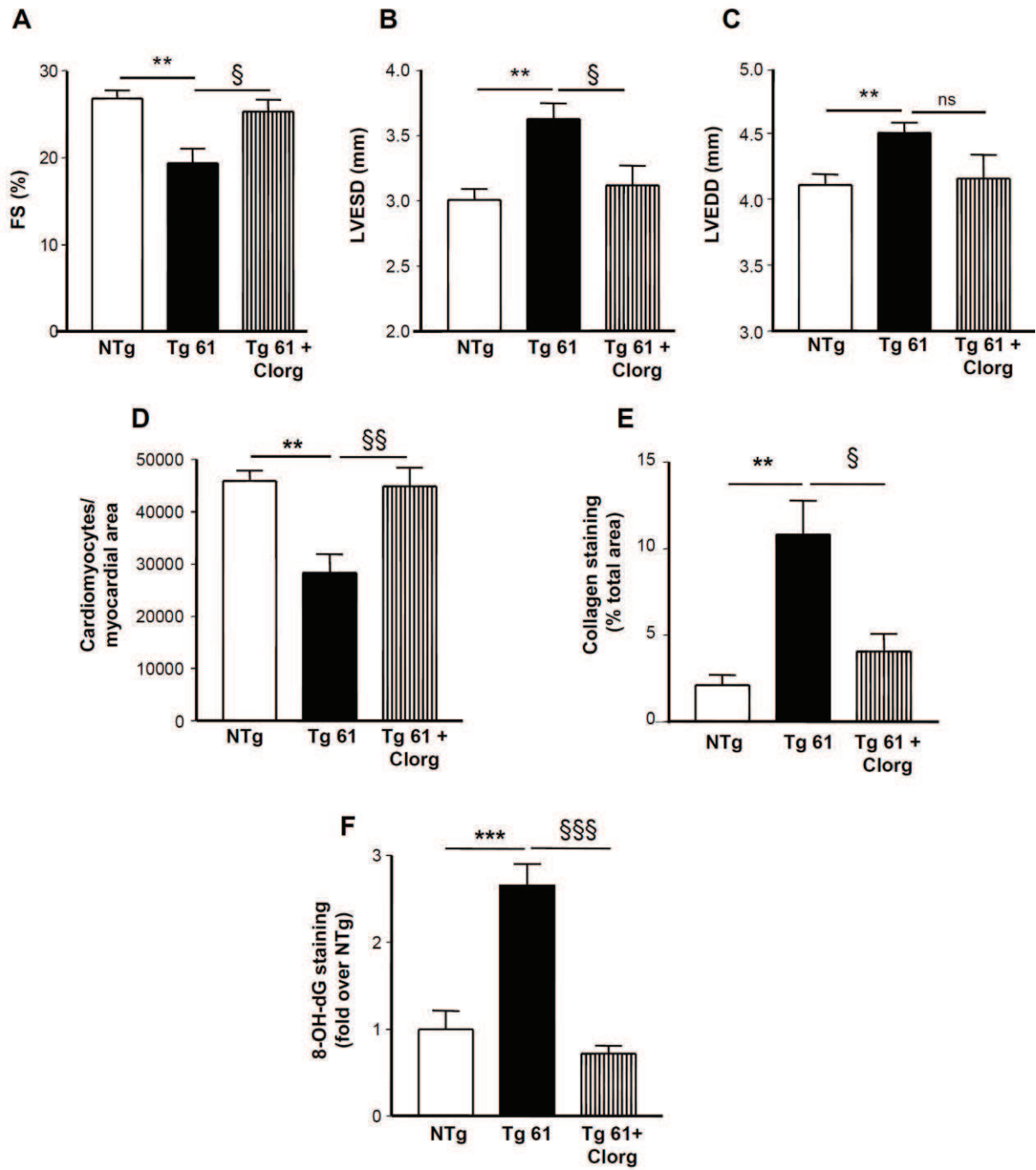


Figure 5

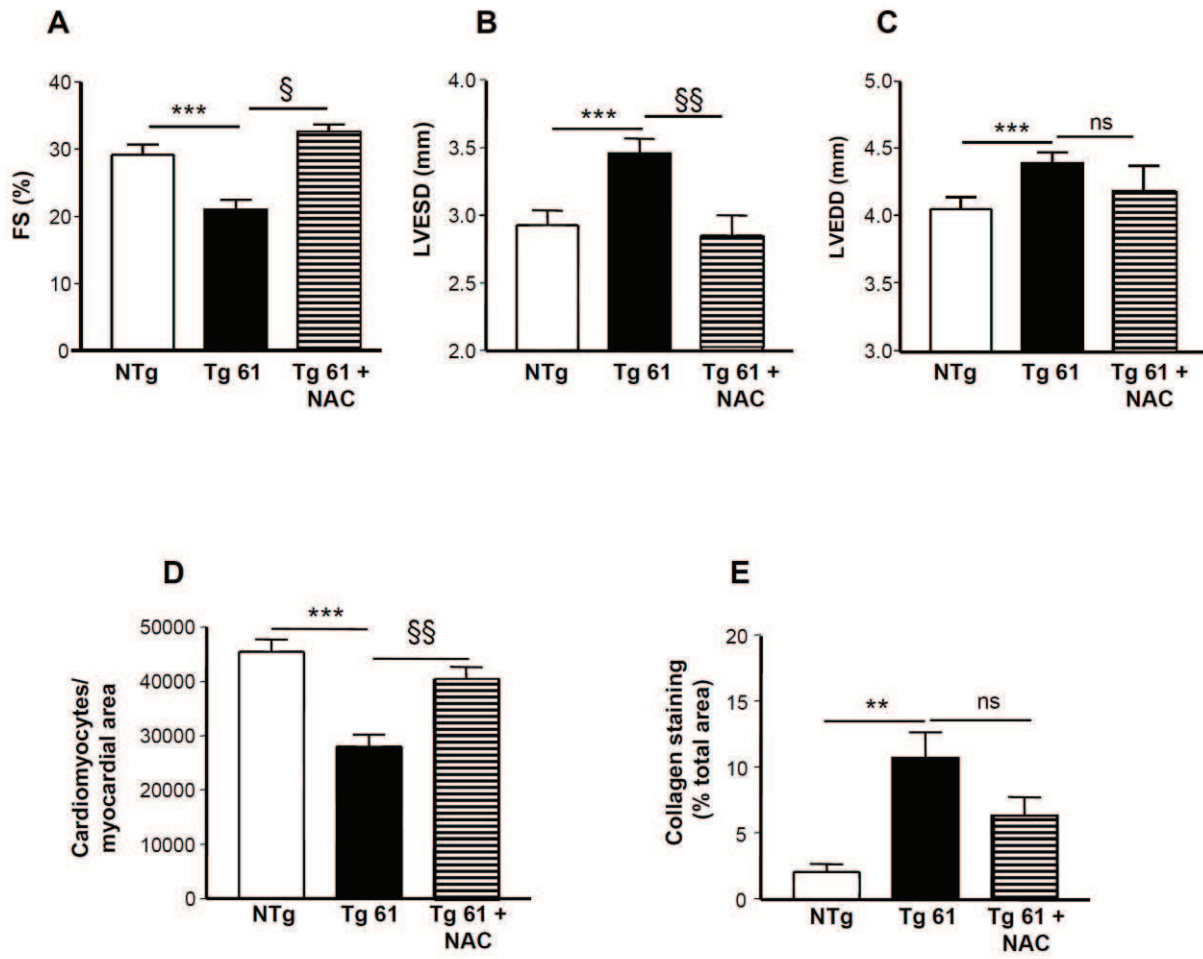


Figure 6

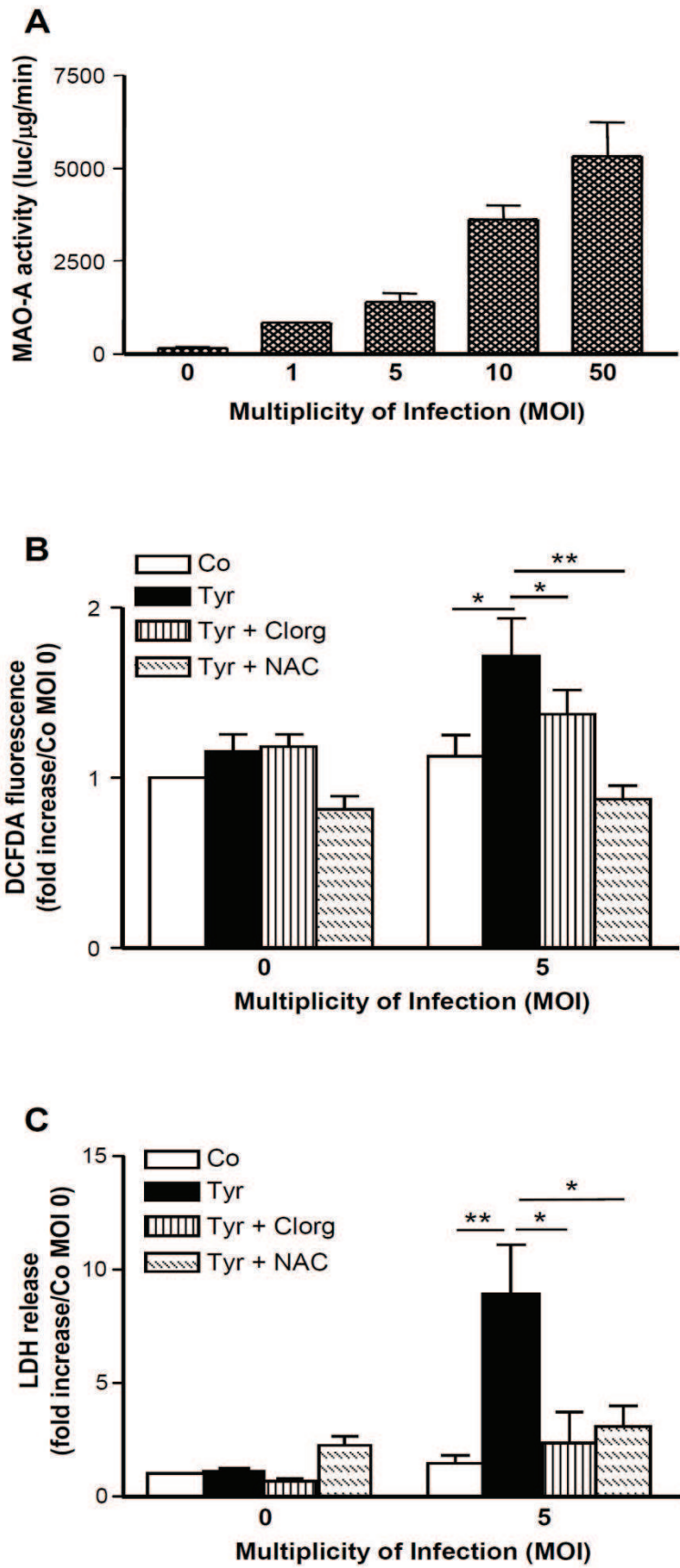


Figure 7

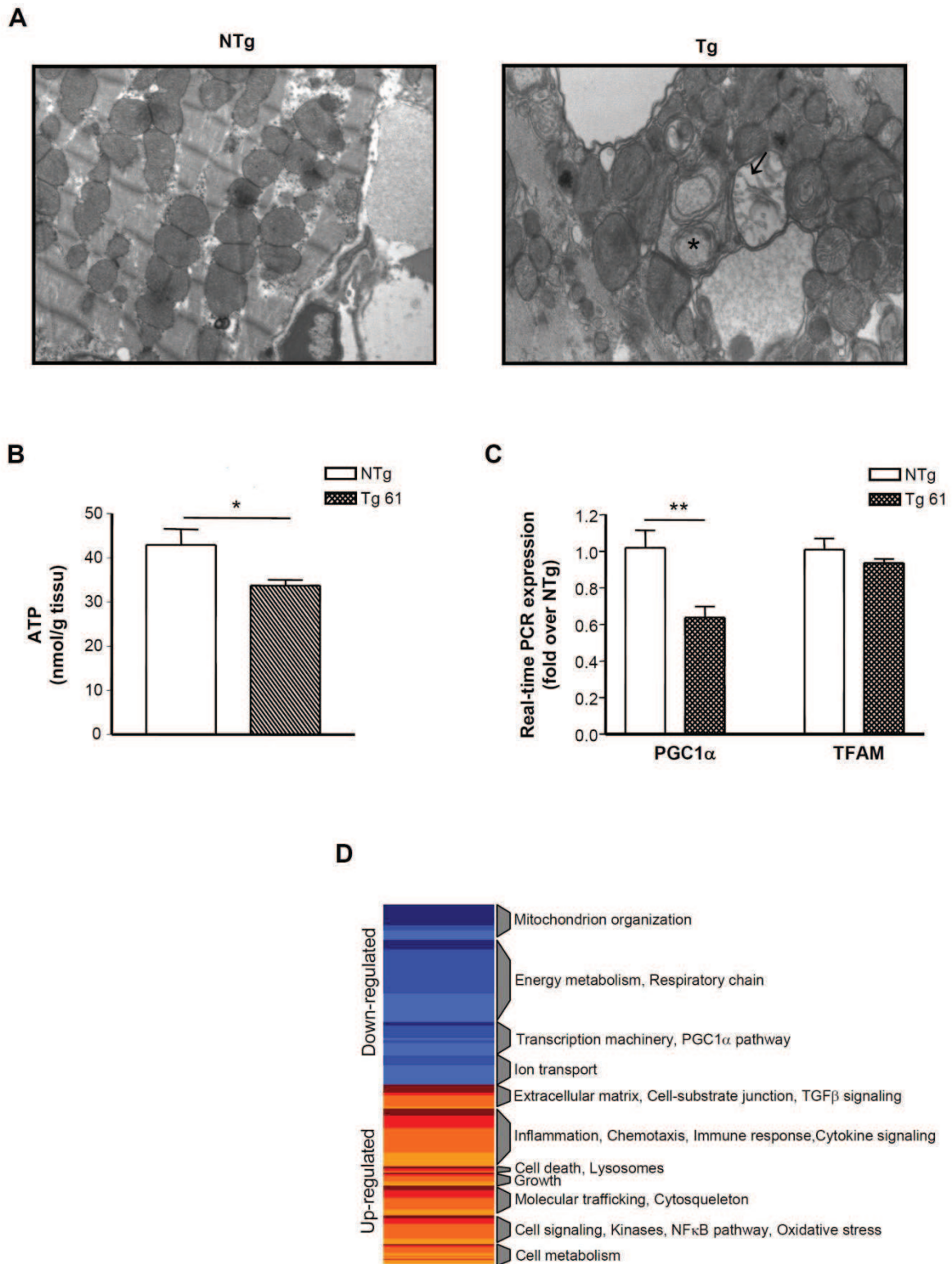


Figure 8

Supplemental Material

Supplemental methods

Rat neonatal cardiomyocytes isolation. Hearts of neonatal (2-3 days old) Sprague-Dawley rats were dissociated with collagenase type II, 0.1 % (Biovalley). The cell culture protocol used was a modification of the methods described by Pchejetski et al ¹. Briefly, cells were resuspended in Ham F12 medium supplemented with horse serum 10 %, FCS 10 % and penicillin-streptomycin. To selectively enrich the myocytes, dissociated cells were pre-plated for 2 h to allow non-myocytes to attach to the bottom of the culture dish. The resultant suspension of myocytes was transferred onto laminin-coated culture dishes. Transduction with adenovirus was performed 48 h after plating. 24 h post-transduction, medium was replaced with Ham F12 medium supplemented with dialysed-FCS 3% and inhibitors (clorgyline, NAC or NIM-811, an analog of cyclosporine) when indicated. Tyramine was added 2 h later for the indicated time.

Adenoviral construct. Replication-deficient ($\Delta E1, E3$) adenoviral vector expressing MAO-A under the transcriptional control of the CMV promoter was constructed with the AdEasy System (Qbiogen, F) according to the manufacturer's protocol. Initially, a *NotI-HindIII* fragment containing the MAO-A coding region (1.9 kb) was subcloned into the *NotI-HindIII*-digested pAd shuttle CMV to get shuttle vector pAdMAO-A. Generation of recombinant adenoviral vectors were obtained by co-transformation of the pAdMAO-A (or pAdGFP control) and pAdEasy $\Delta E1, E3$ DNA into BJ5183 bacterial cells. Replication-defective MAO-A adenovirus (AdeMAO-A) and control AdeGFP were produced by transfection of 293A cells with a single isolate of each recombinant adenoviral vector, expanded, and purified. Viral titers were initially determined by optical absorbance at 260 nm. Infections were done at a certain MOI based on this definition, e.g. 1×10^6 bav/ 1×10^6 cells = MOI 1.

Assays of MAO activity. Cardiac tissues were homogenized in PBS 50 mM, pH 7.5 supplemented with protease inhibitors. Crude protein extracts (20 µg) were incubated at 37°C for 20 min, in the presence of 400 µM of [¹⁴C]5-HT to measure MAO-A activity, as previously described². MAO-A activity *in vitro* was carried out using MAO-Glo assay kit (Promega, France). 5 µg of cellular lysate were incubated with 20 µM MAO-A substrate for 20 min at 37°C and non-specific activity was defined in the presence of clorgyline. Following addition of the detection reagent for 20 min, the luminescent signal was measured in a Mithras LB940 multimode reader (Berthold Technologies).

Western blot. Ventricular homogenates in RIPA Buffer (Tris 25 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, NP-40 1%, sodium deoxycholate 1%, SDS 0.1%) were electrophoresed through Tris/glycine 10% gels and transferred to PVDF as described². Membranes were incubated with anti-MAO-A antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) and the protein was visualized using a HRP-conjugated secondary antibody and ECL detection (GE Healthcare, Saclay, France).

Immunofluorescence. Frozen cardiac sections were fixed with PFA 3% for 15 min and neutralized with Glycine 100 mM. Following permeabilization with Triton 0.5 %, heart sections were first incubated with anti-MAO-A antibody (Santa Cruz Biotechnology) diluted to 1/25 in BSA 0.1%, Triton 0.2% and Tween 0.05% in PBS overnight at 4°C, and finally with anti-actinin antibody (Santa Cruz Biotechnology) diluted to 1/50 at room temperature (RT) for 1 h. After washing, sections were incubated for 1 h at RT with Oregon green 488-conjugated goat anti-rabbit or Alexa 594-conjugated goat anti-mouse antibodies (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Image acquisition was performed using a DM600 microscope (Leica) fitted with a Roper COOLsnap ES CCD camera. Images were denoised using the Nearest Neighbours approach of the 2D Deconvolution setup of Metamorph software (Filter size: 2; Scaling Factor: 0.5; Result Scale : 2).

Assays of 5-HT, 5-HIAA, NE and DHPG. Snap frozen ventricular tissues from mice were homogeneously grinded in 1.5 ml water. Assays for 5-HT and 5-HIAA ³, and NE and DHPG ⁴ were performed using two different HPLC methods with coulometric detection, applied to tissues. For 5-HT and 5-HIAA, determinations were made without extraction on the centrifuged supernatants after deproteinization of the aqueous mixture using 1 ml in HClO₄ 0.1 M with ascorbic acid 3.10⁻⁴ M. For NE and DHPG determinations, 500µl samples of the aqueous centrifuged mixture were extracted using acid-washed alumina columns.

Heart H₂O₂ real-time measurement. The H₂O₂-specific amperometric probe was calibrated as referred to manufacturer's instructions (ISO-HPO-100; World Precision Instruments, Aston, Stevenage, UK). Briefly, the probe was left in 20 ml of PBS buffer. After the sensor had stabilized, solution of H₂O₂ (from 100 to 800 nM) was added in the PBS solution. The current observed was directly proportional to H₂O₂ concentration. The sensitivity of a fresh probe was at least 1 pA/nM. Probes were tested before each experiment to validate their sensitivity. Then, 6-weeks old mice were given pentobarbital (100 mg/kg ip) and were placed on a heating plate at 37°C. The chest was opened quickly and the probe was implanted directly in the left ventricle to monitor H₂O₂ release. After 20 min of stabilization corresponding to an adaptative period for the probe, the concentration of H₂O₂ in the tissue was measured in real time with the data acquisition system LabTrax (WPI) connected to the free radical analyzer Apollo1000 (WPI). Data acquisition and analysis were performed with DataTrax2 software (WPI), as previously described ⁵. Basal H₂O₂ release was calculated during 15 min.

Antioxidant enzyme activities. For catalase (CAT) activity assay, 70 µg of cardiac homogenate were added to phosphate buffer 100 mM, pH 6.8, containing H₂O₂ 10 mM. CAT activity was determined by the procedure of Aebi ⁶, measuring the decrease in absorbance at 240 nm of H₂O₂ for 30 sec at 25° C. The activity was calculated using a H₂O₂ extinction coefficient of 43.6 x 10³ M⁻¹ x cm⁻¹ and was expressed as µmol/min/mg of protein. For

Glutathion Peroxidase (GPX) activity assay, 70 µg of cardiac homogenate were added to phosphate buffer 100 mM, pH 7.4, containing EDTA 0.5 mM, NaN₃ 1 mM, NADPH 0.25 mM, GSH 2.25 mM and glutathione reductase 1.0 U/ml. After addition of tert-butyl hydroperoxide 0.24 mM, the change in optical density of NADPH was monitored spectrophotometrically at 340 nm for 2 min⁷. GPX activity was calculated using a molar extinction coefficient for NADPH of $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ and expressed as nmol/min/mg protein. Superoxide Dismutase (Mn-SOD) activity was evaluated in 10 µg of cardiac homogenate using a Chemical Superoxide Dismutase Assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) as previously described⁷ and expressed as U/mg protein.

Real-time RT-PCR. Extraction of RNA from cardiac ventricles was performed using column affinity purification (Qiagen, Courtaboeuf, France). cDNAs were synthesized using the superscript II RT-PCR system (Invitrogen) with random hexamers. Real-time PCR was performed in an ABI prism 7900 using Taqman Low density Arrays (Applied Biosystem). This allowed simultaneous measurement of 45 genes and 3 housekeeping genes in 384-well plates using 200 ng of cDNA. Genes were expressed after normalization to the geometric mean of three housekeeping genes : β-glucuronidase (GUSb), Peptidyl-prolyl-isomerase A (PPIA), hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT), using the mathematic genorm method⁸.

Microarray analysis. Total RNA was prepared as described above. The quality of samples was verified with Agilent Bioanalyzer 6000 (Agilent Technologies, Massy, France). Hybridization of RNA was done on Agilent Mouse Genome CGH 44K chip at the Genotoul Biopuces Plate-forme (Toulouse, France). Raw data (median values) were normalized and processed using the R statistical software and the limma package for microarrays. Weights were attributed to flag bad data points and the remaining values were Loess normalized within arrays and quantile normalized between arrays. Limma was used to generate log₂

ratios (coefficients) and p-values (using eBayes) in order to select genes with differential expression between groups that were also well behaved in terms of expression within each individual group. Using a log₂ ratio of 0.5 (fold-change 1.4) and a p-value cutoff of 0.005, genes were selected for analysis. GeneSet Enrichment Analysis for categorical feature overrepresentation in each gene list (upregulated or down-regulated) was performed using Toppgene (<http://toppgene.cchmc.org/>). For each enriched Geneset, the enrichment P-value for non-random list intersection (using Bonferroni p-value correction) was converted to a significance score [$S = -\log(pval)$] and a matrix was constructed with colors scaled to significance scores. Common themes were defined among the various overlapping and unique Genesets.

Echocardiography. Animals were anesthetized with 2% isoflurane and examined with non-invasive echocardiography (echocardiograph Vivid 7 ultrasound, GE). Cardiac ventricular dimensions were measured on M-mode images at least 5-times for the number of animals indicated.

Histological analysis. Ventricles were incubated in Carnoy's fixative solution (Ethanol 60%, chloroform 30%, acetic acid 10%), embedded in paraffin and transversally sectioned. 5 μ m tissue sections were stained with H&E, Masson's Trichrome or PAS. Fibrosis was measured as positively stained area with Masson's Trichrome (green), and expressed as percent of total area, using a computer-based morphometric analysis (Nis-element, Nikon). Cardiomyocyte diameter was evaluated after coloration with PAS (250-300 cells counted per heart) on left ventricle. Number of cardiomyocytes per total myocardial area was measured using manual-counting function of the analysis software in 3 consecutive areas of the left ventricle. For 8-OH-dG immunohistochemistry, antigen retrieval was performed using citrate solution (sodium citrate 1 M, citric acid 1 M, pH 6.0) at 97°C during 40 min. After washing with deionised water, endogenous peroxidase activity was blocked with H₂O₂ 30 % for 10 min. 8-

OH-dG mouse monoclonal antibody (1:200) (AbCys, Paris, France) was incubated for 2 h at 37°C and secondary antibody for 30 min at RT. Slides were washed and incubated with 1:50 DAB in substrate buffer for 5 min, and then counterstained with 1:4 Mayer's haematoxylin. Positively stained area was quantified using a computer-based morphometric analysis (Nis-element, Nikon) and calculated as percent of total area. Apoptosis was evaluated by TUNEL staining on cardiac sections as previously described ⁹.

Plasmatic troponin. Cardiac troponin-I (cTn-I) released in plasma was detected using an ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Life Diagnostic, West Chester, USA). Briefly, diluted plasma samples were incubated for 1 h at RT with an HRP-conjugated anti-cTn-I antibody in microtiter wells. After extensive wash, HRP substrate was added in each well for 20 min at RT and the reaction stopped with HCl 1N. Absorbance was measured at 450 nm and plasmatic cTn-I concentration was determined using cTn-I standards.

Intracellular ROS measurement. Generation of ROS in cardiomyocytes was evaluated using DCFDA probe as previously described ⁹. Fluorescence was measured using a fluorimeter F-2500 (Hitachi) (excitation at 492 nm, emission at 527 nm).

LDH release assay. For quantitative assessment of cardiomyocyte necrosis, the release of LDH in culture medium was measured using LDH-Cytotoxicity Assay kit according to the manufacturer's instructions (Biovision). The values were normalized to LDH release of untreated cardiomyocytes.

Electron microscopy. Left ventricles of mice were cut in cubes of 1 mm² and placed in glutaraldehyde 2.5 % solution. Four to eight semi-thin (1 µm) sections were stained with toluidine blue. Trimmed ultra-thin sections (600 Å) were stained with uranyl acetate and lead citrate. Sections were examined under a transmission electron microscopy (Hitachi 5HU12A).

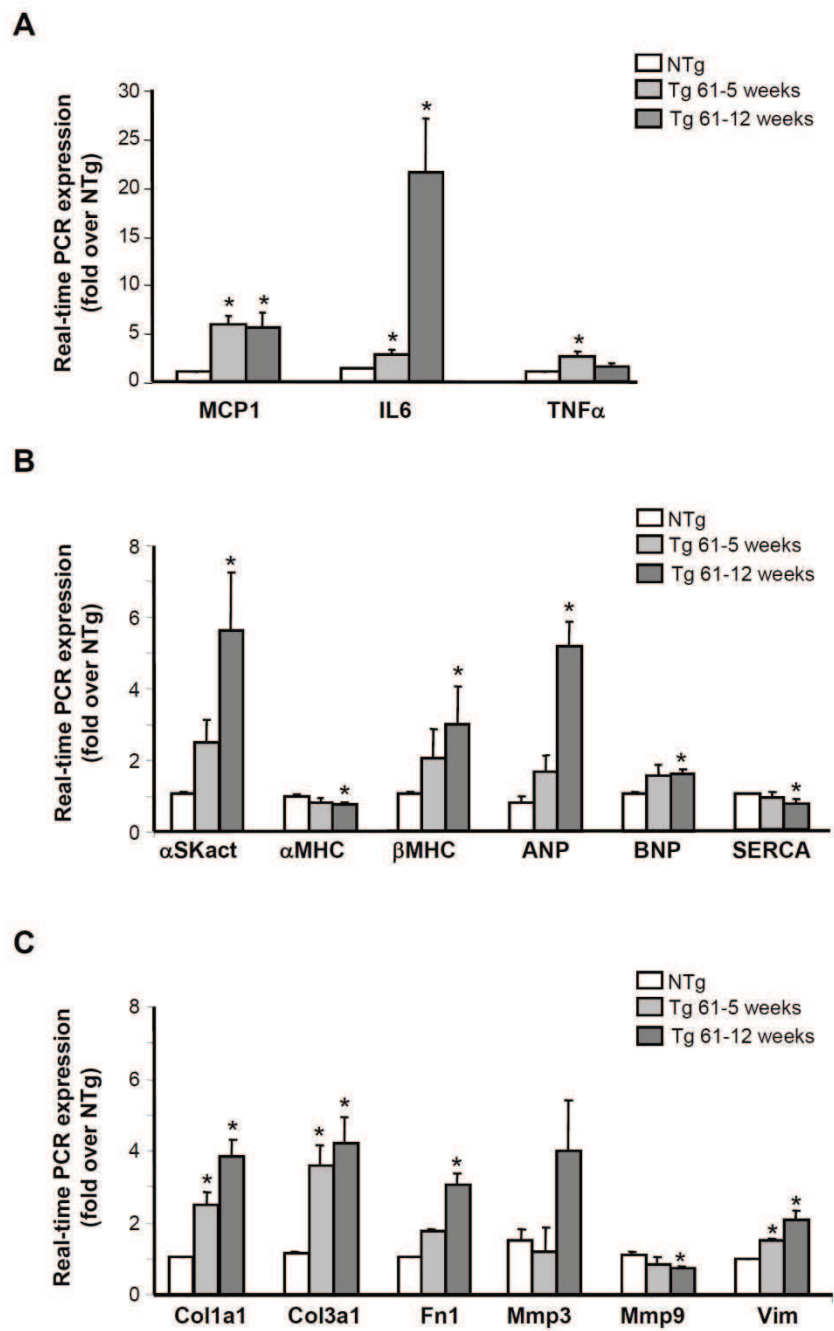
ATP measurement. Snap-frozen cardiac samples (30 mg) were homogenized in 500 µl ice-cold perchloric acid (10% v/v), sited on ice for 10 min and centrifuged at 14 000 rpm for 10

min at 4°C. Supernatants were neutralized with KOH 2.5 M and centrifuged at 4500 rpm for 5 min. Supernatants were assayed for ATP assay kit (Bioluminescence assay kit HS II, Roche).

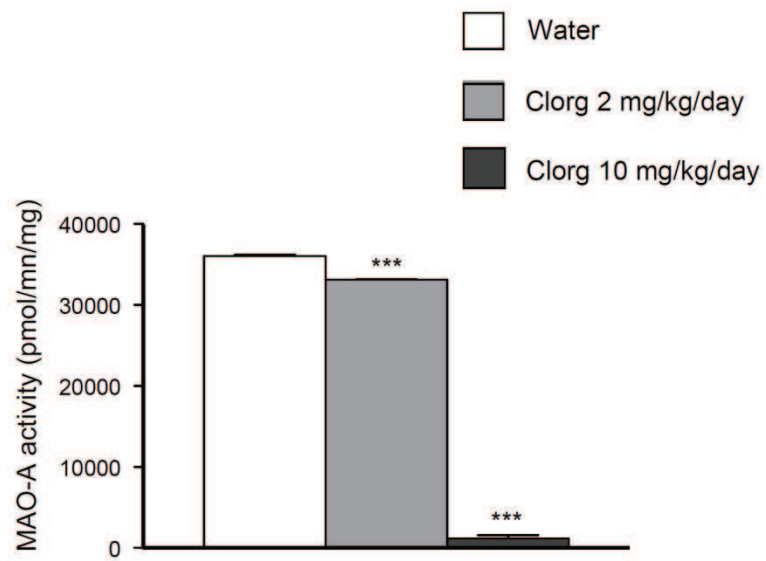
Mitochondrial Calcium Retention Capacity and mitochondrial H₂O₂ production. Cardiac mitochondria were isolated using the procedure of Gomez et al.¹⁰. The calcium retention capacity in isolated mitochondria (250 µg of protein) was measured with a spectrofluorometer in the presence of 0.5 µM Calcium Green-5N with excitation and emission wavelengths set at 500 and 530 nm, respectively^{10, 11}. The results are presented in nmol Ca²⁺.mg protein⁻¹. The total H₂O₂ production was measured using a fluorimeter F-2500 (Hitachi) and a fluorescent probe Amplex Red[®] (10 µM) in the presence of 0.6 U/ml horseradish peroxidase (excitation and emission wavelengths set to 530 and 590 nm, respectively). Isolated mitochondria (250 µg protein) were suspended in ROS buffer (sucrose 250 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, defatted BSA 1.5 mg/ml and Tris/HCl 20 mM pH 7.4). The results are presented in pmol H₂O₂.min⁻¹.mg protein⁻¹.

mPTP opening assay in cardiomyocytes. The mPTP opening was detected with MitoProbe Transition Pore Assay Kit (Molecular Probes). Cardiomyocytes were incubated with a solution of calcein-AM 2 µM and CoCl₂ 1 mM for 30 min at 37°C. After several washes, fluorescence was observed using a Zeiss AX10 fluorescence microscope fitted with an AxioCam Mrm camera.

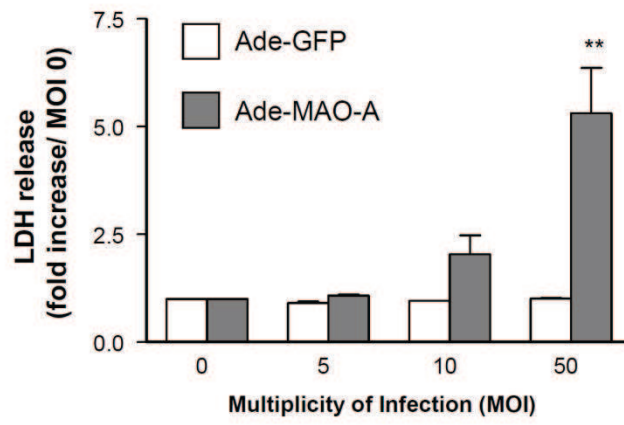
Supplemental figure 1



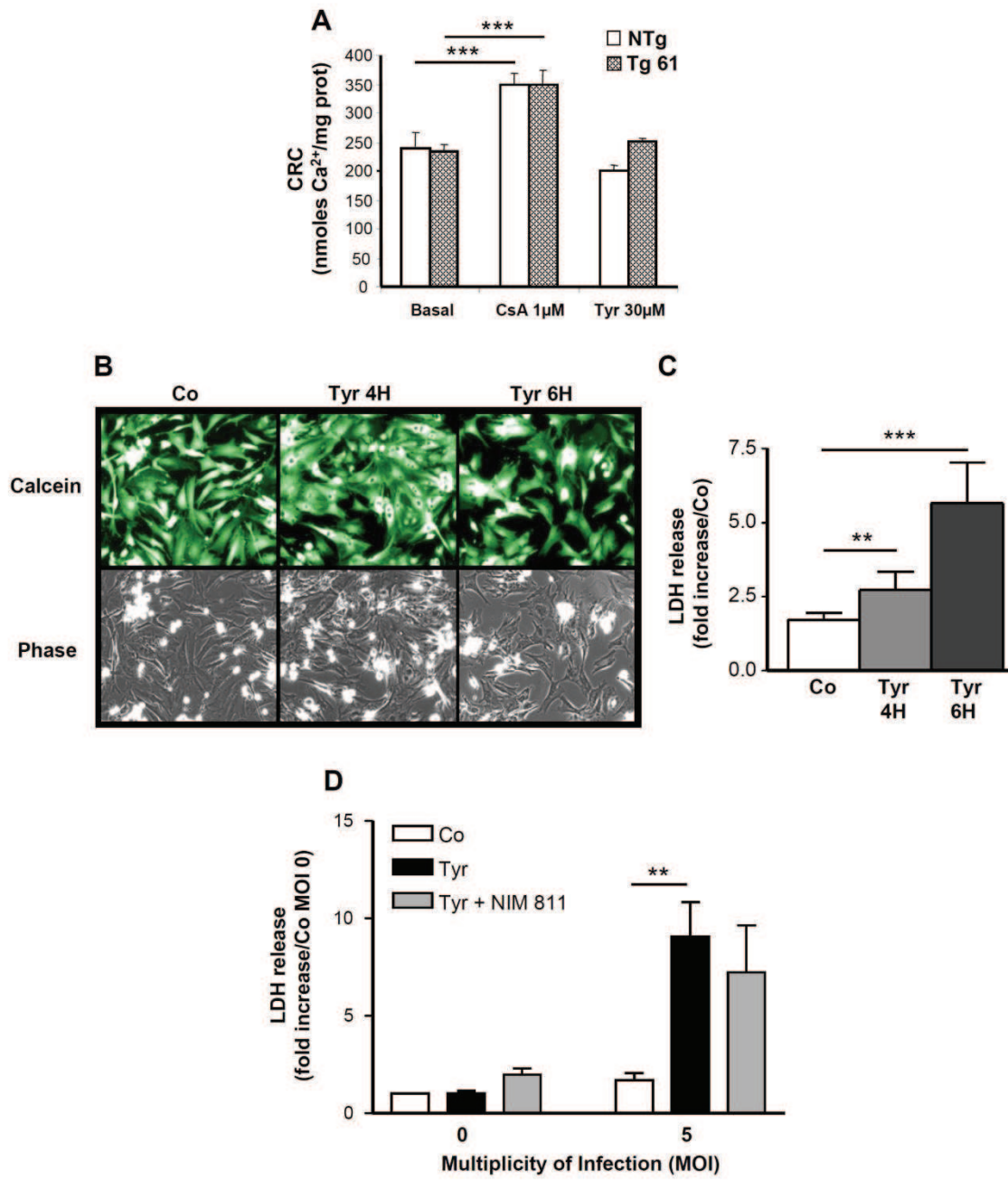
Supplemental figure 2



Supplemental figure 3



Supplemental figure 4



Supplemental Figure legends

Supplemental Figure 1. Transcriptome analysis in MAO-A overexpressing mice at the ages of 5 and 12 weeks. Expression of genes involved in inflammation (A), cardiac remodelling (B) and cardiac fibrosis (C). Expression of the gene of interest is normalized to the expression of 3 housekeeping genes and results are expressed as fold over NTg mice (n=4). (*p<0.05 vs NTg).

Supplemental Figure 2. Chronic clorgyline treatment inhibits cardiac MAO-A activity in Tg mice. MAO-A activity in cardiac homogenates from Tg mice treated with clorgyline 2 or 10 mg/kg/day in water during one week. 400 μ M 14 C-5-HT was used as a specific substrate and clorgyline (10^{-7} M) as a selective inhibitor. (**p<0.001 vs water).

Supplemental Figure 3. Transduction with Ade-MAO-A at MOI 5 is not toxic for neonatal cardiomyocytes. Necrosis was evaluated using LDH release in cardiomyocytes infected with Ade-MAO-A or control Ade-GFP at different MOI. Ade-MAO-A was toxic when used at concentrations greater than MOI 10 whereas Ade-GFP was not toxic (**p<0.01 vs non-infected).

Supplemental Figure 4. Mitochondrial Permeability Transition pore is not involved in cell necrosis induced by MAO-A. (A) Calcium Retention Capacity (CRC) in mitochondria isolated from NTg and Tg 61 hearts. At baseline or under stimulated conditions with tyramine, mitochondria isolated from Tg mice exhibited the same sensitivity to calcium as NTg mice. As a control, Cyclosporin A significantly decreased calcium sensitivity of MPT pore in both NTg and Tg mice. (B) Mitochondrial MPT determined with Calcein/CoCl₂ (x

400) in neonatal cardiomyocytes overexpressing MAO-A (MOI 5). Tyramine treatment (4 and 6 hours) did not promote calcein release from mitochondria. (C) Tyramine treatment (4 and 6 h) triggered LDH release from AdeMAO-A infected cardiomyocytes. (D) Pretreatment of AdeMAO-A infected cardiomyocytes with NIM-811 (5 μ M), an inhibitor of the MPT pore component cyclophilin D, did not prevent cardiomyocyte necrosis in response to tyramine for 24 hours (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs indicated value).

References

1. Pchejetski D, Kunduzova O, Dayon A, Calise D, Seguelas MH, Leducq N, Seif I, Parini A, Cuvillier O. Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis. *Circ Res.* 2007; 100:41-49.
2. Lairez O, Calise D, Bianchi P, Ordener C, Spreux-Varoquaux O, Guilbeau-Frugier C, Escourrou G, Seif I, Roncalli J, Pizzinat N, Galinier M, Parini A, Mialet-Perez J. Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload. *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 46:587-595.
3. Alvarez JC, Bothua D, Collignon I, Advenier C, Spreux-Varoquaux O. Simultaneous measurement of dopamine, serotonin, their metabolites and tryptophan in mouse brain homogenates by high-performance liquid chromatography with dual coulometric detection. *Biomed Chromatogr.* 1999; 13:293-298.
4. Berlin I, Said S, Spreux-Varoquaux O, Olivares R, Launay JM, Puech AJ. Monoamine oxidase A and B activities in heavy smokers. *Biol Psychiatry.* 1995; 38:756-761.
5. Fioramonti X, Marsollier N, Song Z, Fakira KA, Patel RM, Brown S, Duparc T, Pica-Mendez A, Sanders NM, Knauf C, Valet P, McCrimmon RJ, Beuve A, Magnan C, Routh VH. Ventromedial hypothalamic nitric oxide production is necessary for hypoglycemia detection and counterregulation. *Diabetes.* 59:519-528.
6. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-126.
7. Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borchetti E, Zani M, Feccia M, Mancini M, Petrozza V, Cossarizza A, Gallo P, Taylor RW, d'Amati G. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 50:1362-1369.
8. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3:RESEARCH0034.
9. Bianchi P, Kunduzova O, Masini E, Cambon C, Bani D, Raimondi L, Seguelas MH, Nistri S, Colucci W, Leducq N, Parini A. Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury. *Circulation.* 2005; 112:3297-3305.

10. Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation*. 2008; 117:2761-2768.
11. Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Bejui F, Robert D, Ovize M. Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res*. 2004; 61:115-122.

Synthèse des résultats et discussion

La MAO est une enzyme localisée sur la face externe de la membrane mitochondriale externe. Elle régule le métabolisme des amines endogènes. L' H_2O_2 est un produit de ces réactions de désamination des catécholamines. Nous avons choisi ce modèle afin d'étudier l'influence de l' H_2O_2 endogène sur la régulation du mPTP.

Les souris transgéniques surexprimant la MAO-A spécifiquement au niveau cardiaque produisent de très grandes quantités d' H_2O_2 sous stimulation à la tyramine. Cependant, lorsque les mitochondries cardiaques de ces souris sont stimulées par ce substrat, le mPTP ne devient pas plus sensible au calcium que celui des souris non transgéniques. De plus, l'ajout de CsA retarde d'une façon identique l'ouverture du mPTP chez les souris transgéniques et les *wild type*. Ces résultats suggèrent donc que le mPTP n'est pas sensible à l'activation de la MAO-A.

In vitro, le traitement à la tyramine induit un relargage de LDH, mais pas de calcéine, chez les cardiomyocytes transfectés par un adénovirus MAO-A. La nécrose de ces cardiomyocytes induite par la tyramine n'est pas prévenue par un prétraitement à la NIM-811, un inhibiteur de la Cyp D. Ces résultats démontrent que l'ouverture du mPTP n'est pas une cible de la production mitochondriale d' H_2O_2 MAO-A-dépendante.

Le mPTP est considéré comme le médiateur de la nécrose cellulaire. Cependant, bien que de grandes quantités d' H_2O_2 soient produites par la MAO-A lors de la dégradation de la tyramine, la sensibilité du mPTP au calcium n'est pas modifiée sur les mitochondries de cœurs transgéniques. De plus, nous avons montré que ce pore n'était pas impliqué dans la nécrose cellulaire grâce au modèle *in vitro* de cardiomyocytes transfectés par un adénovirus MAO-A.

Les souris transgéniques surexprimant la MAO-A ont une durée de vie limitée, inversement proportionnelle à l'activité de la MAO-A. Les traitements chroniques par la clorgyline, un inhibiteur de la MAO-A, ou le NAC, un anti-oxydant, préviennent la pathologie cardiaque de ces souris. Ceci démontre que le piégeage ou l'inhibition de la surproduction de ROS préviennent la nécrose et la pathologie cardiaque induites dans ce modèle transgénique, bien que l'ouverture du mPTP ne soit pas modifiée.

Ces résultats démontrent que la dysfonction cardiaque et la mort cellulaire induite par une surproduction de ROS n'affectent pas l'ouverture du mPTP. Il semble que la MAO-A soit une cible pharmacologique de premier choix dans la prévention de la mort des cardiomyocytes survenant lors de maladies chroniques. Dans le cas présent, la nécrose induite par une surproduction de ROS n'est pas dépendante de l'ouverture du mPTP. Ce modèle montre l'existence d'autres voies que le mPTP dans la régulation de la mort cellulaire. D'une façon plus générale, il convient de prendre en compte un ensemble de facteurs dans l'étude de la mort cellulaire.

CONCLUSIONS

La réussite du postconditionnement pose un problème chez le rat. Certains auteurs ont montré que le PostC cardioprotège cet animal, alors que d'autres ont montré qu'il est inefficace. Les raisons de la spécificité du rat par rapport au PostC ne sont pas connues. Il semble que la durée de l'ischémie, l'algorithme du postconditionnement, la nature du traitement pharmacologique et le sexe de l'animal peuvent être des facteurs influençant la réussite de cette manœuvre.

Le but de notre travail était d'éclaircir le paradoxe du PostC chez le rat. Nous avons donc étudié les effets de trois types de preconditionnement et de postconditionnement cardiaques sur un modèle de rat *in vivo*. Ces trois protocoles (PreC et PostC ischémiques, à la CsA et à l'isoflurane) mettent en jeu des voies cellulaires distinctes. Parallèlement, nous avons étudié la transition de perméabilité mitochondriale, la phosphorylation oxydative et la production d'espèces radicalaires de nos différents groupes afin d'établir éventuellement une relation entre l'évolution des fonctions mitochondriales et la réussite ou l'échec de la cardioprotection.

Nous avons également étudié l'implication de ces fonctions mitochondriales à l'aide d'autres modèles expérimentaux afin de préciser le rôle de la mitochondrie. Nous avons ainsi étudié, sur différentes lignées cellulaires et modèles animaux, la régulation du mPTP par le flux d'électrons à travers le complexe I de la chaîne respiratoire. De plus, nous avons examiné la régulation de ce pore par deux analogues de l'ubiquinone, CoQ₂ et CoQ₁₀, sur le cœur de lapin sham. Nous avons également évalué l'impact de l'administration de CsA en PreC et en PostC dans un modèle d'infarctus cérébral chez le rat nouveau-né. Enfin, nous avons étudié le rôle des ROS dans la cardioprotection à l'aide de souris transgéniques surexprimant la MAO-A cardiaque.

Nos conclusions sont :

1. Le rat est sensible au PostC cardiaque sous certaines conditions. Il semble que la réussite du PostC chez cet animal nécessite à la fois une préservation de la phosphorylation oxydative, une inhibition de l'ouverture du mPTP et une diminution de la production de ROS.
2. La sensibilité à la protection est organe dépendante. Ainsi, chez le rat nouveau-né, l'inhibition de l'ouverture du mPTP protège le cerveau contre les lésions ischémiques.
3. Le complexe I de la chaîne respiratoire peut réguler l'ouverture du mPTP en relation avec la Cyp D.
4. Les analogues de l'ubiquinone régulent différemment l'ouverture du mPTP selon les organes étudiés. Cette régulation n'altère pas la Cyp D et ne met pas directement en jeu les ROS.
5. La surproduction de ROS, dans un modèle de souris surexprimant la MAO-A, induit une dysfonction cardiaque mais n'affecte pas l'ouverture du mPTP, ce qui démontre qu'il existe d'autres voies que le mPTP dans la régulation de la mort cellulaire.

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que le rat n'est pas réfractaire au postconditionnement, mais pour que celui-ci soit efficace, il est nécessaire de préserver l'intégrité des différentes fonctions mitochondriales. Le flux d'électrons à travers le complexe I est capable de réagir sur un site de régulation du mPTP cardiaque masqué par la Cyp D. Ces résultats suggèrent que le complexe I est peut être un constituant du mPTP. Les différentes

approches utilisées dans ce travail de thèse nous permettent également de conclure que la cardioprotection et la régulation des fonctions mitochondriales sont spécifiquement liées au modèle utilisé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Henze K, Martin W. Evolutionary biology: essence of mitochondria. *Nature* 2003;426:127-8.
2. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 2006;13:1396-402.
3. McMillin JB, Dowhan W. Cardiolipin and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002;1585:97-107.
4. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1456-62.
5. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res* 1992;275:331-42.
6. Bohr VA, Dianov GL. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 1999;81:155-60.
7. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 1997;10:485-94.
8. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992;13:341-90.
9. Chinta SJ, Andersen JK. Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2008;1780:1362-7.
10. de Moura MB, dos Santos LS, Van Houten B. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer. *Environ Mol Mutagen* 2010;51:391-405.
11. Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:2202-10.
12. Saini HK, Machackova J, Dhalla NS. Role of reactive oxygen species in ischemic preconditioning of subcellular organelles in the heart. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:393-404.
13. Penna C, Tullio F, Merlino A, et al. Postconditioning cardioprotection against infarct size and post-ischemic systolic dysfunction is influenced by gender. *Basic Res Cardiol* 2009;104:390-402.
14. Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Pagliaro P. Cardioprotection: a radical view Free radicals in pre and postconditioning. *Biochim Biophys Acta* 2009;1787:781-93.
15. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552:335-44.
16. Loschen G, Flohe L, Chance B. Respiratory chain linked H(2)O(2) production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett* 1971;18:261-4.
17. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002;80:780-7.
18. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999;79:1127-55.
19. Vandecasteele G, Szabadkai G, Rizzuto R. Mitochondrial calcium homeostasis: mechanisms and molecules. *IUBMB Life* 2001;52:213-9.
20. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 1998;280:1763-6.
21. Bianchi P, Kunduzova O, Masini E, et al. Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury. *Circulation* 2005;112:3297-305.
22. Hunter DR, Haworth RA. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 1979;195:453-9.
23. Haworth RA, Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys* 1979;195:460-7.
24. Crompton M, Costi A, Hayat L. Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J* 1987;245:915-8.

25. Di Lisa F, Bernardi P. A CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:775-80.
26. Ichas F, Mazat JP. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:33-50.
27. Fiskum G. Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *J Neurotrauma* 2000;17:843-55.
28. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:399-415.
29. Du H, Guo L, Fang F, et al. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med* 2008;14:1097-105.
30. Devalaraja-Narashimha K, Diener AM, Padanilam BJ. Cyclophilin D gene ablation protects mice from ischemic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297:F749-59.
31. Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, et al. Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 2004;61:115-22.
32. Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Ovize M. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res* 2006;69:178-85.
33. Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* 2008;117:2761-8.
34. Paillard M, Gomez L, Augeul L, Loufouat J, Lesnefsky EJ, Ovize M. Postconditioning inhibits mPTP opening independent of oxidative phosphorylation and membrane potential. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:902-9.
35. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999;341 (Pt 2):233-49.
36. Beutner G, Ruck A, Riede B, Brdiczka D. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1998;1368:7-18.
37. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998;281:2027-31.
38. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 1998;187:1261-71.
39. McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3170-4.
40. Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:207-19.
41. Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med* 2010;31:227-85.
42. Szabo I, De Pinto V, Zoratti M. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *FEBS Lett* 1993;330:206-10.
43. Gincel D, Zaid H, Shoshan-Barmatz V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* 2001;358:147-55.
44. Zizi M, Forte M, Blachly-Dyson E, Colombini M. NADH regulates the gating of VDAC, the mitochondrial outer membrane channel. *J Biol Chem* 1994;269:1614-6.
45. Gincel D, Shoshan-Barmatz V. Glutamate interacts with VDAC and modulates opening of the mitochondrial permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr* 2004;36:179-86.

46. Pastorino JG, Hoek JB, Shulga N. Activation of glycogen synthase kinase 3 β disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res* 2005;65:10545-54.
47. Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem* 1998;273:12662-8.
48. Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J Biol Chem* 1996;271:6746-51.
49. Pastorino JG, Hoek JB. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem* 2003;10:1535-51.
50. Crompton M, Virji S, Ward JM. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* 1998;258:729-35.
51. Halestrap AP, Davidson AM. Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* 1990;268:153-60.
52. Novgorodov SA, Gudz TI, Jung DW, Brierley GP. The nonspecific inner membrane pore of liver mitochondria: modulation of cyclosporin sensitivity by ADP at carboxyatractyloside-sensitive and insensitive sites. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;180:33-8.
53. Halestrap AP, Brenner C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* 2003;10:1507-25.
54. Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem* 1997;272:3346-54.
55. Le Quoc K, Le Quoc D. Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. *Arch Biochem Biophys* 1988;265:249-57.
56. Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J* 1988;255:357-60.
57. Griffiths EJ, Halestrap AP. Further evidence that cyclosporin A protects mitochondria from calcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. Implications for the immunosuppressive and toxic effects of cyclosporin. *Biochem J* 1991;274 (Pt 2):611-4.
58. Connern CP, Halestrap AP. Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochem J* 1992;284 (Pt 2):381-5.
59. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005;434:658-62.
60. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005;434:652-8.
61. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 1995;307 (Pt 1):93-8.
62. Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, Lemasters JJ. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. *Mol Pharmacol* 2002;62:22-9.
63. Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, Halestrap AP. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J* 1998;336 (Pt 2):287-90.

64. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res* 2003;93:292-301.
65. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:367-74.
66. Piot C, Croisille P, Staat P, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2008;359:473-81.
67. Falchi AM, Battetta B, Sanna F, et al. Intracellular cholesterol changes induced by translocator protein (18 kDa) TSPO/PBR ligands. *Neuropharmacology* 2007;53:318-29.
68. Corsi L, Geminiani E, Baraldi M. Peripheral benzodiazepine receptor (PBR) new insight in cell proliferation and cell differentiation review. *Curr Clin Pharmacol* 2008;3:38-45.
69. Kinnally KW, Zorov DB, Antonenko YN, Snyder SH, McEnery MW, Tedeschi H. Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:1374-8.
70. Bognar Z, Kalai T, Palfi A, et al. A novel SOD-mimetic permeability transition inhibitor agent protects ischemic heart by inhibiting both apoptotic and necrotic cell death. *Free Radic Biol Med* 2006;41:835-48.
71. Brown DA, Aon MA, Akar FG, Liu T, Sorrairain N, O'Rourke B. Effects of 4'-chlorodiazepam on cellular excitation-contraction coupling and ischaemia-reperfusion injury in rabbit heart. *Cardiovasc Res* 2008;79:141-9.
72. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation* 2007;115:e356-75.
73. O'Gorman E, Beutner G, Dolder M, Koretsky AP, Brdiczka D, Wallimann T. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 1997;414:253-7.
74. Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* 2003;206:2049-57.
75. Arora KK, Filburn CR, Pedersen PL. Structure/function relationships in hexokinase. Site-directed mutational analyses and characterization of overexpressed fragments implicate different functions for the N- and C-terminal halves of the enzyme. *J Biol Chem* 1993;268:18259-66.
76. Chiara F, Castellaro D, Marin O, et al. Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels. *PLoS One* 2008;3:e1852.
77. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-6.
78. Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, et al. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 2000;19:329-36.
79. Juhaszova M, Wang S, Zorov DB, 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.
80. Chen M, Won DJ, Krajewski S, Gottlieb RA. Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J Biol Chem* 2002;277:29181-6.
81. Milanesi E, Costantini P, Gambalunga A, et al. The mitochondrial effects of small organic ligands of BCL-2: sensitization of BCL-2-overexpressing cells to apoptosis by a pyrimidine-2,4,6-trione derivative. *J Biol Chem* 2006;281:10066-72.
82. Rasola A, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 2007;12:815-33.
83. Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondrial apoptosis without VDAC. *Nat Cell Biol* 2007;9:487-9.
84. Cesura AM, Pinard E, Schubeneel R, et al. The voltage-dependent anion channel is the target for a new class of inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 2003;278:49812-8.
85. Krauskopf A, Eriksson O, Craigen WJ, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:590-5.

86. Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 2007;9:550-5.
87. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 2004;427:461-5.
88. Halestrap AP. Mitochondrial permeability: dual role for the ADP/ATP translocator? *Nature* 2004;430:1 p following 983.
89. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans* 2006;34:232-7.
90. Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 2005;280:18558-61.
91. Leung AWC, Halestrap AP. The cyclophilin-D binding protein of the mitochondrial permeability transition pore may not be the adenine nucleotide translocase. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:971.
92. Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 2009;83:213-25.
93. Halestrap AP. The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp* 1999;66:181-203.
94. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001;495:12-5.
95. Bernardi P, Veronese P, Petronilli V. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me²⁺ binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J Biol Chem* 1993;268:1005-10.
96. Petronilli V, Cola C, Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix Ca²⁺. *J Biol Chem* 1993;268:1011-6.
97. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success. *Basic Res Cardiol* 2008;103:464-71.
98. Inserte J, Barba I, Hernando V, et al. Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage. *Cardiovasc Res* 2008;77:782-90.
99. Inserte 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;81:116-22.
100. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004;61:372-85.
101. Lenartowicz E, Bernardi P, Azzone GF. Phenylarsine oxide induces the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 1991;23:679-88.
102. Crompton M, Costi A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload. *Eur J Biochem* 1988;178:489-501.
103. Sztark F, Ichas F, Ouhabi R, Dabadie P, Mazat JP. Effects of the anaesthetic propofol on the calcium-induced permeability transition of rat heart mitochondria: direct pore inhibition and shift of the gating potential. *FEBS Lett* 1995;368:101-4.
104. Javadov SA, Lim KH, Kerr PM, Suleiman MS, Angelini GD, Halestrap AP. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 2000;45:360-9.
105. Novalija E, Kevin LG, Eells JT, Henry MM, Stowe DF. Anesthetic preconditioning improves adenosine triphosphate synthesis and reduces reactive oxygen species formation in mitochondria after ischemia by a redox dependent mechanism. *Anesthesiology* 2003;98:1155-63.
106. Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, et al. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2005;19:1088-95.

107. Novalija E, Kevin LG, Camara AK, Bosnjak ZJ, Kampine JP, Stowe DF. Reactive oxygen species precede the epsilon isoform of protein kinase C in the anesthetic preconditioning signaling cascade. *Anesthesiology* 2003;99:421-8.
108. McStay GP, Clarke SJ, Halestrap AP. Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem J* 2002;367:541-8.
109. Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta* 2007;1767:1007-31.
110. Liu Y, Yang XM, Iliodromitis EK, et al. Redox signaling at reperfusion is required for protection from ischemic preconditioning but not from a direct PKC activator. *Basic Res Cardiol* 2008;103:54-9.
111. Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem* 1992;267:8834-9.
112. Sedlic F, Sepac A, Pravdic D, et al. Mitochondrial depolarization underlies delay in permeability transition by preconditioning with isoflurane: roles of ROS and Ca²⁺. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;299:C506-15.
113. Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *J Biol Chem* 2008;283:26307-11.
114. Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem* 2008;283:26312-23.
115. Walter L, Nogueira V, Leverve X, Heitz MP, Bernardi P, Fontaine E. Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *J Biol Chem* 2000;275:29521-7.
116. Fontaine E, Ichas F, Bernardi P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 1998;273:25734-40.
117. Chauvin C, De Oliveira F, Ronot X, Mousseau M, Leverve X, Fontaine E. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem* 2001;276:41394-8.
118. Costa AD, 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;281:20801-8.
119. Jennings RB, Reimer KA. Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation* 1983;68:125-36.
120. 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.
121. Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 1979;40:633-44.
122. Reimer KA, Jennings RB, Cobb FR, et al. Animal models for protecting ischemic myocardium: results of the NHLBI Cooperative Study. Comparison of unconscious and conscious dog models. *Circ Res* 1985;56:651-65.
123. Lowe JE, Reimer KA, Jennings RB. Experimental infarct size as a function of the amount of myocardium at risk. *Am J Pathol* 1978;90:363-79.
124. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002;105:2332-6.
125. Hearse DJ. Reperfusion of the ischemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1977;9:605-16.
126. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H971-6.
127. Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *Am J Cardiol* 2010;106:360-8.

128. Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 1997;77:731-58.
129. Brosius FC, 3rd, Liu Y, Nguyen N, Sun D, Bartlett J, Schwaiger M. Persistent myocardial ischemia increases GLUT1 glucose transporter expression in both ischemic and non-ischemic heart regions. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1675-85.
130. Dennis SC, Gevers W, Opie LH. Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to? *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:1077-86.
131. Liu B, Clanachan AS, Schulz R, Lopaschuk GD. Cardiac efficiency is improved after ischemia by altering both the source and fate of protons. *Circ Res* 1996;79:940-8.
132. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res* 1997;33:243-57.
133. Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K. The myocardial Na(+)-H(+) exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res* 1999;85:777-86.
134. Baetz D, Haworth RS, Avkiran M, Feuvray D. The ERK pathway regulates Na(+)-HCO(3)(-) cotransport activity in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H2102-9.
135. 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;65:1045-56.
136. du Toit EF, Opie LH. Modulation of severity of reperfusion stunning in the isolated rat heart by agents altering calcium flux at onset of reperfusion. *Circ Res* 1992;70:960-7.
137. Kaplan P, Hendrikx M, Mattheussen M, Mubagwa K, Flameng W. Effect of ischemia and reperfusion on sarcoplasmic reticulum calcium uptake. *Circ Res* 1992;71:1123-30.
138. Kusuoka H, Porterfield JK, Weisman HF, Weisfeldt ML, Marban E. Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca²⁺ activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. *J Clin Invest* 1987;79:950-61.
139. Nayler WG. The role of calcium in the ischemic myocardium. *Am J Pathol* 1981;102:262-70.
140. Hulsmann WC. Morphological changes of heart muscle caused by successive perfusion with calcium-free and calcium-containing solutions (calcium paradox). *Cardiovasc Res* 2000;45:119-20, 22.
141. Bond JM, Herman B, Lemasters JJ. Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;179:798-803.
142. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS* 1996;76:99-114.
143. Xia Y, Zweier JL. Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. *J Biol Chem* 1995;270:18797-803.
144. Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med* 2000;192:1001-14.
145. Loke KE, McConnell PI, Tuzman JM, et al. Endogenous endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide is a physiological regulator of myocardial oxygen consumption. *Circ Res* 1999;84:840-5.
146. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;2:1057-8.
147. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1620-4.
148. Wang P, Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem* 1996;271:29223-30.
149. Wang ZV, Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in hypertensive heart disease. *J Biol Chem* 2010;285:8509-14.

150. Matsui Y, Takagi H, Qu X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res* 2007;100:914-22.
151. Chao W. Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H1-12.
152. Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, et al. Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes. *Circulation* 2006;114:2056-64.
153. Kobara M, Sunagawa N, Abe M, et al. Apoptotic myocytes generate monocyte chemoattractant protein-1 and mediate macrophage recruitment. *J Appl Physiol* 2008;104:601-9.
154. Ezzati M, Hoorn SV, Rodgers A, Lopez AD, Mathers CD, Murray CJ. Estimates of global and regional potential health gains from reducing multiple major risk factors. *Lancet* 2003;362:271-80.
155. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349:1498-504.
156. Bolli R, Becker L, Gross G, Mentzer R, Jr., Balshaw D, Lathrop DA. Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circ Res* 2004;95:125-34.
157. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
158. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H579-88.
159. Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005;112:2143-8.
160. Laskey WK. Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv* 2005;65:361-7.
161. Laskey WK, Yoon S, Calzada N, Ricciardi MJ. Concordant improvements in coronary flow reserve and ST-segment resolution during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a benefit of postconditioning. *Catheter Cardiovasc Interv* 2008;72:212-20.
162. Thibault H, Piot C, Staat P, et al. Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* 2008;117:1037-44.
163. Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB. Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol* 1986;251:H1306-15.
164. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003;83:1113-51.
165. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis* 2009;204:334-41.
166. Cohen MV, Liu GS, Downey JM. Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. *Circulation* 1991;84:341-9.
167. Liu Y, Downey JM. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol* 1992;263:H1107-12.
168. Ovize M, Aupetit JF, Rioufol G, et al. Preconditioning reduces infarct size but accelerates time to ventricular fibrillation in ischemic pig heart. *Am J Physiol* 1995;269:H72-9.
169. Sumeray MS, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces infarct size following global ischaemia in the murine myocardium. *Basic Res Cardiol* 1998;93:384-90.
170. Tomai F, Crea F, Chiariello L, Gioffre PA. Ischemic preconditioning in humans: models, mediators, and clinical relevance. *Circulation* 1999;100:559-63.
171. Dirnagl U, Becker K, Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol* 2009;8:398-412.
172. Macedo FI, Miranda LE. Role of ischemic preconditioning in liver transplant: a review of literature. *Exp Clin Transplant* 2010;8:1-3.
173. Bonventre JV. Kidney ischemic preconditioning. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:43-8.

174. Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA. Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 1991;260:H796-804.
175. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 2001;104:3158-67.
176. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993;72:1293-9.
177. Argaud L, Ovize M. [How to use the paradigm of ischemic preconditioning to protect the heart?]. *Med Sci (Paris)* 2004;20:521-5.
178. 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;84:350-6.
179. Mei DA, Nithipatikom K, Lasley RD, Gross GJ. Myocardial preconditioning produced by ischemia, hypoxia, and a KATP channel opener: effects on interstitial adenosine in dogs. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1225-36.
180. Liu GS, Richards SC, Olsson RA, Mullane K, Walsh RS, Downey JM. Evidence that the adenosine A3 receptor may mediate the protection afforded by preconditioning in the isolated rabbit heart. *Cardiovasc Res* 1994;28:1057-61.
181. Maas JE, Wan TC, Figler RA, Gross GJ, Auchampach JA. Evidence that the acute phase of ischemic preconditioning does not require signaling by the A(2B) adenosine receptor. *J Mol Cell Cardiol* 2010.
182. Suzuki K, Miura T, Miki T, Tsuchida A, Shimamoto K. Infarct-size limitation by preconditioning is enhanced by dipyridamole administered before but not after preconditioning: evidence for the role of interstitial adenosine level during preconditioning as a primary determinant of cardioprotection. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:1-9.
183. Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1995;77:611-21.
184. Schulz R, Post H, Vahlhaus C, Heusch G. Ischemic preconditioning in pigs: a graded phenomenon: its relation to adenosine and bradykinin. *Circulation* 1998;98:1022-9.
185. Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* 1995;268:H2157-61.
186. Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta1- but not mu- or kappa-opioid receptors. *Circulation* 1998;97:1282-9.
187. Wang GY, Wu S, Pei JM, Yu XC, Wong TM. Kappa- but not delta-opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H384-91.
188. Aitchison KA, Baxter GF, Awan MM, Smith RM, Yellon DM, Opie LH. Opposing effects on infarction of delta and kappa opioid receptor activation in the isolated rat heart: implications for ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 2000;95:1-10; discussion 1.
189. Yao L, Wong GT, Xia Z, Irwin MG. Interaction Between Spinal Opioid and Adenosine Receptors in Remote Cardiac Preconditioning: Effect of Intrathecal Morphine. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2010.
190. Wang P, Gallagher KP, Downey JM, Cohen MV. Pretreatment with endothelin-1 mimics ischemic preconditioning against infarction in isolated rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:579-88.
191. Gourine AV, Molosh AI, Poputnikov D, Bulhak A, Sjoquist PO, Pernow J. Endothelin-1 exerts a preconditioning-like cardioprotective effect against ischaemia/reperfusion injury via the ET(A) receptor and the mitochondrial K(ATP) channel in the rat in vivo. *Br J Pharmacol* 2005;144:331-7.
192. Liu Y, Tsuchida A, Cohen MV, Downey JM. Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:883-92.
193. Das S, Otani H, Maulik N, Das DK. Redox regulation of angiotensin II preconditioning of the myocardium requires MAP kinase signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:248-55.
194. Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:207-16.

195. Das DK, Maulik N, Sato M, Ray PS. Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol Cell Biochem* 1999;196:59-67.
196. Nishida M, Maruyama Y, Tanaka R, Kontani K, Nagao T, Kurose H. G alpha(i) and G alpha(o) are target proteins of reactive oxygen species. *Nature* 2000;408:492-5.
197. Tokube K, Kiyosue T, Arita M. Openings of cardiac KATP channel by oxygen free radicals produced by xanthine oxidase reaction. *Am J Physiol* 1996;271:H478-89.
198. Nakano A, Liu GS, Heusch G, Downey JM, Cohen MV. Exogenous nitric oxide can trigger a preconditioned state through a free radical mechanism, but endogenous nitric oxide is not a trigger of classical ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:1159-67.
199. Post H, Schulz R, Behrends M, Gres P, Umschlag C, Heusch G. No involvement of endogenous nitric oxide in classical ischemic preconditioning in swine. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:725-33.
200. Lochner A, Marais E, Genade S, Moolman JA. Nitric oxide: a trigger for classic preconditioning? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H2752-65.
201. Miyawaki H, Ashraf M. Ca²⁺ as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res* 1997;80:790-9.
202. Przyklenk K, Hata K, Kloner RA. Is calcium a mediator of infarct size reduction with preconditioning in canine myocardium? *Circulation* 1997;96:1305-12.
203. Wallbridge DR, Schulz R, Braun C, Post H, Heusch G. No attenuation of ischaemic preconditioning by the calcium antagonist nisoldipine. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:1801-10.
204. Horimoto H, Gaudette GR, Saltman AE, Krukenkamp IB. The role of nitric oxide, K(+)(ATP) channels, and cGMP in the preconditioning response of the rabbit. *J Surg Res* 2000;92:56-63.
205. Thornton JD, Liu GS, Downey JM. Pretreatment with pertussis toxin blocks the protective effects of preconditioning: evidence for a G-protein mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:311-20.
206. Schultz Je-J, Hsu AK, Nagase H, Gross GJ. TAN-67, a delta 1-opioid receptor agonist, reduces infarct size via activation of Gi/o proteins and KATP channels. *Am J Physiol* 1998;274:H909-14.
207. Eskildsen-Helmond YE, Gho BC, Bezstarosti K, et al. Exploration of the possible roles of phospholipase D and protein kinase C in the mechanism of ischemic preconditioning in the myocardium. *Ann N Y Acad Sci* 1996;793:210-25.
208. Cohen MV, Liu Y, Liu GS, et al. Phospholipase D plays a role in ischemic preconditioning in rabbit heart. *Circulation* 1996;94:1713-8.
209. Johnson JA, Gray MO, Chen CH, Mochly-Rosen D. A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. *J Biol Chem* 1996;271:24962-6.
210. Gray MO, Karliner JS, Mochly-Rosen D. A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. *J Biol Chem* 1997;272:30945-51.
211. Liu GS, Cohen MV, Mochly-Rosen D, Downey JM. Protein kinase C-epsilon is responsible for the protection of preconditioning in rabbit cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1937-48.
212. Vondriska TM, Klein JB, Ping P. Use of functional proteomics to investigate PKC epsilon-mediated cardioprotection: the signaling module hypothesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1434-41.
213. Ping P, Zhang J, Qiu Y, et al. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res* 1997;81:404-14.
214. Yoshida K, Kawamura S, Mizukami Y, Kitakaze M. Implication of protein kinase C-alpha, delta, and epsilon isoforms in ischemic preconditioning in perfused rat hearts. *J Biochem* 1997;122:506-11.
215. Kitakaze M, Funaya H, Minamino T, et al. Role of protein kinase C-alpha in activation of ecto-5'-nucleotidase in the preconditioned canine myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:171-5.
216. Liu Y, Cohen MV, Downey JM. Chelerythrine, a highly selective protein kinase C inhibitor, blocks the anti-infarct effect of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 1994;8:881-2.
217. Maulik N, Yoshida T, Zu YL, Sato M, Banerjee A, Das DK. Ischemic preconditioning triggers tyrosine kinase signaling: a potential role for MAPKAP kinase 2. *Am J Physiol* 1998;275:H1857-64.

218. Baines CP, Wang L, Cohen MV, Downey JM. Protein tyrosine kinase is downstream of protein kinase C for ischemic preconditioning's anti-infarct effect in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:383-92.
219. Fryer RM, Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* 1999;276:H1229-35.
220. Vahlhaus C, Schulz R, Post H, Rose J, Heusch G. Prevention of ischemic preconditioning only by combined inhibition of protein kinase C and protein tyrosine kinase in pigs. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:197-209.
221. Tanno M, Tsuchida A, Nozawa Y, et al. Roles of tyrosine kinase and protein kinase C in infarct size limitation by repetitive ischemic preconditioning in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;35:345-52.
222. Ping P, Murphy E. Role of p38 mitogen-activated protein kinases in preconditioning: a detrimental factor or a protective kinase? *Circ Res* 2000;86:921-2.
223. Michel MC, Li Y, Heusch G. Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;363:245-66.
224. Nakano A, Baines CP, Kim SO, et al. Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart: evidence for involvement of p38 MAPK. *Circ Res* 2000;86:144-51.
225. Weinbrenner C, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. Phosphorylation of tyrosine 182 of p38 mitogen-activated protein kinase correlates with the protection of preconditioning in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2383-91.
226. Kim SO, Baines CP, Critz SD, et al. Ischemia induced activation of heat shock protein 27 kinases and casein kinase 2 in the preconditioned rabbit heart. *Biochem Cell Biol* 1999;77:559-67.
227. Behrends M, Schulz R, Post H, et al. Inconsistent relation of MAPK activation to infarct size reduction by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H1111-9.
228. Strohm C, Barancik T, Bruhl ML, Kilian SA, Schaper W. Inhibition of the ER-kinase cascade by PD98059 and UO126 counteracts ischemic preconditioning in pig myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:218-29.
229. Clerk A, Fuller SJ, Michael A, Sugden PH. Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinases (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. *J Biol Chem* 1998;273:7228-34.
230. Baines CP, Liu GS, Birincioglu M, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol* 1999;276:H1361-8.
231. Barancik M, Htun P, Schaper W. Okadaic acid and anisomycin are protective and stimulate the SAPK/JNK pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34:182-90.
232. Sato M, Cordis GA, Maulik N, Das DK. SAPKs regulation of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H901-7.
233. Saurin AT, Martin JL, Heads RJ, et al. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *FASEB J* 2000;14:2237-46.
234. Maulik N, Watanabe M, Zu YL, et al. Ischemic preconditioning triggers the activation of MAP kinases and MAPKAP kinase 2 in rat hearts. *FEBS Lett* 1996;396:233-7.
235. Marais E, Genade S, Huisamen B, Strijdom JG, Moolman JA, Lochner A. Activation of p38 MAPK induced by a multi-cycle ischaemic preconditioning protocol is associated with attenuated p38 MAPK activity during sustained ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:769-78.
236. Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, et al. Role of phasic dynamism of p38 mitogen-activated protein kinase activation in ischemic preconditioning of the canine heart. *Circ Res* 2001;88:175-80.
237. Barancik M, Htun P, Strohm C, Kilian S, Schaper W. Inhibition of the cardiac p38-MAPK pathway by SB203580 delays ischemic cell death. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;35:474-83.
238. Schneider S, Chen W, Hou J, Steenbergen C, Murphy E. Inhibition of p38 MAPK alpha/beta reduces ischemic injury and does not block protective effects of preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H499-508.

239. Mocanu MM, Baxter GF, Yue Y, Critz SD, Yellon DM. The p38 MAPK inhibitor, SB203580, abrogates ischaemic preconditioning in rat heart but timing of administration is critical. *Basic Res Cardiol* 2000;95:472-8.
240. Cuenda A, Rouse J, Doza YN, et al. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 1995;364:229-33.
241. Clerk A, Sugden PH. The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs). *FEBS Lett* 1998;426:93-6.
242. Wadsworth SA, Cavender DE, Beers SA, et al. RWJ 67657, a potent, orally active inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:680-7.
243. Tong H, Chen W, Steenbergen C, Murphy E. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res* 2000;87:309-15.
244. Mocanu MM, Bell RM, Yellon DM. PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:661-8.
245. 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;61:448-60.
246. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983;305:147-8.
247. Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 1992;70:223-33.
248. Grover GJ, Garlid KD. ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:677-95.
249. Van Winkle DM, Chien GL, Wolff RA, Soifer BE, Kuzume K, Davis RF. Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the K_{ATP} channel. *Am J Physiol* 1994;266:H829-39.
250. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 1997;81:1072-82.
251. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 1998;97:2463-9.
252. Suzuki M, Sasaki N, Miki T, et al. Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest* 2002;109:509-16.
253. Laclau MN, Boudina S, Thambo JB, et al. Cardioprotection by ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and functional coupling between adenine nucleotide translocase and creatine kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:947-56.
254. Dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, et al. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H284-95.
255. Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A. ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol* 1999;519 Pt 2:347-60.
256. Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 2001;89:891-8.
257. Pain T, Yang XM, Critz SD, et al. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 2000;87:460-6.
258. Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res* 2001;88:802-9.
259. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 2002;55:534-43.
260. Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol* 2003;549:513-24.

261. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:1461-9.
262. Weinbrenner C, Liu GS, Downey JM, Cohen MV. Cyclosporine A limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Cardiovasc Res* 1998;38:678-84.
263. Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* 1997;86:699-709.
264. Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* 1997;87:1182-90.
265. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 1997;87:361-70.
266. Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology* 1999;91:1437-46.
267. Toller WG, Gross ER, Kersten JR, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 2000;92:1731-9.
268. Piriou V, Chiari P, Lhuillier F, et al. Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *Br J Anaesth* 2002;89:486-91.
269. Ismaeil MS, Tkachenko I, Gamperl AK, Hickey RF, Cason BA. Mechanisms of isoflurane-induced myocardial preconditioning in rabbits. *Anesthesiology* 1999;90:812-21.
270. Kersten JR, Orth KG, Pagel PS, Mei DA, Gross GJ, Warltier DC. Role of adenosine in isoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 1997;86:1128-39.
271. Toller WG, Kersten JR, Gross ER, Pagel PS, Warltier DC. Isoflurane preconditions myocardium against infarction via activation of inhibitory guanine nucleotide binding proteins. *Anesthesiology* 2000;92:1400-7.
272. Patel HH, Ludwig LM, Fryer RM, Hsu AK, Warltier DC, Gross GJ. Delta opioid agonists and volatile anesthetics facilitate cardioprotection via potentiation of K(ATP) channel opening. *FASEB J* 2002;16:1468-70.
273. Ludwig LM, Patel HH, Gross GJ, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. Morphine enhances pharmacological preconditioning by isoflurane: role of mitochondrial K(ATP) channels and opioid receptors. *Anesthesiology* 2003;98:705-11.
274. Uecker M, Da Silva R, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M. Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* 2003;99:138-47.
275. Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC. Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology* 2002;97:4-14.
276. da Silva R, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* 2004;100:59-69.
277. Ludwig LM, Weihrauch D, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. Protein kinase C translocation and Src protein tyrosine kinase activation mediate isoflurane-induced preconditioning in vivo: potential downstream targets of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reactive oxygen species. *Anesthesiology* 2004;100:532-9.
278. Tanaka K, Weihrauch D, Kehl F, et al. Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species. *Anesthesiology* 2002;97:1485-90.
279. Tanaka K, Weihrauch D, Ludwig LM, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. Mitochondrial adenosine triphosphate-regulated potassium channel opening acts as a trigger for isoflurane-induced preconditioning by generating reactive oxygen species. *Anesthesiology* 2003;98:935-43.

280. Mullenheim J, Ebel D, Frassdorf J, Preckel B, Thamer V, Schlack W. Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals. *Anesthesiology* 2002;96:934-40.
281. Hanley PJ, Ray J, Brandt U, Daut J. Halothane, isoflurane and sevoflurane inhibit NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of cardiac mitochondria. *J Physiol* 2002;544:687-93.
282. Ozcan C, Bienengraeber M, Dzeja PP, Terzic A. Potassium channel openers protect cardiac mitochondria by attenuating oxidant stress at reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H531-9.
283. Piriou V, Ross S, Pigott D, Evans R, Foex P. Beneficial effect of concomitant administration of isoflurane and nicorandil. *Br J Anaesth* 1997;79:68-77.
284. Hanouz JL, Yvon A, Massetti M, et al. Mechanisms of desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesthesiology* 2002;97:33-41.
285. Pravdic D, Sedlic F, Mio Y, Vlastic N, Bienengraeber M, Bosnjak ZJ. Anesthetic-induced preconditioning delays opening of mitochondrial permeability transition pore via protein Kinase C-epsilon-mediated pathway. *Anesthesiology* 2009;111:267-74.
286. Fujimoto K, Bosnjak ZJ, Kwok WM. Isoflurane-induced facilitation of the cardiac sarcolemmal K(ATP) channel. *Anesthesiology* 2002;97:57-65.
287. Piriou V, Chiari P, Gateau-Roesch O, et al. Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology* 2004;100:581-8.
288. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993;87:893-9.
289. Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, et al. Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol* 1999;277:H2451-7.
290. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 1998;275:H1542-7.
291. Brzozowski T, Konturek PC, Pajdo R, et al. Importance of brain-gut axis in the gastroprotection induced by gastric and remote preconditioning. *J Physiol Pharmacol* 2004;55:165-77.
292. Liauw SK, Rubin BB, Lindsay TF, Romaschin AD, Walker PM. Sequential ischemia/reperfusion results in contralateral skeletal muscle salvage. *Am J Physiol* 1996;270:H1407-13.
293. Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N, Rabinowitz B. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol* 1997;273:H1707-12.
294. Belaidi E, Beguin PC, Levy P, Ribuot C, Godin-Ribuot D. Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H901-8.
295. Donnelly TJ, Sievers RE, Vissers FL, Welch WJ, Wolfe CL. Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion? *Circulation* 1992;85:769-78.
296. Ovize M, Kloner RA, Przyklenk K. Stretch preconditions canine myocardium. *Am J Physiol* 1994;266:H137-46.
297. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 2005;111:194-7.
298. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2004;62:74-85.
299. 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;95:230-2.
300. Fang J, Wu L, Chen L. Postconditioning attenuates cardiocyte ultrastructure injury and apoptosis by blocking mitochondrial permeability transition in rats. *Acta Cardiol* 2008;63:377-87.
301. Kloner RA, Dow J, Bhandari A. Postconditioning markedly attenuates ventricular arrhythmias after ischemia-reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2006;11:55-63.

302. Garcia-Dorado D, Piper HM. Postconditioning: reperfusion of "reperfusion injury" after hibernation. *Cardiovasc Res* 2006;69:1-3.
303. Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004;61:365-71.
304. Skyschally A, van Caster P, Iliodromitis EK, Schulz R, Kremastinos DT, Heusch G. Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. *Basic Res Cardiol* 2009;104:469-83.
305. Manintveld OC, Te Lintel Hekkert M, van den Bos EJ, et al. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H1551-60.
306. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, 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.
307. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res* 2005;67:124-33.
308. Donato M, D'Annunzio V, Berg G, et al. Ischemic postconditioning reduces infarct size by activation of A1 receptors and K⁺(ATP) channels in both normal and hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;49:287-92.
309. Burley DS, Baxter GF. Pharmacological targets revealed by myocardial postconditioning. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:177-88.
310. Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Losano G, Pagliaro P. Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling. *Cardiovasc Res* 2007;75:168-77.
311. Xi L, Das A, Zhao ZQ, Merino VF, Bader M, Kukreja RC. Loss of myocardial ischemic postconditioning in adenosine A1 and bradykinin B2 receptors gene knockout mice. *Circulation* 2008;118:S32-7.
312. Bell RM, Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:185-93.
313. Penna C, Mancardi D, Tullio F, Pagliaro P. Postconditioning and intermittent bradykinin induced cardioprotection require cyclooxygenase activation and prostacyclin release during reperfusion. *Basic Res Cardiol* 2008;103:368-77.
314. Zatta AJ, Kin H, Yoshishige D, et al. Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H1444-51.
315. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res* 2004;94:960-6.
316. Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, Przyklenk K. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1618-26.
317. Schwartz LM, Lagranha CJ. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H1011-8.
318. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, et al. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 2004;113:1535-49.
319. Nishino Y, Webb IG, Davidson SM, et al. Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the mouse. *Circ Res* 2008;103:307-14.
320. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacol Ther* 2008;120:172-85.
321. Boengler K, Buechert A, Heinen Y, et al. Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice. *Circ Res* 2008;102:131-5.
322. Goodman MD, Koch SE, Fuller-Bicer GA, Butler KL. Regulating RISK: a role for JAK-STAT signaling in postconditioning? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1649-56.

323. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation* 2008;118:1915-9.
324. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, et al. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol* 2006;101:180-9.
325. Zatta AJ, Kin H, Lee G, et al. Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovasc Res* 2006;70:315-24.
326. Philipp S, Yang XM, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A_{2b} receptor cascade. *Cardiovasc Res* 2006;70:308-14.
327. 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;152:855-69.
328. Penna C, Cappello S, Mancardi D, et al. Post-conditioning reduces infarct size in the isolated rat heart: role of coronary flow and pressure and the nitric oxide/cGMP pathway. *Basic Res Cardiol* 2006;101:168-79.
329. Yang XM, Philipp S, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol* 2005;100:57-63.
330. Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15:69-75.
331. Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs. *Cardiovasc Drugs Ther* 2010;24:85-7.
332. Krolkowski JG, Bienengraeber M, Weihrauch D, Warltier DC, Kersten JR, Pagel PS. Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial K_{ATP} channels. *Anesth Analg* 2005;101:1590-6.
333. Preckel B, Schlack W, Comfere T, Obal D, Barthel H, Thamer 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;81:905-12.
334. Schlack W, Preckel B, Stunneck D, Thamer V. Effects of halothane, enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on myocardial reperfusion injury in the isolated rat heart. *Br J Anaesth* 1998;81:913-9.
335. Obal D, Preckel B, Scharbatke H, et al. One MAC of sevoflurane provides protection against reperfusion injury in the rat heart in vivo. *Br J Anaesth* 2001;87:905-11.
336. Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, Krolkowski JG, Kersten JR, Warltier 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;102:102-9.
337. Krolkowski JG, Weihrauch D, Bienengraeber M, Kersten JR, Warltier DC, Pagel PS. Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo. *Can J Anaesth* 2006;53:174-82.
338. Feng J, Fischer G, Lucchinetti E, et al. Infarct-remodeled myocardium is receptive to protection by isoflurane postconditioning: role of protein kinase B/Akt signaling. *Anesthesiology* 2006;104:1004-14.
339. Rakhit RD, Mojet MH, Marber MS, Duchon MR. Mitochondria as targets for nitric oxide-induced protection during simulated ischemia and reoxygenation in isolated neonatal cardiomyocytes. *Circulation* 2001;103:2617-23.
340. West MB, Rokosh G, Obal D, et al. Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia/reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition. *Circulation* 2008;118:1970-8.

341. Ge ZD, Pravdic D, Bienengraeber M, et al. Isoflurane postconditioning protects against reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition by an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Anesthesiology* 2010;112:73-85.
342. Yang XM, 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;44:1103-10.
343. Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, Pasch T, Perriard JC, Zaugg M. Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta. *Anesthesiology* 2005;103:987-95.
344. Weihrauch D, Krolikowski JG, Bienengraeber M, Kersten JR, Warltier DC, Pagel PS. Morphine enhances isoflurane-induced postconditioning against myocardial infarction: the role of phosphatidylinositol-3-kinase and opioid receptors in rabbits. *Anesth Analg* 2005;101:942-9, table of contents.
345. Pravdic D, Mio Y, Sedlic F, et al. Isoflurane protects cardiomyocytes and mitochondria by immediate and cytosol-independent action at reperfusion. *Br J Pharmacol* 2010;160:220-32.
346. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, et al. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol* 2005;100:404-12.
347. Andreaka G, Vertesaljai M, Szantho G, et al. Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart* 2007;93:749-52.
348. Schaller S, Paradis S, Ngoh GA, et al. TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;333:696-706.
349. Bopassa JC, Michel P, Gateau-Roesch O, Ovize M, Ferrera R. Low-pressure reperfusion alters mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H2750-5.
350. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation* 2007;115:1895-903.
351. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation* 1997;96:1641-6.
352. Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, et al. Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H1435-43.
353. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996;94:2193-200.
354. Schoemaker RG, van Heijningen CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1571-6.
355. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, et al. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H1883-90.
356. Xin P, Zhu W, Li J, et al. Combined local ischemic postconditioning and remote preconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H1819-31.
357. Tang XL, Sato H, Tiwari S, et al. Cardioprotection by postconditioning in conscious rats is limited to coronary occlusions <45 min. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H2308-17.
358. Dow J, Kloner RA. Postconditioning does not reduce myocardial infarct size in an in vivo regional ischemia rodent model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2007;12:153-63.
359. Kaljusto ML, Mori T, Mohammad Husain Rizvi S, et al. Postconditioning in rats and mice. *Scand Cardiovasc J* 2006;40:334-41.

360. Lee DS, Steinbaugh GE, Quarrie R, et al. Ischemic Postconditioning Does Not Provide Cardioprotection from Long-Term Ischemic Injury in Isolated Male or Female Rat Hearts. *J Surg Res* 2010.
361. Ferrera R, Benhabbouche S, Bopassa JC, Li B, Ovize M. One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23:327-31.
362. Tamareille S, Ghaboura N, Treguer F, et al. Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H2035-43.
363. Argaud L, Prigent AF, Chalabreysse L, Loufouat J, Lagarde M, Ovize M. Ceramide in the antiapoptotic effect of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H246-51.
364. Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol* 1985;121:522-30.
365. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
366. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;3:965-76.
367. Gomez L, Thibault H, Gharib A, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H1654-61.
368. Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 1975;54:311-4.
369. Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 1974;42:68-72.
370. Forman HJ, Azzi A. On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology. *FASEB J* 1997;11:374-5.
371. Antunes F, Cadenas E. Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett* 2000;475:121-6.
372. Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem* 1997;253:162-8.
373. Kumar A, Kaur H, Devi P, Mohan V. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. *Pharmacol Ther* 2009;124:259-68.
374. Mitchell P. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* 1975;56:1-6.
375. Swida-Barteczka A, Woyda-Ploszczyca A, Sluse FE, Jarmuszkiewicz W. Uncoupling protein 1 inhibition by purine nucleotides is under the control of the endogenous ubiquinone redox state. *Biochem J* 2009;424:297-306.
376. Yamamura T, Otani H, Nakao Y, et al. Dual involvement of coenzyme Q10 in redox signaling and inhibition of death signaling in the rat heart mitochondria. *Antioxid Redox Signal* 2001;3:103-12.
377. Degli Esposti M, Ngo A, McMullen GL, et al. The specificity of mitochondrial complex I for ubiquinones. *Biochem J* 1996;313 (Pt 1):327-34.

Résumé

Le postconditionnement cardiaque est paradoxal chez le rat. Certains auteurs ont montré que cet animal pouvait être protégé par le postconditionnement alors que d'autres ont montré qu'il était inefficace. L'objectif de notre travail était d'éclaircir cette situation et d'établir un lien entre la régulation des fonctions mitochondriales et la réussite ou l'échec du postconditionnement. Nous avons montré sur un modèle *in vivo* que le rat est sensible au postconditionnement cardiaque sous certaines conditions. Il semble que la réussite de cette thérapie nécessite à la fois une préservation de la phosphorylation oxydative, une inhibition de l'ouverture du mPTP et une diminution de la production de ROS. Nous avons également montré que le complexe I de la chaîne respiratoire régule l'ouverture du mPTP en liaison avec l'état de la Cyp D. L'ensemble de nos résultats montrent que le rat n'est pas réfractaire au postconditionnement, mais pour que celui-ci soit efficace, il est nécessaire de préserver l'intégrité des différentes fonctions mitochondriales. La cardioprotection et la régulation des fonctions mitochondriales sont donc spécifiquement liées au modèle utilisé.

Mots-clés

Ischémie-reperfusion, cardioprotection, préconditionnement, postconditionnement, mitochondrie, mPTP, phosphorylation oxydative, espèces réactives de l'oxygène, rat

Title

Regulation of mitochondrial functions in the cardioprotection – Particularity of the rat

Abstract

Cardiac postconditioning is paradoxical in rat. Certain authors showed that this animal could be protected by postconditioning whereas others showed that it was ineffective. The objective of our work was to clarify this situation and to establish a link between the regulation of the mitochondrial functions and the success or the failure of postconditioning. We showed on an *in vivo* model that the rat is sensitive to cardiac postconditioning under certain conditions. It seems that the success of this therapy requires at the same time a safeguarding of oxidative phosphorylation, an inhibition of the mitochondrial permeability transition pore opening and a reduction in the ROS production. We also showed that complex I of the respiratory chain controls the opening of the mPTP in relation with the state of Cyp D. Our results show that the rat is not insensitive to postconditioning, but it is necessary to preserve the integrity of the mitochondrial functions to be effective. The cardioprotection and the regulation of the mitochondrial functions are specifically related to the model used.

Key words

Ischemia-reperfusion, cardioprotection, preconditioning, postconditioning, mitochondria, mPTP, oxidative phosphorylation, reactive oxygen species, rat

Discipline

Physiologie Cardiovasculaire

Intitulé et adresse du laboratoire

INSERM U886

Laboratoire de Physiologie – Université Claude Bernard Lyon 1
8, avenue Rockefeller 69373 Lyon Cedex 08